



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INFECÇÃO VIRAL EM *Apis mellifera*: DETECÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO DE
AmToll-1 E PROTEOMA DIFERENCIAL**

ALUNA: LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

ORIENTADOR: Prof. Dr. MALCON ANTÔNIO MANFREDI BRANDEBURGO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS UEIRA VIEIRA

UBERLÂNDIA - MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INFECÇÃO VIRAL EM *Apis mellifera*: DETECÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO DE
AmToll-1 E PROTEOMA DIFERENCIAL**

ALUNA: LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

ORIENTADOR: Prof. Dr. MALCON ANTÔNIO MANFREDI BRANDEBURGO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS UEIRA VIEIRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA - MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A447i Almeida, Luciana de Oliveira, 1979-
2011 Infecção viral em *Apis mellifera* : detecção molecular, expressão
de *AmToll-1* e proteoma diferencial / Luciana de Oliveira Almeida.
– 2011.
103 f. : il.

Orientador: Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo.

Co-orientador: Carlos Ueira Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Abelha-européia - Doenças - Teses. 3. A-
belha-européia - Genética - Teses. I. Brandeburgo, Malcon Antônio
Manfredi. II. Vieira, Carlos Ueira, 1981- . III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquí-
mica. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFECÇÃO VIRAL EM *Apis mellifera*: DETECÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO DE
AmToll-1 E PROTEOMA DIFERENCIAL

LUCIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti
Prof. Dr. Dejair Message
Prof. Dr. José Eduardo Serrão
Prof^a. Dr^a. Rute Magalhães Brito

Data da Defesa: 29 / 07 / 2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, pois por obra Dele, todo meu esforço e trabalho, auxiliado incessantemente por Ele foi tomado forma até chegar à conclusão desta tese.

Dedico a meus pais, Jorge e Nilsa, que com todo suor conseguiram passar o real valor da educação na formação do ser humano, fazendo o possível para que eu chegasse aonde até agora cheguei.

Dedico as minhas irmãs, Nádia e Geórgia e ao meu cunhado Valdir, todo apoio, carinho, palavras e experiências trocadas.

Dedico aos meus afilhados, Eduarda, Gustavo, Lorenzo e Mateus. Espero que eles possam entender que na vida, abrimos mão de algumas coisas, mas que no final, sempre há recompensa para tudo que se faz com afinco e determinação. Que nossos estudos, levamos com a gente e ninguém nos toma e que ainda podemos ajudar outras pessoas com todo o conhecimento que adquirimos durante a vida.

Amo muito a todos e não teria sabor algum essa minha conquista se não pudesse compartilhá-la com vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois foi Ele que propiciou e continua propiciando tudo de bom que acontece na minha vida, todos os anjos que Ele colocou na minha vida nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo pela orientação e por acreditar que eu conseguiria chegar ao final dessa tese.

A Prof. Dra. Ana Maria Bonetti pelos grandes ensinamentos durante toda a minha vida acadêmica, os conselhos, os puxões de orelha, as risadas e principalmente o respeito mútuo.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pelo exemplo de pessoa e pesquisador, um grande conhedor e admirador das abelhas.

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, pela co-orientação, apoio a todo instante, discussões, ensinamentos, mas principalmente pela amizade, um anjo que Deus com toda certeza colocou na minha vida.

A todos os amigos do laboratório de genética, em especial a Bel que estava sempre ali, *Toll* pra cá, *Toll* pra lá e quase todo o sequenciamento feito, a Carol com todo carinho e paciência na busca de amostras negativas, ao Carlos Jr. sempre retirando minhas PCRs no final da noite, ao Célio pela bioinformática, análises que me deixaram doida e ele na risada, ao Denis, Fernando, Mariana, Naiara, Roberta e

Syomara pelo apoio, torcida e companhia. Pessoal, compartilhamos vários momentos, tristezas, nervosismos, farras e alegrias, valeu por tudo.

A todos os amigos do laboratório de nanobiotecnologia, em especial a Carol Reis, Carol Siqueroli, Ju, Lu, Paty Terra e Robson pela torcida, a Fabiana e Paty Tieme pelo apoio, os ensinamentos, as bactérias quimio e eletrocompetentes, Thaíse, Eliza e Washington sempre ajudando no PCR tempo real, Tamiris nos sequenciamentos e confirmações dos meus vírus, a Paula Souza e Paula Cristina com toda paciência na proteômica, com os géis 2D e sequenciamento dos spots, valeu galera por toda compreensão, toda força, todo carinho.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos que ganhei no Tocantins, pela paciência enquanto estava em Minas trabalhando e eles na torcida dos resultados para a conclusão da tese, valeu Alê, Edu, Eleide, Fátima, Hos, Mi, Roberto, Rodney, Solange, Susu e Thati.

A Etiene e Wagner que me apoiaram no afastamento da UFT para concluir o doutorado, eu sou muito grata e mais ainda pela grande amizade que fizemos.

A todos os professores da biologia que me ampararam no processo de afastamento para o doutorado, de coração, muito obrigada.

As minhas grandes amigas e companheiras de farras e saídas nesse Tocantins, desbravando cachoeiras, chapadas e o fantástico Jalapão, Binha e Lavínia, foram

muito importantes nesse período de adaptação em Porto Nacional e são hoje, anjos na minha vida, que guardo no meu coração.

A uma família que ganhei no Tocantins, que sempre me apoiou, me confortou nos momentos de choro e desespero, Betão, Jéssica Érika, Lucas e Naty, amo vocês.

Aos meus já amigos daqui da UFU que se tornaram uma família pra mim no Tocantins, Waldesse, Jack, Cauê e Tainá, sempre me apoiando, pessoal e profissionalmente, não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim.

Não posso deixar de agradecer aos velhos amigos-irmãos, Cy e Fausto, perdoem-me por tanta ausência, mas sei que compreendem, pois passaram também por um doutorado e sabem que às vezes deixamos muitas coisas importantíssimas em nossas vidas para dar atenção aos experimentos da tese, mas podem acreditar que não saíram do meu pensamento e do meu coração, estão bem guardadinhos nele.

A caçula Maíra, que me mostrou um pouquinho mais de Deus, me fez acreditar em mim e na conclusão do doutorado, obrigada irmã, Deus lhe enviou no momento certo.

A todos os colegas da UFT, em especial do Labiotec, onde comecei a processar minhas amostras até conseguir meu afastamento para concluir o doutorado.

Ao meu aluno e amigo, Washington, que foi comigo na pontinha do Tocantins, lá no Bico do Papagaio, ajudou com as coletas e levou boas ferroadas, valeu demais.

A Yuki Ishii por abrir as portas de sua casa e fazer todo o contato com os apicultores do Bico do Papagaio.

A todos os apicultores que tiveram paciência em me receber e coletar as abelhas comigo sabendo das ferroadas que receberíamos, sem vocês não poderia realizar este feito.

Aos professores Doutores que fizeram parte da banca e contribuíram para melhorar as discussões da tese.

Ao Gerson e Marlenita, pelo apoio, paciência, palavras e todas as dúvidas sanadas.

Ao Madson pela atenção na secretaria do INGEB.

A Ana Paula pelas palavras de força e apoio, pelo Reiki nos dias de estresse.

Em especial, a minha irmã Geórgia e sua família linda, Valdir meu cunhado, Duda e Lorenzo, que não me deram abrigo, mas um lar durante esse ano tão importante em minha vida. Desculpe-me a falta de tempo, por não estar mais presente em casa, ajudando com as crianças. Amo demais vocês e sou eternamente grata por todo carinho e amor que vocês me ofereceram, sei que foi de coração.

A UFU, UFT, Capes, CNPq e FAPEMIG pelo suporte e apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I	3
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
1. Abelhas africanizadas	4
2. Patologia Apícola.....	5
2.1. Bactérias	5
2.2. Fungos	6
2.3. Parasitas	7
2.4. Vírus.....	8
3. Referências Bibliográficas	18
CAPÍTULO II	26
DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i> NO ESTADO DO TOCANTINS.....	26
Resumo.....	26
Abstract.....	28

1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos	32
2.1. Material Biológico.....	32
2.2. Extração de RNA total.....	33
2.3. Transcrição Reversa	34
2.4. Reação em Cadeia da Polimerase para diagnóstico viral	34
2.5. Clonagem e Sequenciamento	36
2.6. Análise de bioinformática	37
2.7. Análise estatística	38
3. Resultados e Discussão	39
4. Referências Bibliográficas	49
CAPÍTULO III.....	56
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>AmToll-1</i> EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i> INFECTADAS COM OS VÍRUS DA PARALISIA AGUDA (ABPV) E DA ASA DEFORMADA (DWV)	56
Resumo.....	56
Abstract.....	58
1. Introdução.....	59
2. Material e Métodos	63

2.1. Material Biológico	63
2.2. Extração de RNA.....	63
2.3. Transcrição Reversa	63
2.4. Reação de PCR	64
2.5. PCR para diagnóstico viral.....	65
2.6. Sequenciamento da região codificante (cds) do gene AmToll -1	66
2.7. Análises in silico	66
2.8. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	67
2.9. Análise Estatística	69
3. Resultados e Discussão	70
4. Referências Bibliográficas	79
CAPÍTULO IV	84
INFECÇÃO VIRAL: ANÁLISE PRELIMINAR DO PROTEOMA DIFERENCIAL	84
Resumo.....	84
Abstract.....	86
1. Introdução.....	87
2. Material e Métodos	89
2.1. Material Biológico	89
2.2. Extração de proteína e RNA.....	89

2.3. Extração de proteína	89
2.4. Transcrição Reversa	90
2.5. PCR para diagnóstico viral.....	90
2.6. Eletroforese Bidimensional em Gel SDS-PAGE.....	92
3. Resultados e Discussão	94
4. Referências Bibliográficas	99

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1 – Sub-regiões apícolas no estado do Tocantins segundo Seagro – TO (1 – Bico do Papagaio; 2 – Araguaína; 3 – Colinas do Tocantins; 4 – Barrolândia; 5 – Palmas; 6 – Gurupi).	30
Figura 2 – Cidades onde foram realizadas as coletas das abelhas. Em verde região denominada Bico do Papagaio e suas respectivas cidades de coleta.....	33
Figura 3. Árvore filogenética entre as populações de vírus ABPV encontradas no Tocantins baseada na análise da máxima parcimônia com <i>bootstrap</i> de 1000 repetições. Japão DWV (AB070959.1) usado como grupo externo e demais sequências retiradas do Genebank com seus respectivos números de acesso.	46
Figura 4. Árvore filogenética entre as populações de vírus DWV encontradas no Tocantins baseada na análise da máxima parcimônia com <i>bootstrap</i> de 1000 repetições. China SBV (GU108220.1) usado como grupo externo e demais sequências retiradas do Genebank com seus respectivos números de acesso.	47

Capítulo III

Figura 1 – Regiões sequenciadas do cDNA do gene predito <i>Toll-1</i> de <i>Apis mellifera</i> . Em negro regiões flanqueando início e término da região codificadora (cds).	71
Figura 2 - Análise de domínio do fragmento seqüenciado do cDNA do gene <i>AmToll-1</i> utilizando o programa ProDom.	72

Figura 3 - Análise de domínio do fragmento seqüenciado do cDNA do gene <i>AmToll-1</i> utilizando os programas Prosite (A) e NCBI - CDD (B)	74
Figura 4 – Filograma gerado através de alinhamentos múltiplos (Clustal W) entre as proteínas do <i>Toll</i> entre <i>Nasonia vitripennis</i> (XP_001604871.1), <i>Aedes aegypti</i> (AAM97775.1), <i>Drosophila melanogaster</i> (AAN14086.1), <i>Solenopsis invicta</i> (EFZ19053.1), <i>Acromyrmex echinatior</i> (EGI70800.1), <i>Homo sapiens</i> (NP_059138.1)	75
Figura 5 – Quantificação relativa de transcritos do gene <i>AmToll-1</i> por qRT - PCR. Control – abelhas sem infecção; DWV – abelhas infectadas apenas com o vírus da deformidade da asa; ABPV/DWV – abelhas co-infectadas pelo vírus da paralisia aguda e deformidade da asa. *Diferença significativa (Bonferroni $p<0,05$)	76
Capítulo IV	
Figura 1 – Perfil de proteína total presente em abelhas não infectadas com vírus (Controle). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pl de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA)	95
Figura 2 – Perfil de proteína total presente em abelhas infectadas com vírus da Asa deformada (DWV). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pl de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA)	96
Figura 3 – Perfil de proteína total presente em abelhas co-infectada com vírus da Paralisia aguda (ABPV) e da Asa deformada (DWV). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pl de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA)	97

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela I: Sequências dos <i>primers</i> de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências.	35
Tabela II – Taxa de prevalência do vírus da Paralisia aguda (ABPV) em 68 colméias instaladas em 32 apiários de diferentes regiões do Estado do Tocantins.	39
Tabela III – Taxa de prevalência do vírus Asa deformada (DWV) em 68 colméias instaladas em 32 apiários de diferentes regiões do Estado do Tocantins.	40
Tabela IV – Taxa de prevalência (%) de viroses simples ou múltiplas por colméias infectadas para os vírus avaliados no Estado do Tocantins.	40
Tabela V – Relação entre as sequências encontradas para o vírus ABPV em <i>A. mellifera</i> no Estado do Tocantins e sua identidade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.	44
Tabela VI – Relação entre as sequências encontradas para o vírus DWV em <i>A. mellifera</i> no Estado do Tocantins e sua identidade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.	45

Capítulo III

Tabela I – Sequência dos <i>primers</i> para clonar o gene predito <i>Toll-1</i> e os respectivos fragmentos em pares de bases.	64
Tabela II: Sequências dos <i>primers</i> de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências.	65

Capítulo IV

Tabela I: Sequências dos *primers* de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências. 91

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPV	<i>Acute bee paralysis virus</i>
ALPV	<i>Aphid Lethal Paralysis Virus</i>
AMP	Peptídeos antimicrobianos
BQCV	<i>Black queen cell virus</i>
BSA	Soroalbumina bovina
BSRV	<i>Big Sioux River Virus</i>
CBA	Confederação Brasileira de Apicultura
CBPV	<i>Chronic bee paralysis virus</i>
CCD	<i>Colony Collapse Disorder</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CPA	Cria pútrida americana
CPE	Cria pútrida europeia
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DCV	<i>Drosophila C virus</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
DWV	<i>Deformed wing virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
g	Força gravitacional
GET	Solução de glicose, EDTA e Tris-HCl
HiPV	<i>Himetobi P virus</i>
IAPV	<i>Israel acute paralysis virus</i>
IL-1R	Receptor de interleucina
lmd	<i>Immune deficiency pathway</i>
KBV	<i>Kashmir bee virus</i>
kDa	Quilodalton

KoAC	Acetato de potássio
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
LSV-1	<i>Lake Sinai Virus 1</i>
LSV-2	<i>Lake Sinai Virus 2</i>
M	Molar
mg	Miligramas
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
OD	Densidade ótica
p/v	Peso por volume
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
pb	Par de bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGLC	Peptídeoglicanos
pH	Potencial Hidrogeniônico
pl	Ponto Isoelétrico
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSIV	<i>Plautia stali intestine virus</i>
qPCR	PCR em Tempo Real
RhPV	<i>Rhopalosiphum padi virus</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
rpm	Rotação por Minuto
RT	Transcrição Reversa
s	Segundos

SBV	<i>Sacbrood virus</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel desnaturante de dodecil sulfato de sódio
SEAGRO-TO	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Tocantins
T.A.	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Enzima DNA Polimerase)
TIR	<i>Toll/IL-1R homology domain</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
U	Unidade de Enzima
V/h	Volt hora
v/v	Volume por volume
nm	Nanômetros
pmol	Picomol
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar

APRESENTAÇÃO

As abelhas são insetos sociais da ordem Hymenoptera que possuem hábitos e comportamentos bem diversificados e estão distribuídas por todo mundo. Na polinização, têm um papel fundamental favorecendo a reprodução sexuada de várias angiospermas e desta maneira, aumentando a variabilidade genética e contribuindo para a biodiversidade de muitos ecossistemas. No Brasil, encontramos cinco biomas e o estado do Tocantins, em toda sua extensão, abrange três desses biomas, a floresta amazônica, o cerrado (savana brasileira) e a caatinga (semi-deserto), além de áreas de transição entre eles, os chamados ecótonos, que apresentam uma biodiversidade singular. A apicultura tem um grande impacto social e econômico no estado, pois é praticada, principalmente, por pequenos produtores a fim de complementarem suas rendas. Nos últimos anos, a apicultura norte-americana e europeia vem sofrendo uma grande perda de colônias de abelhas *Apis mellifera* devido a um fenômeno denominado como CCD (*Colony Collapse Disorder*), chamando a atenção de pesquisadores e órgãos governamentais nesses países devido ao declínio desses polinizadores. Vários vírus, bactérias e parasitas ou ainda, à associação entre eles têm sido relacionados como causas do problema. No Brasil, os impactos ainda não foram contabilizados oficialmente, no entanto, já foram descobertos alguns vírus que estão associados ao CCD. Avaliamos a incidência, no Estado do Tocantins, dos vírus

da Paralisia Aguda (ABPV), da Realeira Negra (BQCV), da Paralisia Crônica (CBPV), da Asa Deformada (DWV), o vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV), Caxemira vírus (KBV) e vírus da Cria Ensacada (SBV) que possivelmente, estão relacionados com o desaparecimento das abelhas no Estado e em todo o mundo. Investigamos, também, a expressão do gene *AmToll-1* e analisamos o proteoma diferencial entre indivíduos infectados com o vírus DWV e co-infectados com ABPV/DWV. O gene *Toll* tem papel fundamental no sistema imune dos insetos, pois são receptores de reconhecimento padrão (PRR) os quais medeiam respostas celulares como a fagocitose, melanização ou síntese e secreção de peptídeos antimicrobianos. Detectamos a presença dos vírus da Paralisia Aguda (ABPV) e da Asa Deformada (DWV) já disseminados na região norte, no estado do Tocantins. Nas abelhas infectadas e co-infectadas com DWV e ABPV/DWV, a expressão do gene *Am-Toll-1* foi maior em relação as não infectadas, mostrando que a expressão desse gene é modulado por infecção viral. Os resultados do proteoma diferencial mostram que em abelhas infectadas ocorre aumento de expressão de proteínas em resposta à infecção viral. Esses resultados acrescentam dados sobre o sistema imune das abelhas *Apis mellifera* e demonstram, também, que os vírus já estão dispersos na reigão Norte, além da região Sudeste do Brasil.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Abelhas africanizadas

As abelhas são insetos sociais da ordem Hymenoptera que possuem hábitos e comportamentos bem diversificados. Aproximadamente 20.000 espécies de abelhas encontram-se distribuídas em todo mundo, polinizando e favorecendo a reprodução sexuada de várias angiospermas e desta maneira, aumentando a variabilidade genética da maioria das plantas floríferas e frutíferas, contribuindo para a biodiversidade de muitos ecossistemas. (Genersch, 2010; Klein *et al.*, 2007; Van Engelsdorp & Meixner, 2010).

As abelhas africanizadas representam o tipo predominante em áreas tropicais e subtropicais das regiões da América do Sul, América Central e em algumas regiões da América do Norte (Mendonca *et al.*, 2008; Mistro *et al.*, 2005).

No Brasil, as abelhas *Apis mellifera* são polihíbridos das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (Pereira *et al.*, 2003; Winston, 1994). Um fator para o sucesso adaptativo desses híbridos parece ser o seu elevado nível de tolerância a ácaros e resistência a patógenos (Aumeier, 2001; Correa-Marques *et al.*, 2002; Guzman-Novoa *et al.*, 1996; Mondragón *et al.*, 2005; Moretto & Mello Jr., 1999; Moretto & Leonidas, 2003; Rosenkranz, 1999).

A apicultura brasileira reflete nossa grande biodiversidade, distribuída nos biomas aqui existentes, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica,

Pampa e Pantanal, onde a produção de mel se dá durante todo ano considerando as diferentes épocas de floração dos diferentes biomas (CBA, 2011).

2. Patologia Apícola

Seu crescimento vem se destacando no mercado mundial, até abril de 2011 o Brasil exportou, aproximadamente, oito toneladas (7.976.487 Kg) de mel e se enquadra no 11º lugar em produção de mel e o 5º em exportação (Rangel, 2011). Segundo a Confederação Brasileira de Apicultura (CBA), esse crescimento se deu devido à grande mortalidade das abelhas nos Estados Unidos e Europa nesses últimos anos. A alta taxa de mortalidade recebeu o nome de Distúrbio do Colapso da Colônia (*Colony Collapse Disorder - CCD*) (Blanchard *et al.*, 2008; Cox-Foster *et al.*, 2007; Van Engelsdorp *et al.*, 2007; Van Engelsdorp *et al.*, 2008).

As abelhas são alvo de vários patógenos, como bactérias, fungos e vírus, além de outros parasitas como ácaros, nematóides, insetos endoparasitas, amebas, etc, acometendo desde larvas a indivíduos adultos (Ellis & Munn, 2005; Ribièrre *et al.*, 2008).

2.1. Bactérias

Entre as bactérias que acometem as abelhas estão *Melissococcus pluton* e *Paenibacillus larvae*, que atingem as crias através de alimento

contaminado, dando origem à cria pútrida europeia (CPE) e cria pútrida americana (CPA), respectivamente. A associação com outras bactérias ocorre no trato intestinal das crias e atinge outros tecidos, levando a cria à morte. Características sintomáticas da doença são favos falhados, com crias murchas e de coloração diferenciada, que varia do amarelo ao marrom, além de forte odor (Budge *et al.*, 2010; Genersch, 2010; Lopes *et al.*, 2004).

2.2. Fungos

Em relação às doenças micóticas, são encontrados fungos que atingem adultos e crias de abelhas, como o caso do *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* entre outros, provocando, na cria, a chamada cria giz, na qual a cria morta apresenta-se com coloração branca ou cinza escuro com um aspecto rígido, daí o nome da doença, no entanto, diferentemente das doenças relacionadas à bactérias, essa não apresenta odor. Os favos com as crias apresentam-se com falhas e normalmente encontram-se opérculos perfurados (Aronstein & Murray, 2010; Lopes *et al.*, 2004).

Nas abelhas adultas e larvas, os fungos como o *A. flavus*, causam aspergilose, onde o alimento contaminado com esporos acomete o trato digestivo levando-as a morte (Aronstein & Murray, 2010).

Outros fungos que acometem apenas abelhas adultas são os microsporídeos *Nosema apis* e *Nosema ceranae* os quais causam a nosemose. Seus esporos se desenvolvem dentro das células do intestino

médio das abelhas causando lesões intestinais, dificultando a digestão e diminuindo seu tempo de vida. As campeiras doentes quando tentam voar para o forrageamento caem e morrem próximo ao alvado (Forsgren & Fries, 2010; Paxton, 2010).

2.3. Parasitas

A amebíase é outra patologia que acomete as abelhas adultas, sendo causada pelo protozoário *Malpighamoeba mellifcae*, que se desenvolve nos tubos de Malpighi. Um inchaço nos tubos é característico, devido ao desenvolvimento do protozoário, com posterior destruição do tecido epitelial pelas formas trofozoítas. Normalmente, a infecção pelo *M. mellifcae* está associada à nosemose, apresentando-se a dupla infecção com maior perda para as colméias (Bailey, 1968; Liu, 1985).

O ácaro endoparasita *Acarapis woodi*, agente etiológico da acariose é outro parasita das abelhas adultas. Eles se alojam nas traquéias torácicas das abelhas, onde alimentando-se de hemolinfa, se desenvolvem e reproduzem, assim, diminuem o tempo de vida das abelhas, e consequentemente a produção de mel (Lopes *et al.*, 2004; Peng & Nasr, 1985).

Outro ácaro que ataca as abelhas *A. mellifera* em todo o mundo é o *Varroa destructor* um ectoparasita que não se restringe apenas a abelhas adultas, mas também as crias. Nas abelhas adultas se alojam no tórax e abdome e entre os segmentos do abdome sugam a sua hemolinfa. A reprodução ocorre nas crias com a infestação acontecendo pouco antes das

crias serem operculadas, reduzindo o peso das abelhas e sua longevidade (Lopes *et al.*, 2004; Rosenkranz *et al.*, 2010).

2.4. Vírus

Em 1963, uma patologia que causava tremor e paralisia entre as abelhas adultas levando-as a morte foi descoberta, os agentes causadores desta enfermidade foram isolados e nomeados como vírus da paralisia aguda (ABPV) e vírus da paralisia crônica (CBPV) (Bailey *et al.*, 1963). Um total de 18 vírus já foi identificado em abelhas do gênero *Apis* (Bailey *et al.*, 1963; Cox-Foster *et al.*, 2007; Ribiére *et al.*, 2008).

Esses vírus que vem causando tanto impacto na apicultura mundial são vírus de fita simples de RNA, excetuando-se o vírus filamentoso (FV) e *Irisdescent Virus* (IV) que são vírus de DNA (Ribiére *et al.*, 2008).

Foi publicado por Runckel e colaboradores (2011) a detecção de outros quatro vírus *Aphid Lethal Paralysis Virus* (ALPV), *Big Sioux River Virus* (BSRV), *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1) e 2 (LVS-2).

Dentre os vírus de RNA que estão sendo extensivamente estudados por infectarem abelhas em todo o mundo, estão o vírus da paralisia aguda (*Acute bee paralysis virus* - ABPV), da realeira negra (*Black queen cell virus* - BQCV), da paralisia crônica (*Chronic bee paralysis virus* - CBPV), da asa deformada (*Deformed wing virus* - DWV), vírus israelense da paralisia aguda (*Israel acute paralysis virus* – IAPV), Kashmir vírus (*Kashmir bee virus* - KBV) e da cria

ensacada (*Sacbrood virus* - SBV) (De Miranda & Genersch, 2010; Govan *et al.*, 2000; Lanzi *et al.*, 2006; Leat *et al.*, 2000; Maori *et al.*, 2007b; Ribière *et al.*, 2008)

O vírus da paralisia aguda (ABPV) foi descoberto por Bailey e colaboradores (1963) em seus estudos a respeito do vírus da paralisia crônica (CBPV), que causava paralisia e tremores no corpo e nas asas das abelhas adultas. Entretanto, as abelhas que eram acometidas com o APBV morriam mais rápido que as abelhas infectadas com o CHPV. O vírus se acumula na cabeça, cérebro e glândulas hipofaríngeas das abelhas e suas fezes contêm partículas infecciosas do ABPV (Bailey & Gibbs, 1964; Bailey & Milne, 1969).

Na Europa, o vírus ABPV ainda não havia sido diretamente detectado, mas com a propagação do ácaro *V. destructor* ele passou a ter um ciclo de incidência anual (Bailey *et al.*, 1981; Ball, 1985; Faucon *et al.*, 2002), e os experimentos demonstraram que fêmeas de ácaros conseguiam transmitir o vírus à abelhas saudáveis (Brodsgaard *et al.*, 2000).

Bailey (1976) demonstrou que o vírus ABPV pode ser transmitido horizontalmente, espalhando-se na natureza através das secreções da glândula salivar de abelhas adultas como uma infecção inaparente.

As sequências virais do ABPV foram detectadas em sêmen de zangões aparentemente saudáveis, indicando pode, também, ser transmitido verticalmente (Yue *et al.*, 2006).

O vírus da realeira negra, (BQCV) interfere, principalmente, o desenvolvimento de rainhas e, em alguns casos, de operárias. As pupas infectadas morrem, ficam com coloração mais escura e nas paredes da célula de cria aparecem manchas pretas, o que dá o nome à patologia (Bailey & Woods, 1977).

Estudos realizados na Grã-Bretanha demonstraram que o vírus BQCV segue o mesmo ciclo regular de incidência anual do parasita intestinal microsporídeo *N. apis*, com picos de infecções na primavera e início do verão, indicando associação desse fungo com o vírus (Bailey *et al.*, 1983a; Bailey *et al.*, 1983b).

Leat e colaboradores (2000) em suas pesquisas com vírus BQCV, isolado em abelhas da África do Sul, demonstraram a semelhança das proteínas desse vírus com outros vírus de RNA que infectam vários tipos de insetos, como drosófilas (*Drosophila C virus* - DCV), pulgões (*Rhopalosiphum padi virus* - RhPV), cigarrinhas (*Himetobi P virus* - HiPV) e percevejos (*Plautia stali intestine virus* - PSIV).

Cepas do vírus BQCV isoladas de abelhas coletadas na Polônia, Áustria e Hungria demonstraram recombinação viral, pois quando comparados com vírus de outros países eles apresentam mudanças em diferentes regiões do genoma, através de inserções e deleções (Tapaszti *et al.*, 2009).

O vírus da paralisia crônica (CBPV) foi descoberto nos EUA quando Burnside (1945) utilizando extratos de abelhas com paralisia e livres de

bactérias conseguiu, por meio da alimentação, injeção e pulverização destes extratos, reproduzir a doença em abelhas saudáveis, concluindo que o agente responsável pela patologia era um vírus, mas somente em 1963 o vírus foi isolado e caracterizado (Ribièvre *et al.*, 2008).

A paralisia é uma das viroses que apresenta sinais clínicos visíveis, distinguindo entre dois tipos, de acordo com os sintomas (Ball & Bailey, 1997). Na síndrome do tipo I, as abelhas apresentam um tremor anormal das asas e do corpo, quando saem para forragear não conseguem voar e ficam rastejando próxima a colméia. Apresentam abdome dilatado e morrem poucos dias após a infecção deixando a rainha com poucas operárias na colméia (Ribièvre *et al.*, 2000; Ribièvre *et al.*, 2008; Ribièvre *et al.*, 2010).

Na Síndrome do Tipo II, as abelhas infectadas podem voar, no entanto, ficam com poucos pelos, com tórax de aparência escura e brilhante, aparentando-se menores em relação as outras abelhas e são atacadas pelas abelhas saudáveis da colméia, por meio de mordiscadas. Ambas as síndromes podem ocorrer na mesma colméia e as diferenças dos sintomas entre elas são tão característicos, que possibilita diagnóstico visual (Ball & Bailey, 1997; Ribièvre *et al.*, 2008).

Experimentos realizados por Bailey (1965) demonstraram, através de injeção, aplicação tópica e alimentação, que as operárias adultas eram suscetíveis à infecção com o CBPV, mostrando os sintomas da paralisia.

Técnicas moleculares para detecção direta do vírus CBPV em rainhas e em todas as fases de desenvolvimento de sua prole, incluindo ovos tem sido comprovadas, demonstrando também a transmissão vertical (Chen *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2006a).

Outro vírus que ataca as abelhas é o da asa deformada (DWV) que recebe este nome pelo sintoma característico que implica nas abelhas, a deformação de suas asas ou o seu mau desenvolvimento nas abelhas recém-emergidas (De Miranda & Genersch, 2010).

No início, acreditava-se que a malformação das asas e o pequeno tamanho das abelhas eram imputados apenas à alimentação ou a atividades do ácaro *V. destructor* (Akratanakul & Burgett, 1975; Koch & Ritter, 1991).

Pesquisas posteriores demonstraram que abelhas emergentes, com pouco ou nenhum ácaro podiam apresentar a mesma deformidade enquanto abelhas parasitadas podiam apresentar-se sem nenhuma deformidade, o que sugeria que o parasitismo pelo ácaro não era a principal causa da malformação das asas (Marcangeli *et al.*, 1992). Há uma associação sistemática entre abelhas com deformidades e a infecção pelo vírus DWV (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005b; Tentcheva *et al.*, 2006).

Allen e Ball (1996) infectando pupas com o vírus demonstraram que elas desenvolviam a malformação das asas. Outro trabalho comprovou a presença do vírus DWV em abelhas *Bombus terrestris* que não estavam infestadas por ácaros (Genersch *et al.*, 2006).

O vírus DWV tem sido intensivamente investigado, pois é uma das muitas viroses que infecta as abelhas, estando relacionado ao colapso da colônia das abelhas devido a alta associação e transmissão, pelo ácaro *V. destructor* (De Miranda & Genersch, 2010).

Na ausência do *V. destructor* o vírus persiste em baixos níveis entre as abelhas sem causar baixas na colméia, sendo encontrado desde os estágios de ovos até o indivíduo adulto e detectado, também, nas secreções da glândula mandibular usadas para alimentar larvas e rainhas (Chen *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006b; Yue & Genersch, 2005). O vírus DWV pode ser transmitido por via horizontal, através de alimentação e contato com fezes contaminadas, bem como verticalmente, entre os parentais e sua prole (Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006b; De Miranda & Fries, 2008; Yue *et al.*, 2007).

O vírus *Kashmir* (*Kashmir bee vírus* – KBV), outro vírus que figura como candidato ao colapso da colônia, é extremamente relacionado ao ABPV quando comparados sua sorologia, biologia e genética (Anderson, 1991; De Miranda *et al.*, 2004; Evans, 2001). Em laboratório eles matam rapidamente as abelhas, adultas ou pupas, quando são infectadas, porém, ele não provoca sintomas clínicos aparentes como o vírus da paralisia crônica (Hornitzky, 1987).

Naturalmente, esse vírus tem sido detectado em abelhas adultas e crias que foram coletadas em diversas áreas da Austrália (Bailey *et al.*, 1979). Sua transmissão se faz das abelhas adultas para as larvas, através da alimentação, visto que já foram encontrados vírus em várias fontes de alimento como mel,

pólen, geléia real (Shen *et al.*, 2005) ou através de fezes contaminadas, quando da limpeza da colméia pelas operárias (Hung *et al.*, 2000).

Outra via de transmissão dessa virose foi comprovada por Chen e colaboradores (2004) em seus experimentos com pupas saudáveis e o ácaro *V. destructor* contaminado com o vírus KBV, demonstrando que esses ácaros tinham a capacidade de infectar as pupas.

O vírus KBV (Dicistroviridae), forma um complexo com o vírus da paralisia (ABPV) e o recentemente descoberto, vírus israelense da paralisia aguda (*Israeli acute paralysis vírus* – IAPV), tanto quanto ao aspecto genético como por possuírem rotas de transmissão semelhantes (Genersch & Aubert, 2010; Maori *et al.*, 2007b).

O vírus IAPV foi descoberto após a infecção em larvas de abelhas saudáveis com extratos de abelhas mortas que se encontravam próximas à colméia, em Israel e por esse motivo foi nomeado como vírus israelense da paralisia aguda (Maori *et al.*, 2007a; Maori *et al.*, 2007b). Existem poucos estudos devido a sua recente descoberta, no entanto, ele como outros vírus encontram-se na lista dos prováveis responsáveis pelo CCD (Maori *et al.*, 2009).

Como a maioria dos dicistrovírus, o IAPV apresenta baixas taxas de infecção, mostrando ser uma doença silenciosa, sem sintomas evidentes. No entanto, a evolução da doença até a morte da abelha é precedida por paralisia,

tremores e dificuldade no voo (Bailey *et al.*, 1963; Maori *et al.*, 2007b; Ribièvre *et al.*, 2008).

O IAPV tem sua prevalência no Oriente Médio, Austrália e Estados Unidos, no entanto, já foi encontrado em países europeus, como França e Espanha (Blanchard *et al.*, 2008; Cox-Foster *et al.*, 2007; Kukielka, 2010; Maori *et al.*, 2007b; Palacios *et al.*, 2008).

Outro vírus relacionado à CCD é o da cria ensacada (SBV), que como o nome diz, infecta as larvas das abelhas, não permitindo a muda da larva para pupa. Normalmente, as larvas sofrem metamorfose dentro de quatro a cinco dias após a operculação dos alvéolos, no entanto, quando estão infectadas pelo vírus, há formação de líquido entre a epiderme e o corpo da larva, formando um saco (Bailey *et al.*, 1964; Ribièvre *et al.*, 2008). A cor branca perolada das larvas muda para um amarelo pálido ao marrom escuro quando finalmente morrem (Bailey *et al.*, 1964).

Em uma colônia contaminada, quando as abelhas jovens removem as larvas mortas infectadas, elas então adquirem o vírus contido no líquido, através de ingestão, acumulando-se nas glândulas hipofaringeanas desses indivíduos, que o transmitem para as larvas pela secreção glandular quando passam a ser nutridoras (Bailey, 1969).

O pólen, recém coletado por forrageiras infectadas, também pode se contaminar e a partir daí há transmissão entre as próprias abelhas adultas e

entre elas e as larvas, pois todos os recursos alimentares ficam contaminados pelo vírus (Shen *et al.*, 2005).

Outra forma de transmissão do SBV é pelo ácaro *V. destructor* que, comprovadamente, possui vírus em sua saliva (Shen *et al.*, 2005). Utilizando técnicas moleculares Tentcheva e colaboradores (2004) encontraram em vários apiários franceses o vírus SBV em ácaros *V. destructor*.

Vários trabalhos tem demonstrado, também, a infecção de rainhas. Outra observação é a de que pode ocorrer infecção em todos os estágios de desenvolvimento, inclusive em ovos (Chen *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006b; Shen *et al.*, 2005). Chen e colaboradores (2006b) observaram ovários de rainhas que estavam contaminados com vírus, no entanto, a espermateca não apresentava infecção, sugerindo transmissão transovariana.

O vírus SBV está amplamente distribuído e em várias áreas, sendo considerada a infecção mais comum entre os vírus de abelhas. Nas larvas, a infecção apresenta sintomas clínicos característicos facilitando o diagnóstico, contudo, nas abelhas adultas ela é assintomática e essas abelhas podem ser grandes fontes de disseminação da doença (Allen & Ball, 1996).

Informações quanto às infecções, silenciosas ou evidentes, se simples ou múltiplas e como combatê-las são necessárias. Entretanto, o que é necessário é aprender a lidar com todas essas enfermidades e tentar ao máximo resguardar essas importantes polinizadoras.

Os vírus estão espalhados pelo mundo todo, e teremos que aprender a lidar com eles. No momento, atividades de extensão com os apicultores e divulgação de técnicas de manejo para seleção de rainhas de colônias resistentes, por meio de troca de rainhas são os únicos meios de que o prejuízo no Brasil não seja tão impactante como foi na Europa e Estados Unidos.

3. Referências Bibliográficas

- Akratanakul, P. & Burgett, M. (1975). *Varroa jacobsoni*: A prospective pest of honeybees in many parts of the world. *Bee World* **56**, 119-121.
- Allen, M. & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **77**, 141-162.
- Anderson, D. L. (1991). Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am Bee J* **131**, 767-&.
- Aronstein, K. A. & Murray, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S20-29.
- Aumeier, P. (2001). Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* **32**, 81-90.
- Bailey, L. (1965). The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. *J Invertebr Pathol* **7**, 167-169.
- Bailey, L. (1968). The measurement and interrelationships of infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba melliferae* of honey-bee populations. *J Invertebr Pathol* **12**, 175-179.
- Bailey, L. (1969). The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann Appl Biol* **63**, 483-491.
- Bailey, L. (1976). Viruses attacking the honey bee. *Adv Virus Res* **20**, 271-304.
- Bailey, L. & Gibbs, A. J. (1964). Acute infection of bees with paralysis virus. *J Insect Pathol* **6**, 395-407.
- Bailey, L. & Milne, R. G. (1969). Multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee paralysis viruses in adult honey bees. *J Gen Virol* **4**, 9-14.
- Bailey, L. & Woods, R. D. (1977). Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on Sacbrood and Acute bee paralysis viruses. *J Gen Virol* **37**, 175-182.
- Bailey, L., Gibbs, A. J. & Woods, R. D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis Mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**, 390-395.

- Bailey, L., Gibbs, A. J. & Woods, R. D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis Mellifera* Linnaeus). *Virology* **23**, 425-429.
- Bailey, L., Carpenter, J. M. & Woods, R. D. (1979). Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J Gen Viro* **43**, 641-647.
- Bailey, L., Ball, B. V. & Perry, J. N. (1981). The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann Appl Biol* **97**, 109-118.
- Bailey, L., Ball, B. V. & Perry, J. N. (1983a). Honeybee paralysis - its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *J Apicul Res* **22**, 191-195.
- Bailey, L., Ball, B. V. & Perry, J. N. (1983b). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann Appl Biol* **103**, 13-20.
- Ball, B. V. (1985). Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res* **24**, 115-119.
- Ball, B. V. & Bailey, L. (1997). Viruses. In *Honey bee pests, predators and diseases*, 2 edn, pp. 11-32. Edited by R. A. Morse & K. Flottum. Medina: A.I. Root Company.
- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnudel, P., Thiery, R., Faucon, J. P. & Ribiere, M. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **99**, 348-350.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. & Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol* **73**, 101-106.
- Brodsgaard, C. J., Ritter, W., Hansen, H. & Brodsgaard, H. F. (2000). Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, Acute paralysis virus and *Paenibacillus larvae* larvae and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* **31**, 543-554.
- Budge, G. E., Barrett, B., Jones, B., Pietravalle, S., Marrs, G., Chantawannakul, P., Thwaites, R., Hall, J., Cuthbertson, A. G. & other authors (2010). The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J Invertebr Pathol* **105**, 164-170.

- Burnside, C. E. (1945).** The cause of paralysis of bees. *Am Bee J* **85**, 354-363.
- CBA (2011).** Confederação Brasileira de Apicultura: Brasil Apícola. Disponível em: <<http://www.brasilapicola.com.br/>>. Acesso: Maio/2011.
- Chen, Y., Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F. (2005a).** Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Pathol* **90**, 118-121.
- Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. (2006a).** Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **92**, 152-159.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. & Feldlaufer, M. F. (2005b).** Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol* **71**, 436-441.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A. & Feldlaufer, M. F. (2006b).** Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**, 606-611.
- Correa-Marques, M. H., De Jong, D., Rosenkranz, P. & Goncalves, L. S. (2002).** Varroa-tolerant Italian honey bees introduced from Brazil were not more efficient in defending themselves against the mite *Varroa destructor* than Carniolan bees in Germany. *Genet Mol Res* **1**, 153-158.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M. & other authors (2007).** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283-287.
- De Miranda, J. R. & Fries, I. (2008).** Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Invertebr Pathol* **98**, 184-189.
- De Miranda, J. R. & Genersch, E. (2010).** Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S48-61.
- De Miranda, J. R., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C. E., Stoltz, D. B. & Camazine, S. M. (2004).** Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Virol* **85**, 2263-2270.

- Ellis, J. D. & Munn, P. A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* **86**, 88-101.
- Evans, J. D. (2001). Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. *J Invertebr Pathol* **78**, 189-193.
- Faucon, J. P., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A. C., Drajnudel, P., Zeggane, S., Aurieres, C. & Aubert, M. (2002). Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World* **83**, 14-23.
- Forsgren, E. & Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol* **170**, 212-217.
- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 87-97.
- Genersch, E. & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* **41**, 54.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I. & de Miranda, J. R. (2006). Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J Invertebr Pathol* **91**, 61-63.
- Govan, V. A., Leat, N., Allsopp, M. & Davison, S. (2000). Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* **277**, 457-463.
- Guzman-Novoa, E., Sanchez, A., Page, R., E. & Garcia, T. (1996). Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **27**, 93-103.
- Hornitzky, M. A. Z. (1987). Prevalence of virus infections of honeybees in Eastern Australia. *J Apicult Res* **26**, 181-185.
- Hung, A. C. F., Peng, C. Y. S. & Shimanuki, H. (2000). Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **31**, 17-23.

- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci* **274**, 303-313.
- Koch, W. & Ritter, W. (1991). Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Zentralbl Veterinarmed B* **38**, 337-344.
- Kukielka, D., Sánchez-Vizcaíno, M. (2010). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Spa J Agricul Res* **8**, 308-311.
- Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M. & Rossi, C. (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Viro* **80**, 4998-5009.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V. & Davison, S. (2000). Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J Gen Viro* **81**, 2111-2119.
- Liu, T. P. (1985). Scanning electron microscope observations on the pathological changes of Malpighian tubules in the worker honeybee, *Apis mellifera*, infected by *Malpighamoeba mellifica*. *J Invertebr Pathol* **46**, 125-132.
- Lopes, M. T. R., Goncalves, J. C., Message, D., Pereira, F. M. & Camargo, R. C. R. (2004). Doenças e inimigos naturais das abelhas, 1 edn. Teresina, PI: Embrapa Meio - Norte.
- Maori, E., Tanne, E. & Sela, I. (2007a). Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* **362**, 342-349.
- Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E. & Sela, I. (2009). IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol* **18**, 55-60.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. & Sela, I. (2007b). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel:

- evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Viro* **88**, 3428-3438.
- Marcangeli, J., Monetti, L. & Fernandez, N. (1992).** Malformations produced by *Varroa jacobsoni* on *Apis mellifera* in the province of Buenos Aires, Argentina. *Apidologie* **23**, 399-402.
- Mendonca, K., Marchini, L. C., Souza Bde, A., Almeida-Anacleto, D. & Moreti, A. C. (2008).** Important bee plants to the africanized honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in a fragment of savannah in Itirapina, Sao Paulo State, Brazil. *Neotrop Entomol* **37**, 513-521.
- Mistro, D. C., Rodrigues, L. A. & Ferreira, W. C., Jr. (2005).** The Africanized honey bee dispersal: a mathematical zoom. *Bull Math Biol* **67**, 281-312.
- Mondragón, L., Spivak, M. & Vandame, R. (2005).** A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie* **36**, 345-358.
- Moretto, G. & Mello Jr., L. J. d. (1999).** *Varroa jacobsoni* infestation of adult Africanized and Italian honey bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in Brazil. *Gen Mol Biol* **22**, 321-323.
- Moretto, G. & Leonidas, J. d. M. (2003).** Infestation and distribution of the mite *Varroa destructor* in colonies of africanized bees. *Brazil J Biol* **63**, 83-86.
- Palacios, G., Hui, J., Quan, P. L., Kalkstein, A., Honkavuori, K. S., Bussetti, A. V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y. P. & other authors (2008).** Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J Viro* **82**, 6209-6217.
- Paxton, R. J. (2010).** Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? *J Apicult Res* **49**, 80-84.
- Peng, Y.-S. & Nasr, M. E. (1985).** Detection of honeybee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *Journal of Invertebrate Pathology* **46**, 325-331.
- Pereira, F. M., Lopes, M. T. R., Camargo, R. C. R. & Vilela, S. L. O. (2003).** Sistema de Produção 3: Produção de Mel. *Embrapa Meio Norte*.

- Rangel, R. (2011).** Mel brasileiro conquista o mercado externo. In *Inovação em pauta*, 10 edn: 2010.
- Ribièvre, M., Faucon, J.-P. & Pépin, M. (2000).** Detection of chronic honey bee (*Apis mellifera* L.) paralysis virus infection: application to a field survey. *Apidologie* **31**, 567-577.
- Ribièvre, M., Ball, B. V. & Aubert, M. (2008).** Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In *Virology and the honey bee*, 1 edn, p. 462. Edited by M. Aubert, B. V. Ball, I. Fries, R. F. Moritz, N. Milani & I. Bernardinelli. Luxembourg: European Communities.
- Ribièvre, M., Olivier, V. & Blanchard, P. (2010).** Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S120-131.
- Rosenkranz, P. (1999).** Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie* **30**, 159-172.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. (2010).** Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S96-119.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R. & Derisi, J. L. (2011).** Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, nosema, and crithidia. *PLoS One* **6**, e20656.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. (2005).** Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Viro* **86**, 2281-2289.
- Tapashti, Z., Forgách, P., Kovágó, C., Topolska, G., Nowotny, N., Rusvai, M. & Bakonyi, T. (2009).** Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Vet Microbiol* **139**, 227-234.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E. & Bergoin, M. (2006).** Comparative analysis of Deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**, 41-50.

- Van Engelsdorp, D. & Meixner, M. D. (2010).** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S80-95.
- Van Engelsdorp, D., Underwood, R. M., Caron, D. & Hayes, J. (2007).** An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. *Am Bee J* **147**, 599-603.
- Van Engelsdorp, D., Hayes, J., Jr., Underwood, R. M. & Pettis, J. (2008).** A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* **3**, e4071.
- Winston, M. L. (1994).** The Africanized 'killer' bee: biology and public health. *Q J Med* **87**, 263 - 267.
- Yue, C. & Genersch, E. (2005).** RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* **86**, 3419-3424.
- Yue, C., Schroder, M., Bienefeld, K. & Genersch, E. (2006).** Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol* **92**, 105-108.
- Yue, C., Schroder, M., Gisder, S. & Genersch, E. (2007).** Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J Gen Virol* **88**, 2329-2336.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS EM
ABELHAS *Apis mellifera* NO ESTADO DO
TOCANTINS

Resumo

O Estado do Tocantins apresenta três biomas, cerrado, floresta Amazônia e caatinga, além de regiões de transição entre eles, abrigando uma diversidade de espécies incluindo vários polinizadores como as abelhas. Com o fenômeno da Colony Collapse Disorder (CCD), pesquisadores em todo mundo buscam uma resposta para a grande mortalidade das abelhas, colocando os vírus como uma delas. Detectamos a presença de sete vírus no Estado do Tocantins através de RT-PCR. Nossa análise confirmou a presença de dois vírus, Vírus da paralisia aguda (ABPV) e da Asa deformada (DWV) mostrando que a região norte já se encontra contaminada e medidas profiláticas devem ser tomadas pelos apicultores a fim de evitar perdas significativas como ocorreu nos Estados Unidos e Europa.

Palavras-chave: Vírus, Abelha, CCD, Tocantins.

Abstract

In Brazil the Tocantins' State has three biomes, savannah, Amazon forest and caatinga, beyond transitional regions between them. These biomes harbor a diversity of species including several pollinators as bees. With the phenomenon of Colony Collapse Disorder (CCD), researchers worldwide are seeking an answer to the high mortality of bees and they claim that viruses could be as one of them. We are looking for seven viruses in the State by RT-PCR. Our analysis confirmed the presence of two viruses ABPV and DWV, showing that the northern region is already contaminated and prophylactic measures should be taken by beekeepers to avoid significant losses as occurred in the United States and Europe.

Keywords: Virus, Colony Collapse Disorder , Bee, Tocantins-Brazil

1. Introdução

O Estado do Tocantins tem uma área de 277.621,858 km² (IBGE, 2011) abrigando a bacia hidrográfica Tocantins – Araguaia. Em toda sua extensão são encontrados três importantes biomas, a floresta amazônica, o cerrado (savana brasileira) e a caatinga (semi-deserto) além de áreas de transição entre eles, os chamados ecótonos, que apresentam uma biodiversidade singular, constituindo-se em verdadeiros laboratórios vivos (Silva, 2007).

Segundo a Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Tocantins (SEAGRO-TO, 2011), o estado possui 139 municípios, dos quais, 81 são produtores de mel, distribuídos em seis sub-regiões apícolas (Figura 1), com uma produção aproximadamente de 214 toneladas/ano, constituindo-se em uma das atividades agropecuárias de grande potencial no Tocantins. A apicultura tem grande impacto social no estado, pois é praticada, principalmente, por pequenos produtores a fim de complementarem suas rendas.

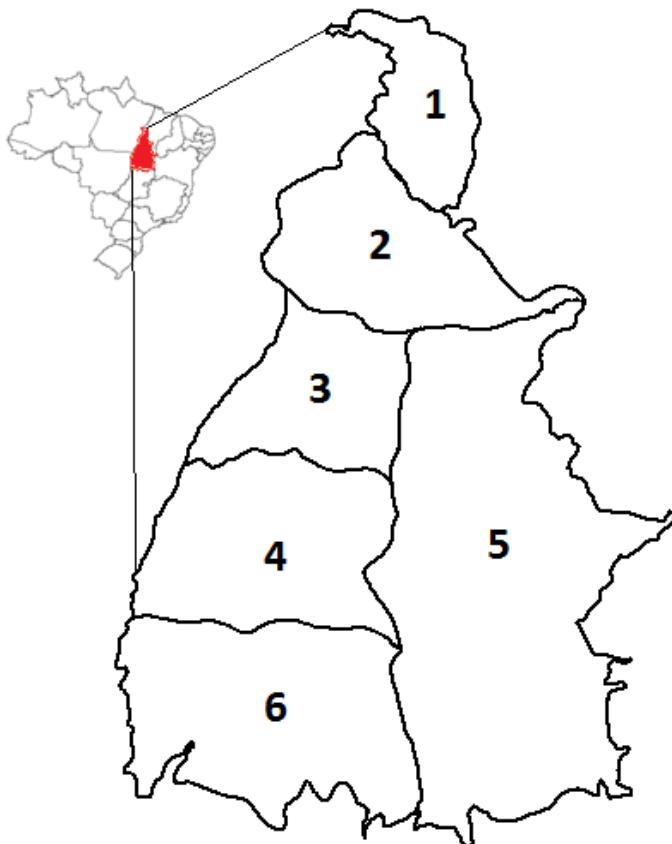


Figura 1 – Sub-regiões apícolas no estado do Tocantins segundo Seagro – TO (1 – Bico do Papagaio; 2 – Araguaína; 3 – Colinas do Tocantins; 4 – Barrolândia; 5 – Palmas; 6 – Gurupi).

A conservação e o uso racional das áreas de transição representam a manutenção da biodiversidade dos biomas. O papel das abelhas na conservação é imprescindível, pois são importantes agentes polinizadores das plantas silvestres ou cultivadas (Morse & Calderone, 2000; Nogueira-Neto, 1977). A polinização intensiva, realizada pelas abelhas do gênero *Apis*, tem favorecido a manutenção da biodiversidade, impactando positivamente na sustentação de ecossistemas e na economia, através de ganhos de produtividade em diversas culturas (Klein *et al.*, 2007).

A apicultura possibilita a geração de renda para as famílias e impede que, por falta de alternativa para a sobrevivência, degradem o ambiente com a retirada de lenha, desmatamentos e queimadas (Santos & Ribeiro, 2009; Souza, 2002).

A perda de colônias de abelhas em todo o mundo levou à preocupação e conscientização sobre o futuro das abelhas. Devido a sua importância, os cientistas de muitos países foram unindo esforços para quantificar a incidência e as causas da perda (Cox-Foster *et al.*, 2007; Giray *et al.*, 2010)

Uma das possíveis causas desse acontecimento é a ocorrência de vírus. Um total de dezoito vírus, a maioria pertencentes a Dicistroviridae ou Iflaviridae, foram identificados e caracterizados para abelhas do gênero *Apis*. A aplicação das técnicas moleculares têm revelado infecções por um ou vários desses vírus (Bailey *et al.*, 1981; Bakonyi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005a; Forgach *et al.*, 2008; Gauthier *et al.*, 2007; Mayo, 2002; Tentcheva *et al.*, 2004a).

Este estudo teve por objetivo avaliar a incidência de sete vírus, entre eles o vírus da paralisia aguda (ABPV), vírus da realeira negra (BQCV), da paralisia crônica (CBPV), da asa deformada (DWV), vírus israelense da paralisia aguda (IAPV), Kashmir vírus (KBV) e vírus da cria ensacada (SBV) nas abelhas *Apis mellifera* no Estado do Tocantins, que podem estar relacionados com a inesperada queda na população das abelhas em todo o mundo, no fenômeno que foi denominado Colony Colapse Disorder (CCD).

2. Material e Métodos

2.1. Material Biológico

O material biológico analisado foram as abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) coletadas em 32 apiários de diferentes regiões do Estado do Tocantins (Figura 2), com amostras de 68 colméias coletadas nas cidades de Palmas (n=5), Porto Nacional (n=4), Barrolândia (n=10), Colinas do Tocantins (n=10), Aliança do Tocantins (n=10), Jaú do Tocantins (n=10), Ponte Alta do Tocantins (n=9) e a região do Bico do Papagaio (n=10). Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Genética e Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

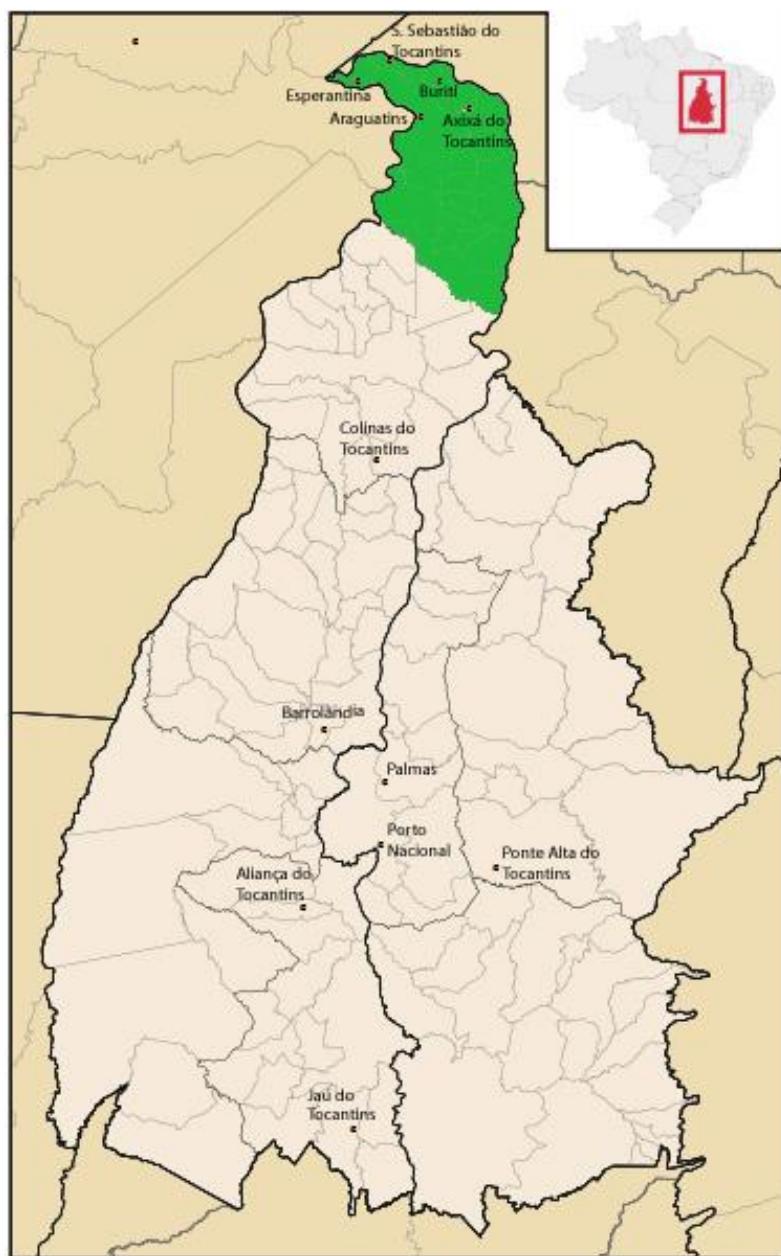


Figura 2 – Cidades onde foram realizadas as coletas das abelhas. Em verde região denominada Bico do Papagaio e suas respectivas cidades de coleta.

2.2. Extração de RNA total

Um grupo de cinco abelhas foi utilizado para a extração de RNA, o qual foi extraído utilizando-se o método do Trizol (INVITROGEN) segundo recomendações do fabricante. O RNA total foi ressuspensiondo em 20 μ L de água

ultra pura contendo dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1%. Para evitar contaminação com DNA, o RNA tratado com enzima DNase (PROMEGA) e, em seguida, foi quantificado em espectrofotômetro NANODROP (ND-1000) e armazenado em ultrafreezer (Sanyo) - 80°C até o momento do uso.

2.3. Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1µg de RNA total utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (USB) segundo recomendações do fabricante. O gene *rp49* (GenBank AF441189), codificador de proteína ribossomal, foi utilizado para testar a qualidade do DNA complementar (cDNA) (Lourenço *et al.*, 2008).

2.4. Reação em Cadeia da Polimerase para diagnóstico viral

Sete vírus de RNA foram analisados por meio de *primers* específicos sintetizados para cada tipo de vírus como segue na Tabela I.

Tabela I: Sequências dos *primers* de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências.

Vírus	Sequência do primer 5' – 3'	T.A. (°C)	Fragmento esperado (pb)	Referências
DWV	F - GAGATTGAAGCGCATGAACA	54	129	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - TGAATTCAGTGTGCCATA			
ABPV	F - TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA	54	500	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - AATCATCATTGCCGGCTCA			
BQCV	F - TGGTCAGCTCCCACTACCTAAACI	54	700	Benjeddou <i>et al.</i> , 2001
	R - GCAACAAGAAGAACGTAAACCACI			
CBPV	F - AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG	55	455	Ribiére <i>et al.</i> , 2002
	R - TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG			
SBV	F - GGATGAAAGGAAATTACCAAG	56	426	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004a
	R - CCACTAGGTGATCCACACT			
KBV	F - GATGAACGTCGACCTATTGA	55	414	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
	R - TGTGGGTTGGCTATGAGTCA			
IAPV	F - AGACACCAATCACGGACCTCAC	58	457	Maori <i>et al.</i> , 2007
	R - AGATTGTCTGTCTCCAGTGCACAT			

A amplificação para os diferentes vírus foi realizada em termociclador e padronizada para um volume final de 20 µL com as seguintes concentrações: 10 pmol de primer, 0,2 mM de dNTP, 1X tampão da enzima e 1U de Taq polimerase (INVITROGEN). As condições da reação de PCR foram padronizadas para os diferentes vírus sendo 2 min a 95°C de etapa inicial, seguido de 35 ciclos de amplificação: 30s a 95°C, 1 minuto a T.A.°C, e 1 minuto a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C para completar a polimerização.

A temperatura de anelamento (T.A.°C) variou de 54°C a 58°C de acordo com

as reações para os *primers* utilizados (Tabela I). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em foto-documentador (IMAGEQUANT 150, GE). A migração dos fragmentos foi acompanhada, para identificação, com marcador de peso molecular de 100pb (INVITROGEN).

2.5. Clonagem e Sequenciamento

Os amplicons obtidos por PCR foram purificados pelo do QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), quantificados em espectrofotômetro NANODROP (ND-1000). Os fragmentos foram então inseridos em vetor plasmidial pGEM-T Easy (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Foram utilizados 3 µL da reação de ligação para 200 µL de células eletrocompetentes *E. coli* XL1Blue e eletroporados em cuveta gelada, em Eletroporador *Bio-Rad*. Após eletroporação adicionou-se, rapidamente, à cuveta, 1mL de meio SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl, glicose e MgCl₂) lavando-a com o meio por duas vezes. O material coletado foi incubado por 1 hora a 37°C, em agitação a 250 rpm e plaqueado 100 µL em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina e uma proporção de 1:10 de IPTG e X-Gal (Maranhão, 2003).

As colônias transformadas (clones positivos ou colônias brancas) foram replicadas em 5 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina (100 µg/mL) e

incubadas a 37°C por 16-24h, sob agitação. Centrifugou-se 1,5 mL a 6000 g, descartando o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 200 µL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5M, pH 8,0; Tris-HCl 1M, pH 7,4) e incubadas em gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µL de solução II (NaOH 2M, SDS 10%) recém preparada e homogeneizada por inversão. Após lise celular foram adicionados 150 µL de solução III (KoAC 3M) e 2 µL de RNase (10 mg/mL) sendo incubado por 10 minutos. Após centrifugação de 15 minutos a 13000 g, 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. O precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70% gelado e ressuspensido em 20 µL de água ultra pura. O plasmídeo foi quantificado a 260 nm em espectofotômetro (CG Analítica) e visualizado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Os clones positivos foram sequenciados em sequenciador automático MegaBace (AMERSHAM) utilizando protocolo padrão.

2.6. Análise de bioinformática

As sequências de nucleotídeos dos produtos amplificados foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta BLAST disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

O programa CAP3 *Sequence Assembly Program* (Huang & Madan, 1999) foi utilizado para formar um contig entre as repetições de

sequenciamento dos amplicons gerados. O programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) foi utilizado para alinhar as sequências.

2.7. Análise estatística

As análises estatísticas e as árvores filogenéticas geradas foram realizadas através do programa estatístico MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

3. Resultados e Discussão

Entre os vírus pesquisados no Estado do Tocantins obtivemos resultado positivo para o vírus da Paralisia aguda (ABPV) e da Asa deformada (DWV), sendo que dos 32 apiários 63,2% das colméias estavam infectadas pelo A BPV (Tabela II) e 97% pelo DWV (Tabela III), bem como 55,9% apresentaram co-infecção com esses dois vírus (Tabela IV).

Tabela II – Taxa de prevalência do vírus da Paralisia aguda (ABPV) em 68 colméias instaladas em 32 apiários de diferentes regiões do Estado do Tocantins.

Localidade	Apiários coletados	Nº de colméias amostradas	Nº de colméias infectadas	Total de infecção (%)
Aliança do Tocantins	3	10	9	13.2
Barrolândia	3	10	2	2.9
Bico do Papagaio	6	10	9	13.2
Colinas do Tocantins	5	10	0	0
Jaú do Tocantins	3	10	10	14.7
Palmas	5	5	5	7.4
Ponte Alta	4	9	5	7.4
Porto Nacional	3	4	3	4.4
Total	32	68	43	63.2

Tabela III – Taxa de prevalência do vírus Asa deformada (DWV) em 68 colméias instaladas em 32 apiários de diferentes regiões do Estado do Tocantins.

Localidade	Apiários coletados	Nº de colméias amostradas	Nº de colméias infectadas	Total de infecção (%)
Aliança do Tocantins	3	10	9	13.2
Barrolândia	3	10	10	14.7
Bico do Papagaio	6	10	10	14.7
Colinas do Tocantins	5	10	10	14.7
Jaú do Tocantins	3	10	9	13.2
Palmas	5	5	5	7.3
Ponte Alta	4	9	9	13.2
Porto Nacional	3	4	4	5.9
Total	32	68	66	97.1

Tabela IV – Taxa de prevalência (%) de viroses simples ou múltiplas por colméias infectadas para os vírus avaliados no Estado do Tocantins.

Vírus	Nº de colméias infectadas	Porcentagem de Infecção
ABPV	1	1.49
CBPV	0	0.0
DWV	24	35.82
KBV	0	0.0
ABPV*CBPV	0	0.0
ABPV*D WV	38	56.82
ABPV*KBV	0	0.0
CBPV*D WV	0	0.0
CBPV*KBV	0	0.0
D WV*KBV	0	0.0
ABPV*CBPV*D WV	1	1.49
ABPV*D WV*KBV	3	4.48
ABPV*CBPV*D WV*KBV	0	0.0
	67	100.0

Os vírus da paralisia aguda (ABPV) e da asa deformada (DWV) geralmente apresentam baixos níveis de expressão entre as abelhas (Bakonyi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005a; Ribièrre *et al.*, 2008; Yue & Genersch, 2005), assim, conseguem permanecer entre elas como uma infecção inaparente. O que poderia justificar o alto índice de colméias infectadas com ambos os vírus no Estado (63,2 e 97,1%, respectivamente) passando despercebidos pelos apicultores.

O ABPV é um vírus pertencente à família Dicistroviridae e ao gênero proposto *Aparavirus* (Bonning & Miller, 2010). Ele é transmitido por secreções da glândula salivar de abelhas adultas, sêmen de zangões, ovário de rainha, além do ácaro *Varroa destructor* (Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006b; Gisder *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2006). Assim, suas variadas formas de transmissão contribuem para a alta taxa encontrada entre as colméias do Estado.

No caso do DWV, um vírus do gênero *Iflavirus* pertencente à família Iflavirus, que provoca como sintomas clínicos a deformidade nas asas, inchaço no abdome e perda de coloração nas abelhas infectadas, ou ainda, infecções assintomáticas (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005c; De Miranda & Genersch, 2010; Gauthier *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2009; Yue & Genersch, 2005).

Sua transmissão pode acontecer verticalmente via sêmen e ovário da rainha, ou horizontalmente, por meio de trofaláxis entre abelhas infectadas e

via o ácaro *V. destructor* (Chen *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2005c; De Miranda & Fries, 2008; Yue *et al.*, 2006), assim como o ABPV, suas variadas formas de transmissão garantem a ele altas taxas de incidência, sendo comprovado no Estado do Tocantins com 97,1% de ocorrência entre as colméias avaliadas.

Vários trabalhos na Europa e EUA tem demonstrado a alta incidência do vírus DWV entre as abelhas (Chen *et al.*, 2005c; Chen *et al.*, 2004; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010), o que podemos observar, também, no Estado do Tocantins, onde 97% das colméias apresentaram-se contaminadas.

A ocorrência do vírus DWV no Estado do Tocantins pode estar associado aos ácaros como *V. destructor*, *V. jacobsoni*, *Tropilaelaps mercedesae*, o que tem sido relacionado como responsável pela transmissão do DWV em abelhas melíferas (Bowen-Walker *et al.*, 1999; De Miranda & Genersch, 2010; Forsgren *et al.*, 2009; Yue & Genersch, 2005).

A presença do ácaro *V. destructor*, parasitando as colméias, foi relatada por apicultores de algumas sub-regiões do Estado do Tocantins. Nova forma de disseminação de vírus ocorre através do pólen, acometendo não apenas as abelhas, mas outros himenópteros polinizadores (Singh *et al.*, 2010), aumentando as possibilidades de disseminação viral.

Möckel e colaboradores (2011) demonstraram que a transmissão do vírus DWV, via *V. destructor*, pode acarretar o desenvolvimento de asas

deformadas em pupas e abelhas emergentes, bem como, aumentar a transmissão do vírus entre abelhas adultas que, na tentativa de limpar a colméia, se contaminariam.

Entre as colméias analisadas encontramos apenas uma infectada com vírus CBPV (1,49%, Tabela IV) associado com os vírus ABPV e DWV, localizada em Porto Nacional e na época da coleta o apicultor informou que a mesma encontrava-se saudável. Outras três colméias, em Aliança do Tocantins, estavam acometidas pelo vírus KBV (4,48%, Tabela IV) e também associadas aos vírus ABPV e DWV. Esses dois vírus não foram confirmados por sequenciamento.

O CBPV é um vírus encontrado em todas as estações do ano na Europa, com surtos esporádicos de infecção, ainda não claramente explicados, mas que pode ser associados a uma queda na imunidade das abelhas, em um período em que ficam em confinamento, como no inverno ou mesmo em períodos de chuva. Ele se mantém em alguns indivíduos na colmeia, sem nenhum sintoma aparente, em baixos níveis, fazendo com que colônias infectadas muitas vezes sejam vistas como saudáveis pelos apicultores (Aubert, 2008; Tentcheva *et al.*, 2004a; Tentcheva *et al.*, 2004b), isso pode estar acontecendo na colméia notificada como saudável pelo apicultor em Porto Nacional.

O vírus KBV é muito semelhante ao ABPV quando se trata da sorologia, biologia e genética (Anderson, 1991; De Miranda *et al.*, 2004; Evans, 2001). Em laboratório, esse vírus mata rapidamente as abelhas adultas e pupas infectadas, no entanto, ele não apresenta sintomas clínicos aparentes como o vírus da paralisia crônica (Hornitzky, 1987) o que dificulta para o apicultor fazer um controle e manter a colméia.

A análise por bioinformática, tanto das sequências de nucleotídeos dos produtos amplificados para o vírus ABPV e DWV, quando comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta BLAST mostraram sua similaridade com sequências desses vírus (Tabelas V, VI), confirmando a presença desses vírus nas colméias do Estado do Tocantins.

Tabela V – Relação entre as sequências encontradas para o vírus ABPV em *A. mellifera* no Estado do Tocantins e sua identidade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Localidade	Fragmento obtido (pb)	Blastn	
		Identidade (%)	Nº de acesso
Aliança do Tocantins	515	95	EU292210.1
Bico do Papagaio	522	97	EU292210.1
Jáu do Tocantins	520	96	EU292210.1
Palmas	558	91	EU292210.1
Ponte Alta	521	97	EU292210.1
Porto Nacional	519	95	EU292210.1

Tabela VI – Relação entre as sequências encontradas para o vírus DWV em *A. mellifera* no Estado do Tocantins e sua identidade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Localidade	Fragmento	Clustal W		Blastn Nº de acesso
	gerado (pb)	(EU292212.1) Identidade (%)	Identidade (%)	
Aliança do Tocantins	94	92	93	EU292212.1
Barrolândia	188	87	92	GU108222.1
Bico do Papagaio	198	98	96	GU108222.1
Colinas do Tocantins	142	97	95	EU292212.1
Jáu do Tocantins	131	77	95	GU108222.1
Palmas	131	95	96	GU108222.1
Ponte Alta	188	84	98	AB070959.1
Porto Nacional	185	96	94	GU108222.1

A análise filogenética foi realizada pelo método da máxima parcimônia (Software Mega 5, TAMURA et al., 2011) com a análise estatística baseada no *bootstrap* de 500 repetições foi feita para ambos os vírus, ABPV e DWV (Figuras 3 e 4, respectivamente).

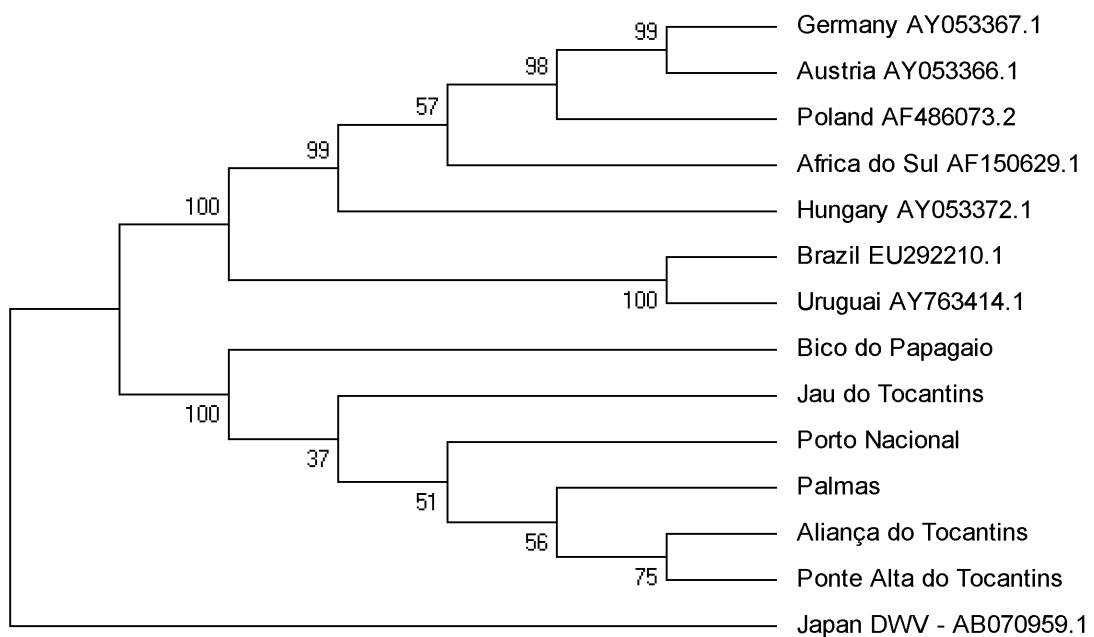


Figura 3. Árvore filogenética entre as populações de vírus ABPV encontradas no Tocantins baseada na análise da máxima parcimônia com *bootstrap* de 1000 repetições. Japão DWV (AB070959.1) usado como grupo externo e demais sequências retiradas do Genebank com seus respectivos números de acesso.

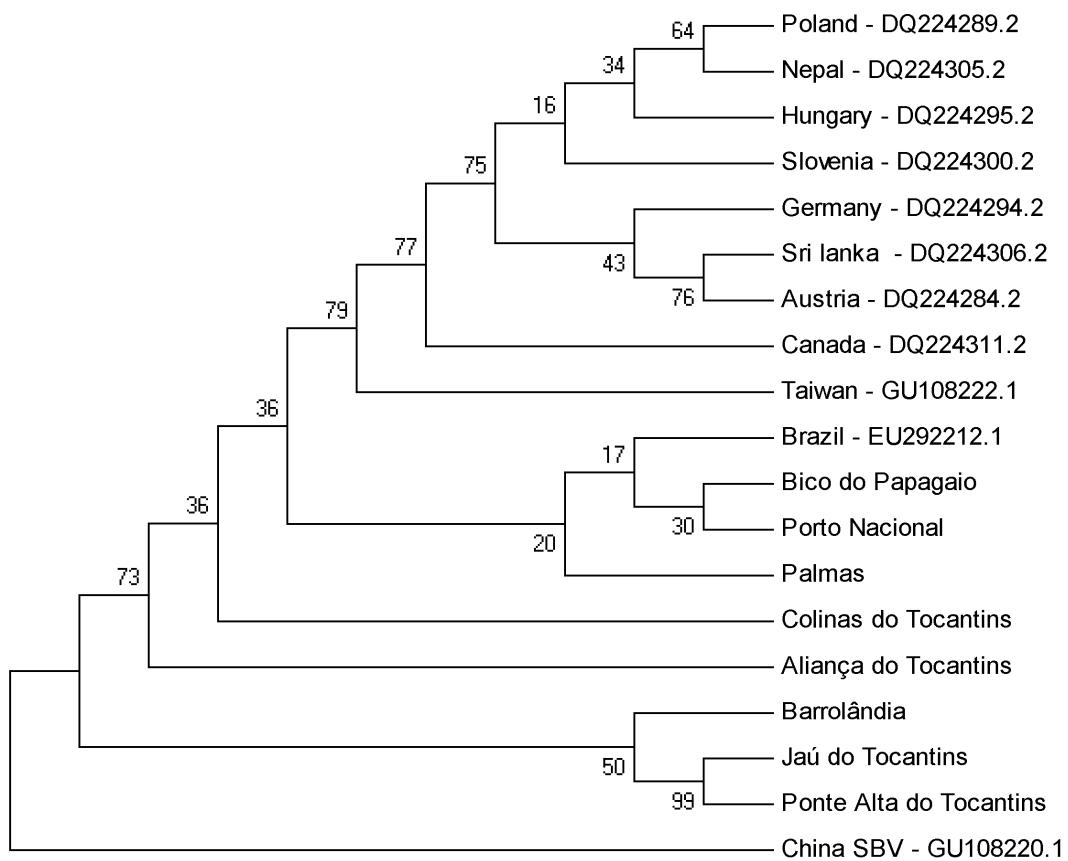


Figura 4. Árvore filogenética entre as populações de vírus DWV encontradas no Tocantins baseada na análise da máxima parcimônia com *bootstrap* de 1000 repetições. China SBV (GU108220.1) usado como grupo externo e demais sequências retiradas do Genebank com seus respectivos números de acesso.

A árvore filogenética para o vírus ABPV mostrou dois ramos distintos, no entanto, era de se esperar que as sequências dos vírus no Estado estivessem mais próximas à sequência brasileira. Quando analisamos a vegetação do Estado do Tocantins observamos 3 grandes biomas, cerrado, floresta amazônica e caatinga, além de áreas de transição entre eles (Silva, 2007). Durante o ano, o Estado passa por duas estações bem definidas, uma quente e

seca e outra quente e úmida. Talvez o clima e a vegetação tocantinense estejam exercendo pressão seletiva sobre os vírus.

Como observado para o vírus ABPV, a árvore filogenética do vírus DWV também separa as sequências encontradas no Estado do Tocantins e Brasil com as sequências para o vírus encontrado em outros.

As análises desse trabalho comprovaram que o Estado do Tocantins apresenta alto índice de infestação pelos vírus ABPV e DWV, demonstrando a contaminação nessa região norte do país. A apicultura no Estado ainda é realizada como agronegócio familiar e, talvez, por esse motivo, os pequenos apicultores distribuídos nas seis sub-regiões amostradas, apesar de perceberem a mortalidade de suas abelhas, não comunicam as autoridades responsáveis.

No caso das abelhas, combater os vírus existentes ainda é difícil e a única forma viável, no momento, seria a seleção massal, a fim de selecionar linhagens resistentes. Para os apicultores, o sacrifício de rainhas em colméias infectadas e sua substituição por rainha de colmeia saudável seria uma alternativa geneticamente aconselhável.

Outras formas de controle seria o combate aos ácaros, visto sua alta relação na disseminação de vírus, bem como de bactérias, fungos e protozoários que acometem as colméias e depreciam, assim, o sistema imune

das abelhas (Bromenshenk *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2009; Forsgren *et al.*, 2009; Mockel *et al.*, 2011).

Estudos para tratamento de abelhas com mecanismo de RNA de interferência (RNAi) tendo como alvo os vírus poderá resultar em um mecanismo de combate à infecção, visto que a maquinaria de RNAi foi evolutivamente selecionada para controle intracelular viral especialmente em plantas (Aliyari & Ding, 2009; Sabin *et al.*, 2010).

Hunter e colaboradores (2010), alimentando com um produto contendo dsRNA (Remebee-I) 160 colmérias da Flórida e Pensilvânia infectadas com o vírus IAPV, obtiveram resultados positivos com um aumento da população nas colmérias, demonstrando o uso de RNAi como tratamento preventivo para uma doença de insetos. Pesquisas nessa área devem ser realizadas no país na tentativa de controlar os vírus instalados nas colmérias de abelhas.

4. Referências Bibliográficas

- Aliyari, R. & Ding, S. W. (2009).** RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev* **227**, 176-188.
- Anderson, D. L. (1991).** Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am Bee J* **131**, 767-&.
- Aubert, M. (2008).** Impact of virus infections in honey bees. In *Virology and the honey bee*, 1 edn, p. 462. Edited by M. Aubert, B. V. Ball, I. Fries , R. F.

A. Moritz, N. Milani & I. Bernardinelli. Luxembourg: European Communities.

- Bailey, L., Ball, B. V. & Perry, J. N. (1981). The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann Appl Bio/97*, 109-118.
- Bakonyi, T., Grabensteiner, E., Kolodziejek, J., Rusvai, M., Topolska, G., Ritter, W. & Nowotny, N. (2002). Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Appl Environ Microbiol/68*, 6446-6450.
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M. & Davison, S. (2001). Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase pcr. *Appl Environ Microbiol/67*, 2384-2387.
- Bonning, B. C. & Miller, W. A. (2010). Dicistroviruses. *Annu Rev Entomol* **55**, 129-150.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. & Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol* **73**, 101-106.
- Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A. & other authors (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* **5**, e13181.
- Chen, Y., Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F. (2005a). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Pathol* **90**, 118-121.
- Chen, Y., Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F. (2005b). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Pathol* **90**, 118-121.
- Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. (2006a). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **92**, 152-159.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. & Feldlaufer, M. F. (2005c). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol/71*, 436-441.

- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A. & Feldlaufer, M. F. (2006b). Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**, 606-611.
- Chen, Y. P., Smith, I. B., Collins, A. M., Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F. (2004). Detection of Deformed wing virus infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. *American Bee Journal* **144**, 557-559.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M. & other authors (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**, 283-287.
- Dainat, B., Ken, T., Berthoud, H. & Neumann, P. (2009). The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insectes Sociaux* **56**, 40-43.
- De Miranda, J. R. & Fries, I. (2008). Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Invertebr Pathol* **98**, 184-189.
- De Miranda, J. R. & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S48-61.
- De Miranda, J. R., Cordoni, G. & Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S30-47.
- De Miranda, J. R., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C. E., Stoltz, D. B. & Camazine, S. M. (2004). Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J Gen Viro* **85**, 2263-2270.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E. & Huang, M. H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* **56**, 1184-1191.
- Evans, J. D. (2001). Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. *J Invertebr Pathol* **78**, 189-193.

- Forgach, P., Bakonyi, T., Tapaszti, Z., Nowotny, N. & Rusvai, M. (2008).**
 Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *J Invertebr Pathol* **98**, 235-238.
- Forsgren, E., de Miranda, J. R., Isaksson, M., Wei, S. & Fries, I. (2009).**
 Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp Appl Acarol* **47**, 87-97.
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M., Edouard & Bergoin, M. (2007).** Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* **38**, 426-435.
- Giray, T., Kence, M., Oskay, D., Döke, M. A. & Kence, A. (2010).** Scientific note: colony losses survey in Turkey and causes of bee deaths. *Apidologie* **41**, 451-453.
- Gisder, S., Aumeier, P. & Genersch, E. (2009).** Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Viro* **90**, 463-467.
- Gisder, S., Mockel, N., Linde, A. & Genersch, E. (2011).** A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ Microbiol* **13**, 404-413.
- Hornitzky, M. A. Z. (1987).** Prevalence of virus infections of honeybees in Eastern Australia. *J Apicult Res* **26**, 181-185.
- Huang, X. & Madan, A. (1999).** CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**, 868 - 877.
- Hunter, W., Ellis, J., Vanengelsdorp, D., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., Williams, M., Sela, I., Maori, E. & other authors (2010).** Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog* **6**, e1001160.
- IBGE (2011).** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso : Abril/2011.

- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci* **274**, 303-313.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. & other authors (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lourenço, A., Pedro, Mackert, A., dos Santos Cristina, A. & Simões, Z., Luz Paulino (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. & Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* **88**, 3428-3438.
- Maranhão, A. Q. (2003). Transformação Bacteriana. In *Técnicas básicas em biologia molecular*, 1 edn, vol. 1, pp. 129 - 143. Edited by M. O. Azevedo, M. S. S. Felipe, M. M. Brígido, A. Q. Maranhão & M. T. DeSouza. Brasília: Edutora Universidade de Brasília.
- Mayo, M. A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology* **147**, 1655-1656.
- Mockel, N., Gisder, S. & Genersch, E. (2011). Horizontal transmission of Deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J Gen Virol* **92**, 370-377.
- Morse, R. A. & Calderone, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture Magazine* **128**, 1-14.
- Nogueira-Neto, P. (1977). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo, Brasil.: Nogueriapis.
- Ribièvre, M., Ball, B. V. & Aubert, M. (2008). Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In *Virology and the honey bee*, 1 edn,

- p. 462. Edited by M. Aubert, B. V. Ball, I. Fries, R. F. Moritz, N. Milani & I. Bernardinelli. Luxembourg: European Communities.
- Ribi  re, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Auri  re, C., Faucon, J. P. & Pépin, M. (2002).** Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**, 339-351.
- Sabin, L. R., Hanna, S. L. & Cherry, S. (2010).** Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Curr Opin Immunol* **22**, 4-9.
- Santos, C. S. & Ribeiro, A. S. (2009).** Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. *Revista Verde* **4**, 1-6.
- SEAGRO-TO (2011).** Secretaria da Agricultura, da Pecuária e do Desenvolvimento Agrário do Estado do Tocantins. Brasil.
- Silva, L. A. G. C. (2007).** Biomas presentes no Estado do Tocantins., pp. 1-9. Edited by D. A. e. P. Fundiária: Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados.
- Singh, R., Levitt, A. L., Rajotte, E. G., Holmes, E. C., Ostiguy, N., Vanengelsdorp, D., Lipkin, W. I., Depamphilis, C. W., Toth, A. L. & other authors (2010).** RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* **5**, e14357.
- Souza, D. C. (2002).** Apicultura orgânica: alternativa para área de explora  o da região do semi  rido nordestino. In *Congresso Brasileira do Apicultura*, pp. 133-135. Campo Grande, MS.: Anais do Congresso Brasileira do Apicultura.
- Stoltz, D., Shen, X. R., Boggis, C. & Sisson, G. (1995).** Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* **34**, 153-160.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*.
- Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J. & Evans, J. D. (2008).** Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol* **99**, 117-119.

- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E. & Bergoin, M. (2004a). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7185-7191.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., Ball, B. V. & Bergoin, M. (2004b). Polymerase chain reaction detection of Deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 431-439.
- Yue, C. & Genersch, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* **86**, 3419-3424.
- Yue, C., Schroder, M., Bienefeld, K. & Genersch, E. (2006). Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol* **92**, 105-108.

CAPÍTULO III

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE
AmToll-1 EM ABELHAS *Apis mellifera* INFECTADAS
COM OS VÍRUS DA PARALISIA AGUDA (ABPV) E
DA ASA DEFORMADA (DWV)**

Resumo

Os insetos, que compõem um grupo extremamente bem sucedido devido ao seu sistema imune inato altamente elaborado, têm colonizado todos os habitats terrestres. Nesse trabalho caracterizamos e quantificamos transcritos por PCR em tempo real do gene *AmToll-1* em abelhas infectadas pelo vírus da Asa deformada (DWV) e co-infectadas com o vírus da Paralisia aguda (ABPV) e DWV. As análises *in silico* mostraram que esse gene possui domínio rico em leucina, típico de receptor *Toll*. O filograma mostrou formação de agrupamentos entre os Hymenoptera e Diptera. A quantificação de transcrito revelou que esse gene é significativamente mais expresso nos indivíduos com co-infecção, mostrando que co-infecção viral modula os níveis de transcritos do gene *AmToll-1*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, ABPV, DWV, Receptor *Toll*

Abstract

Insects are a group extremely successful over time, due including their highly developed innate immune system and have colonized all the terrestrial habitats. In this study, we characterized and quantified transcripts by real-time PCR of the AmToll-1 gene in bees infected with deformed wing virus (DWV) and co-infected with acute bee paralysis virus (ABPV) and DWV. The analysis "*in silico*" showed that this gene has domain leucine-rich typical of Toll receptor. The quantification of transcripts of Toll gene revealed increased their expression significantly in individuals with co-infection. These data show that viral co-infection can modulate levels of gene transcripts *AmToll-1*.

Keywords: *Apis mellifera*, ABPV, DWV, Toll receptor

1. Introdução

Os insetos compõem um grupo extremamente bem sucedido ao longo do tempo e colonizaram todos os habitats terrestres. Contudo, com toda essa diversidade de habitats os expõe a uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus, que são controlados devido ao seu sistema imune, permitindo que sobrevivam às diversas patologias e sigam colonizando novos ambientes (Michener, 2000; Morse & Calderone, 2000).

Invertebrados possuem sistema imune inato altamente elaborado, o qual se apresenta como uma variedade de reações celulares e humorais coordenadas, como a síntese de peptídeos antimicrobianos, moléculas de adesão celular e proteinases inibidoras (Jiang, 2008; Luo *et al.*, 2003).

A imunidade celular é realizada pelos hemócitos, células de defesa suspensas na hemolinfa, através da fagocitose, nodulação e encapsulação (Lavine & Strand, 2002). Eles reconhecem organismos estranhos como bactérias e fungos e quando ocorre uma infecção, um dos primeiros mecanismos de defesa é a fagocitose, como mostrado por Amaral e colaboradores (2010) em *Melipona scutellaris*.

A imunidade humoral, responde pelos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de proteínas, que diferencia o que é

“próprio” do “não-próprio” no organismo, e a partir daí uma cadeia de reações químicas ocorre ativando o sistema de defesa (Murphy *et al.*, 2010).

Uma forma de reconhecimento, empregada por insetos e outros artrópodes e vertebrados, encontra-se nos denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*) que são polímeros presentes exclusivamente em microrganismos e são essenciais à sua sobrevivência, como os peptídeoglicanos (PGC), lipopolissacarídeos (LPS) de paredes bacterianas e o β -1,3-glucano de fungos (Akira *et al.*, 2006; Ferrandon *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2002).

Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRR – *Pattern recognition receptors*) os quais fazem com que o organismo hospedeiro comece se defender dos invasores, desencadeando várias respostas imunológicas – celulares através da fagocitose e humorais, com a síntese e secreção de peptídeos antimicrobianos (AMP) ou com a melanização através da cascata de serino-proteases (Akira *et al.*, 2006; Ferrandon *et al.*, 2007; Kavanagh & Reeves, 2004; Murphy *et al.*, 2010).

Entre os PRR conhecidos, destaca-se a família *Toll*, primeiramente descoberto em *Drosophila* como receptores essenciais ao desenvolvimento dorso-ventral dos embriões (Hashimoto *et al.*, 1988) e, posteriormente, relacionados ao seu sistema imune (Lemaitre *et al.*, 1996).

Os receptores do tipo *Toll* são proteínas transmembrana, conservadas ao longo da evolução, caracterizadas por dois domínios, um extracelular, rico em regiões repetidas de leucina (LRR – *Leucine rich repeat*) e outro, intracelular ou citoplasmático, homólogo ao receptor de interleucina (IL-1R) caracterizado como domínio *Toll/IL-1R homology* (TIR). Ambos os domínios são responsáveis por reconhecer os PAMPs de diferentes microrganismos (Akira *et al.*, 2006; Ferrandon *et al.*, 2007; Hoffmann, 2003; Raetz & Whitfield, 2002).

Nove famílias de *Toll* foram identificadas em *Drosophila*, (*Toll*, 18-*Wheeler* e *Toll* 3 a 9) (Ooi *et al.*, 2002). Em *A. mellifera* foram identificados cinco receptores *Toll*: *Toll1*, *Toll2/18w*, *Toll6*, *Toll8/Trex1* *Tollo* e *Toll10* (Evans *et al.*, 2006).

Estudos em *Drosophila* tem demonstrado que frente a uma infecção há uma resposta rápida através de duas vias de sinalização produzindo vários peptídeos antimicrobianos por via *Toll*, quando deparam com fungos e bactérias gram-positivas, e por via *Imd* (*Immune deficiency*) quando ocorrem bactérias gram-negativas (Tanji & Ip, 2005).

Evans e colaboradores (2006) mostraram que *A. mellifera* possui menos genes relacionados à imunidade quando comparada ao genoma de *Drosophila* e *Anopheles*, sugerindo que o comportamento social, também, contribui para a defesa contra patógenos na colméia.

Estudos relacionados ao gene *Toll* em relação à doenças virais ainda são poucos quando comparados a bactérias e fungos. Nessa investigação foi caracterizado o gene predito *Toll-1* e avaliada a expressão do gene *AmToll-1* em abelhas *Apis mellifera* infectadas e co-infectadas com os vírus DWV e ABPV/DWV, respectivamente, para analisar a resposta do sistema imune das abelhas melíferas.

2. Material e Métodos

2.1. Material Biológico

O material biológico analisado foram as abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) coletadas em diferentes regiões do Estado do Tocantins, cobrindo 68 colmeias e ainda 19 abelhas coletadas em colônias naturais em Uberlândia, Minas Gerais. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Genética e Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2. Extração de RNA

Um grupo de cinco abelhas foi utilizado para a extração de RNA pelo método do Trizol (INVITROGEN) segundo recomendações do fabricante. O RNA total foi ressuspensionado em água ultrapura tratada com DEPC 0,1%. O RNA foi tratado como o Kit RQ1 DNase (PROMEGA), seguida por quantificação em espectrofotômetro NANODROP (ND-1000) e armazenado em ultrafreezer -80°C até o momento do uso.

2.3. Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1 μ g de RNA utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (USB), segundo recomendações do fabricante. O gene *rp49* (GenBank AF441189), codificador de proteína

ribossomal, foi utilizado para testar a qualidade do DNA complementar (cDNA) (Lourenço *et al.*, 2008).

2.4. Reação de PCR

Para sequenciamento do gene *AmToll-1* foram desenhados, pelo programa *Oligo Explorer 1.4*, cinco pares de *primers* (Tabela I) que se sobreponham, com base na sequência do gene predito *Toll-1* de *A. mellifera* (GeneBank: XM_396158.2).

A amplificação por RT-PCR, foi processada nas condições: 5 min a 95°C, 30 ciclos (30s a 95°C, 40 s a 58°C, e 30 s a 72°C), seguidos por 10 minutos a 72°C para completar a polimerização.

Tabela I – Sequência dos *primers* para clonar o gene predito *Toll-1* e o respectivos fragmentos em pares de bases.

Primers	Sequência	Fragmento (pb)
Primer 1	F: 5'-CCGAAGGAGTTTGAGATAC-3' R: 5'-CGAGGAAAAGTTGTTCCAGG-3'	702
Primer 2	F: 5'-TTGGACGTGAGCAGCAATCA-3' R: 5'-GAGTTACAAGCCAATCACCAA-3'	739
Primer 3	F: 5'-ACCAAGCTACGCATTGCAAAA-3' R: 5'-CCAATTCTGTCAAAGATGGC-3'	734
Primer 4	F: 5'-ATTTGACAAGTGTGCCACGAA-3' R: 5'-TATCCATTCTCCAGCTAACCA-3'	734
Primer qPCR	F: 5'-GCTGGAGAATGGATACCAACACA-3' R: 5' -CGTCCCCAACACTTCCAA-3'	150

2.5. PCR para diagnóstico viral

A fim de selecionar indivíduos negativos e positivos para os vírus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV e SBV foram feitas reações de amplificação utilizando *primers* específicos desenhados para cada tipo de vírus como segue na Tabela II.

Tabela II: Sequências dos *primers* de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências.

Vírus	Sequência do primer 5' – 3'	T.A. (°C)	Fragmento esperado (pb)	Referências
DWV	F - GAGATTGAAGCGCATGAACA	54	129	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - TGAATTCACTGTCGCCATA			
ABPV	F - TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA	54	500	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - AATCATCATTGCCGGCTCTA			
BQCV	F - TGGTCAGCTCCCACTACCTAAACI	54	700	Benjeddou <i>et al.</i> , 2001
	R - GCAACAAGAAGAAACGTAAACCACI			
CBPV	F - AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG	55	455	Ribiére <i>et al.</i> , 2002
	R - TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG			
SBV	F - GGATGAAAGGAAATTACCAAG	56	426	(Tentcheva <i>et al.</i> , 2004)
	R - CCACTAGGTGATCCACACT			
KBV	F - GATGAACGTCGACCTATTGA	55	414	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
	R - TGTGGGTTGGCTATGAGTCA			
IAPV	F - AGACACCAATCACGGACCTCAC	58	457	Maori <i>et al.</i> , 2007
	R - AGATTGTCTGTCTCCAGTGCACAT			

A amplificação, para os diferentes vírus, foi padronizada para um volume final de 20 µL com as seguintes concentrações: 10 pmol de primer, 0,2 mM de dNTP, 1X tampão da enzima e 1U de Taq polimerase (Ludwing Biotec). As

condições da reação de PCR foram padronizadas para os diferentes vírus sendo 2 min a 95°C de etapa inicial, seguido de 35 ciclos de amplificação (30s a 95°C, 1 minuto a X°C, 1 minuto a 72°C) e 10 minutos a 72°C para completar a polimerização. A temperatura de anelamento (X°C) foi variável entre as reações como demonstrado na Tabela II. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em foto-documentador (IMAGEQUANT 150, GE). A migração dos fragmentos foi acompanhada por marcador de peso molecular de 100pb (INVITROGEN).

2.6. Sequenciamento da região codificante (cds) do gene *AmToll-1*

Os amplicons obtidos do gene *Toll* por PCR foram purificados pelo QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), quantificados por espectrofotômetro NANODROP (ND-1000) e submetidos à seqüenciamento automático em MegaBace (AMERSHAM).

2.7. Análises *in silico*

As sequências de nucleotídeos dos produtos amplificados foram confirmadas usando a ferramenta BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para comparação com a sequência do gene predito *Toll* de *A. mellifera* (GenBank: XM_396158.2).

A busca por sequências homólogas tanto para nucleotídeos como para aminoácidos foi realizada através do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados do GenBank.

O software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) foi utilizado para alinhamentos múltiplos com o gene *AmToll-1*. Motivos conservados foram analisados pelo Prosite (Hulo *et al.*, 2006) e domínios homólogos com o ProDom (Servant *et al.*, 2002).

2.8. PCR em tempo real (qRT-PCR)

A quantificação de transcritos do gene *AmToll-1* obtidos das abelhas controle (sem infecção), infectadas apenas pelo vírus DWV, e co-infectadas com os vírus ABPV e DWV foi realizada pela técnica de PCR Tempo Real, a qual é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA, ciclo a ciclo.

As reações de qRT-PCR foram realizadas simultaneamente para os genes *Toll* e *rp49*, em placa de leitura óptica de 96 poços, em triplicata. Cada reação continha 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 3 pmol de cada *primer* específico, 2µL cDNA, completado com água ultra pura para um volume final de 10µL.

Os *primers* para os genes *AmToll-1* e *rp49* foram desenhados usando *Primer Express Software* (Applied Biosystem), com base na seqüência do gene

predito *Toll* de *A. mellifera* (GenBank: XM_396158.2) sendo, Forward: 5' GCTGGAGAATGGATACCAACACA 3' e Reverse 5' CGTCCCCAACACTTCCAA 3'. O gene codificador da proteína ribossomal (rp49) foi utilizada como gene endógeno para normalização da reação (Lourenço *et al.*, 2008).

As reações de PCR foram feitas com 40 ciclos em ABI 7700 Sequencer Detector (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 1min, 95°C por 10min seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1min.

O primeiro ciclo (C_T), detectado na reação de PCR, foi definido como o ciclo no qual ocorre aumento significativo na amplitude do sinal gerado. Os valores do C_T foram calculados pelo *real-timer sequencer detection software* (Applied Biosystems) e foram empregados para calcular a expressão do mRNA do gene *Toll* relativo ao mRNA do gene normalizador *rp49*. Os níveis de expressão foram calculados relativos ao controle (negativo para infecção viral) usando a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por análise de curva de dissociação do gene endógeno *rp49* que, nesse caso, deve apresentar um pico único, devido aos *primers* flanquearem um intron (Lourenço *et al.*, 2008). Sendo satisfatório o resultado, foi processada a reação de qRT - PCR com as amostras dos grupos controle e experimental (infectado).

2.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa PRISMA 5.0, utilizando ANOVA com teste Bonferroni para análise da significância entre os grupos.

3. Resultados e Discussão

As amplificações utilizando *primers* específicos, desenhados baseado no gene predito de *A. mellifera*, resultaram em bandas com o tamanho esperado (Tabela I). Após sequenciamento dos amplicons as sequências foram alinhadas para formar *contig* utilizando o programa *CAP3 Contig Assembly Program* (Huang & Madan, 1999). Os *contig* foram utilizados no alinhamento com a sequência predita no genoma de *Apis* utilizando programa Clustal W. Até o momento, 74% do gene encontra-se sequenciado (Figura 1).

```

>Gene Toll 1 - Apis mellifera XM_396158.2
GTTGAACCGTTCACTGAACGTTGATCTATGAATTCTCAATTAAATTAGAAATTCTTCTT
TGCAATTCAATAATGTTGATTACATCGAACAAACAAATTATCGATGATCGTGAATT
GTGAAATACCGAGTGTGTTACCGTGAATAATTCTGGAAAAAAACAAATAGTGCACACGAATGAT
TGCAACGAATAATCCTCCTATTGAATCTCGTACGTTATTCCGTGCAATTACAAATGTTGAAAT
CTCGTTGATGGATCATTGGAAATTGTTATCGCAGATGTTACCGGAAATTGATGTCACCGGA
GCAAAATGCAACTGCTATCTAAGTCCCAGGGAGTTTGAGATAATGTCACCGGAAATTGATGTCACCGGA
GCCTTCGTTGAAAGTTAAATTACGAACGTATTGGGATTGAAATTGTTAAATTTCGAAATTGATGTCACCGGA
ACTTCCAACTGTTACCTGAAACTGTTCAAGATGTTACGTTATTGATGTCACCGGAAATTGATGTCACCGGA
AAACCAAGGTTAAATGAGATTCTGAAACAAACTCGGTGCTCAAAACATAGAGAAACTGATATTCCATTCA
TATGGCAATTATCTGTTCTGAATAGGAAGCATCTACAAGGTTTCAAATTAGAAATATCTGAGCCTGA
CATGTAATAACTGACCAATTAGCAATGATATTTCGCGGATGTACACGATTGAAAGAATCTCAATT
ACGCCAAATAATATTATTCAATTCTGAAATTCAATTACATACCAATTAGAAATACTGAACTT
GGTGATAATAAGCTGAAGGAAATAGACGTGAACACATTAAACCGTTAAAGCATTGAAATGTTAAATA
TGTGGGGAAATAAGTTCACAGGTTCAATCGAATATTCTGACAATTCTGTCATTGAAATTCTTGG
CGTAGCAGCAGATCATTTAAACTACTTGCCTAATGATATTTCGCGGAAATTGTTAAATTGATGTCACCGGA
CATTGGGCTGAAACAACCTTCTGTTACAGAGGTCTACTGCAAGCACAATGTTAAATTAAAG
TAAATTATCTAATAATAGAATAAGCATGAAGACATTACCGAATGGATTGTTGCAATTGAAAGAATCT
GAAAGAGATAGAGCTAAATAATGATTGATAGAATTGCTGATCTATTGATGATTCCATATCGCTT
GAAATCATGATTGCTTTCAATAATCTGAGTCTTCTGTAATCTTTGCAATTGGTGAATT
TAACAAAATTAAATAATTAGTAACACAAATTGACATCATTGCTGATGGAATTCTCAAAATTGAAAGAA
ATTGATTATATTAGATTGCTCACAATAATCTACTTCATACTCGATATTGTTAGTGAATTAAATA
TCACCTCAAAATTAAATGAAAGAATCAATTAAAGATTAGAAGAAACAAGGTTCAATTCTTAA
CCAAGCTACGATTGCAAAATTCTAACAACTTACATTCAATACTTCGATAAAATAGCTATATTG
TGAATATGGAAATGAGATCACCTTCAAAGTTGCTCATCTAGAAGAATTGATCTGGATAAAATAAT
ATTCGGACATATTGGTATTGGCTGTAACTCATGTAAGCTGAAGAAATTCTCAATTAAATC
AGATACAAGAAATATCAATCCGAGATTACAATTTCAAATTCAATTGAAAGTGAATCTCACAAATAA
TAAATAAACATATAAAACTGAAATGAAAGCTAAAGAAATTGCAAGATTCAACAAGATTCTGGAATGTA
ATGATATATTGAAATAATCTATCGAATGACTGTGATATAATTAAATTCTTCTTATTGGAAAG
GAAATGGATCTAACGTTCAAAATTTCACATCATGCGCAGGATGTCGATGCAAAATCCACA
AAAGTTAAAGCAGAAAGAAATTGAAATTAGAATCAAAGAAATTCTGTCAAATATCTAATTCTGT
CCTAATGAGTGCACATGTTATTCAACAAAGTAATAAGAAATTACCGTTAATTGTTGGAAAAAATT
TGACAAGTGTGCCACGAAATCAAAACATTACTAAATTATAACTTGTGATAGATCTACGGATAATAA
ATTAAGTGAATGCCATCTTGACAGAAATTGGTTAGATAACACATACAGATATCCAAGTACTATTATCA
AATAATGATATTGATGAAAGTATCAATTGATGGATTACAATCGAACATAGAGTTGGAGTTACAAACAATA
ATATCAGTAATTAGAACCAATGTTCAATTCTAAACAAATGTTCTGCTGTTAACGGTGCATGGAA
TCCATGGATATGCGATGTTGATACAGAGATTACTAGCTTATACAAACGAAAGATTCTCAGACATTG
ATTCTTCTTAATTACTGCAAGGATGATAATTGATGATAATTGATGATAAAAGCAGAAGCAGATTCTG
CTACTTATACTACGTTAATTATTAAGTTGCTTCTGCTGTCAGGCATGATAATTGGTCTGCT
AGCAGCAATTATTATAGATATCAACGAGAAATTAAAGTTGGCTATATGACATCAATTGCTTATGG
TTAATAACAGAAGATGAATTAGATAAAAGATAATTGATGATGCAATTAAAGTTATTACATAAAGATG
AAGATTGTTGATGAGTTAGTCCAAAGTTAGAAATTGACCTAACCGTTCAAATTGTTGCTGCA
TTTCGTTGATGGTTAGCTGGAGAATGGATACCAACACAAATCGCGTTCTGTTGAGAAATCTAGGCGA
ACGATAGTAGTTTATCACCAATTGGAAAGTTGGGAGAATGGAATTAGTGGCGCATT
GTCAAGCAGTCACTGAAACGAGATCAAAGTTATTAAATTATGATGAAATTGGCCCCATTAAATAA
TTAGATCCAGAAACTCAAGGATATATGAGCATGAAATCATATGTTAAAGGGGTGATCTTGGTTGG
GACAAATTGCGATATGCGTACACATGCTGAATTACAAAGAATGTTAAAGAAAAAAATTCTCAA
AACATCAACCATGATACAAATTAAAGCGAGAAGAAAGAGTTAATTATCCAATTGATATTCTGAAAC
ACCCCTGCAACAAGCACTCCACCGACAGATACTTAAAAATTATGATGATAAAACGACAGTGT
AATAAAGAAAATTCTCAAATTCTCTTCACTGAGATTGCAACACCAAACTTATTCTCAAAGGAAGAAT
TAGTAAACACATAATTGGTTAATAAAAGTACAATGACTACCGTATGACAAGATCATATATATATA
ATATACAAAACATTAAAGAATGTTGTTAAAGTTGAAGTACTCATTTACATTAAAAAATAA
ATTATTATAATTATTAGGATCATTGAAATTACACATTCAATTCAATTGTTACAATT

```

Figura 1 – Regiões sequenciadas do cDNA do gene predito *Toll-1* de *Apis mellifera*. Em negrito, regiões flanqueando início e término da região codificadora (cds).

As sequências de aminoácidos para o fragmento maior do gene *AmToll-1* foram deduzidas pelo programa Expasy Translate (Gasteiger *et al.*, 2003) e

fazer a análise “*in silico*” na busca de domínios protéicos para o fragmento do gene entre o banco de dados do ProDom, que encontrou três domínios (PD946710, PD709061, PD705153) (Figura 2), todos relacionados com precursores ligados ao *Toll*.

Banco de dados ProDom	
> PD709061 (Closest domain: Q8MQU8_AEDAE 566-705)	
Number of domains in family: 10	
Commentary (automatic):	
TOLL TOLL-RELATED RECEPTOR REPEAT DEVELOPMENTAL MEMBRANE ADHESION POLYMORPHISM ENSANGP00000016637 PRECURSOR	
Length = 140	
Score = 162 (67.0 bits), Expect = 1e-10	
Identities = 34/109 (31%), Positives = 57/109 (52%), Gaps = 8/109 (7%)	
Query:	97 IKHININNEAKEIARFQQDQRNVMETIYIENNPPIECCDIFNFILYLEGKLDPNVYKFHI 156
	I I+L + + I Q+ + +Y+ +NP+ C+C IF+F+ YL +LD VY+
Subjct:	566 ISEIDLKDMEPIITSQRSQDDSKIYVYVNDNPLNCNCVIFS FVQYLLNELEDAVYRRIQF 625
Query:	157 METPGCLTCQNPQKFKGKEIVKLESKKFICQISNP-----CPNECTCY 199
	+ L C PQ +G +KL++K +CQ+ P CP C+C+
Subjct:	626 VADD--LRCSEPNQNLLEGVHVS KLQT KDLLCQLDQPGTEIKHCPANC SCH 672
> PD946710 (Closest domain: Q8MQU9_AEDAE 465-542)	
Number of domains in family: 2	
Commentary (automatic):	
REPEAT DEVELOPMENTAL MEMBRANE ADHESION POLYMORPHISM TOLL TOLL-RELATED PRECURSOR LEUCINE-RICH TRANSMEMBRANE	
Length = 78	
Score = 129 (54.3 bits), Expect = 8e-07	
Identities = 30/70 (42%), Positives = 46/70 (65%), Gaps = 1/70 (1%)	
Query:	31 SPFQSCSSLEELYLDKNNISDIFGDWLVT HVKLKLNQFNQI QEISIRDLQFLSNSIEV 90
	+PFQ L L+L N+IS IF DW + +++L+ L+L FN++ +S LQF SN I +
Subjct:	466 TPFQVLQKLRLHRLRNNSISTIFQDWYIINNLELQSLDLSFNKLPLLSYTQLQFQSN-ITL 524
Query:	91 NLNNN KIKHI 100
	NL+NN+I +
Subjct:	525 NLSNNEISKV 534
> PD705153 (Closest domain: Q8MQU8_AEDAE 511-564)	
Number of domains in family: 2257	
Commentary (automatic):	
REPEAT LEUCINE-RICH RECEPTOR PRECURSOR GLYCOPROTEIN SIGNAL TRANSMEMBRANE TOLL-LIKE MEMBRANE DOMAIN	
Length = 54	
Score = 105 (45.1 bits), Expect = 0.0004	
Identities = 24/54 (44%), Positives = 35/54 (64%), Gaps = 8/54 (14%)	
Query:	42 LYLDKNNISDIFGDWLVT HVKLKLNQFNQI QEISIRDLQFLSNSIEVNL TNN 95
	L L N+I+ IF DW ++ L++L+L +N I +S LQFLS + VNLT+N
Subjct:	511 LNLRNNSITTI FRDWNYNNLHLRELDLSYNNISTLSYLSLQFLSQDVRVNLT HN 564

Figura 2 - Análise de domínio do fragmento seqüenciado do cDNA do gene *AmToll-1* utilizando o programa ProDom.

O domínio PD946710 está relacionado a proteína *Toll* em *D. melanogaster*, onde estabelece o desenvolvimento embrionário dorso-ventral e atua no sistema imune através da ativação da proteína *spätzle* na hemolinfa,

controlando a expressão de peptídeo antifúngico drosomicina (Drs) (Hashimoto *et al.*, 1988; Keith & Gay, 1990; Lemaitre *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2003). Os domínios PD709061 e PD705153 relaciona-se com o domínio intracelular TIR de *Aedes aegypti* (Luna *et al.*, 2003).

A busca por domínios conservados utilizando programa Prosite (<http://expasy.org/prosite/>) e *Search Conserved Domains on a Protein* (NCBI - CDD) demonstraram similaridade com regiões ricas em leucina (Figura 3) em ambos os bancos de dados. Essas regiões são típicas de receptores *Toll* (Akira *et al.*, 2006; Bowie & O'Neill, 2000; Raetz & Whitfield, 2002).



Figura 3 - Análise de domínio do fragmento seqüenciado do cDNA do gene *AmToll-1* utilizando os programas, Prosite (A) e NCBI - CDD (B).

Nos alinhamentos múltiplos com o programa Clustal W entre as proteínas *Toll* de outros insetos e humano, o filograma demonstrou três ramificações definidas, uma bem distinta com o *Homo sapiens*, outra entre *D. melanogaster* e *A. aegypti* (díptera) e uma com os himenópteros, *A. mellifera*, *Acromyrmex echinatior*, *Nasonia vitripennis* e *Solenopsis invicta*. Entretanto, entre os himenópteros houve uma maior semelhança entre os de vida social, abelhas e formigas (Figura 4).

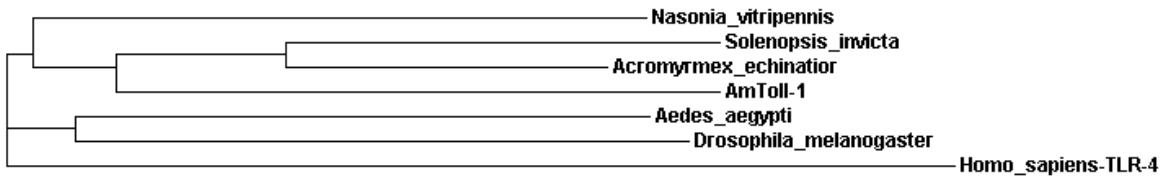


Figura 4 – Filograma gerado através de alinhamentos múltiplos (Clustal W) entre as proteínas do *Toll* entre *Nasonia vitripennis* (XP_001604871.1), *Aedes aegypti* (AAM97775.1), *Drosophila melanogaster* (AAN14086.1), *Solenopsis invicta* (EFZ19053.1), *Acromyrmex echinatior* (EGI70800.1), *Homo sapiens* (NP_059138.1).

A vida em sociedade, com cuidado da prole, sobreposição de gerações e diferenciação de castas, garante a muitos insetos, como formigas, térmitas, algumas vespas e abelhas, incluindo *A. mellifera*, sobreviver e dominar diferentes habitats (Wilson, 1971).

Esses insetos sociais desenvolveram uma forma de defesa coletiva contra patógenos, criando um sistema de imunidade social, visto que a sociabilidade também aumenta os riscos de transmissão de doenças entre a população. As defesas coletivas baseiam-se em medidas profiláticas, com adaptações comportamentais, fisiológicas e organizacionais entre os membros da colônia na tentativa de impedir a entrada e o desenvolvimento de patógenos (Cremer *et al.*, 2007; Evans & Spivak, 2010).

A análise da expressão do gene *AmToll-1*, por qRT- PCR, em abelhas infectadas apenas com o vírus DWV e com co-infecção por ABPV e DWV mostrou maior expressão do que nas abelhas do grupo controle (Figura 5).

Houve diferença significativa apenas entre indivíduos que estavam co-infectados e o controle (Bonferroni, $p<0,05$). Para os indivíduos infectados apenas pelo vírus DWV ocorreu aumento do número de transcritos, porém sem diferença significativa ($p>0,05$). Como não foram encontradas abelhas infectadas somente com ABPV, não foi possível quantificar os transcritos do *AmToll-1* nessas abelhas.

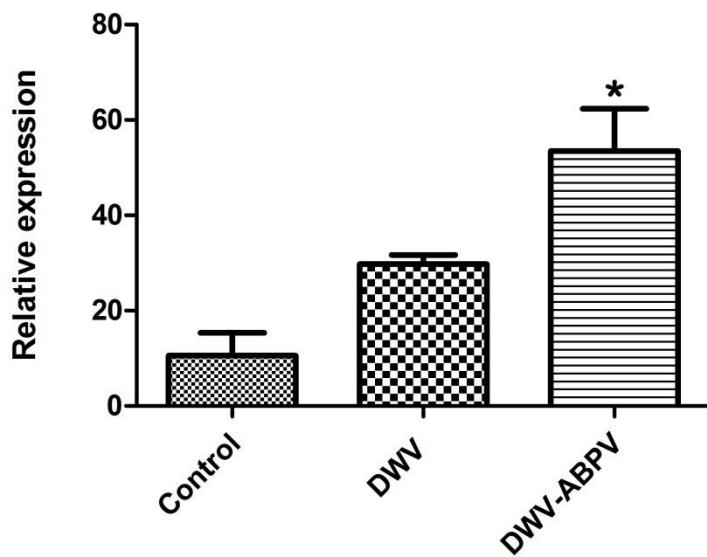


Figura 5 – Quantificação relativa de transcritos do gene *AmToll-1* por qRT - PCR. Control – abelhas sem infecção; DWV – abelhas infectadas apenas com o vírus da deformidade da asa; ABPV/DWV – abelhas co-infectadas pelo vírus da paralisia aguda e deformidade da asa. *Diferença significativa (Bonferroni $p<0,05$).

O fato das abelhas infectadas apenas com o DWV não apresentarem expressão significativa de transcritos do gene *Toll* pode ser devido ao fato de

que esse vírus, para manter-se no hospedeiro apresente uma taxa menor de infecção, evitando a morte da abelha (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005b; De Miranda & Genersch, 2010; Yue & Genersch, 2005).

No entanto, quando há co-infecção, os vírus provavelmente estariam expressando suas proteínas para a replicação, o que aumentaria os níveis de sinalização para os receptores *Toll*, tornando sua expressão significativa em relação a abelhas não infectadas na tentativa de sobreviver à infecção.

Experimentos analisando a expressão dos receptores *Toll-like* (TLR) TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5 e TLR-9 em camundongos co-infectados com *Streptococcus pneumoniae* e o vírus da influenza evidenciaram maior expressão de transcritos de TLR-2 e 4 quando comparados com infecção única (Seki *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que humanos co-infectados com plasmódios e helmintos, com infecções sucessivas, são uma fonte contínua de ligantes TLR, que pode resultar em estimulação repetida desses receptores (Hartgers & Yazdanbakhsh, 2006).

Zambon e colaboradores (2005) demonstraram em estudos com *Drosophila*, que a via *Toll* está envolvida na resposta antiviral, onde genes de peptídeos antimicrobianos (AMP) são ativados em resposta à infecção viral, assim como ocorre em infecções com *Escherichia coli*.

Muitos são os trabalhos sobre sistema imune em insetos, especialmente, *Drosophila*, sendo a maioria relacionada à infecção por bactérias e fungos (Akira & Takeda, 2004; Ferrandon *et al.*, 2007; Shia *et al.*, 2009; Tanji & Ip, 2005).

A identificação de novos vírus em *A. mellifera* (*Aphid Lethal Paralysis Virus* (ALPV), *Big Sioux River Virus* (BSRV), *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1), *Lake Sinai Virus 2* (LSV-2)) (Runckel *et al.*, 2011), e a escassa literatura a respeito de seu sistema imune frente a infecção viral, demonstram a necessidade de mais pesquisas. Este trabalho acrescenta mais dados à literatura relacionados ao sistema imune desse organismo em relação a infecção viral, visto que novos vírus já foram identificados e, ocorrem nas colônias de *A. mellifera*.

4. Referências Bibliográficas

- Akira, S. & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Amaral, I. M. R., Neto, J. F. M., Pereira, G. B., Franco, M. B., Beletti, M. E., Kerr, W. E., Bonetti, A. M. & Ueira-Vieira, C. (2010). Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron* **41**, 123-129.
- Benjedou, M., Leat, N., Allsopp, M. & Davison, S. (2001). Detection of Acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2384-2387.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. & Gunn, A. (1999). The transmission of Deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol* **73**, 101-106.
- Bowie, A. & O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Bio* **67**, 508-514.
- Chen, Y., Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F. (2005a). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J Invertebr Pathol* **90**, 118-121.
- Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **92**, 152-159.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. & Feldlaufer, M. F. (2005b). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol* **71**, 436-441.
- Cremer, S., Armitage, S. A. & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Curr Biol* **17**, R693-702.

- De Miranda, J. R. & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S48-61.
- Evans, J. D. & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* **103 Suppl 1**, S62-72.
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z. & other authors (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* **15**, 645-656.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (2007). The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* **7**, 862-874.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788.
- Hartgers, F. C. & Yazdanbakhsh, M. (2006). Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunology* **28**, 497-506.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of Drosophila. *Nature* **426**, 33-38.
- Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**, 868 - 877.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Pagni, M. & Sigrist, C. J. (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**, D227 - D230.
- Jiang, H. (2008). The biochemical basis of antimicrobial responses in *Manduca sexta*. *Insect Science* **15**, 53-66.
- Kavanagh, K. & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 101-112.

- Keith, F. J. & Gay, N. J. (1990). Drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J* 9, 4299–4306.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. & other authors (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295-1309.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973-983.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-[Delta][Delta]CT method. *Methods* 25, 402-408.
- Lourenço, A., Pedro, Mackert, A., dos Santos Cristina, A. & Simões, Z., Luz Paulino (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372-385.
- Luna, C., Hoa, N. T., Zhang, J., Kanzok, S. M., Brown, S. E., Imler, J. L., Knudson, D. L. & Zheng, L. (2003). Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 12, 67-74.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. & Xu, X. (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett* 551, 53-57.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. & Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* 88, 3428-3438.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world*. . Baltimore: John Hopkins University Press.
- Morse, R. A. & Calderone, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture Magazine* 128, 1-14.

- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2010). *Imunobiologia de janeway*, 7 edn. Porto Alegre: Artmed.
- Ooi, J. Y., Yagi, Y., Hu, X. & Ip, Y. T. (2002). The drosophila Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO Rep* **3**, 82-87.
- Raetz, C. R. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**, 635-700.
- Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurière, C., Faucon, J. P. & Pépin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**, 339-351.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R. & Derisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, nosema, and crithidia. *PLoS One* **6**, e20656.
- Seki, M., Yanagihara, K., Higashiyama, Y., Fukuda, Y., Kaneko, Y., Ohno, H., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Tomono, K. & other authors (2004). Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *European Respiratory Journal* **24**, 143-149.
- Servant, F., Bru, C., Carrère, S., Courcelle, E., Gouzy, J., Peyruc, D. & Kahn, D. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics* **3**, 246-251.
- Shia, A. K., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A. N., Reichhart, J. M. & Ligoxygakis, P. (2009). Toll-dependent antimicrobial responses in Drosophila larval fat body require Spatzle secreted by haemocytes. *J Cell Sci* **122**, 4505-4515.
- Stoltz, D., Shen, X. R., Boggis, C. & Sisson, G. (1995). Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* **34**, 153-160.
- Tanji, T. & Ip, Y. T. (2005). Regulators of the Toll and Imd pathways in the Drosophila innate immune response. *Trends Immunol* **26**, 193-198.
- Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J. & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol* **99**, 117-119.

- Teixeira, M. M., Almeida, I. C. & Gazzinelli, R. T. (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* **4**, 883-886.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E. & Bergoin, M. (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7185-7191.
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L. & Gay, N. J. (2003). Binding of the drosophila cytokine spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* **4**, 794-800.
- Wilson, E. O. (1971). *The insect societies*. Cambridge. MA: Belknap Press.
- Yue, C. & Genersch, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* **86**, 3419-3424.
- Zambon, R. A., Nandakumar, M., Vakharia, V. N. & Wu, L. P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7257-7262.

CAPÍTULO IV

INFECÇÃO VIRAL: ANÁLISE PRELIMINAR DO PROTEOMA DIFERENCIAL

Resumo

Várias metodologias são utilizadas para identificar e quantificar os diferentes patógenos que acometem as abelhas. Avaliamos por meio da análise por gel bidimensional SDS-PAGE, a expressão de proteínas em abelhas infectadas com o vírus da asa deformada (DWV) e co-infectadas com o vírus da paralisia aguda (ABPV). Os resultados preliminares mostraram que houve alteração no perfil protéico quando comparadas abelhas não infectadas e infectadas, com aumento de transcritos nas infectadas e co-infectadas pelos vírus.

Palavras-chave: Proteoma diferencial, Vírus, Abelha.

Abstract

Several tools are used to identify and quantify the different pathogens that attack the bees. We evaluated gene expression in infected bees with deformed wing virus (DWV) and bees co-infected with acute bee paralysis virus (ABPV) by analyzing two-dimensional gel SDS-PAGE. The preliminary results showed that there was a change in protein profile when compared to uninfected bees, with an increase of transcripts between bee infected and co-infected by the virus.

Keywords: Differential proteomics, Virus, Bee.

1. Introdução

A detecção dos diferentes vírus que vem acometendo as abelhas é realizada por uma variedade de técnicas moleculares; entre elas a reação em cadeia da polimerase – PCR, simples ou multiplex, é habitualmente usada pelos pesquisadores para um diagnóstico rápido (Blanchard *et al.*, 2008; Kukielka, 2010; Nielsen, 2008; Teixeira *et al.*, 2008).

Outras técnicas para identificação de vírus também usadas são a PCR em tempo real (Chantawannakul *et al.*, 2006; Maori *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010), o teste de imunodifusão em gel de agarose (AGID) (Ribiére *et al.*, 2002) e a hibridização in situ de fluorescência (FISH) (Mockel *et al.*, 2011) que, normalmente estão associadas a RT-PCR, além de técnicas sorológicas como Elisa (Shen *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2007).

Com o objetivo de se obter resultados múltiplos e acurados, além de poupar tempo, técnicas como *microarray* estão sendo usadas para identificar vários vírus ao mesmo tempo (Zhang *et al.*, 2010). Glover e colaboradores (2011) fazendo uso dessa técnica detectaram nove vírus.

As novas técnicas de sequenciamento abrem caminhos para a definição rápida e precisa de genomas e transcriptomas. Runckel e colaboradores (2011), utilizando o sequenciador *Illumina Genome Analyzer II* encontraram quatro novos vírus em *Apis mellifera*, *Aphid Lethal Paralysis Virus* (ALPV), *Big Sioux River Virus* (BSRV), *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1) e 2 (LVS-2).

Esta geração de ferramentas moleculares contribui com novas abordagens de estudos transcricionais, para entendimento da expressão gênica diferencial em abelhas infectadas (Johnson *et al.*, 2009; Navajas *et al.*, 2008).

Estudos que abordem análise da expressão gênica a nível pós tradicional ainda são poucos (Bromenshenk *et al.*, 2010; Foster, 2011). Esse trabalho analisou o proteoma diferencial de abelhas *A. mellifera* infectadas com o vírus da asa deformada (DWV) e co-infectadas com o vírus da paralisia aguda (ABPV).

2. Material e Métodos

2.1. Material Biológico

O material biológico analisado foram as abelhas *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) coletadas em diferentes regiões do Estado do Tocantins e em Uberlândia, Minas Gerais. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Genética e de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e o sequenciamento, na Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2. Extração de proteína e RNA

Foi macerado em nitrogênio líquido um grupo de 5 abelhas para extração concomitante de RNA e proteína. Extraiu-se RNA de metade do macerado pelo método do Trizol (INVITROGEN), segundo recomendações do fabricante. O RNA total foi ressuspensiondo em água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato 0,1%. Para eliminar contaminantes RNA foi tratado pelo Kit RQ1 DNase (PROMEGA), seguida por quantificação em espectrofotômetro NANODROP (ND-1000). O material foi armazenado em ultrafreezer -80°C até o momento do uso.

2.3. Extração de proteína

A outra metade do macerado (item 2.2) foi utilizada para a extração protéica dos seguintes grupos: controle (C), infecção por DWV (D) e co-

infecção por ABPV/DWV (AD). Os macerados foram reconstituídos em tampão de extração para proteína total (Tris-HCl 20mM pH7,2, EDTA 10mM, EGTA 2mM, sacarose 250mM, DTT 1mM, Benzamidina 1mM). Posteriormente, foram submetidos à centrifugação a 15000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado, novamente centrifugado por 2 minutos, sendo o sobrenadante desta última centrifugação considerado o extrato de proteínas solúveis totais.

A dosagem protéica foi realizada pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro Hitach U-2000 e a concentração média dos extratos de proteína foi determinada a partir de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina. Os extratos foram então armazenados em alíquotas contendo 500 µg de proteína total a -80°C para posterior análise em gel bidimensional.

2.4. Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1µg de RNA utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (USB), segundo recomendações do fabricante. O gene *rp49* (GenBank AF441189), codificador de proteína ribossomal, foi utilizado para testar a qualidade do DNA complementar (cDNA).

2.5. PCR para diagnóstico viral

Sete vírus de RNA foram analisados por meio de *primers* específicos desenhados para cada tipo de vírus como segue a Tabela I.

Tabela I: Sequências dos *primers* de genes de vírus de RNA, temperatura de anelamento (T.A.), fragmento esperado em pares de base e referências.

Vírus	Sequência do primer 5' – 3'	T.A. (°C)	Fragmento esperado (pb)	Referências
DWV	F - GAGATTGAAGCGCATGAACA	54	129	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - TGAATTCACTGTCGCCATA			
ABPV	F - TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA	54	500	Teixeira <i>et al.</i> , 2008
	R - AATCATCATTGCCGGCTCTA			
BQCV	F - TGGTCAGCTCCCACTACCTAAACI	54	700	Benjeddou <i>et al.</i> , 2001
	R - GCAACAAGAAGAACGTAAACCACI			
CBPV	F - AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG	55	455	Ribiére <i>et al.</i> , 2002
	R - TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG			
SBV	F - GGATGAAAGGAAATTACCAAG	56	426	(Tentcheva <i>et al.</i> , 2004)
	R - CCACTAGGTGATCCACACT			
KBV	F - GATGAACGTCGACCTATTGA	55	414	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
	R - TGTGGGTTGGCTATGAGTCA			
IAPV	F - AGACACCAATCACGGACCTCAC	58	457	Maori <i>et al.</i> , 2007
	R - AGATTGTCTGTCTCCAGTGCACAT			

A amplificação para os diferentes vírus foi padronizada para um volume final de 20 µL com as seguintes concentrações: 10 pmol de primer, 0,2 mM de dNTP, 1X tampão da enzima e 1U de Taq polimerase (Ludwing Biotec). As condições da reação de PCR foram padronizadas para os diferentes vírus sendo 2 min a 95°C de etapa inicial, seguido de 35 ciclos de amplificação (30s a 95°C, 1 minuto a T.A.°C e 1 minuto a 72°C) e 10 minutos a 72°C para completar a polimerização. Somente a temperatura de anelamento (T.A.°C) foi variável entre as reações, como mostrado na Tabela I.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em fotodocumentador (IMAGEQUANT 150, GE). A migração dos fragmentos foi acompanhada por marcador de peso molecular de 100pb (INVITROGEN).

2.6. Eletroforese Bidimensional em Gel SDS-PAGE

Para a análise em gel bidimensional, 500 µg do extrato protéico entre os grupos analisados (C, D e AD) foram precipitados com o Kit 2-D Clean-up (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Os precipitados secaram por, no máximo, 10 minutos e foram imediatamente ressuspensos em 200 µL tampão de re-hidratação (6M uréia; 2M Thiouréia; 2% ASB-14 (p/v); 15 mM DTT; 0,002% azul de bromofenol 1%) acrescidos de 0,5% (v/v) de tampão IPG, pH 3-10 (GE Healthcare). A re-hidratação foi realizada em bandeja do sistema IPGPhor III (GE Healthcare) durante a noite. Foram utilizadas tiras de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip) com faixa de pH 3-10 e 11 cm de comprimento (GE Healthcare). Após a re-hidratação, as tiras foram submetidas à focalização isoelétrica (IEF) no sistema IPGPhor III (GE Healthcare), em um programa com total de 20933 V/h.

As tiras focalizadas foram equilibradas em duas fases, em 5 mL de solução de equilíbrio por 15 minutos (1,5M Tris-HCl pH 8,8; 6M Uréia; 30% Glicerol; 2% w/v SDS; 0,002% azul de bromofenol 1% w/v). Na primeira fase foram adicionados 10 mg/mL de DTT (USB) à solução de equilíbrio e na

segunda foram adicionados 25 mg/mL de iodocetomida (Sigma). As tiras foram submetidas, posteriormente, à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% (GE Healthcare) no sistema Multiphor II, de acordo com o programa sugerido pelo manual do fabricante. O padrão de massa molecular utilizado foi o Sigma marker S8445 (Sigma Aldrich).

Os géis foram corados com Comassie Blue coloidal (2% (w/v) Coomassie G-250), por 72 horas, descorados com água destilada e mantidos em água até digitalização.

A digitalização dos géis foi feita no scanner Image Scanner (GE Healthcare), utilizando-se o programa Image Master LabScanTM v 5.0 (com resolução de 300 dpi). As análises foram feitas visualmente e também pelo programa Image Master 2D Platinum v 6.0 (GE Healthcare), conforme recomendações do manual. Os spots diferenciais foram recordados dos géis e enviados para análise de espectrometria de massa na Universidade Federal de Minas Gerais.

3. Resultados e Discussão

Entre as 19 abelhas coletadas em Uberlândia, 17 foram positivas para DWV e nove positivas para ABPV. Um total de 89,5% das abelhas encontrava-se infectadas, com 47,4% apresentando co-infecção pelos vírus. Após seleção de indivíduos controle e infectados foi feito o proteoma diferencial.

A eletroforese bidimensional em gel SDS-PAGE mostrou diferença de expressão no padrão de proteína total entre o grupo controle (C) (Figura 1), infectados com DWV (D) (Figura 2) e co-infectados com ABPV e DWV (AD) (Figura 3).

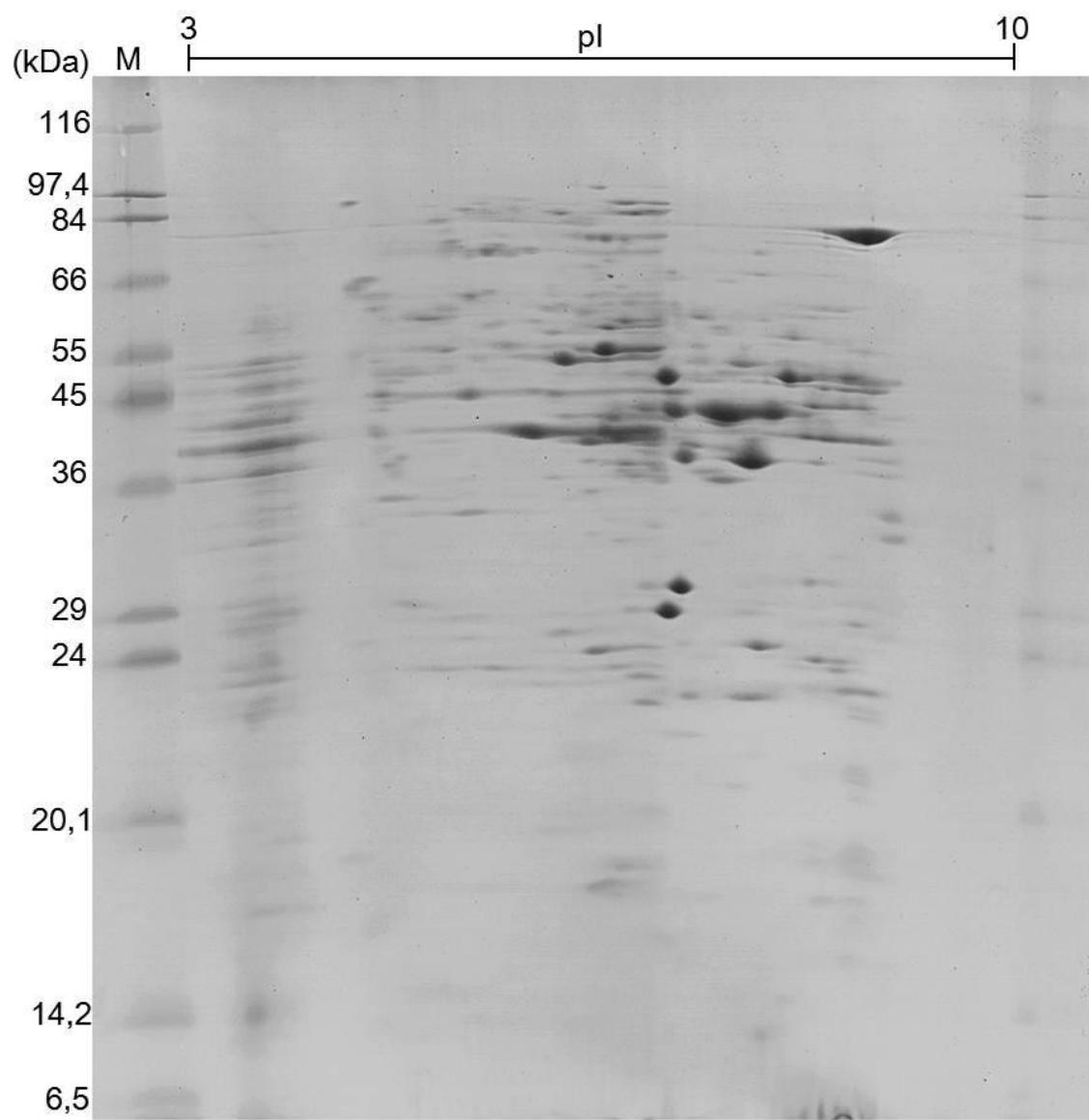


Figura 1 – Perfil de proteína total presente em abelhas não infectadas com vírus (Controle). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pl de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA).

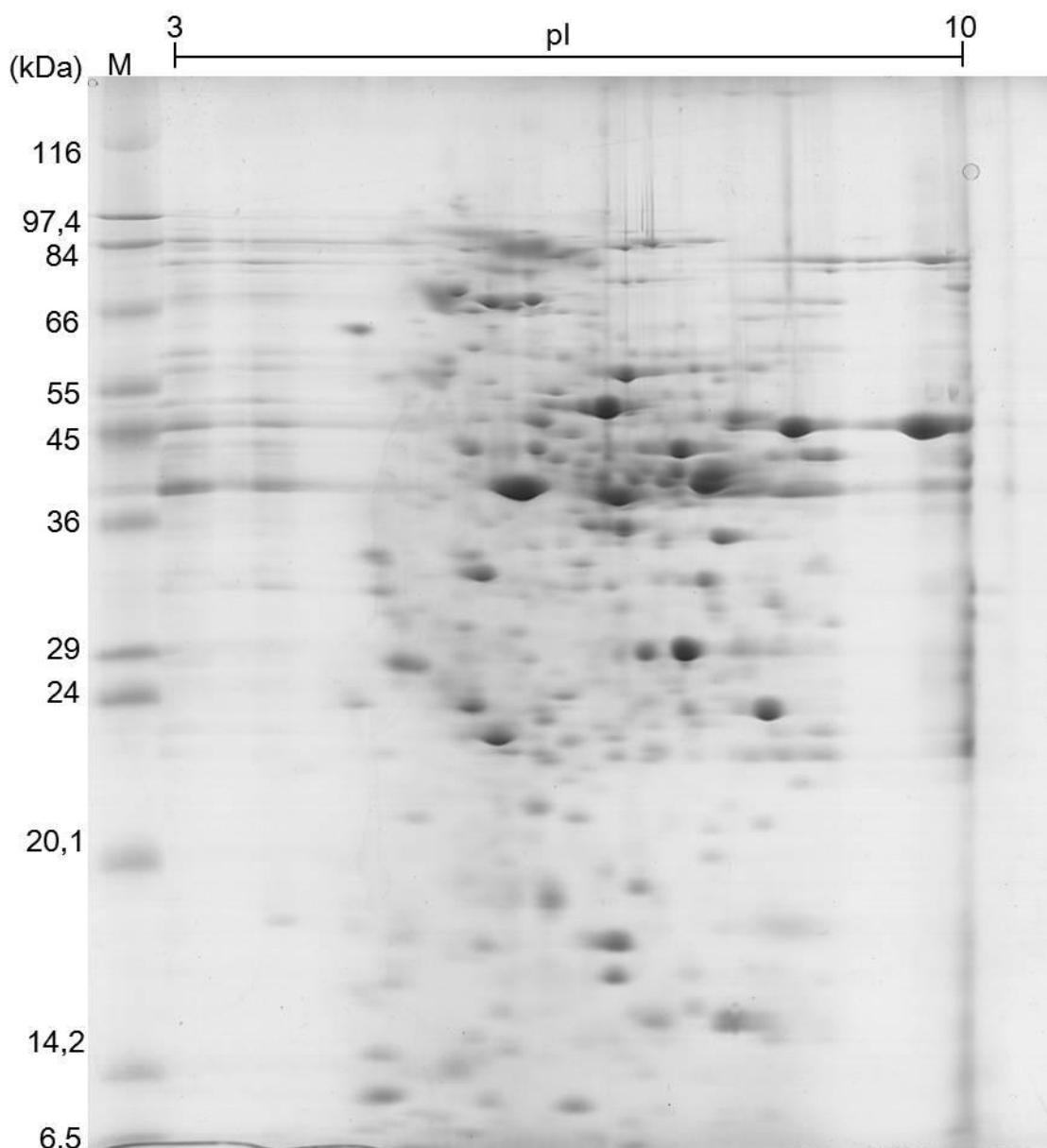


Figura 2 – Perfil de proteína total presente em abelhas infectadas com vírus da Asa deformada (DWV). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pI de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA).

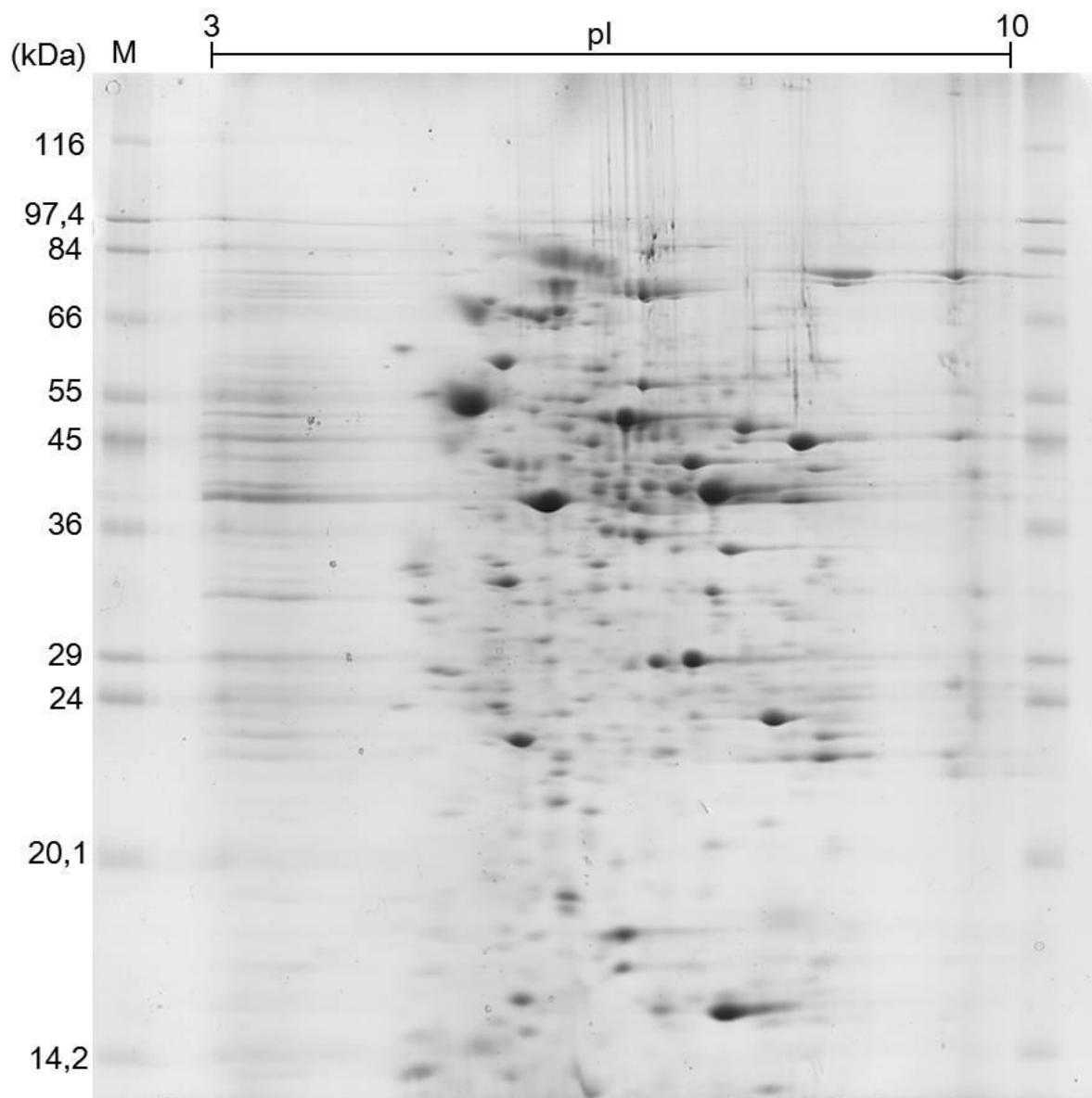


Figura 3 – Perfil de proteína total presente em abelhas co-infectada com vírus da Paralisia aguda (ABPV) e da Asa deformada (DWV). Gel bidimensional SDS-PAGE 12,5%, com variação de pl de 3 a 10, corado com Comassie Blue coloidal. M – Padrão de massa molecular (SIGMA).

A análise do proteoma através do programa Image Master 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare) mostrou 89 *spots* bem definidos para o grupo Controle, 132 *spots* para as abelhas infectadas com DWV, com aumento de 60% na

expressão de proteínas. Para as abelhas co-infectadas com ABPV e DWV, 178 *spots* foram selecionados, com aumento de 74% das proteínas em relação ao Controle.

Os géis mostram que houve aumento da expressão de proteínas nos indivíduos infectados e co-infectados em relação ao Controle, sugerindo que o sistema imune da abelha respondeu à infecção com aumento da expressão protéica.

Não é possível inferir nada concreto até que todos os resultados de espectrometria de massa em andamento e análise de bioinformática sejam realizados. Esses resultados representam um passo significativo para melhor entendimento, a nível molecular, de como o organismo das abelhas se comporta frente a uma infecção viral.

4. Referências Bibliográficas

- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M. & Davison, S. (2001). Detection of Acute bee paralysis virus and Black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2384-2387.
- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnu del, P., Thiery, R., Faucon, J. P. & Ribiere, M. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **99**, 348-350.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A. & other authors (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* **5**, e13181.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N. & Brown, M. (2006). A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol* **91**, 69-73.
- Foster, L. J. (2011). Interpretation of data underlying the link between colony collapse disorder (CCD) and an invertebrate Iridescent virus. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 006387.
- Glover, R. H., Adams, I. P., Budge, G., Wilkins, S. & Boonham, N. (2011). Detection of honey bee (*Apis mellifera*) viruses with an oligonucleotide microarray. *J Invertebr Pathol*.
- Johnson, R. M., Evans, J. D., Robinson, G. E. & Berenbaum, M. R. (2009). Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14790-14795.

- Kukielka, D., Sánchez-Vizcaíno, M. (2010). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Spanish honeybees. *Spa J Agricul Res* **8**, 308-311.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. & Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* **88**, 3428-3438.
- Mockel, N., Gisder, S. & Genersch, E. (2011). Horizontal transmission of Deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J Gen Virol* **92**, 370-377.
- Navajas, M., Migeon, A., Alaix, C., Martin-Magniette, M., Robinson, G., Evans, J., Cros-Arteil, S., Crauser, D. & Le Conte, Y. (2008). Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics* **9**, 301.
- Nielsen, S. L., Nicolaisen, M., Kryger, P. (2008). Incidence of Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus, Chronic bee paralysis virus, Deformed wing virus, Kashmir bee virus and Sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *39*, 310-314.
- Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurière, C., Faucon, J. P. & Pépin, M. (2002). Molecular diagnosis of Chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**, 339-351.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R. & Derisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, nosema, and crithidia. *PLoS One* **6**, e20656.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol* **86**, 2281-2289.
- Singh, R., Levitt, A. L., Rajotte, E. G., Holmes, E. C., Ostiguy, N., Vanengelsdorp, D., Lipkin, W. I., Depamphilis, C. W., Toth, A. L. & other

- authors (2010). RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* **5**, e14357.
- Stoltz, D., Shen, X. R., Boggis, C. & Sisson, G. (1995). Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* **34**, 153-160.
- Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J. & Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol* **99**, 117-119.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E. & Bergoin, M. (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7185-7191.
- Todd, J. H., De Miranda, J. R. & Ball, B. V. (2007). Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* **38**, 354-367.
- Zhang, Y., Liu, X., Zhang, W. & Han, R. (2010). Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *J Insect Physiol* **56**, 1207-1218.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões gerais

1. O Tocantins, Estado da região norte do Brasil, encontra-se contaminado com o vírus da paralisia aguda (ABPV) e da asa deformada (DWV);
2. A expressão do gene *AmToll-1* aumenta significativamente em abelhas co-infectadas com o vírus ABPV/DWV quando comparadas a abelhas sem infecção;
3. Infecção viral modula resposta no sistema imune, via *Toll*, em *Apis mellifera*;
4. O perfil protéico em abelhas infectadas com o vírus DWV e co-infectadas com o vírus ABPV e DWV apresentou uma maior expressão em relação ao perfil de abelhas não infectadas;