UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Metabolismo oxidativo e estado redox tecidual dependente da função e do estado nutricional de operárias de *Apis mellifera* L.

Mário Sérgio Cervoni

**Ribeirão Preto - SP
2018**

MÁRIO SÉRGIO CERVONI

Metabolismo oxidativo e estado redox tecidual dependente da função e do estado nutricional de operárias de *Apis mellifera* L.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina
de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciência

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

**Ribeirão Preto - SP
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cervoni, Mário Sérgio

Metabolismo oxidativo e estado redox tecidual dependente da função e do estado nutricional de operárias de *Apis mellifera* L. Ribeirão Preto, 2018.

127 p.: 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Klaus Hartmann Hartfelder.

Apoio financeiro:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mário Sérgio Cervoni

Título da Tese: Metabolismo oxidativo e estado redox tecidual dependente da função e do estado nutricional de operárias de *Apis mellifera* L.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Aprovado em ____/____/____.

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Klaus Hartfelder, pelo exemplo de profissionalismo e eficiência, por sua orientação e ensinamentos ao longo desses anos e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

À Profa. Doutora Luciane C. Alberici, por ter disponibilizado seu tempo e equipamentos do laboratório, e por sua colaboração na realização e discussão dos experimentos.

Aos colaboradores Giovana Craveiro, Carlos A.M.C Júnior e Anderson de O. Souza por toda a ajuda prestada durante a realização dos experimentos e pela ajuda na interpretação e discussões dos resultados obtidos.

Ao técnico de apicultura Luiz R. Aguiar que ajudou na obtenção do material biológico para esse estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética e Biologia e Desenvolvimento de Insetos (LGBDI) pela amizade ao longo desses anos de convivência, pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos professores, funcionários e colegas do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de abelhas (LBDA) do Departamento de Genética – Bloco A, por toda a ajuda e ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos Roseli A. Ferreira e Anderson R. de Souza pela convivência e por toda ajuda prestada durante a rotina do laboratório.

À Profa. Doutora Evelin C. Cárnio por disponibilizar o laboratório e ao técnico Marcelo E. Batalhão pela colaboração durante a dosagem de NO.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pela contribuição durante minha formação e pela convivência.

Aos meus pais Ana e Sérgio, e a minha irmã Laís, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À minha namorada Giovana por seu amor e carinho, por estar por perto em todos os momentos, sempre me apoiando e incentivando.

A todos os meus amigos de Ribeirão Preto e Tabatinga por todo apoio e amizade demonstrados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e pessoal, muito obrigado.

Resumo

Cervoni, M.S. **Metabolismo oxidativo e estado redox tecidual dependente da função e do estado nutricional de operárias de *Apis mellifera* L.** 2018. 127p. Tese de Doutorado – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As operárias de *Apis mellifera* realizam diferentes tarefas de acordo com a sua idade (polietismo etário), sendo que operárias jovens cuidam da cria e quando mais velhas forrageiam. Entretanto, tal transição não segue uma cronologia fixa, mas se ajusta às necessidades da colônia, especialmente as condições nutricionais, tanto da colônia quanto dos indivíduos. Nesse sentido, abordamos a questão de como o metabolismo oxidativo no corpo gorduroso das operárias, i.e., o centro do metabolismo intermediário destes insetos, está relacionado com alterações da função das operárias na colônia e como o mesmo responde a um estresse nutritivo imposto individualmente em duas fases, na fase larval e na fase adulta. Como métodos para avaliar a atividade mitocondrial e o estado redox das células do corpo gorduroso utilizamos um sistema de respirometria de alta resolução para medir o consumo de O₂, e realizamos ensaios bioquímicos para quantificar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), os níveis de óxido nítrico, o número de unidades mitocondriais, e eventuais danos oxidativos resultantes. Ademais, por meio de PCR quantitativa medimos a expressão relativa de genes ligados à biogênese mitocondrial, ao sistema antioxidante e à via de sinalização por hipóxia.

Na comparação destes parâmetros entre operárias nutridoras e forrageiras avaliamos separadamente os três principais compartimentos do corpo (cabeça, tórax e abdômen) uma vez que esses estão diferencialmente relacionados a tais funções. Para os tecidos da cabeça observamos que as amostras de nutridoras apresentaram maior consumo de O₂, associado a uma maior produção de EROs e expressão elevada dos genes da via de hipóxia, enquanto forrageiras apresentaram maiores quantidades de transcritos dos genes do sistema antioxidantes e menores níveis de danos oxidativos. Para os tecidos do tórax observamos nas forrageiras uma maior capacidade de produção de ATP, acompanhada de uma elevada expressão de genes codificadores de enzimas do sistema antioxidante e menores níveis de danos oxidativos. Com relação aos tecidos abdominais, as abelhas nutridoras apresentaram maior atividade mitocondrial, enquanto as amostras de forrageiras apresentaram maior número de unidades mitocondriais, elevados níveis EROs e também uma expressão elevada dos genes do sistema antioxidante e da via de hipóxia. Assim, os dados revelaram uma clara mudança na atividade mitocondrial e nos padrões redox teciduais associados a esta transição de polietismo etário. Também notamos diferenças nestes parâmetros para cada compartimento do corpo analisado, refletindo uma demanda energética diferencial em cada tecido.

A segunda parte do projeto teve como objetivo avaliar os mesmos parâmetros redox em uma situação de restrição alimentar em três situações distintas. O primeiro grupo experimental foi constituído de larvas que sofreram restrição calórica por um

período de 10 horas. O segundo grupo foi composto por abelhas recém emergidas que sofreram ou não tal restrição calórica no período larval. O terceiro grupo consistiu de abelhas que sofreram ou não restrição calórica no período larval, e após emergirem foram mantidas em caixas até atingirem a idade de 7 dias, quando foram submetidos novamente a uma restrição calórica. Para o primeiro grupo, as larvas, verificamos que após o período de restrição calórica os genes relacionados com a biogênese mitocondrial e o sistema antioxidante apresentaram níveis de expressão menores comparadas com larvas controle. Observamos também que larvas que sofreram restrição calórica apresentaram menor consumo de O_2 e menores níveis de EROs. Para o segundo grupo, as abelhas recém emergidas, não observamos nenhuma diferença na expressão de genes mitocondriais e do sistema antioxidante entre as que sofreram ou não restrição calórica na fase larval, demonstrando uma recuperação nestes parâmetros após o período de metamorfose. No terceiro grupo, as abelhas de 7 dias foram submetidas a uma nova restrição calórica para observar se indivíduos que passaram por a situação de estresse no período larval apresentariam uma resposta mais imediata a um estresse nutricional na fase adulta. Os resultados do terceiro grupo revelaram que abelhas que haviam sido expostas a uma situação prévia de restrição calórica, apresentaram uma redução dos transcritos de genes ligados a biogênese mitocondrial e do sistema antioxidante quando comparados ao grupo que sofreu restrição calórica apenas na fase adulta. Em conjunto nossos dados sugerem que a restrição calórica é capaz de diminuir o metabolismo oxidativo e que existe uma resposta aparentemente adaptativa em indivíduos adultos que passaram por essa situação previamente durante o desenvolvimento larval. Assim, esses resultados podem servir para direcionar estudos futuros sobre a relação entre restrição calórica, metabolismo oxidativo e longevidade nesses insetos sociais.

Palavras chaves: abelhas melíferas, consumo de oxigênio, biogênese mitocondrial, estado redox, via de sinalização por hipóxia, restrição calórica.

Abstract

Cervoni, M.S. **Oxidative metabolism and redox state dependent on the function and nutritional status of *Apis mellifera* L. workers**. 2018. 127p. PhD thesis – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Apis mellifera workers perform different tasks according to their age (age polyethism), where young workers care for the brood and older ones become foragers. However, this a transition does not follow a fixed chronology, but is fitted to the needs of the colony, especially the nutritional conditions of both, the colony and the individual bee. In this sense, we address the question of how oxidative metabolism in the fat body of the workers, e.g., the center of the intermediary metabolism of these insects, is related to changes in the function of the workers in the colony, and how these parameters responds to a nutritional stress imposed individually in two stages, in the larval and adult phase. For evaluating mitochondrial activity and the redox status of fat body cells we used a high resolution respirometry system to measure O₂ consumption, and we performed biochemical assays to measure the generation of reactive oxygen species (ROS), levels of nitric oxide, the number of mitochondrial units, and eventual oxidative damages. Furthermore, using quantitative PCR, we measured the relative expression of genes linked to mitochondrial biogenesis, to the antioxidant system, and to the hypoxia signaling pathway.

In the comparison of these parameters between nurse and forager workers, we evaluated separately the three main body compartments (head, thorax and abdomen), since these are differentially related to these functions. For the head tissues, we observed that nurses showed higher O₂ consumption, associated with higher ROS production and elevated expression of hypoxia pathway genes, while foragers presented higher amounts of transcripts of the antioxidant system genes and lower levels of oxidative damages. For the thorax tissues we found in the foragers a greater capacity of ATP production, accompanied by a higher expression of genes encoding enzymes of the antioxidant system and lower levels of oxidative damage. With respect to the abdominal tissues, nurse bees presented higher mitochondrial activity, while foragers had a higher number of mitochondrial units, elevated ROS levels, and also a higher expression of genes related to the antioxidant system and hypoxia pathway. Thus, these data revealed a clear change in mitochondrial activity and redox tissue patterns associated with this transition of age polyethism. We also noticed differences in these parameters for each of the analyzed body compartment, reflecting a differential energy demand in each tissue.

The second part of the project aimed to evaluate the same redox parameters in a food restriction condition in three distinct situations. The first experimental group consisted of larvae that experienced caloric restriction for a 10 hour period. The second group consisted of newly emerged bees that had or not experienced such a caloric restriction in the larval period. The third group consisted of bees that had experienced or not caloric restriction during the larval period, and after emergence were kept in boxes until reaching 7 days old, when they were resubmitted to another caloric

restriction. For the first group, the larvae, we found that after the period of caloric restriction, genes related to mitochondrial biogenesis and the antioxidant system presented lower levels of expression compared to control larvae. We also observed that larvae that had experienced caloric restriction presented lower O₂ consumption and lower ROS levels. For the second group, newly emerged bees, we did not observe any differences in the expression of mitochondrial genes and the antioxidant system among those individuals that had experienced or not caloric restriction in the larval phase, indicating a recovery in these parameters after the period of metamorphosis. In the third group, the 7-day-old bees had experienced a new caloric restriction to see whether individuals that had been in a stressful situation during larval period would respond more readily to nutritional stress in adulthood. The results for this group showed that bees that had been exposed to a previous caloric restriction presented a reduction in the transcript levels of genes related to mitochondrial biogenesis and the antioxidant system when compared to the group that experienced caloric restriction only in adulthood. Taken together, our data suggest that caloric restriction is able to diminish the oxidative metabolism, and that there is a seemingly adaptive response in adult individuals that had previously experienced this situation during larval development. Thus, these results can serve to direct future studies on the relationship between caloric restriction, oxidative metabolism and longevity in these social insects.

Key words: honey bees, oxygen consumption, mitochondrial biogenesis, redox state, hypoxia signaling pathway, caloric restriction.

Lista de Figuras

Figura 1	2
Figura 2	3
Figura 3	6
Figura 4	14
Figura 5	17
Figura 6	32
Figura 7	34
Figura 8	34
Figura 9	35
Figura 10	36
Figura 11	38
Figura 12	38
Figura 13	39
Figura 14	41
Figura 15	41
Figura 16	42
Figura 17	42
Figura 18	44
Figura 19	44
Figura 20	45
Figura 21	46
Figura 22	47
Figura 23	47
Figura 24	48
Figura 25	49
Figura 26	49
Figura 27	50
Figura 28	52
Figura 29	68

Figura 30	69
Figura 31	70
Figura 32	70
Figura 33	73
Figura 34	74
Figura 35	75
Figura 36	76
Figura 37	78
Figura 38	78
Figura 39	79
Figura 40	79
Figura 41	80
Figura 42	82
Figura 43	84

Lista de Tabelas

Tabela I	31
----------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
CI	respiração ligada ao complexo I
CII	respiração ligada ao complexo II
Ct	ciclo do limiar (threshold cycle)
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DEPC	dietilpirocarbonato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETS	sistema transportador de elétrons
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIF	fator induzido por hipóxia
IIS	via de sinalização insulínica
M	molar
mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetros
OXPHOS	fosforilação oxidativa
O ₂ • ⁻	superóxido
PCR	reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	RT-PCR quantitativa
rpm	rotações por minuto

RT	transcrição reversa
s	segundos
TOR	alvo da rapamicina
µg	microgramas
µl	microlitros
U	unidades
<i>X g</i>	força centrífuga relativa

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Poletismo etário	5
1.2 Nutridoras x Forrageiras	6
1.3 Relação entre HJ e vitelogenina	8
1.4 Vias de sinalização – IIS/TOR	9
1.5 Via de sinalização por hipóxia	11
1.6 Envelhecimento, metabolismo oxidativo e restrição calórica	14

CAPÍTULO I

2. OBJETIVO GERAL	21
2.1 Objetivos específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Material biológico	23
3.2 Consumo de O ₂	23
3.3 Atividade da citrato sintase (CS)	25
3.4 Produção de EROs	25
3.5 Quantificação de NO	26
3.6 Proteína carbonilada	27
3.7 Peroxidação de lipídeos	28
3.8 Análise da Expressão gênica	28
3.8.1 Extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA	28
3.8.2 RT-qPCR	29
3.9 Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Cabeça	32

4.2 Tórax	40
4.3 Abdômen	45
4.4 NO	51
5. DISCUSSÃO	53
5.1 Cabeça	53
5.2 Tórax	57
5.3 Abdômen	59
6. CONCLUSÃO	63

CAPÍTULO II

7. OBJETIVO GERAL	65
7.1 Objetivos específicos	65
8. MATERIAL E MÉTODOS	67
8.1 Restrição calórica em larvas	67
8.2 Obtenção de abelhas adultas e restrição calórica nesses indivíduos	67
9. RESULTADOS	69
9.1 Efeitos gerais da restrição calórica na fase larval	69
9.1.1 Mortalidade larval	69
9.1.2 Massa corpórea, proteína e RNA total em abelhas recém emergidas	69
9.2 Efeito da restrição calórica sobre genes mitocondriais e do sistema antioxidante em larvas e operárias adultas recém emergidas	71
9.3 Consumo de O ₂ e estado redox em larvas	76
9.4 Expressão do gene <i>Amsima</i> (<i>HIF-α</i>)	80
9.5 Efeito da restrição calórica larval sobre genes mitocondriais e do sistema antioxidantes em operárias adultas que passaram por uma segunda restrição ..	81
10. DISCUSSÃO	85

10.1 Efeitos da restrição calórica em larvas e abelhas adultas sobre a expressão de genes da biogênese mitocondrial e do sistema antioxidante	86
10.2 Consumo de oxigênio e produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à restrição calórica em larvas	89
11. CONCLUSÃO	92
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
13. APÊNDICE	111
13.1 Apêndice 1.....	111
13.2 Apêndice 2.....	112
13.3 Apêndice 3.....	113

1. Introdução

As abelhas do gênero *Apis mellífera* pertencem a ordem Hymenoptera, que inclui os principais grupos de insetos altamente eusociais entre as abelhas, vespas e formiga. Tais se caracterizam por apresentarem divisão de trabalho nas colônias, diferenciação de castas e sobreposição de gerações (Michener, 1974; Winston, 1987). Hymenópteros são insetos holometábolos e, portanto, possuem metamorfose completa, passando por quatro estágios sequenciais de desenvolvimento: o embrionário, larval, pupal e adulto.

Em uma colônia de abelhas melíferas são encontrados três tipos de indivíduos fenotipicamente distintos: zangões, operárias, e uma única rainha (Figura 1). Os zangões são machos, e estes são gerados a partir de ovos não fertilizados (indivíduos haploides). A função dos zangões no contexto da colmeia pode ser resumida em acasalar-se com uma rainha virgem durante o voo nupcial. O número de zangões na colmeia pode variar de acordo com as condições da colônia e a época do ano, ficando geralmente entre algumas centenas ou nenhum indivíduo. Já entre as fêmeas, que são geradas a partir de ovos fecundados (diploides), encontram-se duas castas morfológica e fisiologicamente distintas: as operárias e uma única rainha. As operárias, que representam a maioria da população de uma colônia, que tipicamente consiste de cerca de 30.000 indivíduos, são responsáveis por atividades de manutenção da colmeia e cuidados com a cria. Já a rainha é a única fêmea fértil dentro de uma colônia, capaz de ser fecundada e produzir centenas de ovos por dia. A rainha mantém o seu monopólio reprodutivo dentro da colmeia por meio de sinais químicos.

Figura 1- Indivíduos adultos (respectivamente operária, rainha e zangão) encontrados em uma colônia de abelhas *Apis mellifera*. Imagem obtida na internet, acessado 20/08/18. Disponível em <http://media.web.britannica.com/eb-media/28/91428-034-B47AA1F1.jpg>.

Os ovos são depositados pela rainha nos alvéolos dos favos de cera e as larvas eclodem após 72 horas. No início do desenvolvimento larval, uma larva fêmea é um indivíduo ainda bipotente, i.e, o seu destino de casta ainda não está definido e, assim, a mesma poderá desenvolver-se em uma rainha ou operária. De fato, o destino de casta é determinado por meio da alimentação diferencial oferecida às larvas pelas operárias nutridoras, e em termos gerais, essa capacidade de um mesmo genótipo gerar diferentes fenótipos a partir de estímulos ambientais é conhecida por plasticidade fenotípica. Até o segundo estágio larval todas larvas fêmeas são alimentadas com uma secreção rica em proteínas e lipídeos, produzida por glândulas cefálicas das operárias nutridoras, a glândula hipofaríngea e a glândula mandibular. Após o terceiro estágio larval, larvas destinadas a se tornarem rainhas continuam a serem alimentadas com tal secreção, denominado geleia real, enquanto larvas destinadas a desenvolverem-se em operárias recebem uma dieta mista, composto de secreções das mesmas glândulas, suplementadas com pólen e mel (Haydak, 1970). Além da alimentação de futuras rainhas e operárias diferir na qualidade, ela também

varia na quantidade, sendo que uma larva destinada a ser uma rainha recebe até 10 vezes mais alimento quando comparada com uma larva de operária.

Para ter efeitos morfogenéticos, a alimentação diferencial recebida pelas larvas fêmeas precisa ser traduzida em sinais endógenos, e uma alteração casta-específica logo observada ocorre no sistema neuroendócrino. Larvas de rainhas que receberam geleia real durante toda a fase de alimentação larval apresentam um aumento na atividade biosintética dos *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizado no complexo retrocerebral responsável pela síntese do hormônio juvenil (HJ) (Rachinsky e Hartfelder, 1990; Hartfelder e Engels, 1998). Essa diferença nos CA é manifestada por um elevado título de HJ em larvas de rainhas que pode ser observado tanto no extrato larval total como nos títulos desse hormônio na hemolinfa (Rembold, 1987a; Rachinsky *et al.*, 1990). HJ é uma molécula morfogenética que atua na regulação do crescimento e desenvolvimento de determinados órgãos de insetos. Especificamente, durante o desenvolvimento dos insetos holometábolos impede a metamorfose, permitindo o crescimento da larva. No caso das abelhas melíferas, o HJ é considerado o fator endógeno de maior importância no processo de indução de desenvolvimento de rainhas (Rembold, 1987b). Embora as castas de rainhas e operárias passem pelos mesmos estágios de desenvolvimento larval (Figura 2), existem diferenças casta-específicas com relação as taxas de crescimento e o tempo de desenvolvimento até se tornarem indivíduos adultos (Rembold, 1987a; Nunes-Silva *et al.* 2006).

Figura 2 – Tempo de desenvolvimento desde o ovo até indivíduos adultos para zangões, operárias e rainhas de abelhas *Apis mellifera*. Modificado de Winston (1987). Imagem obtida na internet, acessado 20/08/18. Disponível em <http://www.entomologa.ru/images/outline/figures/12.5.jpg>.

Durante o período de desenvolvimento larval foram também descritas diferenças no metabolismo oxidativo de rainhas e operárias. Análises da relação entre consumo de O₂ e produção de CO₂ em larvas individuais, revelaram que larvas de rainhas possuem atividade metabólica oxidativa mais elevada quando comparadas com larvas de operárias (Melampy e Willis, 1939). Também foi demonstrado que larvas de rainhas possuem maior atividade de citocromo oxidase e maior conteúdo de citocromo c, demonstrando possuírem maior número de mitocôndrias do que larvas de operárias (Osanai e Rembold, 1968). A análise da expressão gênica mostrou-se de acordo com os ensaios bioquímicos, sendo que larvas de rainhas possuem maior nível de expressão dos genes mitocondriais (Corona *et al.*, 1999). Trabalhos mais recentes usando um sistema de respirometria de alta resolução confirmaram que larvas de rainhas possuem consumo mais elevado de O₂ e uma maior capacidade de produzir ATP no corpo gorduroso, principal tecido metabólico de insetos (Santos *et al.*, 2016). Relacionado ao metabolismo oxidativo, a via de sinalização por hipóxia também apresentou expressão diferencial de seus genes centrais durante o desenvolvimento larval de rainhas e operárias (Azevedo *et al.*, 2011), sugerindo que a regulação do metabolismo oxidativo é um dos fatores centrais no processo de diferenciação de castas.

Embora os parâmetros oxidativos já tenham sido razoavelmente bem descritos durante o período de desenvolvimento larval, existem poucas informações sobre o consumo de O₂ e a atividade mitocondrial em abelhas adultas. Uma vez que a atividade mitocondrial está relacionada com fatores comportamentais, como foi recentemente descrita para o comportamento de agressão em *A. mellifera* (Rittschof *et*

al., 2018), é possível que no contexto da divisão de trabalho entre operárias adultas também ocorram alterações no estado redox e vias de sinalizações.

1.1 Polietismo etário

Além da divisão de trabalho entre as castas de rainhas e operárias que está relacionada com a divisão reprodutiva do trabalho, também existe a divisão de trabalho entre as abelhas adultas operárias. A divisão do trabalho entre as operárias pode ocorrer de forma física ou temporal. A forma física é mais comum em formigas (Hymenoptera) e cupins (Isoptera), que apresentam castas morfologicamente especializadas que desenvolvem tarefas específicas (Wilson, 1971). Entre operárias adultas de *A. mellifera* é encontrada a divisão do trabalho de forma temporal, também conhecida por polietismo etário, no qual a função é desempenhada de acordo com a idade do indivíduo, portanto, com o avanço de sua idade cronológica ele passa por estágios de comportamentos sucessivos ao longo de sua vida (Figura 3).

Uma abelha operária vive em torno de 30 a 40 dias, e de acordo com o polietismo etário, podemos classificar as operárias em cinco grandes grupos (baseado na classificação de Seeley, 1982): faxineiras (1º ao 5º dia) são responsáveis pela limpeza dos favos; nutrizes ou nutridoras (5º ao 10º dia) cuidam da alimentação das larvas e apresentam grande desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, produtoras da geleia real; construtoras (11º ao 20º dia) possuem grande desenvolvimento das glândulas cerígenas, usadas na produção de cera para construir os favos, além de receberem e desidratarem o néctar depositado nos favos para a produção do mel; guardas (18º ao 21º dia) responsáveis pela defesa da colmeia, possuem órgãos de defesa bem desenvolvidos e grande acúmulo de veneno; e forrageiras (22º até a morte) que coletam o néctar, pólen, água e resina. Embora essas funções sejam progressivas de acordo com a idade, há ampla flexibilidade

dependendo das necessidades da colmeia, como no caso de distúrbio da colônia por infestação de parasitas e em condições de escassez de alimento (Harris e Woodring, 1992; Schulz *et al.*, 1998; Amdam *et al.*, 2004; Goblirsch *et al.*, 2013). Essa divisão de trabalho permite que a colônia funcione como uma unidade social, favorecendo a homeostase da colmeia ao invés de abelhas individuais.

Figura 3 – Divisão de trabalho e os estágios comportamentais de abelhas operárias adultas em função de sua idade cronológica. Foto tirada por Z.Y. Huang. Imagem obtida na internet, acessado 20/08/18. Disponível em <https://beespotter.org/topics/social/images/Age%20polyethism.jpg>.

1.2 Nutridoras x Forrageiras

As fases de nutridora e forrageira são os dois estágios de vida mais estáveis das abelhas. Apesar de abelhas nutridoras e forrageiras não apresentarem diferenças

morfológicas externas, para realizarem tais unções elas passam por mudanças fisiológicas que incluem alteração na expressão gênica e proteica, no metabolismo bioquímico e no sistema imune (Whitfield *et al.*, 2003; Amdam *et al.*, 2004, 2005; Remolina *et al.*, 2007; Alaux *et al.*, 2009). Abelhas nutridoras, cuja principal função é alimentar as larvas, apresentam acúmulo de proteínas e lipídeos no corpo gorduroso abdominal, um tecido que possui função análoga ao fígado dos vertebrados, também apresentam hipertrofia da glândula hipofaríngea, um par de glândulas cefálicas responsável pela secreção de geleia real. Nutridoras se alimentam de grande quantidade de pólen (principal fonte de aminoácidos das abelhas), aumentando assim sua reserva de nutrientes no corpo gorduroso e a capacidade da glândula hipofaríngea de produzir secreções. Após a transição para a função de forrageira, a abelha perde metade de suas reservas de lipídeos no abdômen e apresenta redução no tamanho da glândula hipofaríngea (Fluri *et al.*, 1982; Deseyn e Billen, 2005; Toth *et al.*, 2005; Ament *et al.*, 2010). As abelhas forrageiras saem da colmeia para coletar pólen usando suas corbículas, e néctar que é armazenado em uma vesícula melífera (papo de mel), uma estrutura especializada do intestino anterior. De volta à colônia elas regurgitam o néctar coletado para outras abelhas operárias que são responsáveis por estocarem os alimentos trazidos pelas forrageiras. Diferentemente das abelhas nutridoras elas consomem muito pouco pólen, sendo que sua principal fonte de alimento é o mel (Winston, 1987), fornecendo grande quantidade de carboidratos para suprir a demanda energética para as atividades de forrageamento.

A transição de tarefa de uma abelha nutridora para a função de forrageira está diretamente correlacionada com a sua expectativa de vida. Quando na fase de nutridora, as abelhas apresentaram sinais de senescência apenas após 30 – 50 dias, porém, uma vez que passa a exercer o papel de forrageira sua expectativa de vida passa a ser de apenas 7 – 10 dias (Münch e Amdam, 2010). Essa baixa expectativa de vida de uma forrageira ocorre devido a uma soma de fatores de risco, que envolve questões extrínsecas e intrínsecas. Fatores extrínsecos incluem a predação,

desidratação, desorientação e a exaustão física que estão relacionados com os riscos de se distanciar da colmeia, enquanto os fatores intrínsecos estão relacionados com o processo de envelhecimento do organismo, especialmente a imunosenescência.

O processo de senescência é definido como uma perda ou diminuição das funções biológicas, sobrevivência ou reprodução de um organismo devido ao aumento de sua idade cronológica (Finch, 1990), sendo uma característica comum entre organismos multicelulares (Lithgow e Kirkwood, 1996; Kirkwood e Austad, 2000). O processo de senescência em operárias de *A.mellifera* está diretamente relacionado com a sua função na colmeia. Abelhas nutridoras que prorrogam sua mudança de função para forrageiras aumentam consideravelmente sua expectativa de vida, e experimentalmente, por meio de manipulação nas condições da colônia, foi possível reverter o fenótipo de forrageira para nutridora, e tal reversão foi acompanhado de uma reversão dos sinais de senescência, especialmente da imunosenescência (Amdam *et al*, 2005; Robinson *et al.*, 1992). A análise dos padrões de metilação do DNA também revelou diferença entre abelhas nutridoras e forrageiras, e esse padrão se mostrou reversível, uma vez que forrageiras forçadas a voltarem à função de nutridora apresentaram um rearranjo do seu padrão de metilação, demonstrando uma plasticidade no padrão de metilação associado com o comportamento do indivíduo (Herb *et al.*, 2012).

1.3 Relação entre HJ e vitelogenina

A transição das atividades intranidais (dentro da colmeia, especificamente nutridora) para atividades extranidais (fora da colmeia, forrageira) é precedida por diversas mudanças, como na atividade secretora de glândulas endócrinas e exócrinas (Fahrbach e Robinson, 1995; Robinson e Vargo, 1997), além da estrutura e expressão gênica no cérebro (Fahrbach e Robinson, 1996; Fahrbach *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2005). O HJ é um fator importante na regulação dessa transição, e seus níveis na

hemolinfa aumentam antes do início do período de forrageamento (Huang e Robinson, 1992; Robinson, 2002; Sullivan *et al.*, 2003), permanecendo mais elevado em forrageiras em comparação com nutridoras.

Em insetos uma das principais funções de HJ é de participar na regulação da vitelogênese (ver revisão recente em Santos *et al.*, 2018), processo no qual ocorre a deposição de nutrientes no ovócito, principalmente da família de glicoproteínas vitelogenina (Vg), principal proteína depositada durante esse processo. Vg, que é sintetizada nas células do corpo gorduroso e liberada na hemolinfa, em *A. mellifera* possui um tamanho aproximado de 180-kDa (Wheeler e Kawooya, 1990). Em 2006 Seehuus e colaboradores demonstram que em abelhas operárias Vg atua como agente antioxidante, correlacionando a presença de Vg com uma maior resistência ao estresse oxidativo causado pelo tratamento com paraquat. Também foi sugerido um papel de Vg na longevidade de rainhas ao promover um aumento na resistência ao estresse oxidativo nessa casta (Corona *et al.*, 2007). Na maioria dos insetos existe uma correlação positiva dos títulos de HJ e Vg. A alatectomia (retirada do *corpora allata*) inibe o acúmulo de vitelo nos ovócitos e a aplicação de HJ ou seus análogos em insetos alatectomizados é capaz de resgatar o fenótipo, mostrando o papel desse hormônio na ovogênese (Bell e Barth, 1971; Davey, 1981). Em contrapartida, em *A. mellifera* a correlação entre HJ e Vg é negativa (Fluri *et al.*, 1981; Fahrbach e Robinson *et al.*, 1995; Hartfelder e Engels, 1998; Bloch *et al.*, 2002), abelhas nutridoras possuem baixos títulos de HJ e altos títulos de Vg, enquanto que em abelhas forrageiras é observado um padrão oposto. Dessa forma, Vg e HJ juntos apresentam funções regulatórias tanto à nível da colônia, coordenando a divisão de trabalho, quanto à nível individual, ao fornecer proteção contra o estresse oxidativo.

1.4 Vias de sinalização – IIS/TOR

A sinalização mediada por nutrientes é outro fator que influencia a divisão de trabalho entre as abelhas operárias, e de maior relevância entre essas cascatas estão

vias de sinalização altamente conservadas em eucariotos, como a via de sinalização por insulina (IIS - *insulin–insulin like signaling*) e alvo da rapamicina (TOR – *target of rapamycin*) que regulam processos de crescimento e proliferação celular, envelhecimento, fertilidade, entre outros processos biológicos (Brogiolo *et al.*, 2001; Oldham e Hafen, 2003). A via IIS é uma via neuroendócrina que, entre outras funções, monitora os níveis de nutrientes em todo o organismo, enquanto a via TOR monitora principalmente os níveis intracelulares de nutrientes.

Em *A. mellifera* o eixo IIS/TOR foi descrito em estudos que investigaram a diferenciação de castas (Wheeler *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007; Azevedo e Hartfelder, 2008; Wolschin *et al.*, 2011), a divisão do trabalho e a longevidade diferencial em rainha e operárias adultas (Corona *et al.*, 2007). Forrageiras apresentam níveis de expressão dos genes da via IIS mais elevado em comparação com nutridoras, enquanto a inibição da via de TOR retarda o início do forrageamento (Ament *et al.*, 2008). Outro ponto a ser destacado quanto ao eixo IIS/TOR é que essa cascata tem conexão com o HJ, sendo que o *knockdown* por meio de RNA de interferência (RNAi) de genes dessas vias causou um declínio dos níveis de HJ, e a aplicação desse hormônio após o *knockdown* foi suficiente para resgatar o fenótipo, sugerindo que o HJ atua a jusante das vias IIS/TOR (Mutti *et al.*, 2011).

Estudos em *Drosophila melanogaster* também apontam para uma interação entre IIS e HJ (Tatar *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2005). Entretanto, a análise da expressão dos genes dessas vias durante o desenvolvimento larval de rainhas e operárias, revelou uma surpreendente diferença em comparação com outros organismos modelos, entre eles *D. melanogaster*. No período em que larvas de rainhas apresentam uma maior taxa de crescimento quando comparadas com larvas de operárias (Wang, 1965; Thrasyvoulou e Benton, 1982), os níveis de transcrição dos genes que codificam os dois receptores de insulina estão menores em rainhas. Também, o gene *AmILP-2*, que codifica um dos dois peptídeos semelhantes a insulina e que é predominantemente expresso em abelhas melíferas, está mais expresso em

larvas de operárias (Azevedo e Hartfelder, 2008). Um padrão inesperado foi também encontrado para a via TOR, uma vez que o *knockdown* da função TOR em larvas por RNAi causou a expressão de características de operárias (Patel *et al.*, 2007), enquanto análises dos níveis de transcritos mostraram que tor é mais expresso em larvas operárias (Hartfelder *et al.*, 2015). Esse padrão inesperado de expressão dos genes das vias IIS e TOR, gerou uma busca por outras vias de sinalizações que interagem com o eixo IIS/TOR, e estudos em vertebrados e invertebrados evidenciaram que dentre essas vias está a via de sinalização por hipóxia.

1.5 Via de sinalização por hipóxia

Um desafio fisiológico dos organismos é suprir a demanda celular de O₂, portanto, os sistemas sensores de O₂ precisam atuar em diferentes níveis, podendo regular diretamente as quantidades de O₂ entregues aos órgãos e tecidos ou alterando o metabolismo celular para situações de diferentes disponibilidades de O₂. Dentre os reguladores do metabolismo celular que respondem aos níveis de O₂ está a via de sinalização por hipóxia, cujos três principais componentes são os fatores induzíveis por hipóxia (HIFs) α e β , e uma enzima modificadora, a prolilhidroxilase (PHD - *prolyl hydroxylase domain*). O fator HIF foi identificado inicialmente em células de hepatoma (Semenza e Wang, 1992), sendo posteriormente verificado sua expressão global em células de mamíferos, além de ser conservado em insetos (Nagao *et al.*, 1996) e até em metazoários muito basais como *Trichoplax adhaerens* (Loenarz *et al.*, 2011). Em 2011, Azevedo e colaboradores, identificaram e anotaram em *A. mellifera* os três genes centrais da via de sinalização por hipóxia: *Amsima* (HIF α), *Amtango* (HIF β) e *Amfatiga* (PHD).

HIF se liga ao DNA por meio da formação de um heterodímero entre as subunidades α e β , que pertencem a família de proteínas hélice-volta-hélice (bHLH - *basic helix-loop-helix*) com domínio PAS (Per-Arnt-Sim) (Wang *et al.* 1995). Esses domínios estão envolvidos em interações proteína-proteína e são frequentemente

encontrados em proteínas sinalizadoras, funcionando como sensores de sinalização (Ponting e Aravind, 1997; Hefti *et al.*, 2004). A enzima PHD é uma dioxigenase que requer a presença de O₂ molecular para hidroxilar resíduos prolil específicos que estão contidos no domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD - *oxygen-dependent degradation domain*) na subunidade HIF- α (Bruick e McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001).

O fato de sua dependência de O₂ como co-substrato para suas atividades, aponta para um mecanismo que sugere que a enzima PHD atue como um sensor de O₂. Em condições de normóxia, a enzima mantém sua atividade catalítica dependente de O₂ e hidroxila constantemente os resíduos prolina de HIF- α . Essa modificação permite que HIF- α sofra uma ubiquitinação dependente de pVHL (*von-Hippel-Lindau protein*) direcionando HIF- α para ser degradado via proteassomo (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Os resíduos hidroxilados de prolina são reconhecidos por pVHL através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de hidroxiprolina, essa ligação não se forma com resíduos de prolina não hidroxilados (Hon *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2002). A hidroxilação aumenta a afinidade de HIF- α por pVHL em mais de mil vezes, o que leva a sua alta degradação na presença de O₂ (Loenarz *et al.*, 2009). Já em condições de hipóxia, a atividade de PHD é reduzida o que permite a estabilidade de HIF- α , que é então transportado para o núcleo onde dimeriza com HIF- β , e este dímero se liga a elementos responsivos à hipóxia (HREs), controlando assim a expressão dos genes regulados por essa via (Wang *et al.*, 1995) (Figura 4).

Foi demonstrado que a ligação do complexo HIF ao DNA é responsável por regular diretamente a transcrição de mais de 500 genes (Mole *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009; Schödel *et al.*, 2011), resultando em ajustes da fisiologia celular e a resposta adaptativa ao estresse, como em processos metabólicos (incluindo a homeostase de O₂), metabolismo energético, crescimento e diferenciação celular, além de estar envolvida com longevidade (Semenza, 1998; Wenger, 2002; Fuchs *et al.*, 2010).

Em insetos foi demonstrada a importância de HIF durante o processo de ramificação traqueal (Centanin *et al.*, 2008, 2010). Outros trabalhos mostraram que HIF é regulado por microRNAs (Kulshreshtha *et al.*, 2007) e também interage com outras vias de sinalização (Gustafsson *et al.*, 2005; Olson e van der Vliet, 2011; Stegeman *et al.*, 2016) iniciando cascatas secundárias de ativação de vias de sinalização, o que torna a resposta de HIF extremamente complexa. A subunidade β é expressa de maneira constitutiva e pode formar dímero com outros membros da família, portanto, a subunidade α pode ser considerada o regulador específico da resposta a hipóxia.

A análise de expressão dos três genes homólogos da via de sinalização por hipóxia, *Amsima*, *Amtango* e *Amfatiga*, durante o desenvolvimento larval de *A. mellifera* revelou que larvas de operárias expressam níveis significativamente mais elevados desses genes em comparação com larvas de rainhas (Azevedo *et al.*, 2011). Entretanto, pelo fato dessas larvas serem criadas lado a lado em células abertas nos favos de cria, não há razões para crer que larvas de operárias sejam expostas a concentrações mais baixas de O₂. Assim, considera-se que o fato de os genes da hipóxia estarem mais expressos nessas larvas possa estar relacionado com diferenças no metabolismo oxidativo e/ou com interações dessa via com outras vias de sinalização para regular o processo de diferenciação de castas (Azevedo *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2016).

Figura 4 – Esquema representativo da via de sinalização por hipóxia. Imagem obtida de Thirlwell *et al.*, 2011.

1.6 Envelhecimento, metabolismo oxidativo e restrição calórica

A transição de função de uma abelha nutridora para forrageira é acompanhada por uma alta taxa de mortalidade (Rueppell *et al.*, 2007). Embora o estado comportamental (nutridora ou forrageira) seja em grande parte responsável pelo aumento da mortalidade, as abelhas apresentam características de senescência em função da idade cronológica que independem de sua função. Por exemplo, foi medida em função da idade cronológica a resistência a três fatores causadores de estresse: restrição alimentar, estresse oxidativo e estresse térmico. As abelhas com idades mais avançadas se mostraram menos resistentes e esses fatores de estresse, evidenciando sinais de senescência celular (Remolina *et al.*, 2007). Análises do metabolismo

energético em células do corpo gorduroso abdominal, revelaram que abelhas mais jovens possuem maior status energético celular, sugerindo um declínio do metabolismo energético em função da idade (Hsu e Chuang, 2014).

Dentre as teorias que explicam o envelhecimento, destaca-se a teoria do estresse oxidativo, que propõe que espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma das principais causas da senescência celular (Harman, 1956). EROs são consideradas moléculas altamente reativas, dentre elas estão o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem diversas fontes geradoras de EROs, entre as quais estão NADPH oxidases (NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), porém, a mitocôndria pode ser considerada a principal fonte de EROs que são gerados como subprodutos do processo da respiração (Halliwell, 1991). A maior parte de EROs mitocondriais é gerado na cadeia transportadora de elétrons (Chance *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 2002; Murphy, 2009). A energia necessária para realizar o processo de fosforilação oxidativa, processo no qual o ADP (adenosina difosfato) é fosforilado e convertido em ATP (adenosina trifosfato), é gerada através de reações de óxido-redução que acontecem nos complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Os elétrons provenientes do processamento dos nutrientes são passados para a coenzima NAD^+ (dinucleótido de nicotinamina e adenina), essa coenzima funciona como um agente oxidante, sendo reduzida a NADH após receber dois elétrons e um próton (H^+) do substrato energético. NADH atua como um carregador de elétrons, transportando-os da extremidade de menor para a extremidade de maior potencial de redução da cadeia, chegando até o O_2 que funciona como o aceptor final de elétrons (Balaban *et al.*, 2005).

Existem quatro grandes complexos proteicos, localizados na membrana interna da mitocôndria que compõe a cadeia transportadora de elétrons: Complexo I (NADH desidrogenase), Complexo II (succinato desidrogenase), Complexo III (complexo dos citocromos bc_1) e o Complexo IV (citocromo c oxidase). Os complexos I e II são responsáveis por transferir os elétrons para a coenzima Q (ubiquinona), porém,

utilizam diferentes fontes doadoras de elétrons, sendo NADH a usada pelo Complexo I e FADH₂ a do Complexo II. A ubiquinona é capaz de mover-se pela camada bilipídica e, após receber elétrons provenientes dos complexos I e II, transloca-se para o Complexo III. Esse complexo será o responsável por transferir os elétrons da ubiquinona para o citocromo c, uma proteína solúvel que pode mover-se livremente, sendo capaz de transportar os elétrons até o Complexo IV, que por sua vez transfere os elétrons para o O₂ (aceptor final de elétrons) que é reduzido a H₂O.

O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV gera um bombeamento de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria (espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria), e o aumento da concentração de H⁺ nesse espaço gera um gradiente eletroquímico no qual os prótons tendem a difundir-se de volta ao interior da mitocôndria por meio de canais proteicos, como é o caso da ATP sintase (Complexo V) que irá promover a fosforilação oxidativa (Balaban, 2009). O fluxo constante de elétrons na cadeia transportadora (Figura 5) é mantido por meio de desidrogenases do Ciclo de Krebs que fornecem os nucleotídeos piridina NADH e FADH₂. Durante o processo de transporte na cadeia respiratória pode ocorrer o vazamento de elétrons que, ao reagirem com O₂, formam EROs. Esse vazamento ocorre principalmente nos Complexos I e III, embora, outras enzimas como é o caso do Complexo II também sejam capazes de gerar EROs (Murphy, 2009; Quinlan *et al.*, 2013). Os elétrons que vazam da cadeia transportadora reagem com O₂ produzindo o radical O₂^{•-}, que rapidamente é convertido em H₂O₂ por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) (Weisiger e Fridovich, 1973; Okado e Fridovich, 2001; Turrens, 2003). No citosol a SOD predominantemente encontrada é a que usa cobre e zinco como cofator (CuZnSOD), enquanto nas mitocôndrias a forma predominante é a SOD que usa o manganês como cofator (MnSOD). O H₂O₂ gerado é um produto mais estável que é capaz de atravessar a membrana celular e se difundir pela célula atuando como molécula sinalizadora. Seus níveis são regulados pelo sistema antioxidante presente no citosol, como as enzimas catalase (Cat), glutational

peroxidase (GPx) e tioredoxina peroxidase (Tpx) (Nordberg e Arnér, 2001; Wang *et al.*, 2012).

Figura 5- Cadeia transportadora de elétrons. A ilustração mostra o fluxo de elétrons ao longo dos complexos presentes na membrana mitocondrial interna. Imagem obtida em "Oxidative phosphorylation: Figure 3," por Openstax College, Biology (CC BY 3.0). Disponível em https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVAgrZ@7/Oxidative-Phosphorylation. Data do acesso 20/08/2018.

EROs podem ser chamados de moléculas Janus, pois quando mantido em níveis fisiológicos adequados, EROs funcionam como moléculas sinalizadoras, regulando o estado redox e o metabolismo oxidativo (Finkel, 2011). Entretanto, quando presente em excesso são responsáveis por provocar danos oxidativos, causando a deterioração de DNA, proteínas e lipídeos (Cross *et al.*, 1987). Devido a sua capacidade de causar danos a macromoléculas, EROs são consideradas como uma força primária no processo de senescência e um determinante da expectativa de vida (Harman, 1956). Alternativamente, o $O_2^{\cdot -}$ produzido pelas mitocôndrias pode reagir com óxido nítrico (NO) produzindo peroxinitrito (Groves, 1999), um oxidante capaz de

provocar inibição da respiração mitocondrial além de causar danos a outros componentes do metabolismo oxidativo (Szabó e Ohshima, 1997; Foresti *et al.*, 1999).

Enzimas da família de óxido nítrico sintases (NOSs) geram NO a partir do aminoácido L-arginina (Moncada e Erusalimsky, 2002). Esse gás é altamente difusível, característica pela qual se destaca como uma molécula sinalizadora intra e intercelular, envolvida na regulação de diversos processos, como na manutenção de homeostase, em funções do trato gastrointestinal, na atividade de neurônios, entre outros (Moncada e Higgs, 1993; Salzman, 1995; Estrada e Murillo-Carretero, 2005). Outra característica pela qual NO se destaca é pela sua capacidade de se ligar de maneira competitiva com O₂ no complexo IV (citocromo c oxidase), regulando desse modo a taxa de respiração celular e a sinalização mitocondrial (Brown e Borutaite, 2001; Cooper, 2002). Altas concentrações de NO podem estabilizar HIF- α em condições de normóxia, ao impedir a utilização do O₂ pela célula, causando uma hipóxia metabólica, e também pela sua capacidade de inibir PHD evitando assim que HIF- α seja marcado para degradação (Moncada e Erusalimsky, 2002; Murphy, 2003; Olson e van der Vliet, 2011).

Outro fato que está relacionado com o processo de envelhecimento é a restrição calórica, que é definida como uma redução na ingestão de alimentos sem causar desnutrição, sendo que essa relação já foi descrita em diversos organismos. Indivíduos submetidos a restrição calórica apresentam uma redução de aspectos de senescência, retardam o aparecimento de patologias associadas com o aumento da idade, além de terem uma expectativa de vida estendida (Holehan e Merry, 1986; Weindruch *et al.*, 1986; Yu, 1996; Fontana *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a restrição calórica é capaz de reduzir o metabolismo e as taxas de consumo de O₂, resultando em uma menor produção de EROs e menores taxas de danos oxidativos (Sohal e Weindruch, 1996), sendo esse mecanismo umas das formas pela qual a restrição calórica é capaz de aumentar a expectativa de vida. A restrição calórica durante fases iniciais do desenvolvimento é capaz de gerar efeitos nos indivíduos

adultos, enquanto alguns estudos relatam efeitos benéficos como uma resposta com valor adaptativo frente a esse mesmo estímulo (Lee e Zucker, 1988; Simpson *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2009; Kuzawa *et al.*, 2010; van den Heuvel *et al.*, 2013), outros trabalhos relataram efeitos maléficos, correlacionando esse estresse nutricional com o aumento a suscetibilidade de desenvolver doenças (Barker, 2004; Roseboom *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2009). Em *A. mellifera* a restrição calórica por um período curto de tempo revelou efeitos benéficos para operárias adultas (Wang *et al.*, 2016a,b), enquanto um estresse nutricional prolongado durante a fase larval resultou em adultos com menor taxa de sobrevivência e menos efetivos na tarefa de forrageamento (Scofield e Mattila, 2015).

A via de sinalização por hipóxia apresenta um papel na modulação desses processos, sendo que HIF- α atua no controle do metabolismo oxidativo, influencia a longevidade do indivíduo e apresenta variações de sua atividade em resposta a restrição calórica, sendo descrito como um dos elementos responsáveis pelo aumento da longevidade em resposta a restrição calórica (Chen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Semenza, 2011). Assim, nesse trabalho iremos abordar aspectos do metabolismo oxidativo e estado redox discutidos acima em dois capítulos. O Capítulo I aborda esses aspectos durante a transição de função de abelhas nutridoras para forrageiras. A nossa hipótese é que a atividade mitocondrial diferencial associada a produção de EROs tem uma relação com a divisão de trabalho e influencia no processo de senescência observado em abelhas que iniciam sua atividade de forrageamento. O Capítulo II aborda o metabolismo oxidativo e estado redox em resposta a efeitos da restrição calórica. Nesse capítulo testamos a hipótese de que a redução da ingestão de alimentos promove uma redução das taxas metabólicas e da geração de EROs, fatores que estão ligados com a longevidade. No capítulo II também foi avaliado a possibilidade de uma resposta adaptativa em indivíduos que tenham vivenciado esse estresse nutricional de maneira prévia, durante o desenvolvimento larval, e que tal

resulta em uma resposta mais rápida quando esse estresse nutricional ocorre novamente na fase adulta.

Capítulo I - A atividade mitocondrial diferencial associada a produção de EROs em relação com a divisão de trabalho em operárias de *Apis mellifera*

2. Objetivo geral

Esse capítulo tem como objetivo geral avaliar o estado redox dos três principais compartimentos do corpo de insetos (cabeça, tórax e abdômen) comparando duas fases de vida de abelhas operárias adultas: nutridoras e forrageiras. Embora muitos aspectos envolvidos nessa transição de função já tenham sido descritos, como a regulação por HJ e Vg (Huang e Robinson, 1992; Amdam *et al.*, 2003) e o papel das vias IIS/TOR (Ament *et al.*, 2008), ainda há pouca informação sobre o estado redox desses tecidos e se danos causados por estresse oxidativo podem estar relacionados com o processo de senescência acelerado que é observado nas abelhas forrageiras.

2.1 Objetivos específicos

- 1 – Avaliar, por meio de quantificação do consumo de O₂ na presença de diferentes substratos da respiração celular, se a mudança de função no polietismo etário das abelhas adultas é acompanhada por alterações na capacidade mitocondrial; e correlacionar a atividade metabólica com as demandas energéticas de cada compartimento de acordo com o estágio de vida da abelha;
- 2 - Verificar se há diferenças no número de unidades mitocondriais funcionais entre abelhas nutridoras e forrageiras relacionadas as funções dos respectivos compartimentos do corpo;
- 3 – Relacionar a geração de EROs a possíveis danos oxidativos causados pelo excesso dessas moléculas;

4 – Inferir sobre a capacidade de proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo por meio da quantificação relativa da expressão de genes codificadores de enzimas do sistema antioxidante;

5- Testar se a expressão dos três principais genes ligados a via de sinalização por hipóxia correlacionando com a atividade mitocondrial de cada compartimento do corpo.

3. Material e Métodos

3.1 Material biológico

A coleta das abelhas *Apis mellifera* africanizadas híbridas foi feita em colmeias mantidas no apiário experimental localizado no Departamento de Genética na Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. A coleta de nutridoras e forrageiras foi baseada no comportamento exclusivo de cada uma dessas fases de vida. Nutridoras foram coletadas diretamente dos favos de cria no interior da colmeia, no momento em que realizavam a alimentação das larvas, um comportamento exclusivo de abelhas nutridoras. As abelhas forrageiras foram coletadas na entrada da colmeia, sendo reconhecidas por apresentarem a corbícula carregada com pólen. Para os experimentos, os grupos foram coletados simultaneamente e da mesma colônia para minimizar variações que poderiam ser atribuídas a diferenças genéticas de cada colônia.

Antes do início de cada experimento as abelhas coletadas foram anestesiadas em gelo para permitir a sua manipulação. Na anestesia os três compartimentos (cabeça, tórax e abdômen) foram separados e processados de acordo com cada experimento. No caso do abdômen foram removidos o ferrão e o intestino, enquanto para os outros compartimentos foram utilizados todos os tecidos do compartimento.

3.2 Consumo de O₂

O consumo de O₂ nos diferentes compartimentos do corpo foi medido usando um sistema de respirometria de alta resolução (OROBOROS Oxygraph® Oroboros Instrument, Innsbruck, Austria) que possui um eletrodo do tipo oxygraph-2k. Após serem separados do restante do corpo foi feita uma incisão nos compartimentos para permitir o acesso do substrato ao tecido. O material biológico foi então inserido na

câmara de reação contendo 2 ml do meio de respiração MiR05 (0,5mM EGTA, 3mM MgCl₂.6H₂O, 20mM taurina, 10mM KH₂PO₄, 20mM HEPES, 1g/L BSA, 60mM potássio de ácido lactobionico, 110mM sacarose) sob agitação magnética constante e temperatura de 30 °C. O consumo de oxigênio foi medido nos seguintes estados respiratórios: (I) no estado rotina ou basal foi determinado o consumo de O₂ basal, sem a adição de substratos mitocondriais; (II) a respiração ligada ao Complexo I foi avaliada após a adição de piruvato e malato (10 mM; Sigma-Aldrich), que são substratos desse complexo; (III) o estado de fosforilação oxidativa (OXPHOS) foi determinado após a adição de ADP (220 mM; Sigma-Aldrich), que é convertido em ATP pelo complexo V; (IV) em seguida foi adicionado o reagente oligomicina (1 mg/ml, Sigma-Aldrich), um inibidor do complexo V, esse estado respiratório também é conhecido por *Leak State* (L); (V) o sistema transportador de elétrons (ETS), ou estado desacoplado, foi determinado adicionando-se o desacoplador químico carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP; Sigma-Aldrich) em 4 adições sequenciais de 1 µM cada, esse composto acelera o fluxo de elétrons na cadeia respiratória; (VI) por fim foi utilizado o reagente Antimicina A (3 mM; Sigma-Aldrich), que bloqueia o complexo III, e por meio deste foi determinada a respiração não mitocondrial ou residual, o valor desse consumo de O₂ foi subtraído dos outros estados respiratórios, permitindo que avaliássemos somente o consumo de O₂ referente a atividade mitocondrial.

Após o término do experimento os tecidos foram retirados da câmara de reação e transferidos para tubos Eppendorf contendo o tampão RIPA (NaCl 0,75M, SDS 0,5%, Tris 0,25M, Triton X-100 5%, EDTA suplementado com ortovanadato 100mM, ácido sódico pirofosfato 100 mM, PMSF 100mM, leupeptina 1%, todos reagentes da empresa Sigma-Aldrich) e estocados no freezer a -20 °C. Esse material foi posteriormente processado e a atividade da citrato sintase (CS) foi determinada e usada para normalizar os dados de respirometria. Assim, os dados da respirometria foram calculados no formato pmol O₂/ unidade de CS.

3.3 Atividade da citrato sintase (CS)

A atividade de citrato sintase foi medida como um correlato do número de mitocôndrias presentes nas amostras. Para o ensaio as amostras foram homogeneizadas em solução-tampão trietanolamina/ácido clorídrico (TEA/HCl) (0,1M; pH 8,0), em seguida foram centrifugadas durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e usado para a dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford (1976). Em uma placa de 96 poços foi determinada a cinética da atividade de citrato sintase. Para tal foi utilizado um equivalente de 10 µg de proteína do sobrenadantes coletado anteriormente. Tal qual foi adicionado juntamente com um meio reacional contendo TEA/HCl (0,1 M; pH 8,0), acetil-CoA (0,3 mM; Sigma-Aldrich), oxaloacetato (0,5 mM, Sigma-Aldrich), Triton X-100 (0,25%; Sigma-Aldrich) e 0,1mM do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB; Sigma-Aldrich). A atividade foi medida em temperatura ambiente durante 10 min em um espectrofotômetro (Varian Cary 50 MPR, Australia) em um comprimento de onda de 412 nm, de acordo com Srere (1969). As medidas foram feitas em quintuplicatas experimentais e os valores da absorbância foram normalizados pela quantidade de proteína das respectivas amostras.

3.4 Produção de EROs

Medimos a produção de H₂O₂ como um correlato da produção de EROs nos tecidos de interesse. As medidas foram feitas em temperatura ambiente e sob constante agitação, em um espectrofluorímetro (F-4500 Hitachi) no qual incubamos as amostras de tecido em um meio reacional contendo 2 ml de meio MiR05 (0,5mM EGTA, 3mM MgCl₂.6H₂O, 20mM taurina, 10mM KH₂PO₄, 20mM HEPES, 1g/L BSA, 60mM potássio de ácido lactobionico, 110mM sacarose), piruvato e malato (10 mM;

Sigma-Aldrich), 4 µl da enzima horseradish peroxidase (HRP; Thermo Fisher Scientific) (0,1 U/ml) e 2 µl do reagente Amplex® Red a uma concentração inicial de 50 µM (Molecular Probes/ThermoFisher, Eugene, OR, USA). A sonda Amplex® Red reage em uma proporção estequiométrica de 1:1 com H₂O₂, e na presença de HRP produz um composto altamente fluorescente, a resofurina, cuja fluorescência pode ser detectada por meio de uma excitação no comprimento de onda de 570 nm e emissão em 585 nm. Ao final do experimento o material foi coletado e as proteínas foram dosadas pelo método Bradford (1976), e esses valores foram usados para normalizar a quantidade de fluorescência. Para uma estimativa da quantidade de H₂O₂ presente na amostra, os valores de fluorescência obtidos foram comparados com uma curva padrão que foi gerada por adições sequenciais de H₂O₂ (40 nM) ao mesmo meio de reação utilizado para as amostras biológicas.

3.5 Quantificação de NO

Foi utilizada a técnica NO/ozônio para medir as quantidades de NO presente na amostra. Uma vez que NO é um produto muito instável e de difícil detecção, os produtos estáveis de sua oxidação (nitratos) são medidos como uma estimativa da quantidade de NO presente na amostra.

Num primeiro passo, os homogenatos amostrais foram desproteinizados por precipitação com álcool. Para tal, cada 20 µl do tecido homogeneizado foi incubado com 40 µl de etanol 95% a 4 °C durante 30 min, seguido de centrifugação a 5.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi então coletado e amostras de 10 µl deste foram injetadas na câmara de reação do aparelho Sievers NO Analysis (Sievers 280 NOA, GE Analytical Instruments). A câmara contém um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCL 1N a 95 °C), e a reação entre esses compostos converte o nitrato em NO em quantidades equimolares. Utilizando o gás hélio, o NO é então aspirado para a

câmara de quimiluminescência do aparelho Sievers NO Analysis, onde ele reage com ozônio e emite luz vermelha. Os fótons emitidos são convertidos em sinais elétricos e a corrente gerada é transformada por meio de um conversor analógico-digital e analisada em um computador anexado. Com base na área sob a curva gerada por essa corrente elétrica é possível estimar as quantidades de nitrato presente na amostra, a partir de uma curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (0, 5, 10, 15, 30 e 60 pmol).

3.6 Proteína carbonilada

Para esse ensaio as amostras foram homogeneizadas em 100 µl de tampão Tris 0,1 M (pH 7,4) gelado e posteriormente centrifugadas a 1.500 x *g* durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram então separados em duas alíquotas, sendo que uma delas serviu como controle no final do experimento. Ambas alíquotas foram incubadas com 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% e as amostras foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 10 min a 4 °C. Após o final da centrifugação foi possível observar a formação de um pellet, que em uma das alíquotas foi ressuscitado em 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) 10 mM diluída em HCL 2,5 M, enquanto a segunda alíquota, que representava o controle, foi ressuscitada apenas em 1 ml de HCL 2,5 M (Reznick e Packer, 1994). As amostras foram incubadas durante 1h a 37 °C na ausência de luz. Ao término da incubação foi adicionado 1 ml de TCA 10% aos tubos e as amostras foram mantidas em banho de gelo durante 10 min, seguido de uma nova centrifugação a 5.000 x *g* durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Os pellets formados foram lavados 3 vezes com 1 ml de uma solução etanol:acetato de etila (1:1) e centrifugados a 5.000 x *g* durante 5 min a 4 °C. Os pellets formados foram dissolvidos em 2 ml de guanidina 6M (Sigma-Aldrich) sob agitação constante durante 40 min. Ao final da agitação as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (Cary 50MPR) no comprimento de onda de 340 nm. Guanidina 6M

foi usada como branco e o experimento foi normalizado pela quantidade de proteína estimada por ensaio de Bradford (1976). O resultado final corresponde a absorbância da amostra dividida pela concentração de proteína, e o resultado desse produto foi então dividido pelo coeficiente de extinção molar ($1,8 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.7 Peroxidação de lipídeos

Os níveis de peroxidação lipídica foram detectados usando o ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Esse ensaio detecta os níveis de MDA (malondialdeído), um dos principais produtos da oxidação de lipídeos. Nesse ensaio o ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com MDA e forma um subproduto de cor vermelha que pode ser detectado por espectrofotômetro.

As amostras foram incubadas em TBA (Sigma-Aldrich) 0,4% diluído em HCL 0,2 M e 0,2% de butil hidroxitolueno (Sigma-Aldrich) e foram aquecidas a 90 °C durante 45 min. Em seguida foi adicionado 1 ml de n-butanol (Sigma-Aldrich), a mistura foi agitada e as amostras foram mantidas a 10 °C durante 10 min e foram então centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 2 min. A densidade óptica da camada sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50MPR) no comprimento de onda de 535 nm.

3.8 Análises da expressão gênica

3.8.1 Extração de RNA e síntese de primeira fita cDNA

O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando 500 µl do reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas e mantidas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 500 µl de clorofórmio (Merck Millipore), seguido de agitação rigorosa por 15

s e incubação por 3 min em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 x g a 4 °C por 15 min e retirou-se então o sobrenadante contendo o RNA (fase aquosa). O RNA foi precipitado em 250 µl de álcool isopropílico (Merck Millipore) seguido de centrifugação a 12.000 x g a 4 °C por 10 min. O precipitado de RNA foi lavado em 500 µl de etanol 75% e ressuspendido, seguido por centrifugação a 7.500 x g a 4 °C por 5 min. O etanol foi removido e o material foi completamente seco em um termobloco a 55 °C. O pellet de RNA obtido foi ressuspendido em água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich) 0,1 % para evitar sua degradação.

A qualidade do RNA foi acessada em um espectrofotômetro (NanoVue, GE Healthcare) por leitura a 260 nm, e a pureza da amostra foi analisada pela razão da leitura 260/280 nm que tem que ser superior a 1,8. O RNA extraído foi então tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen) com o propósito de eliminar resquícios de DNA genômico. A digestão foi realizada durante 30 min a 37 °C. Em seguida foi adicionado 2 µl de EDTA (Thermo Fisher Scientific) 25 mM por 10 min a 65 °C para inativar a enzima. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita por transcrição reversa a partir de 3 µg do RNA total de acordo com o protocolo do fabricante do sistema SuperScript II (Life Technologies) e um primer oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Life Technologies).

3.8.2 RT-qPCR

A análise dos níveis de transcritos foi realizada por PCR quantitativa em tempo real com alíquotas dos cDNAs diluídos 10 vezes e primers específicos para cada gene de interesse (Tabela I). A metodologia empregada nos ensaios de RT-qPCR foi a do SYBR Green (Applied Biosystems) e as análises foram feitas no sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação consistiu de 7,5 µl de SYBR Green, 0,5 µl de cada um dos respectivos primers forward e reverse (diluídos a 10 pM/µl), 1,5 µl do respectivo cDNA e 5 µl de água deionizada

autoclavada, totalizando um volume final de 15 µl. As reações ocorreram nas seguintes condições: 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. No final desses ciclos foi realizado um protocolo de curva de dissociação para verificação da especificidade dos produtos amplificados. Para tal, foi feito após o último ciclo: aquecimento a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e 95 °C por 15 s. As reações foram realizadas em triplicata técnica para cada uma das amostras biológicas.

A quantidade relativa dos transcritos foi calculada em relação aos valores Ct (threshold cycle) do gene alvo e do gene de controle endógeno *rp132* (anteriormente denominado de *rp49*) (Lourenço *et al.*, 2008), inseridos na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela I – Sequência dos primers

Gene	Sequência dos primers
<i>Amfatiga</i> (GB18380)	F: GTAGTGATCAAATAACGTGGC R: CCTTTGTCCTTCCATTGATTGT
<i>Amsima</i> (GB16786)	F: TGAACGACAGCATGGCCGA R: CGTTCGTTGCTCCTTCTCCG
<i>Amtango</i> (GB17763)	F: ATGAAACAACACAATCGCCTAT R: TGTCTTCCAATAGCCCATGC
<i>Catalase</i> (GB41427)	F: TGGAGCAAGTCCTGATAAAATGC R: TGGGCCAAGACGATGTCTATG
<i>CuZnSOD</i> (GB10133)	F: GTCGTTCCGTGTAGTCGAGAA R: TCCTTTGACTTCACCCTGAAGA

<i>DRP1</i> (GB47440)	F: ATGGATGCTGGAAGTATGCT R: AGGAGTTCCATTTCTGTTTGCC
<i>Fis1</i> (GB46314)	F: GCTTTAGCGTATGTCAGATCGT R: ACCATAAAGTCCCTCTTTTTCCA
<i>Gtpx-1</i> (GB14138)	F: CGACAACTATAAGGAAGCGAAA R: AGATAGAAAAACGTCTTCGCCT
<i>Marf</i> (GB45207)	F: GAGCAAAAAGAAGTAAGGGCACA R: TCTTCGGCATCTTTAGGCGT
<i>MnSOD</i> (GB14346)	F: GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC R: AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC
<i>OPA1</i> (GB52849)	F: TCCTCTAATCGTATATTTGACGCA R: ATCGGCTAATGGTCGTGCAA
<i>rpl32</i> (GB10903)	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG
<i>TFAM</i> (GB43084)	F: CAAGTTTACAGCCCGCAACC R: GCGTTTGTTGTTGCTGTGGA
<i>TFB2</i> (GB44671)	F: TCAATTTTGGCATTTTATTCGACA R: CACATCCAGGAAGTACTTTTTCCA

Sequências em ordem 5'–3'. F= primer *Forward*; R= primer *Reverse*.

3.9. Análises estatísticas

Análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.01 para Windows (GraphPad Software La Jolla California USA). Os respectivos testes usados são detalhados na seção de resultados.

4. Resultados

Nessa seção os resultados são descritos de forma separada para cada um dos três compartimentos do corpo que foram avaliados quanto à sua capacidade e densidade mitocondrial, níveis de H_2O_2 e NO, danos oxidativos, e níveis de expressão dos genes antioxidantes e genes da sinalização por hipóxia.

4.1 Cabeça

Por meio do sistema de respirometria de alta resolução foi determinado o consumo de O_2 em diferentes estados mitocondriais. Para verificar se os substratos tiveram de fato acesso ao tecido, foi medido o consumo de O_2 na presença e na ausência dos substratos do Complexo I, piruvato e malato (Figura 6). Na presença destes substratos podemos observar um maior consumo de O_2 , demonstrando que o respectivo ensaio correu de forma certa.

Figura 6 – Consumo de O_2 na presença e na ausência dos substratos piruvato (P) e malato (M) no meio de respiração.

Nos resultados do consumo de oxigênio na cabeça de nutridoras e forrageiras, podemos notar diferenças significativas: análise two-way ANOVA (estado mitocondrial $F_{(3,32)} = 17.12$, $p \leq 0,0001$; casta $F_{(1,32)} = 46.23$, $p \leq 0,0001$; interação $F_{(3,32)} = 3.71$, $p \leq 0,005$). O teste post-hoc feito por comparações múltiplas de Sidak mostrou que as castas apresentam consumo diferencial de O_2 nos estados respiratórios CI, OXPHOS e ETS (Figura 7A). É possível fazer uma estimativa da capacidade de produção de ATP ao subtrair o valor de OXPHOS do valor do estado não fosforilado (*Leak*). Assim, podemos observar na (Figura 7B) que o tecido da cabeça de nutridoras apresenta uma maior capacidade de produção de ATP quando comparado com forrageiras.

Em conjunto esses dados demonstram que as mitocôndrias presentes nos tecidos da cabeça de abelhas nutridoras, possuem maior consumo de O_2 associado com maior capacidade de produção de ATP. Tal indica um declínio do metabolismo mitocondrial em abelhas forrageiras que pode estar relacionado com um processo de senescência nesse tecido. Usando um ensaio bioquímico que mede a atividade da citrato sintase, uma enzima localizada na matriz mitocondrial, foi possível obter uma estimativa do número de unidades mitocondriais funcionais. Como mostrado na Figura 8 esse ensaio não detectou diferenças no número de mitocôndrias nas cabeças de nutridoras e forrageiras.

Figura 7 – Capacidade mitocondrial na cabeça de operárias de abelhas *Apis mellifera*. (A) Consumo de O₂ nos diferentes estados respiratórios. CI - Complexo I; OXPHOS – fosforilação oxidativa; *Leak* – estado não fosforilado; ETS – sistema transportador de elétrons. (B) Estimativa da capacidade de produção de ATP que foi calculada subtraindo o valor do consumo de O₂ no estado *Leak* do valor de consumo de O₂ no estado OXPHOS (OXPHOS - *Leak*). N= nutridoras; F= forrageiras. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Para análise estatística foi usado two-way ANOVA (A) e teste *t* de Student bicaudal (B). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0005$.

Figura 8 – Atividade da citrato sintase na cabeça de abelhas operárias de *Apis mellifera* que foi medida como um correlato do número de unidades mitocondriais funcionais. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Como análise estatística foi usado teste *t* de Student bicaudal. N= nutridoras; F= forrageiras.

Em seguida analisamos se essa diferença na atividade mitocondrial pode estar relacionada com uma geração diferencial de H₂O₂, um subproduto da respiração celular. Para a detecção dessa espécie reativa foi usado o reagente Amplex Red.

Após anestesiá-las no gelo, o tecido da cabeça de nutridoras e forrageiras foram processados e incubados em meio de respiração MiR05, juntamente com o mix de substrato da respiração e o reagente Amplex, e a fluorescência captada foi quantificada e comparada contra uma curva padrão estabelecida com H_2O_2 . As análises mostraram que os tecidos das cabeças de nutridoras produzem maiores quantidades de H_2O_2 quando comparados com os respectivos tecidos de forrageiras (Figura 9A), fato que pode estar relacionado com uma maior atividade mitocondrial no primeiro grupo.

Análises foram realizadas também para outra molécula sinalizadora, o NO, que é capaz de controlar a atividade mitocondrial. A análise de NO foi feita usando um ensaio bioquímico em sistema Sievers, baseado em uma reação de quimiluminescência entre NO e ozônio. Essa reação emite fótons que são captados e convertidos em um sinal elétrico por meio do qual é possível estimar a quantidade de NO presente na amostra. Na comparação dos tecidos da cabeça de nutridoras e forrageiras não detectamos nenhuma diferença na quantidade de NO presente nessas amostras (Figura 9B).

Figura 9 – Moléculas sinalizadoras na cabeça de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Produção de H_2O_2 quantificado pelo ensaio Amplex Red. (B) Quantificação de NO medido por ensaio de quimiluminescência baseado na reação NO/ozônio. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. ** $p \leq 0.01$. N = nutridoras; F= forrageiras.

Tendo em vista que a atividade mitocondrial e a geração de EROs podem causar estresse oxidativo, foram medidos dois parâmetros para avaliar danos oxidativos causados em proteínas e lipídeos. O ensaio para quantificar as proteínas carboniladas foi baseado na reação com DNFH, enquanto o ensaio para quantificar a peroxidação de lipídeos foi baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico. A análise dos produtos de reação por espectrofotometria revelou que os tecidos da cabeça de nutridoras possuem maior nível de proteínas carboniladas em comparação com forrageiras, enquanto os níveis de peroxidação de lipídeos não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 10 A-B). Concluímos que o maior nível de proteínas carboniladas em nutridoras pode estar relacionado com o maior nível de EROs nesse grupo.

Figura 10 – Danos celulares relacionados com estresse oxidativo na cabeça de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Quantificação de proteínas carboniladas medida pela leitura do conteúdo carbonil no comprimento de onda 340 nm após a reação com DNFH. (B) Quantificação da peroxidação de lipídeos através do ensaio TBARS que foi medido por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda 535 nm. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0.05$. N = nutridoras; F= forrageiras.

Em seguida analisamos a expressão de quatro genes ligados ao sistema antioxidante por meio de RT-qPCR. Foi analisada a expressão de genes codificadores de duas enzimas que possuem atividade de superóxido dismutase, CuZnSOD (SOD1)

presente no citosol e MnSOD (SOD2) presente na matriz mitocondrial. As outras duas enzimas, catalase e GTPX, possuem atividade peroxidases e agem na degradação do H_2O_2 , que é formado a partir das reações das enzimas SODs. A comparação da expressão desses genes nos tecidos das cabeças de nutridoras e forrageiras revelou que as forrageiras possuem níveis mais elevados de expressão, sendo que para *MnSOD*, *CuZnSOD* e *GTPX* esse aumento foi estatisticamente significativo (Figura 11). Para saber quais desses genes eram predominantemente expressos na cabeça fizemos uma comparação desses quatro genes contra uma mesma amostra de referência. Assim notamos um predomínio na expressão de *MnSOD*, *CuZnSOD* e *Catalase* (Figura 12). Consideramos que os níveis menores de expressão dessas enzimas do sistema antioxidante nos tecidos da cabeça de nutridoras, somados a maior produção de EROs (Figura 9A) nesse grupo, pode explicar os maiores níveis de proteína carbonilada encontrado (Figura 10A).

Figura 11 - Expressão gênica de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisadas por RT-qPCR usando amostras da cabeça de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene endógeno *rpl32* como controle. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Como análise estatística foi usado teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. N= nutridoras; F= forrageiras.

Figura 12 – Análise comparativa da expressão dos genes do sistema antioxidante na cabeça de operárias de *Apis mellifera* calibrados contra a mesma amostra de referência. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas.

Como último passo na análise do perfil oxidativo dos tecidos da cabeça de nutridoras e forrageiras avaliamos a expressão gênica dos três genes centrais da via de sinalização por hipóxia. *Amsima* (*HIF α*) se mostrou mais expresso nos tecidos de nutridoras, enquanto o seu parceiro *Amtango* (*HIF β*) e a enzima modificadora *Amfatiga* (*PHD*) não apresentaram variação entre os dois grupos (Figura 13 A-C). Como feito para os genes das enzimas antioxidantes, normalizamos também os três genes da via da hipóxia contra um mesmo calibrador para ter uma visão mais global da atividade gênica da via, e observamos uma predominância na expressão de *Amsima*, especialmente nos tecidos da cabeça de nutridora, sugerindo uma maior atividade da via de hipóxia nesse grupo (Figura 13D). Uma possibilidade seria que a via de hipóxia é ativada pela maior produção de H_2O_2 nas nutridoras, conforme mostrado na Figura 9A.

Figura 13 - Expressão gênica dos fatores centrais da via da hipóxia analisadas por RT-qPCR usando amostras da cabeça de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene endógeno *rpl32* como controle. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$. N= nutridoras; F= forrageiras.

4.2 Tórax

O perfil oxidativo do tecido do tórax de abelhas nutridoras e forrageiras foi avaliado usando os mesmos parâmetros e condições descritos no item anterior para tecidos da cabeça. A análise de respirometria de alta resolução por two-way ANOVA (estado mitocondrial $F_{(3,32)} = 11,58$, $p \leq 0,0001$; casta $F_{(1,32)} = 4,62$, $p \leq 0,005$; interação $F_{(3, 32)} = 1,946$, ns) revelou que o tórax de abelhas forrageiras apresenta maior consumo de O_2 no estado OXPHOS, mas nenhuma diferença foi encontrada nos demais estados mitocondriais (Figura 14A). A taxa estimada de capacidade de produção de ATP também foi maior no tórax das abelhas forrageiras (Figura 14B). Em conjunto esses dados indicam que o tecido do tórax de forrageiras possui um sistema mitocondrial mais eficiente, demonstrando uma maior capacidade de produção de ATP.

No tórax está localizada toda a parte de musculatura relacionada com o voo dos insetos, e abelhas forrageiras percorrem longas distâncias em seus voos de forrageamento. Portanto, a maior produção de ATP deve suprir a alta demanda energética necessária para realizar o voo. Tendo em vista que a análise do número de unidades mitocondriais estimada pela atividade da citrato sintase não revelou diferença entre os dois grupos (Figura 15), a maior produção de ATP deve representar de fato uma maior eficiência do sistema mitocondrial

Figura 14 - Capacidade mitocondrial no tórax de operárias de abelhas *Apis mellifera*. (A) Consumo de O₂ nos diferentes estados respiratórios. CI - Complexo I; OXPHOS – fosforilação oxidativa; *Leak* – estado não fosforilado; ETS – sistema transportador de elétrons. (B) Estimativa da capacidade de produção de ATP que foi calculada subtraindo o valor do consumo de O₂ no estado *Leak* do valor de consumo de O₂ no estado OXPHOS (OXPHOS - *Leak*). N= nutridoras; F= forrageiras. Os resultados representam médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA (A) e teste *t* de Student bicaudal (B). * $p \leq 0.05$.

Figura 15 – Atividade da citrato sintase no tórax de abelhas operárias de *Apis mellifera*, que foi medida como um correlato do número de unidades mitocondriais funcionais. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. N= nutridoras; F= forrageiras.

Apesar de o tórax de abelhas forrageiras ter apresentado maior atividade mitocondrial e consumo de O₂, não foram observadas diferenças nos níveis de H₂O₂ (Figura 16A). Também não houve diferença com relação aos níveis de NO (Figura 16B). No entanto, testes para avaliar danos oxidativos revelaram maior quantidade de

proteína carbonilada no tórax das abelhas nutridoras, enquanto os níveis de peroxidação de lipídeos não apresentaram alteração na comparação entre os dois grupos (Figura 17).

Figura 16 - Moléculas sinalizadoras no tórax de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Produção de H₂O₂ quantificado pelo ensaio Amplex Red. (B) Quantificação de NO medido por ensaio de quimiluminescência baseado na reação NO/ozônio. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. N = nutridoras; F= forrageiras.

Figura 17 - Danos celulares relacionados com estresse oxidativo no tórax de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Quantificação de proteínas carboniladas medida pela leitura do conteúdo carbonil no comprimento de onda 340 nm após a reação com DNPH. (B) Quantificação da peroxidação de lipídeos através do ensaio TBARS que foi medido por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda 535 nm. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. ** $p \leq 0,01$. N = nutridoras; F= forrageiras.

Na análise de expressão os genes codificadores de enzimas antioxidantes apresentaram um perfil semelhante ao observado na cabeça, sendo que o tórax de forrageiras apresentou maior expressão dos genes *MnSOD* e *Catalase*, enquanto nenhuma diferença foi observada para os genes *CuZnSOD* e *GTPx-1* (Figura 18 A-D). Essa maior expressão dos genes antioxidantes em forrageiras pode ser a explicação pelo fato de não termos encontrado diferenças nos níveis de H_2O_2 apesar da maior atividade mitocondrial nesse grupo. Além disso, os menores níveis de proteína carbonilada detectado em forrageiras pode ser outro reflexo da maior capacidade do sistema antioxidante, sugerida pela maior expressão desses genes nas forrageiras. Ao normalizar a expressão do conjunto desses genes contra uma mesma amostra de referência, o perfil encontrado se mostrou próximo ao observado em tecidos da cabeça, sendo que *GTPx-1* apresentou uma expressão menor quando comparada aos outros genes analisados (Figura 19).

Figura 18 - Expressão gênica de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisadas por RT-qPCR usando amostras do tórax de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene endógeno *rpl32* como controle. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$. N= nutridoras; F= forrageiras.

Figura 19 - Análise comparativa da expressão de genes do sistema antioxidante no tórax de operárias de *Apis mellifera* calibrados contra a mesma amostra de referência. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas.

Quanto aos genes centrais da via da hipóxia, embora, *Amsima* tenha mostrado um nível mais elevado em amostras de tórax de nutridoras, esse aumento não foi estatisticamente significativo, enquanto a expressão de *Amtango* e *Amfatiga* apresentaram níveis muito semelhantes entre esses dois grupos (Figura 20 A-C). A normalização desses genes contra uma mesma amostra de referência revelou novamente um predomínio na expressão de *Amsima*, (Figura 20D).

Figura 20 - Expressão gênica dos fatores ligados a sinalização pela via da hipóxia analisados por RT-qPCR usando amostras do tórax de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene endógeno *rpl32* como controle. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste t de Student bicaudal. N= nutridoras; F= forrageiras.

4.3 Abdômen

Os dados provenientes da respirometria de alta resolução indicaram um maior consumo de O_2 no tecido abdominal (predominantemente corpo gorduroso) de

abelhas nutridoras quando analisados por two-way ANOVA (estado mitocondrial $F_{(3,32)} = 11,37$, $p \leq 0,0001$; casta $F_{(1,32)} = 67,98$, $p \leq 0,0001$; interação $F_{(3, 32)} = 3,13$, $p \leq 0,005$), sendo esse aumento significativo durante a respiração nos estágios de CI, OXPHOS e ETS (Figura 21A). O aumento na atividade mitocondrial é refletido na estimativa de maior capacidade de gerar ATP, como pode ser observado nas amostras de nutridoras (Figura 21B). O ensaio da citrato sintase revelou que o tecido abdominal de abelhas forrageiras possui maior número de unidade mitocondriais funcionais (Figura 22). Pelo fato de forrageiras apresentarem mitocôndrias aparentemente menos eficientes, uma das possibilidades é que o aumento no número mitocondrial pode representar uma forma de compensar tal deficiência.

Figura 21 - Capacidade mitocondrial no abdômen de operárias de abelhas *Apis mellifera*. (A) Consumo de O₂ nos diferentes estados respiratórios. CI - Complexo I; OXPHOS – fosforilação oxidativa; *Leak* – estado não fosforilado; ETS – sistema transportador de elétrons. (B) Estimativa da capacidade de produção de ATP que foi calculada subtraindo o valor do consumo de O₂ no estado *Leak* do valor de consumo de O₂ no estado OXPHOS (OXPHOS - *Leak*). Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. A análise estatística foi por two-way ANOVA (A) e teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0005$. N= nutridoras; F= forrageiras

Figura 22 - Atividade da citrato sintase no abdômen de abelhas operárias de *Apis mellifera* que foi medida como um correlato do número de unidades mitocondriais funcionais. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$. N= nutrideras; F= forrageiras.

Quanto às moléculas sinalizadoras, H_2O_2 apresentou níveis mais elevados no abdômen de forrageiras. Já os níveis de NO, assim como observado também nos demais tecidos, não apresentou variação entre os dois grupos (Figura 23). O maior número de mitocôndrias encontrado em forrageiras pode estar relacionado com a maior produção de H_2O_2 observada nesse grupo. Não houve diferença quanto aos níveis de proteína carbonilada e de peroxidação de lipídeos (Figura 24).

Figura 23 - Moléculas sinalizadoras no abdômen de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Produção de H_2O_2 quantificado pelo ensaio Amplex Red. (B) Quantificação de NO medido por ensaio de quimiluminescência baseado na reação NO/ozônio. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$. N = nutrideras; F= forrageiras.

Figura 24 - Danos celulares relacionados com estresse oxidativo no abdômen de abelhas operárias de *Apis mellifera*. (A) Quantificação de proteínas carboniladas medida pela leitura do conteúdo carbonil no comprimento de onda 340 nm após a reação com DNPH. (B) Quantificação da peroxidação de lipídeos através do ensaio TBARS que foi medido por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda 535 nm. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. N = nutridoras; F= forrageiras.

O perfil de expressão dos genes antioxidantes seguiu o padrão apresentado nos dois outros tecidos analisados, sendo que abelhas forrageiras apresentaram maior expressão. No entanto, esse aumento foi estatisticamente significativo apenas para o gene *Catalase* (Figura 25). O padrão dos genes antioxidantes, quando analisados com relação a mesma amostra de referência, mostrou um perfil diferente dos tecidos da cabeça e do tórax, sendo que a *Catalase* foi o gene predominantemente expresso, seguido de *MnSOD*, enquanto *CuZnSOD* e *GTPx-1* apresentaram uma expressão mais moderada (Figura 26).

Figura 25 - Expressão gênica das enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisadas por RT-qPCR usando amostras do abdômen de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene endógeno *rp132* como controle. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$. N= nutridoras; F= forrageiras.

Figura 26 - Análise comparativa da expressão dos genes antioxidantes no abdômen de operárias de *Apis mellifera* calibrados contra a mesma amostra de referência. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas.

Os genes da via de sinalização por hipóxia mostram-se mais expressos no abdômen de forrageiras, sendo estatisticamente maior para *Amsima* e *Amfatiga* (Figura 27 A-C). O maior nível de *Amsima* é acompanhado de maiores quantidades de H_2O_2 nesse grupo, sugerindo que possa ocorrer alguma interação entre esses fatores. Para os tecidos da cabeça e do tórax não foi encontrado alteração na expressão de *Amfatiga*, enquanto no abdômen o cenário foi diferente, com uma expressão aumentada em forrageiras. O perfil dos três genes normalizados pela mesma amostra repetiu o padrão apresentado na cabeça (Figura 27D).

Figura 27 - Expressão gênica dos fatores ligados a sinalização pela via da hipóxia analisados por RT-qPCR usando amostras do abdômen de operárias de *Apis mellifera*. A quantificação relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene endógeno *rpl32* como controle. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Como análise estatística foi usado Teste t de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. N= nutridoras; F= forrageiras.

4.4 NO

A molécula sinalizadora NO foi avaliada pelo fato de apresentar um papel regulador na atividade mitocondrial, bem como por sua capacidade de ativar a via de hipóxia. Como já dito, os níveis desse gás não apresentaram variação nas comparações do mesmo tecido entre nutridoras e forrageiras. Mas quando comparamos os níveis de NO entre os diferentes tecidos, foi possível observar um aumento na presença dessa molécula nas amostras dos tecidos da cabeça, tanto de nutridoras como de forrageiras, em comparação com o tórax e abdômen (Figura 28). Tal pode estar relacionado com os efeitos neuromoduladores dessa molécula (Bredt *et al.*, 1990; Garthwaite *et al.*, 1988), sendo que em *A.mellifera* já foi descrita a participação da enzima NOS (óxido nítrico sintase) e de NO em processos de aprendizagem, memória de longo prazo e na integração de estímulos no lobo antenal (Müller e Hildebrandt, 1995; Müller, 1996; Watanabe *et al.*, 2007; Dacher e Gauthier, 2008).

Figura 28 – Comparação dos níveis de NO medido por ensaio de quimiluminescência nos diferentes compartimentos do corpo de operárias de *Apis mellifera*. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas.

5. Discussão

Nesse capítulo buscamos traçar o perfil oxidativo em abelhas nutridoras e forrageiras por respirometria de alta resolução, o que permitiu avaliar parâmetros como a capacidade de OXPHOS, geração de ATP e o sistema de transporte de elétrons. Foram também medidos os níveis de H_2O_2 como um representante de EROs e avaliamos danos causados por essas espécies reativas, que são fatores diretamente ligados a atividade mitocondrial. Nas análises da expressão gênica colocamos o foco sobre enzimas do sistema antioxidante e da via de sinalização por hipóxia. O padrão do perfil oxidativo apresentado para os três compartimentos do corpo de abelhas forrageiras e nutridoras reflete as funções fisiológicas específicas de cada compartimento, e a seguir discutiremos separadamente os dados obtidos para cada um dos três compartimentos.

5.1 Cabeça

A regulação do comportamento animal sofre influência do meio ambiente, sendo que a participação de genes específicos na modulação do comportamento de abelhas já foi reportada, incluindo alterações na expressão gênica do cérebro (Zayed e Robinson, 2012). Durante a transição de nutridora para forrageira já foram destacadas grandes modificações na glândula hipofaríngea, tecido responsável pela produção da geleia real. Quando as abelhas iniciam a atividade de forrageamento, essa glândula apresenta uma redução de tamanho e uma alteração no seu perfil transcricional e de composição proteica (Fluri *et al.*, 1982; Feng, *et al.*, 2009). O metabolismo cerebral também sofre mudanças para suprir as demandas durante alterações comportamentais, por exemplo, a bioenergética mitocondrial do cérebro foi relacionada

com mudanças no comportamento de agressão em *A. mellifera* (Rittschof *et al.*, 2018). Outros estudos envolvendo a transição de nutridoras para forrageiras mostraram alterações no comportamento associadas a mudanças químicas, estruturais, e na abundância de RNAs mensageiros e microRNAs no cérebro (Robinson *et al.*, 2002; Kucharski e Maleszka, 2002; Greenberg *et al.*, 2012).

Manipulações experimentais que permitiram avaliar separadamente a função, nutridora e forrageira independentemente da idade do organismo, mostraram grande plasticidade genômica no cérebro de abelhas adultas, sendo observada uma forte associação entre o perfil de RNA mensageiro no cérebro com a predição de comportamento de abelhas individuais (Whitfield *et al.*, 2003). Através da análise de genes diferencialmente expressos em amostras de cérebro foi demonstrado uma expressão diferencial de genes ligados ao metabolismo. Tais incluíam cinco dos seis genes do ciclo do ácido cítrico e genes mitocondriais, todos expressos em menor quantidade em abelhas forrageiras (Whitfield *et al.*, 2006; Ament *et al.*, 2008). Já na musculatura do voo e em análises do corpo inteiro observou-se o oposto, sendo que abelhas forrageiras apresentaram maior atividade ou expressão de fatores ligados ao metabolismo (Harrison, 1986; Corona *et al.*, 2005; Wolschin e Amdam, 2007). Ademais, ensaios enzimáticos utilizando preparações de um homogenato rico em mitocôndrias feito a partir de amostras de cérebro de abelhas com diferentes idades, revelou maior atividade nos complexos mitocondriais I, IV e V de abelhas mais jovens (Alaux *et al.*, 2009).

Nossas análises sobre o consumo de O_2 nos tecidos da cabeça, que é composto principalmente pelo cérebro, estão de acordo com esses trabalhos descritos previamente. Os dados de respirometria de alta resolução demonstraram que abelhas nutridoras apresentam maior consumo de O_2 no Complexo I e nos estados OXPHOS e ETS, o que resultou em uma maior estimativa da capacidade de produção de ATP nesse grupo (Figura 7A-B). A fosforilação oxidativa representa a maior via de

metabolismo celular no cérebro, portanto, uma predominância na transcrição gênica e na atividade enzimática dos complexos mitocondriais em nutridoros são fortes indicativos de uma maior atividade metabólica no cérebro de nutridoros.

EROs são gerados como um subproduto da atividade mitocondrial, e embora exista mais de uma fonte geradora dessas espécies reativas no cérebro, como é o caso de NADPH oxidases, a maior parte de EROs presente no cérebro pode ser considerada como proveniente da atividade mitocondrial (Massaad e Klann, 2011). Em neurônios, EROs são capazes de atuar na modulação da expressão gênica por meio de fosforilação, da ativação e oxidação de fatores de transcrição, de moléculas de adesão, de enzimas antioxidantes, e de proteínas de choque térmico (Hsps), entre outros (Massaad e Klann, 2011). Muitos fatores de transcrição apresentam em seu sítio de ligação ao DNA resíduos de cisteína sensíveis a alterações redox e, portanto, podem ser regulados por modificações oxidativas, que por sua vez, levam a modulação da expressão gênica.

Em nosso trabalho quantificamos a geração de H_2O_2 como correlato geral da produção de EROs nos tecidos da cabeça de nutridoros e forrageiras. Observamos uma diferença significativa entre os dois grupos (Figura 9A), sendo que nutridoros apresentaram uma maior geração de EROs, corroborando com os dados de maior atividade mitocondrial nesse grupo. Apesar de EROs funcionarem como moléculas sinalizadoras e moduladoras da expressão gênica, deve haver um equilíbrio entre a atividade mitocondrial, a produção de EROs e a atividade do sistema antioxidante para que essas moléculas altamente reativas não excedam seus níveis fisiológicos adequados. A presença em excesso de EROs está ligada a degradação de DNA, proteínas e lipídeos da membrana. Nossa análise de danos oxidativos revelaram maior quantidade de proteína carbonilada nas amostras de nutridoros (Figura 10A), fato que se mostrou de acordo com os maiores níveis de H_2O_2 nesse grupo.

Para inferir sobre a capacidade do sistema antioxidante, avaliamos a expressão de quatro genes ligados ao metabolismo de EROs. Os resultados dessas

análises sugerem que abelhas forrageiras possuem um sistema antioxidante mais eficiente, sendo que três dos quatro genes avaliados se mostraram significativamente mais expressos na cabeça de forrageiras (Figura 11). O fato de as abelhas nutridoras possuírem uma maior geração de EROs associado com uma menor expressão de enzimas capazes de metabolizar essas moléculas pode explicar os maiores danos oxidativos observados nesse grupo. Tais dados sobre a maior capacidade de proteção no cérebro de forrageiras estão de acordo com trabalhos anteriores que revelaram que esse grupo possui maior expressão de genes relacionados com o enovelamento proteico, proteínas Hsps, bem como outros fatores com potencial de proteger o tecido dos efeitos do envelhecimento e estresse fisiológico (Whitfield *et al.*, 2006; Ament *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2012).

Com relação aos genes da via de sinalização por hipóxia, encontramos níveis mais elevados do principal regulador da ativação dessa cascata, *Amsima* (*HIF- α*), nas amostras de abelhas nutridoras (Figura 13). Foi demonstrado que o cérebro de abelhas forrageiras possui maior expressão dos genes da via IIS, e a inibição da via TOR que é ativada pela via IIS, levou abelhas a atrasar o início de forrageamento (Ament *et al.*, 2008). Embora já tenha sido descrita uma interação positiva entre o eixo IIS/TOR e a via da hipóxia em determinados contextos biológicos, tal não foi observado em nossas amostras de cabeça de operárias de *A. mellifera*. Outro importante regulador de HIF- α é H₂O₂, que é capaz de promover a ativação desse fator mesmo em condições de normóxia (Bonello *et al.*, 2007; Marinho *et al.*, 2014). As amostras de cabeça de nutridoras apresentaram maiores níveis de H₂O₂ o que pode estar associado com os maiores níveis de *Amsima* encontrado, sugerindo que nesse tecido a via da hipóxia esteja mais relacionada com EROs provenientes da atividade mitocondrial do que com a regulação por meio do eixo IIS/TOR.

5.2 Tórax

O voo de insetos é uma atividade suportada de forma aeróbica, e toda musculatura necessária para o voo está contida no tórax, representando 75% da massa torácica e 35% da massa total do corpo (Heinrich, 1980; Feuerbacher *et al.*, 2003). Durante a atividade do voo as abelhas melíferas chegam a ter um aumento de 10 a 100 vezes em suas taxas de metabolismo, representando uma das maiores taxas metabólicas tecido específicas em comparação com outras espécies (Suarez, 1996; Roberts e Harrison, 1999; Suarez *et al.*, 2000). Esse aumento exacerbado nas taxas metabólicas representa um desafio para a maquinaria celular, que precisa aumentar suas atividades enzimáticas mitocondriais e as taxas de fosforilação oxidativa para suprir a alta demanda energética.

Em abelhas melíferas a capacidade de voo é determinada pelo potencial das mitocôndrias da musculatura do tórax de gerar ATP para suprir a alta demanda energética requerida por essa atividade, juntamente com o peso da abelha que se apresenta reduzido em abelhas que iniciam a atividade de forrageamento (Kammer e Heinrich, 1978; Beenakkers, 1984). Durante os voos de forrageamento uma abelha pode percorrer longas distâncias, chegando a se afastar por mais de 2 km da colmeia e carregar uma quantidade de peso que equivale a sua massa corpórea (Winston, 1987; Roberts e Harrison, 1999).

Outro fator limitante para o voo é a quantidade de glicogênio estocada nos tecidos de reserva energética que podem ser esgotados em voos de longa duração. Para aumentar sua autonomia de voo, abelhas forrageiras possuem maiores quantidades de glicogênio estocadas na musculatura torácica, bem como maior taxa de incorporação de glicose em glicogênio muscular (Neukirch, 1982; Harrison, 1986). Para gerar energia para o voo, *A. mellifera* utiliza preferencialmente carboidratos primários, que são catabolizados por meio de oxidação durante os processos de glicólise e o Ciclo de Krebs (Beenakkers, 1969; Beenakkers, 1984). Portanto, a distância a ser percorrida e a carga máxima que uma abelha pode suportar durante

uma viagem de forrageamento está diretamente ligado à diminuição de sua massa corporal e a quantidade de reservas energéticas estocadas na forma de glicogênio.

Nossas análises de respirometria de alta resolução revelaram que o tecido do tórax de abelhas forrageiras apresenta maior consumo de O_2 no estado OXPHOS, e esse aumento é refletido na estimativa de maior capacidade de produção de ATP nesse grupo (Figura 14). Esse resultado foi similar ao observado em estudos anteriores que demonstraram que o tórax de forrageiras possui maior taxa de consumo de O_2 (Harrison, 1986).

Abelhas melíferas, como os demais insetos holometábolos, desenvolvem toda sua musculatura de voo durante a fase pupal, e a mesma apenas gradualmente amadurece durante a vida adulta. Assim, a maior capacidade de voo que é observado em abelhas forrageiras não pode ser atribuída a diferenças na quantidade de musculatura, e deve estar mais relacionada com sua habilidade de operar certas enzimas metabólicas próximo ao limite de seu potencial máximo (Schippers *et al.*, 2010). De acordo com isso, a nossa estimativa do número de unidades mitocondriais não revelou diferença entre nutridoras e forrageiras (Figura 15) e, portanto, a maior capacidade de produzir ATP deve estar de fato relacionada ao aumento da atividade mitocondrial, o que se assemelha ao encontrado por Schippers e colaboradores (2010) para as enzimas metabólicas.

Embora, forrageiras apresentaram maior atividade mitocondrial, não detectamos nenhuma alteração referente à geração de H_2O_2 (Figura 16A). As análises dos danos oxidativos não revelaram diferenças quanto a peroxidação de lipídeos, mas, surpreendentemente demonstraram maior nível de proteína carbonilada nos tecidos do tórax de abelhas nutridoras (Figura 17A). Devido à alta atividade metabólica e a alta demanda energética requerida pela musculatura de voo, que já está amadurecida nas abelhas forrageiras, esperávamos encontrar maiores taxas de EROs e de danos oxidativos no tórax de forrageiras em comparação com nutridoras, que não exercem voos de longa distância. Uma possível explicação para essa aparente contradição

pode ser tirada da Figura 18, que mostra que os tecidos torácicos de abelhas forrageiras apresentaram expressão mais elevada das enzimas *MnSOD* e *Catalase*, e assim devem ter maior potencial de eliminar EROs excedentes. Uma maior capacidade do sistema antioxidante de forrageiras também foi relatada em estudos anteriores (Schippers *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008). Durante longos períodos de voo ocorre também um aumento de temperatura no tórax (Esch, 1976), fato que está atrelado com uma expressão mais elevada de *hsp70* no tórax de abelhas forrageiras (Elekonich e Roberts, 2005; Williams *et al.*, 2008).

Em conjunto, esses dados revelam uma maior capacidade de abelhas forrageiras de responder mais prontamente a diferentes situações de estresse celular causado pela alta atividade metabólica da musculatura torácica. Não observamos nenhuma diferença na expressão dos genes da via de sinalização por hipóxia (Figura 20), um padrão diferente do apresentado pelos dois outros compartimentos do corpo avaliados nesse projeto. Tendo em vista que a maior parte do tórax é composta pela musculatura de voo, que se apresenta madura em abelhas adultas, podemos atribuir a maior capacidade de OXPHOS encontrada em forrageiras com o aumento da atividade metabólica mitocondrial, necessária para suprir a demanda energética. Essa alta atividade metabólica é acompanhada de um sistema antioxidante mais efetivo, capaz de minimizar efeitos nocivos de subprodutos metabólicos que podem causar danos celulares.

5.3 Abdômen

O abdômen de *A. mellifera* é composto por uma grande variedade de tecidos, incluindo o trato reprodutivo, glândula de veneno, coração, trato intestinal, túbulos de Maphighi, glândulas cuticulares, a camada epitelial do tegumento e o corpo gorduroso parietal. Em nossas análises removemos o ferrão juntamente com o intestino, e uma

vez que os órgãos de reprodução em operárias adultas são apenas vestigiais, o tecido predominantemente analisado nesse estudo é o corpo gorduroso.

O corpo gorduroso de insetos é funcionalmente considerado como um tecido análogo ao fígado e ao tecido adiposo juntos de vertebrados, atuando no metabolismo de carboidratos e estocagem de lipídeos, como também na detoxificação de compostos (Law e Wells, 1989; Liu *et al.*, 2009; Arrese e Soulages, 2010). O mesmo é composto por trofócitos, que são células maiores e com um formato irregular, e por oenócitos que são células menores e de formato esférico. Esses dois tipos celulares formam uma monocamada de células que reveste internamente cada segmento abdominal. Durante a transição de nutridoras para forrageiras ocorrem diversas mudanças no corpo gorduroso, que sofre um remodelamento e passa por grandes alterações bioquímicas (Chan *et al.*, 2011). Por exemplo, a idade na qual uma abelha inicia sua atividade de forrageamento é dependente das quantidades da sua reserva de lipídeos no corpo gorduroso (Schulz *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2005). Na transição de nutridora para forrageira ocorre uma perda de lipídeos que não é somente relacionado com o status nutricional, mas também com a função da abelha (Ament *et al.*, 2011). Essa correlação entre a redução do corpo gorduroso abdominal e forrageamento também já foi observada em outras espécies de himenópteros sociais, como formigas e vespas (Blanchard *et al.*, 2000). Além do estado nutricional e a fisiologia interna das operárias, o hormônio da glândula mandibular da rainha se mostrou capaz de promover um atraso no início da atividade de forrageamento, junto a um aumento nas reservas lipídicas (Robinson *et al.*, 1998; Fischer e Grozinger, 2008).

Os resultados obtidos pelas análises de respirometria de alta resolução dos tecidos abdominais revelaram que o consumo de O₂ é mais elevado no Complexo I e nos estados OXPHOS e ETS em nutridoras em comparação com forrageiras (Figura 21A). A estimativa de produção de ATP também se apresentou maior em nutridoras (Figura 21B), porém, o número de unidades mitocondriais foi maior nas amostras de forrageiras (Figura 22), o que pode ser interpretado como uma tentativa de aumentar a

geração de energia nestas, já que suas mitocôndrias possuem uma menor capacidade de OXPHOS. Nossos resultados também estão de acordo aos de um estudo anterior que relatou que no corpo gorduroso de forrageiras de idade mais avançada há uma maior densidade mitocondrial, enquanto os níveis de potencial de membrana, NAD⁺ e concentração de ATP são menores nesse grupo. Tal indica que abelhas mais jovens possuem um sistema mais eficiente de geração e utilização da energia mitocondrial (Hsu e Chuang, 2014).

Ao avaliar as quantidades de H₂O₂ encontramos maiores níveis nas abelhas forrageiras (Figura 23), e essa diferença pode estar relacionada ao maior número de mitocôndrias nesse grupo. Quanto à peroxidação de lipídeos e aos níveis de proteínas carboniladas não observamos diferenças entre os dois grupos de abelhas (Figura 24), porém, estudos anteriores indicam que o aumento da idade está acompanhado de um aumento no acúmulo de lipofuscina, peroxidação lipídica e de proteína carbonilada (Hsieh e Hsu, 2011), sendo todos estes indicadores de envelhecimento.

A análise de genes relacionados ao sistema antioxidante revelou que forrageiras apresentam maior expressão da *Catalase* (Figura 25), similar ao padrão observado para os outros compartimentos do corpo. Tal, sugere uma maior proteção ao estresse oxidativo nesse grupo. Uma vez que a maior produção de H₂O₂ no abdômen de forrageiras está acompanhada de um sistema antioxidante mais eficiente, isso pode explicar o fato de não termos encontrado diferenças nos níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas no abdômen de nutridoras e forrageiras. Quanto aos genes da via de sinalização por hipóxia, *Amsima* (*HIF-α*) e sua enzima modificadora *Amfatiga* (*PHD*) apresentaram níveis mais elevados em forrageiras (Figura 27A, C). Embora, PHD é considerado responsável por marcar HIF-α para degradação, inibindo assim a via da hipóxia, ao comparar os níveis de expressão desses dois genes (Figura 27D) notamos que *Amsima* é mais expresso, o que sugere que a via está ativa.

Em análises da via IIS/TOR, que se conecta com a via de hipóxia, também foram encontradas diferenças no abdômen de abelhas nutridoras comparadas a forrageiras. Por exemplo, os genes da via IIS se mostraram mais expressos no abdômen de forrageiras, e o *knockdown* da via TOR promoveu um retardo no início do forrageamento (Ament *et al.*, 2008). Tal pode estar relacionado a diferenças na dieta, uma vez que abelhas nutridoras se alimentam preferencialmente de pólen e assim têm uma dieta rica em proteína e lipídeos, enquanto as forrageiras se alimentam quase exclusivamente de néctar, uma dieta rica em carboidratos. Essa diferença na alimentação pode explicar a variação no eixo IIS/TOR, que é uma via sensorial de nutrientes. Em conjunto esses dados sugerem que no tecido abdominal a transição de função nas abelhas operárias de nutridora para forrageira é acompanhada por alterações no metabolismo oxidativo e de lipídeos, bem como em mudanças na expressão das vias IIS/TOR e hipóxia, que por sua vez são um reflexo de alterações na alimentação e na atividade mitocondrial.

6. Conclusão

Nesse capítulo buscamos traçar um perfil de fatores ligados ao metabolismo oxidativo de abelhas operárias que realizam tarefas intra e extranidais, e observamos que a mudança de tarefa é acompanhada por alterações no estado redox celular dos três principais compartimentos do corpo. Dentre as mudanças estão alterações na fisiologia mitocondrial, de fatores bioquímicos ligados a fosforilação oxidativa, e da expressão de genes regulados por H_2O_2 , subproduto da respiração mitocondrial. Em outros modelos animais foi demonstrado que o estado redox, bem como o metabolismo mitocondrial, sofre influência da molécula sinalizadora NO (Mateo *et al.*, 2003; Metzen *et al.*, 2003). Interessantemente, em *A. mellifera* não encontramos evidência para tal ao compararmos os níveis de NO entre as duas fases de vida de abelhas operárias, mas notamos que os níveis de NO são superiores nos tecidos da cabeça, tanto de nutridora como forrageira, em comparação o tórax e abdômen, fato que condiz com o conhecido papel neuromodulador de NO.

Surpreendentemente algumas das análises de danos oxidativos mostraram maiores níveis em abelhas nutridoras, contrário a nossa hipótese de existirem maiores sinais de estresse oxidativo e senescência celular nas abelhas forrageiras, uma vez que essas, além de possuírem uma idade mais avançada, também sofrem estresses ligados as atividades realizadas fora da colmeia, incluindo o alto custo metabólico para realizar essa função. Uma possível explicação é que a expressão mais elevada de genes ligados ao sistema antioxidante possa moderar essas maiores situações de estresse. Nesse aspecto vale ressaltar que em nosso estudo as abelhas foram coletadas estritamente de acordo com a função desempenhada, independente da sua idade. Entretanto, outros estudos mostraram que forrageiras com idade mais avançada, apresentam maiores sinais de imunosenescência do que forrageiras mais jovens (Amdam *et al.*, 2005), esse fato, associado aos fatores de risco externo da

atividade de forrageamento, podem ser a explicação para a alta mortalidade de forrageiras.

Outro ponto que merece destaque é que os três compartimentos do corpo apresentaram padrões próprios para a relação entre o metabolismo oxidativo, o estado redox, e vias de sinalização. Tal indica que análises feitas com o corpo inteiro devem ser vistas com certo cuidado, pois podem gerar interpretações equivocadas, uma vez que cada um desses compartimentos está ligado a diferentes funções biológicas e assim possuem um metabolismo específico.

Capítulo II - A atividade mitocondrial diferencial associada a produção de EROs em relação a restrição calórica em operárias de *Apis mellifera*

7. Objetivo geral

O objetivo geral desse capítulo foi verificar: (I) a resposta imediata do metabolismo oxidativo e o estado redox celular a uma restrição calórica na fase larval; (II) se essa restrição calórica na fase larval deixa marcas em abelhas adultas recém emergidas; e (III) se abelhas adultas expostas a uma nova restrição calórica apresentam uma resposta adaptativa, comparado com abelhas que não passaram por uma restrição calórica na fase larval. Tais perguntas surgiram com base em resultados de outros organismos modelos que relataram que a restrição calórica é capaz de diminuir as taxas metabólicas e a geração de EROs, aumentando assim a longevidade, e que a restrição calórica por um curto período é capaz de desencadear uma resposta que possa ter um caráter adaptativo quando esses indivíduos são expostos novamente a um estresse nutricional (Sohal e Weindruch, 1996; Yu, 1996; Fontana *et al.*, 2010).

7.1 Objetivos específicos

- 1 – Comparar a expressão de genes relacionados com a biogênese mitocondrial, enzimas do sistema antioxidante e da via de sinalização por hipóxia em: (I) larvas que passaram por uma restrição calórica de 10 h com larvas controles, i.e., o efeito agudo do tratamento (II) abelhas adultas recém emergidas destes dois grupos, i.e., o efeito crônico do tratamento; e (III) em abelhas adultas de 7 dias que passaram por uma nova restrição calórica;
- 2 – Comparar as abelhas nessas três situações no que diz respeito ao metabolismo oxidativo e ao estado redox por meio de respirometria de alta resolução,

correlacionando a atividade mitocondrial com a produção de EROs e danos oxidativos causados por esses subprodutos da respiração celular;

3 – Verificar por meio de ensaios bioquímicos se a restrição calórica promove uma mudança no número de unidades mitocondriais.

8. Material e Métodos

A metodologia usada nesse capítulo foi a mesma usada no Capítulo I, com exceção dos itens descritos abaixo referentes ao desenho experimental.

8.1 Restrição calórica em larvas

Para obter larvas de mesma idade para os experimentos de restrição calórica, foi usada uma técnica apícola de postura controlada, onde a rainha fica presa sobre um quadro de cria dentro de uma tela excludora. Tal permite a passagem das operárias, mas impede a rainha de sair devido ao seu maior tamanho. A rainha foi mantida nessas condições durante 6 h para a postura de ovos. Depois, a tela foi removida e as larvas foram deixadas para se desenvolverem normalmente dentro da colônia. Passados 7 dias pós-oviposição, as larvas foram submetidas a uma restrição calórica. Para tal foi colocada uma tela excludora que impedia que as operárias nutridoras tivessem acesso a essas larvas durante um período de 10h. Passado esse período a tela foi removida e as larvas podiam ser novamente alimentadas. O grupo controle consistiu de larvas da mesma idade, produzidos ao mesmo tempo por postura controlada e o favo mantido na mesma colmeia que o grupo experimental. Assim garantiu-se que os grupos Controle e Restrição Calórica diferissem apenas nesse tratamento de restrição durante 10 horas.

8.2 Obtenção de abelhas adultas e restrição calórica nesses indivíduos

Após o período de fechamento das células de cria, quando as larvas entram na fase de tecelagem de casulo (Fase S) e não recebem mais alimentação das operárias nutridoras, colocamos uma tela excludora sobre os quadros controle e restrição para podermos coletar as abelhas quando emergissem como indivíduos adultos. As

abelhas recém-emergidas foram coletadas e transferidas para caixas de confinamento medindo 8x11x13 cm, cada caixa contendo 50 abelhas. Essas caixas foram mantidas em estufa a 34 °C e 80% de umidade relativa, e foram fornecidos recipientes contendo água e alimento (*beebread*) *ad libitum* que foram trocados diariamente. *Beebread* é uma mistura de 70% de açúcar e 30% de pólen. Nessas condições as abelhas foram mantidas até atingirem a idade de 7 dias, idade na qual foram submetidas a uma nova restrição calórica. Para os experimentos de restrição calórica na fase adulta, os recipientes contendo *beebread* foram removidos da caixa de confinamento, sendo fornecido apenas água durante um período de 10 h, e em seguida as abelhas foram coletadas para análise.

A Figura 29 mostra o desenho experimental de forma esquemática.

Figura 29 – Desenho experimental dos grupos que foram selecionados para as análises.

9. Resultados

9.1 Efeitos gerais da restrição calórica na fase larval

9.1.1. Mortalidade larval

Após sete dias passados da oviposição, quando as larvas se encontravam no início do quinto instar, foi realizada a restrição calórica por 10 horas no grupo experimental. Para controlar por eventuais efeitos letais foi feita uma contagem do número de larvas no início e no término do período de restrição para avaliar a taxa de sobrevivência dos dois grupos. As larvas do grupo controle (Ctl) apresentaram uma sobrevivência de 95,37%, enquanto as larvas que sofreram restrição calórica (RC) tiveram uma sobrevivência de 88,4% (Figura 30), indicando que o tratamento provocou uma certa mortalidade, mas de nível relativamente baixo.

Ctl - Início	Ctl - Fim	% Sobrevivência
238	227	95,37
RC - Início	RC - Fim	% Sobrevivência
276	244	88,4

Figura 30 - Efeito da restrição calórica na sobrevivência de larvas de *A. mellifera*. Foi feita uma contagem do número de larvas presentes nos quadros no início e no fim do período de restrição calórica. Ctl = controle; RC = restrição calórica.

9.1.2. Massa corpórea, proteína e RNA total em abelhas recém emergidas

Os quadros dos grupos Ctl e RC foram mantidos na mesma colmeia para se desenvolverem normalmente até a emergência de adulto. Baseado em trabalhos anteriores (Wang *et al.*, 2016 a,b), a eficácia da restrição calórica foi validada pelo peso dos indivíduos ao emergirem. Como observado na Figura 31 os indivíduos que

sofreram restrição calórica durante a fase larval emergiram com peso menor em comparação com os indivíduos que foram alimentados normalmente. Fizemos também uma análise da quantidade de RNA e proteína total desses indivíduos, e como observado para o peso, esses parâmetros se mostraram menores em indivíduos que sofreram restrição calórica no período larval (Figura 32). Assim, esses dados servem para validar a eficácia do tratamento.

Figura 31 – Efeitos da restrição calórica na massa corporal de *A. mellifera* em indivíduos recém emergidos (< 24 h após emergência). Os dados são expressos como média e E.P.M de 20 replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. **** $p \leq 0,0005$.

Figura 32 – Efeitos da restrição calórica na quantidade de (A) proteína e (B) RNA total analisados em amostras do abdômen de abelhas *A. mellifera* em indivíduos recém emergidos

(< 24h). Os dados estão expressos como média e E.P.M de 10 replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

9.2 Efeito da restrição calórica sobre genes mitocondriais e do sistema antioxidante em larvas e operárias adultas recém emergidas

Após confirmarmos a eficácia do tratamento de restrição calórica, iniciamos as análises da expressão gênica na qual avaliamos os transcritos de genes relacionados com a biogênese mitocondrial e de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante em larvas (resposta aguda) e operárias adultas recém emergidas (resposta crônica).

Mitocôndrias são organelas extremamente dinâmicas que passam por um monitoramento constante e sofrem um remodelamento de sua forma, tamanho e número para se adaptarem de acordo com o tecido e as condições celulares. Dentro desse contexto analisamos os seguintes genes relacionados com a biogênese mitocondrial: *TFAM* (*Mitochondrial transcription factor A*) e *TFB2* (*transcription factor B2*), que são fatores de transcrição relacionados com a replicação do DNA mitocondrial; dois genes relacionados com a fusão mitocondrial: *Marf* (*Mitochondrial assembly regulatory factor*), gene ortólogo de mitofusinas de mamíferos responsável pela fusão da membrana externa da mitocôndria, e o gene *Opa 1* (*Optic atrophy protein 1*) responsável pela fusão da membrana interna da mitocôndria; e dois genes relacionados com o processo de fissão mitocondrial: *DRP1* (*Dynamin related protein 1*) e *Fis 1* (*Mitochondrial fission 1 protein*).

A análise em larvas dos grupos Ctl e RC revelou que a restrição calórica provocou de maneira geral uma diminuição da expressão desses genes, sendo estatisticamente significativa para *TFAM*, *TFB2*, *Drp1* e *Fis1* (Figura 33). Já para o grupo representado por abelhas recém emergidas esses genes não apresentaram alterações (Figura 34), indicando uma recuperação dos efeitos observados em larvas logo após o final do período de restrição.

Com relação aos genes antioxidantes foram analisados os transcritos dos seguintes genes: duas enzimas superóxido dismutase, *CuZnSOD*, que é predominantemente encontrada no citoplasma, e *MnSOD* que é predominante em mitocôndrias; e duas enzimas peroxidases que metabolizam H_2O_2 , *Catalase* e *GTPx-1*. Para o grupo de larvas esses quatro genes apresentaram uma redução estatisticamente significativa que foi observada no grupo que sofreu restrição calórica (Figura 35). Para os indivíduos recém emergidos não notamos diferenças nos níveis de transcritos desses genes (Figura 36).

Figura 33 – Quantificação relativa dos transcritos de genes relacionados com a biogênese mitocondrial analisados por RT-qPCR em larvas de *Apis mellifera* submetidas a restrição calórica no quinto instar larval. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene *rpl32* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 34 - Quantificação relativa dos transcritos de genes relacionados com a biogênese mitocondrial analisados por RT-qPCR usando amostras do abdômen de abelhas *Apis mellifera* recém emergidas (<24h) e que passaram ou não por restrição calórica na fase larval. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene *rp/32* como controle endógeno. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal.

Figura 35 - Quantificação relativa dos transcritos de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisados por RT-qPCR usando amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto instar larval. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene *rp132* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0005$.

Figura 36 - Quantificação relativa dos transcritos de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisados por RT-qPCR usando amostras do abdômen de abelhas *Apis mellifera* recém emergidas (<24h). A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene *rpl32* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal.

9.3 Consumo de O₂ e estado redox em larvas

Uma vez que o tratamento provocou efeitos mais significativos quando avaliado em larvas no final do período de restrição alimentar, selecionamos esse período para investigar os efeitos do tratamento sobre o metabolismo oxidativo por meio de respirometria de alta resolução nas situações basal e na presença de substratos mitocondriais para avaliar o consumo de O₂ nos diferentes complexos funcionais da cadeia respiratória. Os substratos foram adicionados de maneira sequencial usando os mesmos substratos descritos no Capítulo I com exceção dos seguintes reagentes:

rotenona (0,5 μ M) que é um inibidor natural do Complexo I; e succinato (10,5 mM) para medir o estado CII (respiração suportada pelo Complexo II). Os dados referentes ao consumo de O_2 revelaram que as larvas do grupo RC apresentaram de forma geral um menor consumo de O_2 quando comparadas com larvas do grupo Controle. Esses valores foram estatisticamente significativos para os Estados CI, CII, *Leak* e ETS (Figura 37).

Por meio de ensaio bioquímico que mede a atividade da citrato sintase foi estimado o número de unidade mitocondriais funcionais, e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Figura 38). A geração H_2O_2 foi medida utilizando o reagente Amplex Red nos estados basal, CI, Rotenona e CII da cadeia respiratória. As larvas do grupo controle apresentaram níveis mais elevados de H_2O_2 no estado basal e no estado CI (Figura 39). Embora os grupos tenham apresentado uma geração diferencial de EROs, a análise dos danos oxidativos que foram medidos pela peroxidação lipídica usando o ensaio TBARs (Figura 40) não revelou diferença entre os grupos. Tal pode estar relacionado com um sistema antioxidante mais eficiente nas larvas do grupo controle, conforme inferido pela análise da expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes.

Figura 37 – Consumo de O₂ na presença de diferentes substratos mitocondriais medido em amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto instar larval. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Figura 38 - Atividade da citrato sintase em amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto instar larval que representa um correlato do número de unidades mitocondriais funcionais. Os dados estão expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal.

Figura 39 - Produção de H₂O₂ quantificada pelo ensaio Amplex Red em amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto instar larval. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$.

Figura 40 - Quantificação da peroxidação de lipídeos através do ensaio TBARS em amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto instar larval. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal.

9.4 Expressão do gene *Amsima* (*HIF-α*)

O fator induzível por hipóxia (HIF) regula a expressão de centenas de genes em resposta ao status celular, e embora seja ativado principalmente em situações de baixa disponibilidade de O₂, pode ser diferencialmente expresso em situações de normóxia, participando assim da regulação do metabolismo celular. Em situações de normóxia a regulação da expressão desse gene sofre influência da atividade mitocondrial e de EROs, que são formados como subprodutos do processo de respiração.

Analisamos a expressão desse gene nas larvas logo após o final da restrição calórica e notamos uma redução estatisticamente significativa na sua expressão no grupo RC (Figura 41). A diminuição de *Amsima* parece estar relacionada com menores níveis de atividade mitocondrial, de EROs, bem como menor expressão dos genes mitocondriais.

Figura 41 - Quantificação relativa dos transcritos de *Amsima* analisados por RT-qPCR usando amostras de larvas de *Apis mellifera* no quinto estágio larval. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene *rpl32* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de cinco replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$.

9.5 Efeito da restrição calórica larval sobre genes mitocondriais e do sistema antioxidante em operárias adultas que passaram por uma segunda restrição

Nesse experimento procuramos investigar se a experiência de uma restrição calórica na fase larval reflete na resposta a uma segunda restrição calórica na fase adulta, o que poderia representar uma resposta adaptativa. No que diz respeito aos genes de biogênese mitocondrial observamos uma menor expressão de alguns desses em resposta à nova restrição calórica em abelhas do grupo RC, i.e., abelhas que passaram por duas restrições (larval e adulta) comparado a abelhas que passaram apenas por uma, na fase adulta. Essa diminuição foi estatisticamente significativa para *TFB2*, *Marf* e *Fis1* (Figura 42). Em conjunto esses dados indicam que a restrição calórica na fase adulta induz uma resposta nesses genes similar à observada na fase larval.

Figura 42 - Quantificação relativa dos transcritos de genes relacionados com a biogênese mitocondrial analisados por RT-qPCR usando amostras do abdômen de abelhas *Apis mellifera* com 7 dias de idade. Estas passaram por uma restrição calórica (RC) ou não (Controle) na fase larval e por uma nova restrição calórica ao atingir 7 dias da fase adulta. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o gene *rp/32* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

No que diz respeito aos genes do sistema antioxidante, nas abelhas que sofreram uma nova restrição calórica na fase adulta, as que tinham passado por uma restrição calórica prévia na fase larval apresentaram uma redução na expressão de *GTPx-1* comparado às abelhas controle que sofreram uma restrição calórica apenas na fase adulta (Figura 43). A análise dos transcritos das enzimas do sistema antioxidante revelou um padrão parecido com o observado para os genes relacionados com a biogênese mitocondrial. Entretanto, a resposta foi aparentemente mais moderada em comparação com os genes mitocondriais, pois apenas um dos quatro genes avaliados apresentou uma redução estatisticamente significativa em comparação com o grupo Controle. Em conjunto nossos dados de expressão gênica sugerem que uma restrição alimentar em abelhas adultas leva a uma resposta mais acentuada na diminuição do metabolismo oxidativo quando estas já tinham passado por uma experiência similar quando ainda larvas.

Figura 43 - Quantificação relativa dos transcritos de enzimas relacionadas com o sistema antioxidante analisados por RT-qPCR usando amostras do abdômen de abelhas *Apis mellifera* com 7 dias de idade. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene *rpl32* como controle endógeno. Os dados são expressos como médias e E.P.M de sete replicatas biológicas. Na análise estatística foi usado o teste *t* de Student bicaudal. * $p \leq 0,05$.

10. Discussão

Animais apresentam a capacidade para reagirem em situações de estresse, como é o caso do estresse nutricional, respondendo com alterações em seus processos fisiológicos e metabólicos para aumentar suas chances de sobrevivência e reprodução. Em 1934 McCay e colaboradores apresentaram evidências de que a restrição calórica, i.e, redução da ingestão de calorias sem causar desnutrição, retarda o início do processo de envelhecimento e promove um aumento na expectativa de vida. Estudos posteriores demonstraram que esse efeito era observado em diversas espécies incluindo macacos, camundongos, peixes, moscas, leveduras, entre outras (Barrows e Kokkonen, 1982; Weindruch e Walford, 1988; Anderson *et al.*, 2009). Em *A. mellifera*, operárias expostas oralmente a doses subletais do pesticida tiacloprido apresentaram menor consumo de alimento, esse fato foi associado com uma maior longevidade desse grupo quando comparado ao grupo controle (Dickel *et al.*, 2018).

Embora alguns estudos revelaram que a restrição calórica no período pré-natal aumenta as suscetibilidades de desenvolver doenças na vida adulta (Barker, 2004; Roseboom *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2009), outros relataram que indivíduos que sofrem determinadas situações de estresse durante seu desenvolvimento apresentam um mecanismo antecipatório na fase adulta, respondendo de maneira mais eficaz quando colocados frente a esse mesmo estímulo na vida adulta (Lee e Zucker, 1988; Simpson *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2009; Kuzawa *et al.*, 2010; van den Heuvel *et al.*, 2013).

Um tipo de resposta adaptativa ocorre também em *A. mellifera*, conforme demonstrada por Wang e colaboradores (2016 a, b), sendo que abelhas que foram expostas a uma situação de restrição calórica no período larval são capazes de sobreviver por mais tempo quando deixadas sem alimento na fase adulta e possuem maiores reservas de glicogênio, além de serem capazes de mudar mais rapidamente

para outras fontes de energia, mantendo assim os níveis de glicose no sangue por mais tempo quando colocadas frente a uma nova situação de restrição. Entretanto, outro estudo revelou que abelhas que são privadas de pólen (principal fonte de proteínas desses indivíduos) durante o desenvolvimento larval, ao se desenvolverem em indivíduos adultos se tornam forrageiras menos eficientes e com menores taxas de sobrevivência em comparação com indivíduos alimentados normalmente (Scofield e Mattila, 2015).

Entretanto, há uma diferença nestes trabalhos (Wang *et al.*, 2016a,b; Scofield e Mattila, 2015) que merece ser destacada. Tal é tempo durante qual as larvas estavam sob estresse nutricional. Nos trabalhos de Wang e colaboradores as abelhas sofreram uma restrição durante um período curto de tempo (12h) e depois foram alimentadas normalmente, enquanto no estudo de Scofield e Mattila as abelhas sofreram o estresse nutricional durante todo o período de alimentação larval, o que pode ter causado um prejuízo mais generalizado ao seu desenvolvimento.

10.1 Efeitos da restrição calórica em larvas e abelhas adultas sobre a expressão de genes da biogênese mitocondrial e do sistema antioxidante

Com o objetivo de avaliar os efeitos da restrição calórica sobre o metabolismo oxidativo e o estado redox, utilizamos o mesmo desenho experimental feito Wang e colaboradores (2016a, b), impondo uma restrição calórica por algumas horas durante o quinto instar larval de *A. mellifera*. Observamos que, ao emergirem das células de cria no fim da metamorfose, as operárias que sofreram restrição calórica na fase larval apresentaram menor massa corpórea, além de menores quantidades totais de RNA e proteína (Figura 31 e 32), efeitos semelhantes aos observados nos trabalhos

anteriores (Wang *et al.*, 2016a, b), que além de menor peso corporal também relataram uma diminuição do número de ovários.

Em resposta às necessidades metabólicas e fisiológicas, animais passam por adaptações tecido-específicas da atividade mitocondrial e da transcrição e tradução de proteínas dessa organela. Por exemplo, atividade física demanda grandes quantidades de ATP nos músculos, e para tal ocorre um aumento da biogênese mitocondrial na musculatura esquelética de vertebrados (Holloszy e Coyle, 1984; Booth e Baldwin, 1996; Baar *et al.*, 2002). Seguindo esse raciocínio e tendo em vista que a ingestão de alimentos fornece os substratos para a respiração mitocondrial, durante uma situação de restrição calórica a necessidade de oxidação dos substratos energéticos tende a ser menor devido à menor quantidade de calorias ingeridas. Entretanto, não há um consenso em estudos envolvendo situações de restrição alimentar e análises da biogênese e atividade mitocondrial. Alguns dados apontam que a restrição calórica promove uma indução da biogênese mitocondrial (Nisoli *et al.*, 2005; López-Lluch *et al.*, 2006; Civitarese *et al.*, 2007; Guarente, 2008), enquanto outros relatam uma diminuição desse processo (Ferreira e Gil, 1984; Ardawi *et al.*, 1989; Briet e Jeejeebhoy, 2001; Vendemiale *et al.*, 2001).

Nossa análise da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial mostrou que logo após um período de 10h de restrição calórica, larvas de *A. mellifera* apresentaram uma menor expressão desses genes em comparação com o grupo controle (Figura 33), sugerindo uma redução na atividade mitocondrial. Entretanto, esse efeito representou uma resposta transitória, uma vez que essa diferença não foi mais observada nos adultos recém emergidos (Figura 34). Tal sugere que o estresse nutricional causou uma resposta imediata proveniente de uma demanda metabólica durante aquela situação de estresse. Estes resultados estão de acordo com os observados por Wang e colaboradores (2016b) que, ao avaliarem a expressão de um conjunto de genes metabólicos, não encontraram diferenças em abelhas adultas de 7

dias de idade, que haviam sofrido restrição calórica no período larval e que, na fase adulta, foram mantidas em condições normais de nutrição.

Em nosso desenho experimental adicionamos um tratamento, sendo um novo estresse nutricional na fase adulta. Essa análise revelou uma tendência de indivíduos que tinham sofrido restrição calórica no período larval a diminuir a expressão de genes de biogênese mitocondrial frente ao este novo estresse nutricional, quando comparados com indivíduos que sofreram restrição calórica apenas na fase adulta (Figura 42). Tal pode ser interpretado como uma resposta adaptativa, pois aumenta a amplitude da resposta a um estresse, e assim pode diminuir possíveis efeitos nocivos causados por esse estresse. Evidentemente, esse desenho experimental não permite inferir sobre onde e como tal memória fisiológica ficou genomicamente ou fisiologicamente armazenada.

O mesmo padrão que foi descrito para os genes mitocondriais observamos referente aos genes codificadores das enzimas do sistema antioxidante. Sabe-se que efeitos da restrição calórica podem aumentar ou diminuir a atividade dessas enzimas dependendo do tecido e das condições específicas da restrição calórica (Walsh *et al.*, 2014). Os nossos resultados mostraram que após restrição calórica por 10 horas os transcritos das quatro enzimas analisadas apresentaram-se reduzidos no grupo RC em comparação com o grupo controle (Figura 35). Esse efeito desapareceu nas abelhas recém emergidas (Figura 36), da mesma forma como foi o caso para os genes mitocondriais. Entretanto, com relação às abelhas que passaram por uma nova restrição calórica aos 7 dias de idade a resposta foi mais moderada, sendo que apenas o gene *GTPx-1* apresentou níveis reduzidos de transcritos (Figura 43).

10.2 Consumo de oxigênio e produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à restrição calórica em larvas

Após verificar que a restrição calórica causou um efeito imediato forte sobre a expressão de genes mitocondriais e do sistema antioxidante, partimos para a análise do consumo de O_2 nas larvas logo após o final da restrição calórica. Estudos anteriores demonstraram que a restrição calórica promove uma diminuição do gasto energético, ou em outras palavras, uma redução da oxidação das reservas energéticas do organismo, além de uma redução do vazamento de prótons nas mitocôndrias no estado *Leak* (Bevilacqua *et al.*, 2004; Bevilacqua *et al.*, 2005; Civitarese *et al.*, 2007). A resposta adaptativa à restrição calórica, além de reduzir a oxidação da glicose, também aumenta a mobilização de ácidos graxos em diversos organismos (Rion e Kawecki, 2007; Bruss *et al.*, 2010). No caso das larvas de abelhas observamos por meio de respirometria de alta resolução que as larvas que sofreram uma restrição calórica apresentaram menor consumo de O_2 nos Complexos I e II, e nos estados *Leak* e ETS (Figura 37), corroborando com os dados de estudos em mamíferos (Bevilacqua *et al.*, 2004; Bevilacqua *et al.*, 2005; Civitarese *et al.*, 2007).

Optamos por não fazer análises de consumo de O_2 para as abelhas adultas (7dias), devido ao fato que Wang e colaboradores (2016b), de quem adotamos o nosso desenho experimental, já tinham observado que abelhas que passaram por restrição na fase larval e na fase adulta (9-12h) apresentaram menor consumo de oxigênio em comparação com abelhas que sofreram restrição apenas na fase adulta, sugerindo uma resposta adaptativa moderada. Esses autores também avaliaram a utilização das reservas energéticas e mostraram que na restrição calórica durante a fase adulta, todas as abelhas aumentaram a utilização de lipídeos e proteínas, mas o grupo que havia sofrido a restrição previamente na fase larval foi capaz de fazer essa transição da utilização de carboidratos para outras fontes de energia mais rapidamente, assim conservando os níveis de glicose na hemolinfa (Wang *et al.*,

2016b). Esses dados estão de acordo com estudos anteriores em diversos organismos que revelaram que a mudança para fontes alternativas de substratos energéticos é uma importante estratégia metabólica adaptativa que resulta na redução do consumo de O₂ e conservação dos níveis de carboidratos (Nakaya *et al.*, 2002), que são a principal, se não exclusiva fonte energética para o sistema nervoso.

Apesar de verificarmos nas larvas uma diminuição dos transcritos de biogênese mitocondrial e do consumo de O₂ em resposta à restrição calórica, a análise do número de mitocôndrias inferido pelo ensaio da citrato sintase não revelou diferença entre os grupos (Figura 38). Assim, para ter uma visão mais profunda sobre essa aparente discrepância analisamos nestas larvas também os níveis de EROs produzidos como subproduto da respiração mitocondrial. O interesse nesse parâmetro veio do fato de que estudos anteriores (Sohal e Weindruch, 1996; Stankovic *et al.*, 2013) revelaram que a restrição calórica é capaz de aumentar a expectativa de vida, provavelmente devido à diminuição da geração de EROs e assim reduzindo danos celulares causados pelas mesmas. Ao quantificar a produção de H₂O₂ observamos que o grupo que foi exposto à restrição calórica apresentou menor geração de EROs no estado basal e na respiração ligada ao Complexo I (Figura 39). Esse resultado está de acordo com os dados do consumo de O₂ que também foram menores nesse grupo. Entretanto, a avaliação de danos oxidativos por peroxidação de lipídeos não revelou diferenças entre os grupos (Figura 40). Uma possível explicação é que o grupo controle, que apresentou maiores níveis de geração de EROs, também apresentou maiores níveis na expressão de genes codificadores de enzimas do sistema antioxidante, o que sugere uma maior atividade do sistema de defesa.

O último passo em nossa análise dos efeitos da restrição calórica em larvas foi a quantificação dos níveis de expressão de *Amsima* (*HIF-α*) nas larvas de restrição alimentar e controle. A subunidade alpha do fator de transcrição HIF é regulada pela

atividade mitocondrial e EROs, além de ser um dos elementos integrativos da longevidade em resposta a restrição calórica (Kang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Estudos em *Caenorhabditis elegans* revelaram que mutantes deficientes em HIF- α apresentaram um aumento de sua longevidade, mesmo quando mantidos em condição de um meio rico em nutrientes, enquanto mutantes que tinham maior atividade de HIF- α apresentavam menor longevidade nessas condições (Chen *et al.*, 2009). Em outro trabalho examinou-se a regulação da resposta de HIF- α no fígado de ratos durante o processo de envelhecimento (Kang *et al.*, 2005). A restrição calórica em ratos de idade avançada, que normalmente apresentam maior atividade de HIF- α , causou uma diminuição da atividade desse fator, promovendo uma maior longevidade desses indivíduos (Kang *et al.*, 2005). Entretanto, vale mencionar que estudos envolvendo outros tecidos em espécies de mamíferos, incluindo camundongos e coelhos, relataram um cenário oposto, onde a ativação de HIF- α diminuiu em função do aumento da idade (Rivard *et al.*, 2000; Di Giulio *et al.*, 2005; Rohrbach *et al.* 2005).

Nossos dados da expressão desse fator mostraram que nas larvas que passaram por restrição calórica a expressão de *Amsima* foi reduzida (Figura 41), resultado que está de acordo com os dados observados por Kang e colaboradores (2005). Assim, sugere-se que a regulação da expressão de *Amsima* nas larvas parece estar associada com a atividade mitocondrial e a quantidade de EROs, sendo que a restrição calórica aparentemente promove uma redução nesses parâmetros e na expressão desse fator de transcrição.

11. Conclusão

Nesse trabalho foi descrito que uma restrição calórica durante um período de 10 horas em larvas de *A. mellifera* no quinto instar provoca uma mortalidade relativamente baixa e que esses indivíduos, ao emergirem como adultos, possuem menor massa corpórea e níveis totais de RNA e proteína.

Nossas análises de expressão dos genes mitocondriais e do sistema antioxidante em larvas imediatamente após o período de restrição calórica revelou que o tratamento provoca uma redução nos transcritos destes genes. Quando avaliamos esses transcritos em abelhas recém emergidas, que não se encontravam em estresse nutricional, não observamos diferenças de expressão, levando a conclusão de que as alterações observadas nas larvas não são permanentes, e que o tratamento promove um efeito mais imediato (agudo) em resposta a restrição. Para aprofundar no entendimento dessa resposta aguda no metabolismo oxidativo, medimos em larvas o consumo de O_2 e geração de H_2O_2 , e ambos os parâmetros estavam reduzidos em larvas do grupo RC, indicando uma redução do metabolismo em resposta ao menor consumo de alimento. O gene central da via de sinalização por hipóxia, *Amsima* (*HIF- α*), também apresentou uma expressão reduzida no grupo RC, sugerindo que seja regulado pela atividade mitocondrial.

Inferimos sobre a existência de uma possível resposta adaptativa em indivíduos adultos, impondo uma restrição calórica em abelhas com 7 dias que eram provenientes dos grupos Controle e RC. Nessas análises quantificamos os transcritos dos genes mitocondriais e do sistema antioxidante, e observamos uma redução de alguns desses genes, principalmente dos genes mitocondriais, no grupo que havia sofrido uma restrição durante a fase larval, sugerindo uma queda no metabolismo oxidativo nesses indivíduos.

Esse estudo estabeleceu uma base para inferir sobre correlações entre a restrição calórica, atividade mitocondrial e a regulação da via de sinalização por hipóxia em *A. mellifera*, sendo que esses fatores estão associados com a longevidade em diversos organismos. Estudos futuros sobre a longevidade em abelhas melíferas envolvendo esses parâmetros podem servir de base para ajudar a esclarecer interações moleculares envolvidas no aumento da expectativa de vida em função da redução de ingestão de alimentos.

12. Referências Bibliográficas

1. Alaux C, Sinha S, Hasadsri L, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, DeGrandi-Hoffman G, et al. Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(36):15400-5.
2. Amdam GV, Aase AL, Seehuus SC, Kim Fondrk M, Norberg K, Hartfelder K. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp Gerontol*. 2005;40(12):939-47.
3. Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol*. 2004;97(3):741-7.
4. Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1799-802.
5. Ament SA, Blatti CA, Alaux C, Wheeler MM, Toth AL, Le Conte Y, et al. New meta-analysis tools reveal common transcriptional regulatory basis for multiple determinants of behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):E1801-10.
6. Ament SA, Chan QW, Wheeler MM, Nixon SE, Johnson SP, Rodriguez-Zas SL, et al. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *J Exp Biol*. 2011;214(Pt 22):3808-21.
7. Ament SA, Corona M, Pollock HS, Robinson GE. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(11):4226-31.
8. Ament SA, Wang Y, Robinson GE. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(5):566-76.
9. Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol Pathol*. 2009;37(1):47-51.
10. Ardawi MS, Majzoub MF, Masoud IM, Newsholme EA. Enzymic and metabolic adaptations in the gastrocnemius, plantaris and soleus muscles of hypocaloric rats. *Biochem J*. 1989;261(1):219-25.
11. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol*. 2010;55:207-25.
12. Azevedo SV, Caranton OA, de Oliveira TL, Hartfelder K. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *J Insect Physiol*. 2011;57(1):38-45.

13. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002;16(14):1879-86.
14. Balaban RS. The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787(11):1334-41.
15. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483-95.
16. Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.* 2004;23(6 Suppl):588S-95S.
17. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol.* 2009;36(5):445-58.
18. Barrows CH, Kokkonen GC. Dietary restriction and life extension, biological mechanisms. In: Moment GB, ed. *Nutritional approaches to aging research.* Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1982:219–43.
19. Beenackers AM. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 1984;14:243–60.
20. Beenackers AM. Carbohydrate and fat as a fuel for insect flight. A comparative study. *J Insect Physiol.* 1969;15(3):353-61.
21. Bell WL, Barth RH. Initiation of yolk deposition by juvenile hormone. *Nat New Biol.* 1971;230(15):220-2.
22. Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(5):E852-61.
23. Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(3):E429-38.
24. Blanchard GB, Orledge GM, Reynolds SE, Franks NR. Division of labour and seasonality in the ant *Leptothorax albipennis*: worker corpulence and its influence on behaviour. *Anim Behav.* 2000;59(4):723-38.
25. Bloch G, Sullivan JP, Robinson GE. Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol.* 2002;48(12):1123-31.

26. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, *et al.* Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):755-61.
27. Booth FW, Baldwin KM. Muscle plasticity: energy demand/supply processes. In: *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems.* Bethesda, MD: Am. Physio. Soc. 1996, sect. 12, chapt. 24, p. 1075–1123.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
29. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990;347(6295):768-70.
30. Briet F, Jeejeebhoy KN. Effect of hypoenergetic feeding and refeeding on muscle and mononuclear cell activities of mitochondrial complexes I--IV in enterally fed rats. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(5):975-83.
31. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol.* 2001;11(4):213-21.
32. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 2001;52(3-5):189-95.
33. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001;294(5545):1337-40.
34. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(1):E108-16.
35. Centanin L, Dekanty A, Romero N, Irisarri M, Gorr TA, Wappner P. Cell autonomy of HIF effects in *Drosophila*: tracheal cells sense hypoxia and induce terminal branch sprouting. *Dev Cell.* 2008;14(4):547-58.
36. Centanin L, Gorr TA, Wappner P. Tracheal remodelling in response to hypoxia. *J Insect Physiol.* 2010;56(5):447-54.
37. Chan QW, Mutti NS, Foster LJ, Kocher SD, Amdam GV, Wolschin F. The worker honeybee fat body proteome is extensively remodeled preceding a major life-history transition. *PLoS One.* 2011;6(9):e24794.
38. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.

39. Chen D, Thomas EL, Kapahi P. HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet. 2009;5(5):e1000486.
40. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. PLoS Med. 2007;4(3):e76.
41. Cooper CE. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? Trends Biochem Sci. 2002;27(1):33-9.
42. Corona M, Estrada E, Zurita M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. J Exp Biol. 1999;202(Pt 8):929-38.
43. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. Mech Ageing Dev. 2005;126(11):1230-8.
44. Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(17):7128-33.
45. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med. 1987;107(4):526-45.
46. Dacher M, Gauthier M. Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. Physiol Behav. 2008;95(1-2):200-7.
47. Davey, KG. Hormonal control of vitellogenine uptake in *Rhodnius prolixus* Stal. Am Zool. 1981; 21: 701-5.
48. de Azevedo SV, Hartfelder K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. J Insect Physiol. 2008;54(6):1064-71.
49. Deseyn J, Billen J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). Apidologie 2005; 36: 49–57.
50. Di Giulio C, Bianchi G, Cacchio M, Artese L, Rapino C, Macrì MA, et al. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 α , VEGF and NOS during aging. Respir Physiol Neurobiol. 2005;147(1):31-8.
51. Dickel F, Münch D, Amdam GV, Mappes J, Freitak D. Increased survival of honeybees in the laboratory after simultaneous exposure to low doses of pesticides and bacteria. PLoS One. 2018;13(1):e0191256.

52. Elekonich MM, Roberts SP. Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;141(4):362-71.
53. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43-54.
54. Esch H. Body temperature and flight performance of honey bees in a servo mechanically controlled wind tunnel. *J. Comp. Physiol.* 1976; 109:254–77.
55. Estrada C, Murillo-Carretero M. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* 2005;11(4):294-307.
56. Fahrbach SE, Moore D, Capaldi EA, Farris SM, Robinson GE. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn Mem.* 1998;5(1-2):115-23.
57. Fahrbach SE, Robinson GE. Behavioral development in the honey bee: toward the study of learning under natural conditions. *Learn Mem.* 1995;2(5):199-224.
58. Fahrbach SE, Robinson GE. Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Dev Neurosci.* 1996;18(1-2):102-14.
59. Feng M, Fang Y, Li J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics.* 2009;10:645.
60. Ferreira J, Gil L. Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics. Alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1984;218(1):61-7.
61. Feuerbacher E, Fewell JH, Roberts SP, Smith EF, Harrison JF. Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on hovering metabolic rate and mechanical power output in the honey bee *Apis mellifera*. *J Exp Biol.* 2003;206(Pt 11):1855-65.
62. Finch CE. Chicago: University of Chicago Press; 1990. Longevity. Senescence, and the Genome.
63. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194(1):7-15.
64. Fischer P, Grozinger CM. Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften.* 2008;95(8):723-9.
65. Fluri P, Lüscher M, Wille H, Gerig L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J Insect Physiol.* 1982; 28: 61–8.

66. Fluri P, Sabatini AG, Vecchi MA, Wille H. Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J Apicult Res.* 1981; 20:221-5
67. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science.* 2010;328(5976):321-6.
68. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J.* 1999;339 (Pt 3):729-36.
69. Fuchs B, Dietrich A, Gudermann T, Kalwa H, Grimminger F, Weissmann N. The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv Exp Med Biol.* 2010;661:187-200.
70. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 1988;336(6197):385-8.
71. Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One.* 2013;8(3):e58165.
72. Greenberg JK, Xia J, Zhou X, Thatcher SR, Gu X, Ament SA, et al. Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes Brain Behav.* 2012;11(6):660-70.
73. Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol.* 1999;3(2):226-35.
74. Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell.* 2008;132(2):171-6.
75. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 2005;9(5):617-28.
76. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991;91(3C):14S-22S.
77. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.
78. Harris JW, Woodring J. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L) brain. *J Insect Physiol.* 1992;38:29-35.
79. Harrison JM. Caste-specific changes in honeybee flight capacity. *Physiol Zool.* 1986;59:175-87.

80. Hartfelder K, Engels W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol.* 1998;40:45-77.
81. Hartfelder K., Guidugli-Lazzarini KR, Cervoni MS, Santos DE, Humann FC. Old threads make new tapestry – rewiring of signaling pathways underlies caste phenotype plasticity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Adv Insect Physiol.* 2015;48:1-36.
82. Haydak MH. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology.* 1970;15:143-56.
83. Hefti MH, François KJ, de Vries SC, Dixon R, Vervoort J. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem.* 2004;271(6):1198-208.
84. Heinrich B. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera* L. Regulation of head temperature. *J Exp Biol.* 1980;85:61–72
85. Herb BR, Wolschin F, Hansen KD, Aryee MJ, Langmead B, Irizarry R, et al. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nat Neurosci.* 2012;15(10):1371-3.
86. Holehan AM, Merry BJ. The experimental manipulation of ageing by diet. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1986;61(4):329-68.
87. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1984;56(4):831-8.
88. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature.* 2002;417(6892):975-8.
89. Hsieh YS, Hsu CY. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Exp Gerontol.* 2011;46(4):233-40.
90. Hsu CY, Chuang YL. Changes in energy-regulated molecules in the trophocytes and fat cells of young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69(8):955-64.
91. Huang ZY, Robinson GE. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):11726-9.
92. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-8.

93. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.
94. Kammer AE, Heinrich B. Insect flight metabolism. *Adv Insect Physiol*. 1978;13: 133–228.
95. Kang MJ, Kim HJ, Kim HK, Lee JY, Kim DH, Jung KJ, et al. The effect of age and calorie restriction on HIF-1-responsive genes in aged liver. *Biogerontology*. 2005;6(1):27-37.
96. Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature*. 2000;408(6809):233-8.
97. Krause ET, Honarmand M, Wetzel J, Naguib M. Early fasting is long lasting: differences in early nutritional conditions reappear under stressful conditions in adult female zebra finches. *PLoS One*. 2009;4(3):e5015.
98. Kucharski R, Maleszka R. Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*). *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;99(2):92-101.
99. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1859-67.
100. Kuzawa CW, McDade TW, Adair LS, Lee N. Rapid weight gain after birth predicts life history and reproductive strategy in Filipino males. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16800-5.
101. Law JH, Wells MA. Insects as biochemical models. *J Biol Chem*. 1989;264(28):16335-8.
102. Lee TM, Zucker I. Vole infant development is influenced perinatally by maternal photoperiodic history. *Am J Physiol*. 1988;255(5 Pt 2):R831-8.
103. Lithgow GJ, Kirkwood TB. Mechanisms and evolution of aging. *Science*. 1996;273(5271):80.
104. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 2002;80(5):780-7.
105. Liu Y, Liu H, Liu S, Wang S, Jiang RJ, Li S. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2009;71(1):16-30.
106. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

107. Loenarz C, Coleman ML, Boleininger A, Schierwater B, Holland PW, Ratcliffe PJ, et al. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. EMBO Rep. 2011;12(1):63-70.
108. Loenarz C, Mecinović J, Chowdhury R, McNeill LA, Flashman E, Schofield CJ. Evidence for a stereoelectronic effect in human oxygen sensing. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(10):1784-7.
109. López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(6):1768-73.
110. Lourenço AP, Mackert A, dos Santos Cristino A, Simões ZLP. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. Apidologie. 2008; 39: 372-85.
111. Lutz CC, Rodriguez-Zas SL, Fahrbach SE, Robinson GE. Transcriptional response to foraging experience in the honey bee mushroom bodies. Dev Neurobiol. 2012;72(2):153-66.
112. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox Biol. 2014;2:535-62.
113. Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. Antioxid Redox Signal. 2011;14(10):2013-54.
114. Mateo J, García-Lecea M, Cadenas S, Hernández C, Moncada S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. Biochem J. 2003;376(Pt 2):537-44.
115. McCay CM, Crowell MF. Prolonging the life span. Sci Mon. 1934;39:405–414.
116. Melampy RM, Willis ER. Respiratory metabolism during larval and pupal development of the female honeybee (*Apis mellifera* L.). Physiol Zool. 1939;12: 302-11.
117. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brüne B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. Mol Biol Cell. 2003;14(8):3470-81.
118. Michener CD. The Social Behavior of the Bees. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, 1974; 404 p.

119. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 2002;296(5574):1886-9.
120. Mitchell A, Romano GH, Groisman B, Yona A, Dekel E, Kupiec M, et al. Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*. 2009;460(7252):220-4.
121. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284(25):16767-75.
122. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):214-20.
123. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-12.
124. Müller U. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*. 1996;16(3):541-9.
125. Müller U, Hildebrandt H. The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. *Eur J Neurosci*. 1995;7(11):2240-8.
126. Münch D, Amdam GV. The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Lett*. 2010;584(12):2496-503.
127. Murphy MP. Does interplay between nitric oxide and mitochondria affect hypoxia-inducible transcription factor-1 activity? *Biochem J*. 2003;376(Pt 2):e5-6.
128. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
129. Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, Amdam GV. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *J Exp Biol*. 2011;214(Pt 23):3977-84.
130. Nagao M, Ebert BL, Ratcliffe PJ, Pugh CW. *Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites. *FEBS Lett*. 1996;387(2-3):161-6.
131. Nakaya Y, Harada N, Niwa Y, Takahashi A. Time course of change in respiratory quotient during prolonged starvation in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rats. *Nutr Res*. 2002; 22:695-703.

132. Neukirch A. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifera*) upon flight performance and energy consumption. *J Comp Physiol.* 1982;146:35–40.
133. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 2005;310(5746):314-7.
134. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-312.
135. Nunes-Silva P, Gonçalves LS, Franco MT, Jong DD. Rate of growth and development time of Africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Braz J Morphol Sci.* 2006;(23):325-32.
136. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38388-93.
137. Oldham S, Hafen E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 2003;13(2):79-85.
138. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide.* 2011;25(2):125-37.
139. Osanai M, Rembold H. [Development-dependent mitochondrial enzyme activities in honey bee castes]. *Biochim Biophys Acta.* 1968;162(1):22-31.
140. Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, et al. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One.* 2007;2(6):e509.
141. Ponting CP, Aravind L. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol.* 1997;7(11):R674-7.
142. Quinlan CL, Perevoschikova IV, Goncalves RL, Hey-Mogensen M, Brand MD. The determination and analysis of site-specific rates of mitochondrial reactive oxygen species production. *Methods Enzymol.* 2013;526:189-217.
143. Rachinsky A, Hartfelder K. *Corpora allata* activity, a primer regulating elements for caste-specific juvenile hormone titre in honeybee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J Insect Physiol.* 1990;36:189-94.

144. Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol.* 1990;79(1):31-8.
145. Rembold H. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 1987a; 17:1003-6.
146. Rembold H. Caste differentiation of the honeybee – fourteen years of biochemical research at Martinsried. In: Eder J, Rembold H (eds). *Chemistry and Biology of Social Insects.* Verlag J. Peperny, München; 1987b. pp. 3–13.
147. Remolina SC, Hafez DM, Robinson GE, Hughes KA. Senescence in the worker honey bee *Apis Mellifera*. *J Insect Physiol.* 2007;53(10):1027-33.
148. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
149. Rion S, Kawecki TJ. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *J Evol Biol.* 2007;20(5):1655-64.
150. Rittschof CC, Vekaria HJ, Palmer JH, Sullivan PG. Brain mitochondrial bioenergetics change with rapid and prolonged shifts in aggression in the honey bee. *J Exp Biol.* 2018;221(Pt 8).
151. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29643-7.
152. Roberts SP, Harrison JF. Mechanisms of thermal stability during flight in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol.* 1999;202 (Pt 11):1523-33.
153. Robinson GE. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *Am Nat.* 2002;160 Suppl 6:S160-72.
154. Robinson GE, Grozinger CM, Whitfield CW. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nat Rev Genet.* 2005;6(4):257-70.
155. Robinson GE, Vargo EL. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1997;35(4):559-83.
156. Robinson GE, Winston ML, Huang Z, Pankiw T. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *J Insect Physiol.* 1998;44(7-8):685-92.
157. Robinson GE, Page RE, Strambi C, Strambi A. Colony integration in honey bees: mechanisms of behavioral reversion. *Ethology.* 1992;90: 336–48.

158. Rohrbach S, Simm A, Pregla R, Franke C, Katschinski DM. Age-dependent increase of prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression in human and mouse heart. *Biogerontology*. 2005;6(3):165-71.
159. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*. 2006;82(8):485-91.
160. Rueppell O, Bachelier C, Fondrk MK, Page RE. Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp Gerontol*. 2007;42(10):1020-32.
161. Salzman AL. Nitric oxide in the gut. *New Horiz*. 1995;3(1):33-45.
162. Santos DE, Alberici LC, Hartfelder K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *Insect Biochem Mol Biol*. 2016;73:1-11.
163. Santos, CG, Humann FC, Hartfelder K. Juvenile hormone signaling in insect oogenesis. *Curr Opin Insect Sci*. 2018;31: 43-8.
164. Schippers MP, Dukas R, McClelland GB. Lifetime- and caste-specific changes in flight metabolic rate and muscle biochemistry of honeybees, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol B*. 2010;180(1):45-55.
165. Schippers MP, Dukas R, Smith RW, Wang J, Smolen K, McClelland GB. Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 19):3828-36.
166. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):e207-17.
167. Schulz DJ, Huang ZY, Robinson GE. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behav Ecol Sociobiol*. 1998;42:295–303
168. Scofield HN, Mattila HR. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121731.
169. Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(4):962-7.
170. Seeley TD. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*. 1982;11:287–93.
171. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin. Genet. Dev*. 1998;8:588–94.

172. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1263-8.
173. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5447-54.
174. Simpson SJ, Despland E, Hägele BF, Dodgson T. Gregarious behavior in desert locusts is evoked by touching their back legs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3895-7.
175. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273(5271):59-63.
176. Srere PA. Citrate synthase. *Method Enzymol*. 1969;13: 3-11.
177. Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Tomasevic T, Radosavljevic T. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys*. 2013;32(2):277-83.
178. Stegeman H, Span PN, Peeters WJ, Verheijen MM, Grénman R, Meijer TW, et al. Interaction between hypoxia, AKT and HIF-1 signaling in HNSCC and NSCLC: implications for future treatment strategies. *Future Sci OA*. 2016;2(1):FSO84.
179. Suarez RK. Upper limits to mass-specific metabolic rates. *Annu Rev Physiol*. 1996;58:583-605.
180. Suarez RK, Staples JF, Lighton JR, Mathieu-Costello O. Mitochondrial function in flying honeybees (*Apis mellifera*): respiratory chain enzymes and electron flow from complex III to oxygen. *J Exp Biol*. 2000;203(Pt 5):905-11.
181. Sullivan JP, Fahrbach SE, Harrison JF, Capaldi EA, Fewell JH, Robinson GE. Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of allatectomy on flight behavior and metabolism. *J Exp Biol*. 2003;206(Pt 13):2287-96.
182. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide*. 1997;1(5):373-85.
183. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*. 2001;292(5514):107-10.
184. Thirlwell C, Schulz L, Dibra H, Beck S. Suffocating cancer: hypoxia-associated epimutations as targets for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2011;3:9.

185. Thrasyvoulou AT, Benton AW. Rates of growth of honeybee larvae. *J Apic Res.* 1982;21:189-92.
186. Toth AL, Kantarovich S, Meisel AF, Robinson GE. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *J Exp Biol.* 2005;208(Pt 24):4641-9.
187. Tu MP, Yin CM, Tatar M. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;142(3):347-56.
188. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-44.
189. van den Heuvel J, Saastamoinen M, Brakefield PM, Kirkwood TB, Zwaan BJ, Shanley DP. The predictive adaptive response: modeling the life-history evolution of the butterfly *Bicyclus anynana* in seasonal environments. *Am Nat.* 2013;181(2):E28-42.
190. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology.* 2001;33(4):808-15.
191. Walsh ME, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:88-99.
192. Wang D. Growth rates of young queen and worker-honeybee larvae. *J Apicult Res.* 1965;4:3-5.
193. Wang D, Li F, Chi Y, Xiang J. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17(4):423-33.
194. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5510-4.
195. Wang Y, Campbell JB, Kaftanoglu O, Page RE, Amdam GV, Harrison JF. Larval starvation improves metabolic response to adult starvation in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Exp Biol.* 2016a;219(Pt 7):960-8.
196. Wang Y, Kaftanoglu O, Brent CS, Page RE, Amdam GV. Starvation stress during larval development facilitates an adaptive response in adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Exp Biol.* 2016b;219(Pt 7):949-59.
197. Watanabe T, Kikuchi M, Hatakeyama D, Shiga T, Yamamoto T, Aonuma H, Takahata M, Suzuki N, Ito E. Gaseous neuromodulator-related genes

- expressed in the brain of honeybee *Apis mellifera*. Dev. Neurobiol. 2007;67:456-73.
198. Weindruch R, Walford RL. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher, 1988.
 199. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. J Nutr. 1986;116(4):641-54.
 200. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. J Biol Chem. 1973;248(10):3582-92.
 201. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. FASEB J. 2002;16:1151–62.
 202. Wheeler DE, Buck N, Evans JD. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Mol Biol. 2006;15(5):597-602.
 203. Wheeler DE, Kawooya JK. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. Arch Insect Biochem Physiol. 1990;14(4):253-67.
 204. Whitfield CW, Ben-Shahar Y, Brillet C, Leoncini I, Crauser D, Leconte Y, et al. Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(44):16068-75.
 205. Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. Science. 2003;302(5643):296-9.
 206. Williams JB, Roberts SP, Elekonich MM. Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. Exp Gerontol. 2008;43(6):538-49.
 207. Wilson EO. The Insect Societies. Harvard University Press, Cambridge, 1971.
 208. Winston, ML. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1987.
 209. Wolschin F, Amdam GV. Comparative proteomics reveal characteristics of life-history transitions in a social insect. Proteome Sci. 2007;5:10.
 210. Wolschin F, Mutti NS, Amdam GV. Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees. Biol Lett. 2011;7(1):112-5.
 211. Xia M, Huang R, Sun Y, Semenza GL, Aldred SF, Witt KL, et al. Identification of chemical compounds that induce HIF-1 α activity. Toxicol Sci. 2009;112(1):153-63.

212. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(5):651-68.
213. Zayed A, Robinson GE. Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. *Annu Rev Genet.* 2012;46:591-615.
214. Zhang Y, Shao Z, Zhai Z, Shen C, Powell-Coffman JA. The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PLoS One.* 2009;4(7):e6348.

13. Apêndices

13.1 Apêndice 1

Author's personal copy

CHAPTER ONE

Old Threads Make New Tapestry—Rewiring of Signalling Pathways Underlies Caste Phenotypic Plasticity in the Honey Bee, *Apis mellifera* L.

Klaus Hartfelder^{*,†}, Karina R. Guidugli-Lazzarini^{*}, Mario S. Cervoni^{*}, Douglas E. Santos^{*}, Fernanda C. Humann^{*,†}

^{*}Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[†]Instituto Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus do Matão, Matão, São Paulo, Brazil

[†]Corresponding author; e-mail address: klaus@fmrp.usp.br

Contents

1. Introduction	2
2. Differential Feeding of Honey Bee Larvae	3
3. The Secrets of Royal Jelly	5
4. The Role of JH in Honey Bee Caste Development	7
5. IIS, TOR and Egfr Pathway Activities in Honey Bee Caste Development	13
6. Endogenous Hypoxia in Worker Larvae—Convergence of Nutrient Signalling and Oxidative Metabolism	20
7. Epigenetics and Caste Development	22
8. Are There Commonalities Between Context-Dependent Signalling Pathways in Larval Caste Development and Adult Caste Function?	24
9. Conclusions	26
Acknowledgements	29
References	29

Abstract

Caste development in social Hymenoptera represents a prime example of phenotypic plasticity and variation in life histories and is best understood in honey bees. We review the larval feeding regimes and major signalling pathways involved in the divergent developmental trajectories. The role of juvenile hormone (JH) is discussed with an emphasis on the regulation of JH synthesis, degradation and the molecular mode of JH action. As there are apparent inconsistencies between the expression of insulin, TOR and Egfr pathway genes and larval growth rates, we propose that the circuitries and integration of these nutrient-sensing pathways have been remodelled in social evolution. A potential

RESEARCH ARTICLE

Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workersMário S. Cervoni^{1,*}, Carlos A. M. Cardoso-Júnior¹, Giovana Craveiro¹, Anderson de O. Souza², Luciane C. Alberici² and Klaus Hartfelder¹

ABSTRACT

During adult life, honey bee workers undergo a succession of behavioral states. Nurse bees perform tasks inside the nest, and when they are about 2–3 weeks old they initiate foraging. This switch is associated with alterations in diet, and with the levels of juvenile hormone and vitellogenin circulating in hemolymph. It is not clear whether this behavioral maturation involves major changes at the cellular level, such as mitochondrial activity and the redox environment in the head, thorax and abdomen. Using high-resolution respirometry, biochemical assays and RT-qPCR, we evaluated the association of these parameters with this behavioral change. We found that tissues from the head and abdomen of nurses have a higher oxidative phosphorylation capacity than those of foragers, while for the thorax we found the opposite situation. As higher mitochondrial activity tends to generate more H_2O_2 , and H_2O_2 is known to stabilize HIF-1 α , this would be expected to stimulate hypoxia signaling. The positive correlation that we observed between mitochondrial activity and *hif-1 α* gene expression in abdomen and head tissue of nurses would be in line with this hypothesis. Higher expression of antioxidant enzyme genes was observed in foragers, which could explain their low levels of protein carbonylation. No alterations were seen in nitric oxide (NO) levels, suggesting that NO signaling is unlikely to be involved in behavioral maturation. We conclude that the behavioral change seen in honey bee workers is reflected in differential mitochondrial activities and redox parameters, and we consider that this can provide insights into the underlying aging process.

KEY WORDS: Honey bee, High-resolution respirometry, Redox state, Hypoxia signaling, Nitric oxide

INTRODUCTION

The organization of a colony in the honey bee, *Apis mellifera*, as in all other eusocial insects, involves a structured division of labor. In a typical honey bee colony, the vast majority of individuals are facultative non-reproductive workers. While the queen is responsible for the reproduction of the colony, the workers perform all other social tasks, and in doing so, worker bees undergo

a succession of behavioral states during their adult life. While young, they are nurse bees performing tasks inside the hive (e.g. brood care and feeding), and as they age they become forager bees that collect nectar, pollen and water (Seeley, 1982). Thus, associated with their age, workers tend to preferentially perform different kinds of tasks, and this age-related division of labor is also known as temporal or age polyethism (Winston, 1987).

Although worker bees are morphologically all alike, the differential behavioral states (nurse and forager) are contingent on certain physiological alterations, including differences in the levels of juvenile hormone (JH) (Huang and Robinson, 1992; Robinson, 2002; Sullivan et al., 2003) and the yolk precursor vitellogenin circulating in hemolymph (Excels, 1974; Hartfelder and Engels, 1998; Amdam et al., 2004; Guidugli et al., 2005), as well as in the insulin/insulin-like signaling (IIS) pathway (Ament et al., 2008), and in general aspects of gene expression (Ben-Shahar et al., 2002). The age at which a worker initiates foraging is a strong lifespan determinant, owing to both the extrinsic mortality caused by the risks of foraging, as well as intrinsic senescence, especially of the innate immune defence system (Amdam et al., 2004, 2005; Remolina et al., 2007).

Senescence or aging is a natural process affecting all animals and can be defined as a time-dependent deterioration. One of the long proposed and most investigated and accepted mechanisms concerning the molecular basis of aging is the oxidative stress hypothesis, which proposes that reactive oxygen species (ROS) are the main cause of the aging process (Harman, 1956). At low levels, ROS serve as signaling molecules exerting important functions in the regulation of biological and physiological processes (Finkel, 2011). However, when present in high levels and exceeding the normal limit, ROS promote oxidative stress and can induce damage to lipids, proteins and DNA (Cross et al., 1987). ROS are mainly produced by mitochondria during the process of respiration in the electron transport chain (ETC) (Brand, 2010). Leakage of electrons at ETC Complex I and Complex III leads to partial reduction of oxygen to form superoxide ($O_2^{\cdot-}$) radicals. These are quickly dismutated to hydrogen peroxide (H_2O_2) by superoxide dismutase (SOD), and are then further inactivated by catalase (CAT). Both $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 are considered to be ROS.

Another free radical that plays an important biological role is nitric oxide (NO). NO is a gaseous molecule that is able to diffuse freely across cell membranes and to function as an inter- and intracellular messenger (Moncada, 1993). Another interesting feature of NO is that it can react with $O_2^{\cdot-}$ and can therefore modulate cellular redox signaling, resulting in alterations in biological systems promoted by ROS. In addition, NO can bind to cytochrome c oxidase (complex IV of ETC) where it competes with O_2 ; this interaction modulates mitochondrial activity, affecting cell

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ²Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Author for correspondence (cervoni@usp.br)

© M.S.C., 0000-0003-1178-6144

Received 8 May 2017; Accepted 7 September 2017

13.3 Apêndice 3

04/10/2018 Universidade de São Paulo Mail - Encyclopedia of Social Insects – Submission Confirmation Email: Caste Differentiation, Honey B...

Mário Sergio Cervoni <cervoni@usp.br>

Encyclopedia of Social Insects – Submission Confirmation Email: Caste Differentiation, Honey Bees

1 message

Shruti Datt <shruti.datt@springernature.com>
Reply-To: Shruti Datt <shruti.datt@springernature.com>
To: cervoni@usp.br

Mon, Sep 24, 2018 at 9:23 AM

Dear Mário S. Cervoni,

This email confirms that the manuscript for the entry

- »Caste Differentiation, Honey Bees« (entry type: "Standard"; Authors: Hartfelder, K.*, Cervoni, M.)

* corresponding author(s)

has just been successfully (re-)submitted by Klaus Hartfelder to Project [Encyclopedia of Social Insects](#).

Your manuscript will now be checked by our in-house staff and then reviewed by the Editors of the project. The system will send you another email if the Editors have accepted your contribution or if any revisions are required.

Please check if your affiliation and name is correct, as authorship changes are not permitted after an entry has been submitted. You can edit your user data by clicking here: [Change user profile](#)

Please do not forward this e-mail to anyone: All links in this e-mail contain your personal key to our submission system, your manuscripts and contract.

On behalf of the Editors we would like to thank you for this submission and the hard work that you put into this manuscript.

Best wishes
The Springer Reference Editorial Team

Caste differentiation in honey bees

Mário Sérgio Cervoni and Klaus Hartfelder

Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence: Klaus Hartfelder, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: klaus@fmrp.usp.br

The female castes of the honey bee

A honey bee colony is typically composed of three types phenotypically distinct individuals: a single queen, a few hundred drones, depending on season, and tens of thousands of workers. While the drones are the haploid males (not a caste) that originated from unfertilized eggs, the fertilized, diploid eggs – heterozygous at the sex locus - give rise to either of the two female castes. After eclosion, a female larva is a bipotent individual that does not yet have a fixed caste fate. Rather, the caste phenotype of a female honey bee becomes gradually determined during larval development. Hence, the queen-worker dimorphism is the result of developmental plasticity, that is, the capacity of a single individual genome to respond to environmental signals and, consequentially, give rise to divergent phenotypes as a result of bifurcating sequential developmental decisions. In honey bees, the endogenous factor that is critical for triggering this process is the type of larval food that the nurse bees continuously provide to the developing larvae (Haydak, 1970). Thus, there are two fundamental questions that need to be answered: (i) what is it in the larval food that makes the difference, and (ii) how does the developmental program of the female honeybee larva respond to the larval food signal. Fortunately, the honey bee is an ideal model organism to address these questions, since larvae destined to become queens or workers are reared in two very different types of cells. Worker larvae develop in hexagonal, horizontal cells that compose the combs, while queen larvae are reared in much larger cells of more irregular rounded shape that are normally situated at the edges of a comb and point vertically downwards. Furthermore, the long tradition of beekeeping has brought with it the availability of many ingenious tools that allow experimental manipulations of the developing larvae.

Differential feeding and the secrets royal jelly

Queen larvae are fed with copious amounts of royal jelly (RJ) from the first larval instar on until they enter metamorphosis in the fifth instar. RJ is a protein, carbohydrate, and lipid-rich secretion produced by the hypopharyngeal and mandibular glands in the head of nurse bees. Worker larvae are also fed a glandular secretion, worker jelly (WJ), during the first three days of development. This secretion is of similar composition as RJ, but contains only half the amount of sugar. During the remainder of the larval feeding phase, worker larvae then receive a mixed diet composed of WJ, honey and pollen. Another point worthy of note is that worker larvae receive not only a less caloric diet during the first days of larval development, they are

also fed at much lower frequency, so that in the end a queen larva receives approximately ten times more food than a worker larva. It is this differential feeding program that drives all the subsequent developmental decisions towards the generation of the two very distinct female phenotypes, and beekeepers and breeders for century make use of the apparent simplicity of this differential feeding program to rear queens from worker larvae. This is also accompanied by a long history of research into the secrets of royal jelly, which is also a highly valued and priced health food and cosmetics product, with a market largely supplied by Chinese beekeepers.

The advances in analytical chemistry permitted detailed analyses and comparisons of RJ and WJ (Rembold, 1965), but when tested in *in vitro* rearing systems of larvae, no single compounds could really qualify as a “queen determinator”. Instead, the higher sugar content of RJ has experimentally been validated as a factor biasing queen development (Asencot and Lensky, 1985). Subsequent studies then put a focus on the main protein fraction in RJ, the Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) (Schmitzova et al., 1998), and interestingly, the genome sequence of the honey bee (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006; Drapeau et al., 2006) confirmed the presence of multiple MRJPs and revealed a striking genomic arrangement of the MRJPs encoding genes as a cluster of nine genes inserted within a cluster of genes encoding Yellow proteins. Apparently, the honey bee MRJP genes have undergone a unique amplification from an ancestral *mrjp*-like gene, and all the other bees and Hymenoptera in general have only a single *mrjp*/*mrjp*-like homolog in their genomes (Buttstedt et al. 2014). Furthermore, the *mrjp* genes are expressed not only in the hypopharyngeal glands, but in many tissues, and thus clearly have other functions in addition to composing the major protein fraction in RJ. Nonetheless, one of the MRJPs, the monomer of MRJP1 named royalactin, was reported in a much-commented publication to determine queen development (Kamakura, 2011). This view has, however, received strong critique on different grounds, one being that the reported low stability of royalactin (it degrades over a period of 30 days at high temperatures) should not be a critical factor since all larvae are fed fresh RJ or WJ each day. The final blow to the assumption that royalactin is the queen determinator, however, came from recent experiments on the physicochemical properties of royalactin/MRJP1, which forms a complex with a smaller protein, apisimin (Mandacaru et al., 2017). At low pH, as is the case for RJ due to the large amount of organic acids, MRJP1 and apisimin form a network structure of high viscosity, and it is this viscosity that allows a queen larvae to stick to the bottom of the downward pointing queen cell “defying gravity”(Buttstedt et al., 2018).

The lipids of RJ and WJ are also unique. They are mainly short chain fatty acid derivatives produced by the mandibular glands. In the adult queen, these glands produce the queen mandibular gland pheromone that signals workers the presence of the queen and serves as a sex pheromone in the mating process. In workers, these same glands contribute lipid constituents to RJ and WJ. Strikingly, there is a bifurcation in the biosynthesis pathway for these lipids so that queen mandibular glands produce 9-hydroxy-(E)2-decenoic acid (9-HDA) and 9-keto-(E)2-decenoic acid (9-ODA), while in adult workers the biosynthesis pathway is biased towards the production of 10-hydroxy-(E)2-decenoic acid (10-HDA) (Plettner et al., 1996). This caste-specific biosynthesis pathway is apparently regulated by a simple switch mechanism, the alternative splicing of the transcription factor *geminin* gene (Jarosch-Perlow et al., 2018), allowing laying workers to also produce a queen-like pheromone signal. In larval food, 10-HDA, which represents the major compound among the fatty acids fraction, may play a quite unexpected role as a modulator of the epigenetic state of the larval DNA (see below). In a mammalian cell culture assay, 10-HDA has been shown to possess histone deacetylase inhibitor activity (Spannhoff et al., 2011).

Additional factors in larval food with a potentially caste-biasing activity are pollen-derived microRNAs (miRNAs). These are enriched in pollen stores (bee bread) and in the larval food of workers, and the addition of certain of these miRNAs to RJ led to the expression of worker-like characters in in vitro-reared bees (Zhu et al., 2017). Nonetheless, since different pollen sources differ in their miRNAs composition, and the fact that pollen is added to the diet of worker larvae primarily during the last larval instar, the effect of such miRNAs is likely to play a more generic than specific role in the caste determination process of the honey bee.

This said, the differential feeding programs of queen and worker larvae, as well as the composition of the respective diets, still hold many secrets and poses interesting questions concerning the evolution of the peculiarities seen in the honey bee, when compared to other corbiculate bees. Two major differences are the orientation of the brood cells for queens and workers, especially so the unique downward orientation of the queen cells, and the progressive larval feeding with two distinct diets, where the queen diet functions as both food, as well as a glue. Nonetheless, the main question that remains to be answered is, what are the effects of the larval diets on the caste-specific morphogenesis pathways.

The larval endocrine system responds to the differential feeding program

Like other insect polyphenisms, caste differentiation in social insects is an aspect that is fully integrated with the molting and metamorphosis programs of insect development (Hartfelder and Emlen, 2012), and these programs are primarily controlled by the insect endocrine system. The two main players are juvenile hormone (JH), a sesquiterpenoid lipid hormone produced by the corpora allata (CA) glands in the retrocerebral complex, a structure equivalent to the vertebrate hypothalamic hypophysial axis, and ecdysteroids produced by the prothoracic glands. With respect to honey bee caste development, it is JH that plays a crucial role and is best studied in terms of its effects. Wirtz and Beetsma (1972) were the first to demonstrate the queen-inducing properties of synthetic JH, which they topically applied to fourth and early fifth instar worker larvae, and these effects were subsequently confirmed by other researchers (Rembold et al., 1974).

Physiologically, the differential feeding of the queen and worker larvae results in a caste specific maturation of the neuroendocrine system, whereby the CA of queen-destined larvae become much enlarged in size (Dogra et al., 1977). This larger CA size is reflected in elevated rates of JH synthesis and JH levels circulating in the hemolymph of third and fourth instar queen larvae (Rembold, 1987; Rachinsky and Hartfelder, 1990; Rachinsky et al., 1990) and in the expression of JH synthesis-specific genes (Bomtorin et al., 2014). Due to its hydrophobic nature, JH needs to bind to transport proteins after its release into the hemolymph. The JH-specific transport proteins also have the function to protect it from degradation by JH esterases present in the bee's hemolymph, enzymes that are of importance for clearance of JH from the circulation at the onset of metamorphosis (Mackert et al., 2008). In contact with a target cell, the lipophilic JH molecule can pass the plasma membrane, bind to its intracellular receptor, the Methoprene-tolerant (Met) protein and its partner Taiman (Charles et al., 2011), and regulate the expression of JH-dependent genes. Even though a plethora of genes is differentially expressed in queen and worker larvae (Evans and Wheeler, 1999; 2000) and following JH treatment of worker larvae, only few genes are actually likely to respond directly to JH, one of these being Krüppel homolog-1 (Kr-h1), which encodes a crucial transcription factor of the JH-response

cascade (Jindra et al., 2013; Belles and Santos, 2014). In honey bee larvae, Kr-h1 is strongly expressed in queen-destined larvae (Hartfelder et al., 2015)

As the morphology of the adult reproductive system is a fundamental caste character, critical for reproductive division of labor, its differentiation is strongly influenced by the JH levels circulating in the larval hemolymph. At eclosion of first instar larvae from the egg, the ovaries of both queen and worker larvae are composed of numerous ovariole primordial, which, during the subsequent larval instars, gradually elongate and become clearly separated (Hartfelder et al., 2018). In the third and fourth larval instar, which roughly correspond to days 2 to 4 of larval development, each ovary consists of approximately 150 ovarioles, but shortly thereafter, most of the ovarioles present in the worker ovary undergo programmed cell death, and only a few survive to compose the adult worker ovary. In queen larvae, the onset of such massive cell death is inhibited by the much higher JH hemolymph levels (Schmidt-Capella and Hartfelder, 1998), which permit the survival of practically all of the ovariole primordia and, thus, guarantees the formation of the large queen ovaries. A mathematical modeling approach has more recently provided insights into the dynamics of how sugars in the larval diet can relate to JH titers and the setting of ovariole numbers (Leimar et al., 2012).

Compared to JH, little is known on the role that ecdysteroids play in honey bee caste development. Differences have been shown with respect to the timing of ecdysteroid level peaks in the hemolymph of queen and worker larvae and pupae (Rachinsky et al., 1990; Pinto et al., 2002), and these differences in the timing of the ecdysteroid peaks are likely associated with the long-known differences in developmental time for queens (16 days mean from oviposition to adult) and workers (20-21 days).

Nutrient sensing signaling pathways

Even though JH is a well-established regulator of caste development, the question of how the nutrients drive these differences in hormone levels has essentially been a black box until the honey bee genome was sequenced and genes related to nutrient sensing pathways were annotated. These pathways and their role in the regulation of insect growth and metamorphosis are best understood in the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Mirth and Riddiford, 2007), and they are the insulin/insulin-like signaling (IIS) and target-of-rapamycin (TOR) pathways, both of which are highly conserved in metazoans (Oldham, 2011). The honey bee genome encodes two insulin-like peptides (ILP1 and ILP2), two insulin receptors (InR1 and InR2), TOR, as well as all downstream intracellular components of the signaling pathways, which converge at their downstream output in the regulation of the S6 kinase (S6K) activity and differential phosphorylation of the transcription factor FOXO.

When analyzing the expression levels of the honey bee ILP and InR genes during larval development, Wheeler et al. (2006) found that they were up-regulated in queen larvae and in worker larvae that had been transferred to queen cells after initial rearing in worker cells. This is exactly what one would expect from insulin signaling as a stimulator of growth. Nonetheless, it came to a surprise that at the transition from the fourth to the fifth larval instar, i.e. the stage when caste fate becomes terminally committed, the expression of both InR genes was strongly down-regulated in queen larvae, and the ILP2 gene, which is more expressed than ILP1 in both castes, became strongly up-regulated in worker larvae (Azevedo and Hartfelder, 2008).

The transcript levels of the TOR pathway genes revealed only minor differences in the early larval instars (Wheeler et al., 2014), but a strong differential expression of *tor* was seen during the feeding stages of the fifth instar, with a marked up-regulation in worker larvae (Hartfelder et al., 2015). Evidently, these results for the IIS/TOR pathway genes are surprising, but a word of caution is needed, as all these studies looked at mRNA and not at protein levels, and this may, at least partly, explain why different results were seen in functional studies based on RNA interference (RNAi) of IIS/TOR genes. For instance, the impairment of the IIS cascade by RNAi-mediated knockdown of the insulin receptor substrate (IRS) gene in third-instar queen larvae promoted the expression of worker-like traits (Wolschin et al., 2011). Similarly, inhibition of TOR signaling using both a pharmacological inhibition (rapamycin) and knockdown of *tor* gene function by RNAi (Patel et al., 2007), caused a prolonged pre-adult development, reduced weight at adult emergence, appearance of corbicula, and reduction of the ovary size, all of which are worker characteristics. Subsequently, Mutti et al. (2011) demonstrated that the RNAi-mediated knockdown of IIS and/or TOR pathway functions caused a decline in JH levels. They could rescue the expression of queen traits by application of synthetic JH to the knockdown larvae, indicating that JH signaling should act downstream of the IIS/TOR nutrient-sensing pathways.

Similar results suggesting that JH is a downstream output of nutrient-sensing and growth-regulating pathways were put forward by Kamakura (2011). He obtained the strongest effect in his RNAi experiments when reducing the function of the gene encoding an epidermal growth factor receptor (*Egfr*), another highly conserved growth regulating pathway in metazoans. The effect seen was a reduction in the JH levels and a strong bias towards the expression of worker characters in larvae reared on royal jelly. But again, the results of these functional experimental analyses stand in contrast with the actual endogenous expression levels of the *egfr* gene, which were shown to be higher in the early fifth-instar worker larvae (Hartfelder et al., 2015), when queens have the highest growth rates.

In trying to make sense out of these apparently contradictory results concerning the expression patterns of elementary nutrient-sensing and growth-regulating pathways seen in honey bee larvae, a look to *Drosophila* is informative, as in the fruit fly the hypoxia signaling pathway has been shown to be a connecting factor with the IIS/TOR pathways (Dekanty et al., 2005).

An endogenous hypoxia state in worker larvae is associated with reduced mitochondrial dynamics

Hypoxia signaling is an evolutionarily highly conserved pathway that serves to guarantee an adequate oxygen supply to cells and tissues. The core elements of this pathway are two hypoxia-inducible transcription factor subunits (HIF α and HIF β) and a modifying enzyme, prolyl hydroxylase domains (PHD), which functions as an oxygen sensor. Under adequate oxygen conditions (normoxia), the HIF α subunit is continuously tagged by PHD for ubiquitination-mediated degradation, but under hypoxia conditions, the enzymatic activity of PHD is reduced, leading to the stabilization of HIF α and its subsequent translocation to the nucleus, where it forms a dimeric transcription factor complex with HIF β , activating hypoxia responsive genes.

Interestingly, the quantification of the transcript levels of these three core hypoxia genes during larval development revealed elevated expression levels in worker larvae, indicating a hypoxic state in their tissues (Azevedo et al., 2011). This

hypoxia state is likely due to an endogenous hypoxia in these larvae, as there is no evidence indicating that worker larvae are reared under a different oxygen environment than queen larvae; after all, both are reared next to each other in open brood cells. Support for this hypothesis comes from actually relatively old data, obtained between 1930 and 1980, which showed that queen larvae have higher rates of oxygen consumption (Melampy and Willis, 1939), higher amounts of mitochondrial proteins, and higher cytochrome oxidase activity and cytochrome c contents (Osanai and Rembold, 1968; Eder et al., 1983). Furthermore, the expression of mitochondrial genes has been shown to be higher in queen larvae (Corona et al., 1999). To test the endogenous hypoxia hypothesis in more depth, a high-resolution respirometry approach was used, and this confirmed that queen larvae exhibit elevated rates of oxygen consumption and elevated maximum capacities of ATP production in their fat body cells (Santos DE et al., 2016). These differences in oxidative metabolism are also directly reflected in the intracellular localization and structure of fat body mitochondria, as well as in the expression of genes related to mitochondrial biogenesis (Santos DE et al., 2016). So with this, the research approaches to understand the mechanisms underlying honey bee caste differentiation are now connecting basic physiology with differential gene expression in a tissue that represents the main machinery of the intermediate metabolism of insects, directly comparable to the vertebrate liver and adipose tissue.

Gene regulatory networks in honey bee caste development

Systematic studies towards the understanding of how differential gene expression is associated with the developmental plasticity of social insect castes started with macro- and then microarray analyses (Evans and Wheeler, 1999; Evans and Wheeler, 2000; Barchuk et al. 2007). The gene ontology classification of differentially expressed genes indicated that physio-metabolic genes are overrepresented in the putative gene regulatory network (GRN) for queen development, while for workers the network was enriched for genes with morphogenetic functions. Furthermore, the GRN structures for queen and worker development showed very different topologies (Barchuk et al., 2007). A large-scale microarray platform developed by the University of Illinois was subsequently used for the fine scale differential gene expression profiling from first to fifth instar queen versus worker larvae (Cameron et al., 2013). The study showed that queen and worker larvae differ in their transcriptomes already at 6 hours after egg laying, and that several of the differentially expressed genes (DEGs) are associated with mitochondrial and metabolic functions. At the transition from the third to fourth instar then, several DEGs were associated with hormone biosynthesis. In contrast, worker larvae at this stage showed a number of DEGs related to programmed cell death, quite probably occurring in the ovary. Several of the DEGs for queens and workers also showed indications of alternative splicing, meaning that the product of a single gene can generate different protein isoforms. Furthermore, RNAi-mediated knockdown of the *hex70b* gene showed that this gene may play a critical role on queen/worker morphogenesis (Cameron et al., 2013).

With the advent next generation sequencing technologies, gene expression analyses can now be performed at much deeper sequence coverage than with microarrays. This allowed the identification of novel classes of genes, so called noncoding RNAs, and to compare these with transcriptomes for protein coding genes (Chen et al., 2012; Ashby et al., 2016; Guo et al., 2016) in search for regulatory functions. The detailed study by Ashby et al. (2016) found that many of the miRNAs

are likely targeting genes with neural functions, and thus may play a role in the differential development of the larval brain of queens and workers (Barchuk et al., 2018). In parallel with the transcriptome analyses promoted by the novel sequencing platforms, there was also a significant advance in proteomics technologies. For instance, Garcia et al. (2009) detected 20 differentially expressed proteins (DEPs) in their queen/worker larvae comparison, which included the surprising demonstration that MRJP1 (see above) is actually present in the cytoplasm of larval brain cells. A subsequent study that focused on the nuclear proteomes of queen and worker larvae detected 120 DEPs, indicating an extensive regulation of gene expression (Begna et al., 2012).

While the above-cited transcriptome and proteome analyses presented the overall picture on differential gene expression in honey bee larvae, the different tissues and organs are known to exhibit very different developmental dynamics with respect to timing of their caste bias (Dedej et al., 1998). Tissue-specific differential gene expression was studied in imaginal discs of larval hindlegs, which, during pupal development will express the corbicular structures, and, of course in ovaries, which exhibit marked programmed cell death during worker development. A suppression subtractive library analysis revealed 125 DEGs in queens vs. worker hindlegs, many of which coding for miRNAs (Santos CG et al., 2016). A similar strategy applied to fifth instar larval ovaries identified 70 genes as potentially differentially expressed (Humann et al., 2011) and responding to JH (Lago et al. 2016). Furthermore, two of the differentially expressed genes qualified as long noncoding (lnc) RNAs (Humann et al., 2013). These, subsequently named lncov1 and lncov2, were among the first long noncoding RNAs for which a functional role could be inferred, and their role in programmed cell death regulation in the ovary is supported by their chromosomal mapping in a region associated with variation in ovariole number (Linksvayer et al., 2009). Different from miRNAs, the mechanisms by which lncRNAs control developmental programs is still an open question, but there is growing consensus that they act as scaffolds connecting transcription regulatory proteins with specific DNA regions. Furthermore, they may also be connectors with epigenetic mechanisms.

Epigenetic factors involved in honey bee caste development

Studies in mammals led to the observation that environmental stimuli, such as diet, are capable of tuning the epigenetic state of the genome, and thus control gene expression by altering the pattern of DNA methylation and histone post translational modification (PTM). Thus, the integration of environmental with endogenous signals can be achieved by epigenetic regulation through a conserved enzymatic machinery that includes DNA methyltransferases (DNMTs), histone methyltransferases (HMTs), histone acetylases (HACs and deacetylases (HDAs), and methyl binding proteins (MBPs). In this context, one of the important results coming out of the Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2016) effort was the finding that the *Apis mellifera* genome encodes a complete DNA methylation machinery (Wang et al., 2006), directly comparable to that of vertebrates. This sets the honey bee apart from *Drosophila*, which has only a single DNMT gene, and immediately spurred research projects aiming at understanding the role of DNA methylation in key transitions in the social life of the honey bee, such as the nutritionally driven caste determination and the behavioral maturation of workers, especially the transition from intranidal to extranidal tasks.

A showcase result for the importance of DNA methylation in caste development was the RNAi-mediated knockdown of the gene encoding DNA methyltransferase 3 (DNMT3), which resulted in the expression of queen characters, including a much enlarged ovary in the DNMT3-silenced workers (Kucharski et al., 2008). This subsequently prompted whole genome methylation analyses that compared methylomes for queen and worker larvae of different age, first by methylated DNA immunoprecipitation sequencing (meDIP-Seq, Shi et al., 2013) and later by bisulfite sequencing (Shi et al., 2017), as well as the comparison of queen larvae reared from eggs versus queen larvae reared from young worker larvae (He et al., 2017). These studies showed that global methylation levels decrease in 4- and 6-day old queen larvae compared to worker larvae and that queen larvae have less differentially methylated genes (DMGs) than workers (Shi et al., 2013). In accordance, 3-day-old queen larvae reared from eggs had lower DNA methylation levels than queen larvae of the same age reared from worker larvae, indicating that DNA methylation is very sensitive to the nutritional state already in the earliest larval stages (He et al., 2017). Furthermore, hypomethylated DMGs in queen larvae had functional annotations primarily in the terms biological and metabolic regulation, immune system, and signaling pathways (Shi et al., 2017).

Looking at the association of DNA methylation and caste from a different perspective, Foret et al. (2012) performed an in-depth study on the methylomes of larval and adult brains of both queens and workers (Foret et al., 2012). They found higher levels of caste-specific DMGs in the larval brain than in the adult brain, and several of these DMGs were associated with conserved metabolic and signaling pathway genes, including insulin and TOR signaling. Worthy of note was furthermore that some of the metabolism-related DMGs, including ALK, a kinase involved in cell growth, showed patterns of alternative splicing. Overall though, the global methylation levels in the honey bee genome, just as in other invertebrates, are much lower than in vertebrates and the methylation pattern is much less complex. Actually, a major difference between vertebrates and model invertebrates, such as the honey bee, is that in the latter CpG methylation is largely limited to introns, i.e. to gene bodies, whereas in vertebrates much of the methylated CpG nucleotides are in promoter regions. It is now growing consensus that gene body DNA methylation may promote alternative splicing events, such as seen in the honey bee ALK transcripts, due to alteration in the speed with which RNA polymerase II passes across a gene body (Lyko et al., 2010; Wedd et al., 2016).

Though being intensively studied, including in the honey bee, DNA methylation is only one aspect, and probably a rather conservative one, of an organism's epigenome. Much more dynamic are histone marks, in particular, the methylation and/or acetylation of lysine residues on histone 3 tails. The question of histone marks and their effects on gene expression in honey bees has barely been touched upon so far, but the fact that a major lipid component of larval food, 10-HAD, has an inhibiting effect on histone deacetylation (Spannhoff et al., 2011) is certainly intriguing. A first shot at this question was taken via mass spectrometry analysis of histone PTMs in queen ovaries and 4-day-old larvae (Dickman et al., 2013), revealing more than 20 different PTM states. This was now much extended in a chromatin-immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) approach on three very common histone modifications, H3L4me3, H3K36me3, and H3K27ac in 4-days-old queen and worker larvae (Wojciechowski et al., 2018). This study showed a coherent association of these histone marks with differential gene expression among queen and workers, including specific histone marks on genes that modify the chromatin state by affecting DNA methylation and nucleosome positioning and how these may possibly alter the access and binding of transcription factors to gene regulatory sites. Actually, it opens the door to a much more profound understanding on how the nutritional status of a

larvae can affect its epigenome, and how this then can become a driver of differential gene expression patterns that finally define honey bee caste fate in terms of its morphological and behavioral characteristics.

References

Asencot M, Lensky Y. 1985 The phagostimulatory effect of sugars on the induction of “queenliness” in female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Com. Biochem Physiol A* 81:203–208

Ashby R, Foret S, Searle I, Maleszka R. 2016. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci Rep* 6:18794

Azevedo SV, Hartfelder K. 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J Insect Physiol* 54:1064-1071

Azevedo SV, Hartfelder K. 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J Insect Physiol* 54:1064-1071

Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simoes ZLP, Maleszka R. 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev Biol* 7:70

Barchuk AR, dos Santos GD, Dias Caneschi R, de Paula DE, Moda LM. 2018 The ontogenetic saga of a social brain. *Apidologie* 49:32-48

Belles X, Santos CG. 2014. The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Krüppel homolog1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis and the homology of the pupal stage. *Insect Biochem Mol Biol* 52:60-68.

Begna D, Han B, Feng M, Fang Y, Li JK. 2017. Differential expressions of nuclear proteomes between honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae: A deep insight into caste pathway decisions. *J Proteome Res* 11:1317-1329

Bomtorin AD, Mackert A, Rosa GCC, Moda LM, Martins JR, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP. 2014. Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. *PLoS One* 9: e86923

Buttstedt A, Moritz RFA, Erler S. 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biol Rev* 89:255-269

Buttstedt A, Muresan CI, Lilie H, Hause G, Ihling CH, Schulze SH, Pietzsch M, Moritz RFA. 2018. How honeybees defy gravity with royal jelly to raise queens. *Curr Biol* 28:1095-1100

Cameron RC, Duncan EJ, Dearden PK. 2013. Biased gene expression in early honeybee larval development. *BMC Genomics* 14:903

Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M. 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:21128-21133

Chen X, Hu Y, Zheng HQ, Cao LF, Niu DF, Yu DL, Sun YQ, Hu SN, Hu FL. 2012. Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker destined larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 42:665-673

Corona M, Estrada E, Zurita M. 1999. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 202:929-938

Dedek S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W. 1998. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J Apic Res* 37:183-190

Dekanty A, Lavista-Llanos S, Irisarri M, Oldham S, Wappner P. 2005. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF- α /Sima. *J Cell Sci* 118:5431-5441

Dickman MJ, Kucharski R, Maleszka R, Hurd PJ. 2013. Extensive histone post-translational modification in honey bees. *Insect Biochem Mol Biol* 43:125-137

Dogra GS, Ulrich GM, Rembold H. 1977. A comparative study of the endocrine system of the honey bee under normal and experimental conditions. *Z Naturforsch* 32e:637-642

Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R. 2006. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res* 16:1385-1394

Eder J, Kremer JP, Rembold H. 1983. Correlation of cytochrome c titer and respiration in *Apis mellifera*: adaptive response to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp Biochem Physiol* 76B:703-716

Evans JD, Wheeler DE. 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5575-80

Evans JD, Wheeler DE. 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol* 2:research0001.6

Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S, Jacobsen SE, Robinson GE, Maleszka R. 2011. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *London*, 464-522 109:4968-4973

Guo XQ, Su SK, Geir S, Li WF, Li ZG, Zhang SW, Chen SL, Chen RS. 2016. Differential expression of miRNAs related to caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 47:495-508

Hartfelder K, Emlen DE. 2012. Hormonal regulation of insect polyphenism. In: Gilbert LI (Ed.) *Insect Endocrinology*, Academic Press, London, pp 464-522

Hartfelder K, Guidugli-Lazzarini KR, Cervoni MS, Santos DE, Humann FC (2015) Old threads make new tapestry - rewiring of signalling pathways underlies caste phenotypic plasticity in the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Adv Insect Physiol* 48:1-36

Hartfelder K, Tibério GJ, Lago DC, Dallacqua RP, Bitondi MMG. 2018. The ovary and its genes - developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 49:49-70

Haydak MH. 1943. Larval food and development of castes in the honeybee. *J Econ Entomol* 36:778-792

Haydak MH. 1970. Honey bee nutrition. *Annu Rev Entomol* 15:143–156

He XJ, Zhou LB, Pan QZ, Barron AB, Yan WY, Zeng ZJ. 2017. Making a queen: An epigenetic analysis of the robustness of the honeybee (*Apis mellifera*) queen developmental pathway. *Mol Ecol* 26:1598-1607

Humann FC, Hartfelder K. 2011. Representational Difference Analysis (RDA) reveals differential expression of conserved as well as novel genes during caste-specific development of the honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Insect Biochem Mol Biol* 41:602-612

Humann FC, Tiberio GJ, Hartfelder K. 2013. Sequence and expression characteristics of long noncoding RNAs in honey bee caste development - potential regulators of transgressive ovary size. *PLoS One* 8:e78915

Jarosch-Perlow A, Yusuf AA, Pirk CWW, Crewe RM, Moritz RFA. 2018. Control of mandibular gland pheromone synthesis by alternative splicing of the CP-2 transcription factor gemini in honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* [Epub]

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu Rev Entomol* 58:181-204

Kamakura M. 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473:478-483

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319:1827-30

Lago DC, Humann FC, Barchuk AR, Abraham JK, Hartfelder K. 2016. Differential gene expression underlying ovarian phenotype determination in honey bee, *Apis mellifera* L. caste development. *Insect Biochem Mol Biol* 79:1-12

Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page RE. 2012. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach. *Ecol Evol* 2:3098-109

Linksvayer TA, Rueppell O, Siegel A, Kaftanoglu O, Page RE, Amdam GV. 2009. The genetic basis of transgressive ovary size in honeybee workers. *Genetics* 183:693-707.

Melampy RM, Willis ER. 1939. Respiratory metabolism during larval and pupal development of the female honeybee (*Apis mellifica* L.). *Physiol Zool* 12:302-311

Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falkenhayn C, Maleszka R. 2010. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol* 8:e10000506

Mackert A, do Nascimento AM, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP. 2008. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. - expression analysis and functional assays. *Comp Biochem Physiol B* 150:33-44

Mandacaru SC, de Vale LH, Vahidi S, Xiao Y, Skinner OS, Ricart CA, Kelleher NL, de Sousa MV, Konemann L. 2017. Characterizing the structure and oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by mass spectrometry and complementary biophysical tools. *Biochemistry* 56:1645-1655.

Melampy RM, Willis ER. 1939. Respiratory metabolism during larval and pupal development of the female honeybee (*Apis mellifica* L.). *Physiol Zool* 12:302-311

Mirth CK, Riddiford LM. 2007. Size assessment and growth control: How adult size is determined in insects. *BioEssays* 29:344-355

Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, Amdam GV. 2011. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *J Exp Biol* 214:3977-84

Oldham S. 2011. Obesity and nutrient sensing TOR pathway in flies and vertebrates: functional conservation of genetic mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 22:45-52

Osanai M, Rembold H. 1968. Entwicklungsabhängige Enzymaktivitäten in den Mitochondrien von Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene. *Biochim Biophys Acta* 162:22-31

Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, et al. 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One* 2:e509

Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MMG, Simões ZLP. 2002. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J Insect Physiol* 48:783-790

Plettner E, Slessor, KN, Winston ML, Oliver JE. 1996. Caste-selective pheromone biosynthesis in honeybees. *Science* 271:1851–1853.

Rachinsky A, Hartfelder K. 1990. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J Insect Physiol* 36:189-194

Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. 1990. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol* 79:31-8

Rembold H. 1965. Biologically active substances in royal jelly. *Vitam Hormones* 23:359–382

Rembold H. 1987. Caste specific modulation of juvenile-hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem* 17:1003–1006.

- Rembold H, Czoppelt C, Rao PJ. 1974. Effect of juvenile hormone on caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 20:1193-1202
- Santos CG, Hartfelder K. 2016. Insights into the dynamics of hind leg development in honey bee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae - a morphology/differential gene expression analysis. *Genet Mol Biol* 38:263-277
- Santos DE, Alberici LC, Hartfelder K. 2016. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *Insect Biochem Mol Biol* 73:1-11
- Schmidt-Capella IC, Hartfelder K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol* 44:385-91
- Schmitzová J, Klaudiny J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Júdová J, Simúth J. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* 54:1020-30
- Shi YY, Yan WY, Huang ZY, Wang ZL, Wu XB, Zeng ZJ. 2013. Genomewide analysis indicates that queen larvae have lower methylation levels in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 100:193-197
- Shi YY, Liu H, Qiu YF, Ma ZY, Zeng ZJ. 2017. DNA methylation comparison between 4-day-old queen and worker larvae of honey bee. *J Asia-Pacif Entomol* 20:299-303
- Spannhoff A, Kim YK, Raynal NJ, Gharibyan V, Su MB, Zhou YY, Li J, Castellano S, Sbardella G, Issa JP, Bedford MT. 2011. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Rep* 12:238-43
- The Honey Be Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949.
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinsn GE. 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314:645-7
- Wedd L, Kucharski R, Maleszka R. 2016. Differentially methylated obligatory epialleles modulate context-dependent LAM gene expression in the honeybee *Apis mellifera*. *Epigenetics* 11:1–10
- Wheeler DE, Buck N, Evans JD. 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15:597-602
- Wheeler DE, Buck N, Evans JD. 2014. Expression of insulin/insulin-like signaling and TOR pathway genes in honey bee caste determination. *Insect Mol Biol* 23:113-121
- Wirtz P, Beetsma J. 1972. Induction of caste differentiation in the honeybee by juvenile hormone. *Entomol Exp Appl* 15:517-520

Wojciechowski M, Lowe R, Maleszka J, Conn D, Maleszka R, Hurd PJ. 2018. Phenotypically distinct female castes in honey bees are defined by alternative chromatin states during larval development. *Genome Res* doi:10.1101/gr.236497.118

Wolschin F, Mutti NS, Amdam GV. 2011. Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees. *Biol Lett* 7:112-115

Zhu K, Liu M, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, et al. 2017. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genet* 13:e1006946