

ALESSANDRA DE OLIVEIRA FAUSTINO

**PERFIL OXIDATIVO DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA:
APIDAE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus**

T

F268p
2022

Faustino, Alessandra de Oliveira, 1993-
Perfil oxidativo da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)
em diferentes estágios do desenvolvimento: / Alessandra de Oliveira
Faustino. - Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (32 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Leandro Licursi de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: .
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.511>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Efeito do stress; 2. Enzimas - Oxidação; 3.
Marcadores bioquímicos; I. Oliveira, Leandro Licursi de II.
Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Biologia Geral.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural III.
Título

CDD 22. ed. 571.15799

Bibliotecário(a) responsável: EUZEBIO LUIZ PINTO CRB-6/3317

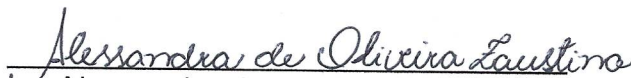
ALESSANDRA DE OLIVEIRA FAUSTINO

**PERFIL OXIDATIVO DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA:
APIDAE) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 06 de junho de 2022.

Assentimento:


Alessandra de Oliveira Faustino
Autora


Leandro Licursi de Oliveira
Orientador

*Dedico aos meus pais,
Edna Maria e Paulo Sérgio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado tantos anjos em minha vida ao longo desses quatro anos. E também, por ter me concedido paciência, persistência e força de vontade para superar as dificuldades e conseguir vencer mais essa etapa.

Agradeço a minha família por todo apoio. Em especial a minha mãe, meu pai e minha irmã, por todo carinho, incentivo e compreensão. Amo vocês.

Ao meu namorado Pedro Vitor, por sempre estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Te amo.

Aos amigos de Viçosa.

A minha companheira de apartamento e amiga de longa data, Jaqueline Amorim Pereira, por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Ao meu orientador Prof. Leandro Licursi de Oliveira por todo suporte e ensinamento. O senhor foi muito mais que um orientador, foi um conselheiro, um amigo, que eu vou levar para o resto da vida. Muito obrigada por tudo.

As minhas estagiárias (Amanda, Gabriela e Camila) pelo auxílio nos experimentos e também por todo carinho e companheirismo.

Aos amigos do laboratório, em especial ao Daniel e a Ana, por todo apoio e amizade.

Ao Doutor Luis Carlos Martinez, pela disponibilidade e amparo com as correções do artigo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo crescimento pessoal e profissional, e pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Ao Prof. Weyder Cristiano Santana, pelo auxílio e orientação na coleta das abelhas e realização desse trabalho.

Aos funcionários do Apiário Central do departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia pelo acolhimento, paciência e pelos conhecimentos adquiridos.

Aos demais laboratórios do departamento de Biologia Geral, por sempre serem

solicitos e disponibilizarem seus equipamentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FAUSTINO, Alessandra de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Perfil oxidativo da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em diferentes estágios do desenvolvimento.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

As abelhas, são insetos sociais que vivem em colônias hierarquicamente organizadas, formadas por indivíduos de diferentes castas e que desempenham diferentes funções. Os trabalhos distintos realizados por essas abelhas dentro da colmeia, estão relacionados ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequentes danos causados pelo estresse oxidativo. Dentre os fatores que contribuem para o processo de envelhecimento, o estresse oxidativo é uma das teorias mais bem aceitas, além de estar intimamente ligada a patogênese de muitas doenças. Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil oxidativo de abelhas operárias e rainhas de *Apis mellifera* ao longo de seu desenvolvimento, no intuito de compreender a influência do processo da metamorfose, da alimentação e dos trabalhos realizados por essas duas castas de abelhas, sobre o estresse oxidativo. Para tanto, foram analisadas as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase, e os marcadores de dano oxidativo como proteína carbonilada e peroxidação lipídica. Abelhas rainhas e operárias apresentaram um perfil oxidativo muito semelhante. A atividade da enzima catalase foi aumentando ao longo do desenvolvimento, atingindo o pico nas abelhas adultas. Em contraste, a atividade da superóxido dismutase e glutathione S-transferase diferiram e apresentaram valores significativamente maiores nas pré-pupas e pupas. Já em relação aos biomarcadores de danos oxidativos, proteína carbonilada e peroxidação lipídica, estes obtiveram maiores concentrações nas abelhas adultas. Houve então uma maior atividade das enzimas antioxidantes e menor concentração dos marcadores de dano nas fases iniciais, contrastando com as abelhas adultas. Embora os perfis oxidativos tenham sido semelhante, pois analisamos abelhas rainhas recém-emergidas, nós podemos concluir que a diferença na alimentação e no modo de vida dessas duas castas vão influenciar, ao longo da sua vida, a proporção dos danos causados pelo estresse, visto que as abelhas rainhas vivem muito mais que as operárias.

Palavras-chave: Abelhas sociais. Enzimas oxidantes. Marcador de estresse.

ABSTRACT

FAUSTINO, Alessandra de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Oxidative profile of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) at different stages of development.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira.

Bees are social insects that live in hierarchically organized colonies, formed by individuals of different castes and performing different functions. The different works carried out by these bees inside the hive are related to the increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and consequent damages caused by oxidative stress. Among the factors that contribute to the aging process, oxidative stress is of the most accepted theories, in addition to being closely linked to the pathogenesis of many diseases. Therefore, the objective of this study was to characterize the oxidative profile of worker bees and queens of *Apis mellifera* throughout their development, in order to understand the influence of the process of metamorphosis, food and the work carried out by these two bee castes, on oxidative stress. Therefore, the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase were analyzed, as well as markers of oxidative damage such as protein carbonyl and lipid peroxidation. Queen and worker bees showed a very similar oxidative profile. The activity of the catalase enzyme increased throughout development, reaching a peak in adult bees. In contrast, superoxide dismutase and glutathione S-transferase activity differed and showed significantly higher values in prepupae and pupae. As for the biomarkers of oxidative damage, carbonyl protein and lipid peroxidation, these obtained higher concentrations in adult bees. There was then a greater activity of antioxidant enzymes and a lower concentration of damage markers in the early stages, in contrast to adult bees. Although the oxidative profiles were similar, as we analyzed newly emerged queen bees, we can conclude that the difference in diet and way of life of these two castes will influence, throughout their life, the proportion of damage caused by stress, given that that queen bees live much longer than worker bees.

Keywords: Social bees. Oxidative enzymes. Stress marker.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. <i>Estresse oxidativo</i>	9
1.2. <i>Desenvolvimento das abelhas</i>	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. <i>Coleta do material biológico e preparo das amostras</i>	14
2.2. <i>Atividade das enzimas antioxidantes</i>	15
2.3. <i>Peroxidação lipídica</i>	16
2.4. <i>Análise da oxidação proteica</i>	16
2.5. <i>Análises Estatísticas</i>	17
3. RESULTADOS	17
3.1. <i>Atividade das enzimas antioxidantes nas abelhas operárias</i>	17
3.2. <i>Marcadores de estresse oxidativo nas abelhas operárias</i>	18
3.3. <i>Atividade das enzimas antioxidantes nas abelhas rainhas</i>	19
3.4. <i>Marcadores de estresse oxidativo nas abelhas rainhas</i>	19
4. DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

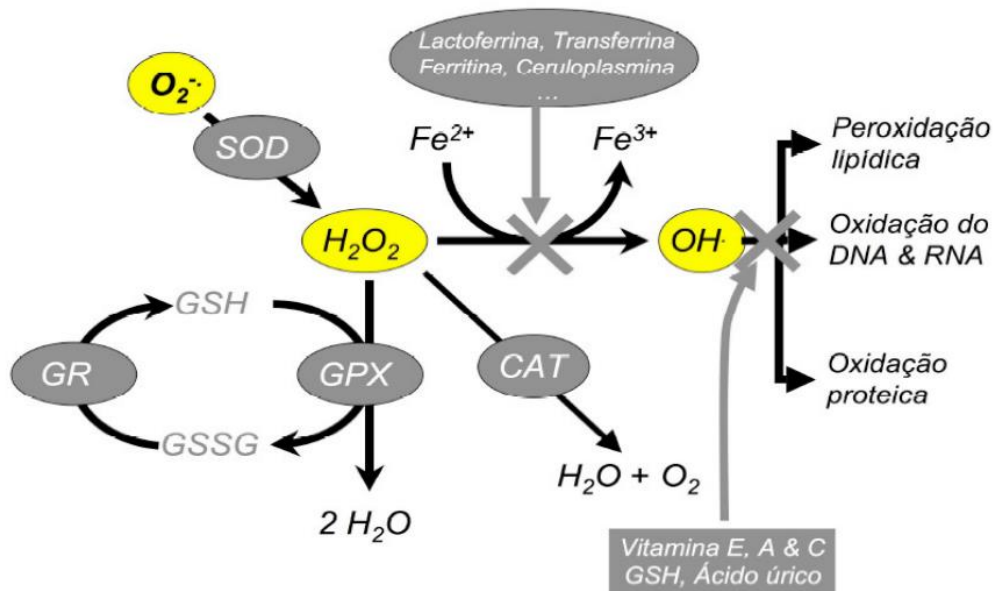
1.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa antioxidantes do organismo, que pode ocorrer tanto pelo excesso na produção dessas espécies reativas, quanto pela redução da capacidade antioxidante (Sies, 1985; 1986; 1991). As EROs são moléculas instáveis e extremamente reativas, devido a presença de elétrons desemparelhados nas suas camadas mais externas, que podem reagir com outras moléculas. Elas são formadas naturalmente por diferentes vias metabólicas e em maior quantidade em condições de estresse (Sies, 1997; Sharma et al., 2012).

As mitocôndrias são a principal fonte de EROs produzidas de forma endógena, que ocorre em razão da ineficiência do metabolismo mitocondrial e consequente escape de elétrons da cadeia transportadora. Apesar desse processo ser fundamental para a manutenção da vida, esses elétrons que se perdem podem reagir com outras moléculas e causar diversos danos às células, como, peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, alteração na estrutura das proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, podendo levar a morte celular (Felton, 1995; Felton e Summers, 1995; Hamanaka e Chandel, 2010; Pardini, 1995; Silva e Ferrari, 2011). Os danos celulares causados pelo acúmulo de EROs são considerados como a base para as teorias do envelhecimento, estando associados também a doença neurodegenerativa como Alzheimer e Parkinson, além de certos tipos de câncer e diabetes (Finkel e Holbrook, 2000; Cruzat et al., 2007; Markesbery, 1997; Beckman e Ames, 1998; Harman, 2006; Pandey et al., 2010).

A proteção dos organismos contra as EROs, dá-se por meio dos sistemas de defesa antioxidantes, sendo estes enzimáticos ou não (Sies, 1997). As principais enzimas antioxidantes produzidas são a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (Felton e Summers, 1995; Ranson et al., 1997; 2000; 2001; Halliwell e Whiteman, 2004; Tu e Akgül, 2005; Rodrigo et al., 2007). O sistema não enzimático é representado por uma variedade de substâncias de origem endógena ou obtidas a partir dos alimentos consumidos como as vitaminas A, C e E (Fig. 1) (Ferreira e Matsubara, 1997; Schneider e Oliveira, 2004).

Figura 1: Ação dos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SOD– Superóxido dismutase; GR– Glutathiona redutase; GSH e GSSG – Formas reduzida e oxidada da Glutathiona; CAT– Catalase; DNA – Ácido Desoxirribonucleico; RNA– Ácido Ribonucleico).



Fonte: Ferreira et al., 2007.

O nosso corpo tende a manter essas EROs sob controle, todavia, alguns fatores exógenos, como, radiação UV, excesso de atividade física, contato com poluentes e pesticidas, podem aumentar a produção de radicais livres e consequentemente reduzir as defesas antioxidantes.

Os insetos, por terem que lidar com uma grande variedade de fatores abióticos e bióticos durante seu ciclo biológico, como as flutuações térmicas, contato com diferentes poluentes e doenças transmissíveis por patógenos, fizeram com que eles se tornassem excelentes fontes de estudos para compreender melhor a influência desses fatores sobre o estresse oxidativo (Ahmad, 1995; Wang et al., 2001; Lalouette et al., 2011).

1.2. Desenvolvimento das abelhas

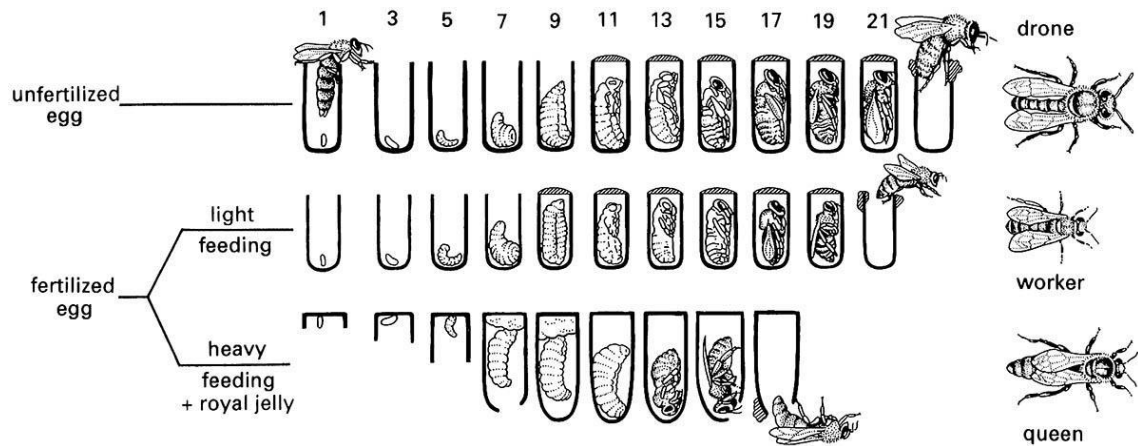
As abelhas da espécie *Apis mellifera*, conhecidas popularmente como abelhas europeias ou ocidentais, pertencem a ordem Hymenoptera, grupo cujas espécies são altamente eusociais e com uma característica bem marcante, a divisão de trabalho. Essas abelhas possuem grande importância econômica, atuando na polinização,

produção de mel, cera e no controle biológico. (Ramos e Carvalho, 2007). Os indivíduos pertencentes a essa ordem, apresentam metamorfose completa e indireta, mais conhecida como holometábola, os quais perpassam por quatro fases distintas durante seu desenvolvimento (embrião, larva, pupa e o adulto). Ao final do processo, depois de sucessivas mudas, vemos um indivíduo adulto, completamente diferente da larva de origem (Cruz-Landim, 2009).

A fase larval, inicia-se aproximadamente três dias após a postura dos ovos, com a eclosão das larvas. Esse período do ciclo de vida das abelhas é voltado principalmente para a alimentação e o crescimento, onde, por conseguinte ocorrem sucessivas divisões celulares. As larvas, são imaturos simples, desprovidas de apêndices externos (ferrão, asas e antenas), olhos e apresentam aparelho bucal simples, porém, possuem um longo sistema digestório. Elas são alimentadas continuamente com uma substância nutritiva produzida pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeanas das abelhas nutridoras. Conforme crescem, o processo de ecdise que ocorre para a troca das cutículas, caracteriza os cinco instares larvais. Ao final do último instar, as larvas mudam sua posição, ficando eretas e imóveis, não se alimentam mais e eliminam todo o seu conteúdo intestinal. Nessa fase, os alvéolos onde elas se encontram são selados e elas começam a tecer seu casulo, sendo comumente chamadas de pré-pupas (Michelette e Soares, 1993; Rachinsky et al., 1990; Winston, 1987).

A fase de pupa tem início com a eliminação da cutícula larval e a exposição da cutícula pupal. O tempo de duração do estágio pupal varia entre as diferentes espécies, sexo e castas, e é nele onde ocorrem as complexas modificações na estrutura corpórea das abelhas (Fig. 2). A classificação das pupas, à medida que se desenvolvem, é realizada com a análise de alguns parâmetros, como, pela diferença da coloração dos olhos (pupa de olho branco, rosa, vermelho, marrom e preto), alterações na estrutura do corpo e a pigmentação e esclerotização da cutícula (Cruz-Landim, 2009; Winston, 1987).

Figura 2: Duração dos estágios de desenvolvimento da abelha *Apis mellifera* nas diferentes castas.



Fonte: Disponível em: <http://www.entomologa.ru/figures/129.htm>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

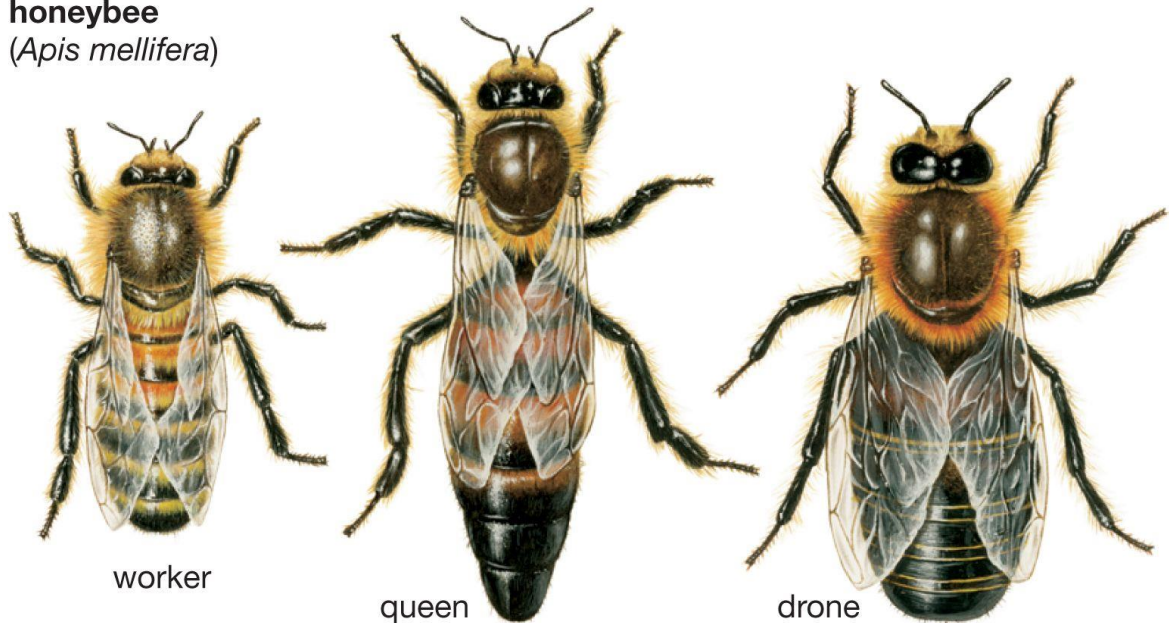
Diferente da fase larval, também chamado de período de crescimento dos insetos, na fase de pupa quase não se observa a ocorrência de divisões celulares, estando mais relacionado com as alterações das células e os processos morfogenéticos, do que com a proliferação celular. Processos de rearranjos, diferenciação e morte celular são geneticamente programados e são essenciais durante a metamorfose, visto que as funções desempenhadas pelos órgãos internos das abelhas, são diferentes nas larvas e nos adultos. Um exemplo dessas mudanças que ocorrem nas pupas é o do canal alimentar, o qual é amplamente remodelado para atender as necessidades das abelhas adultas. Todavia, outras estruturas como a musculatura, podem sofrer diferentes processos de transformação, como, destruição, substituição por outro que tenha função nos adultos, remodelação e até a formação de novas estruturas. Além disso, é também durante a pupação que ocorre a distinção das partes corporais (cabeça, tórax e abdômen) e o desenvolvimento dos apêndices externos (Borror, 1992; Cruz-Landim, 2009; Locke, 1985).

A última fase de desenvolvimento das abelhas, inicia-se quando a cutícula pupal é eliminada e assim expõem a cutícula definitiva da abelha adulta. A troca dessa última muda, transforma a pupa em adulto. Durante esse estágio já não ocorrem mais alterações em relação ao tamanho e a estrutura do corpo, somente o exoesqueleto, alguns órgãos e tecidos sofrem singelas modificações para se tornarem funcionais nos indivíduos adultos. Dessa forma, as abelhas, com suas mandíbulas, rompem o opérculo dos alvéolos onde elas se encontram e emergem (Fig. 3). As asas e antenas então se desdobram e esses adultos recém-emergidos estão prontos para realizar as tarefas da colmeia (Winston, 1987).

As abelhas vivem em colônias hierarquicamente organizadas, formada por indivíduos de diferentes sexos e castas (rainha, zangão e operárias), os quais possuem funções bem distintas (Fig. 3).

Figura 3: Sexos e castas da abelha *Apis mellifera*.

honeybee
(*Apis mellifera*)



© 2012 Encyclopædia Britannica, Inc.

Fonte: Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

A rainha, fêmea fértil da colônia, tem como função principal a postura de ovos para a formação dos demais indivíduos, além disso é ela que mantém a ordem social da colmeia, através da liberação de feromônios. Os zangões, indivíduos machos da colônia, tem por função a fecundação da rainha durante o voo nupcial. Já as operárias, fêmeas inférteis, são elas que fazem toda a manutenção e defesa da colmeia (Free, 1980; Le Conte et al., 1995; Michener, 1974; Pankiw, 1998; Wilson, 1971). O fator determinante para essa diferenciação entre as duas castas de fêmeas (rainha e operárias), é o tipo de alimento que recebem durante seu desenvolvimento. As larvas das abelhas operárias e rainhas, até o seu terceiro dia de vida, não apresentam diferenças, nem na questão morfológica e nem em relação ao alimento que recebem. A partir do terceiro dia de desenvolvimento, as larvas destinadas a se tornarem rainhas continuam sendo alimentadas com uma substância esbranquiçada e muito nutritiva, chamada de geleia real (Rachinsky et al., 1990). Enquanto isso, as operárias passam a receber uma mistura não tão nutritiva, composta de água, mel e pólen. Essa

diferença na alimentação que passam a receber após o terceiro dia de vida, faz com que essas duas castas tenham um desenvolvimento ovariano diferente, tornando a abelha rainha a única fêmea fértil da colônia. Além disso, é a geleia real, esse alimento rico em vitaminas, proteínas e minerais, que faz com que as abelhas rainhas sejam maiores e mais fortes, e com longevidade maior do que a das operárias e zangões (Cruz-Landim, 2009; Chen e Chen, 1995; Borguini et al., 2012; Townsend e Lucas, 1940).

As abelhas apresentam uma alta flexibilidade em relação a expectativa de vida (Rueppell et al., 2004). As rainhas podem viver cerca de dois anos; os zangões, por sua vez, vivem em média 26 dias, porém morrem logo após a cópula, e as operárias, em condições normais, vivem entre 20 e 40 dias (Winston, 1987; Page e Peng, 2001). Essa plasticidade, observada entre as abelhas operárias, está relacionada com as tarefas que desempenham na colmeia e não especificamente com a idade (Amdam e Page, 2005). Normalmente, as primeiras tarefas realizadas pelas operárias são dentro da colmeia (cuidado com as crias e manutenção da colmeia, por exemplo) e mais tarde, cerca de 18 a 28 dias após emergidas, elas saem para forragear (busca por alimento e água) (Winston, 1987). No entanto, o início do forrageamento não está somente associado com a idade cronológica, mas, pode variar de acordo com a necessidade da colônia (Amdam et al., 2005). Essa atividade de forrageamento ativa pode estar relacionada com a alta produção de EROs e consequente acúmulo de danos oxidativos, visto que, após 1 a 2 semanas a maioria das forrageiras morrem (Visscher e Dukas, 1997; Williams et al., 2008).

Buscando compreender sobre a influência do processo da metamorfose, da alimentação, bem como da atividade desempenhada pelas abelhas adultas e sua relação com o estresse oxidativo, o nosso trabalho teve por objetivo traçar e comparar o perfil oxidativo das abelhas rainha e operárias de *A. mellifera* ao longo de todo o seu desenvolvimento e na fase adulta, a fim de entender melhor essa relação; e determinar as alterações enzimáticas que ocorrem em cada uma dessas fases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material biológico e preparo das amostras

Indivíduos de *A. mellifera* foram coletados no Apiário Central do departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). As

abelhas operárias foram provenientes de três colônias diferentes. As rainhas foram obtidas através da técnica de produção artificial de abelhas rainhas, que consistiu na transferência de larvas de operárias (de uma colônia selecionada) com três dias de idade para realeiras artificiais de cera (Doolittle, 1889).

As abelhas coletadas foram selecionadas em diferentes fases do desenvolvimento, com o intuito de abranger o período pós-embrionário: larvas (3 dias (L3) e 6 dias (L6)), pré-pupas (PP), pupas de olho rosa (P), e adultos recém-emergidos (NE). Além disso, incluímos abelhas operárias (nutridoras (N) e forrageadora (F)) e rainhas recém-emergidas (Q) nos experimentos. Para confirmar se as abelhas coletadas eram realmente nutridoras, a presença das glândulas hipofaríngeas, que se encontram mais desenvolvidas nesses indivíduos e se apresentam em forma de ácinos grandes, foram observadas na lupa. Já as abelhas forrageiras, foram coletadas na entrada da colmeia e todas possuíam polén em suas corbículas. Foram utilizados 15 indivíduos de cada estágio para todas as análises, exceto L3, em que utilizamos 30 indivíduos devido ao seu tamanho.

As abelhas foram colocadas em microtubos de 1.5 mL e homogeneizadas (Homogeneizador BioSpec 985370-04 Tissue-Tearor) em tampão fosfato de sódio (PBS) (50 mM, pH 7.8). Os homogenatos foram centrifugados a $10000 \times g$ durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados para análise das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e marcadores de estresse oxidativo, malondialdeído (MDA). Os pellets foram utilizados para a quantificação de proteínas carboniladas (CP).

2.2. Atividade das enzimas antioxidantes

A enzima catalase foi determinada de acordo com o método de Hadwan e Abed (2016), com algumas modificações. A atividade da enzima foi mensurada incubando 10 μ L do sobrenadante em 190 μ L do substrato de reação (50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7.4 contendo 20 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)) por 3 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida com uma solução de molibdato de amônio (32.4 mmol/L). O consumo do peróxido de hidrogênio pela catalase foi determinado usando um espectrofotômetro de varredura de placa (Thermo Scientific - Multiskan GO) a 374 nm e a atividade dessa enzima calculada em unidade (U) de CAT por mL.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi baseada na capacidade desta em catalisar a reação do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio e água diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol (Marklund, 1974). Em particular, 10 μ L do sobrenadante dos homogenatos foram adicionados em microplaca de poliestireno, incubados com 170 μ L de PBS e realizada a leitura em espectrofotômetro de varredura de placa a 320 nm para a determinação do branco. Em seguida, a reação foi iniciada quando adicionado 20 μ L de pirogalol (100 μ mol/L) e incubada por 30 minutos. Após esse período, a absorbância foi novamente medida em espectrofotômetro de varredura de placa a 320 nm e os dados expressos em U de SOD por mL.

A determinação da enzima glutathione S-transferase foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm (Habig et al., 1974). A formação do conjugado glutathione-1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) ocorre em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST. Em uma cubeta de quartzo, 5 μ L do sobrenadante foram adicionados, juntamente com 5 μ L de glutathione reduzida (GSH) (0.1M), 5 μ L de CDNB (0.1M) e 485 μ L de PBS (50 mM, pH 7.4). Essa solução foi homogeneizada cuidadosamente e a cubeta foi colocada no espectrofotômetro para iniciar a leitura. O aumento da absorbância foi monitorado durante 90 segundos a 340 nm. O coeficiente de extinção molar do CDNB é $\epsilon_{340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os dados expressos em U de GST por mL.

2.3. Peroxidação lipídica

A dosagem do MDA consistiu em tratar o sobrenadante do homogenato de abelhas com solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0.375% de ácido tiobarbitúrico e HCl 0.25 M) e deixar em banho maria por 15 minutos a 90°C. Posteriormente essa solução foi resfriada em um recipiente contendo água e gelo e centrifugada a 5000 $\times g$ por 10 minutos. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi quantificada pela absorção de luz em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 535 nm (Buege e Aust, 1978). O coeficiente de extinção molar $1.56 \times 10^{-5} \text{ M cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os dados expressos como concentração de MDA (nmol).

2.4. Análise da oxidação proteica

A oxidação de proteínas foi determinada através da concentração de proteínas carboniladas e quantificadas pelo ensaio bioquímico utilizando dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de PBS (0.1M), e divididos em 2 alíquotas iguais, denominados branco (500 μ L) e teste (500 μ L). As amostras destinadas ao teste foram incubadas com 500 μ L da solução de DNPH 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 2.5 M, enquanto que as do branco, foi incubado com 500 μ L de HCl a 2.5M. Ambas as alíquotas foram misturadas no vórtex e mantidas em temperatura ambiente no escuro durante 1 hora. Após a incubação, branco e teste foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, agitadas no vórtex, centrifugadas a 10000 $\times g$ por 10 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. Os precipitados formados foram lavados 3 vezes com 1 mL de solução etanol:acetado de etila (1:1) e centrifugados a 10000 $\times g$ por 10 minutos a 4 °C. Após a última lavagem, os pellets foram ressuspensos em duodecil sulfato de sódio (SDS) 6%. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas carboniladas, o qual foi mensurado em espectrofotômetro a 370 nm (Levine et al., 1990). O total de proteínas carboniladas foi calculado com o coeficiente de extinção molar de $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em μmol .

2.5. Análises Estatísticas

Os dados bioquímicos foram analisados com análise de variância ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas com o teste HSD de Tukey ao 5% de significância. Em adição, o teste de D'Agostino-Pearson foi usado para conferir a heterogeneidade dos dados e satisfazer as primícias de normalidade. Os resultados (média \pm desvio padrão) de cada experimento foram mostrados em gráficos usando o programa GraphPad Prism v.6.0.

3. RESULTADOS

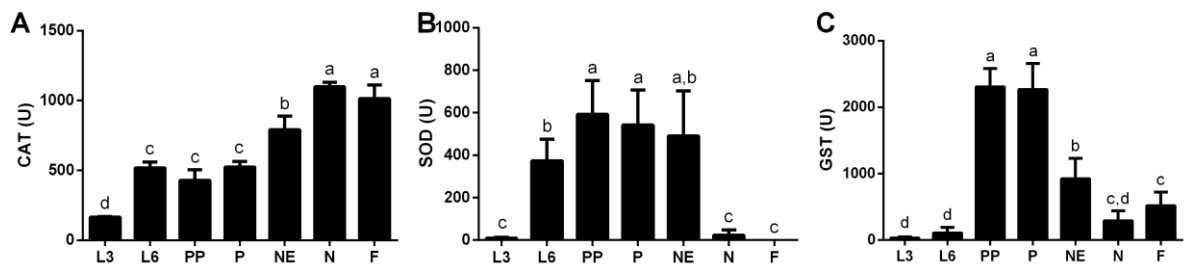
3.1. Atividade das enzimas antioxidantes nas abelhas operárias

Os estágios de desenvolvimento de *A. mellifera* apresentaram diferenças na atividade de CAT ($F_{6,122} = 462.7$; $P < 0.0001$). A atividade da enzima CAT teve um aumento gradativo ao longo da vida das abelhas. Maior atividade enzimática foi observada nas fases adultas (N e F) e menor atividades nas L3, seguidas de L6, PP e P, as quais apresentaram resultados semelhantes (Fig. 4A).

Na atividade da enzima SOD, foram encontradas diferenças entre os estágios de desenvolvimento de *A. mellifera* ($F_{6,91} = 67.57$; $P < 0.0001$), com aumento nas PP, P e NE. A atividade de SOD foi praticamente nula nas L3 e nos adultos (N e F) (Fig. 4B).

A análise da enzima GST mostrou diferenças entre os estágios de desenvolvimento de *A. mellifera* ($F_{6,106} = 287.0$; $P < 0.0001$), exibindo maior atividade nas PP e P, seguida pelas NE, F e N e menor atividade nas fases larvais L3 e L6 (Fig. 4C).

Figura 4: Atividade das enzimas antioxidantes em diferentes fases do desenvolvimento de operárias *Apis mellifera*. Larva de 3 dias (L3), larva de 6 dias (L6), pré-pupa (PP), pupa (P), recém-emergida (NE), nutridora (N) e forrageira (F). (A) CAT: catalase; (B) SOD: superóxido dismutase; (C) GST: glutiona S-transferase. As letras acima das colunas denotam a diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0.05$).



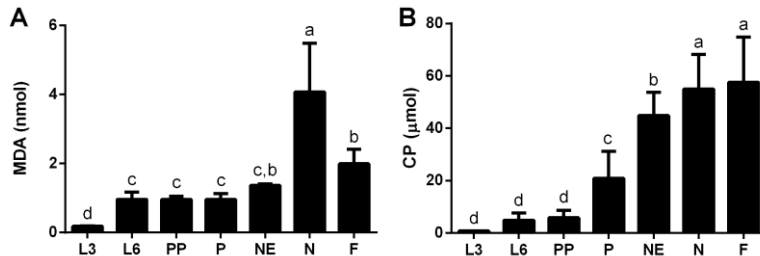
3.2. Marcadores de estresse oxidativo nas abelhas operárias

As concentrações de MDA foram diferentes entre os estágios de desenvolvimento de *A. mellifera* ($F_{6,89} = 63.76$; $P < 0.0001$), sendo maiores nas N, seguidas de F. Menores concentrações foram observadas nas L3 e valores intermediários nas L6, PP e P (Fig. 5A).

As concentrações de CP foram diferentes entre os estágios de desenvolvimento de *A. mellifera* ($F_{6,129} = 123.8$; $P < 0.0001$) com aumento crescente durante a vida das abelhas. As maiores concentrações foram observadas nas abelhas adultas N e F e as menores concentrações nas fases iniciais de desenvolvimento L3, L6 e PP (Fig. 5B).

Figura 5: Marcadores de estresse oxidativo em diferentes fases do desenvolvimento de operárias *Apis mellifera*. Larva de 3 dias (L3), larva de 6 dias (L6), pré-pupa (PP),

pupa (P), recém-emergida (NE), nutridora (N) e forrageiras (F). (A) MDA: malondialdeído; (B) CP: proteína carbonilada. As letras nas colunas denotam a diferença estatística entre os estágios de desenvolvimento ($P < 0.05$).



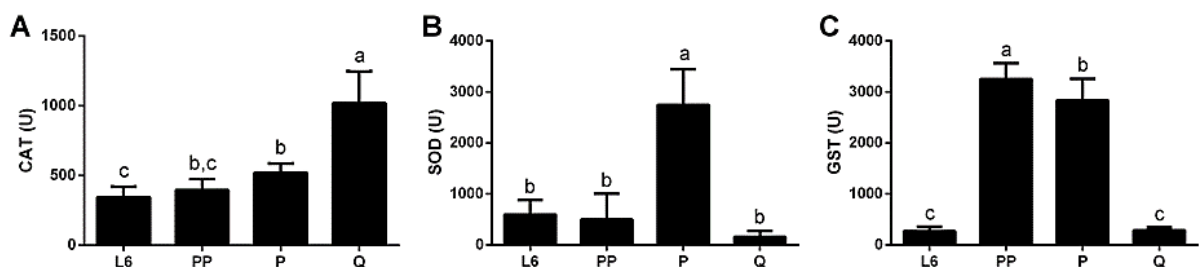
3.3. Atividade das enzimas antioxidantes nas abelhas rainhas

A atividade enzimática de CAT mostrou diferenças dentre as fases analisadas ($F_{3,43} = 64.92$; $P < 0.0001$). A atividade da enzima CAT aumentou gradativamente ao longo de seu desenvolvimento, sendo maior na fase adulta (Q) (Fig. 6A).

A atividade enzimática da SOD apresentou diferença ($F_{3,35} = 56.92$; $P < 0.0001$), com valores significativamente maiores nas P, quando comparados aos demais estágios (Fig. 6B).

Os valores obtidos de GST apresentaram diferença de atividade ($F_{3,43} = 413.0$; $P < 0.0001$), sendo que nas PP e P apresentaram valores significativamente maiores do que nos demais estágios (Fig. 6C).

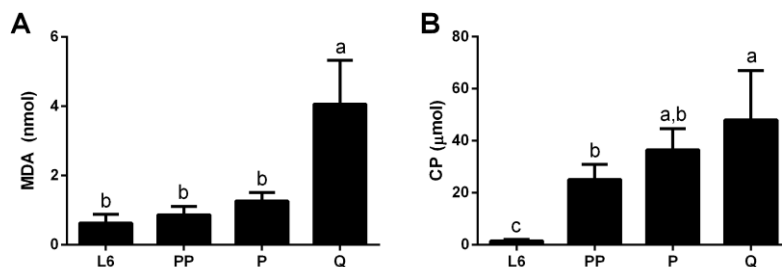
Figuras 6: Atividade das enzimas antioxidantes nos diferentes estágios do desenvolvimento de rainhas *Apis mellifera*. Larva de 6 dias (L6), pré-pupa (PP), pupa (P) e rainha adulta (Q). (A) CAT: catalase; (B) SOD: superóxido dismutase; (C) GST: glutathione S-transferase. As letras acima das colunas denotam a diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0.05$).



3.4. Marcadores de estresse oxidativo nas abelhas rainhas

Os perfis dos produtos de peroxidação lipídica (MDA) ($F_{3,41} = 68.4$; $P < 0.0001$) (Fig. 7A) e proteína carbonilada (CP) ($F_{3,43} = 41.68$; $P < 0.0001$) (Fig. 7B) foram muito semelhantes entre si. As concentrações de CP foram muito superiores às de MDA, mas ambos os marcadores apresentaram valores crescentes ao longo do desenvolvimento, atingindo seu pico na fase adulta (Q).

Figura 7: Marcadores de estresse oxidativo nos diferentes estágios do desenvolvimento de rainhas *Apis mellifera*. Larva de 6 dias (L6), pré-pupa (PP), pupa (P) e rainha adulta (Q). (A) MDA: malondialdeído; (B) CP: proteína carbonilada. As letras nas colunas denotam a diferença estatística entre os estágios de desenvolvimento ($P < 0.05$).



4. DISCUSSÃO

A primeira linha de defesa contra as EROs, produzidas principalmente nas mitocôndrias, é a enzima SOD, que catalisa a dismutação de radicais superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Droge 2002; Corona e Robinson 2006). A atividade enzimática de SOD nas abelhas operárias começaram baixas nas L3, aumentaram nas L6 e atingiram o pico nas PP, P e NE. Um perfil semelhante ao encontrado nas abelhas operárias foi observado nas abelhas rainhas, cuja atividade de SOD foi menor nos estágios iniciais (L6 e PP) e significativamente maiores nas P. Farjan et al. (2012), que analisaram a abelha *Apis mellifera carnica* em diferentes fases de seu desenvolvimento (larvas, pré-pupas, pupas de diferentes idades e recém-emergida), também observaram um crescente aumento da enzima SOD, até a fase de pupa, com menor atividade nos adultos. As pupas são o estágio intermediário entre as larvas e os adultos, e é nela que ocorrem as transformações fisiológicas e morfológicas e das abelhas (Cruz-Landim, 2009). Diante disso, acredita-se que, durante o período de desenvolvimento das abelhas dentro dos alvéolos, são nas fases de pré-pupas e pupas que elas sofrem maior estresse, em detrimento das inúmeras

mudanças. Essa maior atividade de SOD, teria então como objetivo proteger essas abelhas dos danos que poderiam ser causados por esse estresse oxidativo.

Subsequentemente, a atividade da SOD diminui novamente nos adultos das abelhas operárias, assim como nas rainhas (N, F e Q). Resultados similares foram encontrados nos músculos de voo das abelhas adultas de *A. mellifera* (Margotta et al., 2018). Esses dados demonstram a relação entre a baixa atividade da enzima SOD e a intensa atividade de voo, visto que os danos causados por conta da alta demanda energética necessária para o voo, não foram supridos pela enzima antioxidante. Além disso, já é sabido que as atividades desempenhadas pelas abelhas adultas, bem como seu contato com patógenos e estressores ambientais, afeta a sua imunidade tornando-as suscetíveis ao estresse oxidativo (VanEngelsdorp e Meixner, 2010; Lalouette et al., 2011; Korayem et al., 2012; Orčić et al., 2017).

A função primária da catalase é prevenir o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da reação de decomposição em água (H_2O) e gás oxigênio (O_2), para que estes não causem danos às células e tecidos (Murzakhmetova et al., 2008; Shangari e O' Brien, 2006). A atividade enzimática de CAT se manteve alta durante quase todo o período de desenvolvimento das abelhas operárias e rainhas. Resultados semelhantes foram observados por Farjan et al. (2012), que encontraram alta atividade da CAT em todos os estágios analisados.

A catalase é uma enzima que está presente em maiores proporções nas mitocôndrias e nos peroxissomos, sendo encontrados altos níveis desta nos músculos de voo das abelhas melíferas (Halliwell e Gutteridge 1989; Powers et al., 1994; Williams et al., 2008). Esta informação está de acordo com nossos resultados, uma vez que as maiores atividades de CAT foram observadas nas fases adultas de ambas as castas (operárias (N e F) e rainhas adultas (Q)). Outro trabalho que também corrobora com os nossos dados, foram os de Margotta et al. (2018), cuja atividade de CAT nos músculos de voo de *A. mellifera* também foram altas, denotando que essa enzima funciona como um mecanismo de defesa crucial para esses insetos.

Embora tenha sido observada baixa atividade das enzimas CAT e SOD nos estágios larvais, vale ressaltar que este fato pode estar relacionado a inibições por *feedback*. Estudos verificaram que a enzima SOD pode ser suprimida devido ao excesso de H_2O_2 , que associado ao radical superóxido (O_2^-), no seu sítio ativo, acarreta na auto-inibição. De forma similar, a enzima CAT pode ser inativada em consequência dos elevados níveis de O_2^- (Fridovich, 1986; Valentine e Hart, 2003).

Essa relação entre as altas concentrações do radical superóxido e a inibição dessas duas enzimas nessas fases, pode ser explicado pelo intenso processo de metabolização, que ocorre devido à alta ingestão de alimentos ricos em lipídeos, que eleva a taxa de respiração celular e conseqüentemente aumenta a produção de O_2^- (Wajchenberg, 2002; Giacco e Brownlee, 2010).

Outra enzima crítica na defesa das células contra o estresse oxidativo é a glutathione transferase ou S-transferase. As GSTs compreendem um grupo de enzimas cuja função é auxiliar na desintoxicação do organismo, através da eliminação de xenobióticos, que ocorre pela conjugação destes com a glutathione reduzida (GSH). Dessa forma, esses compostos se tornam mais solúveis e fáceis de serem excretados pelas células. (Hayes et al., 2005). A atividade enzimática da GST foi significativamente maior nas fases de PP e P, tanto nas abelhas operárias como nas rainhas. Padrões similares aos desse trabalho foram observados durante o desenvolvimento de outros grupos de insetos (*Lucilia cuprina*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella* e *Tenebrio molitor*), os quais apresentaram maior atividade enzimática na fase de pupa, sendo esta pouco ativa na fase adulta (Kotze e Rose, 1987; Hazelton e Lang, 1983; Kostaropoulos et al. 1996). Perfis semelhantes aos apresentados também foram observados durante o desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera ligustica* e *Apis cerana*, cuja atividade de GST na fase de pupa foi maior do que nas larvas e nos adultos (Diao et al., 2006). Outro resultado que corrobora aos nossos, em relação aos indivíduos adultos, foram obtidos por Orčić et al. (2017), que analisaram abelhas operárias da espécie *A. mellifera carnica*.

Estudos demonstram que essa baixa atividade de GST observada nos indivíduos adultos é comum nos mamíferos, assim como nos insetos (Gregus et al., 1985; Kotze e Rose, 1987). Possivelmente este fato esteja relacionado a redução do corpo gorduroso das abelhas, que ocorre durante a vida adulta. O corpo gorduroso é um órgão que, dentre outras funções, está relacionado com o processo de desintoxicação e já é sabido que este sofre um processo de retração ao longo da vida das abelhas. Dessa forma, o menor volume do corpo gorduroso ocasiona em uma maior susceptibilidade das abelhas adultas aos xenobióticos, como os inseticidas, por exemplo, bem como apresentam uma menor atividade da GST, visto que o abdômen é a principal fonte dessa enzima (Cruz-Landim, 2009; Diao et al., 2006). Ao contrário dos adultos, a alta atividade da GST observadas nas fases de PP e P pode ser explicada pela elevada taxa biossintética, que ocorre em virtude da metamorfose, e

que está associada a alta capacidade de desintoxicação, sendo um importante mecanismo de proteção durante o desenvolvimento das abelhas (Diao et al., 2006).

O malondialdeído é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e importante biomarcador do estresse oxidativo. O dano tecidual causado por essa peroxidação lipídica está relacionado à patogênese de muitas doenças (Esterbauer et al. 1991; Mylonas e Kouretas 1999; Joosten 2001; Kesavulu et al. 2001; Scott et al. 2003). As concentrações deste biomarcador permaneceram baixas durante quase todo o período de desenvolvimento das abelhas rainhas e operárias (L3, L4, PP, P, NE e F). As baixas concentrações de MDA nas PP, P e NE podem ser explicadas pelas enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT, que apresentaram altas atividades durante essas fases e, por conseguinte, preveniram os danos oxidativos. Nas abelhas nutridoras e rainha adultas, as concentrações de MDA foram significativamente maiores, o que possivelmente está associado a menor atividade das enzimas SOD e GST. Somado a isso, outro fator que acarreta esse aumento de MDA são as altas taxas metabólicas que apresentam os indivíduos adultos. Nas abelhas nutridoras, as glândulas mandibulares e hipofaringeanas são muito ativas, pois são elas que produzem o alimento que será ofertado as larvas durante todo o seu desenvolvimento. Nas rainhas, o número de ovários aumenta e estes se tornam mais alongados, para que elas consigam colocar os milhares de ovos todos os dias (Cruz-Landim, 2009; Winston, 1987). Embora esperássemos encontrar concentrações de MDA, nas abelhas operárias forrageiras, similares às das nutridoras e rainhas, devido ao seu alto consumo de oxigênio que é ocasionado pela intensa atividade de voo, isso não foi observado.

Semelhante ao MDA, a proteína carbonilada também é um marcador biológico de estresse oxidativo, que está associado à progressão de muitas doenças (Hensley et al., 1994; Alam et al., 1997; Floor e Wetzel, 1998; Smith et al., 1998; Stadtman e Levine, 2000). A concentração de CP teve um aumento gradual ao longo de todo o desenvolvimento das abelhas operárias e rainhas (L3, L6, PP, P e NE), atingindo o pico nas fases adultas de ambas as castas (N, F e Q). O resultado da CP nos adultos coincide com a redução das atividades enzimáticas de SOD e GST. Essa correlação mostra a importância dessas enzimas na minimização dos danos causados pelo estresse oxidativo, pois, nas fases em que as enzimas antioxidantes apresentaram baixas atividades, foram observados maiores danos oxidativos. Além disso, o estresse sofrido por essas duas castas de abelhas, devido ao trabalho realizado dentro da

colônia, leva ao aumento da produção de EROs e seu acúmulo ocasiona em danos oxidativos, pois ocorre sobrecarga das defesas antioxidantes (Margotta et al., 2018; Seehuus et al., 2006; Winston, 1987).

5. CONCLUSÃO

As abelhas operárias e rainhas de *A. mellifera* apresentam um perfil oxidativo muito semelhante durante sua vida. O período de desenvolvimento das abelhas dentro dos alvéolos (L3, L6, pré-pupas e pupas) apresentou menores danos moleculares e teciduais, o que possivelmente está relacionado com a alta atividade das enzimas antioxidantes nessas mesmas fases. A atividade enzimática da CAT foi maior nas fases adultas, enquanto que da SOD e da GST foram maiores nas fases de PP e P, o que nos mostra que cada uma dessas enzimas tem uma relevância maior em fases diferentes do desenvolvimento das abelhas. Em contraste, os adultos apresentaram maiores concentrações dos marcadores de estresse oxidativo (MDA e CP), uma vez que, o trabalho intenso dentro e fora da colmeia e o contato com inúmeros estressores ambientais, causam danos extremos as células, sem que as enzimas os reparem. Esse acúmulo de danos está intimamente ligado à longevidade das abelhas.

Embora o perfil oxidativo de ambas as castas tenha sido semelhante, dado que analisamos abelhas rainhas recém-emergidas, as diferenças nas funções que elas desempenham e na alimentação que recebem ao longo da vida, influenciam na sua longevidade, pois é fato que as abelhas rainhas vivem muito mais que as operárias. A geleia real, alimento recebido pelas abelhas rainhas durante toda a vida, e que possui um poderoso potencial antioxidante, provavelmente auxilia as enzimas antioxidantes na prevenção ao estresse oxidativo.

Este trabalho servirá de controle para muitos outros os quais queiram analisar o perfil das abelhas operárias e rainhas de *Apis mellifera* e observar algum tipo de alteração diante de um tratamento, por exemplo, além de servir como base para outros estudos de bioquímica, fisiologia e enzimologia desses insetos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121–126). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- AHMAD, S. (1995). Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **29**(2), 135-157. <https://doi.org/10.1002/arch.940290205>
- ALAM, Z.I., DANIEL, S.E., LEES, A.J., MARSDEN, D.C., JENNER, P., HALLIWELL, B. (1997). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J. Neurochem.* **69**, 1326–1329. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031326.x>
- AMDAM, G.V., AASE, A.L.T., SEEHUUS, S.C., FONDRK, M.K., NORBERG, K., HARTFELDER, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* **40**, 939–947. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- AMDAM, G.V., PAGE JR, R.E. (2005). Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. *Ageing Res. Rev.* **4**, 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.007>
- BECKMAN, K.B., AMES, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- BELO, M.F.R.F., SOUZA, A.L.F. (2016). Estudo cinético da enzima catalase (EC 1.11.1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). *Sci. Plena.* **12**(7). <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2016.071001>
- BORGUINI, R.G., DUARTE, F., ALVES, M.L.T.M.F., TEIXEIRA, E.W., MORETI, A.D.C. (2012). Avaliação do potencial antioxidante da geleia real ao longo do tempo de armazenamento. *Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n3p257>
- BORROR, D. J., TRIPLEHORN, C. A., JOHNSON, N. F. (1992). An Introduction To Study Of Insect. 6th ed, *Saunders College Pub.*, Philadelphia, Pennsylvania.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* (Vol. 52, pp. 302–310). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- CORONA, M., ROBINSON, G.E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.* **15**, 687–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x>
- CRUZAT, V.F., ROGERO, M.M., BORGES, M.C., TIRAPÉGUI, J. (2007). Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev. Bras.*

Med. Esporte. **13**, 336–342. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922007000500011>

- DIAO, Q., YUAN, K., LIANG, P., GAO, X. (2006). Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. *Journal of Apicultural Research*. **45**(3), 145-152. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101333>
- DROGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med.* **11**, 81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- FARJAN, M., DMITRYJUK, M., LIPÍŃSKI, Z., BIERNAT-ŁOPIEŃSKA, E., ŻÓŁTOWSKA, K. (2012). Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *J. Apic. Res.* **51**, 263–270. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.07>
- FELTON, G.W. (1995). Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology* (pp. 356-434). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9689-9_10
- FELTON, G.W., SUMMERS, C.B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **43**, 61–68.
- FERREIRA, F., FERREIRA, R., DUARTE, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, **7**(2):257-275.
- FINKEL, T., HOLBROOK, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **408**(6809), 239. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- FLOOR, E., WETZEL, M.G. (1998). Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.* **70**, 268–275. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010268.x>
- FRIDOVICH, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **247**(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90526-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90526-6)

- GIACCO, F., BROWNLEE, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. **107**(9), 1058-1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- GREGUS, Z., VARGA, F., SCHMELAS, A. (1985). Age-development and inducibility of hepatic glutathione S-transferase activities in mice, rats, rabbits and guinea-pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. **80**(1), 85-90. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90135-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90135-5)
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- HADWAN, M.H., ABED, H.N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*. **6**, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. (1989). Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British J. Pharmacol.* **142**, 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- HAMANAKA, R. B., CHANDEL, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*. **35**(9), 505-513. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002>
- HARMAN, D. (2006). Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *New York Acad. Sci.* **1067**, 10–21. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.003>
- HAYDAK, M.H. (1970). Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 143–156.
- HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- HAZELTON, G.A., LANG, C.A. (1983). Glutathione S-transferase activities in the yellow-fever mosquito [*Aedes aegypti* (Louisville)] during growth and aging. *Biochem. J.* **210**, 281–287. <https://doi.org/10.1042/bj2100281>
- HENSLEY, K., ET AL. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**, 3270–3274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3270>

- JOOSTEN, E. (2001). Homocysteine, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **39**, 717–720. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2001.119>
- KESAVULU, M.M., RAO, B.K., GIRI, R., VIJAYA, J., SUBRAMANYAM, G., APPARAO, C. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **53**, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(01\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(01)00238-8)
- KORAYEM, A.M., KHODAIRY, M.M., ABDEL-AAL, A.A.A., EL-SONBATY, A.A. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *J. Biol. Earth Sci.* **2**, B93–B109.
- KOSTAROPOULOS, I., MANTZARI, A.E., PAPADOPOULOS, A.I. (1996). Alterations of some glutathione S-transferase characteristics during the development of *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 963–969. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00063-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00063-X)
- KOTZE, A.C., ROSE, H.A. (1987). Glutathione S-transferase in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann). *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**, 77–86. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(87\)90086-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90086-1)
- LALOUETTE, L., WILLIAMS, C.M., HERVANT, F., SINCLAIR, B.J., RENAULT, D. (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comp. Biochem. Physiol.* **158**, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.007>
- LANDIM, C.D.C. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora Unesp, São Paulo.
- LEIMAR, O., HARTFELDER, K., LAUBICHLER, M.D., PAGE JR, R.E. (2012). Development and evolution of caste dimorphism in honeybees—a modeling approach. *Ecol. Evol.* **2**, 3098–3109. <https://doi.org/10.1002/ece3.414>
- LEVINE, R.L., ET AL. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 464–478). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- LINKSVAYER, T.A., KAFTANOGLU, O., AKYOL, E., BLATCH, S., AMDAM, G.V., PAGE JR, R.E. (2011). Larval and nurse worker control of developmental plasticity and the evolution of honey bee queen–worker dimorphism. *J. Evol. Biol.* **24**, 1939–1948. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02331.x>
- LOCKE, M. (1985). A structural analysis of post-embryonic development. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **2**, 87-149.

- MARGOTTA, J.W., ROBERTS, S.P., ELEKONICH, M.M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* **221**(14). <https://doi.org/10.1242/jeb.183228>
- MARKESBERY, W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biol. Med.* **23**, 134–147. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00629-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00629-6)
- MARKLUND, S., MARKLUND, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469–474.
- MICHELETTE, E. R. F., SOARES, A. E. E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. **24**(4), 431-440. <https://doi.org/10.1051/apido:19930410>
- MURZAKHMETOVA, M., MOLDAKARIMOV, S., TANCHEVA, L., ABAROVA, S., SERKEDJIEVA, J. (2008). Antioxidant and prooxidant properties of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. in vitro and in vivo. *Phytotherapy Res.* **22**, 746–751. <https://doi.org/10.1002/ptr.2348>
- MYLONAS, C., KOURETAS, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo (Athens, Greece)*. **13**, 295–309.
- ORČIĆ, S., ET AL. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomol. Exp. Appl.* **165**, 120–128. <https://doi.org/10.1111/eea.12633>
- PAGE JR, R.E., PENG, C.Y.S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36**, 695-711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)
- PANDEY, K.B., MISHRA, N., RIZVI, S.I. (2010). Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin. Biochem.* **43**, 508–511. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.11.011>
- PARDINI, R.S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 101–118. <https://doi.org/10.1002/arch.940290203>
- POWERS, S. K., CRISWELL, D., LAWLER, J., JI, L. L., MARTIN, D., HERB, R. A., DUDLEY, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* **266**(2), R375-R380. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.2.R375>
- RACHINSKY, A., STRAMBI, C., STRAMBI, A., HARTFELDER, K. (1990). Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 31–38. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90085-Z)

- RAMOS, J. M., CARVALHO, N. D. (2007). Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. *Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal*, **6**(10), 1-21.
- RANSON, H., ET AL. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **359**, 295–304. <https://doi.org/10.1042/bj3590295>
- RANSON, H., JENSEN, B., WANG, X., PRAPANTHADARA, L., HEMINGWAY, J., COLLINS, F.H. (2000). Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* **9**, 499–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00214.x>
- RANSON, H., PRAPANTHADARA, L.A., HEMINGWAY, J. (1997). Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **324**, 97–102. <https://doi.org/10.1042/bj3240097>
- REGINATO, R.D., CRUZ-LANDIM, C. (2001). Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. *Inv. Rep. Develop.* **39**, 127–134. <https://doi.org/10.1080/07924259.2001.9652475>
- REMBOLD, H., DIETZ, A. (1966) Biologically active substances in royal jelly. *Vitam. Horm.* **23**, 359–382. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60385-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60385-4)
- REMBOLD, H., LACKNER, B., GEISTBECK, I. (1974). The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinator from royal jelly. *J. Insect Physiol.* **20**, 307–314. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(74\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90063-8)
- RIBBANDS, C.R. (1953). The behaviour and social life of honeybee. Bee Research Assoc., London.
- RODRIGO, R., GUICHARD, C., CHARLES, R. (2007). Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* **21**, 111–127. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00466.x>
- RUEPPELL, O., PANKIW, T., NIELSEN, D.I., FONDRK, M.K., BEYE, M., PAGE, R.E. (2004). The genetic architecture of the behavioral ontogeny of foraging in honeybee workers. *Genetics.* **167**, 1767–1779. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.021949>
- SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R.D. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte.* **10**, 308–313. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>
- SCOTT, B., DEMAN, A., PEETERS, P., VAN DEN BRANDEN, C., STOLEAR, J.C., VAN CAMP, G., VERBEELEN, D. (2003). Cardiac troponin T and

- malondialdehyde modified plasma lipids in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **18**, 737–742. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg020>
- SEEHUUS, S.C., KREKLING, T., AMDAM, G.V. (2006). Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Exp. Gerontol.* **41**, 1117–1125. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.004>
- SEVERSON, D. W., WILLIAMSON, J. L., AIKEN, J. M. (1989). Caste-specific transcription in the female honey bee. *Insect Biochem.* **19**, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(89\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(89)90094-2)
- SHANGARI, N., O'BRIEN, P. J. (2006). Catalase activity assays. *Current Protocols in Toxicology*. **27**, 7–7. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0707s27>
- SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., PESSARAKLI, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* v. 2012.
- SIES, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks Oxidative Stress. *New York Acad. J.* **5**, 1–8.
- SIES, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*. **25**, 1058–1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- SIES, H. (1991). Oxidative stress II. *Oxidants and Antioxidants Academic Press*, London.
- SIES, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*. **82**, 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- SILVA, W. J. M. D., FERRARI, C. K. B. (2011). Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. **14**, 441–451. <https://doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>
- SMITH, M.A., SAYRE, L.M., ANDERSON, V.E., HARRIS, P.L., BEAL, M.F., KOWALL, N., PERRY, G. (1998). Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 731–735. <https://doi.org/10.1177/002215549804600605>
- STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L. (2000). Protein oxidation. *New York Acad. Sci.* **899**, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- TU, C.P.D., AKGÜL, B. (2005). *Drosophila* glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*. **401**, 204–226. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01013-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01013-X)
- VALENTINE, J. S., HART, P. J. (2003). Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(7), 3617–3622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730423100>

- VANENGELSDORP, D., MEIXNER, M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Inv. Pathol.* **103**, S80–S95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
- VISSCHER, P.K., DUKAS, R. (1997). Survivorship of foraging honey bees. *Insectes Sociaux.* **44**, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s000400050017>
- WAJCHENBERG, B. L. (2002). Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* **46**, 514-519. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000500004>
- WANG, Y., OBERLEY, L.W., MURHAMMER, D.W. (2001). Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biol. Med.* **31**, 1448–1455. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00728-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00728-6)
- WILLIAMS, J.B., ROBERTS, S.P., ELEKONICH, M.M. (2008). Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Exp. Gerontol.* **43**, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.001>
- WINSTON, M. L. (1987). The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, MA (pp. 281).