

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ANDRESA RAQUEL CAPODIFOGLIO

Longevidade diferencial de fêmeas adultas de *Apis mellifera*

SÃO CARLOS - SP

2023

ANDRESA RAQUEL CAPODIFOGLIO

Longevidade diferencial de fêmeas adultas de *Apis mellifera*

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia pela Universidade
Federal de São Carlos (UFSCar,
campus sede).**

Orientador: Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes

São Carlos - SP

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cláudia e Marcelo Capodifoglio, e ao meu irmão, Bruno Capodifoglio, por todo amor e apoio incondicional e por sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes, por todas as conversas, pela amizade construída e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos, os que fiz na Federal, os que fiz no trabalho e os que conheci por intermédio do destino, por estarem sempre dispostos a ajudar e a segurar as pontas. Em especial, ao Lucas Santos Oliveira e à Milena Maria Pinto, pelos anos de amizade e companheirismo, quase que diários.

Aos amores que vivi.

A todos que de alguma forma contribuíram com a construção desta monografia: Msc. Caio Soares, Dr. Fabiano Abreu, Dra. Flávia Cristina de Paula Freitas, Laís Soares, Msc. Luana Bataglia e Dra. Renata de Cássia Pires. Em particular à Dra. Adelita Santiago, à Luani Godoy e à Ana Maria Gui (também grandes amigas).

Ao privilégio de poder ter vivenciado a Universidade Federal de São Carlos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fenótipos de operárias adultas da espécie *Apis mellifera*.

Figura 2. Castas da espécie *A. mellifera*.

Figura 3. Mecanismo regulador dos níveis de vitelogenina na hemolinfa, tendo como estímulo a dieta das abelhas da espécie *A. mellifera*.

Figura 4. Via colesterol-20-hidroxiecdisona-vitelogenina.

Figura 5. Diagrama de Venn com o conjunto de genes em comum mais expressos em operárias órfãs.

Figura 6. Diagrama de Venn com o conjunto de genes em comum menos expressos em operárias órfãs.

Figura 7. Genes *up* regulados no corpo gorduroso de pseudo rainhas e no cérebro, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs.

Figura 8. Genes em comum *down* regulados em pseudo rainhas e operárias órfãs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos que exploram diretamente a diferença de expressão gênica entre operárias poedeiras (pseudo rainhas, operárias órfãs ou anarquistas) e operárias comuns.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos nos diferentes fenótipos de operárias poedeiras.

Tabela 3. Genes em comum *up* regulados no cérebro, no abdômen (sem ovário) e nos ovários de operárias órfãs.

Tabela 4. Genes em comum *down* regulados no cérebro, no abdômen (sem ovário) e nos ovários de operárias órfãs.

Tabela 5. Genes em comum *up* regulados no corpo gorduroso das pseudo rainhas e no abdômen (sem ovário) das operárias órfãs.

Tabela 6. Genes em comum *up* regulados no corpo gorduroso das pseudo rainhas e no ovário das operárias órfãs.

Tabela 7. Análise de *Gene Ontology* dos genes *up* regulados expressos exclusivamente em pseudo rainhas.

Tabela 8. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas e no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs.

Tabela 9. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs.

Tabela 10. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas e no ovário de operárias órfãs.

Tabela 11. Genes menos expressos exclusivamente no corpo gorduroso das pseudo rainhas.

RESUMO

As fêmeas adultas de abelhas da espécie *Apis mellifera* possuem uma variação em sua longevidade. Rainhas e operárias poedeiras (anarquistas, pseudo rainhas e operárias órfãs) vivem mais do que operárias não poedeiras, indicando relação com aspectos reprodutivos. No presente trabalho fizemos uma prospecção baseada na literatura científica em busca de fatores que se associam às diferenças de expectativa de vida quando comparamos estes fenótipos entre si. Para as rainhas, observamos que a longevidade de cerca de 2 anos está envolvida com processos oxidativos, produção de vitelogenina, composição da microbiota intestinal, imunossenescência, composição lipídica das membranas, atividade da telomerase e alimentação exclusiva de geleia real. Para as operárias poedeiras, não foram encontrados dados específicos relacionados à longevidade. Desta forma, recuperamos dados de expressão gênica comparativa entre os fenótipos de operárias poedeiras e não poedeiras, a fim de encontrar potenciais genes marcadores de longevidade. Identificamos, dentre os genes mais expressos em operárias não poedeiras, um enriquecimento funcional relacionado com a resistência a xenobióticos, enquanto aqueles mais abundantes e preferencialmente expressos em pseudo rainhas estão envolvidos na regulação dos hormônios ecdiesteroides. Paradoxalmente, alguns dos genes candidatos a marcadores de longevidade em rainhas, apresentam perfis de expressão gênica opostos em todos os fenótipos de operárias poedeiras. Nesse sentido, usando operárias não poedeiras como referência, sugerimos que os mecanismos associados à maior longevidade de rainhas não se sobrepõem àqueles associados à maior longevidade das operárias poedeiras.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; Longevidade; Eussocialidade; Revisão bibliográfica.

ABSTRACT

Adult females of *Apis mellifera* bee species exhibit variation in their longevity, with queens and laying workers (such as anarchists, pseudo queens, and queenless/orphaned workers) living longer than non-laying workers, indicating a relationship with reproductive aspects. In this study, we conducted a literature-based survey to identify potential factors associated with differences in life expectancy between these phenotypes. For queens, we observed that longevity of approximately two years is associated with oxidative processes, vitellogenin production, intestinal microbiota composition, immunosenescence, lipid composition of membranes, telomerase activity, and exclusive feeding of royal jelly. However, no data were found to explain longevity in laying workers. Therefore, we analyzed comparative gene expression data between laying and non-laying workers to identify potential marker genes for longevity. We found that non-laying workers showed higher expression of genes related to xenobiotic resistance, while pseudo queens had more abundant and preferentially expressed genes involved in the regulation of ecdysteroid hormones. Paradoxically, some candidate genes for longevity markers in queens showed opposite gene expression profiles in all phenotypes of worker layers. Based on these findings and using non-laying workers as a reference, we suggest that the mechanisms associated with greater longevity in queens do not overlap with those associated with greater longevity in laying workers.

Keywords: *Apis mellifera*; Longevity; Eusociality; Literature review.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Apis mellifera</i> e a eussocialidade	3
1.2 Operárias adultas poedeiras	8
2 OBJETIVO	10
3 METODOLOGIA	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 PARTE I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS FATORES ASSOCIADOS À MAIOR LONGEVIDADE DAS RAINHAS QUANDO COMPARADAS COM OPERÁRIAS	14
4.1.1 Espécies reativas de oxigênio: mecanismos utilizados para driblar os processos degenerativos e sua relação com a longevidade de abelhas.	14
4.1.2 Vitelogenina	17
4.1.3 Microbiota e Longevidade	21
4.1.4 Imunossenescência	23
4.1.5 Telomerase	26
4.1.6 Geleia real, suas propriedades e efeitos sobre a longevidade	27
4.2 PARTE II: EXPRESSÃO GÊNICA EM OPERÁRIAS POEDEIRAS <i>VERSUS</i> NÃO POEDEIRAS COM POTENCIAL ASSOCIAÇÃO ÀS DIFERENÇAS DE LONGEVIDADE DESTES FENÓTIPOS	30
5 CONCLUSÃO	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida de uma espécie é uma medida estatística que se refere ao tempo médio de vida que um grupo de indivíduos nascidos em condições semelhantes viverá (SHRYOK, 1973). Os organismos que vivem por um período superior à média de seus semelhantes da mesma espécie, contornando as adversidades intrínsecas provenientes do envelhecimento, são considerados seres mais longevos (OXFORD LANGUAGES, 2022).

A ocorrência do envelhecimento intrínseco de organismos multicelulares, a partir do surgimento da vida, é um processo quase universal até o momento (HUGHES *et al.*, 2002). O envelhecimento consiste em um processo progressivo, dinâmico e irreversível, em que são observadas modificações morfológicas, bioquímicas, funcionais e até mesmo comportamentais do indivíduo, independentemente de seu nível de organização celular (VIÑA, BORRÁS e MIQUEL, 2007).

O ser humano, em particular, por ter consciência acerca do processo de envelhecer, tende a rejeitá-lo, por ser o fenômeno que o lembra e o aproxima da morte. Apesar de natural, há muito tempo, nossa espécie vem buscando compreender o envelhecimento, explicar suas causas e mitigá-lo, a fim de aumentar sua expectativa de vida com qualidade (SANTOS, 2010). Tais esforços podem ser considerados tão antigos quanto o próprio registro da história.

Deixando um pouco o olhar biocientífico de lado, pode-se fazer menção a uma epopeia suméria (tida como a obra literária mais antiga da humanidade) que conta a jornada de um rei — Gilgamesh — que viveu por volta de 2.700 a.C. Gilgamesh, após a perda de um amigo, decidiu destruir a morte e, para tal, começou sua campanha em busca da imortalidade (HAYFLICK, 2016). No Egito antigo (2.500 a.C.), o deus Osíris tornou-se uma das figuras mais importantes para o povo egípcio, pois, dada sua “dupla ressurreição” (corpórea e social), ele passou a retratar um modelo pelo qual os efeitos da ruptura causada pela morte poderiam ser totalmente revertidos (SMITH, 2008). O primeiro imperador da China unificada (221 a.C.), Qin Shi Huangdi, também demonstrou um grande fascínio pela busca da imortalidade, morrendo durante uma viagem para o Leste do território chinês, ocasião em que procurava as lendárias Ilhas dos Imortais onde acreditava-se existir um elixir da imortalidade. Ironicamente, o imperador em questão, teria morrido ao beber uma poção, que havia sido preparada pelos cientistas e médicos da corte (ROBERT, J. 1996). Já o filósofo romano Lucrécio (94 a.C. — 50 a.C.) argumentou, de maneira semelhante a que Weismann o faria séculos depois, que o envelhecimento e, conseqüentemente, a morte, são benéficos para um

grupo por abrirem espaço para os indivíduos da nova geração (FABIAN e FLATT, 2011; BAILEY, 1947; DE RERUM NATURA (ON THE NATURE OF THINGS)).

No entanto, como a imortalidade ainda não é uma realidade verossímil, é pertinente aos pesquisadores voltarem suas atenções a aprofundarem os conhecimentos acerca das causas do envelhecimento. Uma forma interessante de investigar tal caráter intrínseco é estudando espécies cujos membros possuem notável variação de expectativa de vida, tal qual ocorre com as espécies eussociais em que se observa a existência de uma variação de até 100 vezes no tempo médio de vida (KELLER e GENOUD, 1997).

1.1 *Apis mellifera* e a eussocialidade

A compreensão acerca da eussocialidade começou a ser delineada a partir de 1911 quando o entomologista William Morton Wheeler descreveu, pela primeira vez, as colônias de insetos sociais como “superorganismos”, pois os membros dessas colônias pareciam operar em conjunto, como se fossem uma única entidade (WHEELER, 1911). Já em 1966, a também entomologista Suzanne Batra, ao estudar as abelhas da família *Halictidae*, observou uma divisão de trabalho na colônia, em que cada indivíduo desempenhava funções específicas, utilizando pela primeira vez a terminologia eussocialidade para definir este tipo de comportamento (BATRA, 1966).

Alguns anos depois, em 1969, Charles D. Michener (entomólogo estadunidense e orientador de Suzanne) acabou tornando o termo eussocialidade mais abrangente ao analisar os membros de uma família ainda maior de Hymenoptera, a Apoidea. Além disso, após comparar os graus de comportamento social entre abelhas e outros animais, Michener descreveu três características que deveriam conseguir diferenciar a eussocialidade, especificamente entre abelhas, dos demais níveis/tipos de organizações sociais existentes entre os seres vivos. Segundo Michener, seriam elas: “(i) a presença de castas e divisão do trabalho, (ii) colônias com duas gerações de adultos, (iii) trabalho cooperativo das abelhas na colônia” (MICHENER, 1969).

Como mencionado, Michener elencou aspectos adequados para descrever o comportamento eussocial exclusivamente em abelhas. A generalização destes critérios foi formulada, em 1971, pelo biólogo Edward O. Wilson — que estudava o comportamento de formigas (WILSON, 1971) — e ficou conhecida como “critérios de Wilson”. Esses critérios foram criados a partir da observação do comportamento social de várias espécies, como

abelhas, vespas, formigas e cupins. Tais critérios incluem a divisão reprodutiva do trabalho, a sobreposição de gerações que contribuem para as atividades laborais do grupo e indivíduos cooperativamente cuidando da prole (WILSON, 2000).

As abelhas da espécie *A. mellifera*, são um exemplo bastante estudado de espécie eussocial. Ela se organiza em duas castas: a das rainhas e a das operárias (Figura 2) e ambas originam-se de ovos fecundados (diploides). Dito isso, entende-se que as larvas oriundas de ovos fertilizados de até 3 dias são bipotentes, ou seja, podem se desenvolver tanto como rainhas, quanto como operárias, a depender de sua dieta. Isso porque todas as larvas, até o segundo dia após a eclosão do ovo (instar L2), são alimentadas com geleia real. A partir desse instar, as larvas que continuam sendo alimentadas com esta dieta exclusiva, se tornarão rainhas — esses indivíduos também mantêm essa dieta ao longo de toda vida adulta. Por outro lado, larvas alimentadas com geleia real misturada com mel e pólen (geleia de operária), se tornarão operárias (REMBOLD *et al.*, 1974).



Figura 2. Castas da espécie *A. mellifera*. Organização das castas em: operárias e rainha. Fonte: <https://br.pinterest.com> (Acesso em 20/12/2022).

No geral, a rainha é a base da colmeia, e sua capacidade de produzir inúmeros descendentes é essencial para a sobrevivência e o sucesso da colônia (YU *et al.*, 2022). Além de botar ovos, ela também produz feromônios que ajudam a regular o comportamento das outras abelhas na colmeia. Estes atuam de diferentes maneiras na espécie *A. mellifera*:

mantendo a coesão da colônia (MELATHOPOULOS *et al.*, 1996), evitando o desenvolvimento dos ovários das operárias (BUTLER e FAIREY, 1963), atraindo os zangões presentes na área de congregação (local onde os machos se reúnem para esperarem as fêmeas virgens, que voam até a área de congregação para acasalar) para o acasalamento com rainhas virgens e aumentando a coleta de néctar (GARY, 1962) e de pólen (HIGO *et al.*, 1992). Além disso, os feromônios podem inibir a síntese do hormônio juvenil em operárias, fato relacionado com a regulação da divisão de trabalho, pois pode proporcionar um atraso nas atividades de forrageamento (ROBINSON *et al.*, 1998). De modo geral, é notável que os feromônios podem atuar tanto como reguladores sociais quanto sexuais e reprodutivos (KROCHER e GROZINGER, 2011).

As operárias, por sua vez, são responsáveis por atender às necessidades da rainha e pela manutenção da colmeia, por serem elas que cuidam das rainhas, alimentando-a para mantê-la saudável e apta a produzir ovos (WINSTON, 1987).

Além disso, segundo Winston (1987), num primeiro momento, as operárias executam principalmente tarefas de limpeza, mas à medida que amadurecem e desenvolvem glândulas que produzem geleia real (por volta dos 5 a 6 dias de vida), elas também passam a nutrir e cuidar das larvas jovens, recebendo o nome de “nutridoras” e tendo o pólen como base de sua dieta (CRAILSHEIM *et al.*, 1992). Uma vez capazes de produzir cera, elas assumem responsabilidades adicionais, como a construção de favos. Finalmente, à medida que ativam suas glândulas de veneno e odor (por volta dos 20 a 24 dias de vida), tornam-se responsáveis pela guarda, sinalização e forrageamento, agora recebendo o nome de “forrageiras” (PAGE, 2006), alimentando-se principalmente de néctar. Tal distribuição de trabalho não é definitiva e pode ser modificada, sendo acelerada, desacelerada ou até mesmo revertida, tudo isso respondendo às demandas socioambientais e direcionadas a partir de uma comunicação por feromônios, mas de maneira geral, a divisão primária do trabalho entre as operárias é baseada no polietismo etário (WINSTON, 1987). No caso de não haver forrageiras suficientes, algumas operárias mais jovens poderão acelerar seu desenvolvimento comportamental para se tornarem forrageiras. Por outro lado, se não houver nutridoras suficientes, algumas operárias mais velhas e até mesmo as forrageiras podem reverter seu desenvolvimento para atuarem novamente como nutridoras (HUANG e ROBINSON, 1996).

Quando a classificação é atribuída em virtude das estações em que ocorrem os nascimentos das operárias, temos as operárias de verão e as operárias de inverno. Esta última

é observada em colônias localizadas em países de clima temperado (AMDAM e OMHOLT, 2002). Outro aspecto utilizado para atribuir essa classificação diz respeito à diferença de expectativa de vida, uma vez que abelhas de inverno vivem mais do que abelhas de verão. Enquanto operárias de verão vivem por volta de 3 a 6 semanas, operárias de inverno vivem até 4 meses (PAGE e PENG, 2001). Isso pode ser resultado de um forrageamento mais tardio das abelhas de inverno quando comparadas com as abelhas de verão, pois durante o forrageamento, há um aumento da mortalidade extrínseca, acompanhada de uma alta demanda fisiológica (AMDAM *et al.*, 2009). Outra suposição para uma maior expectativa de vida das abelhas de inverno seria que indivíduos que se desenvolvem em ambientes mais frios podem ter uma taxa metabólica mais lenta (CZARNOLESKI *et al.*, 2013), proporcionando menor dano molecular (SOHAL *et al.*, 1986).

Além da diferença na expectativa de vida, as abelhas de verão e inverno também apresentam diferenças na sua fisiologia e comportamento. Por exemplo, as abelhas de inverno possuem maior quantidade de gordura corporal, o que lhes confere maior resistência às baixas temperaturas típicas do inverno (JOHNSON, 2010). Essas abelhas também são responsáveis por manter a temperatura da colmeia estável, aglomerando-se ao redor da rainha para mantê-la aquecida. Já as abelhas de verão possuem um desenvolvimento mais rápido, seguindo a atribuição de tarefas conforme descrito acima (SEELEY e VISSCHER, 1985).

Ademais, em uma mesma espécie eussocial, na qual um mesmo genótipo pode originar diferentes castas, é válido admitir a existência de mecanismos atuando para regular vários elementos relacionados ao comportamento, à reprodução, à própria determinação e diferenciação de castas e até mesmo ao envelhecimento (OPACHALOEMPHAN *et al.*, 2018). Por exemplo, a expressão e a atividade reduzida, em larvas a partir de 3 dias após a eclosão dos ovos fertilizados (conhecidas como larvas L3), de proteínas responsáveis pelo estabelecimento dos padrões de metilação do material genético, mais especificamente a DNA (citosina-5)-metiltransferase 3A produzida a partir da expressão do gene *dnmt3*, é resultado de uma alimentação exclusiva com geleia real, a qual desencadeia o desenvolvimento dessas mesmas larvas em rainhas (KUCHARSKI *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2011).

Entretanto, os mecanismos que governam o desenvolvimento diferencial de operárias e rainhas não se limitam apenas à epigenética. Alguns trabalhos associam perfis diferenciais de expressão de microRNAs (miRNAs) encontrados entre larvas de operárias e larvas de rainha a uma possível relação com o desenvolvimento diferencial entre as castas (SHI *et al.*,

2015; GUO *et al.*, 2015; ASHBY *et al.*, 2016). Alguns miRNAs específicos como o miR-let-7, o mir-100, mir-34, mir-375, mir-283, mir-10, mir-184 tiveram seu nível de expressão aumentado em larvas de rainhas quando comparado com o nível de expressão em larvas de operárias (SHI *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2015). Vale destacar, que estes mesmos miRNAs também estão presentes na geleia real (SHI *et al.*, 2012) e, como dito, esta dieta torna-se exclusiva das larvas de rainha (a partir do instar L3) perpetuando-se ao longo de toda vida das rainhas.

Sendo assim, quando se fala da influência dos miRNAs e da geleia real para a fisiologia das abelhas, tem-se dois momentos distintos. O primeiro diz respeito a fase larval, em que estes miRNAs sabidamente estão sendo expressos de maneira diferencial pelas larvas e também ingeridos por meio do consumo de geleia real e agindo de maneira a promover a diferenciação de castas. O segundo momento diz respeito à fase adulta, em que os miRNAs continuarão sendo absorvidos a partir do consumo de geleia real e poderão estar associados a maior longevidade das rainhas, fato que será discutido no decorrer do texto.

Fora estas características e as que foram propostas por Wilson e outros pesquisadores aqui mencionados, os insetos eussociais apresentam uma grande plasticidade em sua longevidade. Rainhas da espécie *A. mellifera* vivem extraordinariamente mais do que membros de outras castas de uma colônia. Foi observado que existe uma diferença de até 10 vezes no tempo de vida intrínseco (independente do ambiente) entre rainhas e operárias. Enquanto a casta das operárias apresenta uma expectativa de vida de no máximo alguns meses, as rainhas podem viver em média de 1 a 2 anos (PAGE e PENG, 2001).

Essa maior longevidade da rainha, em comparação com as operárias comuns, não é alcançada por meio de uma compensação negativa com a reprodução, fato observado igualmente em operárias poedeiras que vivem mais do que as operárias não poedeiras (DIXON, KUSTER e RUEPPELL, 2014). E este mencionado *trade off* entre reprodução e longevidade, isto é, indivíduos reprodutores vivendo menos e indivíduos que investem menos em reprodução vivendo mais, ocorre, pois os recursos do corpo de um organismo são limitados e devem ser alocados entre demandas concorrentes, como crescimento, mecanismos de manutenção e reparo do material genético, sistema imunológico, dentre outros componentes biológicos. Além disso, a reprodução também pode aumentar a exposição de um indivíduo a estresses ambientais e predadores (SMITH, 1958; GHALAMBOR e MARTIN, 2001; EDWARD e CHAPMAN, 2011). Isto sugere que deve existir uma reorganização de

vias metabólicas que podem explicar a maior longevidade das abelhas adultas poedeiras (CORONA *et al.*, 2007).

1.2 Operárias adultas poedeiras

Como mencionado, a capacidade de colocar ovos das operárias, diz respeito à presença ou ausência da rainha na colmeia, visto que os ovários das operárias normalmente costumam ser inativados em virtude da ação dos feromônios reais. Este fator é essencial para estabelecer e manter a posição reprodutiva dominante da rainha sobre as operárias (KOCHER e GROZINGER, 2011), pois a ausência destes feromônios por um curto prazo resulta em operárias escolhendo alguns ovos recém-postos para criar novas rainhas; já a ausência por um longo período resulta em algumas operárias desenvolvendo ovários, ou seja, as operárias são potencialmente poedeiras (DE GROOT e VOOGD, 1954). Dessa maneira, ao se observar o comportamento de colônias de abelha, cuja presença de uma rainha que coloca ovos se faz vigente, a porcentagem de ovos provenientes das operárias é ínfima (KOCHER e GROZINGER, 2011). Entretanto, na ausência da rainha, as operárias podem começar a colocar ovos não fertilizados, dos quais machos se desenvolvem, (BUTTEL-REEPEN, 1915). Estas operárias que adotam o comportamento de postura de ovos na ausência da rainha aumentam moderadamente sua expectativa de vida, de modo que já foram encontrados indivíduos que viveram por volta de 75 dias (DIXON, KUSTER e RUEPPEL, 2014). O mesmo é válido para as operárias parasitas *A. mellifera capensis*, que também podem ser denominadas como pseudo rainhas.

As abelhas parasitas da espécie *A. m. capensis* são uma subespécie de abelha melífera, originária da África do Sul. Essas abelhas são conhecidas por seu comportamento parasitário, em que invadem e assumem colônias de outras abelhas, como a *Apis mellifera scutellata*, usando táticas enganosas para se infiltrar em colônias hospedeiras. Estas operárias produzem feromônios e mimetismos químicos que enganam as sentinelas da colônia hospedeira, permitindo que as abelhas parasitas adentrem sem serem detectadas e não tenham seus ovos postos efetivamente removidos pelo policiamento dos trabalhadores (MARTIN, BEEKMAN e WOSSLER, 2002). Uma vez dentro da colônia, as abelhas parasitas matam a rainha hospedeira e forçam as operárias “residentes” a criar e cuidar de novas rainhas parasitas. Quando bem estabelecidas nas colônias que invadem, são tratadas tal qual rainhas que se originaram na colmeia invadida, alcançando uma expectativa de vida de até cinco meses (VELTHUIS, RUTTNER e CREWE, 1990).

Já as operárias rebeldes, são operárias que possuem significativamente mais ovariolos no ovário e glândulas mandibulares do que operárias comuns (KUSZEWSKA e WOYCIECHOWSKI, 2015). Elas são originárias de larvas de operárias alimentadas em uma colônia sem rainha, mais precisamente na ausência do feromônio da glândula mandibular da rainha (WOYCIECHOWSKI *et al.*, 2017), cujas mudanças fisiológicas persistem em uma situação de rainha (WOYCIECHOWSKI e KUSZEWSKA, 2012). Foi identificado um que operárias rebeldes vivem em média de 4 a 5 a mais do que operárias que se desenvolvem em colônias com a presença de rainha e que, em virtude disso, têm menor potencial poedeiro (KUSZEWSKA *et al.*, 2017).

As operárias anarquistas são originárias do que, como próprio OLDROYD (1994) chamou “uma síndrome comportamental rara”, porque é um comportamento incomum que desafia as estruturas de “poder” tradicionais da colmeia e a ordem social hierárquica (OLDROYD, 1994). Existem algumas teorias sobre como esse comportamento incomum pode ter surgido nas colônias de abelhas, uma delas sugere que as operárias anarquistas são o resultado de uma variação genética específica que ocorre natural e aleatoriamente nas populações de abelhas.

O gene *Anarchy* desempenha um papel importante na regulação do comportamento e da fisiologia das operárias anarquistas em colônias de abelhas. A expressão reduzida deste gene no ovário das operárias anarquistas, sensível à presença ou não da rainha na colmeia, está associada ao aumento da produção de óvulos e contribui para a especialização comportamental dessas operárias em atividades reprodutivas (RONAI *et al.*, 2016).

Não foram encontradas na literatura trabalhos que tratam das razões genéticas da variação de longevidade de anarquistas quando comparadas com operárias não poedeiras. O material que se tem sobre este fenótipo de operária diz respeito à idade em que elas iniciam o primeiro forrageamento, sendo este mais tardio quando comparado com o início desse comportamento em operárias não poedeiras (OLDROYD e BEEKMAN, 2008). Tal cenário contribuiria para que houvesse uma maior expectativa de vida das operárias anarquistas, pois estas se exporiam aos riscos extrínsecos mais tardiamente do que as forrageiras convencionais, entretanto, nunca foram realizados estudos a respeito da real longevidade deste fenótipo (comunicação pessoal, Benjamin Oldroyd, 2023).

Na Figura 1 encontra-se um resumo com os fenótipos de operárias mencionados acima, divididos de acordo com seu *status* reprodutivo, sua expectativa de vida e se ele ocorre na presença ou não da rainha.

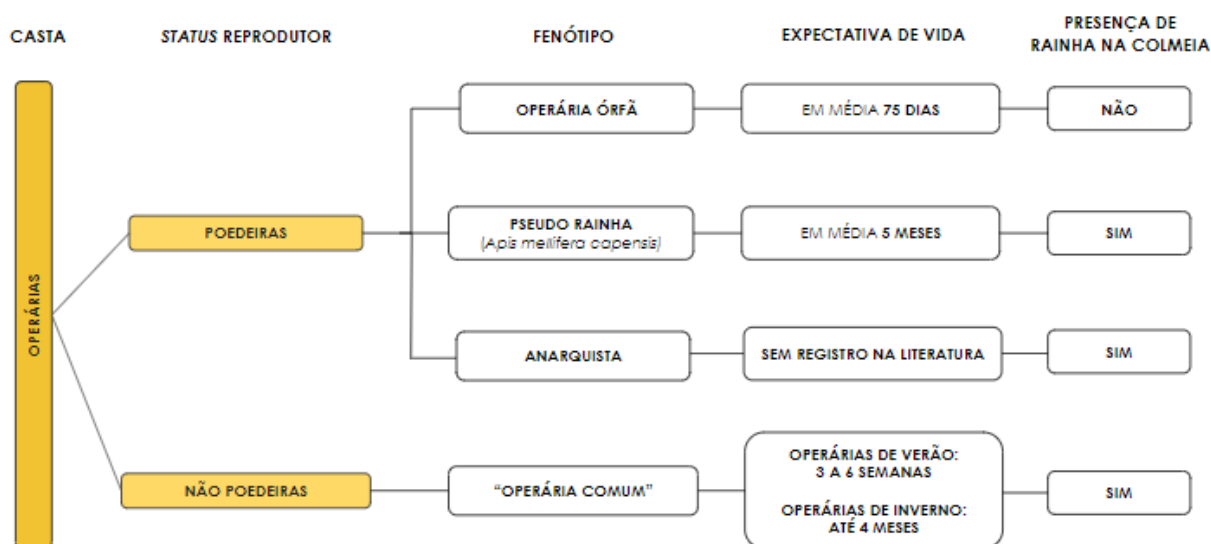


Figura 1. Fenótipos de operárias adultas da espécie *A. mellifera*. Divisão dos fenótipos de operárias presentes na espécie *A. mellifera* conforme seu *status* reprodutor. Na figura também é possível observar a expectativa de vida de cada fenótipo e se o mesmo ocorre na presença ou não da rainha na colmeia. Fonte: Elaboração própria a partir de DIXON, KUSTER e RUEPPEL, 2014; VELTHUIS, RUTTNER e CREWE, 1990; KUSZEWSKA et al., 2017; Comunicação pessoal com OLDROYD, 2023.

2 OBJETIVO

Existe um grande conjunto de informações na literatura indicando possíveis razões que juntas poderiam estar associadas à longa vida das rainhas frente as operárias, entretanto, para as operárias poadeiras que apresentam maior expectativa de vida do que operárias comuns, não foram encontrados tais materiais. Vale ressaltar que neste texto, serão empregados os termos “operárias comuns” e “operárias não poadeiras” para descrever operárias que mantêm seus ovários inativos dada a presença da rainha e, portanto, não são capazes de colocar ovos.

Logo, este trabalho se divide em duas partes:

- Parte I: levantamento bibliográfico dos fatores que se associam a maior longevidade das rainhas da espécie *A. mellifera*, quando comparadas com operárias comuns desta mesma espécie, investigando as estratégias evolutivas, relacionadas ou não com a

expressão diferencial gênica, responsáveis por fazer das rainhas indivíduos mais longevos.

- Parte II: busca por genes diferencialmente expressos entre operárias poedeiras e operárias comuns que possam estar associados a maior longevidade dos grupos de operárias poedeiras.

3 METODOLOGIA

Para realizar o levantamento bibliográfico dos fatores que se associam a maior longevidade das rainhas quando comparadas com operárias comuns foi feita uma consulta, de forma não sistemática, a partir de análise e seleção de artigos científicos encontrados por meio do uso da ferramenta *Google Scholar*. As palavras-chave utilizadas nas buscas foram combinações dos seguintes termos: “*lifespan*”, “*eusociality*”, “*Apis mellifera*”, “*queen*”, “*longevity*”, “*lifetime*”, “*life expectancy*”, “*aging*”, “*worker*”.

Já para identificar genes diferencialmente expressos que estão associados com a maior expectativa de vida de operárias poedeiras quando comparadas com as operárias comuns, foi realizado um levantamento de trabalhos que apresentassem dados de expressão gênica comparativa destes dois perfis de operárias. É importante salientar que, tais artigos, contudo, possuíam objetivos diversos ao realizar tais análises, objetivos estes principalmente voltados a entender as mudanças de expressão gênica que justificassem as alterações do *status* reprodutor das operárias de *A. mellifera* (Tabela 1).

Tabela 1. Trabalhos que exploram diretamente a diferença de expressão gênica entre operárias poedeiras (pseudo rainhas, operárias órfãs ou anarquistas) e operárias comuns. Os tecidos examinados para cada um dos fenótipos e em cada um dos trabalhos e o tipo de metodologia utilizada para a obtenção dos dados. Fonte: *Google Scholar* (Acesso no período de 06/2022 a 01/2023).

	Corpo gorduroso	Cérebro	Ovário	Abdômen (sem ovário)
Operárias órfãs (poedeiras)	-	Microarray (GROZINGER <i>et al.</i> , 2007)	Transcriptoma RNA-Seq (NIU <i>et al.</i> , 2014)	Transcriptoma Tag-Seq (KENNEDY <i>et al.</i> , 2021)
Anarquistas	Microarray (THOMPSON <i>et al.</i> , 2008) ; Microarray (THOMPSON <i>et al.</i> , 2006)	Microarray (THOMPSON <i>et al.</i> , 2008) ; Microarray (THOMPSON <i>et al.</i> , 2006)	-	-
Pseudo rainhas	Transcriptoma RNA-Seq (AUMER <i>et al.</i> , 2018)	-	-	-

O trabalho de Grozinger e colaboradores (2007) buscou identificar diferenças nos padrões de expressão gênica no cérebro da espécie *Apis mellifera* relacionados à sua casta e *status* reprodutor. Foram identificados genes possivelmente envolvidos na regulação do desenvolvimento do cérebro de abelhas e em suas funções cognitivas, da comunicação social entre as abelhas e da capacidade de aprendizagem e memorização de informações.

Niu e colaboradores (2014) compararam o transcriptoma de ovários de abelhas *Apis mellifera* em dois estados diferentes: inativo e ativo. Os resultados mostraram que os ovários ativos apresentam um perfil de expressão gênica significativamente diferente em relação aos ovários inativos, com muitos genes envolvidos na regulação da reprodução e do desenvolvimento ovariano expressos de forma mais intensa. Também foram identificados genes envolvidos na regulação da resposta imune e na comunicação entre as abelhas. Os efeitos da ativação ovariana em operárias de *Apis mellifera* quando expostas a estresse abiótico e biótico foram igualmente observados por Kennedy *et al* (2014). Neste trabalho, Kennedy e colaboradores revelaram que as operárias reprodutivamente ativas apresentaram maior resistência ao estresse abiótico e biótico do que as abelhas inativas. Além disso, foi observado que a ativação reprodutiva resultou em mudanças significativas na expressão de genes envolvidos na regulação do sistema imunológico e na resposta ao estresse.

Thompson e colaboradores (2006 e 2008) compararam os perfis de expressão gênica de operárias comuns e operárias anarquistas para entender as diferenças no desenvolvimento reprodutivo destas operárias, considerando as diferenças relacionadas à idade e ao ambiente em que estas abelhas se encontravam. Por fim, Aumer e colaboradores (2018) visaram compreender as mudanças de expressão gênica que ocorrem no desenvolvimento do parasitismo social em abelhas, comparando operárias comuns e pseudo rainhas da espécie *A. m. capensis*, identificando existem mudanças significativas na expressão de genes relacionados ao comportamento, à reprodução e à sinalização química nas abelhas pseudo rainhas.

A consulta por estes trabalhos foi feita, de forma não sistemática, a partir de análise e seleção de artigos científicos encontrados por meio do uso da ferramenta *Google Scholar*. As palavras-chave utilizadas nas buscas foram combinações dos seguintes termos: “*gene expression*”, “*pseudo queens*”, “*Apis mellifera capensis*”, “*anarchist workers*”, “*reproductive workers*”, “*genome wide*”, “*microarray*”, “*transcriptome*”, “*RNA-Seq*”. Foram considerados artigos originais escritos em língua inglesa que contivessem dados comparativos de expressão

gênica de operárias comuns e dados de operárias poedeiras em tecidos primordiais para que pudesse ser elaborada a comparação.

Em alguns casos, os identificadores do conjunto de genes encontrados nos artigos estavam em formatos atribuídos por base de dados já descontinuadas, fazendo com que tivessem que ser padronizados para que pudessem ser comparados entre si. O padrão escolhido foi o *Gene ID*, empregado pelo *GenBank* do NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*), pois o mesmo ainda é constantemente atualizado e disponibiliza um formato de identificadores aceitos por outros softwares de análise. A conversão foi feita utilizando dados presentes em uma tabela (Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/biostudies/files/A-MEXP-755/A-MEXP-755.adf.txt>). Para os identificadores que não constavam neste conjunto de dados, a conversão foi feita por busca direta no *GenBank* e, como último recurso, usando um *script* bioinformático que tinha o intuito de recuperar identificadores mais antigos.

As análises de ontologia foram feitas usando o software online *g:Profiler* (Disponível em: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Em um primeiro momento, os identificadores dos genes das abelhas da espécie *A. mellifera*, já convertidos, foram traduzidos para os identificadores da espécie *Drosophila melanogaster*, usando a ferramenta *g:Orth* presente no *software*, uma vez que para este organismo existe uma quantidade maior de dados documentados. Posteriormente, estes identificadores obtidos foram utilizados para efetuar a análise de enriquecimento funcional, através da ferramenta *g:GOSt*.

Por fim, os Diagramas de Venn foram construídos utilizando o software online *Venny 2.1* (Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARTE I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS FATORES ASSOCIADOS À MAIOR LONGEVIDADE DAS RAINHAS QUANDO COMPARADAS COM OPERÁRIAS

4.1.1 Espécies reativas de oxigênio: mecanismos utilizados para driblar os processos degenerativos e sua relação com a longevidade de abelhas.

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) possuem um papel central nos processos degenerativos das funções celulares relacionadas ao envelhecimento. Elas ocasionam o que chamamos de estresse oxidativo, o qual pode causar

danos cumulativos e severos no material genético, nos lipídios e nas proteínas (CROSS *et al.*, 1987). As ROS são geradas por processos metabólicos nas células, incluindo a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, em que os elétrons podem “escapar” e reagir com o oxigênio molecular (HAMANAKA e CHANDEL, 2010). Elas também podem ser geradas em resposta a estresses ambientais, como radiação UV, poluentes e substâncias químicas tóxicas (JAGER, COCKRELL e DU PLESSIS, 2022). A exposição crônica a esses estressores ambientais pode levar a um aumento da produção de ROS e à diminuição da capacidade das células em neutralizá-las, contribuindo para o estresse oxidativo e o envelhecimento celular.

Entretanto, é sabido que os mecanismos de ação das ROS podem variar, não se resumindo apenas à geração de danos celulares, sendo assim, são consideradas *Janus-faced molecule* ou moléculas de face *Janus*, pois podem, dependendo de sua concentração, apresentar uma finalidade benéfica para o indivíduo, além da tóxica já mencionada (SCHIEBER E CHANDEL, 2014).

Um dos principais mecanismos utilizados pelas células capazes de reduzir estes efeitos destrutivos das ROS consiste no emprego de enzimas antioxidantes, sendo as superóxido dismutases mitocondrial e citoplasmática (respectivamente, *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD) e *Copper-Zinc Superoxide Dismutase* (CuZnSOD)), as principais delas. Tais ferramentas conseguem acelerar a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é menos reativo e pode ser posteriormente convertido em água e oxigênio por outras enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione peroxidase (LEI *et al.*, 2016).

A face tóxica das ROS foi bem relacionada com a senescência pela teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, proposta por Harman (1956) e intitulada “*Free-radical theory of aging*”. Esta teoria propõe que o acúmulo de dano oxidativo proveniente da atividade metabólica celular é a principal causa do envelhecimento e, conseqüentemente, da determinação da longevidade máxima de um indivíduo (SOHAL e WEINDRUCH, 1996; BECKMAN e AMES, 1998). Tal teoria pode ser sustentada por dois caminhos moleculares: (i) os organismos, cuja expectativa de vida excede a média, têm a expressão de genes antioxidantes aumentada, ou (ii) há mudanças na regulação de genes mitocondriais ocasionando uma menor geração de ROS (CORONA, *et al.*, 2005).

Considerando esses dois possíveis cenários, Corona e seus colaboradores (2005) fizeram uma análise dos níveis transcricionais em rainhas e operárias de *A. mellifera* na fase

adulta. Os seguintes genes codificadores de enzimas com atividade antioxidante foram utilizados no estudo:

- *superoxide dismutase 1 (Sod 1)*,
- *superoxide dismutase 2 (Sod 2)*,
- *catalase (Cat)*,
- *thioredoxin peroxidase 3 (Tpx-3)*,
- *glutathione peroxidase-like 1 (Gtpx-1)*,
- *thioredoxin reductase 1 (Trxr-1)*,
- *methionine sulphoxide reductase A (MsrA)*,
- *glutathione S-transferase D1 (Gst-1)*.

Bem como os seguintes genes que codificam proteínas mitocondriais envolvidas no processo de respiração celular:

- *translation initiation factor 2 (IF-2mt)*,
- *ubiquinone biosynthesis protein COQ7 (Clk-1)*,
- *cytochrome b (CytB)*,
- *cytochrome c (CytC)*,
- *cyclooxygenase I (Cox-I)*

Concluiu-se que a longevidade das rainhas não está relacionada à elevada expressão dos genes antioxidantes analisados. Na verdade, constatou-se que as rainhas possivelmente produzem menos ROS do que as operárias em virtude de um aumento da eficácia respiratória (CORONA, *et al.*, 2005). Logo, isso sugere que elas não dependem necessariamente de uma alta expressão de genes antioxidantes, o que está de acordo com o que foi observado por pesquisadores em larvas de rainhas e operárias: os níveis transcricionais de genes antioxidantes em indivíduos pertencentes à casta real reduzem com o decorrer do tempo, ao passo que aumenta em indivíduos pertencentes a casta operária (SANTOS *et al.*, 2020).

Outros fatores relacionados com outras macromoléculas também podem proporcionar um baixo nível de dano oxidativo. Os ácidos graxos poli-insaturados são mais susceptíveis aos danos gerados pela ação das ROS do que os monoinsaturados e saturados, uma vez que a sensibilidade à oxidação aumenta de maneira exponencial conforme o número de ligações duplas por molécula de ácido graxo (BIELSKI, ARUDI e SUTHERLAND, 1983). Logo, um baixo grau de insaturação de ácidos graxos nas membranas celulares e mitocondriais,

possivelmente é algo vantajoso, pois diminuiria a sensibilidade à peroxidação lipídica das membranas e protegeria outras moléculas contra danos derivados da lipoxidação (PAMPLONA *et al.*, 2002). Portanto, a variação na composição dos ácidos graxos das membranas de rainhas e operárias pode estar associado a diferença de longevidade observada entre essas castas em *A. mellifera* (PAMPLONA *et al.*, 2002).

As rainhas, jovens ou não, apresentam uma maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados e uma menor proporção de ácidos graxos poli-insaturados em comparação às operárias. Vale salientar que na casta das operárias também existe uma diferença na composição de ácidos graxos quando se contrapõem as abelhas recém-emergidas com abelhas mais velhas. Tal constituição em operárias recém-emergidas se mostra intermediária entre a verificada em rainhas e a verificada em operárias mais velhas no quesito insaturação. Ou seja, em rainhas (e operárias recém emergidas), as membranas se mostram mais resistentes à peroxidação do que em operárias mais velhas. Larvas de operárias, por sua vez, possuem uma composição de membranas bastante similar a das operárias recém-emergidas (HADDAD, KELBERT e HULBERT, 2007).

Estes fatos reforçam a ideia de que o aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados em operárias mais velhas (forrageiras) deve-se ao acúmulo destes a partir da dieta à base de néctar, fonte exclusiva a partir da qual abelhas conseguem obter lipídios (ROULSTON e CANE, 2000) ao longo da vida das operárias (ROCHA, 2013), pois ácidos graxos poli-insaturados só são obtidos por meio da alimentação (MARTIN, 2006). Dessa forma, a alimentação da rainha a base de geleia real, que possui uma composição lipídica relativamente baixa (3 a 15% de massa seca) (SAMMATARO e AVITABILE, 1998), contribui para a resistência das membranas da rainha à peroxidação durante toda sua vida.

4.1.2 Vitelogenina

A vitelogenina é uma proteína sintetizada no corpo gorduroso das abelhas (localizado no abdômen, na cabeça e no tórax, sendo que no primeiro há maior quantidade de células gordurosas) (SNODGRASS, 1956). É liberada na hemolinfa e absorvida pelo ovócito no decorrer da vitelogênese, ao ser utilizada como fonte de nutrientes durante o desenvolvimento embrionário. Esse processo é importante para a reprodução em muitos animais, especialmente em artrópodes e aves (WALLACE, 1985). No entanto, outras funções podem ser atribuídas à vitelogenina, como o potencial de atuar como um antioxidante (DAY *et al.*, 1999; AMDAM *et al.*, 2003).

Foi verificado que a vitelogenina tem seus níveis relacionados com a idade do indivíduo, de modo que rainhas de idade mais avançada demonstram ter maior expressão do gene *vitellogenin* (*vg*) do que suas semelhantes mais jovens e do que operárias (CORONA *et al.*, 2007). Ainda, acredita-se que esse maior nível de vitelogenina circulante é um dos fatores responsáveis por tornar as rainhas mais resistentes ao estresse oxidativo do que as operárias (DAY *et al.*, 1999; AMDAM *et al.*, 2003). Operárias, por sua vez, apresentam um padrão oposto, possuindo níveis altos de vitelogenina durante as primeiras 2 a 3 semanas da vida adulta ao realizar tarefas na colmeia e baixo nas forrageiras (HARTFELDER e ENGELS, 1998).

A produção de vitelogenina está intrinsecamente relacionada com dieta das abelhas, conexão explicada pela sua interação com o hormônio juvenil e o sistema insulina-receptor de insulina (IIS) (CORONA *et al.*, 2007).

Como observado na Figura 3, a alimentação mais rica das rainhas, resulta em menores níveis de peptídeos semelhantes à insulina (AmILP-1, na Figura 3 indicada como “ILP”) e, conseqüentemente, de seus receptores (AmInR-1 e AmInR-2, na Figura 3 indicados como “InR”), levando a baixos níveis de hormônio juvenil e conseqüentemente elevados níveis de vitelogenina. De modo contrário, uma dieta menos rica, cenário observado em operárias quando comparadas com rainhas, resulta no aumento dos níveis de AmILP-1 e, conseqüentemente, de seus receptores AmInR-1 e AmInR-2, fazendo com que os títulos de hormônio juvenil aumentem e os níveis de vitelogenina reduzam na hemolinfa (CORONA *et al.*, 2007) (Figura 3).

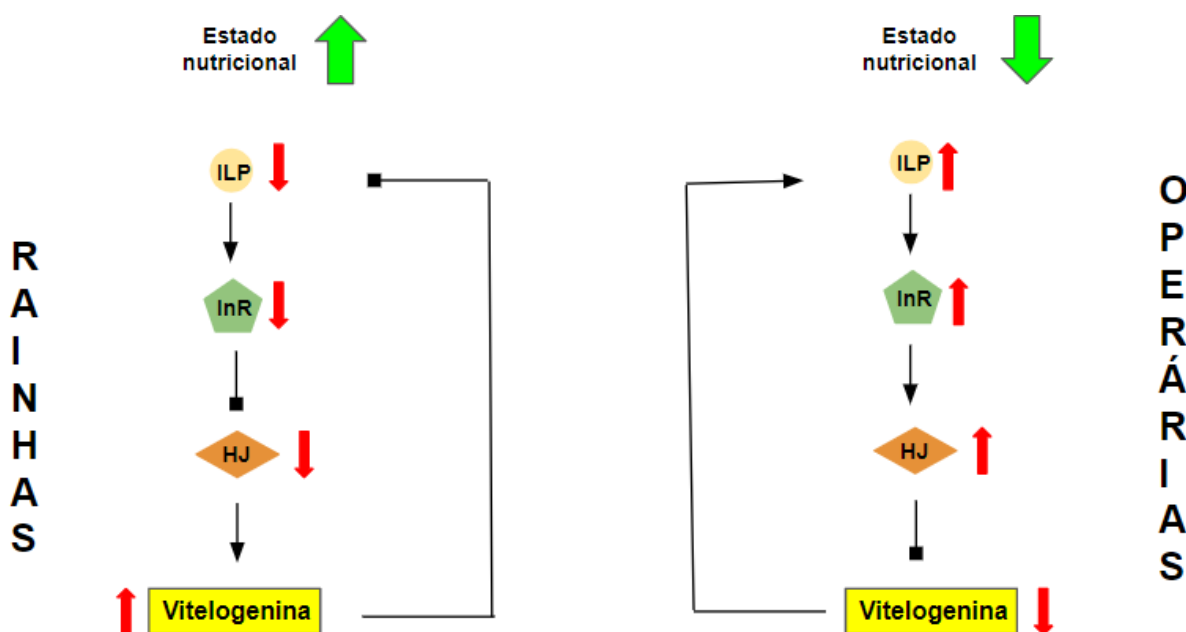


Figura 3. Mecanismo regulador dos níveis de vitelogenina na hemolinfa, tendo como estímulo a dieta das abelhas da espécie *A. mellifera*. À esquerda tem-se o cenário observado em rainhas em que um “elevado estado nutricional” resulta em menores níveis de peptídeos semelhantes à insulina que, por sua vez, via cascatas de fosforilações, diminuem a produção de hormônio juvenil (HJ), levando ao aumento de vitelogenina. À direita, tem-se o cenário observado em operárias, no qual o “baixo estado nutricional” das mesmas, resulta em menores níveis de vitelogenina circulantes. Fonte: Releitura da imagem proposta pelo trabalho de Corona *et al.*, 2007.

Para algumas espécies de insetos, o hormônio juvenil age inibindo a expressão de *vg*, suprimindo a síntese de mRNA nas células do corpo gorduroso (HIREMATH e JONES, 1992). Em outros casos, a diminuição dos níveis de vitelogenina na hemolinfa tratadas com hormônio juvenil pode estar relacionada à sua transferência para ovócitos em crescimento (HORA *et al.*, 2001), uma vez que este hormônio é capaz de ativar canais iônicos nas células foliculares ovarianas, aumentando o espaço intercelular e facilitando a vitelogenina a atingir a superfície dos ovócitos (RONNAU *et al.*, 2015).

Sabendo que o estado nutricional desempenha um papel fundamental na vitelogênese dos insetos, também observa-se a produção da vitelogenina sendo influenciada pelos níveis de colesterol do indivíduo. Como as abelhas melíferas não podem sintetizar o colesterol, este é obtido a partir do pólen, no caso das operárias; e a partir da geleia real, no caso das rainhas (CLARK e BLOCK, 1959). Esta relação é explorada pela via colesterol-20-hidroxiecdisona-vitelogenina.

A via colesterol-20-hidroxiecdisona-vitelogenina, conforme exibido na Figura 4, mostra que a transcrição do gene *vg* é regulada pela transcrição de genes como o *e75* (*ecdysone-induced protein e75*), o *e74* (*ecdysteroid-regulated gene e74*) e o *br-c*

(*broad-complex*) (YANG *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2002). Além de estar relacionada com o fator transcricional do gene *vg*, conhecido como complexo receptor nuclear de ecdisona (EcR)/ultraspiracle(USP)/20-hidroxicdisona(20E) (PAUL *et al.*, 2005), o qual atua como um receptor de 20E (HILL *et al.*, 2013; MELLO *et al.*, 2014), sendo este um ecdisteroide ativo e sintetizado pelo citocromo Cyp314A1 a partir de ecdisona. Já a ecdisona é sintetizada na via de biossíntese de ecdisteroides a partir do colesterol cujos níveis estão intrinsecamente relacionados com o estado nutricional do organismo (PETRYK *et al.*, 2003 ; YAMAZAKI *et al.*, 2011).

Cheng-Yen Lu (2018) relatou em seu trabalho a prevalência de elevados níveis de 20E e de RNAs mensageiros do citocromo Cyp314A1: a *isoforma A do receptor de ecdisona (EcR-A)*, o receptor de ecdisona isoforma B1 (*EcR-B1*), *usp (ultraspiracle)*, *e74*, *e75*, *br-c*, *vg* e *vgr (vitellogenin receptor)* em rainhas mais velhas em comparação com operárias velhas. Foi mostrado que os níveis de 20E e, conseqüentemente, o “estado nutricional” das abelhas, podem estar potencialmente envolvidos na longevidade das rainhas por influenciarem diretamente a produção de vitelogenina por esta via também (LU *et al.*, 2018). Além disso, é provável que esta diferença nos níveis de 20E e, indiretamente nos níveis de ecdisona, entre rainhas e operárias adultas, se deva, dentre outros fatores, à produção de geleia real por nutridoras, pois a 20E apresenta-se como uma repressora da expressão das principais proteínas da geleia real (MRJPs, do inglês *major royal jelly proteins*) (WINKLER, SIEG e BUTTSTEDT, 2018).

Ainda relacionado à produção de vitelogenina, pelo menos parcialmente, temos o gene *kr-h1 (Krüppel homolog1)* que atua inibindo diretamente a transcrição do gene *br-c* (KAYUKAWA *et al.*, 2016). Em *Drosophila*, a expressão do gene *kr-h1* está diretamente relacionada com os títulos de hormônio juvenil, de modo que a depleção deste hormônio pode diminuir a expressão de tal gene, ao passo que o aumento tem o efeito inverso (MINAKUCHI, ZHOU e RIDDIFORD, 2008). Portanto, baixos níveis de hormônio juvenil, inibem a expressão de *kr-h1* e, conseqüentemente, não interferem na expressão de *vg*. Este cenário é possível, por exemplo, em rainhas de *A. mellifera*, por possuírem baixos títulos de hormônio juvenil.

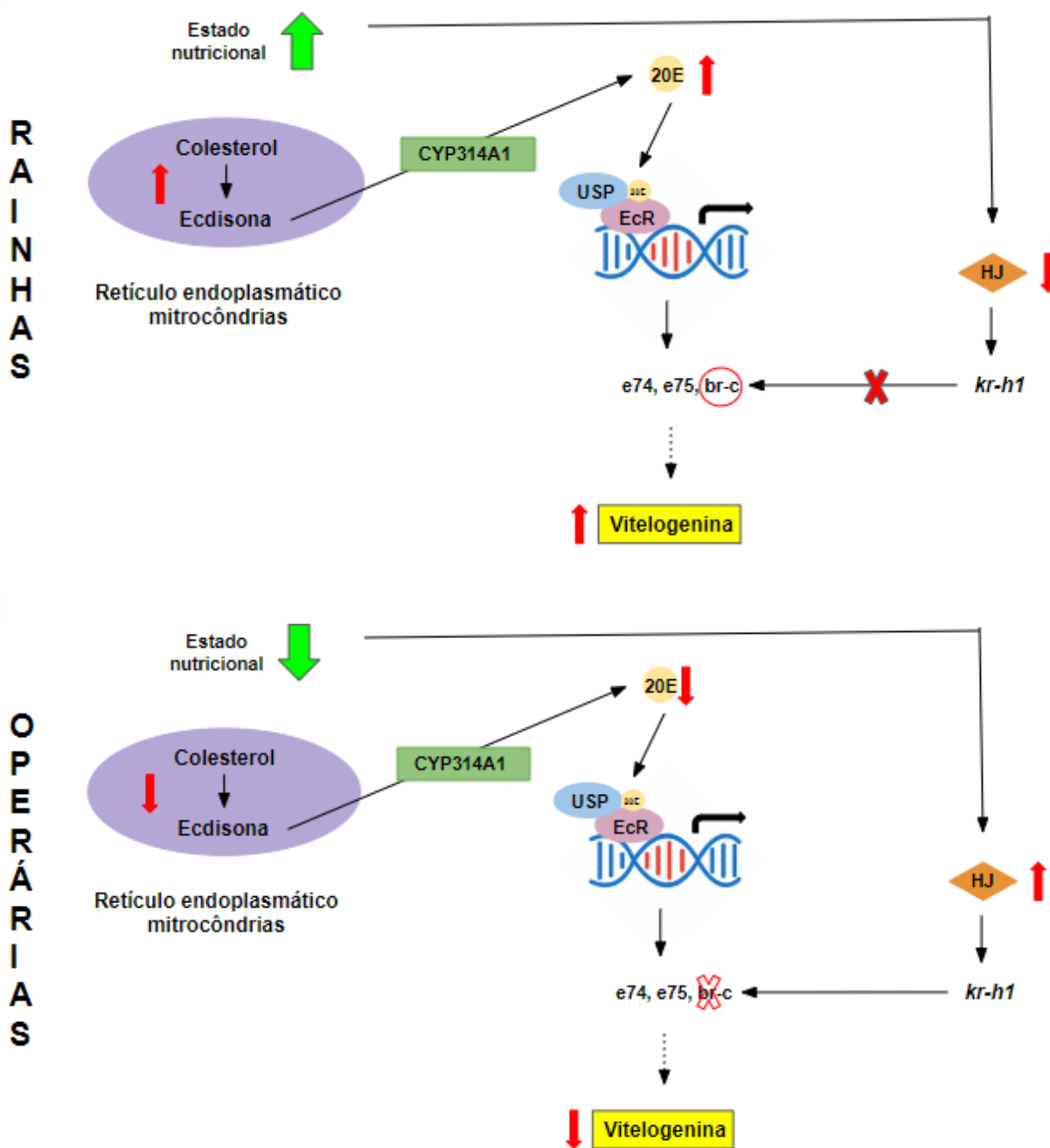


Figura 4. Via colesterol-20-hidroxiecdisona-vitelogenina. O colesterol é convertido em ecdisteroides por meio de um processo de várias etapas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias das células foliculares. A ecdisona é secretada na hemolinfa e convertida pela enzima CYP314A1 do citocromo P450 em sua forma ativa de 20E nos tecidos periféricos. Uma vez liberado na hemolinfa, o 20E se liga ao complexo receptor heterodimérico de EcR e USP. O 20E ligado ao receptor ativa a transcrição dos genes iniciais, *bcr*, *e74* e *e75*. Estas proteínas estão envolvidas na regulação transcricional de genes como *vg* no corpo gorduroso. *Kr-h1*, por sua vez, atua inibindo diretamente a transcrição do gene de sinalização *Broad-Complex (br-C)* Fonte: Imagens adaptadas de WU *et al.*, 2021.

4.1.3 Microbiota e Longevidade

O trato digestivo das abelhas é uma estrutura composta de microrganismos associados que podem estabelecer diferentes níveis de interação com o seu hospedeiro. Esse complexo ecossistema recebe o nome de microbiota intestinal e é responsável por desempenhar uma variedade de funções metabólicas (BORUM, 2021). Além disso, pode ter funções anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (PASCALE *et al.*, 2018) e participar da regulação de diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos por meio da produção de metabólitos e outras substâncias (AGUS, PLANCHAIS e SOKOL, 2018). Portanto, é válido admitir que a longevidade de um organismo pode estar associada à existência de uma homeostase entre a microbiota intestinal e o seu hospedeiro (FAN, GAUR e YANG, 2018).

A composição das microbiotas do trato digestivo varia substancialmente entre os organismos e até mesmo dentro da mesma espécie. Esta alta disparidade pode estar relacionada com a porção do intestino observada, com o valor de pH, com a quantidade de oxigênio, com a disponibilidade de nutrientes e a composição de moléculas antioxidantes (QIN *et al.*, 2010; KIM e BENAYOUN, 2020).

As bactérias que compõem o trato digestivo das abelhas são anaeróbias, sendo assim, é justificável que sua transmissão entre indivíduos ocorra por meio de interações sociais entre os hospedeiros, pois não necessariamente se encontram no ambiente (ALBERONI *et al.*, 2016). Essas interações podem ser por trofalaxia, comportamento em que há troca de alimentos e/ou fluidos entre membros de uma colônia social de insetos (WHEELER, 1918), e por contato das abelhas entre si (MARTINSON, MOY e MORAN, 2012). Outra forma de transmissão se dá pelo contato direto das operárias com bactérias intestinais presentes na excreção de larvas (BLEAU *et al.*, 2020). Vale ressaltar que as interações entre a microbiota e o meio ambiente são bastante complexas e podem ser influenciadas por diversas condições como a dieta, o habitat e o estágio de vida (JONES *et al.*, 2017).

Como citado, dentre as inúmeras funções desempenhadas pela microbiota intestinal que podem afetar a saúde de seu hospedeiro está a modulação das respostas imunológicas deste (KWONG, MANCENIDO e MORAN, 2017). Esta modulação pode gerar dano oxidativo, desencadear processos inflamatórios e até mesmo alterar a expressão imunológica (RAYMANN e MORAN, 2018). Logo, é possível estabelecer uma relação entre a composição da microbiota das abelhas e o envelhecimento biológico destas. No entanto, a microbiota em

rainhas apresenta uma composição que a torna mais “refinada” do que a encontrada em operárias (ANDERSON *et al.*, 2018), conforme será discutido a seguir.

Kwong e colaboradores (2017) mostraram que o aumento do dano oxidativo provoca queda da população de bactérias gram-positivas nas operárias (KWONG *et al.*, 2017). Sendo assim, vemos que seu envelhecimento leva a uma redução de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e a aumento de *Proteobacterias* (BUFORD, 2017), grupo que inclui muitas bactérias patogênicas (MATHESON, 1993). Por outro lado, o oposto se sucede com a microbiota intestinal de rainhas em idade avançada, em que há um acúmulo de bactérias tipicamente consideradas probióticas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e uma diminuição das *Proteobacterias*. Isso se deve a menor expressão de genes com atividade antioxidantes e a maior geração de espécies reativas de oxigênio em operárias quando comparadas com rainhas (CORONA *et al.*, 2005; KELLER e JEMIELITY, 2006). Vale ressaltar que em virtude do intestino ser um ambiente predominantemente anaeróbico em rainhas envelhecidas, ou seja, não depender de oxigênio e apresentar um metabolismo fermentativo contínuo, ele propicia a produção de ácido butírico (butirato). Tal produto é considerado extremamente importante para a fisiologia e homeostase do indivíduo, tal qual ocorre em humanos (ZHENG *et al.*, 2017; RIVIÈRE *et al.*, 2016). Em *A. mellifera*, o butirato regula positivamente os genes envolvidos nas vias anti-patógenos e de desintoxicação, fortalecendo a resposta imunológica das abelhas às infecções virais, por exemplo (HU *et al.*, 2017).

Além disso, mais de 95% das bactérias observadas no trato intestinal da rainha são *Parasaccharibacter apium* e *Lactobacillus kunkeei* (ANDERSON *et al.*, 2018). Ambas se mostram relacionadas com a diminuição do excesso de doenças específicas em abelhas causadas por bactérias e microsporídios (grupo de parasitos intracelulares que infectam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo abelhas, sendo um dos mais conhecidos o *Nosema ceranae*) (CORBY-HARRIS *et al.*, 2016; ALBERONI *et al.*, 2016). É válido mencionar que rainhas mais velhas apresentam maior quantidade de *P. apium* nas peças bucais e *L. kunkeei* no intestino, as quais podem aumentar com a idade e conseqüentemente favorecer sua sobrevivência (ANDERSON *et al.*, 2018).

A composição da microbiota de um indivíduo pode ser influenciada por múltiplos fatores, dentre eles a alimentação (QIN *et al.*, 2010; KIM e BENAYOUN, 2020). Uma dieta de geleia real proporciona proteção ao intestino das rainhas contra o estresse oxidativo. Além disso, essa alimentação especial pode selecionar cepas específicas de microrganismos que

compõem a microbiota, favorecendo, por exemplo, o desenvolvimento de *P. apium* por essa fonte constante e rica de nutrientes em detrimento das demais bactérias que poderiam tentar se desenvolver.

4.1.4 Imunossenescência

A imunossenescência consiste em um processo complexo e multifatorial de envelhecimento do sistema imunológico em qualquer etapa do desenvolvimento da resposta imune (EWERS, RIZZO e KALIL, 2008). Geralmente é acompanhado por uma diminuição da resposta imunológica e aumento da fragilidade do organismo quando exposto a patógenos (SOLANA e PAWELEC, 1998).

Olhando particularmente para os insetos, constata-se que estes possuem uma imunidade exclusivamente inata com mecanismos imunológicos, celulares e humorais — que identificam e eliminam corpos estranhos e patógenos. Ao falar sobre a imunidade mediada por células tem-se o envolvimento dos hemócitos, que conseguem reconhecer e eliminar corpos estranhos presentes na hemolinfa por fagocitose, nodulação ou encapsulação. Já na imunidade humoral, temos a síntese, no corpo gorduroso, de peptídeos antimicrobianos, em resposta à alguma infecção (KLOWDEN, 2002). Além disso, no caso específico das abelhas melíferas e outros insetos sociais, existem estratégias comportamentais, como o grooming, comportamento de limpeza no qual os indivíduos se limpam mutuamente (CURRIE e STUART, 2001), para combater patógenos (EVANS *et al.*, 2006).

Em *A. mellifera*, há uma correlação entre os níveis de vitelogenina na hemolinfa e o número de hemócitos, uma vez que a vitelogenina atua como a principal transportadora de zinco para as células de defesa (AMDAM *et al.*, 2004b). É possível que a geleia real também exerça essa mesma função, uma vez que contém uma quantidade substancial de zinco, que possui diversos papéis regulatórios e catalíticos no sistema imunológico (MOCCHEGIANI, MUZZIOLI e GIACCONI, 2000).

A vitelogenina também atua como opsonina, tornando os patógenos mais suscetíveis à fagocitose pelos hemócitos. Isso ocorre porque os fragmentos desta proteína se ligam às moléculas de superfície dos patógenos, como os lipopolissacarídeos, ativando as células hemocíticas para a eliminação dos invasores (LI, ZHANG e LIU, 2008). Vale ressaltar que a quantidade de hemócitos funcionais circulantes reflete a capacidade do organismo em desenvolver uma “resposta imune” adequada (DOUMS *et al.*, 2002). A diminuição dos níveis

de vitelogenina em abelhas forrageiras, (PINTO, BITONDI e SIMÕES, 2000), resulta na redução do teor de zinco na hemolinfa. Isso pode levar à picnose dos hemócitos, que se define como a degradação do núcleo das células, como observado em culturas (AMDAM et al., 2004b). Como consequência, do ponto de vista evolutivo, a redução da resposta imunológica devido à menor quantidade de hemócitos pode ser considerada uma estratégia da colônia para economizar energia, uma vez que essa casta já apresenta uma alta taxa de mortalidade devido aos seus hábitos externos à colmeia (NEUKIRCH, 1982).

Em suma, conclui-se que existe uma ligação entre os níveis de vitelogenina, os níveis de zinco, a ocorrência de picnose em hemócitos e, conseqüentemente, a função imunológica em operárias (AMDAM *et al.*, 2004a). Dito isso, é possível supor que a variação de vitelogenina existente entre rainhas (níveis mais elevados de vitelogenina) e operárias (níveis de vitelogenina mais baixos) (CORONA *et al.*, 2007), também favorece a existência de um sistema imune mais eficiente em rainhas.

Entretanto, algumas evidências apontam que existe outro mecanismo imunológico utilizado para compensar a perda de hemócitos, denominado sistema profenol-fenoxidase (ROLFF, 2001). Tal sistema acompanha os recursos da imunidade celular dos insetos por meio do processo de melanização, catalisada pela fenoxidase (PO) (SÖDERHALL e CERENIUS, 1998).

A melanização é um processo biológico importante catalisado pela fenoxidase e que resulta na formação de melaninas. Estas proteínas possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e podem iniciar a cicatrização de feridas após uma lesão, agindo rapidamente para formar uma barreira sólida contra a infecção, sendo assim, ajudam a proteger o organismo contra patógenos e estresse oxidativo. Tal processo começa quando um agente patogênico ou outra substância estranha entra no corpo de um organismo. A partir desse momento, as células imunes reconhecem a substância estranha e começam a secretar proteínas chamadas proPOs (proenzimas da fenoxidase), convertidas em PO ativa em resposta ao estímulo. Essa enzima, uma vez ativada, catalisa a oxidação de compostos fenólicos em quinonas, compostos estes altamente reativos que podem se unir a proteínas e outras moléculas para formar melaninas (CERENIUS e SÖDERHALL, 2004; ELEFThERIANOS e REVENIS, 2010).

A atividade do sistema PO aumenta com a idade em operárias e rainhas. Entretanto, as rainhas mais velhas apresentaram tais níveis de atividade muito mais elevados do que aqueles registrados para operárias. Além disso, em rainhas, a atividade desse sistema não atinge uma fase de platô na primeira semana de vida adulta, mas sim, aumenta continuamente com a idade, ao contrário do que foi visto com as operárias nas quais o platô é atingido 4 dias após emergir. Isso pode sugerir uma possível associação com a maior longevidade observada em rainhas quando comparada com operárias (SCHMID *et al.*, 2008).

Outro possível fator de contribuição com a imunidade de *A. mellifera* são os *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs), pequenos RNAs não codificadores normalmente derivados de elementos transponíveis (ou transposons) (BIRYUKOVA e YE, 2015). Os elementos transponíveis, são fragmentos de DNAs que conseguem mudar de posição dentro de um genoma. (BOURQUE *et al.*, 2018). Eles são capazes de atuar na defesa imunológica dos insetos, pois também podem ser produzidos a partir de elementos virais endógenos (EVEs) as quais são sequências de DNA ou RNA de origem viral que se integraram no genoma de um organismo hospedeiro em algum momento de sua evolução. Os EVEs têm ações semelhantes às efetuadas pelo sistema piRNA/PIWI de silenciamento de transposons ativos contra transcritos virais durante a infecção (TER HORST *et al.*, 2019).

Ter uma movimentação desregulada de excisões e inserções de fragmentos de DNA no genoma de um indivíduo pode significar um risco para sua integridade genética (WERREN, 2011), pois pode acarretar a inativação de genes essenciais ou mudanças drásticas da proteína codificada. Isso gera graves consequências ao organismo, fazendo com que os elementos transponíveis tornem-se uma das prováveis causas do envelhecimento (MURRAY, 1990). Assim, a fim de contribuir com a manutenção da estabilidade genômica, mecanismos moleculares que impedem a atividade dos transposons/retrotransposons, envolvendo proteínas PIWI e os piRNAs, são utilizados (THOMSON e LIN, 2009).

A espécie *A. mellifera*, apesar de ser uma das espécies que possui uma das menores constituições de elementos transponíveis, totalizando cerca de 3% do seu genoma (ELSIK *et al.*, 2014), ainda possui um sistema piRNA/PIWI de silenciamento de transposons ativos (YOKOI, KIMURA e BONO, 2022; WANG *et al.*, 2017). Tal sistema mostra ter uma expressão diferencial, sendo mais ativo nas rainhas do que nas operárias. Isso decorre, dentre outros fatores, da necessidade de uma maior preservação da linhagem germinativa que será propagada à prole (WANG *et al.*, 2017). Entretanto, não se pode deixar de considerar a

hipótese de que essa maior proteção do genoma das rainhas frente ao das operárias comuns, juntamente com o mecanismo extra de imunidade antiviral, estejam associados a maior longevidade das rainhas.

4.1.5 Telomerase

Os telômeros consistem em regiões localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, cuja composição mais comumente encontrada é de sequências de DNA repetidas em tandem e não codificantes, sendo (TTTAGG) n a sequência em vertebrados ou (TTAGG) n na maioria dos insetos (FRYDRYCHOVA *et al.*, 2004).

Juntamente com suas proteínas e demais estruturas associadas, os telômeros têm a função de preservar a integridade cromossômica, protegendo-a da maquinaria de reparo e replicação do DNA e de exonucleases (BLASCO, 2005; VERDUN e KARLSEDER, 2007), uma vez que, as DNA polimerases operam por um mecanismo que não consegue replicar completamente as extremidades dos cromossomos, o que levaria à perda progressiva do DNA terminal a cada ciclo de replicação culminando na senescência celular ou em apoptose (NOBELFÖRSAMLINGEN, 2009).

A telomerase é a enzima responsável pela adição das sequências repetidas mencionadas (GREIDER e BLACKBURN, 1985). Ela é composta por duas subunidades: a transcriptase reversa da telomerase (TERT) e o componente de RNA (TERC). A primeira estrutura é encarregada da catálise do DNA, a segunda é utilizada como molde para a síntese do DNA telomérico (FLORES, BENETTI e BLASCO, 2006).

Uma vasta quantidade de trabalhos associando o desgaste dos telômeros e o declínio da atividade da telomerase com a regulação do envelhecimento e expectativa de humana acumulou-se na literatura. Estes trabalhos mostram que o esgotamento dos telômeros pode ser o responsável por originar uma série de doenças, incluídas as doenças cardiovasculares, câncer, imunossupressão e outras condições relacionadas (SHAWI e AUTEXIER, 2008). Tal qual ocorre em humanos, na espécie *A. mellifera* também existe um decaimento na atividade da telomerase, a qual é regulada de maneira específica conforme a casta a qual o indivíduo pertence (KORANDOVA e FRYDRYCHOVA, 2016). Sendo assim, isso pode também ser um fator associado à diferença de longevidade entre rainhas e operárias.

No trabalho de Korandova e Frydrychova (2016) foi descrito que em rainhas, tanto em fase larval quanto na fase adulta, os níveis de atividade da telomerase são elevados quando comparados com operárias. Essa variação na atividade das telomerasas também pode ser observada numa mesma casta conforme a sazonalidade, ou seja, estação do ano em que as larvas das abelhas eclodem. No caso das operárias de inverno, as quais sabe-se que possuem uma expectativa de vida maior, a atividade da telomerase nos corpos gordurosos, encontrados em maiores quantidades nesta classificação de abelhas, apresenta um aumento em seu desempenho. Operárias de inverno possuem uma maior quantidade de tecido gorduroso, pois as células especializadas que o compõe são responsáveis por armazenar energia (ARRESE e SOULAGES, 2010), que se fará necessária para a sobrevivência destas operárias durante os meses frios de inverno, quando as fontes de alimento são escassas ou inexistentes (JOHNSON, 2010).

Nas operárias de verão, em que se tem uma expectativa de vida reduzida e menores quantidades de corpos gordurosos, vemos uma diminuição da atividade da telomerase. Vale destacar que, tal qual ocorre com a funcionalidade da telomerase, também existe um aumento e redução da replicação do DNA, respectivamente, no inverno e na primavera, no corpo gorduroso dos diferentes tipos de operárias. (KOUBOVÁ *et al.*, 2021).

4.1.6 Geleia real, suas propriedades e efeitos sobre a longevidade

A geleia real (RJ, do inglês *royal jelly*) é um fluido com coloração amarela esbranquiçada secretado pelas glândulas hipofaríngeas (hpg) (responsável pela produção do contingente proteico) e mandibulares (mbg) (responsável pela produção do contingente lipídico) de nutridoras.

A constituição da geleia real pode variar segundo a época de sua produção, da espécie de abelha observada e do local onde a colmeia está estabelecida (RAMADAN e AL-GHAMDI, 2012). De maneira geral, é composta por água (60–70%), açúcares (10–16%) (KOLAYLI *et al.*, 2016), lipídios (3–6%), vitaminas, sais e aminoácidos livres. Há também um alto teor de proteínas (12–15%), dentre as quais se destacam MJRPs, pertencentes a uma família de 9 proteínas (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5, MRJP6, MRJP7, MRJP8 e MRJP9) presentes não apenas no gênero *Apis* (FRATINI *et al.*, 2016).

Voltando um olhar particular para as MJRPs produzidas por *A. mellifera*, vemos que a expressão destas se mostram presente em todas as castas e partes do corpo (BUTTSTEDT,

MORITZ e ERLER, 2013), embora apenas 7 delas (MRJP1-7) estejam presentes na geleia real, enquanto as demais (MRJP8-9), são detectadas no veneno (PEIREN *et al.*, 2008). Dada essa considerável diversidade de tecidos e tipos de organismos em que ocorrem as MRJP, é plausível admitir que estas são polifuncionais, possuindo, em alguns casos, atividades que corroboram, inclusive, para a promoção da longevidade.

A MRJP1, por exemplo, também conhecida como royalactina, já foi considerada sendo a responsável exclusiva pela diferenciação fenotípica de castas por atuar sobre o Egfr (receptor do fator de crescimento epidérmico) em abelhas e induzir sua diferenciação em rainha (KAMAKURA, 2011), fato este refutado anos depois (BUTTSTEDT, IHLING e PIETZSCH, 2016). Entretanto, como mostra Ramanathan (2018), ainda pode-se atribuir a ela funcionalidades antioxidantes e antitumorais. Por sua vez, a MRJP3 promove características associadas à otimização do sistema imune devido suas propriedades antialérgicas e anti-inflamatórias (RAMANATHAN, NAIR e SUGUNAN, 2018). Além disso, dentre os peptídeos secretados pelas nutridoras estão a Royalisin e a Jelleines, que atuam fornecendo uma proteção de amplo espectro contra infecções microbianas (FONTANA *et al.*, 2004), também culminando no fortalecimento imunológico.

No que diz respeito às vitaminas, a geleia real também apresenta uma grande atividade antioxidante que deriva de componentes como o ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (BURTON e TRABER, 1990) e vitamina A (FREI, 1994). Além disso, o ácido pantotênico (vitamina B5), vitamina mais abundante neste alimento, é tido como um agente de prolongamento da vida útil em *Drosophila* (GARDNER, 1948). Outro importante composto com propriedades antioxidantes são os compostos fenólicos, como os flavonoides, que conseguem neutralizar os radicais livres e reduzir o estresse oxidativo no organismo (CROFT, 1998; AREIAS *et al.*, 2001; SARIC *et al.*, 2009).

Além dessa variedade de nutrientes, incluindo vitaminas, minerais e proteínas, a geleia real apresenta uma diversidade de ácidos graxos, sendo o 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) mais proeminente (KOCOT *et al.*, 2018). Esta molécula contribui com a diferenciação de castas em abelhas *A. mellifera* pela da inibição das histonas desacetilases, enzimas responsáveis pela quebra dos resíduos de ϵ -acetil-lisina das histonas (POL SINELLI e YU, 2018). Além disso, esse componente também apresenta um forte efeito bactericida (SEDIVA *et al.*, 2018).

Já como fonte de RNA exógenos, principalmente miRNAs, a geleia real demonstra que existe um fluxo horizontal de RNA biologicamente ativo entre as abelhas (o qual é absorvido pelo sistema digestivo e espalhado sistemicamente através da hemolinfa) sendo mediado diferencialmente pela ingestão e secreção de dietas de operárias e de geleia real (MAORI *et al.*, 2019).

Os miRNAs compõem a maioria dos RNAs não codificantes (que inclui os já mencionados piRNAs e os siRNA), possuem de 19 a 24 nucleotídeos de comprimento e apresentam como função dogmática a repressão dos RNAs mensageiros (LEE, FEINBAUM e AMBROS, 1993; LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001), fazendo com que se tornem capazes de atuar na regulação gênica pós-transcricional, nos mecanismos de apoptose e de diferenciação celular, além de trabalharem como tradutores das respostas ao estresse ambiental (VIENBERG *et al.*, 2016). Isso mostra que é razoável acreditar que a presença, seja por produção endógena ou por consumo, de miRNAs específicos em um organismo podem se correlacionar com as diferenças na expectativa de vida. Diversos trabalhos têm evidenciado essa relação, principalmente aqueles que usam os organismos *C. elegans* e *Drosophila* como modelos (SMITH-VIKOS e SLACK, 2012).

Um estudo recente evidenciou que existem 69 miRNAs presentes na geleia real produzida pela espécie *A. mellifera*. Estes mostraram-se capazes de regular positivamente 179 genes, ao passo que 439 foram regulados negativamente, sendo tais genes relacionados a algumas vias como a da insulina (SHI *et al.*, 2012), conhecidamente responsável por estar relacionada a processos de envelhecimento (GARG e COHEN, 2014).

Garg e Cohen (2014) exploraram a modulação e/ou regulação da via da insulina pelos miRNAs específicos, miR-8 e miR-34 (presentes na geleia real) mostrando ser provável que eles atuem equilibrando as atividades dessas vias e estejam envolvidos no envelhecimento. O miR-8, em *Drosophila*, regula negativamente a sinalização de IIS no corpo gorduroso larval (HYUN *et al.*, 2009) e, como já mencionado, a baixa atividade de IIS aumenta a vida útil. O miR-34 regula eventos relacionados com a idade e integridade cerebral de longo prazo em *Drosophila*, apresentando uma correspondência molecular entre envelhecimento e neurodegeneração (LIU *et al.* 2012). Ao miR-let-7 e ao miR-125, também são atribuídas à extensão do tempo de vida em *Drosophila* (CHAWLA *et al.*, 2016). Entretanto, um ponto importante a se considerar é que um miRNA não necessariamente irá possuir um homólogo em outra espécie, sendo assim, é válido considerar esta hipótese antes de assumir que um

RNA não codificante associado com a longevidade em organismos distintos também possui esta associação em *A. mellifera*. Dito isso e sabendo que estes miRNAs estão presentes na geleia real, é razoável inferir que esta também está associada com a maior longevidade de rainhas por meio destes mecanismos, desde que, as mudanças nos níveis de miRNA presentes nos tecidos após absorção intestinal, sejam funcionalmente significativas. Logo, cabem maiores análises a respeito.

É possível assumir, talvez sem grandes surpresas, a geleia real como o denominador comum responsável por influenciar eventos capazes de proporcionar essa pronunciada plasticidade no envelhecimento entre as castas da espécie *A. mellifera*, pois a mesma mostra-se envolvida com processos oxidativos, produção de vitelogenina circulante, composição da microbiota intestinal, imunossenescência, composição lipídica das membranas, epigenética, atividade da telomerase e até mesmo proporcionando efeitos fisiológicos diretos, inerentes ao seu consumo. Entretanto, para ser possível transformar a geleia real, de uma vez por todas, no que poderia ser considerado um elixir da longa vida das abelhas, tal qual, segundo a mitologia, o criado por Nicolas Flamel para o ser humano, seria necessário que o seu consumo fosse uma condição única da casta real, o que sabe-se que não ocorre (CRAILSHEIM, 1991).

Seguindo esse princípio de tentar identificar a exceção para encontrar pontos passíveis de comparação que estejam associados a diferença de expectativa de vida entre indivíduos da espécie *A. mellifera*, depara-se com o coeficiente da reprodução. Este coeficiente se mostra um bom recorte, pois operárias poedeiras possuem maior expectativa de vida quando comparadas com operárias comuns, tal qual ocorre com as rainhas. Ou seja, se for possível identificar mudanças de expressão gênica nessas operárias poedeiras quando comparadas com operárias comuns, talvez ter-se-á apontamentos de possíveis genes que, quando expressos diferencialmente, possam estar associados com a maior expectativa de vida destas operárias poedeiras frente as operárias não poedeiras.

4.2 PARTE II: EXPRESSÃO GÊNICA EM OPERÁRIAS POEDEIRAS VERSUS NÃO POEDEIRAS COM POTENCIAL ASSOCIAÇÃO ÀS DIFERENÇAS DE LONGEVIDADE DESTES FENÓTIPOS

Tendo conhecimento do que foi encontrado na literatura sobre aspectos associados com a maior expectativa de vida de rainhas da espécie *A. mellifera* frente a expectativa de

vida dos diversos fenótipos de operárias, fez-se uma busca com os genes relacionados a estes aspectos, nas listas retiradas dos artigos relacionados na Tabela 1. Estas listas, como explicado, continham os genes diferencialmente expressos em operárias órfãs poedeiras (daqui em diante chamadas apenas de operárias órfãs), pseudo rainhas e anarquistas comparados com os genes diferencialmente expressos de operárias comuns. Buscou-se identificar se a expressão diferencial destes genes se mostrava presente nos fenótipos reprodutores e se seguiam o perfil observado em rainhas, ou seja, se um gene *up* ou *down regulado* em rainhas, quando comparado com operárias comuns, também se mostrava *up* ou *down regulado* em operárias poedeiras, quando comparado com operárias comuns.

Identificou-se que o gene *Sod 2* que codifica a enzima MnSod é mais expresso no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs, com 25 dias de idade, quando comparada sua expressão no mesmo tecido de operárias comuns de mesma idade. Entretanto, quando confrontamos a expressão desse gene no ovário de operárias órfãs, com 14 dias de idade, com a expressão em operárias comuns de mesma idade, notamos que ele é *down regulado*. Isso indica que, talvez, ou essa enzima seja significativamente mais expressa no corpo gorduroso de operárias órfãs do que no ovário, ou que haja um aumento dessa expressão com o decorrer da idade. Esse fato reforçaria o que já foi dito acima: pode haver uma compensação do aumento da produção de ROS (que conhecidamente se dá com o envelhecimento dos indivíduos da casta operárias) com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes para “suprir” uma ausência de um mecanismo que aumente a eficácia respiratória.

A expressão diferencial de genes relacionados com atividade antioxidante também foi identificada nos dados obtidos a partir da literatura e utilizados para esta análise. No abdômen (sem ovário) de operárias órfãs, com 25 dias temos os genes da *Cat*, *MsrA* e *Gst-I* diferencialmente expressos; já nos ovários de operárias órfãs com 14 dias temos também o gene da *Cat*, de *Sod 1*, de *Gtpx-1* e também de *Gst-I* diferencialmente expressos. Entretanto, este perfil de expressão se mostrou o oposto do esperado, sendo menos expressos em operárias órfãs em comparação com as operárias comuns. Isto fez com que este grupo de genes fosse desconsiderado, pelo menos por enquanto, do radar de possíveis genes que estão associados com a maior longevidade das operárias poedeiras frente às não poedeiras. Além disso, genes envolvidos com a respiração celular: *IF2mt* e *Clk-1* no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias e *IF2mt* no ovário de operárias órfãs de 14 dias, se mostraram *up regulados* quando comparados com operárias comuns. Isso corrobora com o fato observado a

partir da análise anterior, mostrando que, possivelmente, não há um aumento da eficácia respiratória por parte das operárias órfãs, visto que tais genes estão envolvidos com o aumento da produção de ROS.

No caso de *vg*, nota-se que houve uma menor expressão desse gene no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e no ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade quando comparadas com operárias não poedeiras. Isso vai igualmente contra o intuitivo de que o gene responsável pela produção da vitelogenina estaria sendo mais expresso em membros operárias poedeiras que possuem maior longevidade. Entretanto, para operárias anarquistas de 16 dias, tivemos um aumento de expressão de *vg* no abdômen.

Vale lembrar que os níveis de vitelogenina circulante estão relacionados com os níveis de hormônio juvenil e, sendo este um importante componente associado com a longevidade das rainhas, também foi investigado se ele se apresenta como uma peça-chave da maior expectativa de vida de operárias poedeiras. Encontramos, dentre os genes relacionados com o metabolismo hormônio juvenil, que os genes *Juvenile Hormone Esterase (Jhe)* e o *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase*, responsáveis pela expressão de enzimas envolvidas na degradação de hormônio juvenil (MACKERT *et al.*, 2010), estão *down regulados* no abdômen de operárias órfãs de 25 dias de idade e no ovário de operárias órfãs de 14 dias de idade quando comparadas com operárias comuns nos mesmos tecidos e faixas etárias.

Estes dados sugerem uma provável maior concentração de hormônio juvenil nestas operárias órfãs e explicam a menor expressão de *vg* observada nestes indivíduos. Pode-se levantar a hipótese, portanto, que no caso das operárias órfãs, o sistema vitelogenina-hormônio juvenil, não é um fator associado à maior longevidade de operárias órfãs. Talvez isso ocorra, pois este fenótipo recebe uma dieta de geleia real, tal qual ocorre ao longo da vida adulta das rainhas.

Ainda analisando a atividade do hormônio juvenil, observa-se que o gene *Juvenile hormone acid O-methyltransferase (Jhamt)* se mostra mais expresso no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade do que em operárias não poedeiras. Este gene codifica a informação para a síntese de uma enzima responsável por produzir hormônio juvenil ativo na *Corpora allata* (NIWA *et al.*, 2008). Sendo assim, considerando as análises que não evidenciaram uma diferença na expressão de *vg*, supõem-se que talvez a vitelogenina não seja

um marcador de longevidade para a maioria destes fenótipos reprodutores analisados, fato sustentado pelas observações a seguir sobre a via colesterol-hidroxiecdisona-vitelogenina.

Quando se trata da via colesterol-hidroxiecdisona-vitelogenina e a sua associação com a maior expectativa de vida de operárias poedeiras quando comparada com operárias comuns, é possível observar que a mesma não tem atuação concreta. Isso, pois, dos componentes desta via que resultam na produção de vitelogenina, apenas o gene *e75* é expresso em maior quantidade no cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade. Para os demais genes, é observado que o *e75*, o *ecdysone receptor (ecr)* e o *ultraspiracle (usp)* são *down regulados* no abdômen de operárias órfãs de 25 dias de idade e no ovário de operárias órfãs de 14 dias de idade, o que indica e reforça que a vitelogenina não está associada com a maior longevidade deste fenótipo quando comparadas com operárias comuns.

No que diz respeito ao sistema operante de silenciamento de transposons para garantir a integridade genética, identificou-se uma maior expressão de *piwi-like protein Ago3* em ovários de operárias órfãs com 14 dias de idade quando comparadas com operárias comuns. Nestas operárias órfãs, observa-se que genes envolvidos com a ação da telomerase estão *up regulados* (*telomerase reverse transcriptase (tert)*, *telomerase-binding protein EST1A*, *telomerase Cajal body protein 1*), reforçando a presença de uma maquinaria de preservação da integridade cromossômica.

Por fim, nota-se uma menor expressão do gene *dnmt3* no ovário de operárias órfãs de 14 dias de idade quando comparada com operárias não poedeiras. Cardoso-Júnior e colaboradores (2018), investigaram uma possível ligação entre uma maior expectativa de vida em operárias e a metilação do DNA. Encontrou-se que a redução dos níveis de metilação do DNA global de um grupo de operárias tratadas com um inibidor de metilação, quando comparadas com o grupo controle em que não havia tratamento, fez com que as operárias com níveis de DNMT reduzidos apresentassem uma vida útil significativamente aumentada (CARDOSO-JÚNIOR, GUIDUGLI-LAZZARINI e HARTFELDER, 2018).

Para pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade, essa busca por genes expressos diferencialmente demonstrou que o sistema (profenol-)fenoxidase, envolvido com a resposta imunológica das abelhas, se mostra mais atuante visto que o gene *phenoxidase-activating factor 2* que compõe esta via é mais expresso no corpo gorduroso

destas em comparação como as operárias comuns. Um ponto de atenção é que nenhum outro gene da busca realizada utilizando os genes diferencialmente expressos em rainhas e que estão associados a maior longevidade destas foi encontrado diferencialmente expresso em pseudo rainhas quando comparados com operárias comuns, levando a duas suspeitas: ou o corpo gorduroso não possui o conjunto gênico diferencialmente expresso associado a maior expectativa de vida, ou novamente a idade em que as pseudo rainhas foram observadas pode não ser a ideal para identificar os genes da busca. Na Tabela 2 tem-se o resumo dos genes expressos diferencialmente encontrados a partir desta busca ativa realizada nas listas, nos diferentes fenótipos de operárias poedeiras quando comparados com operárias comuns.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos nos diferentes fenótipos de operárias poedeiras. Genes diferencialmente expressos nos diferentes fenótipos de operárias poedeiras quando comparados com operárias comuns. As setas apontando para cima indicam que o gene é *up regulado*, enquanto as setas apontando para baixo indicam que o gene é *down regulado*. Fonte: elaboração própria.

Fenótipo	Tecido	Gene	Expressão do gene
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>Sod 2</i>	↑
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>Cat, MsrA e Gst-1</i>	↓
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>IF2mt, Clk-1</i>	↑
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>vg</i>	↓
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>Jhe, Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase</i>	↓
Operária órfã (25 dias de idade)	Abdômen sem ovário	<i>e75, ecr, usp</i>	↓

Fenótipo	Tecido	Gene	Expressão do gene
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>Sod 2</i>	↓
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>Cat, Sod 1, Gtpx-1, Gst-1</i>	↓
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>IF2mt</i>	↑
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>vg</i>	↓
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>Jhe, Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase</i>	↓
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>e75, ecr, usp</i>	↓
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>piwi-like protein Ago3</i>	↑
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>tert, telomerase-binding protein EST1A, telomerase Cajal body protein 1</i>	↑
Operária órfã (14 dias de idade)	Ovário	<i>dnmt3</i>	↓
Operária órfã (10 dias de idade)	Cérebro	<i>e75</i>	↑

Fenótipo	Tecido	Gene	Expressão do gene
Pseudo rainhas (7 a 8 dias de idade)	Corpo gorduroso	<i>Jhamt</i>	↑
Pseudo rainhas (7 a 8 dias de idade)	Corpo gorduroso	<i>phenoloxidase-activating factor 2</i>	↑

A fim de se tentar elencar potenciais genes marcadores de envelhecimento que fossem um denominador comum em um mesmo fenótipo e entre todos os fenótipos analisados, foi utilizado o Diagrama de Venn. A princípio, foi produzido um cruzamento das listas dos genes mais expressos (quando comparados com operárias não poadeiras) em todos os tecidos do fenótipo das operárias órfãs: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. A análise foi feita especificamente com este grupo, pois ele era o único que apresentava o maior e mais completo conjunto de dados.

Na Figura 5 tem-se o diagrama para o conjunto de genes em comum **mais expressos** em operárias órfãs quando comparado com operárias comuns, seguida pela Tabela 3, listando tais genes identificados.

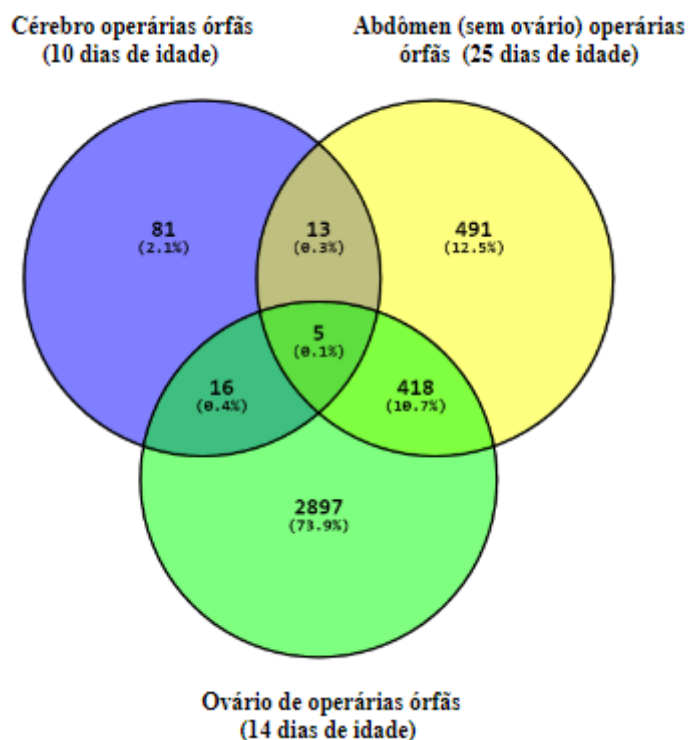


Figura 5. Diagrama de Venn com o conjunto de genes em comum mais expressos em operárias órfãs. Conjuntos de genes em comum mais expressos entre os seguintes tecidos analisados: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. Fonte: Ferramenta Venny 2.1.0. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Acesso no período de 06/2022 a 01/2023).

Os genes em comum **mais expressos** em todos os tecidos analisados: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade, estão descritos na tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3. Genes em comum *up regulados* no cérebro, no abdômen (sem ovário) e nos ovários de operárias órfãs. Relação de genes em comum mais expressos entre os seguintes tecidos: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos genes
409465	No RefSeq Information
411083	<i>sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha</i>
411150	<i>chromatin assembly factor 1 subunit A</i>
725378	<i>nucleolar GTP-binding protein 2</i>
No RefSeq Information	-

Do conjunto dos genes em comum mais expressos em todos os tecidos de operárias órfãs visto acima, é possível notar que a essa expressão diferencial deles, quando comparadas com operárias comuns, provavelmente não está associado a maior expectativa de vida deste fenótipo reprodutor, visto que se tratam de genes que expressam proteínas que participam da manutenção de gradientes eletroquímicos nas células (LIU *et al.*, 2013), montagem de tetrameros de histonas durante a replicação do material genético (HOEK e STILLMAN, 2003) e da maturação dos ribossomos (JENSEN *et al.*, 2003), ou seja, é observado o aumento da expressão de genes relacionados com processos de proliferação celular.

Um diagrama (Figura 6) também foi elaborado para os genes **menos expressos** em operárias órfãs (quando comparados com operárias não poedeiras) em todos os tecidos disponíveis para este fenótipo: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade.

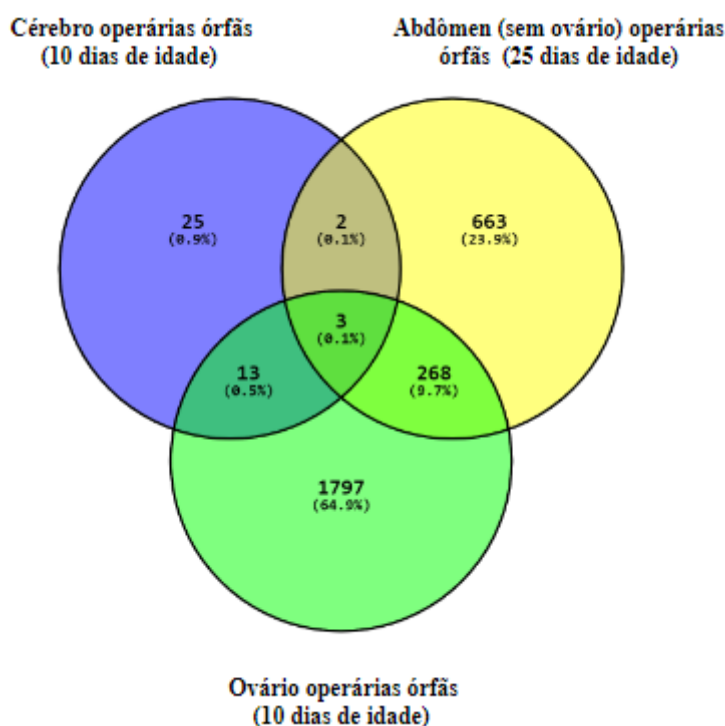


Figura 6. Diagrama de Venn com o conjunto de genes em comum menos expressos em operárias órfãs. Conjuntos de genes em comum menos expressos entre os seguintes tecidos: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. Fonte: Ferramenta Venny 2.1.0. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Acesso no período de 06/2022 a 01/2023).

Os genes em comum **menos expressos** em todos os tecidos analisados: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de

idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade estão descritos na tabela a seguir (Tabela 4).

Tabela 4. Genes em comum *down regulados* no cérebro, no abdômen (sem ovário) e nos ovários de operárias órfãs. Relação de genes em comum menos expressos entre os seguintes tecidos: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos genes
409360	<i>fatty acid hydroxylase domain-containing protein 2</i>
412795	<i>cadherin-99C</i>
551648	<i>hexamerin 110</i>

Dos genes em comum menos expressos em todos os tecidos em comparação com operárias comuns, a *hexamerina 110* segue o mesmo perfil observado no corpo gorduroso de rainhas adultas. Entretanto, quando se trata dos ovários, existe uma alta expressão de *hexamerina 110* em rainhas, fato não observado em operárias órfãs. Isso nos mostra que nessas operárias esse gene provavelmente não possui um papel ligado à atividade ovariana e à reprodução, sendo o que ocorre com as rainhas. Vale ressaltar que esta diferença de expressão também se dá entre rainhas virgens e acasaladas que põe ovos, sendo maior a expressão no segundo caso (MARTINS, NUNES e CRISTINO, 2010).

A *cadherin-99C*, por sua vez, está envolvida com a adesão celular no intestino e com a formação de endossomos (LEE e LEE, 2018), os quais estão intimamente envolvidos com a atividade da via de dupla oxidase (*Duox*). Tal recurso é um componente crítico da resposta imune inata dos insetos e funciona para impedir infecções e manter a regulação homeostática da microbiota intestinal (LEE *et al.*, 2015). Estando este gene mais expresso em operárias comuns, pode-se pensar que se encontrou uma possível contradição, pois esta via poderia estar associada a maior longevidade das operárias órfãs quando comparadas com operárias comuns. No entanto, uma possível justificativa para isso pode ser a maior exposição destas operárias comuns a antígenos com os quais elas têm contato ao realizar atividades fora da colmeia.

Para um olhar mais global, almejando revelar novos genes que estivessem associados a maior expectativa de vida das abelhas poedeiras e que diferissem dos genes já encontrados

na literatura para rainhas e analisados parcialmente pela busca realizada acima, foi produzido um diagrama empregando todos os conjuntos de dados de genes *up regulados* dos diferentes fenótipos (operárias órfãs e pseudo rainhas) e seus diferentes tecidos (cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen de operárias órfãs com 25 dias de idade, ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade e corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade (Figura 7).

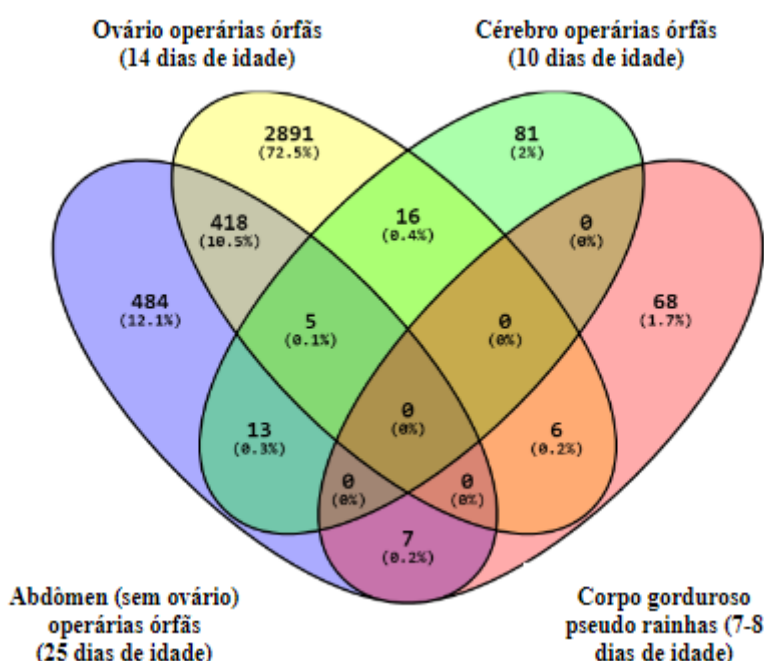


Figura 7. Genes *up regulados* no corpo gorduroso de pseudo rainhas e no cérebro, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs. Genes mais expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade e genes mais expressos no cérebro, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs com 10, 14 e 25 dias de idade respectivamente. Fonte: Ferramenta Venny 2.1.0. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Acesso no período de 06/2022 a 01/2023).

Esta análise foi feita pois ambos os fenótipos possuem maior longevidade quando comparados com operárias comuns. Logo, se pseudo rainhas e operárias órfãs possuem genes expressos diferencialmente em comum quando comparados com essas operárias não poedeiras, esses genes poderiam estar associados à maior expectativa de vida destas operárias poedeiras.

Nesse momento, foram deixados de fora os dados das operárias anarquistas dada a ausência de informações acerca da expectativa de vida desta casta, bem como o pequeno

conjunto de genes diferencialmente expressos que se foi possível reunir a partir da literatura, o que poderia limitar e enviesar os resultados.

Foram elencados os genes encontrados em comum entre as pseudo rainhas e as operárias órfãs nos diferentes tecidos para poder compreender se existem genes em comum que se associem a maior expectativa de vida. Na Tabela 5 têm-se os genes em comum mais expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade e no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 15 dias de idade quando comparados com operárias comuns.

Tabela 5. Genes em comum *up* regulados no corpo gorduroso das pseudo rainhas e no abdômen (sem ovário) das operárias órfãs. Genes em comum mais expressos no corpo gorduroso das pseudo rainhas e no abdômen (sem ovário) das operárias órfãs de 14 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos genes
406105	<i>Esterase A2</i>
411223	<i>Esterase FE4</i>
411894	<i>Dynein beta chain, ciliary</i>
413185	<i>Spondin-1</i>
551268	<i>Pancreatic triacylglycerol lipase</i>
726935	<i>Cardioacceleratory peptide receptor</i>
107965279	<i>Pancreatic lipase-related protein 2</i>

Na Tabela 6, têm-se os genes em comum mais expressos no corpo gorduroso das pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idades e no ovário das operárias órfãs com 14 dias de idade, quando comparados com operárias comuns.

Tabela 6. Genes em comum *up* regulados no corpo gorduroso das pseudo rainhas e no ovário das operárias órfãs. Genes em comum mais expressos no corpo gorduroso das pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade e no ovário das operárias órfãs de 14 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos genes
410639	<i>alpha-methyl dopa hypersensitive protein</i>
551094	<i>fatty-acid amide hydrolase 2-B</i>
551626	<i>probable cytochrome P450 6a17</i>
100577521	<i>uncharacterized LOC100577521</i>
100577541	<i>uncharacterized LOC100577541</i>
100578253	<i>Golgi integral membrane protein 4</i>

Dos genes listados nas tabelas acima (Tabela 5 e 6), comparando pseudo rainhas e operárias órfãs, podemos atribuir à *esterase A2*, *esterase FE4* e *dynein beta chain, ciliary*, papéis que, de certa forma, podem ser relevantes para o contexto da longevidade. A *esterase A2* demonstrou ser uma possível candidata a uma esterase específica de degradação do hormônio juvenil em larvas de *A. mellifera* (SANTOS, 2004). Se tal fato se estender para o indivíduo adulto, poderia ser uma forma de compensar a produção deste hormônio que aumenta com o avanço da idade em operárias comuns. Além disso, um trabalho voltado especificamente para análise da *esterase FE4* em *Apis cerana* mostrou que ela pode estar envolvida na resposta de resistência oxidativa durante o estresse adverso (MA, 2018). A *dynein beta chain* por sua vez, apresenta envolvimento com um fenótipo de resistência à infestação pelo ácaro *Varroa destructor*, suprimindo o crescimento da população deste ectoparasita e ajudando a combater esta ameaça biológica grave que é um risco extrínseco para a longevidade das abelhas (BROECKX, 2019).

Posteriormente, foi novamente examinada a exceção para tentar explicar a variação de expectativa de vida, visto que, apesar destes dois fenótipos de operárias poedeiras possuírem uma maior longevidade do que operárias comuns, as pseudo rainhas vivem mais do que as operárias órfãs. Para isso, dada a quantidade de genes mais expressos exclusivamente no corpo gorduroso das pseudo rainhas, realizou-se um estudo de *Gene Ontology* (GO). Tal estudo corresponde a uma análise bioinformática que utiliza a anotação de termos de *Gene Ontology* para agrupar os genes de interesse em categorias funcionais que fornecem informações sobre processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Neste trabalho, foram selecionados os oito primeiros termos identificados pelo software online, os quais fornecem informações a respeito da função molecular dos genes analisados (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de Gene Ontology dos genes *up* regulados expressos exclusivamente em pseudo rainhas. GO dos genes mais expressos exclusivamente no corpo gorduroso das pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade quando confrontados com os genes mais expressos em operárias órfãs. Foram selecionados os oito primeiros termos com maior Padj. O Padj é usado para avaliar a significância estatística das associações entre os genes e os termos do GO Fonte: Imagem adaptada de g:Profiler. Disponível em: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost> (Acesso no período de 06/2022 a 01/2023).

TERMO	GO ID	Padj
ecdysteroid 22-kinase activity	<u>GO:0106389</u>	7.279×10^{-22}
17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (NADP+) activity	<u>GO:0072582</u>	3.469×10^{-16}

TERMO	GO ID	Padj
17-beta-ketosteroid reductase activity	<u>GO:0072555</u>	3.469×10 ⁻¹⁶
3-keto sterol reductase activity	<u>GO:0000253</u>	3.108×10 ⁻¹⁵
cycloeucalenone reductase activity	<u>GO:0102176</u>	1.219×10 ⁻¹¹
estradiol 17-beta-dehydrogenase activity	<u>GO:0004303</u>	1.449×10 ⁻¹¹
steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	<u>GO:0033764</u>	2.492×10 ⁻¹¹
steroid dehydrogenase activity	<u>GO:0016229</u>	6.646×10 ⁻¹¹

O primeiro aspecto biológico observado (*ecdysteroid 22-kinase*) é uma função molecular que participa do processo de fosforilação de ecdisteroides sintetizados “de novo” nos ovários de muitas espécies de insetos, tornando estes hormônios fisiologicamente inativos. Num segundo momento, estes compostos inativos armazenados (ésteres fosfóricos) são desfosforilados para participar da morfogênese em um estágio embrionário inicial (HOFFMANN e LANGUEUX, 1985). Ou seja, este processo observado exclusivamente em pseudo rainhas quando comparado com operárias órfãs está relacionado com seu estado reprodutivo.

A *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (NADP+)*, algumas vezes também denominada *3-keto-steroid reductase* (BREMER e MILLER, 2014), é uma enzima desidrogenase/redutase de cadeia curta (SDR, do inglês *short-chain dehydrogenase reductases*), que se mostra desempenhando um importante papel na regulação de hormônios esteroides, sendo essenciais na fisiologia hormonal, principalmente em mamíferos (MINDNICH, MÖLLER e ADAMSKI, 2004). Para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), atribuiu-se a elas um papel crucial na esteroidogênese gonadal (ZHOU *et al.*, 2005). Já nas bactérias *Comamonas testosteroni*, faz parte de uma maquinaria metabólica que permite o uso de esteroides como única fonte de carbono (TALALAY, DOBSON e TAPLEY, 1952).

Por sua vez, a *17-beta-ketosteroid reductase* está envolvida na oxirredução de ecdiesteroides, tal qual a maioria das outras enzimas presentes na Tabela 6 (*cycloeucalenone reductase activity*, *estradiol 17-beta-dehydrogenase activity*, *steroid dehydrogenase*). Mostrando assim que essas funções moleculares envolvidas com ecdiesteroides estão possivelmente relacionadas com o parasitismo social existente na espécie *A. m. capensis*, uma vez que este comportamento pode ser atribuído a múltiplos genes, incluindo os envolvidos na sinalização de ecdisteroides que podem fazer com que esta subespécie ative seus ovários (WALLBERG *et al.*, 2016). Estes ovários apresentam-se significativamente maiores, mais facilmente ativados e contêm mais ovariolos produtores de ovos do que em operárias de outras subespécies (HEPBURN e RADLOFF, 2022).

Baseados na literatura, poder-se-ia supor que tais enzimas não estão associadas a processos diretos e específicos que corroborem com a maior longevidade de pseudo rainhas em comparação às demais operárias com fenótipo reprodutor, já que para nenhuma destas enzimas foi encontrado um estudo demonstrando tal relação. Entretanto, dos fenótipos de operárias poedeiras, o das pseudo rainhas é o que demonstra a maior expectativa de vida, assim, não se mostra incongruente relacionar a maior proeminência de funções moleculares envolvidas com ecdiesteroides com expectativa de vida diferencial. Indicando que esse possa ser um possível caminho para identificar genes marcadores de longevidade em operárias de *A. m. capensis* em futuros estudos.

As mesmas análises foram conduzidas para o conjunto de genes menos expressos, ou seja, foi produzido um diagrama empregando todos os conjuntos de dados de genes *down regulados* dos diferentes fenótipos (operárias órfãs e pseudo rainhas) e seus diferentes tecidos: cérebro de operárias órfãs com 10 dias de idade, abdômen (sem ovário) de operárias órfãs com 25 dias de idade, ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade e corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade) (Figura 8), também deixando de lado as operárias anarquistas pelos mesmos motivos já explicados.

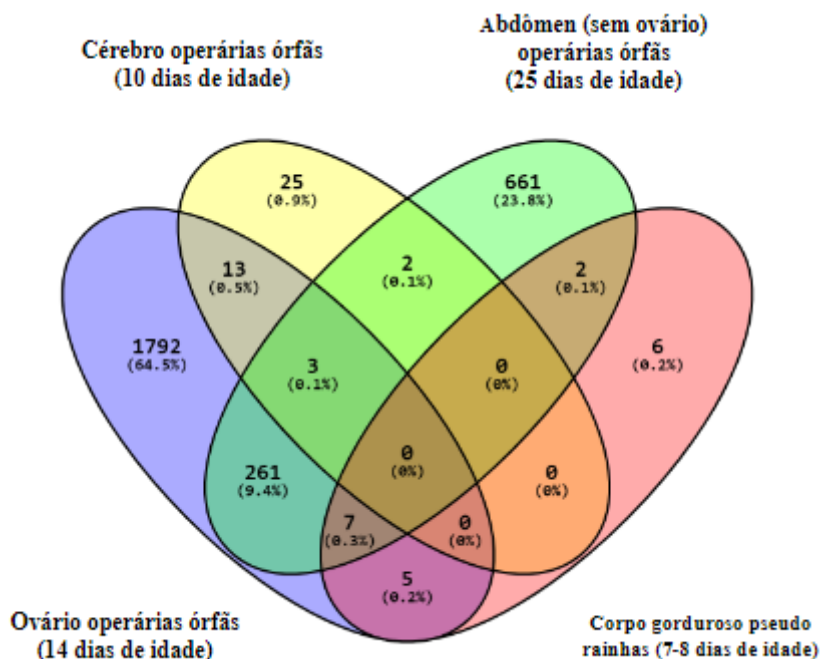


Figura 8. Genes em comum *down* regulados em pseudo rainhas e operárias órfãs. Genes menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade e genes menos expressos no cérebro, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs com 10, 14 e 25 dias de idade, respectivamente. Fonte: Ferramenta Venny 2.1.0. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

Igualmente foram listados os genes identificados em comum entre as pseudo rainhas e as operárias órfãs nos diferentes tecidos para poder compreender se existem genes em comum associados com a maior longevidade das pseudo rainhas quando comparadas com operárias órfãs. Na Tabela 8 observam-se os genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade e no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs de 25 dias de idade. Já na Tabela 9, têm-se os genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade, no abdômen (sem ovário) e no ovário de operárias órfãs com 25 e 14 dias de idade respectivamente. Por fim, na Tabela 10, vê-se os genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade e nos ovários de operárias órfãs de 14 dias de idade.

Tabela 8. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas e no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade e no abdômen (sem ovário) de operárias órfãs de 25 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Anotação
409847	<i>15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase</i> [NAD(+)] (15-pgdh)
724749	<i>uncharacterized LOC724749</i>

Tabela 9. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso pseudo rainhas de 7 a 8 dias de idade, abdômen (sem ovário) e ovário de operárias órfãs com 25 e 14 dias de idade, respectivamente. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos Genes
409801	<i>esterase E4</i>
410337	<i>venom dipeptidylpeptidase IV</i>
550965	<i>cytochrome P450 6a14</i>
724126	<i>uncharacterized LOC724126</i>
724838	<i>uncharacterized LOC724838</i>
726848	<i>hexamerin 70a</i>
100577142	<i>G-protein coupled receptor Mth</i>

Tabela 10. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas e no ovário de operárias órfãs. Genes em comum menos expressos no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade e ovário de operárias órfãs com 14 dias de idade. Fonte: Elaboração própria.

ID	Descrição dos genes
406090	<i>major royal jelly protein 1</i>
406140	<i>apidaecin 1</i>
409619	<i>putative aminopeptidase-2</i>
411978	<i>myrosinase 1</i>
100577614	<i>uncharacterized LOC100577614</i>

Em humanos o gene *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]* codifica uma enzima que pode ser considerada a principal responsável por inativar as prostaglandinas e lipoxinas (TAI *et al.*, 2006) que participam da mediação das respostas celulares a infecções bacterianas e estresse fisiológico (STANLEY-SAMUELSON, 1994; para mais informações consultar STANLEY e KIM, 2019). Sendo assim, sua baixa expressão em operárias com o fenótipo reprodutor pode significar uma baixa incidência de infecções bacterianas nesses organismos. O que também poderia ser o caso das apidaecinas que são uma família de polipeptídicos de insetos com atividade bactericida induzidas após uma infecção (CASTEELS *et al.*, 1989).

Tanto a *esterase E4* quanto *cytochrome P450 6a14* estão relacionados à resistência de operárias, no estágio larval, à infecção por *Varroa destructor* (JIANG *et al.*, 2016), sendo o

segundo gene mencionado também envolvido na resistência à infecção por *Ascosphaera apis* (NIE *et al.*, 2020). Portanto, aparentemente, nada é possível concluir sobre a maior longevidade das operárias poedeiras ao analisar especificamente tais genes. Entretanto, os citocromos P450 fazem parte do conjunto de enzimas responsáveis pela desintoxicação e metabolização de compostos estranhos (feromônios, hidrocarbonetos cuticulares, hormônios, fitoquímicos, inseticidas) com os quais as abelhas estão constantemente entrando em contato, seja através da alimentação, durante forrageamento ou até mesmo metabólitos de microrganismos que infectam a colônia (FEYEREISEN, 2005).

Substâncias encontradas no mel conseguem regular positivamente a produção do P450 (JOHNSON, 2012). Logo, notamos que este é mais um cenário no qual a diferença de expressão gênica observada entre operárias poedeiras e não poedeiras — tal qual ocorre com os genes *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]* e *apidaecin 1*, pode ser explicada, principalmente, a partir dos hábitos diferentes praticados pelos indivíduos observados. E o mesmo vale para o gene da *hexamerin 70a* que é *down regulado* em operárias que possuem o fenótipo reprodutor (o mesmo padrão existente em rainhas adultas (MARTINS, NUNES e CRISTINO, 2010)). A explicação para esse modelo se baseia na função de “estocagem” atribuída às hexamerinas (TELFER e KUNKEL, 1991).

Como sugere Martins e colaboradores (2010), no caso da rainha e possivelmente nas operárias poedeiras, os nutrientes obtidos da alimentação são direcionados para a produção de ovos e para a vitelogênese, ao passo que em operárias comuns a alimentação a base de pólen, quando mais jovens (HRASSNIGG e CRAILSHEIM, 1998), são usados para a síntese e armazenamento de hexamerinas (a *hexamerina 70a*, bem como a já mencionada *hexamerina 110*) e poderão ser consumidas futuramente quando estas abelhas adotarem o comportamento de forrageiras. Isso tudo aponta que nem os genes *hexamerin 70a*, *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]* e até mesmo os que codificam os citocromos P450, apesar de apresentarem padrões de expressão similares aos da rainha, têm relevância para uma maior longevidade.

Vale mencionar, no entanto, que Martins e colaboradores (2008) mostraram que os níveis de expressão de *hexamerin 70a* foram maiores no corpo adiposo de operárias com ovários ativos com 21 dias de idade do que naquelas com ovários inativos (MARTINS, NUNES e SIMÕES, 2008). Entretanto, as idades das operárias poedeiras, cujos dados obtidos

da literatura foram analisados, variam de 7 a 8 dias (corpo gorduroso de pseudo rainhas), 14 dias (ovário de operárias órfãs) até 25 dias (abdômen (sem ovário) de operárias órfãs), ou seja, apresentam uma faixa de variação grande. Em apenas um dos casos as operárias observadas nesta monografia tiveram idade e tecido que se assemelhavam aos parâmetros das operárias do estudo de Martins *et al.* (2008). Se isso fosse considerado, poder-se-ia entender que houve uma contradição das informações obtidas por meio das análises quando comparadas com as da literatura. Por fim, o gene da MRJP1 é mais expresso em operárias não poedeiras, seguindo o padrão já observado anteriormente (DOBRITZSCH *et al.*, 2019) para este fenótipo dessa casta.

Para os genes menos expressos exclusivamente no corpo gorduroso de pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade, também existia o intuito de realizar uma análise GO. Entretanto, por se tratar de uma quantidade pequena de genes expressos exclusivamente (Tabela 11), optou-se por explorá-los individualmente.

Tabela 11. Genes menos expressos exclusivamente no corpo gorduroso das pseudo rainhas. Genes menos expressos exclusivamente no corpo gorduroso das pseudo rainhas com 7 a 8 dias de idade quando confrontados com os genes menos expressos em operárias órfãs. Fonte: Elaboração própria.

Gene ID	Descrição dos Genes
408264	<i>netrin receptor UNC5C</i>
412858	<i>hemicentin-2</i>
552418	<i>cytochrome P450 6k1</i>
724187	<i>toll-like receptor 4</i>
724382	<i>cuticular protein analogous to peritrophins</i> 3-A
100578352	<i>ionotropic receptor 75a-like</i>

Os *netrin receptor UNC5C*, como o próprio nome sugere, são receptores de netrina, juntos eles fazem parte de uma família de proteínas responsáveis por direcionar a migração dos axônios e das células durante o desenvolvimento embrionário do indivíduo (MOORE, TESSIER-LAVIGNE e KENNEDY, 2007). Entretanto, estudos mostram que estas proteínas também são expressas no sistema nervoso de vertebrados adultos, estando envolvidas na plasticidade sináptica (GLASGOW, RUTHAZER e KENNEDY, 2021). Se o mesmo vale para invertebrados, poderíamos supor que a maior produção deste receptor em operárias comuns se daria devido às diferenças na maturação comportamental existentes entre estas operárias e as

pseudo rainhas. No entanto, essa expressão diferencial ocorre no corpo gorduroso dessas pseudo rainhas, tornando a informação um tanto confusa.

Já a hemicentina se mostra relacionada com a formação da matriz extracelular e exerce um papel importante no desenvolvimento e homeostase dos tecidos (FEITOSA *et al.*, 2012; VOGEL e HEDGECOCK, 2001). Um estudo elaborado por Huang (2009) e colaboradores com *Bombyx mori*, evidencia que esta proteína também pode apresentar uma função muito relevante em estágios iniciais durante infecções bacterianas neste organismo. Portanto, mais uma vez, as atividades de operárias comuns que colaboram com sua interação com mais patógenos pode estar associada a maior expressão de hemicentina constatada, fato este que vale também para o *ionotropic receptor 75a-like*. Este receptor faz parte de uma família de receptores quimiossensoriais cujas funções ainda não foram bem estabelecidas. No entanto, acredita-se que estejam relacionadas com a detecção de produtos químicos ambientais, incluindo odores e sabores (RYTZ, CROSET e BENTON, 2013), habilidades fundamentais para forrageiras, por exemplo.

O papel desintoxicante exercido pelos Citocromos P450 já foram aqui abordados igualmente às razões pelas quais os níveis de expressão desta proteína presumivelmente são mais elevados em operárias comuns. Mas vale mencionar que o *cytochrome P450 6k1* foi especificamente relacionado, em insetos, ao metabolismo de compostos secundários das plantas (HUANG, MA e QIN, 2017).

5 CONCLUSÃO

De uma forma geral, o principal ponto que divergiu daquilo que seria o esperado como elemento comum e principal marcador de longevidade das operárias poedeiras, dada a imensa quantidade de trabalhos falando sobre esse assunto em rainhas, foi a vitelogenina. Esta proteína se mostrou, pelo menos a princípio, como não responsável por retardar o envelhecimento desses organismos, pelo menos quando se trata de operárias órfãs e pseudo rainhas, uma vez que seu gene se mostrou mais expresso apenas em anarquistas.

No caso dos genes *down regulados* em operárias poedeiras e conseqüentemente *up regulados* em operárias comuns, em todas as situações debatidas durante o texto, nota-se uma maior expressão de genes relacionados à resistência a xenobióticos, o que faz sentido dadas as atividades que estas operárias não poedeiras são responsáveis por exercer.

Finalmente, quando se tratam dos genes expressos diferencial e especificamente em pseudo rainhas (quando comparadas com operárias órfãs), notam-se os principais genes mais expressos envolvidos em regulação dos hormônios ecdiesteroides, que podem estar conectados ao parasitismo social encontrado nas pseudo rainhas da espécie *A. m. capensis*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, A.; *et al.* **Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease.** *Cell Host & Microbe*, v. 23, p. 716–24. Junho, 2018.

ALBERONI, D. *et al.* **Beneficial Microorganisms for Honey Bees: Problems and Progresses.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 100, ed. 22, p. 9469-9482. Outubro, 2016.

ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell.** ed.5., Garland Science Taylor & Francis, 2008.

AMDAM, G. V. *et al.* **Altered physiology in worker honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) infested with the mite *Varroa destructor* (*Acari: Varroidae*): a factor in colony loss during overwintering?** *Journal of Economic Entomology*, p. 741–747. Junho, 2004a.

AMDAM, G. V. *et al.* **Hormonal Control of the Yolk Precursor Vitellogenin Regulates Immune Function and Longevity in Honeybees.** *Experimental Gerontology*, v. 39, p. 767–73. Maio, 2004.

AMDAM, G. V. *et al.* **Social Exploitation of Vitellogenin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, ed. 4, p. 1799–802. Fevereiro, 2003.

AMDAM, G. V. *et al.* **The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*).** *Experimental Gerontology*, v. 44, p. 467-471. Julho, 2009.

AMDAM, G. V. e STIG, W. O. **The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan.** *Journal of Theoretical Biology*, v. 216, ed. 2, p. 209–28. Maio, 2002.

ANDERSON, R. H. **The laying worker in the Cape honeybee, *A. mellifera capensis*.** *Journal of Apicultural Research*, v. 2, p. 85–92. Setembro, 1963.

ANDERSON, K. E. *et al.* **The queen's gut genes with age: longevity phenotypes in a social insect model.** *Microbiome*, v. 6, ed. 1, p. 108. Junho, 2018.

AREIAS, F. M. *et al.* **Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe(2+)-induced oxidative stress in cultured retinal cells.** *Biochemical Pharmacology*, v. 63, ed. 1, p. 11-118. Julho, 2001.

ARRESE, E. L. e SOULAGES, J. L. **Insect fat body: energy, metabolism, and regulation.** *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 207–225. Janeiro, 2010.

ASHBY, R. *et al.* **MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination.** *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-15. Janeiro, 2016.

AUMER, D. *et al.* **The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*A. mellifera*) workers' life.** *Ecology and Evolution*, v. 9, p. 8771-8782. Agosto, 2019.

AUMER, D. *et al.* **The transcriptomic changes associated with the development of social parasitism in the honeybee *Apis mellifera capensis*.** *The Science of Nature*, v. 105, p. 1-12. Março, 2018.

BAILEY, C. **Titi Lucreti Cari De Rerum Natura.** vol.3, Oxford, UK: Clarendon Press. 1947.

BATRA, S. W. T. **Nests and social behavior of halictine bees of India (Hymenoptera: Halictidae).** *The Indian Journal of Entomology*, vol.28, p. 375-393. 1966.

BECKMAN, K. B. e AMES, B. N. **The free radical theory of aging matures.** *Physiological Reviews*, vol.78, p.547–581. Abril, 1998.

BIRYUKOVA, I. e YE, T. **Endogenous siRNAs and piRNAs derived from transposable elements and genes in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*.** *BMC Genomics*, v.16. Abril, 2015.

BIELSKI, B. H. J., ARUDI, R. L. e SUTHERLAND, M. W. **A study of the reactivity of the HO₂/O₂ with unsaturated fatty acids.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p.4759-4761. Abril, 1983.

BLASCO, M. A. **Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond.** *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 611-622. Agosto, 2005.

BLEAU, N. *et al.* **Dynamics of the honeybee (*A. mellifera*) gut microbiota throughout the overwintering period in Canada.** *Microorganisms*. Julho, 2020.

BORUM, A. E. **Microbiota and Its Importance in Honey Bees**. Bee Studies, v. 13, ed. 1, p.23-30. Julho, 2021.

BOURKE, A. F. G. **Worker reproduction in the higher eusocial Hymenoptera**. Quarterly Review of Biology, v. 63, p. 291–311. Setembro, 1988.

BOURKE, A. F. G. *et al.* **Ten Things You Should Know about Transposable Elements**. Genome Biology, v. 19. Novembro, 2018.

BREMER, A. A. e MILLER, W. L. **Regulation of Steroidogenesis**. Cellular Endocrinology in Health and Disease, cap. 13, p. 207-227. 2014.

BROECKX, B. J. G., De SMET, L. e Blacquière, T. *et al.* **Honey bee predisposition of resistance to ubiquitous mite infestations**. Scientific Reports, v. 9. Maio, 2019.

BUFORD, T. W. **(Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease**. Microbiome. Julho, 2017.

BURTON, G. W. e TRABER, M. G. **Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability**. Annual Review of Nutrition, v. 10, p. 357-382. Julho, 1990.

BUTLER, C. G. e FAIREY, E. M. **The role of the queen in preventing oogenesis in worker honeybees**. Journal of Apicultural Research, v. 2, p. 14-18. Fevereiro, 1963.

BUTTEL-REEPEN, H. V. **Leben und Wesen der Biene**, F. Vieweg und Sohn, Braunschweig., 1915.

BUTTSTEDT, A. *et al.* **Royalactin is not a royal making of a queen**. Nature, v. 537. Setembro, 2016.

BUTTSTEDT, A., MORITZ, R. F. e ERLER, S. **More than royal food - Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *A. mellifera***. Frontiers in Zoology, v. 10. Novembro, 2013.

CASTEELS, P. *et al.*, **Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees**. The EMBO Journal, v. 8, p.2387-2391. Agosto, 1989.

CARDOSO-JÚNIOR, C. A. M., GUIDUGLI-LAZZARINI, K. R. e HARTFELDER, K. **DNA methylation affects the lifespan of honey bee (*A. mellifera* L.) workers - Evidence for a regulatory module that involves vitellogenin expression but is independent of juvenile hormone function.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 92, p. 21-29. 2018.

CERENIUS, L. e SODERHALL, K. **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** *Immunological Reviews*, v. 198, p. 116-126. Março, 2004.

CHAWLA, G. *et al.* **let-7-to-miR-125 microRNA switch regulates neuronal integrity and lifespan in *Drosophila*.** *PLOS Genetics*, v. 12, p. 1-29, Agosto, 2016.

CORBY-HARRIS, V. *et al.* ***Parasaccharibacter apium*, gen. Nov., sp. Nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*.** *Journal of Economic Entomology*, v. 109, p. 537-543. Abril, 2016.

CORONA, M. **Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 126, p. 1230-1238. Novembro, 2005.

CORONA, M. *et al.* **Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, p. 7128-7133. Abril, 2007.

CRAILSHEIM, K. **Interadult feeding of jelly in honeybee (*A. mellifera* L.) colonies.** *Journal of comparative physiology B*, v. 161, p. 55-60. Março, 1991.

CRAILSHEIM, K. *et al.* **Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function.** *Journal of Insect Physiology*, v. 38, ed. 6, p. 409-419. Junho, 1992.

CROFT, K. D. **The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids.** *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 854, p. 435-442. Novembro, 1998.

CROSS, C. E. *et al.* **Oxygen radicals and human-disease.** *Annals of Internal Medicine*, v. 107, p. 526-545. Outubro, 1987.

CURRIE, C. R. e STUART, A. E. **Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants.** *The Royal Society*, v. 268, n. 1471, p.1033-1039. Maio, 2001.

CZARNOLESKI, C. *et al.* **Flies developed small bodies and small cells in warm and in thermally fluctuating environments.** *Journal Experimental Biology*, v. 216, p. 2896-2901. Agosto, 2013.

DAY, B. J. *et al.* **A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 12760–12765. Outubro, 1999.

DIXON, L., KUSTER, R. e RUEPPELL, O. **Reproduction, social behavior, and aging trajectories in honeybee workers.** *Age (Dordr)*, v. 36, p. 89–101. Fevereiro, 2014.

DOUMS, C. *et al.* **Senescence of immune defense in *Bombus* workers.** *Ecological Entomology*, v. 27, p. 138-144. Abril, 2002.

EDWARD, D., A. e CHAPMAN, T. **Mechanisms underlying reproductive trade-offs: Costs of reproduction.** *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs*, p.137-158. Oxford University Press. Maio, 2011.

ELEFThERIANOS, I. e REVENIS, C. **Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis.** *Journal of Innate Immunity*, v. 3, p. 28-33. Março, 2011.

ELSIK, C. G. *et al.* **Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade.** *BMC Genomics*. v. 15, p.15-86. Janeiro, 2014.

EVANS, J. D. *et al.* **Immune pathways and defense mechanisms in *A. mellifera* bees.** *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 645-656. Outubro, 2006.

EWERS, I., RIZZO, L. V. e KALIL, F. J. **Imunologia e envelhecimento.** *Einstein*, v. 6, supl. 1, p. S13-S20. 2008.

FABIAN, D. e FLATT, T. **The Evolution of Aging.** *Nature Education Knowledge*. v. 3, ed.10, p. 9. Maio, 2011.

FAHRBACH, S. E., GIRAY, T. e ROBINSON, G. E. Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 181–191. Maio, 1995.

FAN, X., GAUR, U. e YANG, M. **Intestinal Homeostasis and Longevity: *Drosophila* Gut Feeling.** *Aging and Aging-Related Diseases*, v. 1086, p. 157-168. Setembro, 2018.

FEITOSA, N. M. *et al.* **Hemicentin 2 and Fibulin 1 are required for epidermal–dermal junction formation and fin mesenchymal cell migration during zebrafish development.** *Developmental Biology*, v. 369, p.235–248. Setembro, 2012.

FEYEREISEN, R. **Insect cytochrome P450.** Oxford: Elsevier Pergamon, v. 4, p. 1–77. 2005.

FLORES, I., BENETTI, R. e BLASCO, M. A. **Telomerase regulation and stem cell behaviour.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 18, p. 254-260. Junho, 2006.

FONTANA, R. *et al.* **Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honey bees (*A. mellifera*).** *Peptides*, v. 25, p.919–928. Junho, 2004.

FRATINI, F. *et al.*, **Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties.** *Microbiological Research*, v192, p. 130-141. Novembro, 2016.

FREI, B. **Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action.** *The American Journal of Medicine*, p. 5-13, v. 97. Setembro, 1994.

FRYDRYCHOVA, C. R. *et al.* **Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects.** *Genome*, v. 47, p. 163-78. Fevereiro, 2004.

GARDNER, T. S. **The Use of *Drosophila Melanogaster* as a Screening Agent for Longevity Factors: II. The Effects of Biotin, Pyridoxine, Sodium Yeast Nucleate, and Pantothenic Acid on the Life Span of the Fruit Fly.** *Journal of Gerontology*, v. 3, ed. 1, p. 9–13. Janeiro, 1948.

GHALAMBOR, C. K. e MARTIN, T. E. **Fecundity–survival trade-offs and parental risk-taking in birds.** *Science*, v. 292, p. 494-497. Abril, 2001.

GLASGOW, S. D., RUTHAZER, E. S. e KENNEDY T. E. **Guiding synaptic plasticity: Novel roles for netrin-1 in synaptic plasticity and memory formation in the adult brain.** *The Journal of Physiology*, v. 599, p. 493-505. Janeiro, 2021.

GARG, D. e COHEN, S. M. **MiRNAs and Aging: A Genetic Perspective.** *Ageing Research Reviews*, v. 17, p. 3–8. Setembro, 2014.

GARY, N. E. **Chemical mating attractants in the queen honey bee.** *Science*, v. 13, p. 773-774. Junho, 1962.

GREIDER, C. W. e BLACKBURN, E. H. **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts.** *Cell*, v. 43, p. 405-413. Dezembro, 1985.

GROZINGER, C. M. *et al.* **Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*).** *Molecular Ecology*, v 16, p. 4837-4848. Novembro, 2007.

DE GROOT, A. P. e VOOGD, S. **On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifica* L.).** *Experientia*, v. 15, p. 384-385. Setembro, 1954.

GUO, X. *et al.* **Differential expression of miRNAs related to caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*.** *Apidologie*, v. 47, p. 495–508. Novembro, 2015.

HADDAD, L. S., KELBERT, L. e HULBERT, A. J. **Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes.** *Experimental Gerontology*, v. 42, p. 601-609. Julho, 2007.

HAMANAKA, R. B. e CHANDEL, N. S. **Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes.** *Trends Biochemical Sciences*, v. 35, p. 505-513. Setembro, 2010.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. **Social Insect Polymorphism: Hormonal Regulation of Plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee.** *Current Topics in Developmental Biology*, v. 40, p. 45-77. 1998.

HEPBURN, R. e RADLOFF, S. E. ***Apis mellifera capensis*: an essay on the subspecific classification of honeybees.** *Apidologie*, v. 33, p. 105-127. Março-Abril, 2002.

HIGO, H. *et al.* **Effects of honey bee (*A. mellifera* L.) queen mandibular gland pheromone on foraging and brood rearing.** *The Canadian Entomologist*, v. 124, p. 409-418. Maio, 1992.

HILL, R. J. *et al.* **Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology.** *Annual Reviews. Entomology*, v. 58, p. 251–271. Janeiro, 2013.

HIREMATH, S. e JONES, D. **Juvenile hormone regulation of vitellogenin in the gypsy moth, *Lymantria dispar*: Suppression of vitellogenin mRNA in the fat body.** Journal of Insect Physiology, v. 38, ed. 6, p. 461-474. Junho, 1992.

HOEK, M. e STILLMAN, B. **Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, p.12183-12188. Setembro, 2003.

HOFFMANN, J. A. e LAGUEUX, M. **Endocrine aspects of embryonic development in insects.** Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, v. 1, p. 435–460. Oxford, 1985.

HORA, R. R. *et al.* **Queen size dimorphism in the ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae).** Sociobiology, ed. 38, p. 407-420. Janeiro, 2001.

HRASSNIGG, N. e CRAILSHEIM, K. **The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*A. mellifera* L.).** Journal of Insect Physiology, v. 44, p. 393-404. Maio, 1998.

HU, Y. T. *et al.* **Regulation of genes related to immune signaling and detoxification in *A. mellifera* by an inhibitor of histone deacetylation.** Scientific Reports, v. 7, p. 1-14. Janeiro, 2017.

HUANG, X. *et al.* **Biology, physiology and gene expression of grasshopper *Oedaleus asiaticus* exposed to diet stress from plant secondary compounds.** Scientific Reports, v.7, p. 1-9. Agosto, 2017.

HUANG, Z. Y. e ROBINSON, G. E. **Regulation of honey bee division of labor by colony age demography.** Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 39, p. 147–158. Setembro, 1996.

HUGHES, K. A. *et al.* **A test of evolutionary theories of aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, ed. 22, p. 14286-91. Outubro, 2002.

HYUN, S. *et al.* **Conserved microRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K.** Cell, v. 139, p. 1096–1108. Dezembro, 2009.

INDO, H. P. *et al.* **Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage.** Mitochondrion, v. 7, p. 106–118. Abril, 2007.

JAGER, T. L., COCKRELL, A. E. e DU PLESSIS, S. S. **Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species**. Diseases and Environment. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 996, p 15-23. Novembro, 2017.

JENSEN, B. C. *et al.* **The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit**. Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 32204-32211. Agosto, 2003.

JIANG, S. *et al.* **Differential gene expression of two extreme honey bee (*A. mellifera*) colonies showing varroa tolerance and susceptibility**. Insect Molecular Biology, v. 25, p.272–282. Junho, 2016.

JOHNSON, B. R. **Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms**. Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 64, p. 305-316. Janeiro, 2010.

JOHNSON, R. M. *et al.* **Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *A. mellifera***. PLoS One, v.7, p. 1-9. Fevereiro, 2012.

JONES, J. C. *et al.* **Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees**. Ecology and Evolution, v. 8, p. 441–451. Novembro, 2017.

KAMAKURA, M. **Royalactin induces queen differentiation in honeybees**. Nature, v. 473, p. 478–483. Abril, 2011.

KAYUKAWA, T. *et al.* **Krüppel Homolog 1 Inhibits Insect Metamorphosis via Direct Transcriptional Repression of Broad-Complex, a Pupal Specifier Gene**. Journal of Biology Chemistry, v. 291, ed.4, p. 1751–1762. Janeiro, 2016.

KELLER, L. e GENOUD, M. **Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing**. Nature, v. 389, p. 3-6. Outubro, 1997.

KELLER, L. e JEMIELITY, S. **Social insects as a model to study the molecular basis of ageing**. Experimental Gerontology, v. 41, ed. 6, p. 553-556. Junho, 2016.

KENNEDY, A., HERMAN, J. e RUEPPELL, O. **Reproductive activation in honeybee (*Apis mellifera*) workers protects against abiotic and biotic stress**. The Royal Society, v. 376, p. 1-12. Março, 2021.

KIM, M. e BENAYOUN, B. A. **The microbiome: an emerging key player in aging and longevity.** *Translational Medicine of Aging*, v. 4, p. 103-116. Julho, 2020.

KOCHER, S. D. e GROZINGER, C. M. **Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones.** *Journal of Chemical Ecology*, v. 37, p. 1263–1275. Novembro, 2011.

KOLAYLI, S. *et al.* **A Member of Complementary Medicinal Food: Anatolian Royal Jellies, Their Chemical Compositions, and Antioxidant Properties.** *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*. Outubro, 2016.

KORANDOVA, M. e FRYDRYCHOVA, R. C. **Telomerase activity and telomere length in *A. mellifera*.** *Chromosoma*, v. 125, p. 405-411. Junho, 2016.

KOUBOVÁ, J. *et al.* **Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, DNA replication and nutrients in the fat body of *A. mellifera*.** *Scientific Representative*, v. 1. Janeiro, 2021.

KUCHARSKI, R. *et al.* **Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation.** *Science*, v. 319, p. 1827–1830. Março, 2008.

KUSZEWSKA, K. e WOYCIECHOWSKI, M. **Age at which larvae are orphaned determines their development into typical or rebel workers in the honeybee (*Apis mellifera* L.).** *PLoS One*. Abril, 2015.

KWONG, W. K. *et al.* **Dynamic microbiome evolution in social bees.** *Science Advances*, v. 3, ed. 3. Março, 2017.

KWONG, W. K., MANCENIDO, A. L. e MORAN, N. A. **Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees.** *Royal Society Open Science*. Fevereiro, 2017.

LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs,** *Science*, v. 294, p. 853–858. Outubro, 2001.

LARSEN, P. L. e CLARKE, C. F. **Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q.** *Science*, v. 295, p. 120–123. Janeiro, 2002.

LEE, K. A. e LEE, W. J. **Immune-metabolic interactions during systemic and enteric infection in *Drosophila*.** *Current Opinion in Insect Science*, v. 29, p. 21–26. Outubro, 2018.

- LEE, K. A. *et al.* **Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes.** *Cell Host & Microbe*, v. 17, p. 191–204. Fevereiro, 2015.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. e AMBROS, V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell*, v. 75, p. 843–854. Dezembro, 1993.
- LEI, X. G. *et al.* **Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications.** *Physiological Reviews*, v. 96, p.307-364. Janeiro, 2016.
- LI, Z., ZHANG, S. e LIU, Q. **Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity.** *PLoS One*, v.3, p. 1-7. Abril, 2008.
- LIU, N. *et al.* **MiR-34 microRNA modulates aging and neurodegeneration in *Drosophila*.** *Nature*, v. 482.7386, p. 519-23. Fevereiro, 2012.
- LIU, Z. *et al.* **Transcriptome sequencing analysis reveals the regulation of the hypopharyngeal glands in the honey bee, *A. mellifera carnica* Pollmann.** *PLoS One*. Dezembro, 2013.
- LU, C. Y., HUANG, P. J. e HSU, C. Y. **The cholesterol-hydroxyecdysone-vitellogenin pathway is involved in the longevity of trophocytes and oenocytes of queen honey bees (*A. mellifera*).** *Apidologie*, v. 49, p. 721–733. 2018.
- MAORI, E. *et al.* **Transmissible RNA Pathway in Honey Bee.** *Cell Reports*, v. 27, p. 1949–1959. Maio, 2019.
- MARTIN, C. S. *et al.* **Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos.** *Revista De Nutrição*, v. 19, p. 761-770. Dezembro, 2006.
- MARTIN, S. *et al.* **Parasitic Cape honeybee workers, *Apis mellifera capensis*, evade policing.** *Nature*, v. 415, p. 163–165. Janeiro, 2002.
- MARTINSON, V. G., MOY, J. e MORAN, N. A. **Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, p. 2830–2840. Fevereiro, 2012.
- MATHESON, A. **World bee health report.** *Bee World*, v. 74, p.176–212. 1996.

MELATHOPOULOS, A. P. *et al.* **Effect of queen mandibular pheromone on initiation and maintenance of queen cells in the honey bee (*A. mellifera* L.).** The Canadian Entomologist, v. 128, ed. 2, p.263-272. 1996.

MELLO, T. R. P.; *et al.* **Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*A. mellifera*).** Frontiers in Genetics, v. 5, p. 445. Dezembro, 2014.

MICHENER, C. D. **Comparative Social Behavior of Bees.** Annual Review of Entomology, v. 14, ed. 1, p.299–342. Janeiro, 1969.

MICHENER, C. D. **The Social Behavior of the Bees.** BelknapPress: An Imprint of Harvard University Press. Janeiro, 1974.

MINAKUCHI, C., ZHOU, X. e RIDDIFORD L. M. **Krüppel Homolog 1 (*Kr-H1*) Mediates Juvenile Hormone Action during Metamorphosis of *Drosophila melanogaster*.** Mechanisms of Development, v. 125, ed. 1-2, p. 91-105. Janeiro, 2008.

MINDNICH, R., MOLLER, G. e ADAMSKI, J. **The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases.** Molecular and Cellular Endocrinology, v.218, p. 7-20. Abril, 2004.

MOCHEGANI, E., MUZZIOLI, M. e GIACCONI, R. **Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 21, p. 205-208. Junho, 2000.

MOORE, S. W., TESSIER-LAVIGNE, M. e KENNEDY, T. E. **Netrins and Their receptors.** Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 621, p. 17-31. 2007.

MURRAY, V. **Are transposons a cause of ageing?** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 237, ed. 2, p. 59-63. Março, 1990.

NEUKIRCH, A. **Dependence of the life span of the honeybee (*A. mellifera* L.) upon flight performance and energy consumption.** Journal of Comparative Physiology, v. 146, p. 35–40. Março, 1982.

NIE, H. *et al.* **Changes in the gene expression of chalkbrood resistance in *A. mellifera* larvae infected by *Ascosphaera apis*.** Apidologie, v. 51, p. 35–47. Novembro, 2019.

- NIU, D. *et al.* **Transcriptome comparison between inactivated and activated ovaries of the honey bee *Apis mellifera* L.** *Insect Molecular Biology*, v. 23, p. 668-681. Julho, 2014.
- NIWA, R. *et al.* **Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, p. 714-720. Julho, 2008.
- OKANO, M., XIE, S. e LI, E. **Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.** *Nature Genetics*, v. 19, p. 219–220. Julho, 1998.
- OLDROYD, B. P. *et al.* **Anarchy in the beehive.** *Nature*, v. 371, p. 749. Outubro, 1994.
- OLDROYD, B. P. e BEEKMAN, M. **Effects of selection for honey bee worker reproduction on foraging traits.** *PLoS Biology*, v. 6, p. 463-470. Março, 2008.
- OLIVEROS, J. C. **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.** Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Acesso: 11/2022-02/2023
- OPACHALOEMPHAN, C. *et al.* **Recent advances in behavioral (epi)genetics in eusocial insects.** *Annual Review of Genetics*, v. 52, p. 489–510. Novembro, 2018.
- PAGE, R. E. e PENG, C. Y. S. **Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *A. mellifera* L.** *Experimental Gerontology*, v. 36, p. 695-711. Abril, 2001.
- PAGE, R. E. **The Development and Evolution of Division of Labor and Foraging Specialization in a Social Insect (*A. mellifera* L.).** *Current Topics in Developmental Biology*, v. 74, p. 253–286. Fevereiro, 2006.
- PAMPLONA, R., BARJA, G. e PORTERO-OTÍN, M. **Membrane Fatty Acid Unsaturation, Protection against Oxidative Stress, and Maximum Life Span: A Homeoviscous-longevity Adaptation?** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 959, p. 475–490. Abril, 2002.
- PASCALE, A. *et al.* **Microbiota and metabolic diseases.** *Endocrine*, v. 61, p. 357–371. Setembro, 2018.
- PAUL, R. K. *et al.* **Gene expression of ecdysteroid-regulated gene *E74* of the honeybee in ovary and brain.** *Insect Molecular Biology*, v. 14, p. 9–15. Janeiro, 2005.

PEIREN, N. *et al.* **Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage.** *Toxicon*, v. 52, p. 72–83. Julho, 2008.

PETRYK, A. *et al.* **Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 13773–13778. Novembro, 2003.

PINTO, L. Z., BITONDI, M. M. G. e SIMÕES, Z. L. P. **Inhibition of vitellogenin synthesis in *A. mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen.** *Journal of Insect Physiology*, v. 46, p. 153–160. Fevereiro, 2000.

POLSINELLI, G. A. e YU, H. D. **Regulation of histone deacetylase 3 by metal cations and 10-hydroxy-2E-decenoic acid: Possible epigenetic mechanisms of queen-worker bee differentiation.** *PLoS One*, v. 10, p. 1-12. Dezembro, 2018.

QIN, J. *et al.* **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** *Nature*, v. 464, p. 59–65. Março, 2010.

RAMANTHAN, A. N. K. G., NAIR, A. J. e SUGUNAN, V. S. **A review on Royal Jelly proteins and peptides.** *Journal of Functional Foods*, v. 44, p. 255–264. Maio, 2018.

RAMADAN, M. F. e AL-GHAMDI, A. **Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review.** *Journal of Functional Foods*, v. 4, p. 39–52. Setembro, 2012.

RAUDVERE, U. *et al.* **Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists.** *Nucleic Acids Research*, 2019. Disponível em: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>. Acesso: 11/2022-02/2023

RAYMANN, K e MORAN, N. A. **The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers.** *Current Opinion in Insect Science*, v. 26, p. 97-104. Abril, 2018.

REMBOLD, B., LACKNER, B. e GEISTBECK, I. **The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinator from royal jelly.** *Journal of Insect Physiology*, v. 20, p. 307-314. Fevereiro, 1974.

RIVIÈRE, A. *et al.* ***Bifidobacteria* and butyrate- producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-21. Junho, 2016.

ROCHA, J. F. M. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola.** Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança. Portugal. 2013.

ROLFF, J. **Effects of age and gender on immune function of dragonflies (*Odonata, Lestidae*) from a wild population.** *Canadian Journal of Zoology*, v. 79, p. 2176-2180. Dezembro, 2001.

RONAI, I. *et al.* **Anarchy Is a Molecular Signature of Worker Sterility in the Honey Bee.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, p. 134–142. Janeiro, 2016.

ROULSTON, T. H. e CANE, J. H. **Pollen nutritional content and digestibility for animals.** *Plant Systematics and Evolution*. v. 222, p. 187–209. Março, 2000.

RYTZ, R., CROSET, V. e BENTON, R. **Iontropic receptors (IRs): chemosensory ionotropic glutamate receptors in *Drosophila* and beyond.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43, p. 888-897. Setembro, 2013.

SAMMATARO, D. e AVITABILE, A. **The Beekeeper's Handbook.** 3 ed. Cornell University Press., 1998.

SANTOS, A. M. **Estrutura do Gene da Esterase do Hormônio Juvenil de *A. mellifera* e seu Papel Durante o Desenvolvimento Pós-Embrionário e a Diferenciação de Castas.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

SANTOS, D. E. *et al.* **Differential expression of antioxidant system genes in honey bee (*A. mellifera* L.) caste development mitigates ROS-mediated oxidative damage in queen larvae.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 43. Novembro, 2020.

SANTOS, S. S. C. **Concepções teórico-filosóficas sobre envelhecimento, velhice, idoso e enfermagem gerontogeriatrica.** *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 63, p. 1035-1039. Dezembro, 2010.

SARIC, A. *et al.* **Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen.** Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 547-554. Março, 2008.

SCHIEBER, M. e CHANDEL, N. S. **ROS function in redox signaling and oxidative stress.** Current Biology, v. 24, p. 453-462. Maio, 2014.

SCHMID, M. R. *et al.* **Adult honeybees (*A. mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity.** Journal of Insect Physiology, v. 54, p. 439–44. Fevereiro, 2008.

SEDIVA, M. *et al.* **10-HDA, A Major Fatty Acid of Royal Jelly, Exhibits pH Dependent Growth-Inhibitory Activity Against Different Strains of *Paenibacillus* larvae.** Molecules, v. 23, p. 1-14. Dezembro, 2018.

SHI, Y. Y. *et al.* **Diet and Cell Size Both Affect Queen-Worker Differentiation through DNA Methylation in Honey Bees (*Apis mellifera*, *Apidae*).** PLoS One, v. 6, p. 1-6. Abril, 2011.

SHI, Y. Y. *et al.* **Differentially expressed microRNAs between queen and worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera*).** Apidologie, v. 46, p. 35-45. Julho, 2015.

SHI, Y. Y. *et al.* **Epigenetic Modification of Gene Expression in Honey Bees by Heterospecific Gland Secretions.** PLoS One, v. 7, p.1-7. Agosto, 2012.

SMITH-VIKOS, T. e SLACK, F. J. **MicroRNAs and their roles in aging.** Journal of cell science, v. 125, p. 7-17. Janeiro, 2012.

SMYKAL, V. e RAIKHEL, A. S. **Nutritional Control of Insect Reproduction. Current Opinion in Insect Science,** v. 11, p. 31-38. Outubro, 2015.

SNODGRASS, R. E. *Anatomy of the Honey Bee*, Cornell University Press. 1910.

SODERHALL, K. e CERENIUS, L. **Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity.** Current Opinion in Immunology, v. 10, p. 23–28. Fevereiro, 1998.

SOHAL, R. S. **The Rate of Living Theory: A Contemporary Interpretation.** Insect Aging, p.23-44. 1986.

SOHAL, R. S. e WEINDRUCH, R. **Oxidative stress, caloric restriction, and aging.** *Science*, v. 273, p. 59–63. Julho, 1996.

SOLANA, R. e PAWEELEC, G. **Molecular and celular basis of immunosenescence.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 102, p. 115-129. Maio, 1998.

STANLEY, D. e KIM, Y. **Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biosynthesis and Biological Actions.** *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 1-13. Fevereiro, 2019.

STANLEY-SAMUELSON, D. W. **Assessing the significance of prostaglandins and other eicosanoids in insect physiology.** *Journal of Insect Physiology*, v. 40, p. 3-11. Janeiro, 1994.

SUN, G. *et al.* **Two isoforms of the early *E74* gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 190, p. 147–157. Abril, 2002.

TAI, H. H. *et al.* **NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, p. 955-962. 2006.

TALALAY, P., DOBSON, M. e TAPLEY, D. **Oxidative Degradation of Testosterone by Adaptive Enzymes.** *Nature*, v. 170, p. 620–621. Outubro 1952.

TELFER, W. H. e KUNKEL, J. G. **The function and evolution of insect storage hexamers.** *Annual Review of Entomology*, v. 36, p. 205-28. Janeiro, 1991.

TER HORST, A. M. *et al.* **Endogenous viral elements are widespread in arthropod genomes and commonly give rise to PIWI-interacting RNAs.** *Journal of Virology*. v. 93, p. 1-15. Março, 2019.

THOMSON, T. e LIN, H. **The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 25, p. 355–376. Novembro, 2009.

THOMPSON, G. J., KUCHARKI, R. e OLDROYD, B. P. **Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees.** *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 537-644. Outubro, 2006.

THOMPSON, G. J., KUCHARKI, R. e OLDROYD, B. P. **Genome-wide analysis of genes related to ovary activation in worker honey bees.** *Insect Molecular Biology*, v. 17, p. 657-665. Dezembro, 2008.

VERDUN, R. E. e KARLSEDER, J. **Replication and protection of telomeres.** *Nature*, v. 447, p. 924-931. Junho, 2007.

VELTHUIS, H. H. W., RUTTNER, F. e CREWE, R. M. **Differentiation in reproductive physiology and behaviour during the development of laying workers.** *Social Insects*, p. 231–243. 1990.

VIENBERG, S. *et al.* **MicroRNAs in Metabolism.** *Acta Physiologica*. v. 219, p. 346-361. Fevereiro, 2016.

VIÑA, J., BORRÁS, C. e MIQUEL, J. **Theories of ageing.** *IUBMB Life Journal*. v. 59, p. 249-254. Janeiro, 2008.

VOGEL B. E. e HEDGCOCK, E. M. **Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions.** *Development*, v. 128, p. 883-94. Março, 2001.

WALLBERG, A. *et al.* **Identification of Multiple Loci Associated with Social Parasitism in Honeybees.** *PLoS Genetics*. Junho, 2016.

WEISMANN, A. **Über die Dauer des Lebens.** Verlag von Gustav Fisher, Jena, Germany. 1882.

WANG, W. *et al.* **Contrasting Sex-and Caste-Dependent piRNA Profiles in the Transposon Depleted Haplodiploid Honeybee *A. mellifera*.** *Genome Biology and Evolution*, v. 9, ed. 5, p. 1341–1356. Maio, 2017.

WERREN, J. H. **Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 10863–10870. Junho, 2011.

WHEELER, W. M. **A study of some ant larvae with a consideration of the origin and meaning of social habits among insects.** *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 57, ed. 220, p. 293-343. Dezembro, 1918.

- WHEELER, W. M. **The ant-colony as an organism**. *Journal of Morphology*, v. 22, p. 307–325. 1911.
- WILSON, E. O. **The Insect Societies (Belknap Press)**. Belknap Press: An Imprint of Harvard University Press. Janeiro, 1971.
- WILSON, E. O. **Sociobiology: The New Synthesis, Twenty-Fifth Anniversary Edition**. Belknap Press: An Imprint of Harvard University Press. Março, 2000.
- WINKLER, P., SIEG, F. e BUTTSTED, A. **Transcriptional Control of Honey Bee (*A. mellifera*) Major Royal Jelly Proteins by 20-Hydroxyecdysone**. *Insects*, v. 9, p. 1-10. Setembro, 2018.
- WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. Harvard University Press. Cambridge. 1987.
- WU, Z. *et al.* **Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. v. 8, p.1-11. Janeiro, 2021.
- WOYCIECHOWKI, M. *et al.* **Honeybee worker larvae perceive queen pheromones in their food**. *Apidologie*. v. 48, p. 144–149. Julho, 2014.
- WOYCIECHOWKI, M. e KUSZEWSKA, K. **Swarming generates rebel workers in honeybees**. *Current Biology*, v. 22, p. 707–711. Abril, 2012.
- YAMAZAKI, Y. *et al.* **Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *A. mellifera* L.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, p. 283–293. Maio, 2011.
- YANG, C. *et al.* **The broad complex isoform 2 (BrC-Z2) transcriptional factor plays a critical role in vitellogenin transcription in the silkworm *Bombyx mori***. *Biochemistry et Biophysics Acta*. v. 1840, p. 2674–2684. Maio, 2014.
- YOKOI, K., KIMURA, K. e BONO, H. **Revealing Landscapes of Transposable Elements in *Apis* Species by Meta-Analysis**. v. 13, p. 698. *Insects*. Julho, 2022.
- YU, L. *et al.* **High-Quality Queens Produce High-Quality Offspring Queens**. *Insects*. v. 13, p. 1-11. Maio, 2022.

ZHENG, H. *et al.* **Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, p. 4775–4780. Março, 2017.

ZHOU, L. Y. *et al.* **Cloning, expression and characterization of three types of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** Journal Molecular Endocrinology, v. 35, p. 103-116. Maio, 2005.