

Validación de la expresión del Regulador de Información Silencioso 2 *SIR2* en
obreras y zánganos de *Apis mellifera*

Luis Ariel Pardo Díaz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Francisco José Martínez Pérez

Doctor en Ciencias

Codirector

Leonardo Avendaño Vásquez

Doctor en Acuicultura

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Biología

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A Ana Francisca y Gregorio, que me criaron con verraquera.

A Francisco Javier, Johana y Juan Pablo, que me han soportado durante tanto tiempo.

“Veritas est factum”

Agradecimientos

Francisco J. Martínez Pérez, por la confianza y el apoyo para sacar esta investigación adelante.

Leonardo Avendaño, por toda la ayuda prestada en la obtención de las abejas.

Cristian E. Cadena-Caballero, Jordy Cangrejo Useda y Andrés Martínez Díaz, por todos los buenos consejos en la escritura y elaboración de esta investigación.

Nathaniel Navarro Barón, por su ayuda y entrenamiento en el laboratorio.

William F. Chaparro, Natalia Bueno y Lilian, por todos los consejos, asesorías y paciencia en el Laboratorio Central de Investigaciones.

Escuela de Microbiología y Bioanálisis de la UIS, por el préstamo del espacio físico de su laboratorio.

Ariadna Silva, por el préstamo y consejos para el manejo de los instrumentos de disección.

Juan C. Sánchez Suárez, por la asesoría en la escritura de esta tesis.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	.12
1. MARCO TEÓRICO.....	.15
1.1 GENERALIDADES DE LAS ABEJAS (<i>A. mellifera</i>).....	.15
1.1.1 <i>Ecología e importancia económica</i>15
1.1.2 <i>Taxonomía y generalidades</i>16
1.1.3 <i>Distribución</i>16
1.1.4 <i>A. mellifera en Colombia</i>16
1.1.3 <i>Ciclo de vida</i>17
1.2 Proyecto de secuenciación del genoma.....	.18
1.3 Procesamiento alternativo de corte y empalme del ARN mensajero Eucarionte.....	.18
1.4 Sirtuinas.....	.19
1.4.1 <i>SIR2</i> y su homólogo <i>SIRT1</i>20
2. Objetivos.....	.22
2.1 Objetivo General.....	.22
2.2 Objetivos Específicos.....	.22
3. MÉTODOS.....	.23
3.1 Recuperación de secuencias del GenBank.....	.23
3.2 Delimitación de intrones y exones en <i>SIR2</i>23
3.3 Diseño de cebadores.....	.24
3.4 Predicción de estructuras secundarias y tercerías.....	.25
3.5 Colecta de individuos.....	.25

3.6 Extracción de ácidos nucleicos.....	26
3.6.1 Extracción y purificación de ARN total.....	26
3.6.2 Extracción de ADN genómico.....	27
3.7 RT-PCR y PCR convencional.....	28
3.7.1 RT-PCR de un solo paso.....	29
3.7.2 PCR convencional.....	29
3.8 Mapa de restricción.....	30
3.9 Visualización de productos de RT-PCR, mapa de restricción y PCR.....	30
3.10 Secuenciación de productos de RT-PCR.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Delimitación de exones e intrones en el gen <i>SIR2</i>	31
4.2 Predicción <i>ab initio</i>	31
4.3 Diseño y síntesis de cebadores.....	35
4.4 Predicción de conjuntos termodinámicos.....	36
4.2 Extracción de ácidos nucleicos.....	36
4.3 RT-PCR de un paso y PCR convencional.....	38
4.5 Mapas de restricción.....	39
4.6 Secuenciación.....	41
5. DISCUSIÓN.....	43
6. CONCLUSIÓN.....	50
Bibliografía.....	51

Lista de Tablas

Tabla 1. Caracterización y comparación de los sitios de corte y empalme anotados en el GenBank34
Tabla 2. Cebadores diseñados para este ensayo.....	.36
Tabla 3. Medidas de concentración y pureza del material genómico extraído.....	.37

Lista de Figuras

Figura 1. Materiales y métodos

Figura 2. Estructura de exones y alineamientos múltiples

Figura 3. Estructura 2D de *SIR2*

Figura 4. Patrón de RT-PCR de un paso.

Figura 5. Patrón de restricción en los amplicones de *SIR2*.

Figura 6. Secuencia actina en sentido 5' – 3'.

Lista de Apéndices

Los apéndices están disponibles en el siguiente enlace electrónico:

[https://drive.google.com/drive/folders/1mmESdnz_v9vYTcBnX8KggTUEYafO_3u5?](https://drive.google.com/drive/folders/1mmESdnz_v9vYTcBnX8KggTUEYafO_3u5?usp=drive_link)

[usp=drive_link](https://drive.google.com/drive/folders/1mmESdnz_v9vYTcBnX8KggTUEYafO_3u5?usp=drive_link)

Glosario

Amplición: Fragmento genómico que es amplificado por la reacción de polimerización en cadena a conveniencia del investigador.

ARN mensajero inmaduro: El ARN después de ser transcrito por la ARNpolimerasa pasa por un proceso de modificación de su tamaño, en la cual se eliminan las regiones no codificantes o intrones para luego si ser traducido en proteína.

Espliceosoma: Complejo proteína-ARN que está compuesta por más de cien factores proteicos y cinco pequeñas proteínas ribonucleares nucleares.

Ribonucleoproteína: Proteínas que forman complejos oligoméricos con ARN, están presentes en el núcleo de la célula.

Elementos en *cis*: Secuencias de nucleótidos que están conservadas evolutivamente, son reconocidas por las ribonucleoproteínas para unión y de esta forma se inicia el proceso de corte y empalme, estas secuencias pueden mejorar o silenciar el reconocimiento de regiones consideradas exones e intrones.

Elementos en *trans*: Proteínas (ribonucleoproteínas) que reconocen los elementos *cis*.

RT-PCR: Transcriptasa reversa es una enzima que sintetiza hebras de ADN complementario a partir de las hebras de ARN mensajero, para ser amplificado exponencialmente por la reacción en cadena de polimerización.

Resumen

Título: Validación de la expresión del Regulador de Información Silencioso 2 *SIR2* en obreras y zánganos de *Apis mellifera**

Autor: Luis Ariel Pardo Díaz**

Palabras Clave: Procesamiento del ARNm, Expresión de genes, Castas sociales de abejas, Purificación de ácidos nucleicos, *SIR2*, *Actina*.

Descripción: La especie de abejas *Apis mellifera* está distribuida a nivel global, lo cual la convierte en el insecto que más participa en la polinización. Las diferencias en las esperanzas de vida de las castas que componen las colonias de abejas son de gran interés científico, se ha hipotetizado que estas diferencias pueden ser causa de factores asociados al comportamiento o a epigenética. La familia de genes Sirtunas codifican proteínas desacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺ y están implicadas en el silenciamiento de la transcripción. El miembro de la familia *SIR2* está asociado a la esperanza de vida en eucariotas. La secuencia de este gen se encuentra reportada en el GenBank bajo el estatus predictivo, a su vez, tres posibles variantes de procesamiento del ARNm. Se hipotetiza que puede existir expresión cualitativamente diferente entre las castas obreras y zánganos de la especie *A. mellifera* asociada al procesamiento alternativo. El objetivo de esta investigación, es validar la expresión del *SIR2* en obreras y zánganos. Se realizó un análisis *in silico* de los exones de las tres posibles variantes para establecer exones comunes y únicos, se diseñaron cebadores para recuperar el marco abierto de lectura por medio de RT-PCR y analizar los amplicones por medio de electroforesis y patrones de restricción. Se pudo amplificar un nuevo patrón de RT-PCR que fue expresado exclusivamente en zánganos cuyo tamaño no coincide con secuencias anotadas en el Genbank para *SIR2* de *A. mellifera*. Se sugiere que este nuevo patrón puede ser producto del procesamiento alternativo, dado que se ha reportado en humanos variantes de tamaños similares en el homólogo *SIRT1*. Además, los insectos con una estructura social tan compleja difieren entre ellos mismo por causa epigenéticas. Por lo tanto, validamos por medio de RT-PCR que *SIR2* si tiene expresión diferencial entre las castas de estudio de esta investigación.

*Trabajo de Grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Francisco Martínez Pérez. Dr. Ciencias. Codirector: Leonardo Avendaño Vásquez. Dr. Acuicultura

*

Abstract

Title: Validation of Silent Information Regulator 2 *SIR2* expression in *Apis mellifera* workers and drones*

Author(s): Luis Ariel Pardo Díaz**

Key Words: mRNA processing, Gene expression, Bee social castes, Nucleic acid purification, *SIR2*, *Actin*

Description: The bee species *Apis mellifera* is distributed globally, which makes it the insect that participates most in pollination. The differences in the life expectancies of the castes that make up the bee colonies are of great scientific interest, it has been hypothesized that these differences may be caused by factors associated with behavior or epigenetics. The Sirtunas gene family encodes NAD⁺-dependent histone deacetylase proteins and are involved in transcription silencing. The *SIR2* family member is associated with life expectancy in eukaryotes. The sequence of this gene is reported in the GenBank under the predictive status, in turn, three possible variants of mRNA processing. It is hypothesized that there may be qualitatively different expression between the worker and drone castes of the *A. mellifera* species associated with alternative processing. The objective of this research is to validate the expression of *SIR2* in workers and drones. An *in silico* analysis of the exons of the three possible variants was performed to establish common and unique exons, primers were designed to recover the open reading frame by means of RT-PCR and amplicons were analyzed by means of electrophoresis and restriction standards. It was possible to amplify a new RT-PCR pattern that was expressed exclusively in drones whose size does not match sequences annotated in the Genbank for *A. mellifera SIR2*. It is suggested that this new pattern may be the product of alternative processing, since variants of similar sizes in the *SIRT1* homolog have been reported in humans. Moreover, insects with such a complex social structure differ from each other by epigenetic causes. Therefore, we validated by RT-PCR that *SIR2* does have differential expression between the castes studied in this research.

*Degree Work

**Faculty of Basic Sciences. School of Biology. Biology. Director: Francisco Martínez Pérez. Dr. Ciencias. Codirector: Leonardo Avendaño Vásquez. Dr. Acuicultura

Introducción

Las abejas son de vital importancia en la mayoría de los biomas de la tierra, ya que participan en la recolección del polen, de néctar y resinas en las plantas con flores lo que da como resultado la polinización; evento que sostiene la reproducción de las plantas angiospermas (Danforth et al., 2006). Las abejas de la especie *Apis mellifera* están distribuidas a nivel global y participan en la polinización de la mayoría de los cultivos y bosques silvestres (Parreño et al., 2022). A su vez, es una de las especies de animales que hacen parte del conjunto de organismos modelo para estudios en genómica (Toth y Zayed, 2021).

El ciclo de vida de las abejas está influenciado por múltiples factores como es su organización social, la cual es de tipo castas sociales que son nombradas en obreras, zánganos y reina (Johnson, 2010). Entre cada una de estas se presenta diferencias drásticas en sus ciclos de vida; las obreras y zánganos (machos) tienen esperanza de vida menor en comparación con la reina (Rueppell et al., 2007). Estas castas tienen patrones de comportamiento determinado por la misma división del trabajo (Kodrík et al., 2022). Las hipótesis que se han planteado sobre las diferencias en el ciclo de vida están relacionadas con: la actividad de colecta de polen, el mantenimiento de la colmena, el estrés oxidativo, la composición de la estructura celular y la expresión de genes relacionados con la reparación de ADN (Luna-Lucena et al., 2019). Es de resaltar que muchos comportamientos de cada casta social de las abejas tienen una regulación de la expresión de los genes específica, sin embargo, todos los organismos de las castas presentan la misma organización genómica.

Las Sirtuinas son una familia de genes que codifican para enzimas dependientes de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD o NAD⁺ en su forma oxidada) cuya función celular es la desacetilación de las histonas, y sus consecuencias son: el silenciamiento de la transcripción, prolongación de ciclos de vida y patrones de metilación (Mautone et al., 2020). Esta familia de

genes está ampliamente conservada en la naturaleza, ya que se han identificado desde las levaduras hasta los mamíferos. Por lo tanto, los genes de esta familia son potenciales para estudio del envejecimiento (Ziřtara et al., 2022; Bonkowski y Sinclair, 2016).

En investigaciones con organismos modelo, la sobreexpresión de la Sirtuina reguladora de la información silenciosa 2 cuya nomenclatura en invertebrados es *Silent Information regulation*, *SIR2* o *SIRT1* para vertebrados, se ha evidenciado que interviene en el aumento significativo en la esperanza de vida en estos organismos (Banerjee et al., 2012). Además, en humanos y *Sus scrofa* se ha reportado la presencia de múltiples variantes de corte-empalme alternativas en el procesamiento del pre ARN mensajero (ARNm) de *SIRT1* (Deschřnes y Chabot, 2017).

El desarrollo y masificación de la tecnología de secuenciación de nueva generación y la RT-PCR han permitido ampliar el conocimiento de la regulación genómica y el comportamiento de la transcripción (Angeli, 2024). En la actualidad, se conoce que el genoma humano posee aproximadamente 20.000 genes, los cuales pueden dar origen a más de 300.000 transcritos por efecto del procesamiento alternativo (Amaral et al., 2023). Este cálculo también se ha realizado en otros organismos modelos de la investigación genómica; lo cual, sugiere que este comportamiento es intrínseco en la regulación de la expresión y procesamiento de ARN inmaduro en los organismos vivos, además de plantear como afecta su fisiología la transcripción de una de las posibles variantes de ARNm (Carrillo-Oesterreich et al., 2016).

El genoma de *A. mellifera* ha sido secuenciado en más del 90%, pero un número significativo de sus genes, y sus posibles variantes de procesamiento alternativo, están anotados de forma predictiva por métodos computacionales (Wallberg et al 2019). La secuencia nucleotídica del gen *SIR2* en *A. mellifera* ha sido reportada en el GenBank, pero está bajo el estatus de predictivo, con tres posibles variantes de ARNm. Experimentalmente, se conoce que la expresión

de *SIR2* en *A. mellifera* sufre cambios frente a la manipulación de la dieta, lo que afecta la esperanza de vida de las mismas (Paoli et al., 2014). También, se ha demostrado que la actividad de *SIR2* en trofócitos y células del tejido adiposo del abdomen de abejas obreras jóvenes es menor respecto a los adultos (Hsu y Chuang, 2014). Guan y colaboradores, realizaron una cuantificación de la expresión de *SIR2* por RT-qPCR en *A. mellifera* en la cabeza de obreras y reinas, cuyos resultados mostraron diferencias en la expresión, siendo las reinas las de mayor expresión (2013). No obstante, el diseño experimental para los cebadores de tiempo real empleados no indica las variables que fueron usadas y tampoco indica la existencia de procesamiento alternativo. Es decir, no se ha confirmado de forma experimental el tamaño de alguna de las variables de ARNm *SIR2* reportadas de forma computacional o si existen algunas nuevas. Además del desconocimiento de su expresión entre las castas sociales de zánganos y obreras.

Las predicciones informáticas permiten identificar las regiones del genoma funcionales o potencialmente transcritas, pero pueden o tienden a ignorar los factores de regulación y procesamiento alternativo, dejando intrones y exones fuera de entendimiento de los investigadores. Es por ello, la necesidad de diseños experimentales para identificar y validar la expresión de los genes y los elementos de su regulación en genomas ensamblados por computación (Bhat et al., 2022). Para responder a estas preguntas es fundamental e invariante establecer de forma experimental el gen *SIR2* y su expresión en *A. mellifera* en las castas sociales, obreras y zánganos. El objetivo de este estudio es validar experimentalmente predicciones *ab initio* de los tres posibles marcos abiertos de lectura anotados en el GenBank a través de RT-PCR y patrones de restricción. El aporte de este conocimiento contribuirá a determinar la participación de *SIR2* en efectos ambientales y/o patógenos que afectan la salud actual de las poblaciones de abejas y patrones de su envejecimiento para, con ello, cooperar a afrontar la crítica situación de las abejas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DE LAS ABEJAS (*A. mellifera*)

1.1.1 Ecología e importancia económica

Las especies de abejas son los insectos más importantes en la polinización de las plantas angiospermas, el 75 % de este proceso es obra de las abejas (Khalifa et al., 2021). Las plantas con flores son más del 80% de los cultivos de interés económico para los humanos, además de su alta representación en la flora silvestre, implica que las abejas son un eje en el soporte de la agricultura humana y la vida silvestre (Patricio-Roberto y Campos, 2014). La valoración del servicio ecosistémico de la polinización tiene un rango estimado de 300 a 500 mil millones de dólares anuales (Potts et al., 2016). En este sentido, el crecimiento poblacional humano hace necesario el incremento de la tierra usada para la agricultura lo que demanda mayores tasas de producción y por ende, el cumplimiento de esta meta es prácticamente imposible de lograr sin el aumento de especies polinizadoras como *A. mellifera* (Giannini et al., 2020; Phiri et al., 2022).

Se ha determinado desde 2006 una disminución de individuos de *A. mellifera*, a lo que se ha nombrado como el trastorno de colapso de las colmenas, para indicar el declive de la salud de las abejas en el mundo, especialmente en *A. mellifera* (Williams et al., 2010). Es por ello que la disminución de las poblaciones de abejas, es un motivo de preocupación gubernamental internacional para todos países (Wood et al., 2020; Staveley et al., 2014). Múltiples factores están relacionados como posibles causas de dicha disminución poblacional, algunas de estas son: pérdida de biodiversidad floral que genera metabolitos secundarios, nutrición deficiente, pesticidas, endo y ectoparásitos, aumento de las infecciones por bacterias y virus, cambio climático, entre otras (van Engelsdorp et al., 2017; IPBES, 2018).

1.1.2 Taxonomía y generalidades

A. mellifera se encuentra al interior de la superfamilia Apoidea, con cerca de 20.000 especies de abejas, y que se originaron antes de la división de Gondwana en el Cretácico temprano (Almeida et al., 2023; Zheng et al., 2018). Los caracteres taxonómicos más usados para la identificación de la especie al interior del género están relacionados con su morfometría de cuerpo y alas, en estas a su vez se detallan los patrones de venación (Kandemir et al., 2011). También, se puede usar los tamaños de los individuos según la casta social a la que pertenecen (Ilyasov et al., 2020).

1.1.3 Distribución.

El género *Apis* surge en la región eurasiática tropical, desde este punto de origen se dispersó por el norte y oeste hace aproximadamente 3000 años, especialmente por la acción de los grupos humanos, que la han domesticado para aprovechar la miel y la cera (Cridland et al., 2017). Las abejas melíferas se encuentran distribuidas por los 5 continentes gracias a las constantes y grandes migraciones humanas, en la actualidad la apicultura es una actividad de simbiosis entre agricultura y ecología (Ilyasov et al., 2020).

1.1.4 *A. mellifera* en Colombia.

Esta especie se introdujo en América hacia 1600 por los colonizadores españoles, quienes trajeron las variedades europeas, pero no prosperaron fácilmente (Montoya-Pfeiffer et al., 2016). La apicultura moderna en el continente inicia en 1956 en Brasil, con la introducción de la variedad africanizada *A. mellifera scutellata*, la cual, de forma natural, se ha dispersado por los campos y en algunos casos en ciudades (Smith, 1991; Tibatá et al., 2017). En Colombia, a inicios de la década de los 80 empieza el proceso de introducción de la variedad africanizada, y de esta forma se ha conseguido un mejor rendimiento en la producción de miel (Tibatá et al., 2017). El impacto al

sector agrícola colombiano por parte de las abejas está estimado en 643 mil millones de pesos anuales, según datos de la Federación colombiana de apicultores y criadores de abejas (Fedeabejas) se contabilizan 4677 apiarios a nivel nacional que producen 7000 toneladas de miel anualmente (Redagricola, 2022).

1.1.3 Ciclo de vida

Los insectos que han evolucionado en la estructuración de castas sociales presentan diferencias en la esperanza de vida entre los individuos que la componen (Münch y Amdam, 2010). La casta de obreras son la mayoritaria, pero su ciclo vital es drásticamente menor en comparación a la casta de hembras fértiles o reinas (Luna-Lucena et al., 2019). En abejas, las obreras realizan la mayoría de los trabajos como lo son: cuidado de larvas, seguridad de la colmena y la colecta de néctar (Remolina et al., 2007). Las castas de las abejas obreras y los zánganos presentan longevidad promedio menor que la reina de la colmena. En este sistema de castas se posee el mismo genoma, pero difieren radicalmente en su esperanza de vida. Los insectos que presentan estas condiciones son modelos de interés para estudiar patrones de envejecimiento (Münch y Amdam, 2010).

Las hipótesis que se han planteado en la investigación para determinar las causas de las diferencias en la esperanza de vida, en las castas de abejas, han transitado desde: tasas de estrés oxidativo diferencial, composición de membranas celulares, cantidad de vitelogeninas, entre otras (Simone-Finstrom et al., 2016; Haddad et al., 2007; Martin et al., 2022). Se han aportado evidencias, pero no han sido concluyentes para explicar este fenómeno. En la actualidad, la regulación de la transcripción e identificación de variantes de ARNs plantean nuevas evidencias y enfoques para resolver este enigma de la evolución de los insectos sociales (Bataglia et al., 2021).

1.2 Proyecto de secuenciación del genoma

En el año 2006, se publicó el genoma total de la especie *A. mellifera*, con lo cual, se convirtió en un recurso público y de acceso libre para todos los investigadores (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Lo anterior, proporcionó información sobre la biología de la abeja, conocimientos más profundos sobre la evolución y desarrollo del comportamiento eusocial, patrones de aprendizaje para forraje del néctar, regulación hormonal y neuronal (Kaplan y Linial 2006; Wilson, 2006). Hasta la fecha se han realizado varias secuenciaciones totales y ensamblajes *de novo* del genoma de *A. mellifera*, la última realizada en el año 2019 por Wallberg y colaboradores, se aplicó las últimas técnicas de secuenciación de nueva generación y técnicas computacionales de alto rendimiento. Lo antes indicado, se debe al gran interés científico de responder preguntas celulares, por ejemplo: ¿Cómo teniendo el mismo genoma, la reina tiene un ciclo de vida decenas de veces mayor a las demás castas?

1.3 Procesamiento alternativo de corte y empalme del ARN mensajero Eucarionte

Los métodos modernos de la secuenciación de alto rendimiento han repercutido en la caracterización de genomas, aumentando de forma considerable la cantidad de secuencias nucleotídicas, y a su vez, en el número de organismos secuenciados completamente (Hu et al., 2021). En la actualidad, se conocen nuevas variantes de procesamiento alternativo gracias a las técnicas de PCR y enzimas de retrotranscripción que permiten la elaboración de bibliotecas y la caracterización de los ARNm expresados en intervalos de tiempo o condiciones fisiológicas determinadas (Jalali et al., 2017). Además, es sabido que la mayoría de los genes presentes en cualquier organismo tiene una alta probabilidad de expresar formas alternativas de ARNm, las cuales tienen una implicación en funcionalidad de la proteína expresada, siendo así que varias

enfermedades humanas de interés son causadas por proteínas defectuosas dadas por un marco abierto de lectura irregular (Jakubauskienė y Kanopka, 2021).

El procesamiento post-transcripcional se basa en complejas reacciones bioquímicas entre las secuencias de nucleótidos que tienen una actividad en *cis*, estas secuencias aportan los sitios de reconocimiento que potencia o inhibe el procesamiento del ARNm inmaduro y el corte-empalme. Además, varios complejos de ribonucleoproteínas que están encargadas del reconocimiento de los sitios y posterior corte-empalme (elementos con actividad *trans*), estas reacciones se determinan por la estructura secundaria de la secuencia sustrato (Shi, 2017).

En humanos se ha encontrado la relación causal entre el envejecimiento y cambios en el procesamiento de genes, personas en edad avanzada han mostrado procesamiento de ARNm diferente a personas jóvenes, y entre estas variantes halladas de procesamiento del ARNm inmaduro, algunas fueron nuevas o completamente desconocidas, que no se tenían presupuestado ni con los métodos bioinformáticos (Balliu et al., 2019). En el envejecimiento las condiciones fisiológicas se alteran de forma paulatina, generando cambios drásticos a nivel; molecular, en los patrones de metilación, control de la actividad de las proteínas, entre otras (Bhadra et al., 2020; Marasco y Kornblihtt, 2023).

1.4 Sirtuinas

Sirtuinas son una familia de genes que codifican proteínas desacetilasas de las histonas (HDAC) tipo III dependientes de nicotina adenina dinucleótido (+) (NAD⁺), las cuales catalizan las reacciones para la eliminación de los grupos funcionales de acetilo en los residuos de lisina y un acetyl ADP-ribosa, su sitio de catálisis está ubicado en el dominio central (Min et al., 2001; Hong et al., 2021). Estas proteínas se encuentran implicadas en procesos celulares como: reparación de ADN dañado, gluconeogénesis, formación de ácidos grasos, mejorar la recepción de la insulina,

lipólisis, formación del tejido neuronal, retarda el proceso de envejecimiento, regulador de homeostasis metabólica, regulación epigenética y procesos de inflamación (Sutphin y Kaeberlein, 2011; Kotas et al., 2013; Zhang et al., 2021). En humanos y ratones se ha investigado la actividad de la histona desacetilasa *SIRT1* en las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, en las personas de la tercera edad, la activación produce disminución en el tejido que ha experimentado envejecimiento (Kitada et al., 2016).

Esta familia de genes se encuentra en organismos eucariontes y multicelulares como levaduras, invertebrados y vertebrados; en levaduras se ha encontrado un solo gen de Sirtuinas, siendo este el primer reporte de genes de esta familia, mientras que en otros organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* se han reportado cuatro genes codificantes, en *Drosophila melanogaster* se tiene reportado un total de 5 sirtuinas (dSir1-5) (Lee et al., 2019).

1.4.1 *SIR2* y su homólogo *SIRT1*

SIR2 se denomina al gen en invertebrados, mientras que en vertebrados su homólogo se nombra *SIRT1*. Involucrado directamente en el silenciamiento de la transcripción, el desarrollo del ciclo celular y la estabilidad estructural de los cromosomas (Tao et al., 2023). En *D. melanogaster* y *C. elegans* se han realizado ensayos para sobreexpresar este gen y se ha evidenciado una prolongación del ciclo de vida (Banerjee et al., 2012). En crustáceos marinos se ha encontrado relación entre la expresión de este gen y regulación de reloj circadiano (O'Grady et al., 2016). En polillas tratadas con radiación tipo gamma se ha evidenciado un aumento en la expresión de *SIR2* como uno de los genes asociados a la reparación del genoma (Vimal et al., 2022).

En *A. mellifera* se ha estudiado la relación de las feromonas mandibulares de la reina en la expresión de *SIR2*, por medio de cuantificación, con los cambios y patrones de epigenéticos en la metilación de cromosomas de las obreras (Cardoso-Junior et al., 2020). Se ha comprobado que el

aumento de la expresión de Sirtuinas en asociación de una elevada concentración en la célula de la cinasa activada por AMP (*AMPK*) y NAD^+ , en las épocas de invierno, aumenta la tolerancia al frío y prolongan los ciclos de vida de las abejas (Bonkowski y Sinclair, 2016). También, se encontró la relación de desintoxicación de pesticidas por acción de la quercetina al fomentar la sobreexpresión de *SIR2* en las abejas (Liao et al., 2017). Por el contrario, al ser inhibida la expresión *SIR2* por medio de ARN de interferencia, el ciclo de vida de las abejas se acorta drásticamente (Paoli et al., 2014). La expresión de *SIR2* está relacionada con la edad de las abejas obreras y el envejecimiento de orgánulos como las mitocondrias, también se correlaciona con las concentraciones de NAD^+ (Hsu y Chuang, 2014; Remolina et al., 2007).

No obstante, la secuencia reportada del gen *SIR2* es por ensamblaje del genoma, además de sus tres posibles variantes generadas por procesamiento alternativo de ARNm (Wallberg et al., 2019). En los estudios aquí citados, no se indica cuál de estas posibles variantes fueron utilizadas para el diseño de cebadores de cuantificación por PCR en tiempo real. Tampoco, se ha evaluado si existe entre las castas sociales de obreras, zánganos y reinas posibles diferencias en el procesamiento del ARNm inmaduro que implique nuevas variantes. Por lo tanto, esta investigación busca caracterizar las posibles variantes de procesamiento alternativo del ARNm de *SIR2* en las castas sociales de obreras y zánganos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Validar y establecer la expresión del gen *SIR2* de obreras y zánganos de *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar *in silico* la organización de intrones y exones del gen *SIR2* y su patrón de expresión en forma de ARN mensajero.

Validar marco abierto de lectura del gen *SIR2* de *Apis mellifera* por medio de su patrón de restricción.

Validar la presencia de variantes de ARNm producidas por el gen *SIR2* en protocerebro, tórax y abdomen por RT-PCR en las castas obreras y zánganos de *Apis mellifera*.

Establecer el patrón de restricción de los ADNc generados por procesamiento alternativo para establecer la presencia o ausencia de exones.

3. MÉTODOS

3.1 Recuperación de secuencias del GenBank

La búsqueda se realizó por medio de palabras clave en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Sayers et al., 2024) y su sistema ENTREZ (Maglott et al., 2011) con los siguientes criterios: “*SIR2* [gene] AND *Apis mellifera* [orgn]” y “*SIR2/SIRT1* [gene]” este último criterio se utilizó para la exploración de secuencias verificadas provenientes de otros organismos. Se descargaron las secuencias de las tres posibles variantes de procesamiento del mensajero y la secuencia predictiva del gen; además, las tablas de transcriptos y tabla del gen. Por medio de la herramienta BLASTN (Camacho et al., 2023) se realizaron búsquedas con las secuencias del gen y sus variantes contra las bases de datos nt/nr y marcadores de secuencias expresadas (ETS, por sus siglas en inglés) las cuales fueron depuradas y se usaron las secuencias mayores a 120 nucleótidos, con la finalidad de confirmar las anotaciones de estas secuencias. Posteriormente, se procedió a descargar secuencias de ARNm confirmados de otros organismos. Periódicamente, se hizo la vigilancia informática del estado PREDICTIVO del gen y sus variantes.

3.2 Delimitación de intrones y exones en *SIR2*

Con la información anotada para *SIR2* de *A. mellifera* en el GenBank, se establecieron las regiones consideradas como exones e intrones en la secuencia e identificar los sitios de corte de donadores y aceptores del procesamiento del ARNm inmaduro, con los programas: Splice site predictions (Reese et al., 1997) (https://www.fruitfly.org/seq_tools/), FSPLICE (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) (Umarov y Solovyev, 2017), Alternative Splice Site Predictor (*ASSP*) (Wang y Marín, 2006) (<http://wangcomputing.com/assp/>) y Spliceator (Scalzitti et al., 2021). Posteriormente, se verificó y caracterizaron los puntos de corte-empalme anotados. Igualmente, la secuencia de *SIR2* fue evaluada para predecir la anotación de sus regiones codificantes y promotores a través de los programas FGENESH

(<http://www.softberry.com/berry.phtml>) y ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), se buscaron marcos abiertos de lectura para confirmar los anotados o posibles nuevas variantes. Además, se realizó la caracterización de los diferentes tipos de sitios consenso para los flancos 5' – 3' en intrones, sitio de ramificación y tracto de polipirimidina en las regiones que se consideran intrones. Los flancos intrónicos se caracterizados manualmente, se consideraron seis u ocho nucleótidos río arriba y río abajo con relación a los sitios de corte anotados dependiendo de la consistencia del corte. Tales sitios fueron: la caja ACAGA, la posición de ramificación YURAY y el tracto de polipirimidina. Estos sitios se localizaron en las secuencias manualmente y solo se consideraron por su relación con regiones intrónicas.

Finalmente, usando las secuencias descargadas del gen *SIR2/SIRT1* presentes en otros organismos, se construyeron alineamientos contra las tres posibles variantes, con el fin de identificar los exones más conservados en estas tres, a través del servidor en línea de Kalign 3 (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/kalign>) (Lassmann, 2020) se realizaron los alineamientos con parámetros ajustados en el modelo de pérdida descrito por Martínez-Pérez y colaboradores (2007). Mientras, que en MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato et al., 2019) fueron combinados varios métodos de alineamientos: Global, Local y FFT-NS-1, además varias penalizaciones de aperturas (3.0, 3.5, 4.0), siempre manteniendo la dirección del alineamiento en función de la secuencia *SIR2* para lograr una mayor fidelidad, la penalización por apertura de espacio en 4.0 y valor de compensación en 0.15.

3.3 Diseño de cebadores

Estos fueron diseñados con base en los resultados de los alineamientos de secuencias antes mencionados, los algoritmos para las predicciones de marcos abiertos de lectura y la delimitación de exones e intrones según lo anotado en el GenBank, con el fin de determinar exones comunes a

todas las posibles variantes y únicos a estas. Los parámetros de cebadores se evaluaron con la herramienta OligoAnalyzer en el sitio web Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) (Owczarzy et al., 2008) con el parámetro “Oligo Conc” en 0.1, “Na⁺ Conc” en 0, y por último, el parámetro “Mg⁺⁺ Conc” en 3.0 mM. Tres cebadores específicos del gen *SIR2* en *A. mellifera* fueron diseñados (Sentido, Anidado, Reverso). El gen *actina* fue seleccionado como control constitutivo y positivo. Su diseño se sustentó en dos de sus tres dominios universales relacionados con otros invertebrados (Martínez-Pérez et al., 2005). La síntesis de los cebadores y su purificación por cartucho con fase inversa para *SIR2* y *actina* se realizó por Bioneer (Bioneer Corporation, Daejeon, Korea).

3.4 Predicción de estructuras secundarias y tercerías

Por medio del software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite>) (Gruber et al., 2008) se modelaron las estructuras secundarias óptimas con la mínima energía libre de la secuencia del gene *SIR2* y las secuencias de los cebadores diseñados para la fase de RT-PCR, los resultados se descargaron en el formato vienna de puntos y paréntesis, para ser visualizadas y editadas en RNACanvas (<https://rna2drawer.app/>) (Johnson y Simon, 2023)

3.5 Colecta de individuos

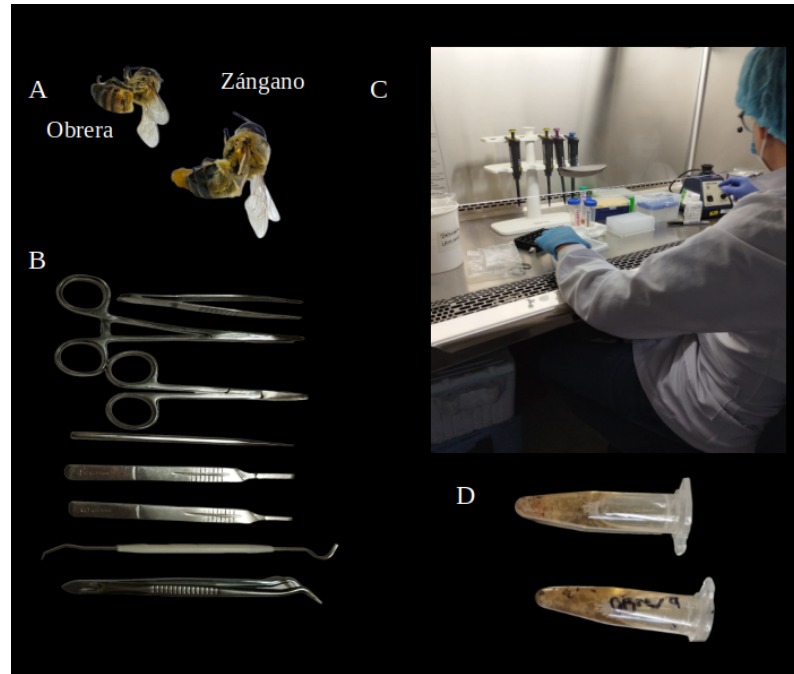
70 individuos de *A. mellifera* fueron obtenidos entre los meses de agosto y noviembre del año 2023, provenientes de los municipios de Santa Bárbara y Málaga, por medio de donaciones de apicultores locales, 20 zánganos y 50 obreras (Figura 1A), en edad adulta. Se dio un periodo de aclimatación de 48 horas, fueron separadas en tubos Falcón de 50 ml según la casta social, siguiendo las pautas del manual de apicultura de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria para diferenciar las castas (Martinez-Sarmiento et al., 2012). Se procedió a la

eutanasia por medio de frío en ultracongelador de -80 °C en el Laboratorio Central de Investigaciones ubicado en la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

3.6 Extracción de ácidos nucleicos

3.6.1 Extracción y purificación de ARN total

Con tres individuos de cada una de las castas sociales, obreras y zánganos, se realizaron disección para retirar el tejido muscular, adiposo y proto-cerebro, procurando no contaminar tejidos con superficie externa y fragmentos de cutícula, siguiendo el protocolo estándar para este tipo de procedimientos (Carreck et al., 2013). Todos los implementos de disección fueron debidamente esterilizados (Figura 1 B, D). Se realizaron tres réplicas de extracción de ARN total con el mismo protocolo para disección, inmediatamente retirado el tejido (Figura 2C) se trató con el kit de aislamiento de ARN total viral MagMAX™-96 y el procesador de perlas magnéticas de pozo profundo KingFisher MagMAX™ Express-96 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). El protocolo del fabricante fue ajustado para la implementación en tejido y ARN de abejas. Se añadieron 500 uL de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 4 M y EDTA 0.2 M) (Chomczynski y Sacchi, 2006), las perlas magnéticas fueron disueltas en solución de unión al 5 % v/v y agregadas en proporción 1:1 a los pozos profundos. Se usó el programa predeterminado del KingFisher “AM1836_DW_50_V2” para la extracción y purificación del ARN viral. 50 uL de tampón de elución fue agregado a las respectivas tiras para la recuperación de ARN total de cada una de las dos castas sociales de abejas, para comprobar la concentración y pureza se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) con la relación de absorbancia y longitud de onda 260/280 y 260/230 nm. Por último, se almacenaron a -80 °C.

Figura 1.*Materiales y métodos*

Nota. (A) Los individuos colectados fueron separados según la casta social a la cual pertenecían, esta se realizó teniendo en cuenta características morfológicas, tamaño de los ojos, tamaño del cuerpo y alas. (B) los instrumentos de disección fueron debidamente esterilizados en autoclave y expuestos a luz UV. (C) todas las extracciones se realizaron en cabina de extracción de bioseguridad tipo 2. (D) las muestras extraídas se resuspendieron en tampón de lisis para la extracción de ARN viral adaptado para tejido de insectos.

3.6.2 Extracción de ADN genómico

Tres individuos de la casta de obreras fueron empleados por réplica para esta extracción. Además, el mismo protocolo de disección e implementos fueron utilizados. Combinando el protocolo de extracción de Chelex-100 de Reyes-Escogido y colaboradores (2010), más otros métodos estandarizados de Salting-out para optimizar la purificación y rendimiento de ADN

genómico en tejido de abejas. Se maceró en mortero el tejido extraído más tampón de lisis TES (Tris- HCl 10mM, EDTA 10 mM y SDS 5 %^{v/v}), seguidamente se adicionó 10 uL de Proteinasa K (20 mg/mL) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y 10 uL de Ribonucleasa A (10 mg/uL) (Monarch New England Biolabs, RU), se incubó a 60 °C/30 minutos en bloque seco. El Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) se calentó a 100 °C en agua ultrapura en concentración de 5% ^{p/v} para ser agregado a la solución de lisis de celular e incubar a 90 °C/7 minutos. Se retiró del bloque seco y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos (Soderstrom et al., 2007).

La fase acuosa se trasvasó hacia otro tubo y se agregó acetato de amonio 3 M para realizar la precipitación de proteínas que pudieran mantenerse aún en la solución, suavemente se agitó y se dejó incubar a -30 °C/20 minutos, luego se centrifugó a 12000 rpm en centrífuga de ángulo fijo (Singh et al., 2018). El sobrenadante se retiró y se depositó en otro tubo, se procedió a la precipitación de ADN con acetato de sodio 3 M en proporción 1:10, más dos volúmenes de etanol absoluto y 5 uL de glucógeno (20 mg/uL), se procedió a la centrifugación a 12.000 gravedades/15 minutos a 4 °C, el líquido se descartó, el sedimento fue lavado con etanol 70% a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones anteriores, durante 15 minutos se dejó secar invirtiendo el tubo en una toalla de papel a temperatura ambiente, se agregó agua ultrapura y se calentó a 55 °C/10 minutos para la disolución del sedimento, se cuantificó la absorbancia de la solución de ADN genómico obtenido, la relación A 260/280 y A 260/230 > 1.8 fueron aceptadas para proceder a la amplificación por PCR. Además, se verificó la integridad en gel de agarosa 0.7 % ^{p/v}.

3.7 RT-PCR y PCR convencional

Los cebadores diseñados y sintetizados previamente fueron reconstituidos a concentración de 100 uM, las soluciones de trabajo se realizaron a concentración de 10 pmol/uL.

3.7.1 RT-PCR de un solo paso

El ensayo de RT-PCR se realizó en termociclador QuantStudio 1 Applied Biosystems™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Se utilizó 8 uL del kit viral de mezcla maestra de un paso 2019-nCoV TaqMan RT-PCR (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON) más 8 uL de muestra de ARN purificado (286.1 ± 25.78 ng/uL). Dos tipos de amplificaciones se realizaron con los tres cebadores diseñados para el gen *SIR2*, la primera de estas fue con los cebadores Sentido y Reverso, la segunda con el Anidado y Reverso, los cebadores del gen *actina* fueron usados como control positivo de las reacciones. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: La retrotranscripción fue a 50 °C/30 minutos, seguida de una etapa de desnaturalización a 94 °C/tres minutos, la temperatura de hibridación fue de 55 °C/30 segundos para los tres cebadores, la etapa de elongación se realizó a 72 °C/dos minutos y medio, para volver a la etapa de desnaturalización a 94 °C/30 segundos; 35 ciclos fueron utilizados para los ensayos de RT-PCR. La purificación de estos amplicones se realizó por medio de columnas de exclusión del kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Redwood City, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante, pero se agregó 10 uL de acetato de sodio 3M para mejor la unión del material genómico a la membrana de la columna.

3.7.2 PCR convencional

Con el ADN genómico extraído anteriormente se realizó la amplificación del gen *SIR2* en su forma nuclear, exones e intrones, se agregó 5 uL (183.65 ± 16.51 ng/uL) de muestras, 2 uL de los dos cebadores Sentido y Reverso, además de los cebadores de *actina* como control positivo de la reacción. La amplificación se realizó de la siguiente manera: se inició con una fase de desnaturalización de 94 °C/8 minutos, seguida de la hibridación a 55 °C/30 segundos, y elongación a 72 °C/4 minutos, las condiciones de amplificación se repitieron por 35 ciclos.

3.8 Mapa de restricción

Los productos obtenidos por RT-PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *DraI* y el tampón de digestión Tango (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), cuyos sitios específicos reconocidos son TTT[^]AAA y extremos romos en cada uno de los fragmentos resultantes. Siguiendo las indicaciones del fabricante se agregaron 10 uL de muestra (25 ± 1 ng/uL) más 0.5 uL de enzima (10 U/uL), se incubó por 30 minutos en bloque seco a 37 °C. En las plataformas en línea NEB cutter de New England Biolabs (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>) y Restriction mapper (<https://www.restrictionmapper.org/>) se hizo el análisis *in silico* para predecir los posibles productos de la digestión y las bandas observables en el gel de electroforesis.

3.9 Visualización de productos de RT-PCR, mapa de restricción y PCR

Los productos de los ensayos de RT-PCR de un solo paso, PCR convencional y mapas de restricciones se resolvieron por medio de electroforesis en geles de agarosa de 2%, 0.7% ^{v/v}, la tinción se realizó con Diamond[™] Nucleic Acid Dye (Promega, Woods Hollow Road, WI), y se visualizó con el Sistema de imágenes ChemiDoc[™] (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.10 Secuenciación de productos de RT-PCR

Los productos obtenidos en las RT-PCR de *SIR2* y *actina* en zánganos fueron secuenciados por medio del método Sanger, 30 uL \pm 50ng/uL de producto purificado de cada uno de los genes amplificados, *SIR2* y *actina*, 20 uL \pm 10 pmol/uL de cada uno de los cebadores usados para las reacciones. A través del servicio SeqExpress de la empresa GenCell (Bogotá, Colombia) con la plataforma SeqStudio[™] Flex system (Applied Biosystems[™]). Además, otra réplica de estos productos de RT-PCR fue precipitado con glucógeno y liofilizada con etanol ultrapuro al 96% para secuenciar en la ciudad de México en las instalaciones de la Universidad Autónoma de la Ciudad

de México. Los resultados fueron analizados por el programa ugene v.49.1 y se reportó en el GenBank.

4. RESULTADOS

4.1 Delimitación de exones e intrones en el gen *SIR2*

En la base de datos del GenBank se encontró una sola secuencia anotada para el gen *SIR2* en *A. mellifera*, de 7704 pares de bases (pb) con código de identificación fue **LOC411917**. Las tres posibles variantes de procesamiento alternativo, se nombraron: Variante X1, Variante X2, Variante X3, cuyos tamaños correspondieron a: 3849 pb, 3213 pb y 3392 pb; con códigos de acceso: **XM_026440017.1**, **XM_026440018.1** y **XM_395386.6** respectivamente. Las tres variantes anotadas y derivadas de análisis predictivos difirieron en los dos primeros exones y en la cantidad de los mismos (Figura 2A). Las variantes X1 y X3 coincidieron en el inicio de la transcripción en el nucleótido 1, con respecto al gen, así mismo, tuvieron en el sitio de inicio de la traducción en la posición 147 del exón uno, común para estas dos, pero de tamaño diferente, ya que el exón uno en la Variante X1 es de 937 nucleótidos, mientras que la variante X3 es de 301 nucleótidos. Por el contrario, la variante X2 inició en la posición 164, y el sitio de inicio de la traducción estuvo ubicado en su segundo exón. En cuanto a la cantidad de exones e intrones, la variante X2 presentaron 10 exones y nueve intrones. Por su parte, las dos variantes restantes, presentaron nueve y ocho exones (Apéndice A).

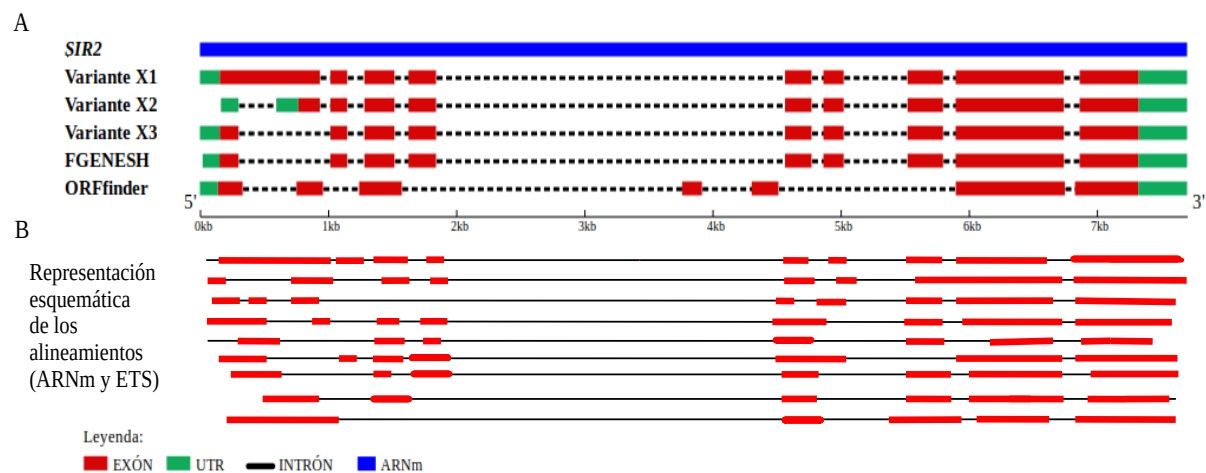
4.2 Predicción *ab initio*

Las predicciones de las regiones que potencialmente codifican para las proteínas, siete y nueve exones del gen *SIR2* se determinaron en un marco de lectura sentido 5' - 3' con ORFfinder y FGENESH se muestran en la Figura 2A. Los dos últimos exones coincidieron con los anotados en el GenBank, aunque ORFfinder retuvo 37 nucleótidos del último intrón en el flanco 3'. Además,

los exones cinco y cuatro se desplazaron río arriba y se ubican en la zona del intrón más largo que tuvo la secuencia, el cual se ubicó entre los nucleótidos 1840 y 4562 (Figura 2A). Los alineamientos de las secuencias de ARNm de *SIR2* de *A. mellifera* contra 37 secuencias reportadas y validadas de organismos vertebrados e invertebrados, además de ETS recuperadas a través de BLASTn, con los parámetros de alta y media similitud, en las cuales más del 60 % fueron provenientes de insectos y entre estas el 50% eran de otras especies de la familia Apoidea. Se determinó que los dos exones ubicados en la parte final de las tres variantes predictivas de ARNm eran conservados, por ende, con alta probabilidad de expresión en *A. mellifera* (Figura 2B). Así mismo, las ETS de media similitud provenientes de otros organismos también mostraron a estos dos exones finales (Apéndices B y D).

Figura 2.

Estructura de exones y alineamientos múltiples



Nota. (A) Cartografía de *SIR2* y sus tres posibles variantes de procesamiento alternativo anotadas en el GenBank, además dos marcos abiertos de lectura recuperados por ORFfinder y FGENESH en las predicciones *ab initio*. (B) Alineamientos múltiples de 565 secuencias (ARNm y ETS) provenientes de invertebrados y vertebrados contra las variantes de *SIR2* y su ARNm.

El uso de programas para caracterizar los sitios de corte y empalme de la secuencia del gen *SIR2* recuperaron un número significativo de nuevos sitios predictivos. En la Tabla 1 se muestran los sitios de corte y empalme o donador/aceptor anotados en el GenBank, contrastados con los sitios/coincidencias encontrados con los programas usados para esta investigación. Los softwares Spliceator, Splite Site y ASSP fueron los que encontraron mayores puntos de corte alternativos, los cuales se calificaron con las categorías: constitutivo y críptico/alternativo. Se encontró que siete de los sitios donantes y dos sitios aceptores fueron clasificados como constitutivos y se clasificaron como crípticos/alternativos de estos, dos correspondieron a donantes y seis a aceptores. Cabe destacar que cuatro sitios de corte y empalme fueron localizados por los softwares por medio de la configuración de confianza o credibilidad baja o media, los cuales corresponden a dos constitutivos y dos crípticos/alternativos.

En los 18 sitios de procesamiento alternativo anotados del ARNm, 10 de estos no coincidieron exactamente en los sitios canónicos GT para el flanco 5' del donante, y AG para el sitio aceptor en 3'. En estos puntos de corte y empalme se encontró que no eran consistentes los resultados de los softwares frente a lo reportado en el GenBank, algunos de ellos presentaron extendido el sitio de corte/empalme en máximo tres nucleótidos río arriba o abajo. Por otra parte, en la caracterización de las secuencias consideradas intrones (Apéndice B), se observó que existe sesgo hacia los nucleótidos Adenina y Timina en las secuencias consenso de las regiones o sitios que potencializan el reconocimiento intrónico por parte de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, por sus siglas en inglés).

Tabla 1.

Caracterización y comparación de los sitios de corte y empalme anotados en el GenBank

Posición	Tipo de corte	Característica	Secuencia
301	Donante	Constitutivo	CCGAAG_gtattt
596	Aceptor	Críptico/Alternativo	ttatag_AAGTGA
937	Donante	Críptico/Alternativo*	AAAAAA_gtacga
1018	Aceptor	Críptico/Alternativo	ttatag_AGACAT
1150	Donante	Constitutivo	TTGCCT_gtaagt
1284	Aceptor	Constitutivo	tttcag_AATTGA
1518	Donante	Críptico/Alternativo.	TTTGGA_ag_gtatac**
1628	Aceptor	Constitutivo*	tatttc_AG_ATTATA**
1843	Donante	Constitutivo*	GATCCA_cag_gtgatg**
4563	Aceptor	Críptico/Alternativo	acatt_CAG_GCTATG**
4773	Donante	Constitutivo	TGTCAT_g_gtgaca**
4866	Aceptor	Críptico/Alternativo	atttaa_G_GCTCCT**
5024	Donante	Constitutivo	TTATAA_ag_gtaatt**
5521	Aceptor	Críptico/Alternativo	atttac_AG_ATTTAG**
5799	Donante	Constitutivo	TCATTT_gtaagt
5898	Aceptor	Críptico/Alternativo*	ttaaag_AATGGA
6742	Donante	Constitutivo	GATTAC_cag_gtatat**
6864	Aceptor	Constitutivo	ttttg_CAG_AAAATT**

Nota. En la columna de posición se hace referencia a los sitios anotados en el GenBank. (*) estos sitios fueron recuperados con los softwares de predicción con las configuraciones de media y baja confianza, la categoría Constitutivo hacen referencia a los sitios canónicos de corte-empalme en los flancos de exón-intrón o intrón-exón, mientras Críptico/Alternativo son los sitios no canónicos. (**) Los nucleótidos en mayúscula pertenecen a la región tomada como exónica, mientras que los nucleótidos en minúscula hacen parte de la región intrónica, los nucleótidos en cursiva y entre las líneas son que no coinciden con lo reportado en el GenBank y lo analizado con los softwares para

predecir sitios potenciales de corte y empalme, si estos nucleótidos están en minúscula o mayúscula se pueden considerar como sitios extendidos.

4.3 Diseño y síntesis de cebadores

Los cebadores diseñados y sintetizados se muestran en la Tabla 2, las posiciones de estos con respecto a los exones de cada una de las variantes anotadas en el GenBank, la Variante X2 no será amplificada por el cebador Sentido, ya que inicia con desplazamiento río abajo respecto a las dos restantes; el cebador Anidado y Reverso fueron ubicados en los dos últimos exones, se seleccionaron estos exones con relación a los resultados de los alineamientos y la predicción de los sitios potenciales para codificar proteína antes mencionados (Apéndice C).

Tabla 2.

Cebadores diseñados para este ensayo

Genes	Secuencia y nombre de los cebadores	Coordenadas (nt)		
		Variante X1	Variante X2	Variante X3
<i>SIR2</i>	Sentido 5' GAAAATGGCGTCAGGCTCG 3'	150-168	No aplica*	150-168
	Anidado 5' GGAGAGAGTCCAAAAGAAG 3'	2476-2495	2019-2038	1840-1859
	Reverso 5' CAGATGCTAATACGTAACGTG 3'	3555-3575	3098-3118	2919-2939
<i>Actina</i>	Sentido 5' GACGAGGCTCAAAGTAAAAG 3'		335-354	
	Reverso 5' GATGTGGATCTCGAAACAGG 3'		1231-1250	
Tamaño esperado de los amplicones				
<i>SIR2</i>	Sentido - Reverso	3425 pb	---	2789 pb
	Anidado - Reverso	1099 pb	1099 pb	1099 pb
<i>Actina</i>			915 pb	

*Nota** El cebador Sentido no híbrida con la secuencia de la variante 2

4. 4 Predicción de conjuntos termodinámicos

La energía libre del conjunto termodinámico fue de -1526.60 kcal/mol para *SIR2*, se encontró que la estructura predictiva de la secuencia completa de del ARNm se distribuyó en dos regiones (Figura 3). La región 1 comprende entre los nucleótidos 1 - 1860 y 7400 – 7704, se caracterizó por contener el inicio y el final de la secuencia y el sitio de hibridación de los cebadores Sentido y Reverso, los cuales coincidieron en un tallo y tallo-burbuja (Figura 3B), pero la secuencia del último exón está ubicada en su gran mayoría en la región dos esta región. La región dos y uno se unen por tallo de gran tamaño que se forma por la hibridación del intrón cuatro y el último exón. Por su parte, el cebador Anidado se ubica en la región dos, y esta contiene gran parte de la secuencia del gen *SIR2* (Apéndice E).

4.2 Extracción de ácidos nucleicos

La concentración del ARN total fue en promedio de $286,1 \pm 25,78$ ng/uL, la relación 260/280 en ARN fue de $1,96 \pm 0,06$ en promedio entre las tres réplicas de extracción que se realizaron, lo que indica una pureza óptima; la segunda relación 260/230, para el ARN total, fue en promedio de $2,31 \pm 0,08$ este valor evidencia alta pureza y casi nula contaminación por sales. Por su parte, el ADNg tuvo un valor de concentración de $183,65 \pm 16,51$ ng/uL en promedio y su relación 260/280 fue de 1.82 ± 0.07 , los métodos empleados no fueron eficientes en la extracción de ADNg, lo cual se reflejó en los resultados de las aplicaciones posteriores.

Tabla 3.

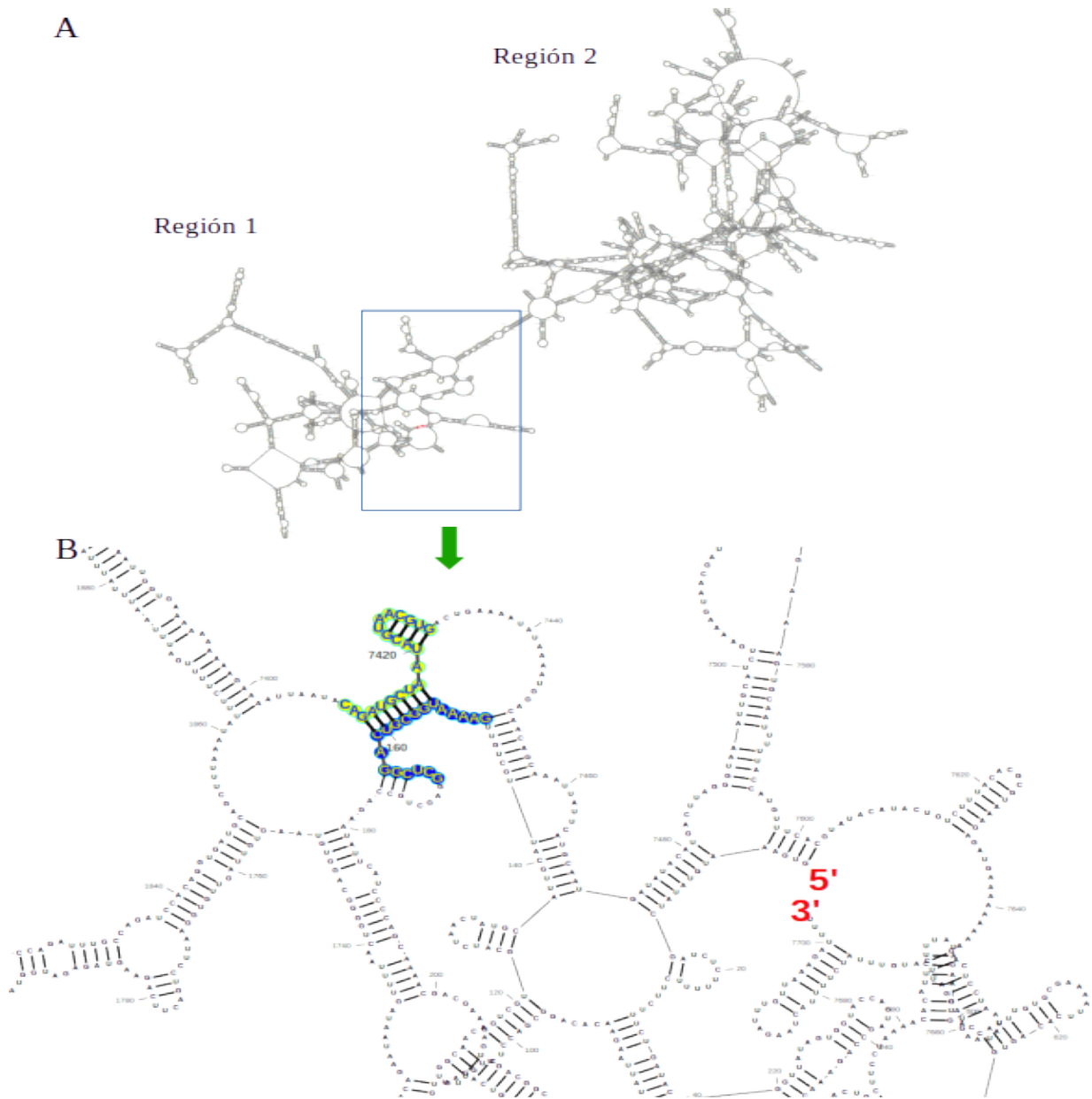
Medidas de concentración y pureza del material genómico extraído

Tipo	Concentración (ng/uL)		Relación A 260/280		Relación A 260/230	
	(ng/uL)	Desviación	A 260/280	Desviación	A 260/230	Desviación
ARN	286.10	25.78	1.93	0.06	2.31	0.08
ADN	183.65	16.51	1.82	0.07	2.14	0.29

Nota. Cada una de las medidas se realizó por triplicado

Figura 3.

Estructura 2D de SIR2



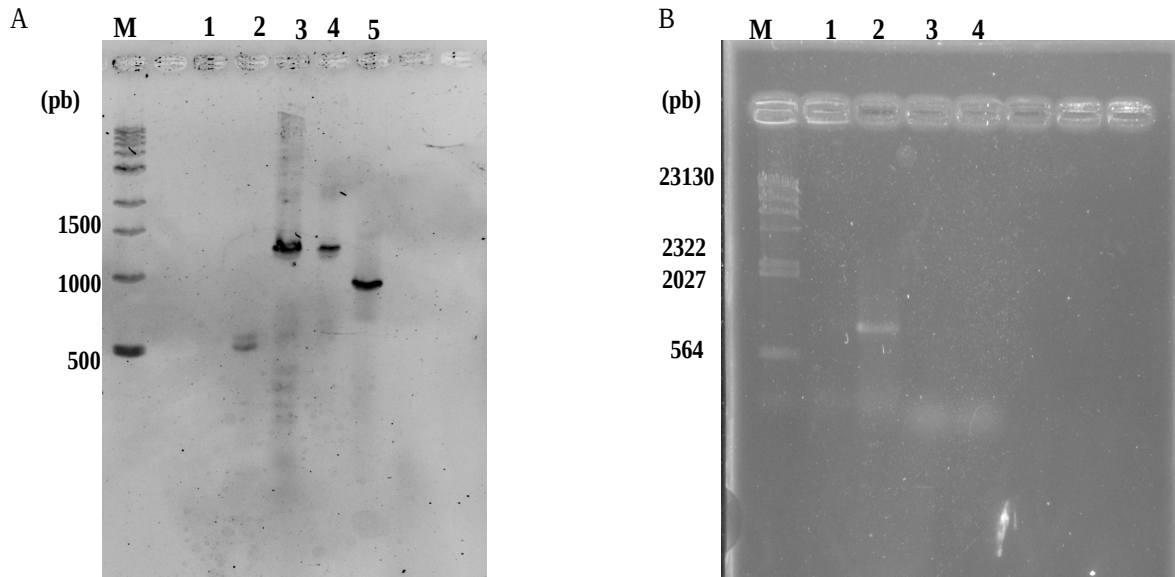
Nota. (A) La estructura 2D del gen se distribuye en dos regiones, la región 1 abarca los primeros cuatro o cinco exones, según la variante; mientras, la región 2 inicia en el intrón 4 (mayor tamaño)

y finaliza en el último exón. (B) los cebadores Sentido y Reverso coinciden en un tallo y burbuja, resaltados en azul y verde respectivamente.

4.3 RT-PCR de un paso y PCR convencional

La amplificación del ADNc diana *SIR2* por medio de los cebadores Sentido y Reverso, presentó un amplicón adicional respecto a las predicciones de los softwares y anotaciones del GenBank que no estaba detallada, por lo que se hipotetizó como una posible variante de procesamiento alternativo de *SIR2* aún no descrita. Además, este nuevo amplicón solo fue visible en las muestras de zánganos con un tamaño de 500-600 pb aproximadamente (Figura 4A, carril 2). Por su parte, las muestras de obreras no amplificaron con el mismo conjunto de cebadores, por ende, no se visualizó ningún amplicón en todo el carril (Figura 4A, carril 1).

Por otro lado, al realizar RT-PCR con los cebadores Anidado y Reverso, fue posible visualizar un amplicón de 1000-1100 pb aproximadamente, este resultado también se visualizó en las muestras de zángano (Figura 4A, carriles 3 y 4 respectivamente). El control positivo, *actina* generó el amplicón esperado de 900 pb (Figura 4A, carril 5). Al cambiar de la RT-PCR anterior algunas condiciones como: temperaturas de hibridación, concentraciones de muestras y cebadores; no generó algún amplicón en obrera, pero en zángano si se observó amplificación para los cebadores antes mencionados (Apéndice H). Las amplificaciones por PCR correspondientes a *SIR2* con el ADNg extraído por medio de la combinación de métodos (Chelex-100 y Salting-out) no fue positiva, al no visualizarse los amplicones esperados, no obstante el gen *actina* si generó el amplicón esperado (Figura 4B).

Figura 4.*Patrón de RT-PCR de un paso.*

Nota. Electroforesis en gel de agarosa (2 % y 0.7 % respectivamente) para la separación y visualización de los amplicones generados por RT-PCR y PCR para *SIR2* y *actina*. (A) M, marcador GeneRuler 1 kb (ThermoFisher). Carriles 1 y 2, los productos amplificados con los cebadores Sentido y Reverso de *SIR2*, para las castas obreras y zánganos respectivamente. Se destaca que en la casta de las obreras no revelo expresión del gen para *SIR2*. Carriles 3 y 4, contienen los amplicones de con los cebadores Anidado y Reverso en las dos castas de estudio. Carril 5, control positivo de las reacciones con el gen *actina*, para esta corrida se empleó ARN de obrera. (B) PCR con los cebadores de *SIR2* en muestras de obreras. M, Marcador Lambda DNA/HindIII (ThermoFisher). Carril 1, ADN extraído, Carril 2, producto de PCR con los cebadores del gen *actina*. Carril 3 y 4, el conjunto de cebadores del gen *SIR2* no amplificaron.

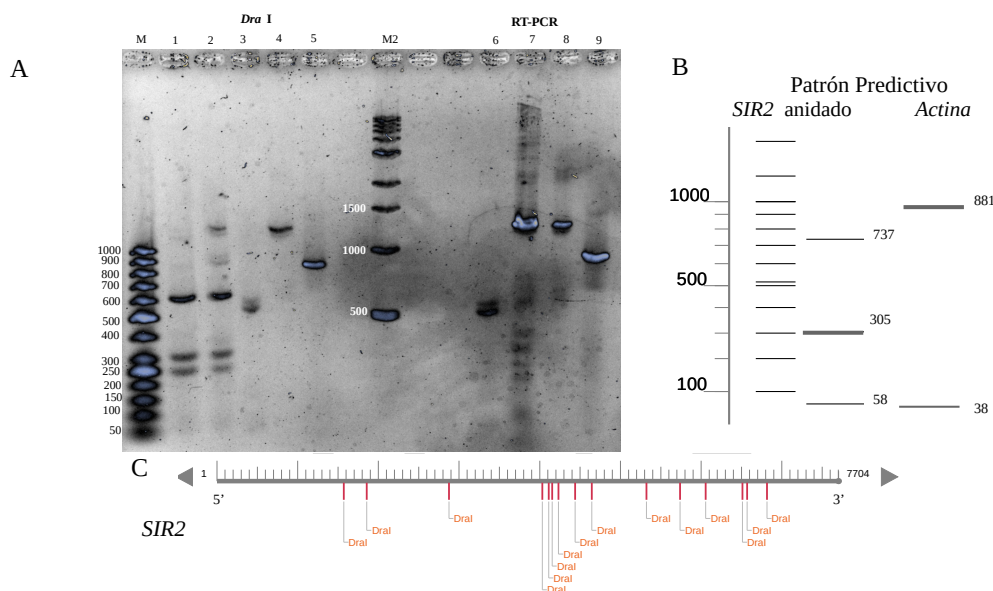
4.5 Mapas de restricción

El análisis *in silico* para la secuencia del gen *SIR2* para identificar los sitios de digestión específicos *DraI* evidencio 15 sitios específicos, pero ninguno de estos coincide con el primero o el último exón de las variantes predictivas (Figura 5B), lo cual sugirió que el nuevo amplicón obtenido no sería reconocido por la enzima. Por su parte, el fragmento que es amplificado por los cebadores Anidado y Reverso que comprende el penúltimo y último exón contiene dos sitios específicos *DraI*, lo cual da origen a tres fragmentos de restricción (Figura 5B).

Como se observa en la Figura 5A, la actividad de la enzima *Dra I* en los amplicones de RT-PCR para este fragmento en obreras y zánganos, se determinó que los tres patrones de restricción difieren en tamaño con el análisis *in silico*, no obstante, se mantuvieron dos sitios de restricción reconocidos por la enzima. Finalmente, la variante de *SIR2* de zángano y *actina* no se observó ninguna digestión.

Figura 5.

Patrón de restricción en los amplicones de SIR2.



Nota. (A) Gel de electroforesis al 2.5 % de agarosa con los productos de digestión de la enzima de restricción *DraI* (Izquierda) y los productos de RT-PCR que fueron sometidos a digestión. M y M2, marcadores 50 pb GeneRuler (ThermoFisher) y 1 kb respectivamente. Los carriles 1 (obreras) y 2 (zánganos) contienen los productos de RT-PCR con los cebadores Anidado y Reverso, los cuales se pueden contrastar con carriles 7 y 8. Carriles 3 y 6, la nueva variante de procesamiento alternativo hallada en esta investigación, este producto no fue digerido por la enzima. Carril 4 es el control negativo de la digestión. 5 y 9 el amplicón de la *actina*. (B) patrón de electroforesis predictivo por medio de la plataforma NEB cutter de New England Biolabs. (C) mapa de restricciones de la secuencia completa de *SIR2*, se destaca que entre las primeras 1500 posiciones y las últimas 800 no existe sitios de corte específicos para la enzima *DraI* cuya secuencia palindrómica es TTT AAA

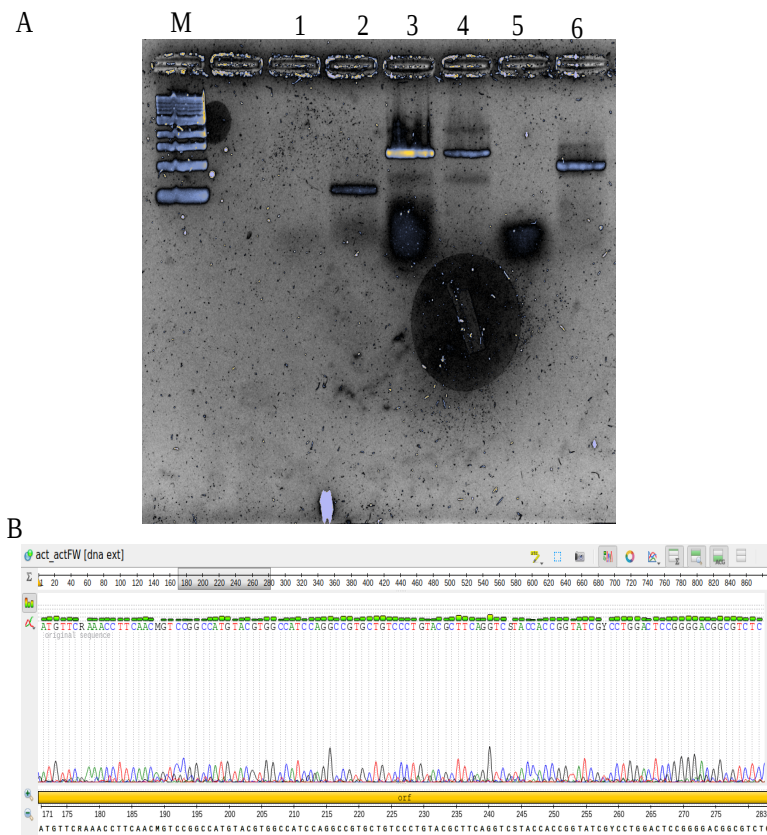
4.6 Secuenciación

La pureza e integridad de los amplicones de *SIR2* y *actina* fueron pertinentes para su secuenciación, sin embargo, el amplicón de *SIR2* generado en obrera y zángano mostraron dos amplicones adicionales lo que requirió su clonación en plásmido para su secuenciación tipo Sanger, mientras los otros dos amplicones fueron secuenciados directamente (Figura 6). De este proceso no se obtuvo buenas lecturas para el nuevo patrón de amplificación de *SIR2* obtenido en este ensayo, el mismo resultado negativo coincidió para los dos servicios de secuenciación mencionados en la sección de métodos. Por su parte, los resultados de secuenciación tipo Sanger para el amplicón *actina*, género en dirección sentido una lectura de 900 pb y el reverso 500 pb. El solapamiento de ambas lecturas e identificación con la base de datos del GenBank indicó que corresponde a la secuencia determinada por métodos computacionales con una identidad del 98%,

lo cual se corroboró con una búsqueda en BLASTn y posterior análisis filogenético con secuencias de organismos modelo. La secuencia fue reportada en el GenBank, pero aún no estará disponible al público (Figura 6, Apéndice F).

Figura 6.

Secuencia actina en sentido 5' – 3'.



Nota. (A) los productos de RT-PCR fueron resueltos en gel de agarosa al 3 % para confirmar la concentración y la integridad de los mismos, los círculos negros fueron burbujas de aire al momento de revelar el gel en el fotodocumentador. (B) Lectura en sentido 5' – 3' del gen *actina* para muestra de zángano con el método de secuenciación Sanger.

5. DISCUSIÓN

En la actualidad las abejas han ganado un papel protagónico por causa de la muerte en masa, pérdida de colonias y bajo rendimiento en los cultivos. Así mismo, el interés científico por la drástica diferencia en la esperanza de vida entre las castas sociales ha motivado a realizar investigaciones para explicar este fenómeno biológico. En esta investigación validamos la transcripción del gen *SIR2* en dos castas sociales de *Apis mellifera* (obreras y zánganos) por medio de RT-PCR. Se descubrió un nuevo patrón de PCR que puede estar asociado al procesamiento alternativo de corte y empalme de ARNm inmaduro, que a su vez, es exclusivo para la casta de los zánganos.

Los resultados de búsqueda de sitios de empalme con otros algoritmos arrojo una gran cantidad de sitios posibles en las configuraciones alta y media credibilidad en cuanto a la aceptación, frente a los anotados por el GenBank, así mismo, el uso de programas para obtener un nuevo análisis de marcos abiertos de lectura recupero algunos exones en regiones consideradas intrones. Qu y colaboradores, plantearon que los sitios de corte y empalme alternativo se pueden interpretar como el código genético, las secuencias que flanquean a los sitios, tanto en intrones como en exones, siguen una composición biológicamente ordenada (2017). Los algoritmos con los cuales GenBank predice o anota genes y variantes de procesamiento usan la probabilidad de que una secuencia dada sea un gen al identificar regiones o sitios: donador aceptor, homologías, promotores, potenciadores, codones de inicio y parada, longitud de los posibles exones e intrones, pero es sabido que estos programas no son efectivos en 20% de los casos de estudio (Brzoska et al., 2006; Jian et al., 2014). El usar nuevos programas de predicción de sitios de corte pretende reducir los sesgos por falsos negativos, los cuales equivalen a sitios de corte o flancos 5' y 3' no canónicos

que además tienen internamente elementos *cis* de reconocimiento de las snRNP (Leung et al., 2014; Li et al., 2020).

Algunos de los programas que se han empleado para esta investigación fueron desarrollados en función de aprendizaje automático, profundo y supervisado; entre ellos se pueden diferenciar en la cantidad de secuencias nucleotídicas empleadas para entrenar los modelos, y los elementos de búsqueda, además la cantidad y calidad misma de los datos (Wang y Marín, 2006; Scalzitti et al., 2021). Sumado a lo anterior, algoritmos anteriores empleaban secuencias de organismos modelo, ejemplo: humano, *D. melanogaster* y *A. thaliana*, entre otras, para entrenar y predecir (Jian et al., 2014). Por lo tanto, es incorrecto asumir que el genoma de las abejas, su expresión y regulación sean idénticos a estos, y que las predicciones anotadas en las bases de datos no puedan tener estar sujetas al error o la exclusión de nuevas variantes.

Es sabido que el reconocimiento de sitios de corte y empalme crípticos o alternativos depende de la cantidad de contenido de GC en la región intrónica, y el flanco 3' o aceptor de esta región, será diferente al constitutivo AG|H, no depende de la unión del factor de corte y empalme U2AF35. Los sitios considerados constitutivos son aquellos que se acomodan a una definición canónica de corte y empalme (contenido de GC > 50%, flancos 5' -AG|GT y 3' YAG|N) (Wang y Marín, 2006). Los genomas ricos en Adenina y Timina como las abejas pueden ser más propensos a tener mayores variables de procesamiento alternativo, dado que al poseer menor contenido en Guanina y Citocina este no estará distribuido, de tal forma que se ajusten las secuencias polinucleotídicas consenso que reconocen las snRNP (Amit et al., 2012).

La predicción de la estructura secundaria es una buena herramienta para interpretar los resultados del procesamiento alternativo, en investigaciones anteriores se ha informado de la conexión entre las conformaciones geométricas que toma el ARNm inmaduro y la posibilidad de

reconocimiento por parte de las proteínas snRNP hacia los sitios *cis* (potencializadores de exones e intrones) (Warf y Berglund, 2010; Rangan et al., 2022; Yadav et al., 2023); los tallos pueden inhibir o mejorar el corte y empalme dependiendo de las secuencias que se ubique en estos, al igual que las burbujas que mejoran el reconocimiento de los sitios *cis* por parte de las proteínas snRNP (Jones et al., 2022). El tamaño del amplicón de esta nueva posible variante de *SIR2* sugiere el silenciamiento de algunos exones, por lo cual se puede plantear que la geometría que adquiere el ARNm al momento de ser transcrito juega en favor de esta hipótesis. La estructura predictiva tiene la unión parte del primer y último exón, además que los sitios de hibridación de los cebadores coinciden en tallo, lo cual podría explicar el porqué del tamaño de esta variante, y el comportamiento regulador del espliceosoma en el procesamiento. Sin embargo, la falta de una secuencia de esta variante no nos permite dar más insumos para una mejor interpretación.

La implementación del kit de perlas magnéticas y el extractor automatizado Kingfisher reducen la contaminación cruzada y mejora la eficiencia de la cantidad y calidad del ARN total; además, la efectiva conservación y manipulación de las muestras han sido determinantes para los resultados en las aplicaciones posteriores, dado que se han seguido estándares y protocolos en investigación molecular de abejas y otro tipo de insectos (Dainat et al., 2011; Evans et al., 2013). La adición extra de reactivos al protocolo de extracción repercute en optimización de la calidad y cantidad de ARN recuperado. Igualmente, la correcta interpretación del tejido, dado que algunos autores sugieren la extracción de ácidos nucleicos con protocolos similares a los de plantas, ya que estas últimas tienen un alto contenido de metabolitos secundarios, que son adquiridas por las abejas mientras forrajea el polen (Hunt, 1997; Soares et al., 2023). El rendimiento y purificación del ARN total ha sido bueno en comparación a otros protocolos que utilizan reactivos orgánicos (Forsgren et al., 2017), bajo la salvedad que para este ensayo se utilizó menos cantidad de abejas o

muestra. Adicionalmente, no se han encontrado implementaciones anteriores de este tipo de kit viral para extracción y purificación de ARN en abejas, sin embargo, se tiene reporte de uso para la extracción en virus de plantas (Dang et al., 2022; Sun et al., 2014).

En cuanto a la extracción de ADNg se puede determinar que los protocolos usados no han sido suficientemente efectivos para tal propósito, probablemente a la prevalencia de compuestos y rastros de celulares que no han sido plenamente removidos de la solución, dado que los valores reportados en la concentración y pureza, relación 260/280 y 260/230, indican contaminación con proteína de restos celulares y sales utilizadas en la extracción (Lucena-Aguilar et al., 2016; Gallagher, 2017). Tal complejidad también ha sido reportada en el procesamiento de muestras de Espodópteros o en insectos xilófagos (Marín et al., 2021), ya que las dietas y las etapas de vida generan metabolitos secundarios. Por su parte, las abejas y su actividad de colecta de polen y néctar generan la constante exposición a todos estos compuestos de las plantas, fenoles y taninos, los cuales tienen un comportamiento de ácidos orgánicos y pueden degradar el ADN o inhibir exonucleasas como la proteinasa K (Calderón-Cortés et al., 2010; Hýbl et al., 2021). el resultado negativo para la amplificación del *SIR2* en la muestra de ADNg puede tener varias interpretaciones, sin embargo, el gen de *actina* sí tuvo amplificación, ya que es un gen constitutivo, abundante en las células del tejido muscular e implicado en la armazón del citoesqueleto (Banerjee et al., 2020). Además, su nivel de expresión no es afectado por factores externos, solo depende de la cantidad de muestra utilizada en los ensayos de PCR; de ahí, que sea un buen candidato a genes de referencia en trabajos posteriores en genómica de abejas (Kozera y Rapacz, 2013). Además, la secuencia de *actina* utiliza en esta investiga está bajo el estatus de predictiva en el GenBank. Por lo cual, la primera validación experimental de esta secuencia parcial de CDS reportada es una contribución al desarrollo de marcadores fiables para investigación genómica de abejas.

El patrón de RT-PCR de *SIR2* hallado en esta investigación asociado a los zánganos, puede tener diversas interpretaciones. Dentro de las principales es considerarlo como una nueva variante de corte y empalme alternativo de ARNm de aproximadamente 600 pb, ya que en las réplicas de RT-PCR se realizaron cambios en: las temperaturas de hibridación de cebadores, en las concentraciones de muestra y cebadores diferentes a las indicadas en la metodología: donde se obtuvo el mismo tamaño de banda en el gel de electroforesis, lo anterior permite dar soporte a la hipótesis para considerar que este patrón es estructural y biológico, y no un artefacto de PCR.

En este sentido, en la actualidad se ha identificado que los ARN cortos pueden tener tamaños superiores a 200 nucleótidos y cercanos a los 500 pb (Chen y Carmichael, 2010). Este tipo de ARN puede tener variadas funciones celulares, como señalizadores, represores, esponjas de micro ARN, relacionado con modulaciones epigenéticas, determinación de la identidad celular, entre otras (Yin et al., 2021). En el genoma humano, se han identificado aproximadamente 16.000 ARN largos que no codifican, y una proporción importante de estos, tienen tamaños similares a los antes mencionados, los cuales comparten con los codificantes ser transcritos por la ARN-polimerasa II, colas poli a en el extremo 3' y cap en 5' (Sun et al., 2018). Además, algunos derivan del directamente del procesamiento alternativo del ARNm inmaduro; por lo tanto, pueden estar constituidos de las regiones exónicas, intrónicas y ser sentido 5' - 3' o antisentido (Yao et al., 2019; Connerty y Lock. 2023).

El homólogo en vertebrados, *SIRT1*, también ha presentado nuevas variantes de procesamiento alternativo de tipo ARN largos no codificantes, en humanos una variante de aproximadamente 266 pb fue caracterizada y relacionada con la miogénesis (Wang-Yu et al., 2014). Los micro ARN que están relacionados con la expresión de *SIRT1* en humanos e implicados

en enfermedades como cáncer han sido caracterizados, algunos de ellos son micro ARN producto del mismo gen (Yamakuchi et al., 2012; Salman et al., 2022).

Las abejas son insectos que se organizan en castas sociales, y estas determinan el trabajo al interior de la colmena, el cual influye en la expresión de genes, así mismo las condiciones climáticas o la estación del año en la que se colecta los individuos afectan directamente la genómica de estos insectos (Moon et al., 2018). En general, los avances en transcriptómica ha permitido la identificación de ARN largos no codificantes en los insectos (Choudhary et al., 2021). Se ha reportado la interacción de este tipo de ARN en el proceso de desarrollo y epigenética en las abejas obreras melíferas, el gen *Nb-1* (gen selectivo del cerebro de la abeja nodriza-1) presenta expresión de ARN no codificante en las nodrizas de la colonia, abejas jóvenes, en tejido neuronal, en comparación con la reina y las obreras más adultas o recolectoras, lo cual indica que interviene en la regulación hormonal (Tadano et al., 2009). Así mismo, *AncR-1* y *Ks-1* son otros genes que ha reportado la expresión de ARN no codificantes dependientes del sexo y etapa de desarrollo, estos genes se expresan en neuronas y órganos sensitivos (Sawata et al., 2004; Kiya et al., 2008). No obstante, se reconoce la ausencia de la secuenciación para certificar que este patrón de PCR nuevo es producto del corte y empalme alternativo, posiblemente que el primer exón y último fueron empalmados.

El genoma de *A. mellifera* concomitantemente los genes amplificados en este ensayo son ricos en A-T, por tal motivo se usó la enzima *DraI* que reconoce sitios específicos de digestión exclusivos para estos dos nucleótidos. No obstante, los fragmentos de restricción no coinciden con lo predicho por las herramientas bioinformáticas usadas en el análisis *in silico*, lo cual nos indica la variabilidad genética en el gen *SIR2* vía polimorfismo de restricción (Hudson, 1982). Si bien es cierto que la familia de las Sirtuinas tiene dominios conservados entre los eucariotas unicelulares y

pluricelulares, también posee sus sitios variables (Buck et al., 2004; Greiss y Gartner, 2009), los cuales pueden presentar polimorfismo entre poblaciones aisladas geográficamente, como es el caso de la secuencia de referencia que pertenece a individuos del norte de Europa y Norteamérica (Wallberg et al., 2019). Es de resaltar la coincidencia en el patrón de los fragmentos entre las dos castas sociales aquí estudiadas. Por su parte, el producto de RT-PCR de los cebadores Anidado y Reverso muestran que los dos últimos exones predictivos sí están siendo expresados en las dos castas sociales, además de indicar que la expresión de una variante de mayor tamaño, la cual puede tener el sitio de inicio de la traducción en posición diferente a la anotada en el GenBank.

6. CONCLUSIÓN

El gen y los ARN mensajeros de *SIR2* y *actina* indicados en el genoma internacional de la abeja *A. mellifera* contienen secuencias para su amplificación por medio de ADN polimerasas termoestables, ~~de este último se demuestra un polimorfismo entre la secuencia obtenida respecto a la reportada en el genoma de la especie de estudio.~~

El uso del kit de extracción de perlas magnéticas es una buena opción para la purificación del ARN total proveniente de insectos como las abejas, así mismo el empleo de mezcla maestra de RT-PCR de un paso agiliza los resultados, lo cual permite identificar y discriminar la expresión de genes en organismo de estudio.

El gen *SIR2* está presente en las abejas y se expresa en tejidos de abdomen, tórax y protocerebro. No obstante, su expresión entre las castas de estudio fue diferente, este hecho nos sugiere que la secuencia de *SIR2* reportada para *A. mellifera* posiblemente sea más compleja y pueda tener más regiones que no estén detalladas.

El patrón de RT-PCR hallado en esta investigación, y que probablemente sea una nueva variante de procesamiento alternativo, está asociado a la expresión que ocurre en la fisiología de las castas de abejas.

El patrón de restricción de los productos de RT-PCR evidencia que existe variabilidad entre los individuos colectados en Málaga y la secuencia reportada en el GenBank.

Bibliografía

- Almeida, E. A. B., Bossert, S., Danforth, B. N., Porto, D. S., Freitas, F. V., Davis, C. C., Murray, E. A., Blaimer, B. B., Spasojevic, T., Ströher, P. R., Orr, M. C., Packer, L., Brady, S. G., Kuhlmann, M., Branstetter, M. G., y Pie, M. R. (2023). The evolutionary history of bees in time and space. *Current Biology: CB*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.07.005>
- Amaral, P., Carbonell-Sala, S., De La Vega, F. M., Faial, T., Frankish, A., Gingeras, T., Guigo, R., Harrow, J. L., Hatzigeorgiou, A. G., Johnson, R., Murphy, T. D., Pertea, M., Pruitt, K. D., Pujar, S., Takahashi, H., Ulitsky, I., Varabyou, A., Wells, C. A., Yandell, M., ... Salzberg, S. L. (2023). The status of the human gene catalogue. *Nature*, 622(7981), 41–47. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06490-x>
- Amit, M., Donyo, M., Hollander, D., Goren, A., Kim, E., Gelfman, S., Lev-Maor, G., Burstein, D., Schwartz, S., Postolsky, B., Pupko, T., y Ast, G. (2012). Differential GC content between exons and introns establishes distinct strategies of splice-site recognition. *Cell Reports*, 1(5), 543–556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.013>
- Angeli, A. (2024). Reverse transcriptase. En *Metalloenzymes* (pp. 23–34). *Elsevier*.
- Assessment report on pollinators, pollination and food production. (2018, junio 26). IPBES Secretariat. <https://ipbes.net/assessment-reports/pollinators>
- Balliu, B., Durrant, M., Goede, O. de, Abell, N., Li, X., Liu, B., Gloudemans, M. J., Cook, N. L., Smith, K. S., Knowles, D. A., Pala, M., Cucca, F., Schlessinger, D., Jaiswal, S., Sabatti, C., Lind, L., Ingelsson, E., y Montgomery, S. B. (2019). Genetic regulation of gene expression and splicing during a 10-year period of human aging. *Genome Biology*, 20(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1840-y>
- Banerjee, K. K., Ayyub, C., Ali, S. Z., Mandot, V., Prasad, N. G., y Kolthur-Seetharam, U. (2012). DSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner. *Cell Reports*, 2(6), 1485–1491. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.013>

- Banerjee, S., Gardel, M. L., y Schwarz, U. S. (2020). The actin cytoskeleton as an active adaptive material. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 11(1), 421–439. <https://doi.org/10.1146/annurev-conmatphys-031218-013231>
- Bataglia, L., Simões, Z. L. P., y Nunes, F. M. F. (2021). Active genic machinery for epigenetic RNA modifications in bees. *Insect Molecular Biology*, 30(6), 566–579. <https://doi.org/10.1111/imb.12726>
- Bhadra, M., Howell, P., Dutta, S., Heintz, C., y Mair, W. B. (2020). Alternative splicing in aging and longevity. *Human Genetics*, 139(3), 357–369. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02094-6>
- Bhat, G. R., Sethi, I., Rah, B., Kumar, R., y Afroze, D. (2022). Innovative in silico approaches for characterization of genes and proteins. *Frontiers in genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.865182>
- Bonkowski, M. S., y Sinclair, D. A. (2016). Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(11), 679–690. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.93>
- Brzoska, P. M., Brown, C., Cassel, M., Ceccardi, T., Di Francisco, V., Dubman, A., Evans, J., Fang, R., Harris, M., Hoover, J., Hu, F., Larry, C., Li, P., Malicdem, M., Maltchenko, S., Shannon, M., Perkins, S., Poulter, K., Webster-Laig, M., ... Samaha, R. R. (2006). An efficient and high-throughput approach for experimental validation of novel human gene predictions. *Genomics*, 87(4), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.11.016>
- Buck, S. W., Gallo, C. M., y Smith, J. S. (2004). Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(6), 939–950. <https://doi.org/10.1189/jlb.0903424>
- Burge, C. B. (1998). Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. *En Computational Methods in Molecular Biology* (pp. 129–164). Elsevier.

- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Cano-Camacho, H., y Zavala-Páramo, G. (2010). A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5056–5064. <https://doi.org/10.3390/ijms11125056>
- Camacho, C., Boratyn, G. M., Joukov, V., Vera Alvarez, R., y Madden, T. L. (2023). ElasticBLAST: accelerating sequence search via cloud computing. *BMC Bioinformatics*, 24(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05245-9>
- Cardoso-Junior, C. A. M., Ronai, I., Hartfelder, K., y Oldroyd, B. P. (2020). Queen pheromone modulates the expression of epigenetic modifier genes in the brain of honeybee workers. *Biology Letters*, 16(12), 20200440. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0440>
- Carreck, N. L., Andree, M., Brent, C. S., Cox-Foster, D., Dade, H. A., Ellis, J. D., Hatjina, F., y van Engelsdorp, D. (2013). Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–40. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.4.03>
- Carrillo Oesterreich, F., Herzog, L., Straube, K., Hujer, K., Howard, J., y Neugebauer, K. M. (2016). Splicing of nascent RNA coincides with intron exit from RNA polymerase II. *Cell*, 165(2), 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.045>
- Chen, L.-L., y Carmichael, G. G. (2010). Long noncoding RNAs in mammalian cells: what, where, and why? *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(1), 2–21. <https://doi.org/10.1002/wrna.5>
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Choudhary, C., Sharma, S., Meghwanshi, K. K., Patel, S., Mehta, P., Shukla, N., Do, D. N., Rajpurohit, S., Suravajhala, P., y Shukla, J. N. (2021). Long non-coding RNAs in insects. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(4), 1118. <https://doi.org/10.3390/ani11041118>
- Connerty, P., y Lock, R. B. (2023). The tip of the iceberg—The roles of long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 14(6). <https://doi.org/10.1002/wrna.1796>

- Cridland, J. M., Tsutsui, N. D., y Ramírez, S. R. (2017). The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Biology and Evolution*, 9(2), 457–472. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx009>
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., y Neumann, P. (2011). Sampling and RNA quality for diagnosis of honey bee viruses using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*, 174(1–2), 150–152. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.029>
- Danforth, B. N., Sipes, S., Fang, J., y Brady, S. G. (2006). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15118–15123. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604033103>
- Dang, T., Bodaghi, S., Osman, F., Wang, J., Rucker, T., Tan, S.-H., Huang, A., Pagliaccia, D., Comstock, S., Lavagi-Craddock, I., Gadhav, K. R., Quijia-Lamina, P., Mitra, A., Ramirez, B., Uribe, G., Syed, A., Hammado, S., Mimou, I., Campos, R., ... Vidalakis, G. (2022). A comparative analysis of RNA isolation methods optimized for high-throughput detection of viral pathogens in California's regulatory and disease management program for citrus propagative materials. *Frontiers in agronomy*, 4. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.911627>
- Deschênes, M., y Chabot, B. (2017). The emerging role of alternative splicing in senescence and aging. *Aging Cell*, 16(5), 918–933. <https://doi.org/10.1111/accel.12646>
- Evans, J. D., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., De la Rua, P., de Miranda, J. R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lun, C. M., Moritz, R. F. A., Maleszka, R., Muñoz, I., y Pinto, M. A. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–54. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.4.11>
- Forsgren, E., Locke, B., Semberg, E., Laugen, A. T., y Miranda, J. R. de. (2017). Sample preservation, transport and processing strategies for honeybee RNA extraction: Influence on RNA yield, quality, target quantification and data normalization. *Journal of Virological Methods*, 246, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.010>

- Gallagher, S. R. (2017). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Et al [*Current Protocols in Immunology*], 116(1), A.3L.1-A.3L.14. <https://doi.org/10.1002/cpim.20>
- Giannini, T. C., Alves, D. A., Alves, R., Cordeiro, G. D., Campbell, A. J., Awade, M., Bento, J. M. S., Saraiva, A. M., y Imperatriz-Fonseca, V. L. (2020). Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. *Apidologie*, 51(3), 406–421. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00727-3>
- Greiss, S., y Gartner, A. (2009). Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Molecules and Cells*, 28(5), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0169-x>
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R., y Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Guan, C., Zeng, Z. J., Wang, Z. L., Yan, W. Y., y Pan, Q. Z. (2013). Expression of Sir2, Hdac1 and Ash2 in Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Queens and Workers. *Journal of Apicultural Science*, 57(1), 67–73. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0008>
- Haddad, L. S., Kelbert, L., y Hulbert, A. J. (2007). Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Experimental Gerontology*, 42(7), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.02.008>
- Harvey, S. E., Lyu, J., y Cheng, C. (2021). Methods for characterization of alternative RNA splicing. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2372, 209–222. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1697-0_19
- Hebsgaard, S. M., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouzé, P., y Brunak, S. (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, 24(17), 3439–3452. <https://doi.org/10.1093/nar/24.17.3439>

- Hong, J. Y., Fernandez, I., Anmangandla, A., Lu, X., Bai, J. J., y Lin, H. (2021). Pharmacological advantage of SIRT2-selective versus pan-SIRT1-3 inhibitors. *ACS Chemical Biology*, 16(7), 1266–1275. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00331>
- Hsu, C.-Y., y Chuang, Y.-L. (2014). Changes in energy-regulated molecules in the trophocytes and fat cells of young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(8), 955–964. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt163>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., y Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hudson, R. R. (1982). Estimating genetic variability with restriction endonucleases. *Genetics*, 100(4), 711–719. <https://doi.org/10.1093/genetics/100.4.711>
- Hunt, G. J. (1997). Insect DNA extraction protocol. *En Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR* (pp. 21–24). Springer Berlin Heidelberg.
- Hýbl, M., Mráz, P., Šipoš, J., Hoštičková, I., Bohatá, A., Čurn, V., y Kopec, T. (2021). Polyphenols as food supplement improved food consumption and longevity of honey bees (*Apis mellifera*) intoxicated by pesticide thiacloprid. *Insects*, 12(7), 572. <https://doi.org/10.3390/insects12070572>
- Ilyasov, R. A., Lee, M.-L., Takahashi, J.-I., Kwon, H. W., y Nikolenko, A. G. (2020). A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3615–3621. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001>
- Jakubauskienė, E., y Kanopka, A. (2021). Alternative splicing and hypoxia puzzle in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Genes*, 12(8), 1272. <https://doi.org/10.3390/genes12081272>
- Jalali, M., Zaborowska, J., y Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction. *En Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 1–18). Elsevier.

- Jian, X., Boerwinkle, E., y Liu, X. (2014). *In silico* tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 16(7), 497–503. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.176>
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0874-7>
- Johnson, P. Z., y Simon, A. E. (2023). RNAcanvas: interactive drawing and exploration of nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W501–W508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad302>
- Jones, A. N., Graß, C., Meininger, I., Geerlof, A., Klostermann, M., Zarnack, K., Krappmann, D., y Sattler, M. (2022). Modulation of pre-mRNA structure by hnRNP proteins regulates alternative splicing of MALT1. *Science Advances*, 8(31). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abp9153>
- Kandemir, İ., Özkan, A., y Fuchs, S. (2011). Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie*, 42(5), 618–627. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3>
- Kaplan, N., y Linial, M. (2006). ProtoBee: Hierarchical classification and annotation of the honey bee proteome. *Genome Research*, 16(11), 1431–1438. <https://doi.org/10.1101/gr.4916306>
- Katoh, K., Rozewicki, J., y Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Khalifa, S. A. M., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., AlAjmi, M. F., Zhao, C., Masry, S. H. D., Abdel-Daim, M. M., Halabi, M. F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M. A. M., y El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>

- Kitada, M., Ogura, Y., y Koya, D. (2016). The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging*, 8(10), 2290–2307. <https://doi.org/10.18632/aging.101068>
- Kiya, T., Kunieda, T., y Kubo, T. (2008). Inducible- and constitutive-type transcript variants of kakusei, a novel non-coding immediate early gene, in the honeybee brain. *Insect Molecular Biology*, 17(5), 531–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00821.x>
- Kodrík, D., Krišťufek, V., y Svobodová, Z. (2022). Bee year: Basic physiological strategies to cope with seasonality. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular y Integrative Physiology*, 264(111115), 111115. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111115>
- Kotas, M. E., Gorecki, M. C., y Gillum, M. P. (2013). Sirtuin-1 is a nutrient-dependent modulator of inflammation. *Adipocyte*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.4161/adip.23437>
- Kozera, B., y Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Lassmann, T. (2020). Kalign 3: multiple sequence alignment of large datasets. *Bioinformatics* (Oxford, England), 36(6), 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz795>
- Lee, I. H. (2019). Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. *Experimental y Molecular Medicine*, 51(9), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0302-7>
- Leung, M. K. K., Xiong, H. Y., Lee, L. J., y Frey, B. J. (2014). Deep learning of the tissue-regulated splicing code. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(12), i121–i129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu277>
- Li, D., McIntosh, C. S., Mastaglia, F. L., Wilton, S. D., y Aung-Htut, M. T. (2021). Correction to: Neurodegenerative diseases: a hotbed for splicing defects and the potential therapies. *Translational Neurodegeneration*, 10(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00267-w>
- Li, H., Tian, S., Li, Y., Fang, Q., Tan, R., Pan, Y., Huang, C., Xu, Y., y Gao, X. (2020). Modern deep learning in bioinformatics. *Journal of Molecular Cell Biology*, 12(11), 823–827. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa030>

- Liao, Z.-Y., Chen, J.-L., Xiao, M.-H., Sun, Y., Zhao, Y.-X., Pu, D., Lv, A.-K., Wang, M.-L., Zhou, J., Zhu, S.-Y., Zhao, K.-X., y Xiao, Q. (2017). The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. *Experimental Gerontology*, 98, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.032>
- Liu, B., Liu, F., Bai, L., Li, Y., y Yang, G. (2010). Molecular cloning, expression and subcellular distribution of an alternative splice variant of the porcine Sirt2 gene. *Molecular Biology Reports*, 37(3), 1671–1676. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9858-y>
- Loganathan, T., y Doss C, G. P. (2023). Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets. *Functional y Integrative Genomics*, 23(1), 33. <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00947-4>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., y Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Luna-Lucena, D., Rabico, F., y Simoes, Z. L. P. (2019). Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Current Opinion in Insect Science*, 31, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.06.006>
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., y Tatusova, T. (2011). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D52–D57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1237>
- Marasco, L. E., y Kornblihtt, A. R. (2023). The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 24(4), 242–254. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>
- Marín, D. V., Castillo, D. K., López-Lavalle, L. A. B., Chalarca, J. R., y Pérez, C. R. (2021). An optimized high-quality DNA isolation protocol for *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *MethodsX*, 8(101255), 101255. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101255>

- Martin, N., Hulbert, A. J., Mitchell, T. W., y Else, P. L. (2022). Regulation of membrane phospholipids during the adult life of worker honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 136(104310), 104310. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104310>
- Martínez-Pérez, F., Durán-Gutiérrez, D., Delaye, L., Becerra, A., Aguilar, G., y Zinker, S. (2007). Loss of DNA: A plausible molecular level explanation for crustacean neuropeptide gene evolution. *Peptides*, 28(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.09.021>
- Martínez-Pérez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdés, J., y Aréchiga, H. (2005). Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Peptides*, 26(12), 2434–2444. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.05.018>
- Martínez-Sarmiento, R., Ortega-Flórez, N., Maldonado-Quintero, W., Vásquez-Romero, R. (2012). Manual técnico de apicultura : abeja (*Apis mellifera*). *Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/32817>.
- Mautone, N., Zwergel, C., Mai, A., y Rotili, D. (2020). Sirtuin modulators: where are we now? A review of patents from 2015 to 2019. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(6), 389–407. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1749264>
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., y Xu, R. M. (2001). Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*, 105(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00317-8)
- Montoya-Pfeiffer, P., Chamorro, D., Nates-Parra, G. (2016). *Apis mellifera* como polinizador de cultivos en Colombia. *Iniciativa Colombiana de Polinizadores: Abejas ICPA* (pp.95-110) Chapter: 6 Publisher: Universidad Nacional de Colombia
- Moon, K., Lee, S. H., y Kim, Y. H. (2018). Validation of quantitative real-time PCR reference genes for the determination of seasonal and labor-specific gene expression profiles in the head of Western honey bee, *Apis mellifera*. *PloS One*, 13(7), e0200369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200369>
- Münch, D., y Amdam, G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*, 584(12), 2496–2503. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.007>

- Navarrete, B., Ibeas, J. I., y Barrales, R. R. (2023). Systematic characterization of *Ustilago maydis* sirtuins shows Sir2 as a modulator of pathogenic gene expression. *Frontiers in microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1157990>
- Oesterreich, F. C., Bowne-Anderson, H., y Howard, J. (2016). The contribution of alternative splicing probability to the coding expansion of the genome. En *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/048124>
- O'Grady, J. F., Hoelters, L. S., Swain, M. T., y Wilcockson, D. C. (2016). Identification and temporal expression of putative circadian clock transcripts in the amphipod crustacean *Talitrus saltator*. *PeerJ*, 4(e2555), e2555. <https://doi.org/10.7717/peerj.2555>
- Omholt, S. W., y Amdam, G. V. (2004). Epigenetic regulation of aging in honeybee workers. *Science of Aging Knowledge Environment: SAGE KE*, 2004(26), e28. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.26.pe28>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., y Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W163-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
- Paoli, P. P., Wakeling, L. A., Wright, G. A., y Ford, D. (2014). The dietary proportion of essential amino acids and Sir2 influence lifespan in the honeybee. *Age* (Dordrecht, Netherlands), 36(3). <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9649-9>
- Parkinson, J. (Ed.). (2010). Expressed sequence tags (ESTs): Generation and analysis. *Humana Press*.
- Parreño, M. A., Alaux, C., Brunet, J.-L., Buydens, L., Filipiak, M., Henry, M., Keller, A., Klein, A.-M., Kuhlmann, M., Leroy, C., Meeus, I., Palmer-Young, E., Piot, N., Requier, F., Ruedenauer, F., Smaghe, G., Stevenson, P. C., y Leonhardt, S. D. (2022). Critical links between biodiversity and health in wild bee conservation. *Trends in Ecology y Evolution*, 37(4), 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.11.013>

- Patrício-Roberto, G., y Campos, M. (2014). Aspects of landscape and pollinators—what is important to bee conservation? *Diversity*, 6(1), 158–175. <https://doi.org/10.3390/d6010158>
- Phiri, B. J., Fèvre, D., y Hidano, A. (2022). Uptrend in global managed honey bee colonies and production based on a six-decade viewpoint, 1961–2017. *Scientific Reports*, 12(1), 21298. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25290-3>
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., y Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220–229. <https://doi.org/10.1038/nature20588>
- Qu, W., Cingolani, P., Zeeberg, B. R., y Ruden, D. M. (2017). A bioinformatics-based alternative mRNA splicing code that may explain some disease mutations is conserved in animals. *Frontiers in genetics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00038>
- Raime, K., Krjutškov, K., y Remm, M. (2020). Method for the identification of plant DNA in food using alignment-free analysis of sequencing reads: A case study on Lupin. *Frontiers in Plant Science*, 11, 646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00646>
- Rangan, R., Hunter, O., Pham, P., Ares, M., Jr, y Das, R. (2022). RNA structure landscape of *S. cerevisiae* introns. En *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.22.501175>
- Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D., y Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 4(3), 311–323. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>
- Redagricola.com. Recuperado el 14 de marzo de 2024, de <https://redagricola.com/produccion-de-miel-en-colombia-llego-a-las-7-000-toneladas-en-2022/>
- Remolina, S. C., Hafez, D. M., Robinson, G. E., y Hughes, K. A. (2007). Senescence in the worker honey bee *Apis Mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 53(10), 1027–1033. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.05.015>

- Rosenberg, A. B., Patwardhan, R. P., Shendure, J., y Seelig, G. (2015). Learning the sequence determinants of alternative splicing from millions of random sequences. *Cell*, 163(3), 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.054>
- Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrk, M. K., y Page, R. E., Jr. (2007). Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Experimental Gerontology*, 42(10), 1020–1032. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.06.002>
- Salman, M., Kamel, M. A., El-Nabi, S. E. H., Ismail, A. H. A., Ullah, S., Al-Ghamdi, A., Hathout, H. M. R., y El-Garawani, I. M. (2022). The regulation of HBP1, SIRT1, and SREBP-1c genes and the related microRNAs in non-alcoholic fatty liver rats: The association with the folic acid anti-steatosis. *PloS One*, 17(4), e0265455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265455>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., y Karsch-Mizrachi, I. (2024). GenBank 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D134–D137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad903>
- Sawata, M., Takeuchi, H., y Kubo, T. (2004). Identification and analysis of the minimal promoter activity of a novel noncoding nuclear RNA gene, AncR-1, from the honeybee (*Apis mellifera* L.). *RNA (New York, N.Y.)*, 10(7), 1047–1058. <https://doi.org/10.1261/rna.5231504>
- Scalzitti, N., Kress, A., Orhand, R., Weber, T., Moulinier, L., Jeannin-Girardon, A., Collet, P., Poch, O., y Thompson, J. D. (2021). Spliceator: multi-species splice site prediction using convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 561. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04471-3>
- Shi, Y. (2017). Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(11), 655–670. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.86>
- Simon, N., Shallat, J., Williams Wietzikoski, C., y Harrington, W. E. (2020). Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots. *Biology Methods and Protocols*, 5(1), bpaa009. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa009>

- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Strand, M. K., Rueppell, O., y Tarpay, D. R. (2016). Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep32023>
- Singh, U. A., Kumari, M., y Iyengar, S. (2018). Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>
- Smith, D. R. (1991). African bees in the Americas: Insights from biogeography and genetics. *Trends in Ecology y Evolution*, 6(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(91\)90142-k](https://doi.org/10.1016/0169-5347(91)90142-k)
- Soares, S., Rodrigues, F., y Delerue-Matos, C. (2023). Towards DNA-based methods analysis for honey: An update. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052106>
- Soderstrom, K., Qin, W., y Leggett, M. H. (2007). A minimally invasive procedure for sexing young zebra finches. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(1), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.04.007>
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., y Vorobyev, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology*, 7 Suppl 1(Suppl 1), S10.1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-s1-s10>
- Staveley, J. P., Law, S. A., Fairbrother, A., y Menzie, C. A. (2014). A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment: HERA*, 20(2), 566–591. <https://doi.org/10.1080/10807039.2013.831263>
- Sun, N., Deng, C., Zhao, X., Zhou, Q., Ge, G., Liu, Y., Yan, W., y Xia, Q. (2014). Extraction of total nucleic acid based on silica-coated magnetic particles for RT-qPCR detection of plant RNA virus/viroid. *Journal of Virological Methods*, 196, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.012>
- Sun, Q., Hao, Q., y Prasanth, K. V. (2018). Nuclear long noncoding RNAs: Key regulators of gene expression. *Trends in Genetics: TIG*, 34(2), 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.005>

- Sutphin, G. L., y Kaeberlein, M. (2011). Comparative genetics of aging. En *Handbook of the Biology of Aging* (pp. 215–241). Elsevier.
- Tadano, H., Yamazaki, Y., Takeuchi, H., y Kubo, T. (2009). Age- and division-of-labour-dependent differential expression of a novel non-coding RNA, Nb-1, in the brain of worker honeybees, *Apis mellifera* L. *Insect Molecular Biology*, 18(6), 715–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00911.x>
- Tao, Z., Jin, Z., Wu, J., Cai, G., y Yu, X. (2023). Sirtuin family in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1186231>
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931–949. <https://doi.org/10.1038/nature05260>
- Tibatá, V. M., Arias, E., Corona, M., Ariza Botero, F., Figueroa-Ramírez, J., y Junca, H. (2018). Determination of the Africanized mitotypes in populations of honey bees (*Apis mellifera*L.) of Colombia. *Journal of Apicultural Research*, 57(2), 219–227. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1409065>
- Toth, A. L., y Zayed, A. (2021). The honey bee genome-- what has it been good for? *Apidologie*, 52(1), 45–62. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00829-3>
- Umarov, R. K., y Solovyev, V. V. (2017). Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. *PloS One*, 12(2), e0171410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171410>
- Vimal, N., Angmo, N., Sengupta, M., y Seth, R. K. (2022). Radiation hormesis to improve the quality of adult *Spodoptera litura* (Fabr.). *Insects*, 13(10), 933. <https://doi.org/10.3390/insects13100933>
- Wahl, M. C., Will, C. L., y Lührmann, R. (2009). The spliceosome: Design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Wallberg, A., Bunikis, I., Pettersson, O. V., Mosbech, M.-B., Childers, A. K., Evans, J. D., Mikheyev, A. S., Robertson, H. M., Robinson, G. E., y Webster, M. T. (2019). A hybrid de

- novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5642-0>
- Wang, M., y Marín, A. (2006). Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*, 366(2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.015>
- Wang, Ying, Ma, L.-T., y Xu, B.-H. (2015). Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Asia-Pacific entomology*, 18(2), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.11.005>
- Wang, Yu, Pang, W.-J., Wei, N., Xiong, Y., Wu, W.-J., Zhao, C.-Z., Shen, Q.-W., y Yang, G.-S. (2014). Identification, stability and expression of Sirt1 antisense long non-coding RNA. *Gene*, 539(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.037>
- Warf, M. B., y Berglund, J. A. (2010). Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.004>
- Wegener, J., Jakop, U., Schiller, J., y Müller, K. (2018). The membrane phospholipid composition of honeybee (*Apis mellifera*) workers reflects their nutrition, fertility, and vitellogenin stores. *Insectes Sociaux*, 65(3), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s00040-018-0623-x>
- Williams, G. R., Tarpy, D. R., vanEngelsdorp, D., Chauzat, M.-P., Cox-Foster, D. L., Delaplane, K. S., Neumann, P., Pettis, J. S., Rogers, R. E. L., y Shutler, D. (2010). Colony collapse disorder in context. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 32(10), 845–846. <https://doi.org/10.1002/bies.201000075>
- Wilson, E. O. (2006). How to make a social insect. *Nature*, 443(7114), 919–920. <https://doi.org/10.1038/443919a>
- Wood, T. J., Michez, D., Paxton, R. J., Drossart, M., Neumann, P., Gérard, M., Vanderplanck, M., Barraud, A., Martinet, B., Leclercq, N., y Vereecken, N. J. (2020). Managed honey bees as a radar for wild bee decline? *Apidologie*, 51(6), 1100–1116. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00788-9>

- Yadav, P., Pandkar, M. R., y Shukla, S. (2023). Epigenetic modifications and alternative pre-mRNA splicing in cancer. En *Epigenetics in Organ Specific Disorders* (pp. 123–146). Elsevier.
- Yamakuchi, M. (2012). MicroRNA regulation of SIRT1. *Frontiers in Physiology*, 3, 68. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00068>
- Yao, R.-W., Wang, Y., y Chen, L.-L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*, 21(5), 542–551. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>
- Yin, L., Zhu, X., Novák, P., Zhou, L., Gao, L., Yang, M., Zhao, G., y Yin, K. (2021). The epitranscriptome of long noncoding RNAs in metabolic diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 515, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.001>
- Zhang, X., Ameer, F. S., Azhar, G., y Wei, J. Y. (2021). Alternative splicing increases sirtuin gene family diversity and modulates their subcellular localization and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 473. <https://doi.org/10.3390/ijms22020473>
- Zheng, B.-Y., Cao, L.-J., Tang, P., van Achterberg, K., Hoffmann, A. A., Chen, H.-Y., Chen, X.-X., y Wei, S.-J. (2018). Gene arrangement and sequence of mitochondrial genomes yield insights into the phylogeny and evolution of bees and sphecid wasps (Hymenoptera: Apoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 124, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.028>
- Ziętara, P., Dziewięcka, M., y Augustyniak, M. (2022). Why is longevity still a scientific mystery? Sirtuins—past, present and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 728. <https://doi.org/10.3390/ijms24010728>