

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Leonardo Campana

Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão  
(Meliponini): A relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento  
agressivo

Ribeirão Preto

2023

LEONARDO CAMPANA

**Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão (Meliponini): A relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento agressivo**

**Versão corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

Ribeirão Preto  
2023

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.

Campana, Leonardo

Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão (Meliponini): A relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento agressivo

Differential expression of immune system genes in stingless bees (Meliponini): The relationship between the immune system readiness and aggressive behavior

Aluno: Leonardo Campana

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder

Ribeirão Preto, 2023

P 82

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética – USP/ FMRP/ Departamento de Genética

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão. Expressão gênica. Comportamento de operárias. Imunidade inata. Agressividade. Reprodução.

**Key-words:** Key-words: Stingless bees. Gene expression. Worker behavior. Innate immunity. Aggressive behavior. Reproduction.

Nome: CAMPANA, Leonardo

Título: Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão (Meliponini): A relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento agressivo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética). Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## **FINANCIAMENTO**

O aluno foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Klaus Hartfelder pela orientação presente, por toda dedicação, ajuda e ensinamentos. Professor, o seu entusiasmo e sabedoria contagiam!

Ao Dr. Carlos Antônio Mendes Cardoso Júnior por me ajudar durante todo o meu projeto e na concretização de vários experimentos, por me ensinar os protocolos experimentais e também pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório Arthur e Larissa pelo apoio, pelas discussões e aprendizados proporcionados.

Ao técnico do laboratório Dr. Anderson Roberto, por todo o suporte no laboratório.

Ao técnico do meliponário Jairo, por me ajudar na coleta das minhas abelhas e também por me ensinar a manipular as colônias.

Ao Dr. Bruno Gusmão Vieira e ao Dr. André Rodrigues de Souza que me auxiliaram com a obtenção as fotografias das fases de vida das abelhas sem ferrão. À Ana Júlia Artem dos Santos pelo auxílio na edição das fotos e também pela amizade de anos.

Aos muitos amigos que fiz em Ribeirão Preto, em especial Carlos, Romário e Natália que além da grande amizade, me deram dicas, sugestões e ensinamentos importantes na vida acadêmica e no meu mestrado. Também gostaria de agradecer em especial à Gabrielle e Wilson, pela amizade, convivência diária e por ajudarem a deixar esses últimos dois anos mais leves. Também agradeço a todos os outros amigos próximos que estiveram presentes durante essa caminhada.

Aos meus pais Lourdes e Judçon e meu irmão Camilo por todo o suporte, incentivo e por estarem presentes sempre quando precisei. Aos meus avós Jovelina e Estevaldo pelo apoio e incentivo.

À Universidade de São Paulo que me proporcionou um ótimo ambiente de trabalho, estrutura e diversas atividades esportivas, culturais e de saúde mental. Aqui aprendi a me conectar mais com o meu corpo e também com minha mente.

Às agências de fomento CAPES – código 001, CNPq e FAPESP para todos os financiamentos recebidos durante o projeto de Mestrado..

*“Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da evolução”*

**Theodosius Dobzhansky**

## RESUMO

Campana L. Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão (Meliponini): A relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento agressivo [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2023.

Viver em colônia ocasiona vários desafios para abelhas sociais, incluindo predadores que buscam seus recursos armazenados, como também patógenos que facilmente se alastram entre os indivíduos agregados naquele espaço. O comportamento agressivo de ataque perante a um intruso e o sistema imunológico inato atuam de diferentes maneiras como estratégia de defesa destes organismos, sendo estas atividades energeticamente custosas. Entretanto, pouco se sabe sobre como os mecanismos moleculares basais destas atividades de defesa se relacionam entre si e se elas interferem em outros aspectos importantes da história de vida destes insetos, como a reprodução e divisão de trabalho. Assim, para compreender melhor como é a relação destes aspectos das histórias de vida das abelhas sociais, utilizamos como modelo de estudo três espécies de abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona postica*, *Frieseomelitta varia* e *Melipona quadrifasciata*, que possuem comportamentos de defesa diferentes e espécie-específicos. Para comparar a agressividade com a atividade basal (não ativada por infecção) do sistema imunológico, primeiro foram quantificados os níveis de agressividade das três espécies em questão. Utilizando um experimento da arena, em que indivíduos das três espécies foram confrontados com a presença de um intruso de outra espécie, foi possível comparar quantitativamente os níveis de agressividade. Das três espécies, *S. postica* foi a mais agressiva, com maior frequência de ataque. Em seguida vem *F. varia* e por último, a espécie mais dócil, *M. quadrifasciata*. Com base nos resultados dos níveis de agressividade, foram comparados os perfis de expressão de genes relacionados a imunidade. Para isso, foram coletadas operárias nutridoras, guardas e forrageiras de três colônias diferentes para cada uma das espécies três espécies. Foi realizada a quantificação da expressão relativa

dos genes *Toll*, *Myd88*, *Dorsal*, *Cactus*, *Imd* e *Relish* na cabeça e no abdômen de todos os indivíduos. A espécie mais agressiva, *S. postica*, apresentou níveis de expressão dos genes do sistema imunológico mais altos na cabeça em relação ao abdômen. Já a espécie mais dócil, *M. quadrifasciata*, apresentou padrão contrário, com os genes do sistema imunológico tendo maior expressão no abdômen em relação a cabeça. *F. varia*, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre cabeça e abdômen para *Toll*, *Dorsal* e *Relish*, enquanto *Myd88* se assemelha à *S. postica*. Com estes resultados, as evidências sugerem que as vias de sinalização do sistema imunológico estejam desempenhando funções alternativas no cérebro ligadas ao comportamento. A expressão destes genes também aumentou conforme a idade na cabeça das três espécies, sendo que as nutridoras, em geral, apresentaram baixa expressão dos genes em relação às guardas e forrageiras que são mais velhas. Com isso podemos inferir uma possível implicação destes genes no processo de senescência. Por fim, *F. varia*, a única espécie em que as operárias são incapazes de pôr ovos, não apresentou um perfil transcricional que a diferencia das outras duas espécies, trazendo evidência que o *trade-off* de imunidade vs. atividade reprodutiva, observado em outros insetos sociais, não ocorre em operárias de abelhas sem ferrão.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão. Expressão gênica. Comportamento de operárias. Imunidade inata. Agressividade. Reprodução.



## ABSTRACT

Campana L. Differential expression of immune system genes in stingless bees (Meliponini): The relationship between the immune system readiness and aggressive behavior [dissertation]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2023.

Living in a colony has several challenges for social bees, including predators interested in the stored resources, and pathogens that quickly spread among individuals aggregated in that crowded space. Aggressive behaviors against intruders and the innate immune system are energetically costly and act in different ways as a defense strategy. However, little is known about how the underlying molecular mechanisms of these defense activities are related to each other, and whether they interfere with other important aspects of the life history of these insects, such as reproduction and division of labor. Thus, to better understand how these aspects of the life histories of social bees are related, we used as a study model three species of stingless bees, *Scaptotrigona postica*, *Frieseomelitta varia*, and *Melipona quadrifasciata*, which have species-specifically different defense behaviors. In order to compare aggression behaviors with the basal (non-activated) activity status of the immune system, the levels of aggressiveness of the three species in question were first quantified. Using an arena assay, in which individuals of the three species were confronted with an intruder of a different species, it was possible to quantitatively compare the levels of aggression. Of the three species, *S. postica* was the most aggressive, with the highest frequency of attacks. Next came *F. varia* and, finally, the most docile species, *M. quadrifasciata*. The expression profiles of genes related to immunity were compared with respect to the results of the aggressiveness tests. For this, workers performing tasks as nurses, guards, and foragers were collected from three different colonies for each species. The relative expression of *Toll*, *Myd88*, *Dorsal*, *Cactus*, *Imd*, and *Relish* genes was quantified in the heads and abdomens of all individuals. The most aggressive species, *S. postica*, showed higher expression levels of immune system genes in the head compared to

the abdomen. The most docile species, *M. quadrifasciata*, showed the opposite pattern, with the genes of the immune system being more expressed in the abdomen than in the head. *F. varia*, in turn, did not present a significant difference between head and abdomen for *Toll*, *Dorsal*, and *Relish*, while *Myd88* was similar to *S. postica*. With these results, we obtained evidence that the immune system signaling pathways are likely to perform alternative functions in the brain, linked to behaviors. The expression of these genes in the head was also found to increase according to the age of the individuals of the three species. Nurses generally had low gene expression compared to the older guards and foragers. This indicates a possible implication of these genes in senescence processes. Finally, *F. varia*, the only species in which workers cannot oviposit, did not present an expression profile that differentiates it from the other two species, indicating that the trade-off between immunity and reproductive activity frequently observed in social insects does not occur in stingless bee workers.

Key-words: Stingless bees. Gene expression. Worker behavior. Innate immunity. Aggressive behavior. Reproduction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Via de sinalização Toll e via de sinalização Imd. ....	27
Figura 2- Colônia de <i>S. postica</i> do meliponário do departamento de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). ....	30
Figura 3- Fases do ciclo de vida de operárias de <i>S. postica</i> . ....	31
Figura 4 - Vista superior de uma colônia de <i>F. varia</i> do meliponário de do Departamento de Genética da FMRP-USP. ....	32
Figura 5 - Fases do ciclo de vida de operárias de <i>F. varia</i> . ....	33
Figura 6 - Detalhe da corbícula carregada de resina de uma operária guarda de <i>F. varia</i> . ....	34
Figura 7 - Detalhe da entrada de uma colônia de <i>F. varia</i> do meliponário do Departamento de Genética da FMRP-USP. ....	34
Figura 8 - Vista frontal de uma guarda com a face escura e de uma forrageira com face amarela de <i>F. varia</i> . ....	35
Figura 9 - Colônia de <i>M. quadrifasciata</i> do meliponário do Departamento de Genética da FMRP-USP. ....	36
Figura 10 - Fases do ciclo de vida de operárias de <i>M. quadrifasciata</i> . ....	37
Figura 11 - Preparação para confinamento de operárias recém emergidas. ....	39
Figura 12 - Desenho experimental dos ensaios da arena. ....	40
Figura 13 - Comportamentos observados no experimento da arena. ....	47
Figura 14 - Proporção do número de atacantes o atacantes de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> . ....	48
Figura 15 - Comparação do tempo de latência, índice e perseguição de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> . ....	49
Figura 16 - Expressão relativa do gene <i>Toll</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> . ....	51
Figura 17 - Expressão relativa do gene <i>MyD88</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> . ....	53

Figura 18 - Expressão relativa do gene <i>Dorsal</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> .....	55
Figura 19 - Expressão relativa do gene <i>Cactus</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> .....	56
Figura 20 - Expressão relativa do gene <i>Imd</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> .....	58
Figura 21 - Expressão relativa do gene <i>Relish</i> em nutridoras, guardas e forrageiras de <i>S. postica</i> , <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Informações obtidas com o experimento da arena.....	41
Tabela 2 - Primers utilizados nos ensaios de qPCR .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Antimicrobial peptide
Ca <sup>2</sup>	Íon Calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	Cycle Threshold
DAP	Ácido diaminopimérico
Dif	Dorsal-related Immune Factor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DWV	Deformed Wing Virus
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
F	Forageira
Fv	<i>Frieseomellita varia</i>
G	Guarda
GLM	Generalized Linear Model
GLMM	Generalized Linear Mixed Model
GRN	Gene Regulatory network
IEG	Immediate Early Genes
IκB	Inhibitor of κB
Mq	<i>Melipona quadrifasciata</i>
N	Nutridora
NF-κB	Nuclear Factor κB
PGRP-LC	Peptidoglycan Recognition Protein LC
PGRP-LE	Peptidoglycan Recognition Protein LE
QMP	Queen Mandibular Pheromone
qPCR	Quantitative Polymerase chain Reaction
RNA	Ácido ribonucleico
SPE	Spätzle-processing enzyme
Sp	<i>Scaptotrigona postica</i>
TLR	Toll-like Receptor
TRN	Transcriptional Regulatory Network

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Abelhas, organização social e suas estratégias de defesa.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Bases biológicas e moleculares do comportamento agressivo em abelhas ...</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Sistema imunológico em abelhas .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Abelhas sem ferrão: um modelo para estudo de genética e comportamento de insetos sociais .....</b>	<b>29</b>
1.4.1 <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille 1807).....	29
1.4.2 <i>Frieseomelitta varia</i> (Lepeletier 1836).....	31
1.4.3 <i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier 1836.....	35
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Quantificação do comportamento agressivo a nível de indivíduo .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Amostragem.....	39
3.1.2 Confinamento .....	39
3.1.3 Experimento da Arena .....	40
<b>3.2 Quantificação da expressão gênica dos genes do sistema imunológico .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Amostras .....	41
3.2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA.....	42
3.2.3 Genes analisados.....	42
3.2.4 PCR quantitativo (-qPCR) .....	44
3.2.5 Análises estatísticas.....	44
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 O comportamento de agressividade difere significativamente entre as três espécies de abelhas sem ferrão.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 As três espécies apresentam perfis diferentes de expressão dos genes relacionados à imunidade .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>Apêndice I - Resumo estatístico dos experimentos de comportamento .....</b>	<b>79</b>
<b>Apêndice II - Resumo estatístico GLMM de <i>S. postica</i>, <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i>. 80</b>	<b>80</b>
<b>Apêndice III - Resumo estatístico GLM de <i>S. postica</i>, <i>F. varia</i> e <i>M. quadrifasciata</i>. . 81</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Abelhas, organização social e suas estratégias de defesa

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, que formam um clado monofilético chamado Anthophila (Hedtke et al., 2013). Esse grupo basicamente é formado por vespas vegetarianas que obtêm a maior parte da sua dieta proteica a partir do pólen coletado de angiospermas. Essa forte relação com as plantas é nítida com a influência recíproca de ambas em suas linhagens ao longo da evolução (Engel et al., 2021). O ato dos adultos visitarem flores para obtenção de alimento, desempenha um papel crítico na polinização, tornando as abelhas os principais polinizadores de ecossistemas naturais e de plantas cultiváveis (Khalifa et al., 2021). A grande maioria das espécies de abelhas possui um estilo de vida solitário. Por outro lado, uma parcela das espécies desenvolveu um estilo de vida social (Batra, 1984).

Vivendo em sociedade, uma das principais características de abelhas eussociais é a presença de diferentes castas femininas, divisão de trabalho reprodutivo entre essas castas e sobreposição de gerações (Michener, 1974; Starr, 2021). Em uma colônia típica, a casta das rainhas é composta por fêmeas reprodutivas, cuja longevidade é elevada quando comparada às operárias (Winston, 1987; Corona et al., 2007). Operárias possuem longevidade reduzida (10-20x menor que as rainhas) e são parcialmente estéreis, podendo em algumas espécies, serem completamente estéreis (Bourke, 1988; Barron et al., 2001). Elas cooperam dividindo diversas tarefas necessárias para assegurar a alta taxa reprodutiva da colônia, como a proteção e manutenção do ninho, construção de células de cria, coleta e armazenamento de água e alimento (Wilson, 1971). Além da divisão de trabalho reprodutivo entre rainhas e operárias, as operárias apresentam marcada divisão de trabalho de acordo com a sua idade, um fenômeno conhecido como polietismo etário (Robinson, 1987). Quando jovens, as operárias desempenham funções principalmente no interior da colônia, como cuidar da cria (nutridoras),



enquanto as operárias mais velhas passam a realizar atividades externas, como busca por alimento (forrageiras) (Winston, 1987; Grüter, 2020).

As abelhas eussociais, como as pertencentes das tribos Apini e Meliponini, possuem a colônia como ponto central de sua sociedade, onde vivem em alta densidade populacional, cuidando da cria e armazenando alimento coletado. Deste modo, estão constantemente sujeitas a forte competição intra- e interespecífica por alimento e território (Nouvian et al., 2016). Em razão do armazenamento de recursos, a colônia pode se tornar alvo de predadores, tanto invertebrados quanto vertebrados. Este estilo de vida faz com que seja necessário que abelhas sociais tenham como uma de suas prioridades a atividade de defesa da colônia (Abbot, 2022).

Em *Apis mellifera* Linnaeus 1758, a espécie de abelha eussocial mais estudada, existe um grupo etário/comportamental de operárias chamado de guardas, que são responsáveis pela defesa da colônia (Moore et al., 1987). Geralmente, o comportamento de guarda ocorre em uma idade de transição de realização de atividades internas para atividades externas à colônia (Tofts; Franks, 1992). Além disso, existe uma sobreposição da realização da tarefa de guarda com várias outras, principalmente com a de forrageio (Nouvian et al., 2016). Guardas de *A. mellifera* geralmente ficam paradas na entrada da colônia com o primeiro par de pernas levantados e com as antenas apontadas para frente, tendo como principal função checar quem entra e quem sai da colônia e alertar as demais parceiras de ninho de uma possível ameaça (Breed; Rogers, 1991). Diversos são os inimigos naturais de abelhas melíferas, podendo se tratar de abelhas de outros ninhos e outros insetos como formigas, besouros e vespas. Nestes casos, muitas são as estratégias de defesa utilizadas, porém as mais marcantes são a utilização de mordidas e ferroadas contra o invasor (Abbot, 2022).

Entretanto, quando se tratam de inimigos de porte maior, ou que exibam maior risco, existe a necessidade de um ataque coletivo e mais coordenado (Nouvian et al., 2018). Quando uma guarda detecta a presença de um inimigo natural, ela libera um feromônio de alarme do aparato do ferrão e das glândulas mandibulares para alertar as outras companheiras de ninho (Blum, 1969). As

abelhas atacantes recrutadas pelo feromônio se orientam por estímulos como movimento e contraste de cores para perseguir o predador (Winston, 1987). Antes de ferroar, as atacantes podem desempenhar diferentes comportamentos de defesa, como morder, vibrar o corpo (*buzzing*) e se embrenhar nos pelos. Isso se dá principalmente pelo fato de que o ato de ferroar leva a morte da atacante (Breed et al., 2004). Quando finalmente uma abelha ferroa o predador, as outras se direcionam para o local onde ocorreu a ferroadada em razão da liberação do feromônio de alarme (composto principalmente de acetato de isoamila) produzido provavelmente pela glândula de Koschewnikow. A secreção da glândula é armazenada na membrana setácea no aparato do ferrão e liberada através de poros da placa quadrada (Free; Simpson, 1968; Grandperrin; Cassier, 1983; Cruz-Landim, 2009).

Abelhas sem ferrão possuem um leque muito diverso de estratégias de defesa quando comparadas ao gênero *Apis*, como por exemplo ataques massivos com mordidas, utilização de resinas pegajosas para imobilização dos inimigos, algumas são impalatáveis a predadores, algumas possuem cheiro ruim, mimetismo e a arquitetura de seus ninhos com diferentes estruturas de defesa (Kerr et al., 1962; Grüter, 2020; Shanahan et al., 2021). Hipotetiza-se que essas variadas estratégias de defesa tornaram a utilização de um ferrão obsoleta, possibilitando que mutações que atrofiem ou abolem o ferrão fossem fixadas nas populações primitivas das abelhas sem ferrão (Kerr et al., 1962). Diferente de *A. mellifera* que produz seu feromônio de alarme em glândulas do aparato do ferrão, as abelhas sem ferrão produzem o feromônio de alarme majoritariamente nas glândulas mandibulares (Smith; Roubik, 1983). As substâncias predominantes no feromônio de alarme variam muito de espécie para espécie, mas geralmente são uma mistura de “2-álcool” com outras substâncias como cetonas, aldeídos e álcoois de cadeia curta (Leonhardt, 2017). Dentre as substâncias já descritas na literatura como principais componentes do feromônio de alarme de abelhas sem ferrão, o 2-heptanol é uma substância comum a várias espécies, sugerindo ser conservada filogeneticamente (Leonhardt, 2017).

Atualmente a maioria dos inimigos das abelhas sem ferrão são invertebrados (Grüter, 2020), principalmente formigas, forídeos, vespas, larvas de besouros, aranhas e larvas de mariposas (Nogueira-Neto, 1997). Quando se trata de inimigos vertebrados, uma das maiores ameaças às abelhas sem ferrão são os seres humanos, seja pela remoção do mel, seja pela destruição dos habitats naturais, uso de pesticidas e introdução de espécies competidoras não nativas (Grüter, 2020). Geralmente como defesa contra humanos, os principais alvos são os cabelos, barba, pálpebras, narinas e ouvidos (Melo, 2021). No Velho Mundo, os inimigos vertebrados que se destacam são primatas de grande porte, além de elefantes e ursos que buscam o mel como fonte de alimento (Schwarz, 1948). Já na região neotropical, há destaque para ursos, tamanduás, tatus, iraras, jaguarundis, lagartos e sapos (por exemplo, Bufonidae) em busca do mel, e pássaros que se alimentam das operárias (por exemplo, pica-paus) (Roubik, 1989). Além disso, existe competição interespecífica entre os meliponíneos, sendo que mais de 30 espécies de abelhas sem ferrão já foram descritas atacando colônias de outras espécies de abelhas sem ferrão, tanto para roubar recursos quanto para usurpar o ninho (Grüter et al., 2016). Exemplos mais notáveis são as abelhas sem ferrão ladras (cleptoparasitas) do gênero *Lestrimelitta*, como *L. limao*, que não visitam flores para coletar néctar e pólen, sendo assim obrigatoriamente cleptoparasitas (Sakagami, 1993).

Como forma de defesa contra estes inimigos, na entrada ou no túnel de acesso de todas as colônias de abelha sem ferrão, sempre há pelo menos uma operária guarda postada controlando quem entra e quem sai (Kärcher; Ratnieks, 2009; Jones et al., 2012). Se as operárias guardas detectarem a presença de um invasor ou uma possível ameaça, elas irão responder atacando e recrutando outras operárias para o ataque por meio do feromônio de alarme (Schorkopf, 2016). A entrada da colônia é uma estrutura importante que varia em tamanho e morfologia de espécie para espécie em abelhas sem ferrão, podendo ser muito pequena, da espessura de uma operária (por exemplo nos gêneros *Frieseomelitta* e *Melipona*), assim como entradas maiores em forma de tubo (exemplo gênero *Scaptotrigona*) (Michener, 1974; Grüter, 2020). Existem evidências de que o tamanho da entrada

dos ninhos reflete as estratégias de defesa adotadas por cada espécie (Couvillon et al., 2008a). Espécies com entradas maiores possuem um maior tráfego de forrageiras, porém existe a necessidade de posicionar muito mais operárias guardas do que em espécies com entradas menores de ninho. Pode-se observar, por exemplo, que o número de guardas posicionadas na entrada do ninho de *Frieseomelitta varia* é em média 1 a 2 indivíduos, enquanto *Scaptotrigona postica*, com entrada maior, possui uma média de 8 guardas posicionadas (Couvillon et al., 2008a). Dependendo do horário do dia e da espécie, haverá uma maior quantidade de guardas posicionadas na entrada da colônia, sendo a noite geralmente o período em que elas ficam apenas dentro do ninho (Grüter, 2011).

Em alguns gêneros, como *Scaptotrigona*, *Tetragona* e *Trigona*, as respostas de defesa tem intensidade proporcional ao tamanho da colônia, ou seja, quanto maior a colônia em termos de população, mais intenso será o ataque (Roubik, 1989). Por outro lado, existem espécies, como as do gênero *Lestrimelitta* que, apesar de terem colônias grandes e populosas, possuem um comportamento mais dócil contra intrusos grandes (Melo, 2021). Espécies que constroem o ninho no solo, geralmente são mais dóceis. Nestas a operária guarda se adentra ao túnel quando ocorre uma possível ameaça. Já espécies que possuem ninhos expostos, geralmente são muito agressivas, respondendo com ataques massivos e coordenados contra intrusos (Michener, 1974).

Foi demonstrado que não somente em *A. mellifera*, mas que também em algumas espécies de abelhas sem ferrão, o ataque massivo é auto-destrutivo, ou seja, o ataque das abelhas contra o intruso geralmente leva à morte dos indivíduos atacante, sendo *Trigona* o gênero com este comportamento mais notável. Nesse tipo de ataque suicida foi observado que muitas das atacantes fatalmente perdem suas mandíbulas enquanto mordem, além de serem esmagadas e mortas ao serem removidas pelo inimigo de grande porte atacado (Shackleton et al., 2015a). Em boa parte dos casos, mesmo decapitadas, a cabeça continua presa ao inimigo com as mandíbulas travadas, fenômeno este conhecido como “mordida suicida” (Shackleton, 2015b). Teoriza-se que as operárias que se sujeitam a este tipo de comportamento suicida, como as guardas, são mais propensas a o fazer pois

possuem uma expectativa de vida menor que as abelhas mais jovens e também menos propensão para desempenhar outras funções (Shorter; Rueppell, 2012).

## **1.2 Bases biológicas e moleculares do comportamento agressivo em abelhas**

Estímulos que elicitam comportamentos defensivos são captados do ambiente pelas abelhas. Ao serem processados no cérebro, levam a uma resposta comportamental, frequentemente de forma agressiva (Galizia, 2014). Estímulos olfativos, como a captação do feromônio de alarme, são um dos principais desencadeadores de resposta agressiva em defesa da colônia (Boch; Rothenbuhler, 1974). O feromônio de alarme é captado pelo par de antenas presente na cabeça, que são movimentadas por músculos permitindo o direcionamento das mesmas a fim de maximizar a captura desses odores (Kannan et al., 2022). As antenas são equipadas com estruturas cuticulares chamadas de sensilas olfativas, que são inervadas por dendritos de neurônios olfativos (Steinbrecht, 1996). O estímulo captado nas antenas é transportado então para dentro do cérebro através das projeções dos neurônios olfativos. A primeira estrutura cerebral em que a informação é captada é o lobo antenal, onde os terminais dos axônios dos neurônios olfativos se ligam aos dendritos dos glomérulos olfativos (Sachse et al., 1999; Wang et al., 2008). Nos lobos antenais existem cerca de 160 glomérulos olfativos, número que corresponde ao número de proteínas de receptores olfativos codificados no genoma da abelha melífera (Nouvian et al., 2016). Os neurônios olfativos que possuem receptores para odores específicos, se ligam sempre ao mesmo glomérulo. Com os glomérulos olfativos ativados, a mensagem olfativa então é enviada aos corpos cogumelos e às regiões laterais do protocérebro via o trato paralelo, onde é processada levando a abelha a se engajar ou não na resposta agressiva (Kannan et al., 2022).

O comportamento agressivo/defensivo normalmente é pontual, ocorrendo em momentos específicos quando os indivíduos ou a colônia estão enfrentando uma possível ameaça. Essa resposta defensiva e agressiva à ameaça causa mudanças rápidas nos títulos de moléculas psicoativas (Hunt, 2007). Em insetos, as aminas

biogênicas desempenham um papel importante na mediação do comportamento pois atuam como neurotransmissores, neuromoduladores e neurohormônios (Huang, 2017). Além disso, a predisposição a uma resposta agressiva mais forte perante a uma ameaça já foi associada a níveis basais desses compostos nos organismos (Hunt, 2007). O componente principal do feromônio de alarme, acetato de isoamila, aumenta os níveis de serotonina e dopamina no cérebro de operárias de *A. mellifera*, além de torná-las mais propensas a atacar, e a inibição farmacológica destas duas aminas biogênicas diminui a propensão ao ataque (Nouvian et al., 2018).

Odores e feromônios além de causar mudanças rápidas nas concentrações de aminas biogênicas, podem também alterar a expressão de determinados genes no cérebro, seja a curto, médio ou longo prazo (Grozinger et al., 2003). Em *A. mellifera*, feromônios como os feromônios mandibulares da rainha (QMP: *Queen Mandibular Pheromone*), e feromônios larvais, são capazes de alterar no cérebro a expressão de genes relacionados ao comportamento das operárias (Alaux et al., 2009a; Grozinger et al., 2003). Além disso, compostos principais do feromônio de alarme são capazes de alterar a expressão de genes imediatos de resposta nos lobos antenais de operárias, como o fator de transcrição *c-jun* (Alaux et al., 2007). Genes imediatos precoces (IEG: *Immediate Early Genes*) são uma classe de genes codificadores de fatores de transcrição com expressão rápida e transitória que, dentre várias funções, contribuem com a plasticidade sináptica, podendo ser expressos em resposta a estímulos neuronais e do ambiente (Sommerlandt et al., 2019). A utilização do feromônio de alarme em exposição durante apenas um minuto na entrada de colônias de *A. mellifera*, mostrou que uma hora depois, este rápido estímulo ambiental foi o suficiente para alterar a expressão gênica de vários genes, incluindo IEGs e genes responsáveis pela síntese de aminas biogênicas (Alaux et al., 2009b).

Chandrasekaran et al. (2011) demonstraram em abelhas que é possível inferir estados neurogenômicos específicos de comportamentos a partir da análise de redes transcricionais regulatórias (TRN: *Transcriptional Regulatory Network*) e da ação coordenada entre fatores de transcrição e genes alvos. Isso é possível pois

os diferentes comportamentos das operárias, como por exemplo, de nutridoras, guardas e forrageiras, possuem módulos transcricionais distintos. (Chandrasekaran et al., 2011). Análises de transcriptoma por meio de *single cell RNA sequencing* seguido da reconstrução de redes de regulação gênica (GRN: *Gene Regulatory network*) demonstraram diferenças entre perfis regulatórios em regiões específicas do cérebro entre soldados (atacantes) e forrageiras, regiões estas ligadas ao processamento de sinais sensoriais importantes na defesa da colônia, no caso visão e olfato (Traniello et al. 2023). Nestas análises foram demonstradas que a maior diferença entre forrageiras e soldados foram fatores de transcrição relacionados com o metabolismo de serotonina e aminas biogênicas (Nouvian et al. 2018; Traniello et al. 2023).

Perturbações crônicas constantes aferidas experimentalmente contra ninhos de *A. mellifera* levam à diminuição dos níveis de forrageio e de agressividade, tanto a nível de indivíduo quanto a nível de colônia. Em contrapartida, perturbações pontuais aferidas experimentalmente levam a um aumento das taxas de agressividade (Alaux et al., 2007; Rittschof et al., 2013). Além disso, as mudanças de comportamento são seguidas por mudanças complexas na expressão gênica do cérebro, sendo alguns dos genes diferencialmente expressos associados ao metabolismo energético (Alaux et al., 2009b; Rittschof et al., 2013). Nos corpos cogumelos especificamente, região do cérebro que processa informação da memória e aprendizagem (Giurfa, 2003), ocorrem duas ondas de expressão gênica diferencial quando o indivíduo é exposto a um intruso: a primeira se trata de genes relacionados ao remodelamento do citoesqueleto e a segunda onda com transcrição de genes relacionados a hormônios e ao metabolismo energético (Shpigler et al., 2017).

No cérebro de operárias de *A. mellifera*, existe uma correlação negativa da expressão de genes relacionados ao ciclo de fosforilação oxidativa com a agressividade. Essa correlação negativa ocorre quando se comparou colônias mais agressivas de abelhas africanizadas com colônias menos agressivas de abelhas europeias; também ocorre na comparação de abelhas mais velhas com abelhas mais novas, que são menos agressivas, além de abelhas expostas ao feromônio de

alarme com abelhas não expostas (Alaux et al., 2009b). Em concordância com os dados de expressão gênica, observa-se que existe uma mudança no perfil metabólico no cérebro das abelhas mais agressivas ou quando expostas ao feromônio de alarme. Durante o comportamento de defesa há uma diminuição da atividade de fosforilação oxidativa e um aumento de atividade de glicólise, mesmo com o suprimento de oxigênio necessário para a execução da respiração celular (Li-Byarlay et al., 2014; Chandrasekaran et al., 2015). Por outro lado, as operárias mais velhas e agressivas apresentam uma maior taxa de respiração mitocondrial no cérebro quando comparadas com as mais jovens e dóceis. Desta forma, observa-se que a questão metabólica cerebral está fortemente ligada ao comportamento agressivo, porém ainda há a necessidade de mais trabalhos que reconciliem os dados fisiológicos, transcricionais e comportamentais (Rittschof et al., 2018).

Operárias de *A. mellifera* que apresentam fenótipos comportamentais coletivos, como intensidade da resposta agressiva a uma ameaça à colônia, têm suas tendências comportamentais individuais de agressividade mascaradas pela disposição comportamental do grupo naquele determinado momento. Essas tendências individuais podem ser referentes a perfis de expressão gênica diferencial entre indivíduos mais agressivos e mais dóceis (Rittschof, 2017). Do ponto de vista genômico, nenhum genótipo específico foi associado a operárias mais agressivas ou mais dóceis. Entretanto, existe uma correlação muito forte entre a agressividade de uma colônia e a frequência de certos alelos (Avalos et al. 2020), e assim, um ajuste do comportamento dos indivíduos conforme o genótipo predominante no grupo. Em outras palavras, a genética do grupo se sobressai em relação a genética do indivíduo no que diz respeito às decisões tomadas por uma operária quando decide atacar ou não (Avalos et al. 2020).

Outro aspecto biológico que afeta significativamente o comportamento agressivo a nível de indivíduo e de grupo é o contexto social ao qual larvas de *A. mellifera* são expostas nas primeiras fases do desenvolvimento. Operárias em estágio de vida pré-adulto quando criadas em um ambiente de colônia mais agressiva, apresentam níveis de agressividade mais altos quando adultas, maior



resiliência à pesticidas e redução da carga ectoparasitária em relação às suas irmãs que foram criadas em colônia de baixa agressividade (Rittschof et al., 2015).

Por fim, mas não menos importante, a resistência a patógenos e parasitas e o sistema imunológico também já foram relacionados ao comportamento agressivo. Cepas altamente agressivas de *A. mellifera* africanizada, apresentam traços de resistência muito fortes contra ectoparasitas, quando comparadas às abelhas de cepas genéticas mais dóceis (Camazine, 1986). Operárias de *A. mellifera* mais dóceis e saudáveis, por sua vez, assim como operárias criadas em colônias com comportamento pouco agressivo, apresentam um perfil transcricional gênico no cérebro e no corpo gorduroso muito semelhante à de indivíduos que estão sofrendo de infecção aguda por um patógeno (Rittschof et al., 2019). Por outro lado, Carr et al. (2020) demonstraram que, quando operárias de colônias mais agressivas e colônias mais dóceis são infectadas por um mesmo patógeno, não há diferença de intensidade da resposta imune entre os dois grupos. Outra assinatura transcricional relacionando agressividade com o sistema imunológico foi observada por Chandrasekaran et al. (2011), sendo esta a existência de uma expressão elevada do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no cérebro de operárias atacantes de *A. mellifera*. Trata-se de um gene fundamental da via de sinalização Toll para a resposta imune inata. Apesar das evidências da existência de uma relação entre o comportamento agressivo e a atividade do sistema imunológico, até o presente momento, poucos estudos foram realizados no intuito de compreender como o estado basal (não ativado) do sistema imunológico de indivíduos saudáveis de insetos sociais se relaciona com o grau de agressividade, uma vez que a maioria dos trabalhos utilizaram indivíduos de *A. mellifera* manipulados farmacologicamente ou com seu meio social alterado nos estudos.

### **1.3 Sistema imunológico em abelhas**

Ao contrário dos vertebrados, que possuem um sistema imunológico composto por imunidade inata e adaptativa, a defesa imunológica dos invertebrados contra patógenos é baseada apenas na imunidade inata (Janeway e Medzhitov

2002), que em insetos é composta por elementos humorais e celulares. A resposta celular é realizada por hemócitos e envolve encapsulação de patógenos, fagocitose, nodulação e eventos de melanização (Strand 2008; Gábor et al. 2020). Por outro lado, a defesa humoral ocorre por meio de peptídeos antimicrobianos (AMPs) sintetizados pelo corpo gorduroso e secretados na hemolinfa (Casteels et al., 1990; Danihlík et al., 2015).

AMPs são produzidos quando um patógeno entra em contato com receptores de reconhecimento específicos que acionam as vias de sinalização Toll e Imd (Evans et al., 2006; Kingsolver et al., 2013; Myllymäki et al., 2014; Zhang et al., 2021). A via de sinalização Toll foi primeiramente descrita como protagonista da determinação do eixo dorso-ventral durante o desenvolvimento embrionário dos insetos. Não tardou, logo a função relacionada à resposta imune inata também foi descrita para esta via (Lynch; Roth, 2011; Buchon et al., 2014; Lima et al., 2021). Em *Drosophila melanogaster*, a via de sinalização Toll é ativada quando a citocina Spaetzle é clivada e se liga ao receptor transmembrana Toll. Mecanicamente, Spaetzle é clivada por ação da enzima processadora de Spaetzle (SPE: *Spätzle-processing enzyme*), que por sua vez é ativada quando proteínas de reconhecimento identificam componentes presentes na parede celular de fungos e bactérias Gram-positivas (Lemaitre; Hoffmann, 2007; Valanne et al., 2011; Buchon et al., 2014). Depois de Spaetzle ser clivado e se ligar ao receptor Toll, a proteína de ligação MyD88 é recrutada para a membrana plasmática, assim como Tube e a quinase Pelle. Essas três proteínas formam um complexo proteico heterotrimérico que fosforila o Cactus (I $\kappa$ B), o inibidor do fator de transcrição Dorsal (NF- $\kappa$ B). Em estado normal, de inativação, Cactus e Dorsal estão ligados entre si, formando um complexo proteico que fica retido no citoplasma. Mas quando fosforilado, Cactus se desprende de Dorsal e é degradado. Dorsal, por sua vez, é translocado para o núcleo onde se liga aos sítios de reconhecimento nos promotores de seus genes alvos, como por exemplo, os responsáveis pela transcrição de AMPs (Figura 1) (Evans et al., 2006; Valanne et al., 2011; Lourenço et al., 2018). Em abelhas melíferas, dois genes codificadores de Dorsal, *Dorsal-1* e *Dorsal-2*, são responsáveis pela transcrição dos AMPs abaecina e defensina-1 (Lourenço et al.

2018), sendo que o primeiro gene apresenta duas isoformas de *splicing* alternativo, *Dorsal-1A* e *Dorsal-1B* (Lourenço et al., 2018).

Diferente da via Toll que possui função conservada entre diferentes filos de animais quanto ao seu papel na imunidade inata, participando também no desenvolvimento embrionário de insetos, a via de sinalização Imd foi descrita e caracterizada até o presente momento apenas para a função imunológica (Zhai et al., 2018). A via Imd é ativada quando as proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PGRP-LC transmembrana e PGRP-LE citosólica) reconhecem peptidoglicanos do tipo DAP (que possuem ácido diaminopimélico na terceira posição do oligopeptídeo) da parede celular de bactérias gram-negativas. Em *D. melanogaster*, assim que ativada, a proteína adaptadora Imd se liga à PGRP-LC ou PGRP-LE. Em sequência, Imd interage com FADD que recruta DREDD (homólogo da caspase 8 dos mamíferos). A partir de DREDD a via pode seguir dois caminhos diferentes, culminando na transcrição de AMPs específicos. O primeiro caminho é que DREDD, por si só, já participa da clivagem do fator de transcrição Relish. Relish é o homólogo do NF- $\kappa$ B da via do Imd. O domínio C-terminal (Rel49) de Relish é separado pela clivagem e permanece no citoplasma, enquanto o domínio N-terminal (Rel68) é translocado para o núcleo onde ativa a transcrição de AMPs. O segundo mecanismo ocorre quando DREDD cliva IMD e expõe um sítio de ligação para a ubiquitina ligase IAP2 E3. Esta ubiquitina ligase, juntamente com Uev1a, Bendless (Ubc13) e Effete (Ubc5), é responsável pela poliubiquitinação de IMD. Consequentemente, IMD recruta o complexo TAB2/TAK1, que fosforila e ativa o complexo IKK, sendo este o responsável pela clivagem e ativação de Relish (Figura 1) (Kleino; Silverman, 2014; Myllymäki et al., 2014; Zhai et al., 2018). A via Imd também é responsável pela regulação da expressão de abaecina, assim como a via Toll, entretanto o AMP himenoptaecina é regulado exclusivamente pela via Imd (Schlüns e Crozier, 2007; Lourenço et al., 2013).

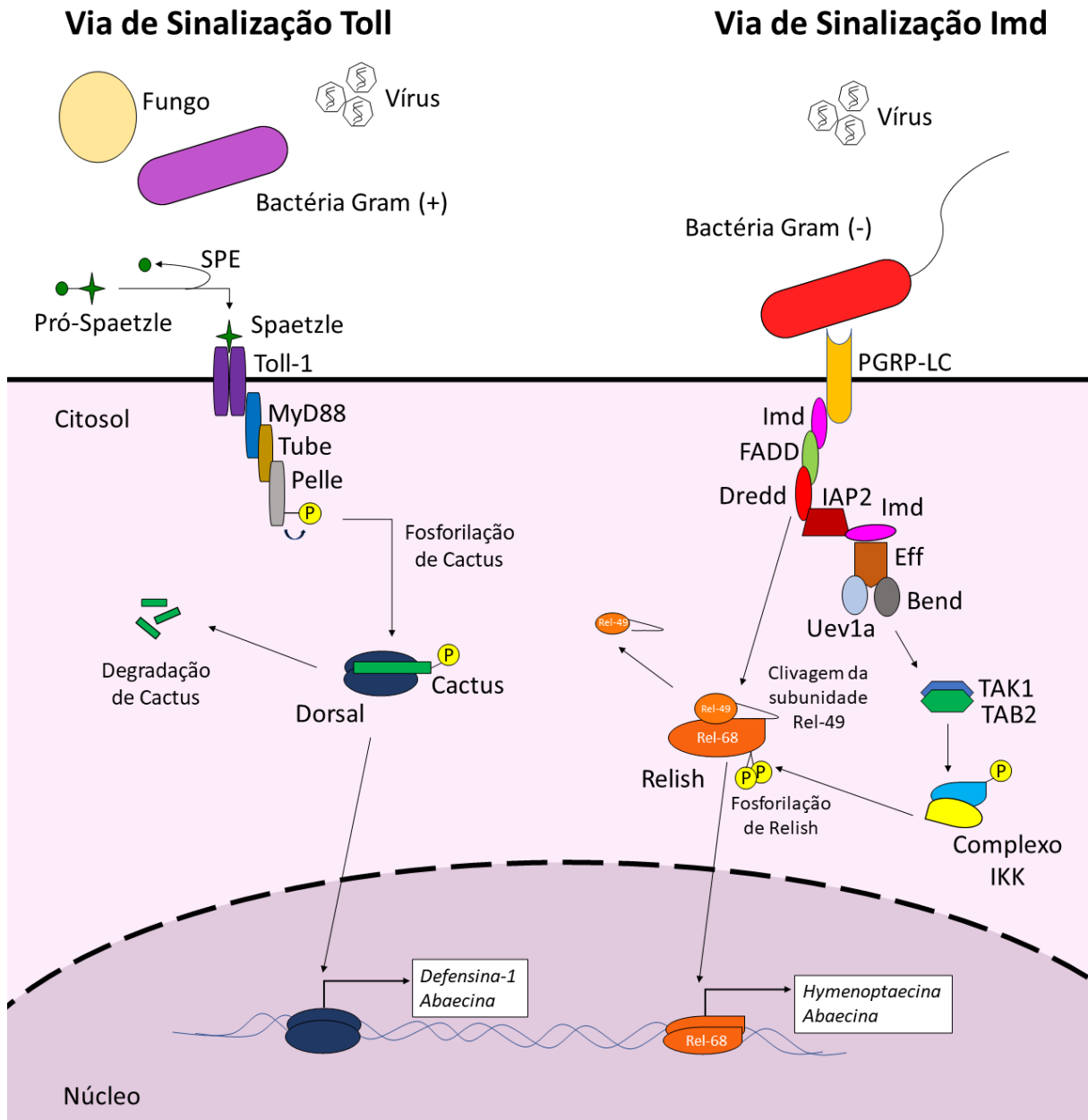


Figura 1- Via de sinalização Toll (à esquerda) e via de sinalização Imd (à direita). Esquema do próprio autor

A resposta imune inata tem altos custos energéticos, e esses custos podem interferir com outros aspectos importantes das histórias de vida dos insetos, levando a um *trade-off* (Sheldon et al., 1996). Especificamente, a atividade reprodutiva e a resposta imune se correlacionam negativamente em insetos, sendo que o aumento da atividade reprodutiva em fêmeas diminui drasticamente a intensidade da

resposta imune. O contrário também é observado, uma vez que altas taxas de atividade do sistema imune resultam em diminuição da atividade reprodutiva (Schwenke et al., 2016). Além de aspectos reprodutivos, o envelhecimento também é um fator que influencia na atividade do sistema imunológico. Em *A. mellifera*, diferentes estágios do ciclo de vida de uma operária, que também coincidem com a divisão de trabalho, possuem diferentes respostas do sistema imunológico quando a frente de uma doença. Forrageiras saudáveis de abelhas melíferas têm um nível de expressão mais alto que nutridoras do gene codificador do AMP Defensina-1. No entanto, após uma infecção bacteriana induzida em laboratório, as nutridoras mostraram uma resposta imunológica mais robusta do que as forrageiras (Lourenço et al., 2019).

Uma descoberta surpreendente a partir da anotação do genoma sequenciado de *Apis mellifera* (Robinson et al., 2006) foi a diversidade genômica reduzida no sistema imunológico das abelhas em comparação com *D. melanogaster*. Por exemplo, o fator Dif presente na via Toll em *Drosophila* está ausente em *A. mellifera* (Evans et al., 2006; Lourenço et al., 2018). Uma possível explicação para a aparente redução no repertório genômico do sistema imune de abelhas melíferas seria a imunidade social (Evans et al., 2006). Como os demais insetos eussociais, a imunidade social das abelhas apresenta um sistema de proteção contra patógenos baseado em defesas comportamentais, fisiológicas e organizacionais da colônia (Cremer et al., 2017). Entretanto, trabalhos recentes não encontraram evidências de que o comportamento social seja uma explicação para uma perda de repertório de genes do sistema imunológico em abelhas, uma vez que essa característica também é presente em abelhas solitárias (Barribeau et al. 2015).

O comportamento complexo em operárias de abelhas eussociais, como resposta agressiva perante a uma ameaça, é influenciado por esses diversos aspectos da história de vida. Compreender a relação entre o sistema imunológico com a atividade reprodutiva, a divisão de trabalho, longevidade e comportamento podem trazer evidências de como a agressividade e a imunidade se tornaram parte da transição no ciclo de vida das operárias. Além disso, a relação do sistema

imunológico com estes diferentes aspectos das histórias de vida das abelhas eussociais, traz evidências de que as vias de sinalização da imunidade inata possam desempenhar funções alternativas à imunidade, como um papel importante em comportamentos complexos e específicos de diferentes espécies.

#### **1.4 Abelhas sem ferrão: um modelo para estudo de genética e comportamento de insetos sociais**

A maioria dos estudos com abelhas eussociais sobre a imunidade celular, estratégias de defesa a nível da colônia e redes gênicas associadas foram realizados utilizando *A. mellifera* como modelo. No entanto, o gênero *Apis*, com apenas 9-12 espécies, representa um grupo relativamente pouco representativo na filogenia das abelhas (Apidae) (Bonoan; Starks, 2021). Em contraste, a tribo Meliponini compreende mais de 500 espécies reconhecidas, distribuídas em 58 gêneros (Grüter, 2020; Melo, 2021). Consequentemente, essa riqueza de espécies, de distribuição pantropical, está associada a um alto nível de diversidade de características biológicas, incluindo locais de nidificação, tamanho da colônia e agressividade contra os intrusos. Aproveitando a ampla variabilidade biológica das abelhas sem ferrão, propomos investigar a relação entre agressividade e o perfil do sistema imunológico usando três espécies de abelhas sem ferrão com comportamentos de agressividade distintos: *Scaptotrigona postica* (agressiva alta), *Frieseomelitta varia* (agressividade média) e *Melipona quadrifasciata* (baixa agressividade).

##### **1.4.1 *Scaptotrigona postica* (Latreille 1807)**

*Scaptotrigona postica*, popularmente conhecida como Mandaguari, tem distribuição por todo o território brasileiro, incluindo registros de ocorrência também no Peru e Bolívia. Pela falta da disponibilidade do holótipo descrito por Latreille e por se tratar de um nome frequentemente dado a espécies possivelmente não descritas que se assemelham, é recorrente na literatura a utilização também do

nome *Scaptotrigona aff. depilis* (Camargo et al., 2013). A espécie é conhecida por construir um tubo de cera na entrada que se abre como uma corneta, onde várias operárias guardas ficam postadas, controlando a entrada de quem entra e sai da colônia (Figura 2a) (Nogueira-Neto, 1997). O ninho é construído em troncos de árvores ou em cavidades artificiais em construções humanas (Roubik, 1989; Nogueira-Neto, 1997). Os favos de cria são dispostos em forma de discos que se sobrepõem e são unidos por trabéculas (Figura 2b). Ao redor dos discos de cria, as operárias constroem várias lamelas de cerume, formando um invólucro com função de termorregulação (Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2000). Células de tamanho maior geralmente dão origem a rainhas em razão da maior quantidade de alimento larval provisionado (Luna-Lucena et al., 2019). Além disso, as operárias de *S. postica*, são capazes de botar ovos tróficos que alimentam a rainha e também ovos que dão origem a machos (Nogueira-Neto, 1997). O pólen coletado por esta espécie é armazenado em potes onde é fermentado e adquire um sabor azedo (Menezes et al., 2013). Espécies pertencentes a este gênero possuem colônias muito populosas e são utilizadas vastamente na meliponicultura para a produção de mel (Cortopassi-Laurino et al., 2006).



Figura 2 - Colônia de *S. postica* do meliponário do departamento de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). (a) Detalhe da entrada da colônia. (b) Vista frontal dos discos de cria descobertos pelo invólucro. (c) Vista superior dos discos de cria. Fotos obtidas pelo próprio autor.

De acordo com Simões e Bego (1979), operárias de *S. postica* possuem uma longevidade média de 39,5 dias. Operárias realizam a função de nutridora, como

provisionamento de células de cria, postura de ovos tróficos ou ovos de machos, entre o 16º e o 20º dia de vida. Já as atividades de guarda são realizadas entre o 31º e o 40º dia de vida (**Figura 3**). A função de forrageira geralmente é executada por operárias mais velhas, mas também com uma grande variedade de idades, podendo ser desde os 26 dias até 60 dias de idade (Simões; Bego, 1979). O comportamento de defesa de *S. postica* é bastante agressivo, tendo no tubo de entrada mais de seis guardas postadas (Nogueira-Neto, 1997; Schorkopf, 2016). Geralmente as operárias desta espécie formam ataques massivos contra ameaças de grande porte. Quando percebem a ameaça, logo liberam o feromônio de alarme, que possui um cheiro forte (Grüter, 2020).

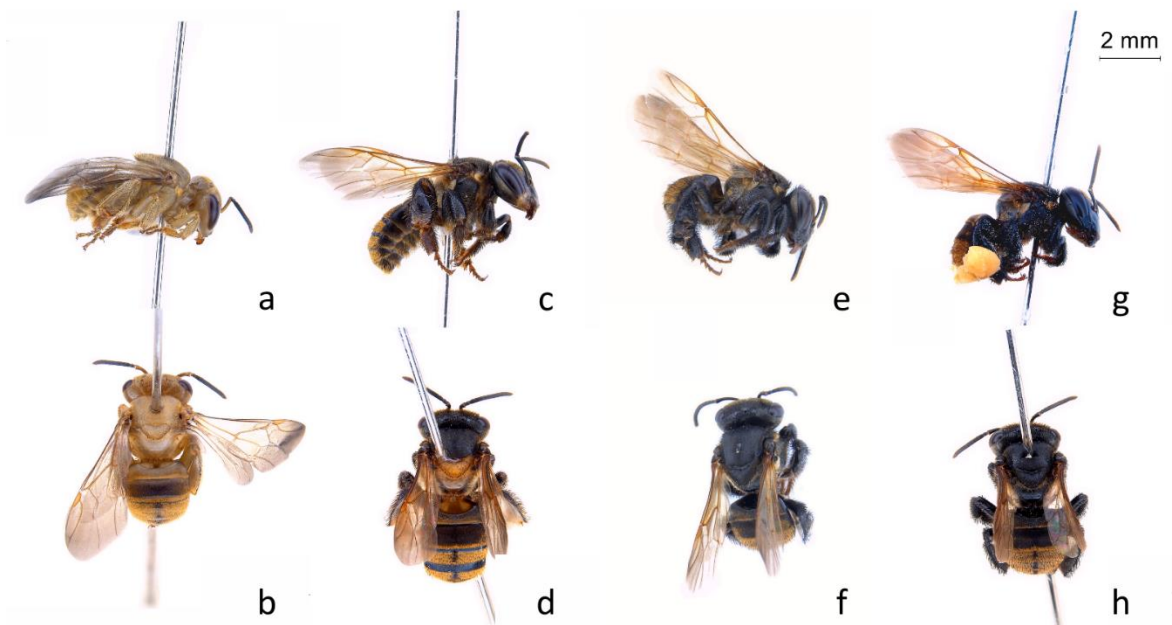


Figura 3- Fases do ciclo de vida de operárias de *S. postica*. (a) Recém emergida, vista lateral. (b) Recém emergida, vista dorsal. (c) Nutridora, vista lateral. (d) Nutridora, escutelo amarelado característico da idade, vista dorsal. (e) Guarda, vista lateral. (f) Guarda, escutelo já escuro, vista dorsal. (g) Forrageira, pólen na corbícula, vista lateral. (h) Forrageira, vista dorsal. Fotos obtidas pelo próprio autor com o auxílio do Dr. Bruno Gusmão Vieira e do Dr. André Rodrigues de Souza.

#### 1.4.2 *Frieseomelitta varia* (Lepeletier 1836)

*Frieseomelitta varia*, popularmente conhecida como marmelada ou moça-branca, é uma espécie de abelha sem ferrão neotropical que se distribui pelo Brasil



nos estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins, sendo também encontrada na Bolívia, região de Santa Cruz (Camargo et al., 2013). A espécie tem hábitos de nidificação em ocos de árvores, construindo as células de cria em forma de cacho e armazenando o mel em potes ovais e o pólen em longos tubos cilíndricos (Figura 4). Não há células específicas que dão origem a uma rainha, mas duas células podem ser construídas apoiadas umas às outras, e uma vez que uma larva se desenvolve em rainha quando rompe a parede da célula de cria vizinha e se alimenta com a porção extra de alimento larval (Nogueira-Neto, 1997). As operárias de *F. varia* não são capazes botar ovos tróficos ou ovos que originam machos em razão do processo de morte celular nos ovários que inicia na fase de pupa, e até o momento em que se tornam nutridoras, os ovários são completamente degenerados (Boleli et al., 2000).



Figura 4 - Vista superior de uma colônia de *F. varia* do meliponário de do Departamento de Genética da FMRP-USP. Detalhe para os cachos de cria mais velhos (amarelo claro) e cachos de cria novos (castanhos). Foto obtida pelo próprio autor.

A longevidade das operárias de *F. varia* chega em média a 41 dias, sendo que a idade máxima já observada foi de 82 dias (Cardoso, 2010). As tarefas classicamente atribuídas às nutridoras, como provisionamento de células de cria, são realizadas por operárias com idade média de 15,12 dias, dentro de uma faixa etária de 8 a 22 dias. Tarefas de guarda e agressões contra indivíduos ocorrem em

média 42 dias e 37,5 dias respectivamente. Já as forrageiras desempenham suas atividades com uma média de 57,58 dias, sendo a atividade mais tardia (Figura 5) (Cardoso, 2010).

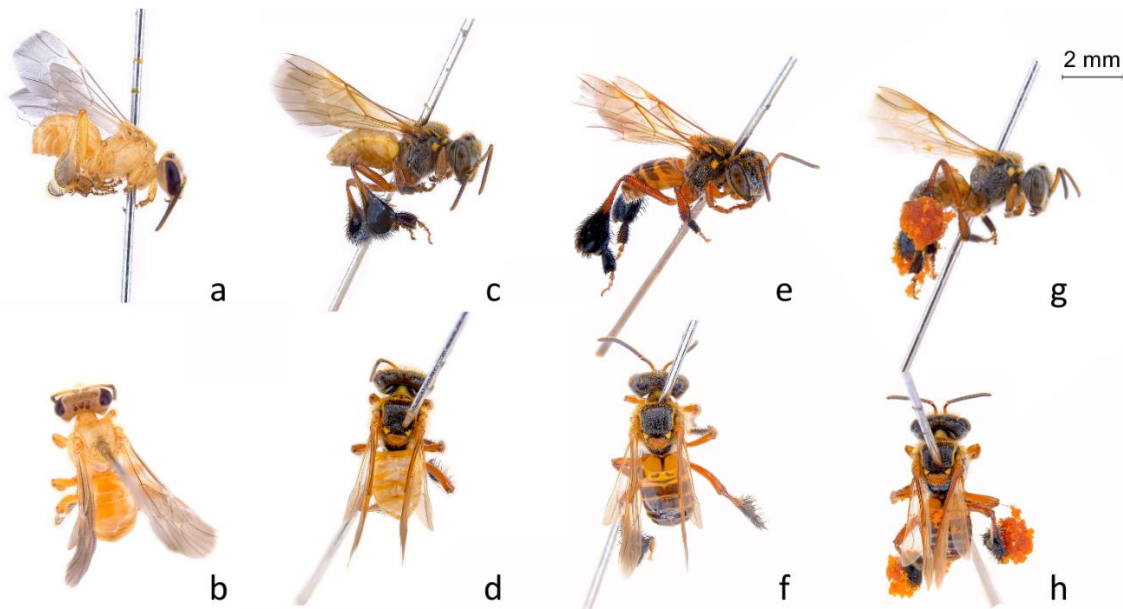


Figura 5 - Fases do ciclo de vida de operárias de *F. varia*. (a) Recém emergida, vista lateral. (b) Recém emergida, vista dorsal. (c) Nutridora, vista lateral. (d) Nutridora, abdômen grande e esbranquiçado, vista dorsal. (e) Guarda, corbícula com resina, vista lateral. (f) Guarda, vista dorsal. (g) Forrageira, pólen na corbícula, vista lateral. (h) Forrageira, vista dorsal. Fotos obtidas pelo próprio autor com o auxílio do Dr. Bruno Gusmão Vieira.

*F. varia* é uma espécie com comportamento de defesa peculiar, conhecida por depositar resina sobre quem importuna suas colônias. As abelhas sem ferrão que utilizam resinas como forma de defesa, as coletam quando são exsudadas de partes danificadas de diferentes tipos de plantas, principalmente árvores lenhosas (Nogueira-Neto, 1997). As forrageiras de *F. varia* coletam a resina e a prendem em suas corbículas, utilizando como instrumento os tarsos e basitarsos dos pares de pernas anteriores (Figura 6). Quando chegam na colônia, as forrageiras descarregam a resina com a ajuda de outras companheiras de colônia, a depositando em locais específicos. Após o processo de depósito, elas meticulosamente limpam as partes do corpo que tiveram contato com o material (Gastauer et al. 2011). Quando ameaçadas por intrusos, operárias de abelhas sem

ferrão já foram observadas buscando pequenas quantidades de resina armazenada e colando-as sobre a cabeça e outras partes do corpo de seus inimigos artrópodes (Nogueira-Neto, 1997).

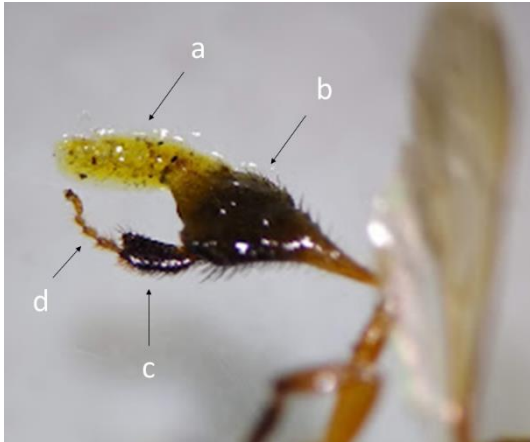


Figura 6 - Detalhe da corbícula carregada de resina de uma operária guarda de *F. varia*. (a) Resina escorrendo. (b) Corbícula. (c) Basitarso. (d) Tarsômeros. Foto obtida pelo próprio autor.

A entrada do ninho de *F. varia* é pequena e permite a passagem de uma única abelha por vez. Geralmente, as guardas de *F. varia* ficam paradas, tampando a entrada com a própria cabeça (Figura 7) (Grüter, 2020). Muitas espécies do gênero *Frieseomelitta* possuem guardas que diferem na coloração quando comparadas com forrageiras, sendo que as guardas possuem cabeça mais escura, enquanto a das forrageiras é mais amarela (Figura 8). Hipotetizou-se que essa característica ajuda a camuflar a entrada da colônia, a tornando ainda mais conspícua (Grüter et al., 2017). Além disso, guardas ficam caminhando perto da entrada da colônia com as corbículas já carregadas de resina, prontas para depositar sobre o invasor, incluindo em humanos (Couvillon et al., 2008b).



Figura 7 - Detalhe da entrada de uma colônia de *F. varia* do meliponário do Departamento de Genética da FMRP-USP. Presença de uma guarda dentro do tubo de entrada apenas com a cabeça voltada para o exterior. Também estão presentes duas guardas caminhando ao redor da entrada com as corbículas carregadas de resina. Foto obtida pelo próprio autor

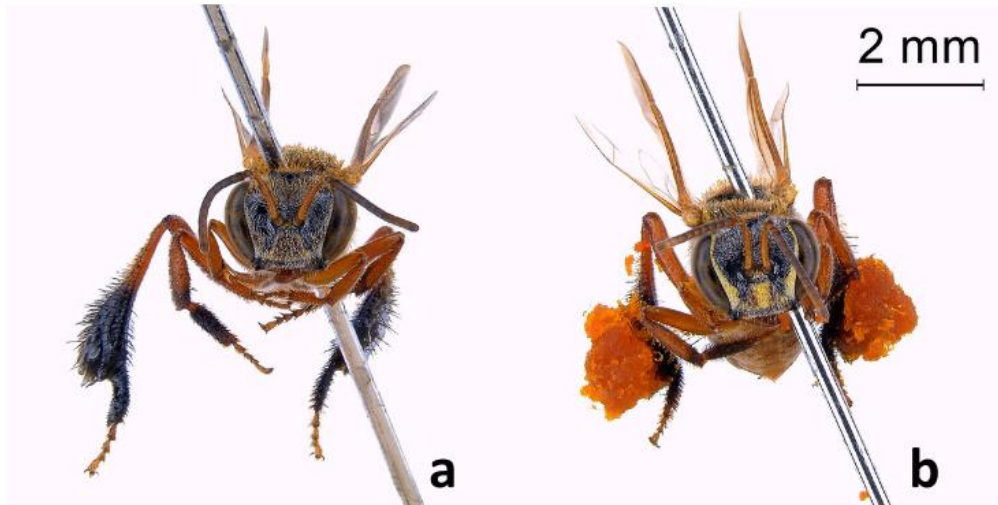


Figura 8 - Vista frontal de uma (a) guarda com rosto escuro e de uma (b) forrageira com face amarela de *F. varia*. Fotos obtidas pelo próprio autor com o auxílio do Dr. Bruno Gusmão Vieira.

#### 1.4.3 *Melipona quadrifasciata* Lepeletier 1836

*Melipona quadrifasciata*, popularmente conhecida como mandaçaia, possui distribuição no Brasil nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe, além de também ocorrer na Argentina (Misiones) e no Uruguai (Misiones) (Camargo et al., 2013). As operárias de *M. quadrifasciata* possuem quase o dobro do tamanho das espécies descritas anteriormente, possuindo cerca de 10 a 12 mm de comprimento. No ambiente natural, constroem seus ninhos também em cavidades de troncos ou galhos de árvores (Nogueira-Neto, 1997). A espécie possui uma população média por colônia menor (de 300 a 1.500 indivíduos) que *S. postica* (de 6.000 a 10.000 indivíduos) e *F. varia* (de 800 a 1.600 indivíduos) (Grüter, 2020). As operárias *M. quadrifasciata*, assim como as operárias de *S. postica*, também são capazes de botar ovos tróficos ou ovos que darão origem a machos. Como a *S. postica*, a espécie constrói seus favos de cria em forma de discos horizontais (Figura 9a) (Nogueira-Neto, 1997; Grüter, 2020), mas todas as células de cria têm tamanho igual. Este fato e a alta taxa de produção de rainhas virgens levou à hipótese de que a determinação das rainhas difere das outras espécies de abelhas sem ferrão, em que existe fatores

genéticos que seriam responsáveis pela determinação da casta no gênero *Melipona* (Kerr, 1950).



Figura 9 - Colônia de *M. quadrifasciata* do meliponário do Departamento de Genética da FMRP-USP. (a) Vista superior dos discos de cria. (b) Detalhe da entrada da colônia com uma guarda postada. Fotos obtidas pelo próprio autor.

Apesar de ser uma das espécies mais estudadas entre os meliponíneos, pouca informação existe sobre a bionomia de *M. quadrifasciata* e sobre a questão de sua longevidade. O que se sabe é que, quando emergem, operárias realizam atividades básicas como autolimpeza e trabalho com cera. Apenas por volta do 13º dia ao 18º dia de vida, trabalham como nutridoras e provisionam as células de cria. Os primeiros voos para fora da colônia são dados por volta de 27-30 dias de idade, mas apenas como descarregadoras de lixo. A atividade de guarda foi observada por volta do 32º dia de idade. A partir do 37º dia de idade trabalham como forrageiras saindo da colônia em busca de alimento (Figura 10) (Kerr et al., 1956).

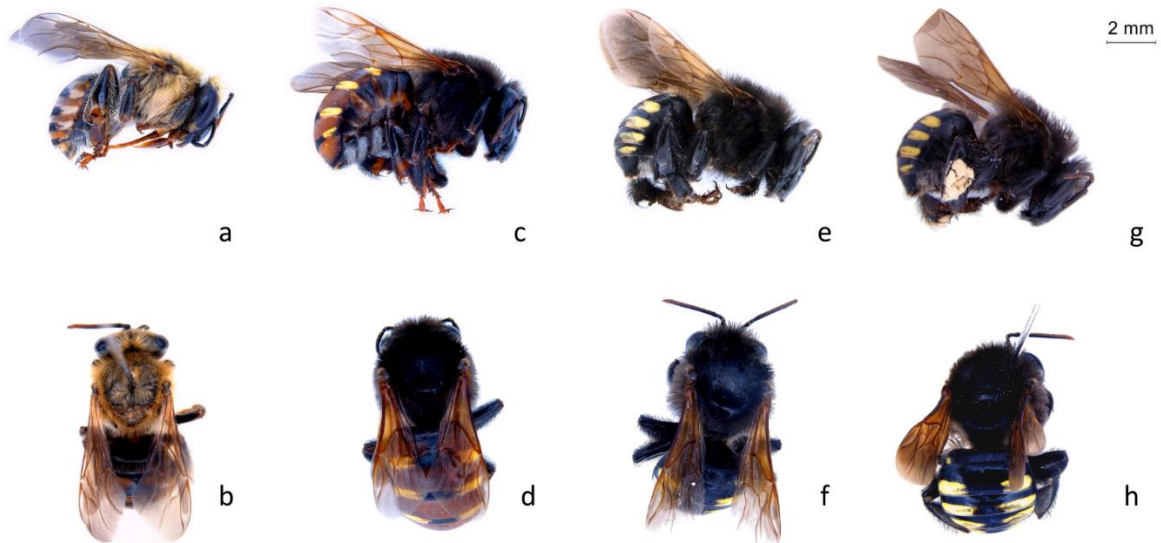


Figura 10 - Fases do ciclo de vida de operárias de *M. quadrifasciata*. (a) Recém emergida, vista lateral. (b) Recém emergida, vista dorsal. (c) Nutridora, coloração mais clara dos tergitos do abdômen, vista lateral. (d) Nutridora, vista dorsal. (e) Guarda, vista lateral. (f) Guarda, vista dorsal. (g) Forrageira, pólen na corbícula, vista lateral. (h) Forrageira, vista dorsal. Fotos obtidas pelo próprio autor com o auxílio do Dr. Bruno Gusmão Vieira e do Dr. André Rodrigues.

*M. quadrifasciata* é uma espécie relativamente dócil. Geralmente, apenas uma guarda fica na entrada do ninho, e a entrada pequena possibilita a passagem de apenas um indivíduo por vez. A entrada da colônia é construída com barro e tem o formato de entrada raiada, com caneluras direcionadas à passagem (Figura 9b) (Roubik, 1989; Nogueira-Neto, 1997; Grüter, 2020). Quando importunadas por humanos, o comportamento principal é se esconder, e a guarda se retrai para o interior da colônia. Quando se defendem, geralmente formam uma nuvem de indivíduos em volta do inimigo, por vezes pousando ou se chocando contra, mas sem morder (Couvillon et al., 2008a). Por outro lado, *M. quadrifasciata* é muito eficiente em reconhecer intrusos, como formigas e abelhas cleptoparasitas. Elas possuem mandíbulas fortes e geralmente, quando mordem o intruso, ficam presas a ele e, paralisadas caem com o intruso no chão. Foi relatado uma certa intolerância de *M. quadrifasciata* a operárias de *A. mellifera*, com confrontos entre as espécies frequentemente relatados em meliponários e apiários (Breed; Page, 1991).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é investigar de forma comparativa a relação entre competência imune e o comportamento agressivo em três espécies abelhas sem ferrão que diferem nos seus níveis de agressividade: *Scaptotrigona postica* sendo uma espécie com comportamento de defesa muito agressivo, enquanto *Melipona quadrifasciata* é a mais dócil e *Frieseomelitta varia* é relativamente intermediária.

### 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar e qualificar o comportamento agressivo a nível de indivíduo das operárias para cada uma das três espécies, sob condições controladas por meio de ensaio de arena.
- Quantificar a expressão relativa dos genes *Toll*, *Myd88*, *Cactus*, *Dorsal*, *Imd* e *Relish*, por meio de real-time PCR (qPCR), em nutridoras, forrageiras e guardas das três espécies selecionadas. Os seis genes são chaves nas vias de sinalização do sistema imune inato dos insetos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Quantificação do comportamento agressivo a nível de indivíduo

##### 3.1.1 Amostragem

Foram coletados discos de cria (*S. postica* e *M. quadrifasciata*), cachos de cria (*F. varia*) e operárias nutridoras de duas colônias diferentes para cada uma das três espécies. As células de cria mais velhas foram desoperculadas com uma pinça. As operárias que prontamente emergiram e saíram sozinhas de dentro das células foram coletadas (Figura 11a). Foram obtidas 100 operárias recém emergidas e 10 operárias nutridoras de *S. postica* e *F. varia* de cada colônia e 50 operárias recém emergidas e 5 operárias nutridoras de *M. quadrifasciata* em cada uma das colônias amostradas.

##### 3.1.2 Confinamento

Os indivíduos foram confinados em caixas de dimensões de 8 x 11 x 13 cm mantidas a uma temperatura de 34° C por 14 dias (Figura 11b). Foi montada uma caixa referente a cada colônia amostrada. As caixas foram abastecidas diariamente com pólen coletado na colônia de origem (Figura 11c) e mel de *Apis mellifera* L. diluído em água a 50%. No 13º dia, 15 horas antes de completarem 14 dias, os alimentos foram removidos das caixas e foi adicionado apenas água, com o intuito de induzir jejum nos indivíduos confinados.



Figura 11 - Preparação para confinamento de operárias recém emergidas. (a) Células desoperculadas de um disco de cria de *M. quadrifasciata* com operárias prontas para emergir. (b) Caixa de confinamento de madeira. (c) Pólen oferecido especificamente para cada espécie.



### 3.1.3 Experimento da Arena

Completando 14 dias de idade e 15 horas de jejum, 20 abelhas de cada colônia foram colocadas separadamente em placas de Petri de 9 cm de diâmetro forradas com papel filtro (chamadas de Arena) (Figura 12). Após um minuto de aclimatação, foi introduzido em cada placa um intruso (operária recém emergida de *Tetragonisca angustula*). Cada placa foi filmada durante 5 minutos e os vídeos obtidos foram analisados no software Boris v. 8.11.3 (Friard; Gamba, 2016). A partir das gravações, foram obtidas as seguintes variáveis listadas na Tabela 1.

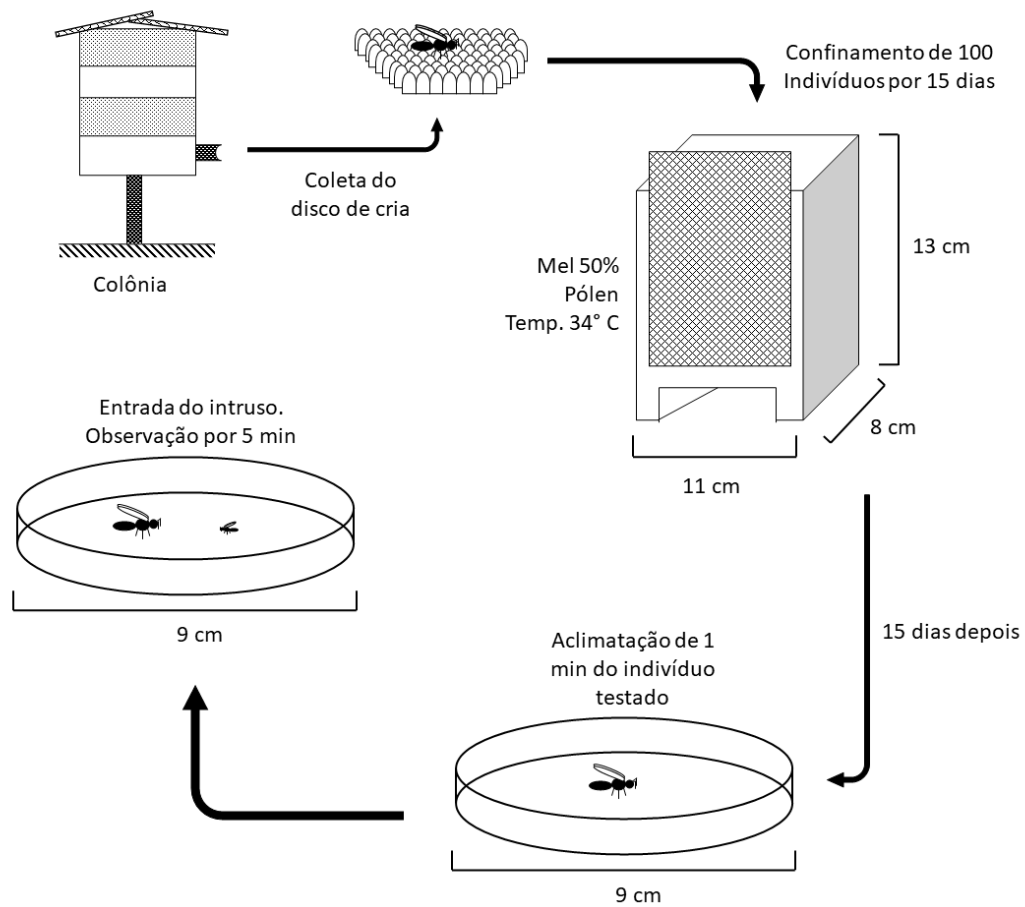


Figura 12 - Desenho experimental dos ensaios da arena. Esquema desenhado pelo próprio autor.

Tabela 1 Informações obtidas com o experimento da arena.

Variável	Descrição
Ataque (B)	Observação se o indivíduo testado ataca ou não o intruso através de mordidas
Antenação (A)	Observação de quantas vezes o indivíduo apenas antena o intruso, mas não ataca.
Perseguição (P)	Observação de quantas vezes o indivíduo persegue o intruso, mas não o ataca ou o toca com a antena.
Fuga (F)	Observação de quantas vezes o indivíduo foge do intruso.
Latência (L)	Se o indivíduo ataca, quanto tempo (em segundos) demorou para o fazer a partir do momento em que o intruso foi adicionado na arena.
Índice (I)	Quanto tempo (em segundos) o indivíduo permanece atacando o intruso.

## 3.2 Quantificação da expressão gênica dos genes do sistema imunológico

### 3.2.1 Amostras

Operárias de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata* foram coletadas no meliponário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. As coletas foram realizadas entre novembro de 2021 e março de 2022, sempre entre 9:00 e 10:00 da manhã. Para cada espécie foram realizadas coletas em três colônias diferentes. Em cada colônia foram obtidas sete amostras de cada um de três estádios do ciclo de vida das operárias: nutridoras, guardas e forrageiras.

Em cada colônia, a coleta se procedeu da seguinte maneira: primeiramente eram coletadas guardas, sendo assim consideradas as abelhas operárias que saíam do ninho e atacavam a rede entomológica do coletor após o aferimento de três a cinco toques com um formão na caixa da colônia. Em *S. postica* e *M. quadrifasciata*, essas operárias geralmente apresentavam a corbícula vazia. Já em *F. varia*, as operárias que atacavam possuíam as corbículas cheias de resina. Em seguida, eram coletadas operárias forrageiras, sendo as abelhas que estavam

retornando do campo para a colônia com as corbículas cheias de pólen. As nutridoras eram coletadas por último. A colônia era aberta e as nutridoras eram coletadas na área de cria, sendo elas identificadas pelo abdômen muito cheio de alimento nas três espécies e desempenhando principalmente o trabalho de provisionamento de células de cria recém construídas com alimento larval.

Para *S. postica* e *F. varia*, cada amostra foi composta por um *pool* de tecidos de três indivíduos, enquanto para *M. quadrifasciata*, cada amostra foi composta de um único indivíduo. Cada indivíduo coletado diretamente da colônia foi imobilizado em gelo (4° C) e levado ao laboratório para a dissecação. No laboratório, os indivíduos foram congelados em nitrogênio líquido e tiveram a cabeça e o abdômen removidos e armazenados separadamente em 300 µL de Trizol® (Invitrogen) a -80° C. Sendo assim, as amostras foram compostas de um *pool* de três cabeças ou três abdomens.

### 3.2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA

Os tecidos foram macerados e homogeneizados com um pistilo em reagente TRIzol® (Invitrogen), e a extração de RNA total seguiu o protocolo do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase livre de RNase (Invitrogen) para remoção do DNA genômico. A quantidade de RNA foi estimada em 260 nm por meio de espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare), com uma unidade de absorbância correspondente a 40 µg/mL de RNA. A qualidade da amostra foi verificada pela taxa de absorbância em 260/280 nm. A transcrição reversa foi realizada utilizando 1 µg de RNA total para síntese de cDNA, utilizando o kit de síntese de cDNA Ultrascrip 2.0 (PCRBiosystems), seguindo as orientações do fabricante.

### 3.2.3 Genes analisados

Os níveis de expressão dos genes *Toll*, *Myd88*, *Dorsal*, *Cactus* (via de sinalização Toll) e *Imd* e *Relish* (via de sinalização Imd), foram obtidos através de PCR quantitativo em tempo real (método descrito na seção 5.4). *Primers* para os genes específicos foram desenhados com base nas respectivas sequências genômicas da espécie *F. varia* pelo grupo da Profa. Dra. Anete Pedro Lourenço

(Ciências Biológicas, Universidade dos Vales do Jequitinhonha e Mucurí, Diamantina, MG; comunicação pessoal) (Tabela 2). Os genes *Toll*, *Myd88*, *Dorsal* e *Imd* foram quantificados em três colônias diferentes por espécie e os genes *Cactus* e *Relish* em apenas uma colônia por espécie.

Tabela 2 - *Primers* utilizados nos ensaios de qPCR

Gene	Forward	Reverse	Nº de acesso <i>F. varia</i>	Nº de acesso <i>M. quadrifasciata</i>	Tamanho do amplicon (pb)	Eficiência do <i>primer</i> (%)	Referência
<i>Toll-1</i>	ACAGGATT CTAGGCGA ACGA	GGCCGATC TCTCCATAC AAA	LOC122 529477	WN51_00358	146	107.079	Este estudo
<i>Myd88</i>	TTCTGAAAA GCCAGCA AAT	CCCAGAAA TCGTACAA ACCAA	LOC122 535811	WN51_03983	110	96.265	Este estudo
<i>Dorsal</i>	GACAAGTG GTTTGGAA GGA	TGGTTGGT CCTTGC TGTA	LOC122 533634	WN51_13230	171	93.317	Este estudo
<i>Cactus</i>	AGGCCCTT ACCGATCC TCTA	CAGAAGTC GCACAATC TCCA	LOC122 537998	WN51_13218	182	103.872	Este estudo
<i>Imd</i>	AACAACCG ATGCAAAA CCTG	TCGTTGTTT TCGGTTCA TCA	LOC122 537783	WN51_08554	101	109.544	Este estudo
<i>Relish</i>	GCAAGGAT GGCAAAA CTTG	TCTGCTGC TTCTTCCTC TCC	LOC122 527329	WN51_13410	117	91.398	Este estudo
<i>Rpl32</i>	CGTAGGCG TTTTAAGGG ACA	ACTCCGTG AGCAATCT CAGC	MN1937 37	MN687948	173	98.322	Freitas <i>et al.</i> (2019)
<i>Rps18</i>	CGTGCTGG AGAATGTTC TGA	ATTCGTTCC AAATCCTCA CG	MN1937 39	MN687946	179	103.452	Freitas <i>et al.</i> (2019)

### 3.2.4 PCR quantitativo (qPCR)

As amplificações foram realizadas usando o kit 2x qPCR SyGreen Mix (PCRBiosystems) seguindo o protocolo do fabricante, sendo elas detectadas pelo sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems). As reações seguiram nas condições de 95° C por 10 min, 40 ciclos a 95° C por 15 s e 60° C por 30 s. Após esses ciclos, foi realizada a análise por curva de *melting* para verificação da especificidade dos *primers*. Os ensaios foram executados em septuplicatas biológicas, e cada uma foi analisada em triplicatas técnicas para checar a reprodutibilidade das respectivas amostras. Os valores Ct (*threshold PCR cycle*, como limiar de detecção) foram normalizados utilizando os Cts de mRNA dos genes de controle endógeno, *Rps18* e *Rpl32* (Freitas et al., 2019). A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  estabelecida por Livak e Schmittgen (2001), referente à média Ct dos genes de controle endógeno e uma amostra do grupo mais jovem das abelhas como calibrador. Apenas amostras com pico único na curva de melting foram utilizadas nas análises subsequentes.

### 3.2.5 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados na plataforma RStudio (RStudio, Inc.; versão 1.3.959). Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o software GraphPAD Prism 8 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

Os dados de contagem e de tempo obtidos dos ensaios da arena, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e ao teste de Kolmogorov-Smirnov para checagem da normalidade. Para a verificação da homoscedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Levene. Inferindo a não-distribuição normal, para comparar três grupos foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis com pós testes de Dunn para múltiplas comparações e o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos.

Para cada espécie, os dados de expressão gênica de *Toll*, *Myd88*, *Dorsal* e *Imd* foram analisados como variáveis dependentes usando um Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) (pacote lme4) considerando “tecido” e “fase do ciclo de

vida” como fatores fixos e “colônia” como fator aleatório. Foi utilizada a função de ligação log para todos os genes a fim de aproximar os dados de expressão gênica a uma distribuição gaussiana, sendo esta checada com a verificação dos resíduos (pacote DHARMA). Em seguida, foi utilizado o teste ANOVA para comparar os níveis de expressão gênica entre tecidos e o pós-teste de Tukey para múltiplas comparações da expressão gênicas das diferentes fases de vida em cada tecido (pacote lsmmeans). Os genes *Cactus* e *Relish* foram analisados como variável dependente usando um Modelo Linear Generalizado (GLM) (pacote lme4), em razão dos indivíduos terem sido amostrados em apenas uma colônia.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 O comportamento de agressividade difere significativamente entre as três espécies de abelhas sem ferrão

Para quantificar de forma padronizada e controlada o comportamento de agressividade das três espécies, desenvolvemos um protocolo, baseado na metodologia de Shpigler et al. (2017), chamando aqui de experimento de arena. O experimento de arena demonstrou que sob criação em condições iguais de contexto social, temperatura e alimentação, *S. postica* é a espécie mais agressiva, enquanto *M. quadrifasciata* é a mais dócil, e *F. varia* apresenta níveis intermediários de agressividade. *S. postica* foi a espécie com maior frequência de indivíduos que atacaram o intruso na arena e também com maior frequência de ataques fatais, que levaram a morte do intruso (Figura 13a). *F. varia* e *M. quadrifasciata* apresentaram uma frequência muito menor de ataque comparadas com *S. postica* (Figura 14).

O período de jejum de 15 horas antes do experimento de arena se mostrou necessário para a execução dos ensaios de comportamento, uma vez que em ensaios piloto foi observado que quando as operárias estavam completamente saciadas com mel e pólen, disponível *ad libitum*, todas as três espécies ignoravam completamente a presença do intruso na arena. Assim, a substituição do mel por água por 15 horas, já foi o adequado para as abelhas ficarem suficientemente agitadas e agressivas, sem apresentarem mortalidade por desnutrição temporária.

As três espécies apresentaram perfis comportamentais diferentes dentro da arena. *S. postica* e *F. varia*, mesmo com a aclimação de 1 minuto, comportavam-se de forma mais agitada, com os indivíduos de *S. postica* andando rapidamente para todos os lados, e *F. varia* com os indivíduos tentando voar e se chocando contra as paredes. *M. quadrifasciata*, por sua vez, apresentou um comportamento letárgico, com pouca movimentação na arena e ignorando o intruso completamente. Na presença do intruso, *S. postica* e *F. varia*, mesmo quando os indivíduos não atacavam, apresentavam uma curiosidade maior, com vários eventos de aproximação ao intruso e antenação (Figura 13b, c, d). *M. quadrifasciata*, por sua

vez, ignorava completamente o intruso na arena (Figura 13e). O único evento de ataque em *M. quadrifasciata* ocorreu com um indivíduo que estava muito agitado batendo as asas e vibrando o corpo desde o começo do experimento. (Apêndice I: Análises estatísticas do experimento comportamental).

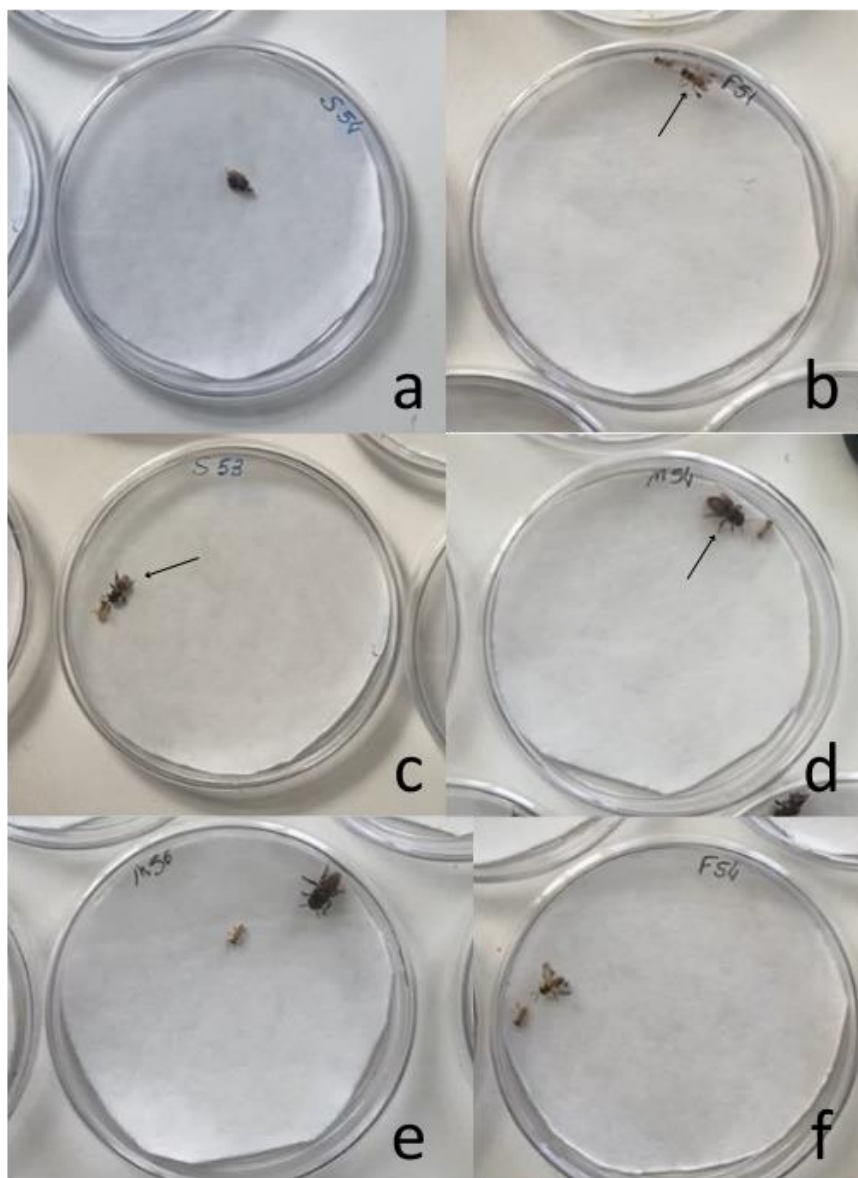


Figura 13 - Comportamentos observados no experimento da arena. (a) Indivíduo de *S. postica* atacando o intruso com mordidas. (b) Indivíduo de *F. varia* (seta) antenando o intruso. (c) Indivíduo de *S. postica* (seta) antenando o intruso. (d) Indivíduo de *M. quadrifasciata* (seta) antenando o intruso. (e) Indivíduo de *M. quadrifasciata* letárgica. (f) Indivíduo de *F. varia* abrindo as asas após ter antenado o intruso. Fotos obtidas pelo próprio autor.



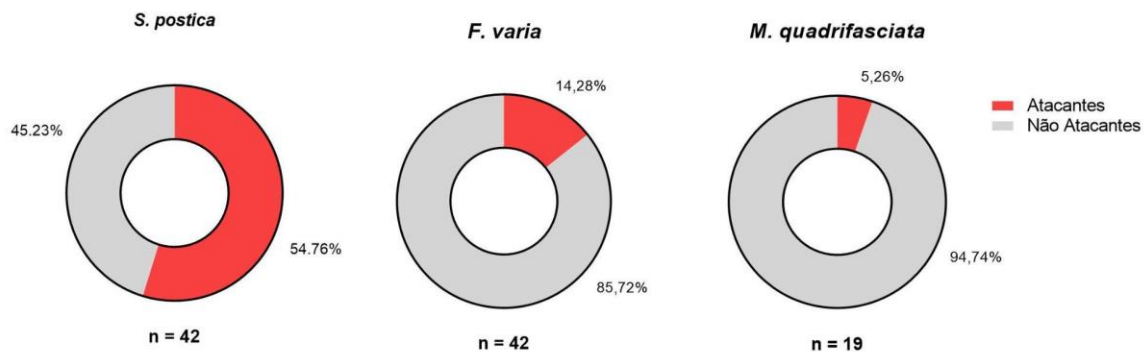


Figura 14 - Proporção do número de atacantes (vermelho) e não atacantes (cinza) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*.

*S. postica* foi a espécie com menor latência de ataque ao intruso, ou seja, que atacou o intruso mais rápido a partir do momento que o mesmo entrou na arena (Figura 15). *F. varia* e *M. quadrifasciata* apresentaram latências superiores de ataque, ou seja, se atacavam, demoravam mais tempo que *S. postica* para o fazer. O índice de ataque, que é o tempo em que o indivíduo permaneceu atacando o intruso, quando ocorreu, teve níveis semelhantes entre *S. postica* e *F. varia*. (Figura 15).

*F. varia* apresentou maior número de eventos de perseguição das três espécies. Diferente das demais, *F. varia* quando perseguia o intruso, o fazia com as asas abertas (Figura 13f). *S. postica* não abria as asas ao perseguir o intruso, enquanto em *M. quadrifasciata*, não foi observado perseguição. Além disso, *M. quadrifasciata* foi a espécie com maior frequência de fuga no momento em que o intruso antenava o indivíduo. *S. postica* não fugiu nenhuma vez do intruso e *F. varia* apresentou frequência de fuga menor (Apêndice I).

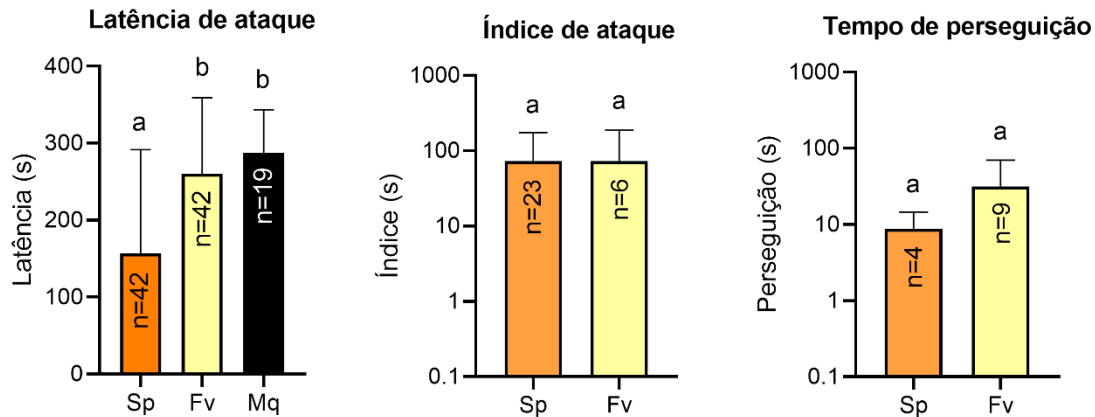


Figura 15 - Comparação do tempo de latência, índice e perseguição de *S. postica* (Sp), *F. varia* (Fv) e *M. quadrifasciata* (Mq). Letras representam diferenças estatísticas (Teste Kruskal-Wallis para latência e Teste de Mann-Whitney para Índice de ataque e tempo de perseguição). Como houve apenas um evento de ataque e nenhum de perseguição, *M. quadrifasciata* não possui média de índice de ataque e de tempo de perseguição.

## 4.2 As três espécies apresentam perfis diferentes de expressão dos genes relacionados à imunidade

Definido que *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata* possuem perfis comportamentais distintos, passamos a investigar os níveis de expressão de genes codificadores do sistema imunológico. De forma geral, *S. postica*, a espécie mais agressiva, a expressão mais alta dos genes de imunidade se mostrou mais alta na cabeça do que no abdômen, enquanto *M. quadrifasciata*, a espécie mais dócil, apresentou um perfil contrário, com maiores níveis de expressão no abdômen do que na cabeça. *F. varia*, apresenta um padrão intermediário. Em relação as fases de vida, no geral, os genes de imunidade tendem a serem mais expressos nas operárias mais velhas (guardas e forrageiras) em relação às operárias mais jovens (nutridoras) para ambos os tecidos.

O gene *Toll*, codificador da proteína transmembrana da via do Toll, demonstrou uma diferença muito acentuada em *S. postica*, com maiores níveis de expressão na cabeça em relação ao abdômen ( $\chi^2=166,3$ ;  $p<0,001$ ). *M. quadrifasciata* apresentou um perfil contrário de expressão gênica, tendo também diferença em cabeça e abdômen ( $\chi^2=133,1$ ;  $p<0,001$ ), porém com os níveis de expressão mais altos no abdômen em comparação com a cabeça. Já em *F. varia*,

não houve diferença significativa entre os dois tecidos ( $\chi^2=0,7676$ ;  $p=0,38$ ). O gene *Toll* não demonstrou expressão gênica diferencial entre as fases de vida no abdômen para as três espécies. Já na cabeça, as três espécies seguem o mesmo padrão, com uma expressão mais alta nas abelhas mais velhas (guardas e forrageiras) em comparação com as mais jovens (nutridoras) (Figura 16; Apêndice II).

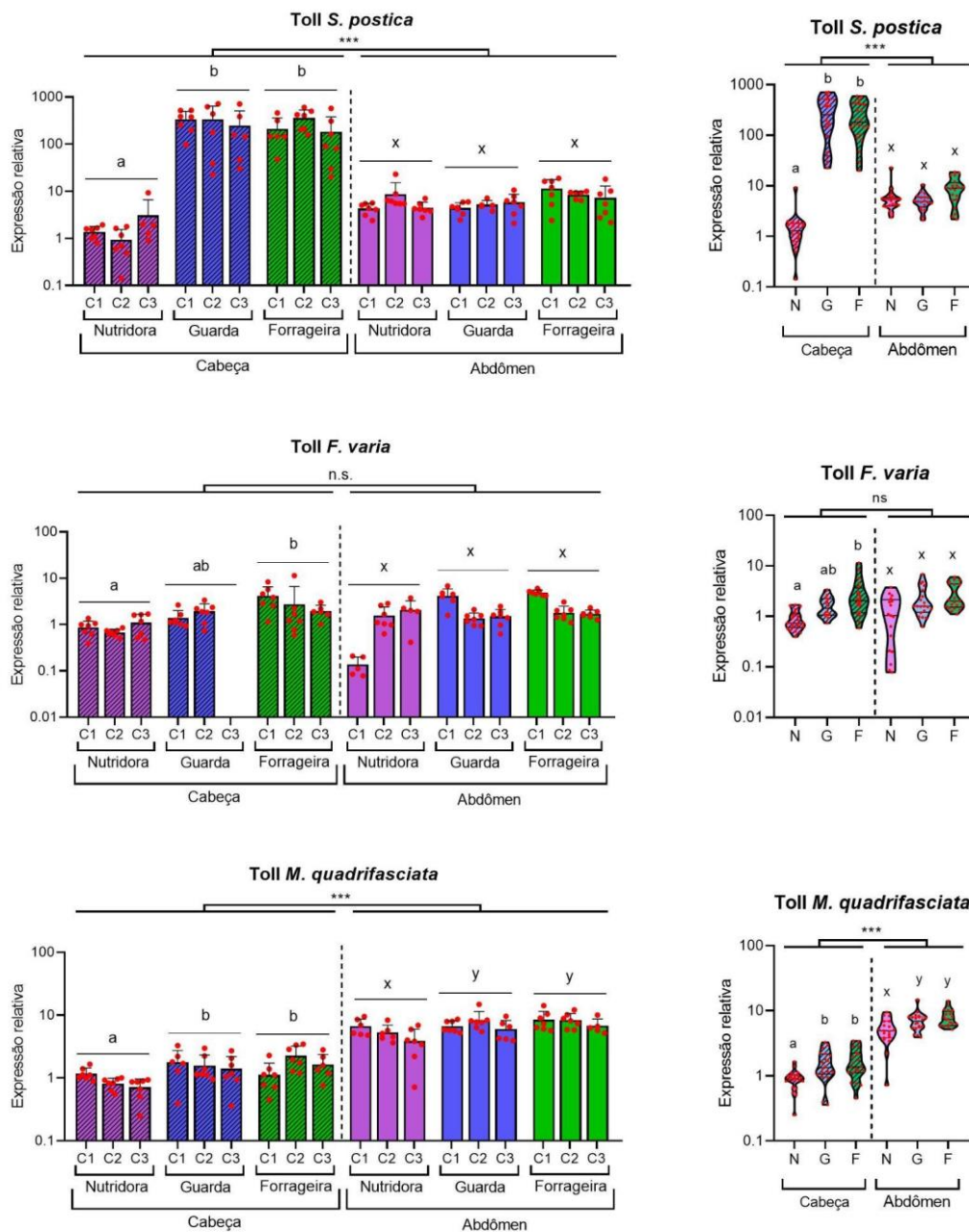


Figura 16 - Expressão relativa do gene *Toll* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. À esquerda, as três colônias (C1, C2 e C3) são mostradas separadamente. À direita, gráfico *violin plot* representando as amostras sem separação por colônias. Roxo hachurado: cabeça de nutridora. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (teste GLMM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; (\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Número amostral por colônia,  $N=7$ . Por fase de vida em cada tecido  $N=21$ .

O gene *MyD88*, que codifica a proteína adaptadora MyD88 da via do Toll, apresentou padrão de expressão similar ao do *Toll* nos tecidos de *S. postica*, com maiores níveis de expressão na cabeça em comparação ao abdômen ( $\chi^2=28,9$ ;  $p<0,001$ ) e *M. quadrifasciata* com maiores níveis de expressão no abdômen ( $\chi^2=4,2$ ;  $p=0,03$ ). Entretanto, a expressão diferencial relativa para este gene não é tão acentuada entre os tecidos quando comparado com *Toll. F varia*, por sua vez, apresenta um padrão de expressão similar a *S. postica* entre tecidos. No abdômen, *S. postica* não apresentou diferenças significativas de expressão gênica de *MyD88* quando comparadas as três fases de vida. Já *F. varia* e *M. quadrifasciata* apresentaram o mesmo padrão de expressão gênica no abdômen, sem diferença entre guardas e forrageiras, porém a fase de nutridora, a mais jovem, com expressão mais baixa que guardas e forrageiras (Figura 17; Apêndice II).

Quando comparada a expressão relativa de *MyD88* na cabeça das três fases de vida das operárias, as guardas de *S. postica*, apresentaram uma expressão maior que a forrageira ( $t=-3,239$ ;  $p=0,0044$ ) e que as nutridoras ( $t=8,610$ ;  $p<0,0001$ ) (Figura 17; Apêndice II).

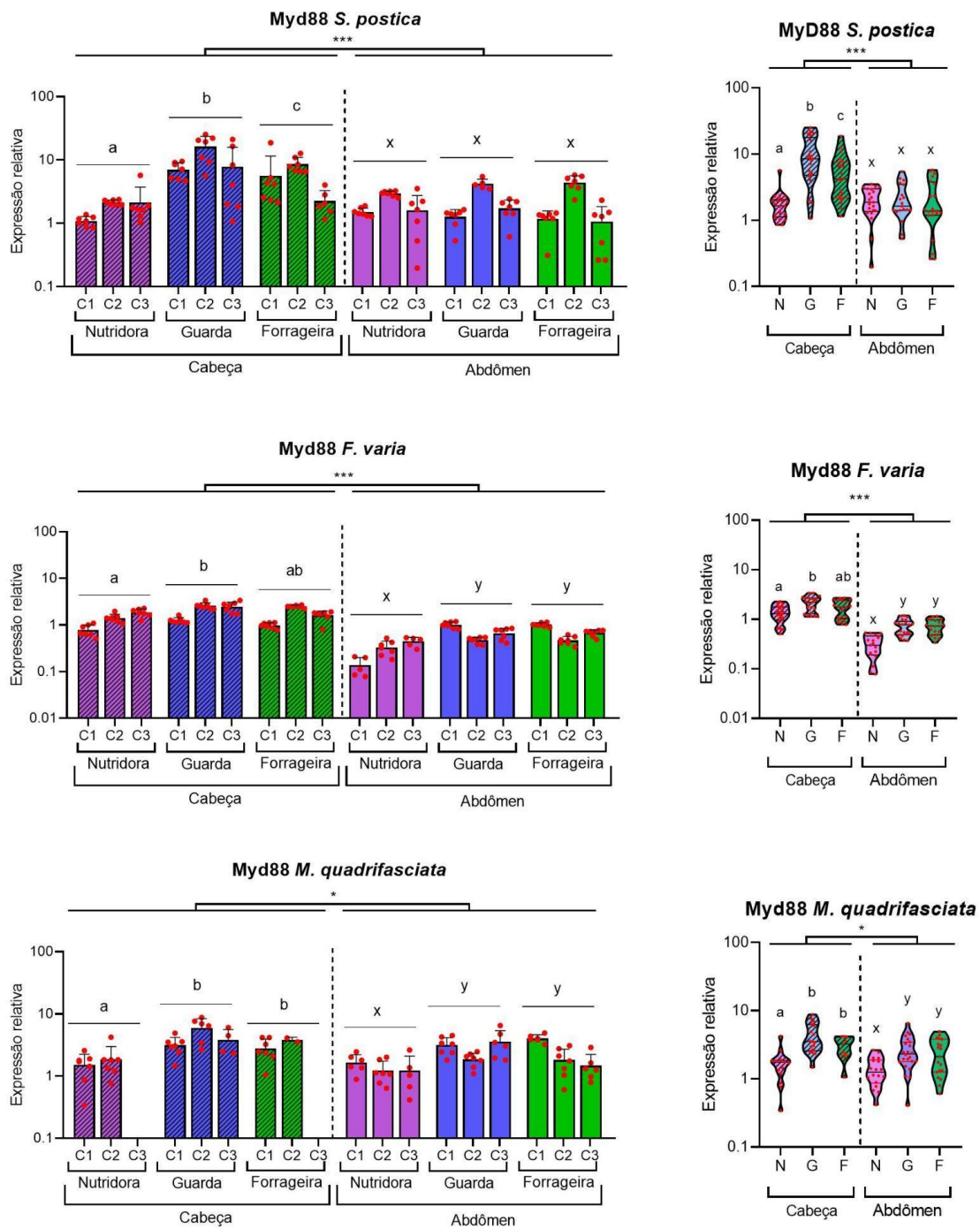


Figura 17 - Expressão relativa do gene *MyD88* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. À esquerda, as três colônias (C1, C2 e C3) são mostradas separadamente. À direita, gráfico *violin plot* representando as amostras sem separação por colônias. Roxo hachurado: cabeça de nutridora. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (teste GLMM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ;

(\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Número amostral por colônia,  $N=7$ . Por fase de vida em cada tecido  $N=21$ . Barras ausentes no histograma indicam ausência de amplificação.

*Dorsal*, o gene codificador do fator de transcrição Dorsal da via de sinalização Toll, apresenta um padrão de expressão diferencial gênica muito similar ao gene *Toll* e *MyD88*. Para *Dorsal*, *S. postica* possui níveis de expressão gênica mais altos na cabeça em relação ao abdômen ( $\chi^2=47,7$ ;  $p < 0,001$ ), enquanto *M. quadrifasciata* apresenta um padrão inverso, com maiores níveis de expressão no abdômen do que na cabeça ( $\chi^2=11,5$ ;  $p < 0,001$ ). *F. varia*, assim como o gene *Toll*, não apresenta diferença significativa entre os tecidos para expressão relativa de *Dorsal*. Em termos de fases de vida, os abdomens das três espécies possuem o padrão de expressão gênica similar, em que as nutridoras possuem uma expressão mais baixa quando comparadas a guardas e forrageiras. Novamente, para *S. postica* e *F. varia*, a expressão gênica na cabeça é maior nas abelhas mais velhas (guardas e forrageiras) quando comparadas com as mais jovens (nutridoras), sendo em *S. postica*, a espécie mais agressiva, a diferença mais destoante. *M. quadrifasciata* não apresentou diferença de expressão do gene *Dorsal* na cabeça das três fases de vida (Figura 18; Apêndice II).

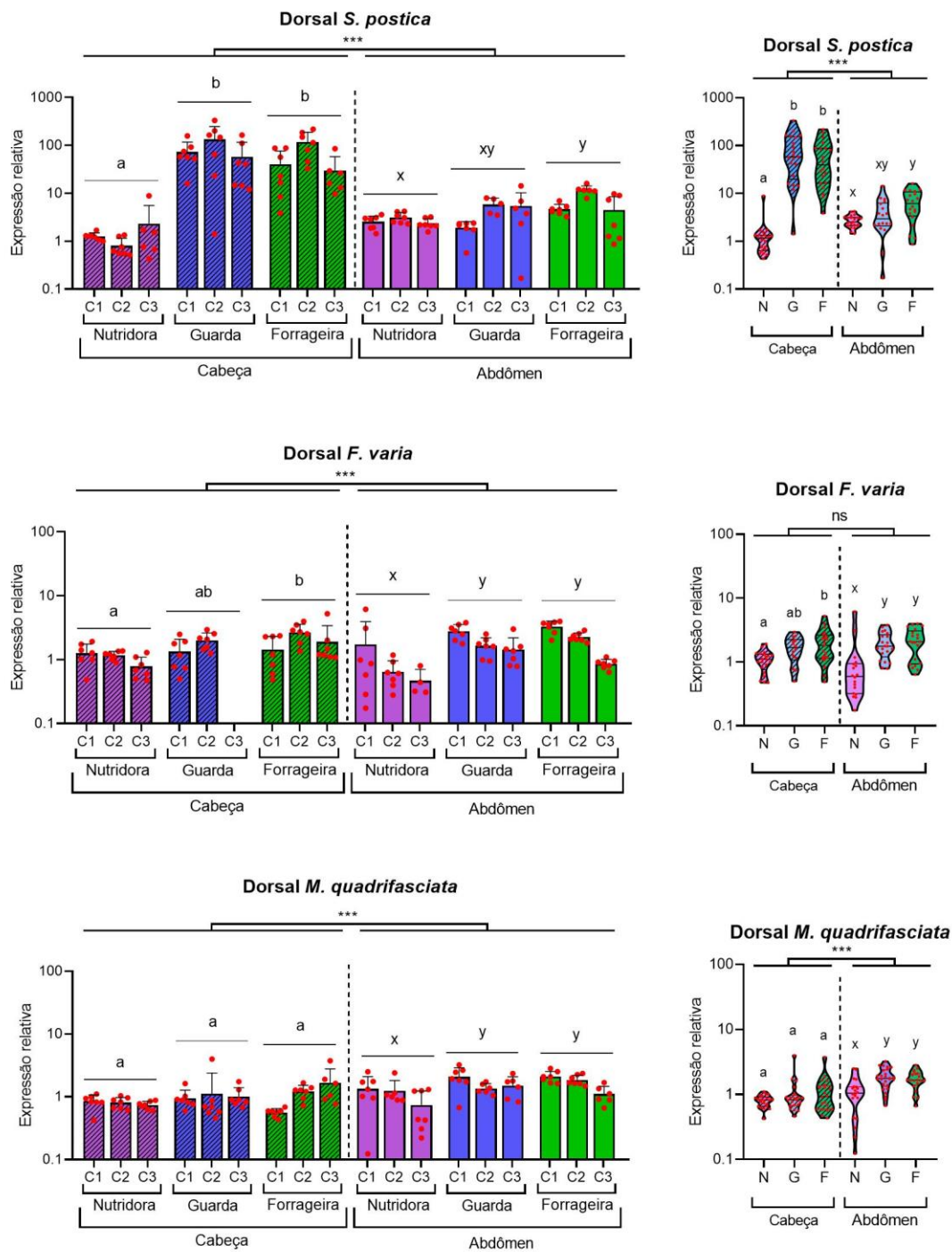


Figura 18 - Expressão relativa do gene *Dorsal* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. À esquerda, as três colônias (C1, C2 e C3) são mostradas separadamente. À direita, gráfico *violin plot* representando as amostras sem searação por colônias. Roxo hachurado: cabeça de nutridora. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (teste GLMM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ;



(\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Número amostral por colônia,  $N=7$ . Por fase de vida em cada tecido  $N=21$

*Cactus*, o inibidor do fator de transcrição *Dorsal* da via de sinalização Toll, não pôde ser amplificado em *S. postica* com os *primers* desenhados com base no genoma de *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Desta forma, os dados apresentados serão referentes apenas às duas últimas espécies citadas. *Cactus* apresenta expressão mais elevada na cabeça de *F. varia* ( $\chi^2=6,917$ ;  $p=0,008$ ) e *M. quadrifasciata* ( $\chi^2=9,5487$ ;  $p=0,002$ ) em relação ao abdômen. Guardas e forrageiras de *F. varia* apresentam uma expressão mais alta de *Cactus* no abdômen em relação às nutridoras. Já no abdômen de *M. quadrifasciata* não há diferença de expressão de *Cactus* entre as fases de vida. Na cabeça, por outro lado, as forrageiras de *F. varia* tiveram uma expressão mais baixa que as guardas ( $t=-2,561$ ;  $p=0,004$ ) e semelhante às nutridoras ( $t=-1,492$ ;  $p=0,3083$ ). *M. quadrifasciata* não apresentou diferença significativa de expressão gênica de *Cactus* na cabeça das três fases de vida (Figura 19; Apêndice III).

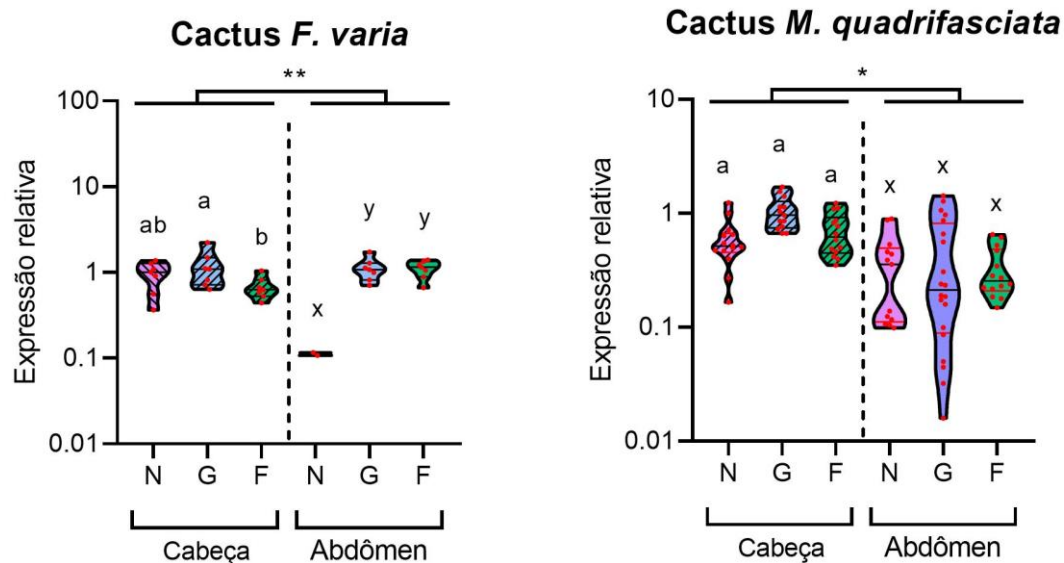


Figura 19 - Expressão relativa do gene *Cactus* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (teste GLM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ;

(\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Por fase de vida em cada tecido  $N=7$  (*F. varia*) e  $N=14$  (*M. quadrifasciata*).

O gene responsável por codificar a primeira proteína adaptadora *Imd* da via de sinalização Imd, possui um padrão de expressão nas três espécies semelhante à do gene *MyD88*, a proteína adaptadora da via Toll. Para *Imd*, a expressão é mais alta na cabeça quando comparada ao abdômen, tanto em *S. postica* ( $\chi^2=27,4$ ;  $p < 0,001$ ) como em *F. varia* ( $\chi^2=19,7$ ,  $p < 0,001$ ). Já *M. quadrifasciata* não apresentou diferença significativa entre os dois tecidos ( $\chi^2=1,6985$ ,  $p=0,1925$ ). No abdômen, guardas e forrageiras possuem uma expressão do gene *Imd* mais alta que as nutridoras em *S. postica* e *F. varia*, enquanto *M. quadrifasciata* não apresentou diferença significativa na cabeça dos três grupos etários. Já na cabeça, a expressão de *Imd* é mais alta em guardas e forrageiras em relação às nutridoras para as três espécies (Figura 20; Apêndice II).

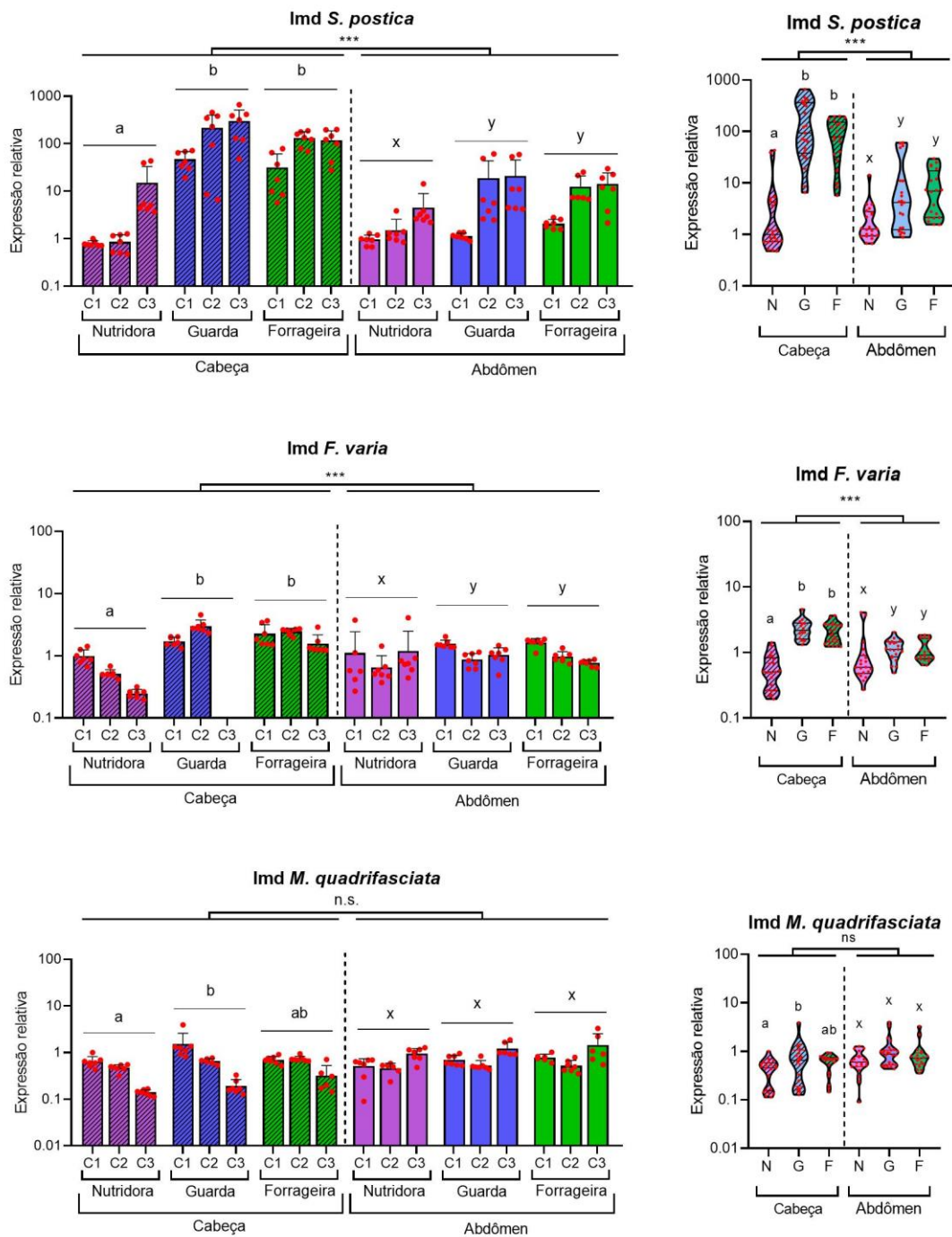


Figura 20 - Expressão relativa do gene *Imd* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. À esquerda, as três colônias (C1, C2 e C3) são mostradas separadamente. À direita, gráfico violin plot representando as amostras sem separação por colônias. Roxo hachurado: cabeça de nutridora. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (teste GLMM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ;

(\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Número amostral por colônia,  $N=7$ . Por fase de vida em cada tecido  $N=21$

O fator de transcrição da via de sinalização Imd, denominado *Relish*, apresenta níveis de expressão mais altos na cabeça de *S. postica* ( $\chi^2=62,989$ ;  $p < 0,0001$ ) e *M. quadrifasciata* ( $\chi^2=9,5487$ ;  $p=0,002$ ) em relação ao abdômen, enquanto *F. varia* não apresenta diferença de expressão entre os dois tecidos ( $\chi^2=0,0066$ ;  $p < 0,9354$ ). Para as três espécies, no abdômen a expressão de *Relish* é mais alta em guardas e forrageiras quando comparadas às nutridoras. Na cabeça, *S. postica* e *F. varia* também seguem o padrão de ter expressões mais altas de *Relish* em guardas e forrageiras quando comparadas a nutridoras. Por outro lado, *M. quadrifasciata* apresenta a expressão de *Relish* mais elevada na cabeça das guardas em relação às nutridoras e as forrageiras com expressão intermediária se sobrepondo a esses dois grupos (Figura 21; Apêndice III).

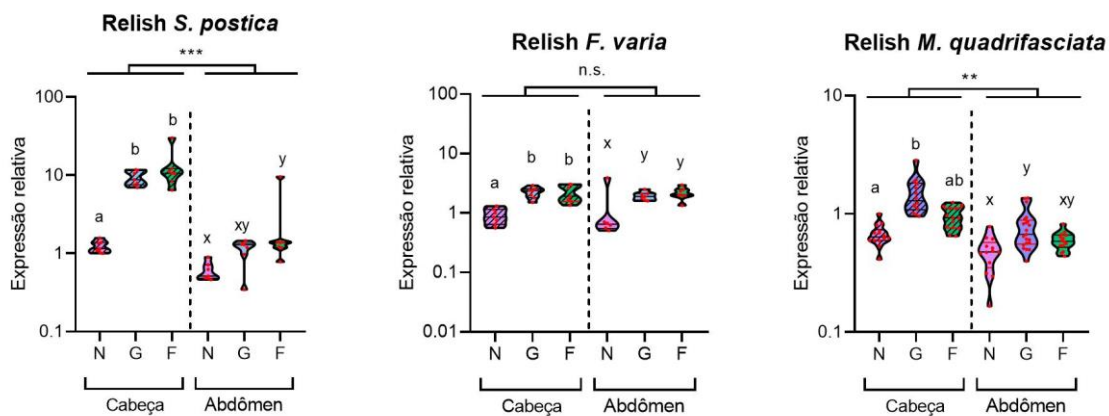


Figura 21 - Expressão relativa do gene *Relish* em nutridoras (N), guardas (G) e forrageiras (F) de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Gráfico violin plot representando as amostras sem separação por colônias. Roxo hachurado: cabeça de de nutridora. Azul hachurado: cabeça de guarda. Verde hachurado: cabeça de forrageira. Roxo vazio: abdômen de nutridora. Azul vazio: abdômen de guarda. Verde vazio: abdômen de forrageira. Letras representam diferenças estatísticas entre fases de vida por tecido. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre tecidos (Teste GLM). Símbolos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; (\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$ ; (n.s.) sem diferença significativa. Por fase de vida em cada tecido  $N=7$  (*S. postica* e *F. varia*) e  $N=14$  (*M. quadrifasciata*).

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*, diferem significativamente quanto ao comportamento de ataque perante a um intruso na arena. Além de validar a escolha das espécies, a adoção do experimento de arena como abordagem metodológico permitiu que os testes pudessem ser realizados sob condições experimentais controladas e padronizadas. Assim, nos permitiu observar, e especialmente quantificar, pela primeira vez, variações comportamentais relacionadas à agressividade e relacioná-las com o estado do sistema imune de forma comparativa em três espécies de abelhas sem-ferrão nativas do Brasil.

Nossos dados de expressão gênica indicam que genes de imunidade são altamente expressos na cabeça da espécie mais agressivas. Ademais, abelhas mais velhas (forrageiras e guardas) expressam níveis mais altos dos genes *Toll*, *MyD88* e *Dorsal* quando comparadas com nutridoras. Estas assinaturas moleculares de abelhas sem ferrão, sugerem que genes de imunidade humoral podem ter sido cooptados para desempenhar funções adicionais, como por exemplo regulando estratégias de defesa. Em *A. mellifera*, *Dorsal* é um fator de transcrição chave no cérebro que orchestra grandes redes genes associadas a determinados comportamentos sociais, como o comportamento agressivo na defesa da colônia (Chandrasekaran et al., 2011). Juntos, estes dados nos permitem hipotetizar que, para além do controle imune (Evans et al., 2006) e no desenvolvimento (Franzenburg et al., 2012), a via Toll adquiriu funções pleiotrópicas extras durante a evolução da eussocialidade em abelhas, se associando ao controle comportamental de aspectos críticos da vida social desses importantes polinizadores, como a resposta a intrusos.

A nível de indivíduo, os ensaios de arena demonstraram que *S. postica* criada sob condições padronizadas, apresenta um estado de “incômodo” elevado na presença de um intruso, apresentando os maiores índices de ataque e ataques fatais entre as três espécies. Além disso, as recorrentes antenações demonstram o estranhamento de *S. postica* perante o intruso e a curiosidade em relação ao mesmo. O conhecimento técnico de meliponicultores sobre o comportamento e os

cuidados necessários para a manipulação das colônias do gênero *Scaptotrigona* são recorrentemente advertidos em razão do seu conhecido alto grau de defensividade. Couvillon et al. (2008a) demonstraram que existe uma correlação positiva forte entre a intensidade do tráfico de indivíduos na entrada de ninho (relacionado ao tamanho da colônia) e a intensidade dos ataques defensivos quando as colônias são importunadas. De fato, das três espécies analisadas neste trabalho, *S. postica* possui a maior abertura da entrada e também a maior quantidade de guardas controlando o intenso tráfego das colônias (Couvillon et al., 2008a). Vale ressaltar que abelhas cleptoparasitas são inimigos naturais importantes de outras abelhas sem ferrão, sendo responsáveis por danos severos ou até fatais em seus ataques a outras colônias (Sakagami, 1993). Entretanto, já foi observado que abelhas cleptoparasitas do gênero *Lestrimelitta* geralmente não atacam colônias de outras abelhas do gênero *Scaptotrigona*. A simples exposição de citral (feromônio com cheiro de capim-limão do gênero *Lestrimelitta*) na entrada de colônias de *Scaptotrigona pectoralis* e *Scaptotrigona mexicana* já é suficiente para elicitar um ataque massivo na colônia (Quezada-Euán; González-Acereto, 2002). Além disso, quando atacam pessoas com mordidas, a sensação é dolorosa, comparada a mordidas de outras abelhas sem ferrão (Shackleton et al., 2015a). Desta forma, evidencia-se que abelhas do gênero *Scaptotrigona* possuem estratégias defensivas eficazes para lidar com outros organismos artrópodes que possam ser uma possível ameaça.

*F. varia*, a espécie com a segunda maior taxa de agressividade, também demonstrou bastante interesse pelo intruso e forma das recorrentes antenações. Entretanto não atacavam com mordidas na maior parte dos ensaios. Possuem mandíbulas menores que *S. postica*, e sua principal estratégia de defesa é colar resina nos intrusos. Essa estratégia pode não surtir muito efeito em inimigos vertebrados, porém é muito efetiva contra outros invertebrados (Couvillon et al., 2008b; Shackleton et al., 2015a; Grüter, 2020). Ensaios de reconhecimento de intrusos demonstraram que *F. varia* tem a capacidade de reconhecer intrusos da mesma espécie e de espécies diferentes, sendo que estes últimos são atacados com maior agressividade. Vale ressaltar que o sucesso em conflitos de *F. varia*

contra intrusos, se dá na maior parte de relatos de cola de resina, que imobiliza o intruso, e não de mordidas (Nunes et al., 2008). De fato, durante os ensaios da arena, os indivíduos tentavam fazer pequenos voos dentro da placa de Petri e, após antenar e se afastar do intruso, os indivíduos de *F. varia* voavam em direção e se chocavam contra o intruso. Pode-se especular que este comportamento seria uma forma de ataque semelhante aos que as operárias no campo realizam, se chocando contra os intrusos, porém com as corbículas carregadas de resina, como forma de imobilizar o inimigo. Em contraste às outras duas espécies, *M. quadrifasciata* é relativamente dócil. Seu comportamento na arena diferiu do comportamento defensivo contra intrusos observado corriqueiramente no campo. Tal pode representar uma diferença entre o limiar individual para ataque a um intruso e o comportamento no contexto social, especialmente no caso de colônias relativamente grandes.

A introdução de uma fase de 15 horas de jejum, por retirada do mel antes de iniciar o ensaio da arena foi um ponto chave durante a padronização do protocolo do uso das abelhas sem ferrão para ensaios de agressividade. Rittschof et al. (2018) discutiram como a restrição alimentar pode afetar o metabolismo de *A. mellifera*, e essa alteração metabólica se estende por todo o corpo da operária, incluindo o cérebro. Como já mencionado, existem fortes evidências de que o comportamento agressivo é relacionado com uma mudança metabólica significativa no cérebro (Chandrasekaran et al., 2011; Li-Byarlay et al., 2014), e no campo já se observou que colônias de abelhas sem ferrão e *A. mellifera* quando com escassez de recursos, apresentam um maior grau de defensividade. Além disso, outros insetos sociais como vespas e formigas também mostram um aumento da intensidade de ataque agressivo quando passam por restrição alimentar (Grover et al., 2007; de Souza et al., 2017). Desta forma, a metodologia padronizada neste trabalho com abelhas sem ferrão confirma a importância do estado nutricional como fator chave nos processos comportamentais de agressividade também nos insetos sociais.

Como os níveis de agressividade, os perfis de expressão dos genes do sistema imunológico das três espécies também apresentaram diferenças marcantes. *S. postica*, a espécie mais agressiva, apresentou níveis de expressão

gênica surpreendentemente elevados na cabeça em relação ao abdômen, principalmente no que diz respeito às cabeças das guardas e forrageiras. Como o corpo gorduroso, órgão responsável pela maior parte da produção de peptídeos antimicrobianos, está presente em sua maior parte no abdômen (Li et al., 2019), encontrar essa superexpressão na cabeça dos genes da via de sinalização Toll e Imd chama a atenção. Como as amostras foram processadas a partir de cabeças inteiras, não se pode afirmar que 100% da expressão desses genes é referente ao cérebro, e que glândulas da cabeça e uma quantidade residual de corpo gorduroso nesta parte do corpo possam contribuir para os padrões gênicos encontrados. Porém, como a maior parte da massa tecidual da cabeça é tecido cerebral, a explicação mais parcimoniosa é de que o aumento na escala logarítmica na cabeça das abelhas mais agressivas se explicaria principalmente devido à atividade transcricional nas células do tecido nervoso. Interessante também é o fato de a espécie mais dócil, *M. quadrifasciata*, apresentar um perfil contrário ao de *S. postica*, com expressão gênica na cabeça menor que no abdômen.

O gene *Toll*, dentre os outros genes aqui estudados, apresentou o perfil de expressão gênica descrito acima mais marcante. Toll é o receptor transmembrana que é homólogo aos receptores conhecidos como TLRs (*Toll-like receptors*) em mamíferos. Com poucas exceções, os genes *Toll* e *Dorsal* (*NF-kB* nos vertebrados) são encontrados na maioria dos genomas dos organismos já sequenciados, sugerindo que a ligação de ambos em uma via de sinalização é antiga (Leulier; Lemaitre, 2008). A via dos *Toll-like receptors* é conservada e tem origem nos metazoários. No passado, teorizou-se que a função imunológica dos TLRs envolvendo Myd88 e NF-kB teria surgido nos bilaterais, entretanto todos os componentes centrais da via de sinalização Toll já estão presentes em cnidários. Nestes organismos, Toll também possui função de reconhecimento de bactérias, além de participar da mediação da recolonização de bactérias comensais depois do organismo hospedeiro sofrer um distúrbio e de também atuar contra bactérias patogênicas. Em vertebrados, a via Toll tem como primária atuação o reconhecimento de microrganismos patogênicos, enquanto nos insetos têm função tanto imunológica, quanto no desenvolvimento embrionário (Franzenburg et al.,



2012). Contudo, outras funções já foram descritas para esta via, incluindo funções relacionadas ao sistema nervoso (Mémet, 2006).

As operárias guardas de *S. postica*, apresentaram uma expressão mais elevada de *Myd88* na cabeça, do que nutridoras e forrageiras. Até mesmo em *F. varia* e *M. quadrifasciata*, que não apresentaram diferença significativa entre guarda e forrageira, observa-se uma tendência de *Myd88* ser mais expresso nas guardas. *Myd88* faz parte do corpo da via Toll como proteína adaptadora *Myd88 downstream* de Toll. O fato da elevada expressão deste gene coincidir com o comportamento das operárias que são mobilizadas a atacar, chama a atenção para uma possível relação desta proteína com agressividade nestas abelhas. Em camundongos, *Myd88* está envolvido na regulação da resposta ao estresse e na produção de corticosterona (Hosoi et al., 2021). Foi observado que indivíduos expostos cronicamente a estresse, apresentam uma alta expressão de *Myd88* no córtex pré-frontal medial. Além disso, com o *knockout* desta proteína ou sua inibição farmacológica, comportamentos de depressão induzida são melhorados (Yao et al., 2023). Choudhury et al. (2022) por sua vez, demonstraram que camundongos deficientes de *Myd88* possuem distúrbios de sono e comportamento semelhantes à depressão, sendo isso causado pela insônia que suprime a serotonina no córtex pré-frontal. Desta forma, pode-se concluir que *Myd88* possui um papel importante na função neurológica e comportamental em mamíferos. Em insetos, por outro lado, este estudo é o primeiro a identificar padrões de expressão de *Myd88* na cabeça possivelmente relacionado com comportamento.

Dorsal, o fator de transcrição ativado pela via Toll, também se mostrou mais expresso na cabeça de *S. postica* em relação ao abdômen, enquanto *M. quadrifasciata* e *F. varia* apresentam o padrão contrário. Como já mencionado, Dorsal é um fator de transcrição ancestral que desempenha diferentes funções alternativas às relacionadas à resposta imunológica inata. Em mamíferos, NF- $\kappa$ B, homólogo de Dorsal, participa de processos cognitivos quando expresso em neurônios. NF- $\kappa$ B está presente em grandes quantidades nas terminações sinápticas dos dendritos ativadas com a presença de neurotransmissores excitatórios. O influxo de  $Ca^{2+}$  mediado por glutamato nas sinapses ativa o NF- $\kappa$ B,

que vai para o núcleo do neurônio e regula a transcrição de diferentes genes alvos (Meffert; Baltimore, 2005; Mémet, 2006; Dresselhaus; Meffert, 2019). Além disso, NF- $\kappa$ B está associado com consolidação da memória e aprendizado em vertebrados e invertebrados, como em crustáceos e insetos (Mémet, 2006). Esta resposta excitatória se dá, até onde se sabe, nos neurônios e não nas células da glia, sendo que nelas, em mamíferos, o NF- $\kappa$ B foi associado somente à resposta imunológica e controle do metabolismo central (Dresselhaus; Meffert, 2019). Desta forma, conforme nossos dados, pode-se supor que Dorsal, ou a própria via Toll, possa ter sido cooptada a ter funções relacionadas ao comportamento em abelhas sem ferrão, além das canônicas funções imunológicas. Especulamos que os elevados níveis de transcritos de genes da via Toll em abelhas mais velhas permitem que níveis consideráveis da proteína Dorsal estejam disponíveis para translocação nuclear, e assim, estas possam responder rapidamente à estímulos externos (predadores ou intrusos). Neste contexto, nosso trabalho abre portas para futuros estudos investigando o papel dos feromônios de alarme na ativação de redes gênicas que conectam as histórias de vida das abelhas sociais.

*Imd* e *Relish* apresentaram padrão de expressão similar à de *Toll* em *S. postica*. Por outro lado, em *M. quadrifasciata* o padrão de *Relish* se mostrou diferente do *Dorsal*, com expressão mais alta de *Relish* na cabeça do que no abdômen. *Relish* é o fator de transcrição da via *Imd*, mas diferente de *Dorsal*, precisa ser clivada para ser deslocado ao núcleo. Pouco se sabe sobre funções alternativas em insetos de *Relish*, além de relacionada ao sistema imunológico, sendo a maioria dos casos relacionados com neurodegeneração, morte celular e de fundamental importância no controle da microbiota intestinal (Zhai et al., 2018; Hanson; Lemaitre, 2020).

Em insetos, os produtos mais conhecidos resultantes da ativação das vias de sinalização *Imd* e *Toll* em indivíduos adultos são os peptídeos antimicrobianos (AMPs). A ativação do sistema imunológico no cérebro de insetos levando a alta expressão de AMPs, possui um efeito citotóxico que é relacionado com neurodegeneração, alteração de comportamento, regulação do sono e memória (Stączek et al., 2023). Já foi observado que o cérebro de *A. mellifera* quando

infectado por DWV (*Deformed Wing Virus*) tem uma super expressão de AMPs, demonstrando a capacidade desse órgão a montar uma resposta imunológica forte (Pizzorno et al., 2021). Entretanto, os resultados consistentes obtidos das três colônias diferentes neste trabalho, dá suporte à suposição de que os padrões de expressão gênica observados nas abelhas sem ferrão sejam constitutivos e não ativados por resposta à infecção por microrganismos.

Em *D. melanogaster*, quando saudável e sem infecção, e conforme seu envelhecimento natural, um aumento crônico do sistema imune leva a um aumento da expressão de AMPs no cérebro, que é subsequentemente acompanhado por marcada neurodegeneração (Stuart et al., 2022). Quando se suprimiu a expressão da via de sinalização Imd/NF- $\kappa$ B nas células da glia, foi ativada a sinalização hormonal adipocinética, que aumenta a disponibilidade de nutrientes, e consequentemente aumenta a expectativa de vida. Por outro lado, a super expressão dos genes da via Imd aumentou a produção de AMPs, que são citotóxicos e causam neurodegeneração (Kounatidis et al., 2017). Desta forma, os níveis de expressão de todos os genes quantificados neste trabalho seguem um padrão de aumento conforme a idade das abelhas e nos dois tecidos, existindo assim a possibilidade que estes genes estejam sendo ativados naturalmente conforme as abelhas envelhecem.

Como o intuito deste trabalho foi avaliar os níveis de expressão gênicas basais das vias de sinalização do sistema imunológico, a expressão dos peptídeos antimicrobianos não foi quantificada. Porém, olhando as vias sob o ponto de vista funcional no cérebro dos indivíduos, poderia se supor que a alta expressão dos genes da via Toll e Imd no cérebro de *S. postica* estaria também levando a alta expressão de genes de AMPs. Caso essa suposição fosse corroborada, *S. postica* teria então taxas mais altas de neurodegeneração em razão da eventual citotoxicidade dos AMPs e, consequentemente, uma menor expectativa de vida do que as outras duas espécies. Para *S. postica* e *F. varia* há registros de atividades de forrageio, a atividade mais tardia de seu ciclo de vida, até por volta dos 60 dias (Simões; Bego, 1979; Cardoso, 2010). Para *M. quadrifasciata* encontra-se dados de observação até o seu ápice de forrageio, que é 49 dias de idade, entretanto não há

dados sobre a expectativa de vida desta espécie (Kerr et al., 1956). Outras espécies do mesmo gênero, como *Melipona marginata*, possui uma expectativa de vida semelhante à de *S. postica* e *F. varia* (Mateus et al., 2019), podendo talvez indicar um padrão semelhante para *M. quadrifasciata*. Com essa pouca diferença de expectativa de vida entre as três espécies, pode-se supor que os altos níveis de expressão dos genes das vias de sinalização no cérebro de *S. postica* estejam desempenhando funções não canônicas, dando suporte a hipótese de funções alternativas destes genes no sistema nervoso de insetos sociais, inclusive funções comportamentais.

Por fim, não foi observado um padrão de expressão gênica das vias de sinalização aqui estudadas relacionados com outros aspectos das histórias de vida das abelhas sem ferrão. Não foi encontrado suporte a um possível *trade-off* entre imunidade vs. reprodução em operárias de abelhas sem ferrão. Por exemplo, esperava-se que *F. varia*, a única espécie que possui operárias completamente estéreis, possuísse padrão de expressão dos genes de imunidade em seu abdômen diferente das outras duas espécies que são capazes de ovipositar e têm ovários ativadas. Entretanto, *F. varia* se parece mais com *S. postica*, enquanto *M. quadrifasciata* foi o grupo *outsider* no que diz respeito a expressão dos genes aqui avaliados. O padrão de *trade-off* de imunidade vs. reprodução é vastamente documentado para insetos solitários como Diptera, Orthoptera, Coleoptera e Lepidoptera (Schwenke et al., 2016). Nossos dados, porém, sugerem que esse *trade-off* possa não existir em operárias de abelhas sem ferrão. Além da reprodução não impor custos energéticos à longevidade das rainhas de insetos sociais, pois encontram amplos recursos de nutrientes na colônia, nossos dados indicam também a ausência de um *trade-off* entre reprodução e capacidade imunológica, e assim revela características únicas dos insetos sociais quanto a manutenção de processos reprodutivos vs. a manutenção somática.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos pela primeira vez a relação da expressão basal (não ativada por infecção) dos genes das vias de sinalização do sistema imunológico com o comportamento em abelhas sem ferrão. *S. postica* foi a espécie quantitativamente mais agressiva, seguida de *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Tal diferença permitiu que quantificásemos os níveis de expressão dos genes do sistema imunológico em diferentes fases do ciclo de vida das operárias, a fim de comparar a expressão dos mesmos com o comportamento agressivo inato das três espécies. A espécie mais agressiva apresentou os mais altos níveis de expressão dos genes de imunidade na cabeça em relação ao abdômen, enquanto a espécie mais dócil possui o padrão contrário. Vimos também que a expressão dos genes do sistema imunológico aumenta conforme a idade, demonstrando também uma característica relacionada à senescência. A partir dos dados concluímos que não existe um *trade-off* de imunidade vs. Atividade reprodutiva em operárias de abelhas sem ferrão, demonstrando que este processo comum em insetos solitários pode não ser regra em insetos sociais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot P. Defense in Social Insects: Diversity, Division of Labor, and Evolution. *Annu Rev Entomol.* 7 de janeiro de 2022b;67(1):407–36.

Alaux C, Robinson GE. Alarm pheromone induces immediate-early gene expression and slow behavioral response in honey bees. *J Chem Ecol.* julho de 2007;33(7):1346–50.

Alaux C, Le Conte Y, Adams HA, Rodriguez-Zas S, Grozinger CM, Sinha S, et al. Regulation of brain gene expression in honey bees by brood pheromone. *Genes Brain Behav.* abril de 2009a;8(3):309–19.

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 USA.* setembro de 2009b;106(36):15400–5.

Avalos A, Fang M, Pan H, Ramirez Lluch A, Lipka AE, Dave Zhao S, et al. Genomic regions influencing aggressive behavior in honey bees are defined by colony allele frequencies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(29):17135–41.

Barribeau SM, Sadd BM, du Plessis L, Brown MJ, Buechel SD, Cappelle K, et al. A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biol.* 24 de dezembro de 2015;16(1):83.

Barron AB, Oldroyd BP, Ratnieks FLW. Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: A review. *Behav Ecol Sociobiol.* 2001;50:199–208.

Batra SWT. Solitary Bees. *Scientific American.* 1984;250(2)120-127.

Blum MS. Alarm pheromones. *Annu Rev Entomol.* 1969;14(1):57–80.

Boch R, Rothenbuhler WC. Defensive behaviour and production of alarm pheromone in honeybees. *J Apic Res.* 1974;13(4):217–21.

Boleli IC, Simões ZLP, Bitondi MG. Regression of the Lateral Oviducts During the Larval-Adult Transformation of the Reproductive System of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. *J. Morphol.* 2000;243(2)141-151.

Bonoan RE, Starks PT. Western Honey Bee (*Apis mellifera*). Em: *Encyclopedia of Social Insects.* Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 1021–7.

Bourke AFG. Worker Reproduction in the Higher Eusocial Hymenoptera [Internet]. Vol. 63, Source: *The Quarterly Review of Biology.* 1988;63(3):291-311.

Breed MD, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ. Defensive Behavior of Honey Bees: Organization, Genetics, and Comparisons with Other Bees. *Annu Rev Entomol.* 2004;49(1): 271-298

Breed MD, Page RE. Intra-and Interspecific Nestmate Recognition in *Melipona* Workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*. 1991;4(4):463-469.

Breed MD, Rogers KB. The Behavioral Genetics of Colony Defense in Honeybees: Genetic Variability for Guarding Behavior. *Behavior Genetics*. 1991;21:295-303.

Buchon N, Silverman N, Cherry S. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. 2014; 14(12), 796-810.

Camargo J, Pedro S, Melo G. *Meliponini* Lepeletier, 1836. Em: Moure J, Urban D, Melo G, organizadores. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. 2013.

Camazine S. Differential Reproduction of the Mite, *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae), on Africanized and European Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am*. 1986;79(5):801–3.

Cardoso R de CB. *Divisão etária de trabalho em operárias de Friesomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Apini) [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; 2010.

Carr HM, Palmer JH, Rittschof CC. Honey bee aggression: evaluating causal links to disease-resistance traits and infection. *Behav Ecol Sociobiol*. setembro de 2020;74(9):1-14.

Casteels P, Ampe C, Riviere L, Damme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem*. janeiro de 1990;187(2):381–6.

Chandrasekaran S, Ament SA, Eddy JA, Rodriguez-Zas SL, Schatz BR, Price ND, et al. Behavior-specific changes in transcriptional modules lead to distinct and predictable neurogenomic states. *Proc Natl Acad Sci USA*. novembro de 2011;108(44):18020–5.

Chandrasekaran S, Rittschof CC, Djukovic D, Gu H, Raftery D, Price ND, et al. Aggression is associated with aerobic glycolysis in the honey bee brain<sup>1</sup>. *Genes Brain Behav*. fevereiro de 2015;14(2):158–66.

Choudhury ME, Mikami K, Nakanishi Y, Matsuura T, Utsunomiya R, Yano H, et al. Insomnia and depressive behavior of MyD88-deficient mice: Relationships with altered microglial functions. *J Neuroimmunol*. Fevereiro de 2022;363.

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 USA*. 2007; 104(17):7128-7133.

Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Dollin A, Heard T, Aguilar I, et al. Global meliponiculture: Challenges and opportunities. *Apidologie*. 2006; 37(2):275-292

Couvillon MJ, Wenseleers T, Imperatriz-Fonseca VL, Nogueira-Neto P, Ratnieks FLW. Comparative study in stingless bees (Meliponini) demonstrates that nest entrance size predicts traffic and defensivity. *J Evol Biol*. janeiro de 2008a;21(1):194–201.

Couvillon MJ, Ratnieks FLW. Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an “undesirable-absent” recognition system. *Behav Ecol Sociobiol*. maio de 2008b;62(7):1099–105.

Cremer S, Pull CD, Urst MAF. Annual Review of Entomology Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level Disease Protection. *Annu Rev Entomol*. 2017;65:105-123

Cruz-Landim C. *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Editora Unesp; 2009.

Danihlík J, Aronstein K, Petřivalský M. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 2015;54(2)123–36.

Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular specificity of NF- $\kappa$ B function in the nervous system. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1043.

Engel MS, Rasmussen C, Gonzalez VH. Bees. Em: *Encyclopedia of Social Insects*. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 93–109.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. 2006;15(5):645-656

Franzenburg S, Fraune S, Künzel S, Baines JF, Domazet-Lošo T, Bosch TCG. MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers. *Proc Natl Acad Sci USA*. novembro de 2012;109(47):19374–9.

Free JB, Simpson J. The alerting pheromones of the honeybee. *Z Vgl Physiol*. 1968;61(3):361–5.

Freitas FCP, Depintor TS, Agostini LT, Luna-Lucena D, Nunes FMF, Bitondi MMG, et al. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sci Rep*. dezembro de 2019;9(1).

Friard O, Gamba M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol Evol*. novembro de 2016;7(11):1325–30.

Gábor E, Cinege G, Csordás G, Rusvai M, Honti V, Kolics B, et al. Identification of reference markers for characterizing honey bee (*Apis mellifera*) hemocyte classes. *Dev Comp Immunol*. agosto de 2020;109.



Galizia CG. Olfactory coding in the insect brain: Data and conjectures. *European Journal of Neuroscience*. 2014;39(11):1784–95.

Gastauer M, Campos LAO, Wittmann D. Handling sticky resin by stingless bees (Hymenoptera, Apidae). *Rev Bras Entomol*. junho de 2011;55(2):234–40.

Giurfa M. Cognitive neuroethology: Dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current Opinion in Neurobiology*. 2003;13(6):726-735

Grandperrin D, Cassier P. Anatomy and ultrastructure of the Koschewnikow's gland of the Honey bee, *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA, APIDAE). *Int. J. Insect Morphol Embrvol*. 1983;12(1):25-42.

Grover CD, Kay AD, Monson JA, Marsh TC, Holway DA. Linking nutrition and behavioural dominance: Carbohydrate scarcity limits aggression and activity in Argentine ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. dezembro de 2007;274(1628):2951–7.

Grozinger CM, Sharabash NM, Whitfield CW, Robinson GE. Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de novembro de 2003;100(24):14519–25.

Grüter C. *Stingless Bees*. Cham: Springer International Publishing; 2020.

Grüter C, Segers FHID, Menezes C, Vollet-Neto A, Falcón T, Von Zuben L, et al. Repeated evolution of soldier sub-castes suggests parasitism drives social complexity in stingless bees. *Nat Commun*. dezembro de 2017;8(1).

Grüter C, von Zuben LG, Segers FHID, Cunningham JP. Warfare in stingless bees. *Insectes Sociaux*. 2016;63:223–36.

Grüter C, Kärcher MH, Ratnieks FLW. The Natural History of Nest Defence in a Stingless Bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with Two Distinct Types of Entrance Guards. *Neotrop Entomol*. 2011;40:51-61

Hanson MA, Lemaitre B. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology*. 2020;62:22–30.

Hedtke SM, Patiny S, Danforth BN. The bee tree of life: A supermatrix approach to apoid phylogeny and biogeography. *BMC Evol Biol*. 2013;13(1).

Hosoi T, Yamawaki Y, Kimura H, Honda S, Ozawa K. Possible Involvement of MyD88 in Regulating Stress Response in Mice. *Front Neurosci*. março de 2021;15.

Huang J. *Molecular Pharmacology and Physiology of Insect Biogenic Amine Receptors*. Em: ACS Symposium Series. American Chemical Society; 2017. p. 127–38.

Hunt GJ. Flight and fight: A comparative view of the neurophysiology and genetics of honey bee defensive behavior. *Journal of Insect Physiology*. 2007;53:399–410.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197–216.

Jones SM, van Zweden JS, Grüter C, Menezes C, Alves DA, Nunes-Silva P, et al. The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula*. *Behav Ecol Sociobiol*. janeiro de 2012;66(1):1–12.

Kannan K, Galizia CG, Nouvian M. Olfactory Strategies in the Defensive Behaviour of Insects. 2022;13(5):470.

Kärcher MH, Ratnieks FLW. Standing and hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* complement each other in entrance guarding and intruder recognition. *J Apic Res*. 2009;48(3):209–14.

Kerr WE. Evolution of the Mechanism of Caste Determination in the Genus *Melipona*. *Evolution* (N Y). março de 1950;4(1):7.

Kerr WE, Lello E. Sting Glands in Stingless Bees: A Vestigial Character (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*. 1962;70(4):190–214.

Kerr WE, dos Santos Neto GR. Contribuição para o Conhecimento da Bionomia dos Meliponini 5. Divisão de Trabalho entre as operárias de *Melipona quadrifasciata* *Melipona quadrifasciata* Lep. *Insectes Soc*. setembro de 1956;3(3):423–30.

Kerr WE, Santos-Neto G. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. Divisão de trabalho entre as operárias de *Melipona quadrifasciata* Lep. *Insectes sociaux*. 1956;3:423-430.

Khalifa SAM, Elshafiey EH, Shetaia AA, El-Wahed AAA, Algethami AF, Musharraf SG, et al. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*. agosto de 2021;12(8).

Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *Journal of Molecular Biology*. 2013;425(24):4921–4936.

Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev Comp Immunol*. janeiro de 2014;42(1):25–35.

Kounatidis I, Chtarbanova S, Cao Y, Hayne M, Jayanth D, Ganetzky B, et al. NF- $\kappa$ B Immunity in the Brain Determines Fly Lifespan in Healthy Aging and Age-Related Neurodegeneration. *Cell Rep*. abril de 2017;19(4):836–48.

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. 2007;25:697–743.

Leonhardt SD. Chemical Ecology of Stingless Bees. *J Chem Ecol.* abril de 2017;43(4):385–402.

Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors - Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics.* Nature Publishing Group; 2008;9(3):165–178.

Li S, Yu X, Feng Q. Fat body biology in the last decade. Vol. 64, *Annual Review of Entomology.* Annual Reviews of Entomology.; 2019;64:315–33.

Li-Byarlay H, Rittschof CC, Massey JH, Pittendrigh BR, Robinson GE. Socially responsive effects of brain oxidative metabolism on aggression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 2014;111(34):12533–12537.

Lima LF, Torres AQ, Jardim R, Mesquita RD, Schama R. Evolution of Toll, Spatzle and MyD88 in insects: the problem of the Diptera bias. *BMC Genomics.* dezembro de 2021;22(1).

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* dezembro de 2001;25(4):402–8.

Lourenço AP, Florecki MM, Simões ZLP, Evans JD. Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. *Insect Mol Biol.* outubro de 2018;27(5):577–89.

Lourenço AP, Guidugli-Lazzarini KR, Freitas FCP, Bitondi MMG, Simões ZLP. Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochem Mol Biol.* maio de 2013;43(5):474–82.

Lourenço AP, Martins JR, Torres FAS, Mackert A, Aguiar LR, Hartfelder K, et al. Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology. *Exp Gerontol.* maio de 2019;119:174–83.

Luna-Lucena D, Rabico F, Simoes ZL. Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Current Opinion in Insect Science.* 2019;31:20–8.

Lynch JA, Roth S. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Genes and Development.* 2011;25:107–18.

Mateus S, Ferreira-Caliman MJ, Menezes C, Grüter C. Beyond temporal-polyethism: division of labor in the eusocial bee *Melipona marginata*. *Insectes Soc.* maio de 2019;66(2):317–28.

Meffert MK, Baltimore D. Physiological functions for brain NF- $\kappa$ B. *Trends in Neurosciences.* 2005;28:37–43.

Melo GAR. Stingless Bees (Meliponini). Em: *Encyclopedia of Social Insects.* Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 883–900.

Mémet S. NF- $\kappa$ B functions in the nervous system: From development to disease. *Biochem Pharmacol.* outubro de 2006;72(9 SPEC. ISS.):1180–95.

Menezes C, Vollet-Neto A, Contrera FAFL, Venturieri GC, Imperatriz-Fonseca VL. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. Em: Pot-Honey. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 153–71.

Michener CD. The bees of the world. Vol. 1. JHU press; 2000.

Michener CDMCD. The social behavior of the bees: a comparative study. Harvard University Press; 1974.

Moore AJ, Breed MD, Moor MJ. The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Anim Behav.* 1987;35(4):1159–67.

Myllymäki H, Valanne S, Rämetsä M. The Drosophila Imd Signaling Pathway . *The Journal of Immunology.* 15 de abril de 2014;192(8):3455–62.

Nogueira-Neto P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Nogueirópolis; 1997.

Nouvian M, Mandal S, Jamme C, Claudianos C, D’Ettorre P, Reinhard J, et al. Cooperative defence operates by social modulation of biogenic amine levels in the honey bee brain. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 31 de janeiro de 2018;285(1871).

Nouvian M, Reinhard J, Giurfa M. The defensive response of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology.* 2016;219:3505–17.

Nunes TM, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Zucchi R. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Anim Behav.* março de 2008;75(3):1165–71.

Pizzorno MC, Field K, Kobokovich AL, Martin PL, Gupta RA, Mammone R, et al. Transcriptomic Responses of the Honey Bee Brain to Infection with Deformed Wing Virus. *Viruses.* fevereiro de 2021;13(2):287.

Quezada-Euán JJ, González-Acereto J. Notes on the nest habits and host range of cleptobiotic *Lestrimelitta nitkib* (Ayala 1999) (Hymenoptera: Meliponini) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Acta Zool Mex.* 2002;(86):245–9.

Rittschof CC. Sequential social experiences interact to modulate aggression but not brain gene expression in the honey bee (*Apis mellifera*). *Front Zool.* março de 2017;14(1).

Rittschof CC, Coombs CB, Frazier M, Grozinger CM, Robinson GE. Early-life experience affects honey bee aggression and resilience to immune challenge. *Sci Rep.* outubro de 2015;5.

Rittschof CC, Robinson GE. Manipulation of colony environment modulates honey bee aggression and brain gene expression. *Genes Brain Behav.* novembro de 2013;12(8):802–11.

Rittschof CC, Rubin BER, Palmer JH. The transcriptomic signature of low aggression in honey bees resembles a response to infection. *BMC Genomics.* dezembro de 2019;20(1).

Rittschof CC, Vekaria HJ, Palmer JH, Sullivan PG. Brain mitochondrial bioenergetics change with rapid and prolonged shifts in aggression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*. abril de 2018;221(8).

Robinson GE. Behavioral Ecology and Sociobiology Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav Ecol Sociobiol*. 1987;20:329-338.

Robinson GE, Evans JD, Maleszka R, Robertson HM, Weaver DB, Worley K, et al. Sweetness and light: illuminating the honey bee genome. *Insect Mol Biol*. outubro de 2006;15(5):535–9.

Roubik DW. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press; 1989.

Sachse S, Rappert A, Galizia CG. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11:3970–82.

Sakagami SF, DWR and RZ. Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. 1993;21(3):237–77.

Schorkopf DLP. Male meliponine bees (*Scaptotrigona aff. depilis*) produce alarm pheromones to which workers respond with fight and males with flight. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. outubro de 2016;202(9–10):667–78.

Schwarz HF. Stingless bees (Meliponinae) of the western hemisphere. *Bulletin American Museum Natural History*. 1948;90:1–546.

Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF. Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annual Review of Entomology*. *Annual Reviews in Entomology*. 2016;56:239–56.

Shackleton K, Toufailia H Al, Balfour NJ, Nascimento FS, Alves DA, Ratnieks FLW. Appetite for self-destruction: Suicidal biting as a nest defense strategy in *Trigona* stingless bees. *Behav Ecol Sociobiol*. 1º de fevereiro de 2015a;69(2):273–81.

Shackleton K. Suicidal Biting in Stingless Bees. *Bee World*. janeiro de 2015b;92(1):21–3.

Shanahan M, Spivak M. Resin use by stingless bees: A review. *Insects*. 2021;12(8):719.

Sheldon BC, Verhulst S, Sheldon B. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology Reproductive trade-offs. *Trends Ecol Evol*. 1996;11(8):317–21.

Shorter JR, Rueppell O. A review on self-destructive defense behaviors in social insects. *Insectes Soc*. 4 de fevereiro de 2012;59(1):1–10.

Shpigler HY, Saul MC, Corona F, Block L, Cash Ahmed A, Zhao SD, et al. Deep evolutionary conservation of autism-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 de setembro de 2017a;114(36):9653–8.

Shpigler HY, Saul MC, Murdoch EE, Cash-Ahmed AC, Seward CH, Sloofman L, et al. Behavioral, transcriptomic and epigenetic responses to social challenge in honey bees. *Genes Brain Behav.* 1º de julho de 2017b;16(6):579–91.

Simões D, Bego LR. Estudo da regulação social em *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latreille, em duas colônias (normal e com rainha virgem), com especial referência ao polietismo etário (Hym. Apidae, Meliponini). *Bolm Zool, Univ S Paulo.* 1979;4:89–98.

Smith BH, Roubik DW. Mandibular Glands of Stingless bees (HYMENOPTERA: APIDAE): Chemical Analysis of Their Contents and Biological Function in Two Species of *Melipona*. *Journal of Chemical Ecology.* 1983;9:1465-1472.

Sommerlandt FMJ, Brockmann A, Rössler W, Spaethe J. Immediate early genes in social insects: a tool to identify brain regions involved in complex behaviors and molecular processes underlying neuroplasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019;76:637–51.

de Souza AR, Lino-Neto J, do Nascimento FS. Pushing Wasps to Work: Decentralized Aggression Induces Increased Activity in the Paper Wasp *Polistes versicolor*. *J Insect Behav.* 1º de julho de 2017;30(4):360–73.

Stączek S, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A. Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *Int J Mol Sci.* março de 2023;24(6):5753.

Starr CK. *Encyclopedia of Social Insects.* Starr CK, organizador. Cham: Springer International Publishing; 2021.

Steinbrecht RA. Olfaction in mosquito-host interactions. *Ciba Foundation Symposium.* Wiley; 1996.

Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Science.* 2008;15:1–14.

Stuart BAR, Franitza AL, E L. Regulatory Roles of Antimicrobial Peptides in the Nervous System: Implications for Neuronal Aging. Vol. 16, *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2022;16:58.

Tofts C, Franks NR. *Doing the Right Thing: Ants, Honeybees and Naked Mole-rats* [Internet]. Vol. 7. 1992.

Traniello IM, Bukhari SA, Dibaeinia P, Serrano G, Avalos A, Ahmed AC, et al. Single-cell dissection of aggression in honeybee colonies. *Nat Ecol Evol* [Internet]. 2023.

Valanne S, Wang JH, Rämet M. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology.* 15 de janeiro de 2011;186(2):649–56.

Wang S, Sato K, Giurfa M, Zhang S. Processing of sting pheromone and its components in the antennal lobe of the worker honeybee. *J Insect Physiol.* maio de 2008;54(5):833–41.

Wilson EO. *The insect societies.* Cambridge: Harvard University Press; 1971.

Winston ML. The biology of the honey bee. Harvard university press; 1987.

Yao XP, Ye J, Feng T, Jiang FC, Zhou P, Wang F, et al. Adaptor protein MyD88 confers the susceptibility to stress via amplifying immune danger signals. *Brain Behav Immun.* fevereiro de 2023;108:204–20.

Zhai Z, Huang X, Yin Y. Beyond immunity: The Imd pathway as a coordinator of host defense, organismal physiology and behavior. *Dev Comp Immunol.* 1º de junho de 2018;83:51–9.

Zhang W, Tettamanti G, Bassal T, Heryanto C, Eleftherianos I, Mohamed A. Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cellular Signalling.* 2021;83:110003.

### Apêndice I - Resumo estatístico dos experimentos de comportamento

	Frequência de ataque (%)	Latência de ataque (s)	Índice de ataque (s)	Perseguição (s)	Número de antenações	Frequência de ataques fatais (%)	Frequência de Fuga (%)
<i>S. postica</i>	54,7 (7,7) n=42	156,8 (20,77) n=42	73,51 (21,09) n=23	8,8 (2,83) n=4	6,889 (0,9179) n=42	19,04 (6,1) n=42	0 n=42
<i>F. varia</i>	14,2 (5,4) n=42	260,2 (15,26) n=42	73,23 (46,87) n=6	31,78 (12,65) n=9	9,762 (1,550) n=42	2,38 (2,3) n=42	4,76 (3,3) n=42
<i>M. quadrifasciata</i>	5,2 (5,2) n=19	287 (12,98) n=19	0	0	4,84 (1,018) n=19	5,26 (5,2) n=19	15,78 (8,5) n=19

Média (Erro padrão SEM).



## Apêndice II - Resumo estatístico GLMM de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*.

### *S. postica*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation
	Tissue (T) [Chi-Square / p.value]	Behavior (B) [Chi-Square / p.value]	Interaction (B x T) [Chi-Square / p.value]	Head				Abdomen					
				Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	
<i>Toll</i>	166.3485 / <2e-16	4.0899 / 0.1294	266.8130 / <2e-16	Nurses	5.179 (0.173) -- 4.829/5.528	Foragers - Guards	-0.481	0.8804	Nurses	1.633 (0.185) -- 1.242/2.024	Foragers - Guards	1.850	0.1584
				Guards	5.298 (0.178) -- 4.940/5.656	Foragers - Nurses	20.154	<.0001	Guards	1.568 (0.199) -- 1.146/1.990	Foragers - Nurses	1.628	0.2383
				Foragers	5.179 (0.173) -- 4.829/5.528	Guards - Nurses	20.397	<.0001	Foragers	2.026 (0.192) -- 1.621/2.432	Guards - Nurses	-0.265	0.9621
<i>Myd88</i>	28.9383 / 7.472e-08	1.7406 / 0.4188	33.4393 / 5.480e-08	Nurses	4.477 (0.345) -- -0.762/1.72	Foragers - Guards	-3.239	0.0044	Nurses	0.538 (0.350) -- -0.677/1.75	Foragers - Guards	-1.319	0.3875
				Guards	2.035 (0.345) -- 0.796/3.27	Foragers - Nurses	5.262	<.0001	Guards	0.664 (0.353) -- -0.534/1.86	Foragers - Nurses	-0.658	0.7884
				Foragers	1.441 (0.347) -- 0.210/2.67	Guards - Nurses	8.610	<.0001	Foragers	0.538 (0.350) -- -0.677/1.75	Guards - Nurses	0.679	0.7763
<i>Dorsal</i>	47.7497 / 4.842e-12	7.0751 / 0.02908	98.1821 / < 2.2e-16	Nurses	0.0531 (0.264) -- -0.584/0.69	Foragers - Guards	-1.042	0.5524	Nurses	0.9451 (0.277) -- 0.275/1.62	Foragers - Guards	1.963	0.1262
				Guards	3.9416 (0.260) -- 3.305/4.58	Foragers - Nurses	12.790	<.0001	Guards	1.0806 (0.290) -- 0.404/1.76	Foragers - Nurses	2.528	0.0341
				Foragers	3.6519 (0.264) -- 3.015/4.29	Guards - Nurses	13.980	<.0001	Foragers	1.6482 (0.281) -- 0.976/2.32	Guards - Nurses	0.474	0.8839
<i>Imd</i>	27.422 / 1.635e-07	18.054 / 0.0001201	45.228 / 1.510e-10	Nurses	0.553 (0.538) -- -1.271/2.38	Foragers - Guards	-1.326	0.3835	Nurses	1.035 (0.547) -- -0.755/2.83	Foragers - Guards	0.714	0.7556
				Guards	4.571 (0.538) -- 2.747/6.39	Foragers - Nurses	11.038	<.0001	Guards	2.104 (0.547) -- 0.314/3.89	Foragers - Nurses	3.963	0.0004
				Foragers	4.140 (0.538) -- 2.316/5.96	Guards - Nurses	12.364	<.0001	Foragers	2.339 (0.550) -- 0.562/4.12	Guards - Nurses	3.290	0.0038

### *F. varia*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation
	Tissue (T) [Chi-Square / p.value]	Behavior (B) [Chi-Square / p.value]	Interaction (B x T) [Chi-Square / p.value]	Head				Abdomen					
				Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	
<i>Toll</i>	0.7676 / 0.3809471	1.9386 / 0.3793445	6.3094 / 0.0426505	Nurses	-0.154 (0.236) -- -0.8298/0.522	Foragers - Guards	2.322	0.0570	Nurses	0.684 (0.238) -- 0.0124/1.356	Foragers - Guards	1.312	0.3915
				Guards	0.230 (0.253) -- -0.4290/0.889	Foragers - Nurses	4.568	<.0001	Guards	0.636 (0.236) -- -0.0403/1.312	Foragers - Nurses	1.038	0.5545
				Foragers	0.718 (0.236) -- -0.0418/1.394	Guards - Nurses	1.816	0.1693	Foragers	0.883 (0.234) -- 0.2029/1.563	Guards - Nurses	-0.252	0.9655
<i>Myd88</i>	41.6661 / 1.083e-10	62.0815 / 3.305e-14	16.3367 / 0.0002835	Nurses	0.239 (0.139) -- -0.1142/0.5913	Foragers - Guards	-1.520	0.2856	Nurses	-1.338 (0.144) -- -1.6901/-0.9854	Foragers - Guards	0.093	0.9953
				Guards	0.641 (0.136) -- 0.2870/0.9954	Foragers - Nurses	1.601	0.2493	Guards	-0.397 (0.137) -- -0.7499/-0.0432	Foragers - Nurses	6.896	<.0001
				Foragers	0.448 (0.137) -- 0.0942/0.8009	Guards - Nurses	3.118	0.0065	Foragers	-0.385 (0.137) -- -0.7379/-0.0312	Guards - Nurses	6.898	<.0001
<i>Dorsal</i>	0.1886 / 0.664093	47.3329 / 5.27e-11	13.2098 / 0.001354	Nurses	0.0432 (0.213) -- -0.5601/0.647	Foragers - Guards	1.916	0.1389	Nurses	-0.4927 (0.218) -- -1.0895/0.104	Foragers - Guards	0.210	0.9760
				Guards	0.1605 (0.229) -- -0.4296/0.751	Foragers - Nurses	2.801	0.0165	Guards	0.5669 (0.211) -- -0.0389/1.174	Foragers - Nurses	6.133	<.0001
				Foragers	0.5285 (0.211) -- -0.0781/1.135	Guards - Nurses	0.603	0.8186	Foragers	0.6028 (0.211) -- -0.00389/1.210	Guards - Nurses	5.932	<.0001
<i>Imd</i>	19.7839 / 8.671e-06	9.2770 / 0.009672	30.6456 / 2.215e-07	Nurses	-0.7133 (0.160) -- -1.140/-0.287	Foragers - Guards	0.455	0.8921	Nurses	-0.3099 (0.160) -- -0.736/0.116	Foragers - Guards	-0.202	0.9777
				Guards	0.6100 (0.174) -- 0.185/1.035	Foragers - Nurses	9.755	<.0001	Guards	0.0824 (0.159) -- -0.345/0.510	Foragers - Nurses	2.543	0.0329
				Foragers	0.6821 (0.159) -- 0.254/1.110	Guards - Nurses	8.250	<.0001	Foragers	0.0538 (0.159) -- -0.374/0.482	Guards - Nurses	2.743	0.0193

### *M. quadrifasciata*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation
	Tissue (T) [Chi-Square / p.value]	Behavior (B) [Chi-Square / p.value]	Interaction (B x T) [Chi-Square / p.value]	Head				Abdomen					
				Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	
<i>Toll</i>	133.1382 / < 2 e-16	12.3223 / 0.00211	0.3428 / 0.84249	Nurses	-0.167 (0.122) -- -0.4406/0.107	Foragers - Guards	0.408	0.9124	Nurses	1.535 (0.1260) -- 1.2563/1.813	Foragers - Guards	0.886	0.6501
				Guards	0.317 (0.124) -- 0.0408/0.593	Foragers - Nurses	3.831	0.0006	Guards	1.900 (0.124) -- 1.6241/2.176	Foragers - Nurses	3.390	0.0028
				Foragers	0.375 (0.124) -- 0.0993/0.652	Guards - Nurses	3.418	0.0025	Foragers	2.027 (0.124) -- 1.7509/2.303	Guards - Nurses	2.516	0.0351
<i>Myd88</i>	4.2825 / 0.038508	12.0620 / 0.002403	0.2978 / 0.861669	Nurses	0.597 (0.286) -- -0.1725/1.366	Foragers - Guards	-0.568	0.8377	Nurses	0.205 (0.270) -- -0.5861/0.996	Foragers - Guards	-0.788	0.7110
				Guards	1.412 (0.270) -- 0.6210/2.203	Foragers - Nurses	2.425	0.0449	Guards	0.871 (0.259) -- 0.0414/1.702	Foragers - Nurses	2.464	0.0407
				Foragers	1.261 (0.315) -- 0.5000/2.023	Guards - Nurses	3.519	0.0019	Foragers	0.718 (0.267) -- -0.0783/1.515	Guards - Nurses	3.386	0.0029
<i>Dorsal</i>	11.5540 / 0.000676	24.3884 / 5.060e-06	6.8838 / 0.032003	Nurses	-0.2478 (0.115) -- -0.488/-0.00753	Foragers - Guards	0.446	0.8961	Nurses	-0.1311 (0.118) -- -0.376/0.11326	Foragers - Guards	-0.381	0.9231
				Guards	-0.1108 (0.115) -- -0.351/0.12952	Foragers - Nurses	1.350	0.3707	Guards	0.5341 (0.107) -- 0.305/0.76331	Foragers - Nurses	3.969	0.0004
				Foragers	-0.0431 (0.118) -- -0.287/0.20131	Guards - Nurses	0.915	0.6320	Foragers	0.4787 (0.118) -- 0.234/0.72308	Guards - Nurses	4.574	<.0001
<i>Imd</i>	1.6985 / 0.1925	2.4666 / 0.2913	1.4130 / 0.4934	Nurses	-1.068 (0.292) -- -1.816/-0.320	Foragers - Guards	-1.509	0.2901	Nurses	-0.578 (0.295) -- -1.325/0.169	Foragers - Guards	-0.353	0.9336
				Guards	-0.243 (0.277) -- -1.007/0.520	Foragers - Nurses	1.532	0.2794	Guards	-0.172 (0.279) -- -0.933/0.589	Foragers - Nurses	1.088	0.5235
				Foragers	-0.640 (0.295) -- -1.387/0.107	Guards - Nurses	3.178	0.0053	Foragers	-0.267 (0.299) -- -1.013/0.480	Guards - Nurses	1.533	0.2788

Diferenças estatisticamente significante estão marcadas em amarelo.

### Apêndice III - Resumo estatístico GLM de *S. postica*, *F. varia* e *M. quadrifasciata*.

#### *S. postica*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation		
	Tissue (T)	[Chi-Square / p.value]	Behavior (B)	Interaction (B x T)	Head				Abdomen						
					Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons		t.ratio	p.value
<i>Relish</i>	62.989 / 2.079e-15		17.404 / 0.0001663	19.853 / 4.886e-05	Nurses	-0.5410 (0.174) -- -0.894/-0.188	Foragers - Guards	0.904	0.6413	Nurses	-0.5410 (0.174) -- -0.894/-0.188	Foragers - Guards	1.796	0.1852	lg
				Guards	0.0403 (0.174) -- -0.313/0.393	Foragers - Nurses	9.115	<.0001	Guards	0.0403 (0.174) -- -0.313/0.393	Foragers - Nurses	4.159	0.0005		
				Foragers	0.4822 (0.174) -- 0.129/0.835	Guards - Nurses	8.211	<.0001	Foragers	0.4822 (0.174) -- 0.129/0.835	Guards - Nurses	2.363	0.0599		

#### *F. varia*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation		
	Tissue (T)	[Chi-Square / p.value]	Behavior (B)	Interaction (B x T)	Head				Abdomen						
					Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons		t.ratio	p.value
<i>Cactus</i>	6.917 / 0.00854		69.632 / 7.579e-16	55.860 / 7.414e-13	Nurses	-0.1476 (0.135) -- -0.423/0.128	Foragers - Guards	-2.561	0.0400	Nurses	-2.1909 (0.253) -- -2.707/-1.675	Foragers - Guards	0.041	0.9991	lg
				Guards	0.0569 (0.135) -- -0.219/0.333	Foragers - Nurses	-1.492	0.3083	Guards	0.0621 (0.135) -- -0.214/0.338	Foragers - Nurses	7.881	<.0001		
				Foragers	-0.4330 (0.135) -- -0.709/-0.157	Guards - Nurses	1.069	0.5401	Foragers	0.0700 (0.135) -- -0.206/0.346	Guards - Nurses	7.854	<.0001		
<i>Relish</i>	0.0066 / 0.9354		23.3176 / 8.643e-06	0.2394 / 0.8872	Nurses	-0.1150 (0.143) -- -0.440/0.140	Foragers - Guards	-0.242	0.9683	Nurses	-0.186 (0.154) -- -0.499/0.128	Foragers - Guards	0.443	0.8977	lg
				Guards	0.779 (0.143) -- 0.488/1.069	Foragers - Nurses	4.355	0.0003	Guards	0.656 (0.143) -- 0.366/0.947	Foragers - Nurses	4.430	0.0003		
				Foragers	0.730 (0.143) -- 0.440/1.020	Guards - Nurses	4.596	0.0002	Foragers	0.746 (0.143) -- 0.456/1.036	Guards - Nurses	4.004	0.0009		

#### *M. quadrifasciata*

Gene	Main effect P values (ANOVA)				Tukey Post-hoc test (T)								Type of data transformation		
	Tissue (T)	[Chi-Square / p.value]	Behavior (B)	Interaction (B x T)	Head				Abdomen						
					Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons	t.ratio	p.value	Behavior	Relative expression [Nurses, Guards and Foragers] (SE) -- 95%CI [lower/upper]	Pairwise Comparisons		t.ratio	p.value
<i>Cactus</i>	6.2412 / 0.01248		0.2494 / 0.88276	1.7115 / 0.42496	Nurses	-0.656 (0.222) -- -1.098/-0.2140	Foragers - Guards	-0.897	0.6436	Nurses	-1.346 (0.231) -- -1.805/-0.8872	Foragers - Guards	0.485	0.8787	lg
				Guards	-0.171 (0.208) -- -0.585/0.2424	Foragers - Nurses	0.673	0.7795	Guards	-1.369 (0.182) -- -1.730/-1.0082	Foragers - Nurses	0.362	0.9304		
				Foragers	-0.444 (0.222) -- -0.886/-0.0022	Guards - Nurses	1.593	0.2543	Foragers	-1.230 (0.222) -- -1.672/-0.7879	Guards - Nurses	-0.079	0.9966		
<i>Relish</i>	9.5487 / 0.002001		12.9579 / 0.001535	0.0746 / 0.963372	Nurses	-0.4242 (0.1021) -- -0.6270/-0.221	Foragers - Guards	-1.263	0.4196	Nurses	-0.8162 (0.1059) -- -1.0266/-0.606	Foragers - Guards	-1.555	0.2705	lg
				Guards	0.0762 (0.0833) -- -0.0894/0.242	Foragers - Nurses	2.313	0.0590	Guards	-0.3315 (0.0833) -- -0.4970/-0.166	Foragers - Nurses	1.902	0.1439		
				Foragers	-0.0903 (0.1021) -- -0.2931/0.112	Guards - Nurses	3.797	0.0008	Foragers	-0.8162 (0.1059) -- -1.0266/-0.606	Guards - Nurses	3.596	0.0015		

Diferenças estatisticamente significante estão marcadas em amarelo.