



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

Sistema imune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Aluna: ISABEL MARQUES RODRIGUES AMARAL

ORIENTADOR: Prf. Dr. Carlos Ueira Vieira / UFU

**UBERLÂNDIA – MG
2009**



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

Sistema imune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Aluna: ISABEL MARQUES RODRIGUES AMARAL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira / UFU

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

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

UBERLÂNDIA – MG

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- A485s Amaral, Isabel Marques Rodrigues, 1984-
 Sistema imune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera,
Apidae, Meliponini) / Isabel Marques Rodrigues Amaral. - 2009.
 78 f. : il.
- Orientador: Carlos Ueira Vieira.
 Co-orientador: Ana Maria Bonetti.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Genética molecular - Teses. 2. Abelha - Imunologia - Teses. I.
I. Vieira, Carlos Ueira. II. Bonetti, Ana Maria. III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
IV. Título.

CDU: 577.21



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

Sistema imune inato em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Aluna: ISABEL MARQUES RODRIGUES AMARAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Data da defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UBERLÂNDIA – MG



DEDICATÓRIA

A Deus,

*por me amparar com carinho nos momentos de dor e me ouvir
cada dia com paciência. Guiando-me no trilhar da vida com muito
amor.*

À minha querida família,

*Edvaldo, Edna, Guilherme e Gilberto, por seu amor
incondicional. Por me ensinarem que na vida é preciso lutar muito e
que apesar dos tropeços constantes no final de cada jornada há uma
recompensa maravilhosa. Amo muito vocês.*

Ao Gustavo,

*meu namorado amado, pessoa única e iluminada. Alvo de
todo o meu amor e presente em todos os meus sonhos!*

Dedico.

“Caminhando, não tenha medo de tropeçar. Tropeçando, não tenha medo de ferir. Ferindo-se, tenha coragem para corrigir algumas rotas de sua vida, mas não pense em recuar. Para não recuar, nunca deixe de amar o espetáculo da vida, porque, ao amá-lo, ainda que o mundo desabe você jamais desistirá de caminhar.

A vida é simplesmente um espetáculo imperdível, uma aventura indescritível.”

Augusto Cury



AGRADECIMENTOS

Estou chegando ao fim de mais uma etapa em minha vida, foram momentos custosos, mas também de muitas alegrias, descobertas e muito aprendizado. Durante todo esse trajeto muitas pessoas estiveram a minha volta, me apoiando, animando, ensinando e quando necessário fazendo críticas construtivas. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu conseguisse chegar ao fim dessa jornada, espero não esquecer de citar algum amigo, aproveito esta ocasião para formalmente expressar meus sinceros e profundos agradecimentos.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Carlos pela orientação durante todo meu trabalho. Quero aproveitar para deixar o meu: Muito Obrigada por ter sempre me ajudado e por participar do meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço por todo carinho e amizade.

Agradeço a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti pelos meus primeiros passos pelo caminho da investigação científica e por toda a ajuda na correção da dissertação.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr pela inspiração e paixão pelo fascinante mundo da pesquisa.

À minha família que sempre esteve do meu lado, apoiando minhas decisões, mesmo quando eu mesma não sabia qual decisão tomar! Ao seu apoio incondicional... Muito obrigada!

Ao meu namorado, Gustavo, companheiro e amigo que me acompanha nesse fascinante mundo do pesquisar, por sua paciência, compreensão e apoio em todos os momentos. Sem sua ajuda eu não teria conseguido. Muito obrigada!!! E com certeza, meu amor, a distância pode separar dois olhares mais jamais dois corações. PS: Te amo cada vez mais...

Ao Prof. Dr. Rodrigo Aparecido Fernandes Redondo por não medir esforços para ajudar quando solicitado e, também, pelos conselhos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti do Laboratório de Histologia – UFM e ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Gourllart do Laboratório de Nanobiotecnologia, por deixarem suas portas sempre abertas.

Aos secretários Gerson e Marlene, pelas informações fornecidas durante todo o curso.

Aos amigos do laboratório, João Felipe, Tininha, Alessandra, Rafa, Denis, Boscolli, Lú, Ana Carolina, Flávia e Fernando que carrego em meu coração para sempre. Foram excelentes momentos juntos, muitas alegrias e risadas.

As minhas amigas Loiva, Dani, Lorena e Mariana que mesmo não entendendo nada de abelhas, sempre me apoiaram.

Ao meu amigo Azul, que mesmo distante sempre será um grande amigo.

As minhas amigas Jú e Tata pelas gargalhadas, pelo carinho e amizade.

Aos colegas de departamento que mesmo em conversas rápidas de corredor pudemos trocar muitas experiências e palavras amigas.

À Universidade Federal de Uberlândia, Capes, CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro.

A todos que fazem parte da minha vida, fundamentais sem exceção, cada qual à sua maneira, por perto ou distantes fisicamente, por acreditarem em mim, pelo afeto, enriquecimento moral, intelectual e espiritual, além da imensa diversão que me proporcionam. O que sou também é um pouco de cada um de vocês!

Muito obrigada!



SUMÁRIO

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Abelhas sem ferrão.....	4
2. Sistema Imune em Insetos.....	7
2.1. Imunidade celular	9
2.2. Imunidade humoral	11
3. Referências Bibliográficas.....	15

CAPÍTULO II - CÉLULAS DA HEMOLINFA EM *MELIPONA SCUTELLARIS* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

1. Resumo.....	22
2. Abstract.....	22
3. Introdução	23
4. Material e Métodos	24
5. Resultados	26
6. Discussão	34
7. Referências Bibliográficas.....	37

CAPÍTULO III - CLONAGEM PARCIAL, SEQUENCIAMENTO E EXPRESSÃO DO GENE *TOLL* EM *MELIPONA SCUTELLARIS* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

1. Resumo.....	42
2. Abstract.....	42
3. Introdução	43
4. Material e Métodos	44
5. Resultados	50
6. Discussão	57
7. Referencias Bibliográficas.....	60

Lista de Figuras e Tabelas

Capítulo I	Páginas
Figura 1: Distribuição da abelha sem ferrão, <i>Melipona scutellaris</i>	7
Figura 2: Modelo das vias de expressão de peptídeos antimicrobianos em <i>Drosophila</i>	13
Capítulo II	
Figura 1: Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de <i>Melipona scutellaris</i>	27
Figura 2: Contagem total de hemócitos (THC) (A), peso corporal (B) e THCg (C) durante o 3º instar larval de <i>M. scutellaris</i>	28
Figura 3: Hemócitos presentes na hemolinfa de <i>M. scutellaris</i> com coloração Giemsa	31
Figura 4: Contagem diferencial (DHC) dos hemócitos em todos os estágios do último instar larval de <i>M. scutellaris</i>	32
Figura 5: Morfologia de hemócitos vivos de <i>M. scutellaris</i> por microscopia contraste de fase	33
Figura 6: Ensaio de fagocitose com <i>beads</i> fluorescentes com células da hemolinfa de <i>M. scutellaris</i>	33
Capítulo III	
Tabela 1: Fases de desenvolvimento de <i>Melipona scutellaris</i>	45
Figura 1: RT-PCR semiquantitativo dos fragmentos dos genes <i>MsToll</i> e <i>MsRP49</i>	50
Figura 2: Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos das cds parciais da proteína ribossomal (RP49) e do receptor Toll de <i>M. scutellaris</i> com mRNA da RP49 e <i>Toll</i> de <i>Apis mellifera</i>	51
Figura 3: Análise de domínio do fragmento seqüenciado do cDNA da RP49 de <i>M. scutellaris</i> utilizando o programa ProDom e <i>Search Conserved Domains on a Protein</i>	52
Figura 4: Análise de domínio do fragmento parcial <i>MsToll</i> utilizando o programa ProDom, <i>Search Conserved Domains on a Protein</i> (NCBI) e Prosite	53
Figura 5: Alinhamento da seqüência parcial da proteína <i>MsToll</i> com outras proteínas Toll de insetos, utilizando o resultado do programa ClustalW	54

Figura 6: Perfil de expressão do gene <i>MsToll</i> em larvas, pupas e adultos de <i>Melipona scutellaris</i>	55
Figura 7: Transcritos do <i>MsToll</i> (cds parcial) em tecidos de <i>Melipona scutellaris</i>	56
Figura 8: Quantificação do mRNA do gene <i>MsToll</i> por PCR Tempo Real	56

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celcius

mg – Miligramas

µg – Microgramas

mL – Mililitro

µL – Microlitro

M – Molar

µm – Micromolar

pmol – Picomol

nm – Nanômetros

pb – Pares de Base

min – Minutos

h – Hora

s – Segundos

g – Gravidade padrão

U – Unidade

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

PBS – Tampão Fosfato Salino

BSA – Soroalbumina bovina

EDTA – Ácido
etilenodiaminotetracético

DEPC – Dietil Pirocarbonato

Dnase -- Desoxirribonuclease

Rnase -- Ribonuclease

RNA – Ácido Ribonucléico

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico
complementar

mRNA – RNA mensageiro

dNTP – Dinucleotídeo trifosfato

RT – Transcrição Reversa

PCR – Reação em cadeia da
Polimerase

qPCR – PCR em Tempo Real

ufc – unidade formadora de colônia



APRESENTAÇÃO

O sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais os organismos se defendem de invasores. Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do antígeno, quer seja um organismo agressor (patógeno) ou outro material estranho e, em segundo lugar, uma reação direcionada a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. Existem duas categorias de resposta imune: a inata ou não-específica e a adaptativa ou específica. Nos invertebrados a resistência a doenças se baseia no sistema inato de defesa, que inclui uma série de reações celulares e humorais coordenadas. Nessas reações, os hemócitos, células circulantes da hemolinfa, atuam de várias maneiras. Na presença de pequenos organismos, como as bactérias, os hemócitos realizam a fagocitose. Quando o número de bactérias é elevado ou quando parasitas maiores são os responsáveis pela infecção, grupos de hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em torno dos organismos invasores, provocando a morte deles por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas que são liberadas no interior dos nódulos ou cápsulas. Para combater a infecção, receptores de reconhecimento padrão (PRR) identificam padrões moleculares presente nos patógenos e são produzidos peptídeos antimicrobianos. Dentre os PRR, nos insetos, destaca-se um conjunto de receptores denominados de receptores do tipo Toll, receptores transmembrânicos com um domínio extracelular contendo regiões ricas em leucinas e um domínio intracelular similar ao do Receptor Interleucina-1. O gene *Toll* foi identificado em embrião de *Drosophila* por seu papel no estabelecimento do eixo dorso-ventral e, posteriormente, verificou-se estar envolvido na resposta imune de moscas adultas.

O presente trabalho foi desenvolvido em três capítulos, o primeiro apresenta uma fundamentação teórica, revisão de literatura sobre abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris* e imunidade nos insetos. O segundo capítulo apresenta os resultados da caracterização da população de hemócitos no 3º instar larval de *M. scutellaris*, enfocando as principais células da hemolinfa envolvidas no processo de fagocitose. Estudo sobre o sistema imunológico em abelha sem ferrão *M. scutellaris* foi o enfoque do terceiro capítulo, em que foi verificada a expressão de um receptor Toll durante o desenvolvimento completo dessa abelha.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Capítulo I

1. Abelhas sem ferrão

Os insetos da ordem Hymenoptera constituem um grupo bastante diversificado em hábitos e comportamentos. Nesse grupo, destacam-se as abelhas em função da complexidade em sua organização social. Existem aproximadamente 20.000 espécies de abelhas habitando toda parte do mundo onde há angiospermas, para as quais são valiosos polinizadores favorecendo a reprodução sexuada e, por consequência, a variabilidade genética da maioria das plantas floríferas. Dessa ação polinizadora depende, também, a produção de frutos e sementes que sustentam populações incontáveis de outras espécies (Michener, 2000; Silveira et al., 2002).

As abelhas sem ferrão pertencem ao Reino Animalia; Filo Arthropoda; Classe Insecta; Ordem Hymenoptera; Subordem Aprocrita; Superfamília Apoidea; Família Apidae; Subfamília Meliponinae; Tribo Meliponini, tribo que inclui todas as “abelhas indígenas sem ferrão” e apresenta ampla distribuição nas regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul (Michener, 2000). Segundo esse autor foram descritas cerca de 380 espécies dentro de 23 gêneros, sendo o Brasil um dos principais locais de ocorrência dessas abelhas. Dentre os meliponídeos, *Melipona* é o gênero com maior número de espécies, aproximadamente 70, com ocorrência em toda a região neotropical, distribuindo-se desde o México até a Argentina sendo mais diversificada na bacia amazônica (Silveira et al., 2002; Camargo e Pedro, 2007).

Todas as espécies de Meliponinae são eussociais, com interações sociais complexas e um sistema cooperativo em que a divisão de trabalho e as castas são bem definidas. A divisão geral do trabalho nas operárias de meliponídeos se modifica de acordo com a idade e com as necessidades da colônia. Nas primeiras horas de nascimento as abelhas realizam a limpeza corporal, mas a maior parte do tempo permanecem imóveis sobre os favos de cria. No 9º dia as operárias manipulam cera raspando as células; um mesmo grupo constrói células de cria, participa no processo de postura e aprovisionamento das células, isto é, descarga do alimento larval. A partir do 14º dia são lixeiras internas e após o 25º dia são guardas, receptoras de néctar, desidratadoras de néctar, ventilam a colméia e saem para o campo em busca de pólen, néctar, barro, resina e, raramente, água.

Dentro do ninho as operárias estão continuamente construindo novas células de cria, formando favos horizontais ou, dependendo da espécie, em cachos. A rainha e os machos não tomam parte deste processo. A rainha, além de sua função reprodutiva, também mantém a coesão da colônia, por meio de atos ritualizados com as operárias e pela liberação de feromônios. A principal função dos machos de meliponíneos é de copular com as rainhas jovens; em algumas espécies os machos produzem cera e trabalham com ela e, em algumas espécies, também podem desidratar o néctar (Kerr et al., 1996).

As fêmeas das abelhas eussociais são divididas em duas castas: rainhas que são fêmeas férteis, responsáveis pela postura da maioria dos ovos, não apresentam comportamento de coleta de alimento e operárias, fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis pela alimentação da cria e da rainha, coleta de alimento, limpeza, construção de alvéolos de cria e demais partes do ninho, defesa e, em alguns casos, postura de ovos que darão origem a machos (ovos reprodutivos) ou ovos que servirão de alimento (ovos tróficos) à rainha (Velthuis et al., 2003).

A dieta na fase larval pode ser considerada um ponto crítico na determinação de castas nos himenópteros. Em *Apis mellifera* (Apini), as larvas são alimentadas continuamente durante o desenvolvimento larval, e as larvas que se tornarão rainhas ou operárias durante os três primeiros dias, após a eclosão do ovo recebem uma secreção glandular rica em proteínas (geléia real). Nos estágios larvais finais (quarto e quinto), este tipo de alimento é fornecido em grandes quantidades apenas para as larvas que darão origem às rainhas, enquanto que as larvas destinadas às operárias são nutridas com uma mistura de secreção glandular, mel e pólen (Beetsma, 1985). No gênero *Trigona* (Meliponini) é, principalmente, a quantidade de alimento recebido pela larva que desencadeia a determinação de castas (Camargo, 1972; Campos, 1979). Em *Frieseomelita varia* (Meliponini) o estímulo alimentar é o principal fator que sinaliza para a produção de rainha e uma larva pré-defecante que ingeriu, além das provisões de sua própria célula, o alimento de célula vizinha, diferencia-se em rainha (Terada, 1979; Faustino et al., 2002). Nas abelhas sem ferrão, do gênero *Melipona* a assistência das nutridoras, fornecendo alimento de modo progressivo para as larvas, não ocorre. Nessas abelhas, as operárias constroem as células de cria,

onde, em seguida, armazenam, sem distinção, uma massa alimentar sobre a qual será colocado o ovo pela rainha fisogástrica e após a oviposição, as operárias fecham as células de cria (Zucchi et al., 1999). Os meliponídeos constituem uma exceção ao mecanismo de determinação rainha/operária via modulação da quantidade de alimento dispensado às larvas. Além de conterem o mesmo alimento, as células de cria apresentam o mesmo tamanho, independente do tipo de larva que irá se desenvolver, ou seja, se dará origem à rainha, operária ou macho (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990).

Em 1948, Kerr sugeriu um controle genético-alimentar para determinação de castas em meliponídeos. Esse modelo propõe que a determinação das castas ocorre por mecanismo que associa a quantidade de alimento (fator ambiental). Rainha e operária de abelhas *Melipona* são divergentes em morfologia, fisiologia e comportamento e, segundo a hipótese Kerr, isso seria devido a dois genes, x^a e x^b , com dois alelos cada um, x^a_1 , x^a_2 e x^b_1 , x^b_2 , agindo no 3º instar larval (terço final de L3 até metade de LPD) juntamente com quantidade suficiente de alimento ingerido pelo indivíduo. Homozigose para um desses genes ou ambos produz operária, independente da quantidade de alimento recebida pela larva, enquanto que a dupla heterozigose ($x^a_1 x^a_2$; $x^b_1 x^b_2$) leva a diferenciação em rainha desde que a larva receba alimentação suficiente (Kerr, 1948; Kerr, 1950; Kerr e Nielsen, 1966; Kerr, 1974). A diferenciação de castas em *Melipona* deve-se, pois a interação entre genética (genes x^a e x^b) e ambiente (alimento), sendo que em colméias em boas condições até 25% das fêmeas são rainhas (Bonetti, 1982; Bonetti e Kerr, 1985).

A abelha sem ferrão, popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, que se constitui no objeto de estudo desse trabalho, pertence à espécie *Melipona scutellaris* e tem se mostrado um excelente material biológico para análises genéticas devido ao seu mecanismo peculiar de determinação de castas por fatores genético-alimentares, o que difere do padrão apresentado por outros Apidae (Bonetti, 1983; Bonetti, 1992). No Brasil, *M. scutellaris* ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (Figura 1) (Camargo e Pedro, 2007).



Figura 1: Distribuição da abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*. Em destaque, Estados do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe) de ocorrência natural de *M. scutellaris*. Fonte: Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region – online version Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jun 2009.

Os himenópteros estão amplamente disseminados e podem ser encontrados em diversos ambientes. Sua dispersão e sobrevivência dependem em grande parte do sucesso em se defenderem contra microorganismos e parasitas, sendo claro, portanto, que os invertebrados devam ter meios eficientes de reconhecer e combater microorganismos potencialmente perigosos (Silva Jr et al., 2000).

2. Sistema Imune em Insetos

Os seres vivos estão em constante contato com agentes potencialmente patogênicos e para evitar infecção contam com uma resposta imune eficiente. Os vertebrados possuem dois sistemas de defesa que são utilizados para combater e eliminar os organismos invasores: a imunidade inata e a adquirida. A imunidade adquirida ou adaptativa ocorre por meio de receptores que interagem com os antígenos, resultando na produção de anticorpos específicos. Uma característica importante da resposta imune adaptativa é a memória imunológica, isto é, a capacidade que o organismo possui de reconhecer determinado antígeno, algumas semanas ou mesmo anos, após a primeira infecção e responder mais rapidamente, em caso de nova exposição ao patógeno. Na imunidade inata não há dependência da ativação antígeno-receptor específica, não havendo, portanto,

a produção de anticorpos nem memória imunológica (Du Pasquier, 2001). Os invertebrados não possuem imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores, nem receptores de células T, ou seja, não produzem anticorpos específicos e por isso, não têm um verdadeiro sistema imune adaptativo, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas (*Ig-like protein*) tenham sido encontradas em alguns insetos (Wu et al., 2002). A resistência a doenças nos invertebrados se baseia no sistema inato de defesa, que inclui a síntese de peptídeos antimicrobianos, proteinases inibidoras, moléculas de adesão celular, ou seja, uma série de reações celulares e humorais coordenadas (Luo et al., 2003; Jiang, 2008).

Uma característica importante das sociedades de insetos é a habilidade de defender seu ninho. O comportamento agressivo-defensivo é importante para a sobrevivência do indivíduo e da espécie, por sua relação com a reprodução, obtenção de alimentos, defesa de território, defesa do indivíduo e seus descendentes. Os insetos estão, constantemente, competindo com uma grande variedade de patógenos. Este contato favoreceu a seleção de um complexo e eficiente sistema imunológico inato (Medzhitov e Janeway, 1997; Little et al., 2005; Wang e Ligoxygakis, 2006). A primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula, a qual é uma barreira estrutural e química capaz de prevenir ou retardar a entrada de patógenos no organismo, revestindo a superfície externa, porções inicial e final do tubo digestivo (intestinos anterior e posterior), espiráculos e sistema traqueal. A cutícula é composta basicamente de fibrilas de quitina (um polissacarídeo) imersas em uma matriz protéica. A sua camada mais externa (epicutícula) apresenta ceras com propriedades antimicrobianas. Ocorrendo a quebra dessa barreira, é ativada a síntese e secreção de peptídeos antimicrobianos, bem como a cascata da fenoloxidase, importante para neutralização de microorganismos e cicatrização (Gallo et al., 2002; Kavanagh e Reeves, 2004).

O sistema imunológico dos insetos caracteriza-se por mediar dois tipos de reações contra agentes estranhos: a reação humoral e a reação celular. A primeira é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e resulta, principalmente, da ação de proteínas. Entre as moléculas efetoras mais importantes do sistema humoral, estão os peptídeos

antimicrobianos, como as cecropinas e atacinas, responsáveis pela inibição da biossíntese de proteínas da membrana externa de bactérias e que são produzidas por diversos tecidos, inclusive o tecido adiposo. Os insetos liberam, também, oxigênio citotóxico e reativo e uma gama de outras moléculas de defesa, como lisozimas (enzimas relacionadas à despolimerização da parede celular). A resposta celular se refere à atividade dos hemócitos, células de defesa suspensas na hemolinfa (Armstrong, 1996; Gillespie et al., 1997; Nappi e Ottaviani, 2000; Schmidt et al., 2001; Tzou et al., 2002). Essas células apresentam morfologia e função variada, desempenhando ações como fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Lavine e Strand, 2002).

A defesa é importante, ainda, contra abelhas estranhas e predadores, como mamíferos, pássaros e insetos. Em mamangavas (*Xylocopa fenestrata*) a defesa consiste em uma secreção repelente e ataque com mandíbulas e ferrão. Um dos mecanismos para defesa mais comum entre as abelhas nativas, sem ferrão, é o hábito de enrolar-se nos pêlos dos seus agressores, beliscando a pele com as mandíbulas, grudando resina e tentando entrar em narinas e ouvidos (Campos e Peruquetti, 1999). Para a defesa é importante a comunicação. Há alarme sonoro em *Bombus* (mamangavas), *Melipona* e em *Apis*. Existem, ainda, substâncias de alarme, os feromônios, que alertam e estimulam a resposta eficaz de defesa, além de atrair outras operárias e marcar o predador.

2.1. Imunidade celular

A cavidade corporal dos insetos (hemocèle) é preenchida pela hemolinfa, um líquido composto por diferentes elementos celulares, os hemócitos e um complexo de substâncias químicas. A hemolinfa é análoga ao sangue dos vertebrados, tendo funções de nutrição, excreção, sinalização e defesa, porém, não desempenha função respiratória. Os hemócitos realizam resposta imune celular (fagocitose, nodulação e encapsulação), bem como a síntese de alguns elementos da resposta humoral, os quais, junto com fatores secretados por outros tecidos (corpo gorduroso, principalmente) têm acesso a diferentes partes do

organismo, ao circular pela hemolinfa, constituindo-se em elementos centrais da resposta imune (Klowden, 2002).

Os hemócitos são células versáteis e seu número e tipo é espécie específica e variam com a idade do inseto (Gupta, 1979; Götz e Boman, 1985). A classificação dessas células baseia-se em diferenças morfológicas, como características nucleares e citoplasmáticas (Barduco et al., 1988; Kurihara et al., 1992).

Uma revisão feita por Gupta (1985) tentou uniformizar a nomenclatura que era bastante heterogênea até a época. Disso resultou a caracterização de sete tipos principais de hemócitos: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos. Brehélin e Zachary (1986) propuseram uma classificação baseada em características ultraestruturais, resultando em nove tipos de hemócitos distintos: prohemócitos, plasmatócitos, oenocitóides, esferulócitos, trombocitóides e quatro tipos de células granulares.

Segundo uma revisão feita por Lavine e Strand (2002), os tipos mais comuns de hemócitos, registrados na literatura para os insetos, são denominados Prohemócitos, Plasmatócitos, Granulócitos e Esferulócitos.

Os hemócitos atuam reconhecendo organismos estranhos como bactérias e fungos. Quando ocorre uma infecção, a primeira forma de defesa realizada pelos hemócitos é a fagocitose. Esse mecanismo de defesa é, talvez, o mais eficiente contra muitos microorganismos patogênicos, porque pode ser acompanhado de outras respostas destrutivas, como a liberação de espécies reativas de oxigênio (Hampton et al., 1998; Kurtz, 2002) e liberação de substâncias tóxicas e moléculas microbicidas, pela degranulação (Martin et al., 1995). Não sendo possível conter a infecção grupos de hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em torno dos organismos invasores, eliminando-os por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas que são liberadas dentro dos nódulos ou cápsulas. É comum a melanização desses nódulos ou cápsulas para o isolamento dos parasitas. A melanização é um componente chave para destruir uma série de microorganismos, bem como para a cicatrização de ferimentos. A síntese de melanina é catalizada pela enzima pro-fenoloxidase-monofenil-L-dopa, encontrada na forma de zimógeno em alguns tipos de hemócitos, sendo liberada na hemolinfa, pela ruptura da membrana plasmática, transportada para a cutícula

e depositada em regiões de ferimentos ou em volta de material encapsulado. A fenoloxidase promove a hidroxilação de monofenóis e oxidação de fenóis a quinonas, com a formação de melanina. As quinonas, por si só, são tóxicas para bactérias, fungos e protozoários (Gillespie et al., 1997; Cerenius e Söderhäll, 2004).

O conhecimento dos mecanismos de imunidade dos insetos apresenta importância grande, pois os distúrbios como alterações na contagem total e diferencial dos hemócitos, em insetos parasitados ou infectados, podem ser utilizados no auxílio para o controle de insetos vetores e pragas, uma vez que é a primeira indicação de reação de defesa (Brunham et al., 1993).

2.2. Imunidade humoral

A ausência do sistema imune adaptativo em invertebrados faz com que um dos maiores desafios desses animais seja a diferenciação do “próprio” e “não-próprio”. Essa diferenciação é o ponto de partida para o estímulo das cascatas de reações de defesa. Insetos, da mesma forma que outros artrópodes e vertebrados, possuem mecanismos para reconhecer polímeros encontrados, exclusivamente, em microorganismos, como peptídeoglicanos (PGLC) e lipopolissacarídeos (LPS) de paredes bacterianas e β -1,3-glucanos de fungos, os chamados PAMP (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*). Os PAMPs apresentam características comuns: são expressos normalmente por microorganismos e não por células do hospedeiro, mostram pouca variação entre os microorganismos e a sua expressão é essencial para a sobrevivência do microorganismo (Teixeira et al., 2002).

Esses padrões moleculares são reconhecidos por receptores específicos para esta função, chamados receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês, *pattern recognition receptors*), os quais podem ser solúveis (humorais) ou ancorados em membranas celulares (Gillespie et al., 1997; Lavine e Strand, 2002; Medzhitov e Janeway, 2002; Passare e Medzhitov, 2005). Os PRR podem mediar respostas celulares como a fagocitose, desencadear cascatas de serino-

proteases, que ativam respostas de melanização ou regular a síntese e secreção de peptídeos antimicrobianos (Kavanagh e Reeves, 2004).

Dentre os PRR, destaca-se um conjunto de receptores denominados de receptores do tipo Toll, que possuem a capacidade de reconhecer os PAMPs (Akira et al., 2006). Os receptores Toll são proteínas transmembranas, responsáveis pela detecção da invasão do organismo por patógenos. Esses receptores são conservados ao longo da evolução desde o helminto *Caenorhabditis elegans* até mamíferos (Janeway e Medzhitov, 2002; Hoffmann, 2003; Akira e Takeda, 2004; Beutler, 2004). Os receptores Toll foram, inicialmente, identificados na *Drosophila*, como receptores essenciais para o estabelecimento do desenvolvimento dorso-ventral dos embriões (Hashimoto et al., 1988). Em 1996, Lemaitre e colaboradores demonstraram que moscas com mutação no “Toll” eram mais susceptíveis à infecção fúngica. Em *Drosophila*, já foram identificadas nove famílias de Toll (Toll, 18-Wheeler e Toll 3 a 9) (Ooi et al., 2002). Posteriormente, homólogos dos receptores Toll foram identificados em mamíferos e designados “*Toll-like receptors*” (Medzhitov et al., 1997). Os receptores Toll são glicoproteínas de membrana caracterizados por um domínio extracelular com número variado de repetições de leucinas (“leucine-rich-repeat”-LRR) e um domínio citoplasmático ou intracelular homólogo ao Receptor de Interleucina 1 (IL-1R) denominado domínio “Toll/IL-1R homology” (TIR). Os domínios LRR são compostos por 19-25 repetições de leucinas com 24-29 aminoácidos cada. Esses domínios são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs de bactérias, parasitas, fungos e vírus. Os receptores Toll reconhecem, coletivamente, lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos expressos em diferentes grupos de microorganismos (Bowie e O'Neill, 2000; Raetz e Whitfield, 2002; Akira et al., 2006).

Na infecção, os insetos processam uma resposta rápida que consiste de vários componentes como, peptídeos antimicrobianos, ativação de proteínas e células da hemolinfa (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003; Lemaitre, 2004; Meister, 2004). Em *Drosophila* a expressão de peptídeos antimicrobianos depende, principalmente, da sinalização das vias Toll e Imd (immune deficiency). Essas duas vias, respectivamente, são homólogas às vias dos “*Toll-like receptors*” e do “fator de necrose tumoral em mamíferos” (Gilmore e Ip, 2003). Infecções

causadas por fungos e bactérias gram-positivas estimulam principalmente a via Toll, enquanto, bactérias gram-negativas ativam principalmente a via Imd (Figura 2). Os componentes ativados pelas duas vias de sinalização são independentes, no entanto, os dois percursos controlam, separadamente e em conjunto, ativação de genes antimicrobianos (Tanji e Tony Ip, 2005).

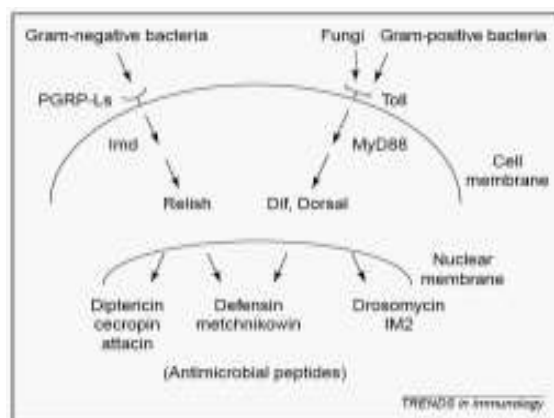


Figura 2: Modelo das vias de expressão de peptídeos antimicrobianos em *Drosophila*. A via Toll medeia a resposta à infecções causadas por fungos e bactérias gram-positivas. A via Imd é processada em resposta à infecções geradas por bactérias gram-negativas. Fonte: Adaptado de Takahiro Tanji and Y. Tony Ip, TRENDS in Immunology, (2005). IM2= Immune Peptide 2, PGRP-Ls= extracellular peptidoglycan recognition protein, Imd= Immune Deficiency, MyD88= Myeloid differentiation factor 88.

Para produção de peptídeos antimicrobianos, em *Drosophila*, por meio da ativação da via Toll, primeiramente, os microorganismos invasores ligam-se a uma forma inativa da proteína Spätzle que, através da ação de serino-proteases, torna-se ativa ligando-se à porção citoplasmática do receptor Toll. Após sua ativação, esses receptores dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras, como a MyD88 (Fator de Diferenciação Mielóide 88). Após o MyD88 acoplar-se ao domínio TIR, a molécula adaptadora Tube é recrutada. Em seguida ocorre a ligação da proteína Pelle que induz a fosforilação da proteína Cactus, a qual está ligada aos fatores de transcrição Dif (Dorsal-related immune factor) e Dorsal. Cactus fosforilado é degradado, liberando Dif e Dorsal, que são transportados para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição de genes antimicrobianos (Horng e Medzhitov, 2001; Tauszig-Delamasure et al., 2002; Sun et al., 2004).

Na via de sinalização Imd, após a infecção por bactérias gram-negativas o fator TAK1 (Transforming Growth Factor-activated Kinase 1) estimula o

complexo I κ B kinase que promove a clivagem da proteína Relish em dois domínios: Rel-68, que se desloca para o núcleo e atua como fator de transcrição de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos e Rel-69, que permanece no citoplasma (Stöven et al., 2000; Vidal et al., 2001; Silverman et al., 2003).

3. Referências Bibliográficas

- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 4, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Patogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4), 783-801.
- Armstrong, P.B., 1996. Humoral immunity in long-lived arthropodes. *Journal of Insect Physiology* 42 (1), 53-64.
- Barduco, M.C., Gregório, E.A., Toledo, L.A., 1988. Hemócitos de *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) no período larval, estudo morfológico e quantitativo. *Revista Brasileira de Biologia* 48, 925-932.
- Beetsma, J., 1985. *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology: in memoriam Karl von Frisch, 1886-1982*. Sunderland Massachusetts Sinauer.
- Beutler, B., 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.
- Bonetti, A.M., 1982. Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 141p.
- Bonetti, A.M., 1983. Action of Juvenile Hormone on gene expression in *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 4 (6), 583.
- Bonetti, A.M., 1992. Regulação da atividade gênica na determinação de casta nos Apíneos (Apis e Melipona). *Revista Brasileira de Genética* 15 (1), 248-251.
- Bonetti, A.M., Kerr, W.E., 1985. Estudo da Expressão Gênica em *Melipona marginata* e *Melipona compressipes* a partir de análise morfométrica. *Revista Brasileira de Genética* 4 (7), 629-638.
- Bowie, A., O'Neill, L.A., 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 508-514.
- Bréhelin, M., Zachary, D., 1986. *Immunity in Invertebrates: Cells, Molecules and Defense Reaction*. Springer-Verlag, Montpellier.
- Brunham, R.C., Plummer, F.A., Stephens, R.S., 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response and pathogen-host coevolution. *Infection and Immunity* 61, 2273-2276.

- Camargo, C.A., 1972. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia* 32 (1), 133-138.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.M.R., 2007. The Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) The Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba.
- Campos, L.A.O., 1979. Determinação do sexo em abelhas XIII. Determinação das castas em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae). *Papel do Hormônio Juvenil. Ciência e Cultura* 31 (1), 65-70.
- Campos, L.A.O., Peruquetti, R.C., 1999. Biologia e criação de abelhas sem ferrão. *Informe Técnico - UFV* 82 1-36.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase activating-system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, 116-126.
- Du Pasquier, L., 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 129 (1), 1-15.
- Engels, W., Imperatriz-Fonseca, V.L., 1990. *Social Insects - an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*. Springer-Verlag, New York.
- Faustino, C.D., Silva-Matos, E.V., Mateus, S., Zucchi, R., 2002. First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Insects Sociaux* 49, 111-113.
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Piracicaba.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42, 611-643.
- Gilmore, T.D., Ip, Y.T., 2003. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London.
- Götz, P., Boman, H.G., 1985. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford.
- Gupta, A.P., 1979. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *In: Gupta, A. P. Insect hemocytes, development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hampton, M., Kettle, A., Winterbourn, C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.

- 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.
- Hornig, T., Medzhitov, R., 2001. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 12654-12658.
- Hultmark, D., 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* 15, 12-19.
- Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review Immunology* 20, 197-216.
- 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 pathogenecity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 101-112.
- Kerr, W.E., 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. In ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". Anais. Piracicaba: Universidade de São Paulo 5, 182-276.
- Kerr, W.E., 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* 35, 143-152.
- Kerr, W.E., 1974. Sex determination in bees .III. Caste Determination and Genetic control in *Melipona*. *Insects Sociaux* 21 (4), 357-368.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. , 1996. Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú 144.
- Kerr, W.E., Nielsen, R.A., 1966. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics* 54 (3), 859-866.
- Klowden, M. J., 2002. Physiological systems in insects. Academic Press, San Diego.
- Kurihara, Y., Shimazu, T., Wago, H., 1992. Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) I. Phase microscopic study. *Applied Entomology and Zoology* 27, 225-235.
- Kurtz, J., 2002. J. Kurtz, Phagocytosis by invertebrate hemocytes: causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* scorpionflies. *Microscopy Research and Technique* 57, 456-468.

- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry* 32 (10), 1295-1309.
- Lemaitre, B., 2004. The road to Toll. *Nature Reviews Immunology* 4, 521-527.
- Little, T.J., Hultmark, D., Read, A.F., 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology* 6, 651-654.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z., Xu, X., 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 551, 53-57.
- Martin, E., Ganz, T., Lehrer, R.I., 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *Journal of Leukocyte Biology* 58, 128-136.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A.Jr., 1997. Innate Immunity: impact on adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9 (4), 9-33.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A.Jr., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A.Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meister, M., 2004. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Current Opinion in Immunology* 16, 10-15.
- Michener, C.D., 2000. The bees of the world. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Nappi, A.J., Ottaviani, E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22 (5), 469-480.
- Ooi, J.Y., Yagi, Y., Hu, X., Ip, Y.T., 2002. The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO reports* 3, 82-87.
- Passare, C., Medzhitov, R., 2005. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 560, 11-18.
- Raetz, C.R., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71, 635-700.
- Schmidt, O., Thepold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessay* 23 (4), 344-351.
- Silva Jr, P.I., Daffre, S., Bulet, P., 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (43), 33464-33470.

- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R.L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., Maniatis, T., 2003. Immune activation of NF- κ B and JNK requires *Drosophila* TAK1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 48928-48934.
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., Hultmark, D., 2000. Activation of the *Drosophila* NF κ B factor Relish by rapide endoproteolytic cleavage. *EMBO reports* 1, 347-352.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D.N., Foster, B.A., Wasserman, S.A., 2004. Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *The EMBO Journal* 23, 100-110.
- Tanji, T., Tony Ip, Y., 2005. Regulators of the toll and imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends in immunology* 26 (44), 193-198.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2002. *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature Immunology* 3, 91-97.
- Teixeira, M.M., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection* 4 (9), 883-886.
- Terada, Y., 1979. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Friesoeomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 96p.
- Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaitre, B., 2002. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology* 5 (1), 102-110.
- Velthuis, H.H.W., Roeling, A., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2003. Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*, illustrated by the two kinds of works eggs and the behaviors of workers laying them. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)* 14, 49-52.
- Vidal, S., Khush, R.S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., Lemaitre, B., 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF- κ B dependent innate immune responses. *Genes & Development* 15, 1900-1912.
- Wang, L., Ligoxygakis, P., 2006. Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology* 211, 251-261.

- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishigawa, T., Muroga, K., 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 13, 391-403.
- Zucchi, R., Silva-Matos, E.V., Nogueira-Ferreira, F.H., Azevedo, G.G., 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees - nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sociobiology* 34, 65-86.

CÉLULAS DA HEMOLINFA EM
MELIPONA SCUTELLARIS
(HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI)



Capítulo II

1. Resumo

Infecção em insetos estimula uma resposta defensiva complexa. O reconhecimento de patógenos pode ser realizado pelos hemócitos ou proteínas que se ligam especificamente em microorganismos com padrões moleculares específicos, os chamados (PAMPs). Diferentes células da hemolinfa cooperam na resposta imune. Os hemócitos reconhecem os patógenos e os isolam por fagocitose, formando nódulos ou, cápsula multicelular em torno do parasita. Nesse trabalho foram identificadas as células da hemolinfa da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* e caracterizados os hemócitos envolvidos no processo de fagocitose utilizando *beads* de 0,5µm de diâmetro, em média, com fluorescência vermelha. Na hemolinfa do 3º instar larval de *M. scutellaris* foram distinguidos quatro tipos de hemócitos: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. No ensaio de fagocitose foram identificados plasmatócitos e granulócitos, com *beads* fluorescentes fagocitados no citoplasma.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, hemócitos, fagocitose, imunidade celular.

2. Abstract

Infection in insects stimulates a complex defensive response. Recognition of pathogens may be accomplished by plasma or hemocyte proteins that bind specifically to bacterial or fungal polysaccharides. Several morphologically distinct hemocyte cell types cooperate in the immune response. Hemocytes attach to invading organisms and then isolate them by phagocytosis, by trapping them in hemocyte aggregates called nodules, or by forming an organized multicellular capsule around large parasites. In the current investigation the cellular population in the hemolymph third instar larvae of *M. scutellaris* has been characterized by means of light microscopy analysis and phagocytosis assays were performed in vivo by injection of 0,5µm fluorescence *beads* in order to identify the hemocyte types involved in phagocytosis. Four morphotypes of circulating hemocytes were found in 3rd instar larvae: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and oenocytoids. The results presented plasmatocytes and granulocytes involved in phagocytic response of foreign particles in 3rd instar larvae of *M. scutellaris*.

Keywords: stingless bee, hemocytes, phagocytosis; cellular immunity.

3. Introdução

Patógenos são uma ameaça constante à sobrevivência de insetos e o desenvolvimento de mecanismos de imunidade eficientes tem alto valor adaptativo para os organismos. O estudo da imunologia de insetos revela um sistema altamente adaptado e efetivo contra uma gama patógenos, em concentrações potencialmente fatais a vertebrados (Kavanagh e Reeves, 2004).

O sistema imunológico dos insetos caracteriza-se por dois tipos de reações contra agentes estranhos. A primeira, reação humoral, é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos, sem a participação direta de células da hemolinfa (Hultmark, 2003; Cherry e Silverman, 2006; Wang e Ligoxygakis, 2006). A segunda ocorre por meio de reações mediadas por hemócitos, células que circulam livremente na hemolinfa, sendo conhecida como reação celular. As células da hemolinfa apresentam morfologia variada e desempenham funções diferentes como, fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Lavine e Strand, 2002).

As infecções por patógenos diminuem drasticamente a produção dos produtos apícolas, reduzindo os ganhos econômicos, em vários países. Nos últimos anos vem sendo relatada a morte de milhares de abelhas nos EUA e na Europa. A mortalidade de abelhas *Apis mellifera* é um dos vários problemas que os apicultores têm enfrentado e vários fatores contribuem para esse fato, tais como a presença de *Varroa destructor* (ácaro) e *Nosema apis* (fungo) além da exposição à inseticidas empregados na agricultura (Suchail et al., 2004).

A mortalidade das abelhas é agravada pela presença de retrovírus que provocam deformações, tremores, incapacidade de voar e paralisia. Em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) tem sido relatado mais de 18 tipos de vírus, entre eles o vírus de paralisia crônica (CBPV), vírus de paralisia aguda (ABPV), vírus célula preta em rainha (BQCV), vírus Sacbrood (SBV), vírus de deformidade da asa (DWV) e vírus Kashmir (KBV) (Bailey e Ball, 1991; Allen e Ball, 1996; Antúñez et al., 2005). Recentemente, Teixeira e colaboradores (2008) verificaram a

existência dos vírus ABPV, BQCV e DWV em apiários brasileiros na região de Altinópolis, estado de São Paulo.

Além da identificação dos vírus é importante conhecer os mecanismos imunológicos desenvolvidos pelos apídeos, para subsidiar ações de manejo, aconselhamento sanitário e técnicas de prevenção. Embora seja *Apis mellifera* a espécie de abelha melhor estudada quanto aos mecanismos imunológicos, os dados ainda são escassos e para abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* não há dados sobre a infecção por vírus.

A meliponicultura, criação racional de abelhas sem ferrão, é fator de renda suplementar, essencial em comunidades do norte e nordeste do Brasil (Campos, 2003), além disso, essas abelhas são agentes polinizadores de considerável variedade de plantas em diferentes ecossistemas (Kerr et al., 1996). Poucos trabalhos sobre hemócitos de insetos são encontrados na literatura e, considerando sua importância na mediação do sistema imune, o presente trabalho propôs-se identificar e caracterizar os hemócitos de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, uma das abelhas mais utilizadas na meliponicultura no nordeste brasileiro.

4. Material e Métodos

4.1. Material biológico

O material biológico é a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Para subdivisão do 3º instar larval em *M. scutellaris* os favos de cria contendo larvas nesse estágio foram retirados da colméia e mantidos em estufa 32°C e 75% de umidade relativa (ASTM). As larvas foram analisadas e separadas de acordo com a quantidade e consistência do alimento presente e pela presença ou ausência de fezes no alvéolo, conforme Figura 1.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2. Coleta da hemolinfa

Após pesagem em balança analítica (A&D company) e higienização superficial das larvas, a hemolinfa foi coletada com o auxílio de micropipeta ajustável, de 5µL, por inserção na parte dorsal posterior das larvas. Dois microlitros da hemolinfa foram coletados e transferidos para tubo de micro centrífuga (0,5mL) já contendo 18µL de tampão anticoagulante (0,098M NaOH,. 0,186M NaCl, 0,017M EDTA, pH 4,5) . Cinco microlitros de hemolinfa foram coletados para caracterização morfológica das células da hemolinfa, por microscopia de luz (OLYMPUS CH-2).

4.3. Contagem total de hemócitos

Para determinação do número total de células da hemolinfa, 10µL de hemolinfa diluída em tampão anticoagulante foram dispensados em câmara de Neubauer (Fisher Scientific) e a contagem feita sob microscópio óptico (OLYMPUS CH-2) com aumento de 400x.

4.4. Caracterização morfológica das células da hemolinfa por microscopia de luz e contagem diferencial dos hemócitos

Cinco microlitros de hemolinfa foram diluídos em 5µL de PBS 1X, em lâmina. Após 20min de incubação à temperatura ambiente, para aderência dos hemócitos à lâmina, as células foram fixadas em metanol por 10min. Em seguida o fixador foi removido e adicionado corante Giemsa 25% diluído em tampão fosfato (0.1M, pH 6,8) às lâminas, que foram incubadas por 20min à temperatura ambiente e depois lavadas em água corrente para remoção do corante residual. As células foram identificadas em microscópio de luz (OLYMPUS CH-2) com aumento de 400x e fotografadas utilizando câmera digital Cyber-Shot S730 7.2 Megapixels (Sony). Para contagem diferencial foram tomadas cem (100) células por lâmina.

4.5. Caracterização morfológica das células por microscopia de contraste de fase

Dez microlitros de hemolinfa foram colocados em placas de cultura celular de 24 well (NuncTM) contendo 990µl de meio Grace's Insect Midium (GiBCO). As

células foram identificadas em microscópio de contraste de fase (Motic AE21) com aumento de 400x e fotografadas utilizando câmera digital Cyber-Shot S730 7.2 Megapixels (Sony).

4.6. Ensaio de fagocitose

Beads com fluorescência vermelha (SIGMA) com média de 0,5µm de diâmetro foram usados de acordo com recomendações do fabricante, e ligados covalentemente com BSA (soroalbumina bovina). Para produção das lâminas foram coletados 10µL de hemolinfa de larvas do 3º instar larval, estágio L3-3 e adicionados 100µL de tampão anticoagulante. Após centrifugação a 3000g por 5min o sobrenadante foi descartado e adicionados 100µL de meio Grace's Insect Medium (GIBCO) e 0,5µL de bead, incubados por 30min no escuro e à temperatura ambiente. Após esse tempo, as lâminas foram preparadas com 20µL da solução (hemolinfa e *beads* fluorescentes) e analisadas em microscópio confocal LSM 510 META (ZEISS).

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico StatView for Windows versão 4.57. (Abacus Concepts, Inc., Copyright 1992 -1996) utilizando análise de variância (ANOVA) e para verificação de possíveis diferenças entre as médias de cada fator a ser estudado, foi utilizado o teste *t-student's*.

5. Resultados

Abelhas do gênero *Melipona* apresentam três *instars* larvais de acordo com a regra de Dyar (Dyar, 1890; Dias et al., 2001). Em *Melipona*, o 3º instar larval divide-se em cinco estágios (Figura 1) caracterizados pela quantidade e consistência do alimento e pela presença ou ausência de fezes na célula de cria, a saber L3-1: alimento líquido, as larvas estão sobre o alimento, curvadas e tem cor perolada; L3-2: alimento com consistência viscosa, as larvas continuam curvadas e com cor perolada; L3-3: alimento na célula de cria seco e com

consistência sólida, as larvas começam a mudar de posição e tem cor perolada brilhante; LPD: célula de cria sem alimento e, ainda, não teve início o processo de defecação, as larvas estão em forma de vírgula, dentro do alvéolo, tem cor perolada e continuam brilhantes; LD: célula de cria sem alimento e teve início o processo de defecação, as larvas são esbranquiçadas e opacas, estão eretas e com a cabeça voltada para cima.

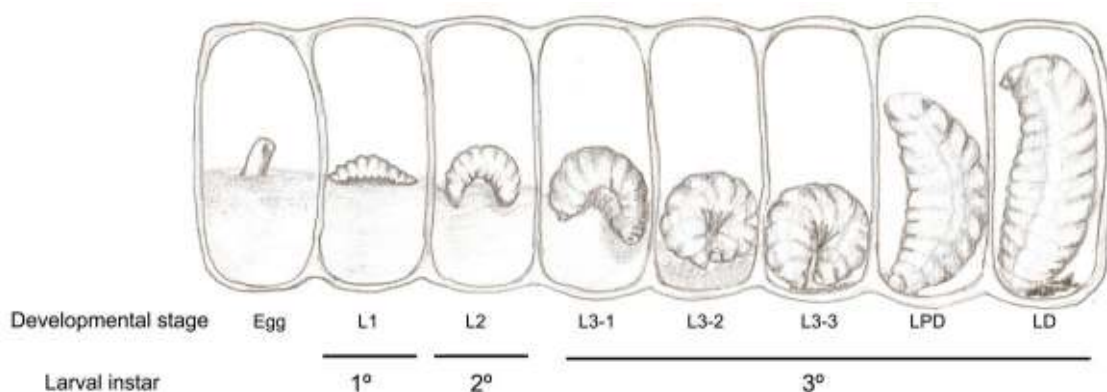


Figura 1: Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris*.

Optamos pela análise do sistema imune inato no 3º instar de desenvolvimento, pelo fato das larvas estarem em contato contínuo com o alimento e com as bactérias presente nele.

5.1. Contagem de hemócitos totais e massa corporal

A contagem do número total de hemócitos (THC) corresponde à contagem de células da hemolinfa por microlitro (*cells/mL*). Não foram observadas diferenças de número na THC nos diferentes estágios do último *instar* larval de *M. scutellaris* (Figura 2A). A massa corporal das larvas apresentou aumento significativo entre os estágios, variando de 40 a 155,6mg, com pico máximo em LPD (155,6mg), seguido de diminuição significativa em LD (104mg) (Figura 2B) (ANOVA, $p < 0.01$).

Como a massa do corpo tem mudanças significativas durante os estágios do último *instar* larval, uma estimativa de número total de hemócitos em cada estágio larval (THCg) foi calculada multiplicando THC pelo valor da massa do corpo (mg) segundo Beetz et al. (2008). O gráfico dos valores de THCg (Figura

2C) mostra um perfil semelhante ao da massa do corpo, porém, com dois grupos significativamente (ANOVA, $p < 0.01$) diferentes quanto ao número de hemócitos. Os estágios L3-1 e L3-2 mostraram baixa quantidade de hemócitos e os estágios L3-3, LPD e LD, quantidade significativamente maior que L3-1 e L3-2.

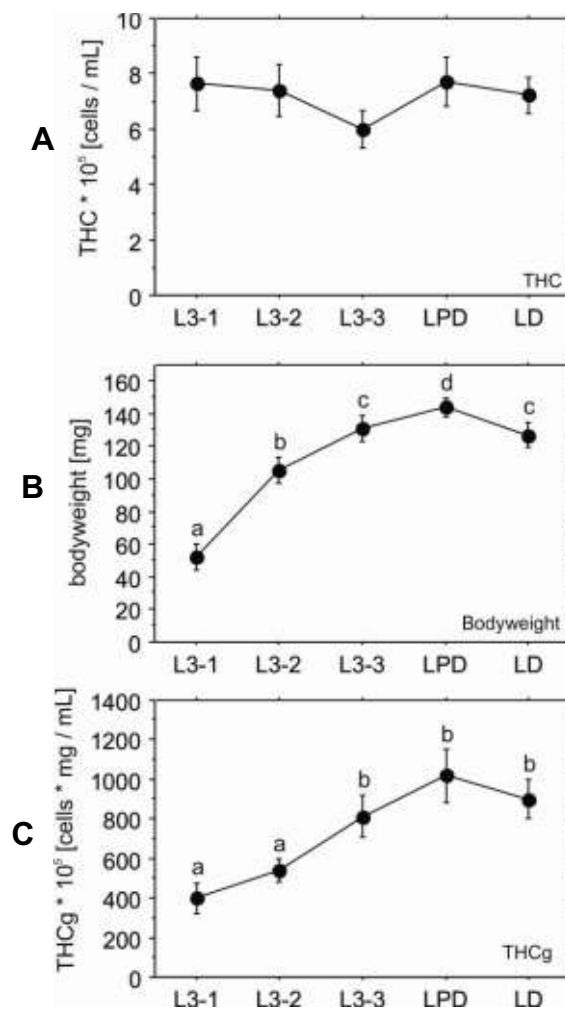


Figura 2: Contagem total de hemócitos (THC) (**A**), peso corporal (**B**) e THCg (**C**) durante o 3° instar larval de *M. scutellaris*. Cada ponto é a média $\pm$ desvio padrão de 10 indivíduos. Diferentes letras significam as diferenças entre os grupos (ANOVA, $p < 0.01$).

5.2. Caracterização morfológica de hemócitos

Os hemócitos foram identificados por microscopia de luz, em microscópio CH-2 (OLYMPUS) com aumento de 400X. Foram distinguidos, na hemolinfa do 3° instar larval de *M. scutellaris*, quatro tipos de hemócitos: prohemócitos (Ph), plasmatócitos (PI), granulócitos (Gr) e oenocitóides (Oe).

5.2.1. Prohemócitos

Os prohemócitos (Figura 3A) foram as menores formas celulares encontrada na hemolinfa de *M. scutellaris*. É uma célula de forma oval ($8.69 \times 8.64\mu\text{m}$ de diâmetro). O citoplasma apresenta coloração azul (basofílica) e o núcleo, roxo escuro. O núcleo é grande e central ocupando quase toda a área celular, com pequeno espaço citoplasmático.

5.2.2. Plasmatócitos

Os plasmatócitos. (Figura 3B) são células de diferentes tamanhos e de forma redonda e oval, forma de fuso e, algumas vezes, de forma irregular. Quando em forma esférica, eles possuem média $11,81 \pm 2,45\mu\text{m}$, variando de 10.0 a $15.0\mu\text{m}$ de diâmetro. Quando em forma oval apresentam média de $11,81 \pm 2,45\mu\text{m}$, variando de 10.0 – $15.0\mu\text{m}$ de diâmetro e média de largura de $10,68 \pm 1,95\mu\text{m}$, variando de 6.29 – $12.25\mu\text{m}$. A coloração do citoplasma é azul (basofílica) e o núcleo, roxo escuro. O núcleo pode ser esférico ou oval. Foram encontrados vários plasmatócitos contendo uma ou mais inclusões citoplasmáticas neutrofílicas (Figura 3C, setas). Formas intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos foram observadas.

5.2.3. Granulócitos

Esse tipo celular (Figura 3D) é facilmente reconhecido por seus inúmeros grânulos neutrofílicos, presentes no citoplasma. Esses hemócitos são variáveis em tamanho e comprimento. Apresentam-se em forma esférica, média de $19,12 \pm 4,11\mu\text{m}$ (variando entre 15.25 – $27.61\mu\text{m}$ de diâmetro) ou oval, com média de $19,12 \pm 4,11\mu\text{m}$ (variando entre 15.25 – $27.61\mu\text{m}$) de diâmetro e $18,09 \pm 3,90$ (variando entre 13.25 – $24.75\mu\text{m}$) de largura).

O núcleo geralmente ocupa a região central, sendo acidofílico. Foram encontradas, nas lâminas, várias células realizando fagocitose frustrada (Figura 3E) o que foi indicado pela ruptura do citoplasma e presença de grânulos, demonstrando que esse tipo de hemócito participa ativamente na fagocitose de corpos estranhos. Células com características intermediárias entre plasmatócitos e granulócitos foram, também, observadas.

5.2.4. Oenocitóides (enócitos)

Esse tipo de hemócito (Figura 3F) foi a maior célula da hemolinfa detectada em *M. scutellaris*. Caracteriza-se pelo formato esférico, com média de $20,25 \pm 2,77\mu\text{m}$ (variando entre 16.44–28.0 μm) ou oval com média de $20,25 \pm 2,77\mu\text{m}$ (variando entre 16.44–28.0 μm) de diâmetro e $20,61 \pm 2,73$ (variando entre 16.79--26.48 μm) de largura. Geralmente o apresenta o núcleo com a mesma forma da célula. Após coloração com Giemsa, os oenocitóides exibiram moderada acidofilia e grande quantidade de grânulos acidófilos no citoplasma.

Em todos os tipos de hemócitos foram encontradas células sugestivas de figuras de mitose (Figuras 3G, H, I, J, K e L), principalmente, no estágio LD, que corresponde ao final do 3º instar larval de *M. scutellaris*, seguindo-se a metamorfose para o estágio de pupa.

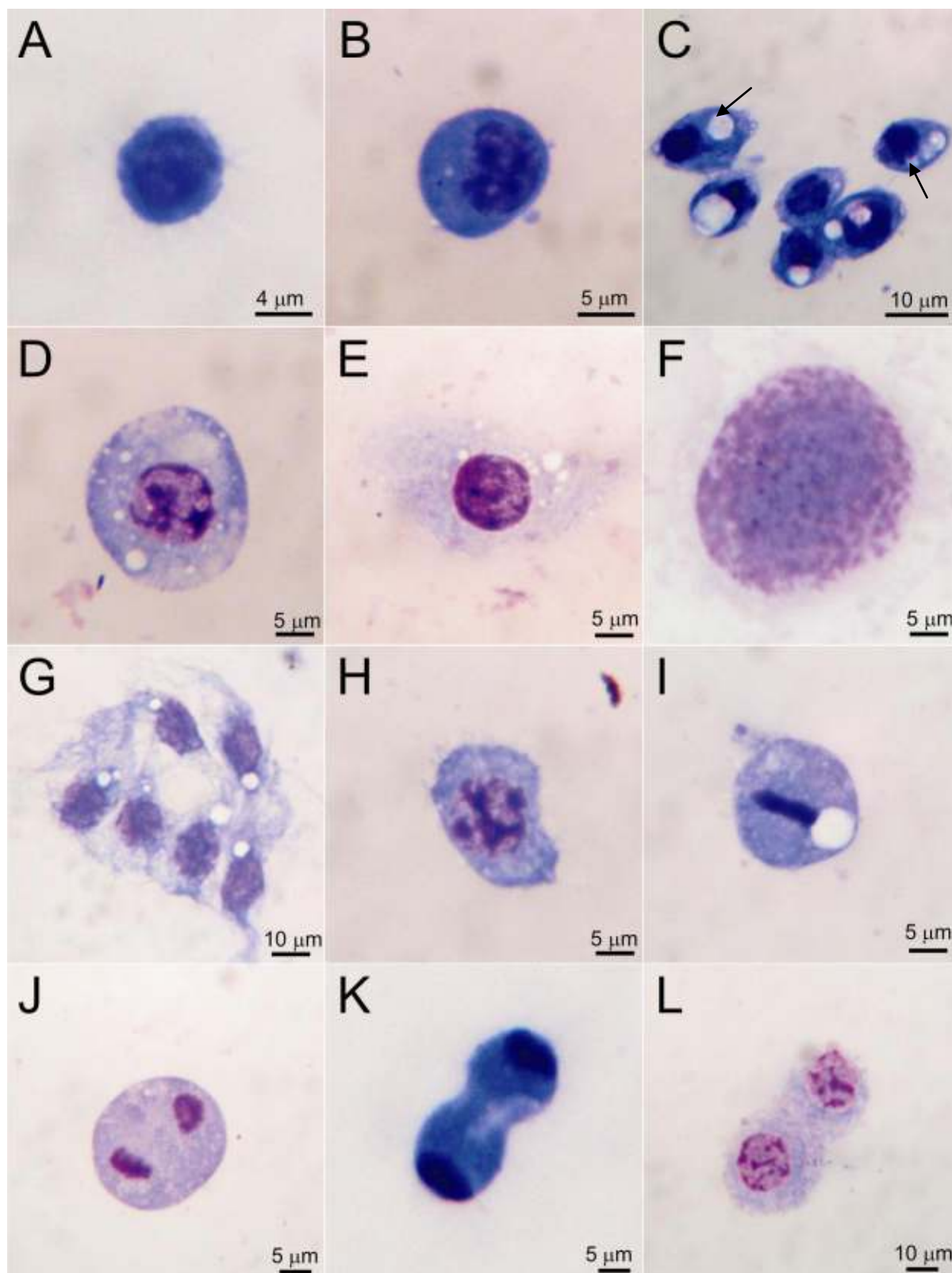


Figura 3: Hemócitos presentes na hemolinfa de *M. scutellaris* com coloração Giemsa. Os hemócitos observados: (A) prohemócitos, (B e C) plasmatócitos, (D) granulócitos, (E) granulócito em fagocitose frustrada, (F) oenocitóides, (G) células do corpo gorduroso, presentes principalmente em LD. Em todos os tipos de hemócitos foram observadas células em divisão mitótica: (H) prófase, (I) metáfase, (J) anáfase, (K) telófase e (L) citocinese. Setas em 3C indicam inclusões citoplasmáticas.

5.3. Contagem diferencial dos hemócitos

Na contagem diferencial dos hemócitos (DHC) (Figura 4) ocorreu aumento significativo de prohemócitos no último estágio larval (LD). Plasmatócitos aumentaram de forma significativa no estágio L3-3 e mantiveram-se estável até o último estágio larval. As análises mostraram que granulócitos e oenocitóides diminuem de forma significativa durante os estágios do 3º instar larval (ANOVA, $p < 0.05$).

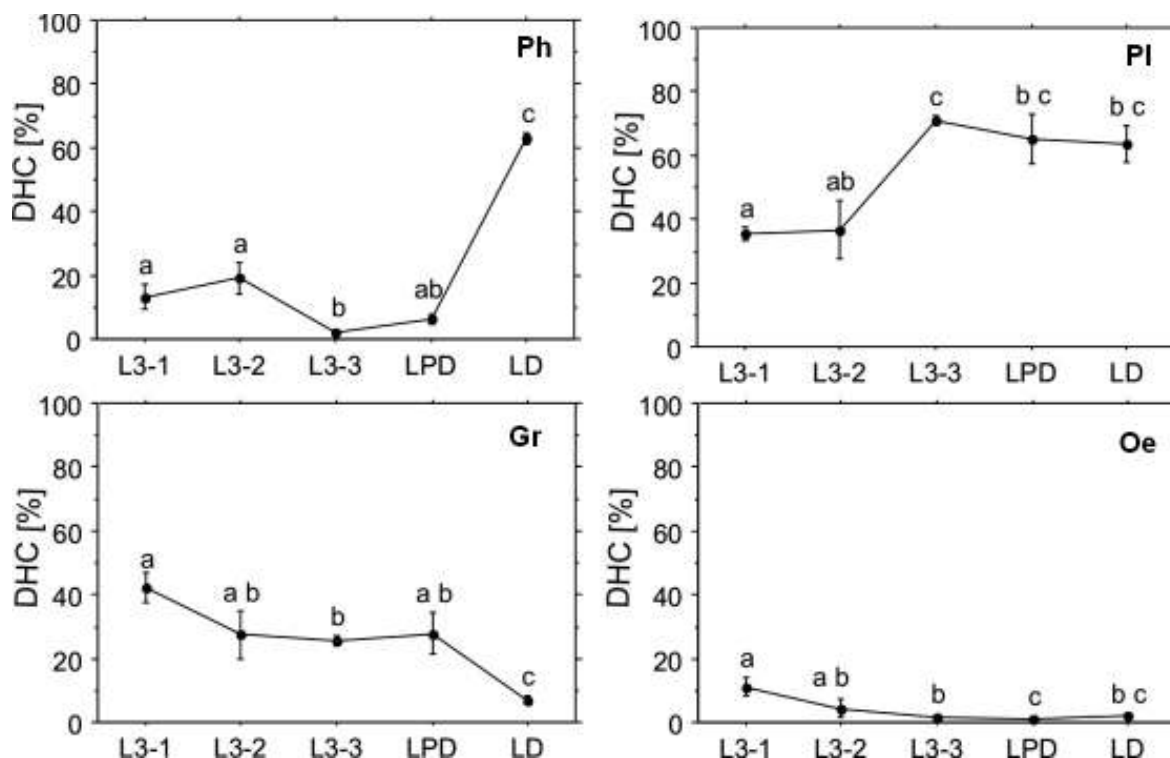


Figura 4: Contagem diferencial (DHC) dos hemócitos em todos os estágios do último instar larval de *M. scutellaris*. Prohemócitos (Ph), plasmatócitos (PI), granulócitos (Gr) e oenocitóides (Oe). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p < 0.05$).

5.4. Caracterização dos hemócitos por microscopia de contraste de fase

A morfologia das células em microscopia de contraste de fase (Figura 5) confirmou a verificada em células coradas com Giemsa, demonstrando que o processo de fixação com metanol e coloração com Giemsa não provocam modificações morfológicas. Plasmatócitos foram as células mais refratárias, seguida de prohemócitos, oenocitóides e menos refratárias, os granulócitos. Foram encontradas, novamente, células intermediárias entre prohemócitos e plasmatócitos.

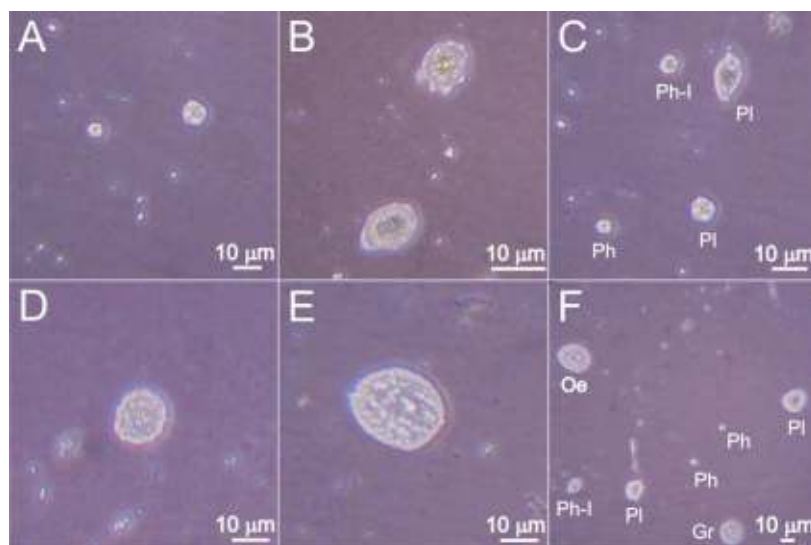


Figura 5: Morfologia de hemócitos vivos de *M. scutellaris* por microscopia contraste de fase. A: prohemócito. B: plasmatócitos. C: prohemócitos, plasmatócitos e estágios intermediários. D: granulócito. E: oenocitóide. F: todos os hemócitos. Ph= prohemócito. Ph-I= prohemócito intermediário. PI= plasmatócitos. Gr= granulócitos. Oe= oenocitóides.

5.5. Ensaio de Fagocitose

Em ensaio adicionando-se bead puro à hemolinfa de *M. scutellaris*, entretanto, não foi observado nenhum movimento fagocítico. Soroalbumina bovina (BSA) foi, então, ligado covalentemente aos *beads* para deixá-los antigênicos. A incubação desses *beads* com os hemócitos permitiu observar plasmatócitos e granulócitos com *beads* fluorescentes fagocitados em seus citoplasmas (Figura 6). Não encontramos prohemócitos e enócitos com *beads* internalizados, sugerindo que esses tipos celulares não realizam fagocitose.

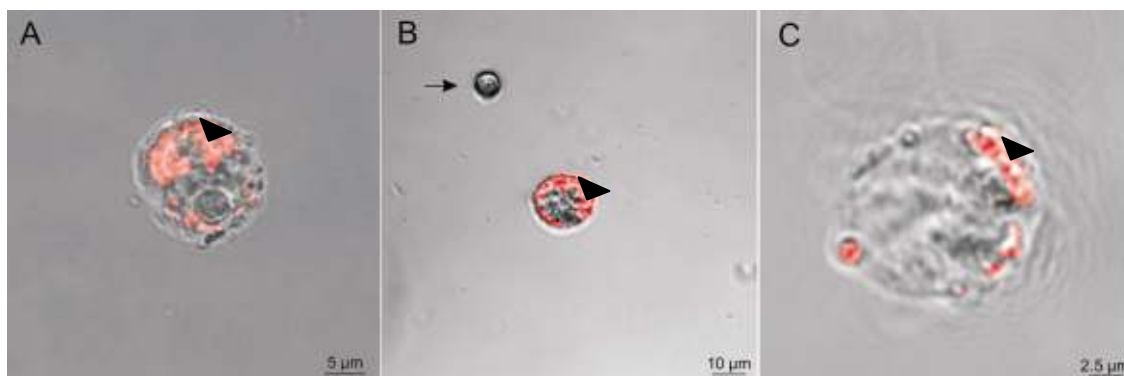


Figura 6: Ensaio de fagocitose com *beads* fluorescentes incubados com células da hemolinfa de *M. scutellaris*. **A:** plasmatócito após fagocitose mostrando *bead* (ponta de seta) no seu interior. **B:** plasmatócito que fagocitou os *beads*, a seta mostra um prohemócito que não realizou fagocitose. **C:** granulócito com *beads* fagocitados (ponta de seta).

6. Discussão

Abelhas sem ferrão, *M. scutellaris*, apresentam quatro estágios de desenvolvimento, a saber, embrião, larva, pupa e adulto. Dias et al (2001) realizaram medições de cápsula cefálica de larvas e utilizando a regra de Dyar (Dyar, 1890) demonstraram que o período de larva em *M. scutellaris* apresenta três instares. O alimento larval é uma mistura de pólen, mel e secreção glandular das abelhas nutridoras (Machado, 1971). O alimento, dentro do alvéolo de cria, possui duas fases: uma superior contendo basicamente secreções das glândulas mandibulares e hipofaringeanas, água, açúcares e subprodutos da digestão do pólen, portanto, mais líquida e uma inferior, contendo o pólen, alimento mais sólido (Velthuis, 1992). O 3º instar larval de *Melipona* subdivide-se em cinco estágios: L3-1, L3-2, L3-3, LPD e LD, que podem ser bem caracterizados pela consistência do alimento e pela presença ou ausência de fezes na célula de cria. A divisão dos instares larvais em estágios bem definidos, permite melhores análises dos processos fisiológicos dessa abelha que envolvem determinação de casta e/ou sexo e, ainda, análises do sistema imune inato, como o apresentado neste trabalho.

O aumento progressivo da massa do corpo (mg) observado entre os estágios do 3º instar larval, com pico máximo em LPD, seguido de diminuição significativa em LD é esperado, visto que, em LPD as larvas estão no final do processo de alimentação e com isso, ganham massa atingindo pico máximo, quando todo o alimento do alvéolo de cria foi consumido. A diminuição da massa em LD é explicada pelo início do processo de defecação.

Gupta (1979, 1985, 1991), Lavine e Strand (2002) e, mais recentemente, Hartenstein (2006) buscaram uniformizar a nomenclatura dos hemócitos e classificaram os principais tipos presentes em várias ordens de insetos como: prohemócito, plasmatócito, granulócito e oenocitóides. Tipos adicionais foram, também, descritos: coagulócito (CO), adipohemócito (AD), esferulócito (ES), podócito (PO) e vermiforme (VE). Em nosso estudo foram encontrados quatro tipos de hemócitos na hemolinfa do 3º instar larval de *M. scutellaris*, distinguidos

após coloração com Giemsa, em prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, e oenocitóides. Esta é a primeira descrição dos tipos celulares presentes na hemolinfa de *Melipona scutellaris*.

Estudos sobre estágios de diferenciação dos hemócitos em vários insetos, realizados por Gupta (1979, 1985, 1991) permitiram definir os Ph como *stem cells*, ou seja, células que originam outros tipos celulares. Yamashita e Iwabuchi (2001) mostraram que, em *Bombyx mori*, aproximadamente, 43% dessas células, diferenciam-se em PI, Gr e ES, confirmando assim sua pluripotencialidade. Os prohemócitos originam os PI e estes os Gr. Os Gr são células pluripotentes e dão origem aos AD, VE e ES. Os tipos celulares AD e VE não são encontrados na maioria das espécies (Gupta, 1991). Em *Drosophila* os prohemócitos da região da cabeça diferenciam-se em plasmatócitos, enquanto outro grupo de prohemócitos da região anterior do intestino médio, forma células granulares (Rehorn et al., 1996; Lebedsky et al., 2000).

Nos resultados da presente análise, os prohemócitos exibiram baixo número na hemolinfa durante todos os estágios do 3º instar larva de *M. scutellaris*, exceto, no estágio LD, que corresponde ao último estágio do 3º instar larval, fase em que ocorre aumento significativo do número de prohemócitos. No processo de metamorfose todos os tecidos são remodelados e novas células são formadas. Alguns autores já descreveram a importância dos hemócitos no processo de metamorfose e indicaram os prohemócitos como as *stem cell* da hemolinfa (Jones, 1970; Akai e Sato, 1971; Feir, 1979; Ratcliffe et al., 1985; Kohlmaier e Edgar, 2008). Foi verificado, por outros autores, que os Ph exibem alto índice mitótico e no período pós-embrionário, a quantificação dos hemócitos não passa de 5% do total de células (Gupta, 1979; Gupta, 1985), assim como, verificamos em *M. scutellaris*, onde na fase de LD encontramos muitos prohemócitos em mitose. Encontramos prohemócitos intermediários, diferenciando-se em plasmatócitos (Figura 5C) o que sugere que prohemócitos de *M. scutellaris* podem ser células pouco diferenciadas, que podem se diferenciar em plasmatócitos quando necessário. As colméias das abelhas estão em constante contato com microorganismos. As fontes primárias de contaminação microbiológica são o pólen, o trato digestivo das abelhas, a poeira e as flores. Os microorganismos encontrados nas colméias são, principalmente, bactérias e

leveduras. As larvas podem ser estéreis inicialmente, mas ao ingerirem o alimento larval (rico em pólen e néctar), adquirem a microbiota presente no mesmo (Snowdon e Cliver, 1996; Gilliam, 1997).

A primeira linha de defesa contra esses microorganismos é o epitélio da parede do intestino e a membrana peritrófica (Gillespie et al., 1997). Ao passarem essas barreiras os microorganismos entram em contato com a hemolinfa das larvas e precisam ser eliminados. Essa tarefa, provavelmente, deve ser feita pelas células da hemolinfa, principalmente plasmatócitos e granulócitos, que como vimos neste trabalho realizaram fagocitose. Como já observado em lepidóptera, no estágio larval, os plasmatócitos e granulócitos representam mais de 50% do total de hemócitos circulantes e são os únicos tipos de hemócitos capazes de aderir à superfícies estranhas (Lackie, 1988; Ratcliffe, 1993; Strand e Pech, 1995).

Giglio e colaboradores (2008) observaram em adultos e larvas de *Carabus lefebvrei* que os plasmatócitos são os hemócitos mais abundantes presentes na hemolinfa. Os plasmatócitos podem ser comparados com os macrófagos dos vertebrados e estão envolvidos na remoção de células apoptóticas durante o desenvolvimento, bem como na ingestão ou encapsulamento de patógenos (Evans et al., 2003; Hartenstein, 2006).

Os granulócitos estão relacionados com função imunológica, incluindo cicatrização, fagocitose e encapsulamento de agentes patogênicos e, também, participam de funções metabólicas durante o desenvolvimento (Hartenstein, 2006). Nardi e colaboradores (2001) mostraram que os hemócitos sintetizam parte da lâmina basal e que os granulócitos estão envolvidos na remodelação tecidual.

Em *M. scutellaris*, os Gr apresentaram coloração mais intensa dos grânulos no último estágio do 3º instar larval (LD). Beetz e colaboradores (2004) já verificaram que o mesmo ocorre no último estágio de larva de *Manduca sexta*. Esses autores afirmam o papel dos granulócitos na remodelação tecidual, para a metamorfose (Nardi e Miklasz, 1989; Kurata et al., 1991; Kurata et al., 1992; Rheuben, 1992; Murray et al., 1995; Kiger et al., 2001; Nardi et al., 2001). Em *M. scutellaris*, porém, ocorre decréscimo significativo no último estágio larval,

sugerindo que outro tipo celular ou outros eventos, como apoptose, podem estar relacionados com a remodelação tecidual.

Os oenocitóides desaparecem, progressivamente, durante todos os estágios do último instar larval de *M. scutellaris*. Esse mesmo comportamento já foi observado em larvas de *Manduca sexta*. A diminuição dos oenocitóides no último instar larval de *Manduca sexta* está diretamente relacionada à produção do hormônio 20-hydroxyecdysone, que estimula a síntese de proteínas envolvidas na metamorfose. Altos níveis desse hormônio inibem a divisão celular nos oenocitóides, promovendo, assim, a apoptose dessas células (Beetz, 2002).

Nesse trabalho foram identificados prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides como os hemócitos presentes na hemolinfa de *Melipona scutellaris*. A caracterização dos hemócitos fornece informações relevantes para evitar e combater infecções nas abelhas sem ferrão e contribui para a compreensão do papel dos hemócitos na imunidade.

7. Referências Bibliográficas

- Akai, H. Sato, S., 1971. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology 17, 1665-1676.
- Allen, M.F., Ball, B.V., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World 77, 141-162.
- Antúñez, K., Alessandro, B.D., Cordella, E., Zunino, P., 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. Journal of Invertebrate Pathology 90, 69-72.
- ASTM Standards. 2002. Recommended practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions ASTM E 104-02. West Conshohocken: American Society for Testing Materials.
- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. Honey Bee Pathologic. Academic Press, London.
- Beetz, S., 2002. Vergleichende Untersuchungen zum Hämozytenbild von Larve und Puppe des Tabakswärmers *Manduca sexta* L. Grades eines Doktors. Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, Justus-Liebig-Universität, 283p.
- Beetz, S., Brinkmann, M., Trenczek, T., 2004. Differences between larval and pupal hemocytes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, determined by monoclonal antibodies and density centrifugation. Journal of Insect Physiology 50, 805- 819.

- Beetz, S., Holthusen, T.K., Koolman, J., Trenczek, T., 2008. Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Archives of Insect and Physiology 67, 63-75.
- Campos, L.A.O., 2003. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. EMBRAPA, Viçosa.
- Cherry, S., Silverman, N., 2006. Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. Nature Immunology 7 (9), 911-917.
- Dias, J.D.D., Bonetti, A.M., Kerr, W.E., 2001. Determinação do número de instares larvais em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae). Naturalia 26, 257-263.
- Dyar, H.G., 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. Psyche 5, 420-422.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2003. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. Developmental Cell 5, 673-690.
- Feir, D., 1979. Insect Hemocytes Cambridge University Press, Cambridge.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology 42 611-643.
- Gilliam, M., 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters 155 (11), 1-10.
- Gupta, A.P., 1979. Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gupta, A.P., 1985. Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology. Pergamon Press, Oxford.
- Gupta, A.P., 1991. Roles in cellular and humoral immunity. In: Gupta, A. P. Immunology of Insects and Other Arthropods. CRC Press, New Brunswick.
- Hartenstein, V., 2006. Blood Cells and Blood Cell Development in the Animal Kingdom. Annual Review of Cell and Developmental Biology 22, 677-712.
- Hultmark, D., 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. Current Opinion in Immunology 15, 12-19.
- Jones, J.C., 1970. Hemocytogenesis in insects. Appleton Press, New York.

- Kavanagh, K., Reeves, E.P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenecity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 101-112.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. , 1996. Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú 144.
- Kiger, J.A., Natzle, J.E., Green, M.M., 2001. Hemocytes are essential for wing maturation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 10190-10197.
- Kohlmaier, A., Edgar, B.A., 2008. Proliferative control in *Drosophila* stem cells. *Cell Biology* 20 (6), 699-706.
- Kurata, S., Kobayashi, H., Natori, S., 1991. Participation of a 200-kDa hemocyte membrane protein in the dissociation of the fat body at the metamorphosis of *Sarcophaga*. *Developmental Biology* 146, 179-185.
- Kurata, S., Saito, H., Natori, S., 1992. The 29 kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Developmental Biology* 153, 115-121.
- Lackie, A.M., 1988. Haemocyte behaviour. *Advances in Insect Physiology* 21, 85-178.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry* 32 (10), 1295-1309.
- Lebetsky, T., Chang, T., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2000. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-149.
- Machado, J.O., 1971. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura* 23 (5), 625-633.
- Murray, M. A., Fessler, L. I., Palka, J., 1995. Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* 168, 150-165.
- Nardi, F., Carapelli, A., Fanciulli, P.P., Dallai, R., Frati, F., 2001. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielanensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution* 18, 1293-1304.
- Nardi, J.B., Miklasz, S.D., 1989. Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue and Cell* 21, 559-567.
- Ratcliffe, N.A., 1993. Cellular defense responses of insects: unresolved problems. *Parasites and Pathogens of Insects* 1, 267-304.

- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology* 97, 183-350.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M., Reuter, R., 1996. A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 122, 4023-4031.
- Rheuben, M.B., 1992. Rheuben, M.B., 1992. Degenerative changes in the muscle fibers of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Experimental Biology* 167, 91-117.
- Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31, 1-26.
- Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Annual Review of Entomology* 40, 31-56.
- Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004. Metabolism of imidacloprin in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* 60, 291-296.
- Velthuis, H.H.W., 1992. Pollen digestion and the evolution of sociality in bees. *Bee World* 73 (2), 77-88.
- Yamashita, M., Iwabuchi, K. 2001 M. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures, *Journal of Insect Physiology* 47, 325–331.
- Wang, L., Ligoxygakis, P., 2006. Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology* 211, 251-261.

CLONAGEM PARCIAL,
SEQUENCIAMENTO E
EXPRESSÃO DO GENE *TOLL* EM
MELIPONA SCUTELLARIS
(HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI)



Capítulo III

1. Resumo

Insetos são continuamente expostos a microrganismos potencialmente patogênicos, mas apenas alguns contatos resultam em infecção. Insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa contra patógenos e parasitas, que envolve o tegumento e intestino como barreiras físicas para infecção; respostas coordenadas de vários tipos de hemócitos quando estas barreiras são violadas e a síntese de peptídeos antimicrobianos e proteínas, principalmente pelo corpo gorduroso. Nosso objetivo foi clonar e sequenciar parcialmente um gene do sistema imune inato *MsToll* da abelha *Melipona scutellaris*. Por análises de RT-PCR semiquantitativo avaliou-se os níveis de expressão de *MsToll* em diferentes estágios do desenvolvimento e em diferentes tecidos de operárias de *M. scutellaris*. A expressão de *MsToll* na resposta imune foi avaliada por RT-PCR tempo real em operárias infectadas com *Escherichia coli* (gram-negativa). Os resultados mostraram menor expressão do gene *MsToll* nos estágios larvais quando comparados com os demais estágios do desenvolvimento. A análise tecido específico de *MsToll* mostrou que em intestino sua expressão foi significativamente maior quando relacionado com os demais tecidos analisados. Com relação aos níveis de *MsToll* na resposta imune observou-se o aumento de quatro vezes dos níveis desse transcrito em abelhas infectadas com *E. coli* comparadas com o controle.

Palavras-chave: Receptor Toll, resposta imune inata, abelha sem ferrão.

2. Abstract

Insects are continuously exposed to potentially pathogenic microorganisms and eukaryotic parasites, but only a few encounters result in infection. Insects possess a complex and efficient system of biological defense against pathogens and parasites. This system involves the following: the integument and gut as physical barriers to infection, coordinated responses of several subpopulations of hemocytes when these barriers are breached, and the induced synthesis of antimicrobial peptides and proteins, primarily by the fat body. The purpose in the present study was to verify a Toll receptor (*MsToll*) expression in *Melipona scutellaris*. By semiquantitative RT-PCR we evaluate the *MsToll* levels at different development stages and in different *M. scutellaris* workers tissues. The *MsToll* expression in the immune response was evaluated by real time RT-PCR in workers infected with *Escherichia coli* (gram-negative). Our data showed lower *MsToll* expression in the larval stage compared with other development stages. The specific tissue analysis showed that its expression in intestine was significantly higher compared with other tissues analyzed. Furthermore, the *MsToll* levels in innate immune response of *M. scutellaris* showed four folds enhanced in bees infected with *E. coli* compared with control.

Keywords: Toll receptor, innate immune response, stingless bee.

3. Introdução

As abelhas, insetos sociais, vivem em colméias populosas e a densidade, bem como a presença de recursos armazenados dentro das colméias, as tornam atraentes para agentes patogênicos (Schmid-Hempel, 1998). Para minimizar os danos causados pelos microorganismos os insetos sociais apresentam estratégias de defesa individuais e em grupo no combate às infecções. Mecanismos sociais incluem a construção dos ninhos com materiais antimicrobianos (Christe et al., 2003), a identificação e retirada da colméia, de larvas infectadas (Spivak e Reuter, 2001) e transferência de traços imunes (Traniello et al., 2002; Sadd et al., 2005). Como a maioria dos eucariotos, os insetos possuem defesas individuais, incluindo as respostas imunes (Casteels-Josson et al., 1994; Evans, 2004).

Os insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa individual representado pela cutícula que os recobre e pelo tubo digestivo, que limitam a invasão da cavidade hemocélica. Quando essas barreiras são vencidas, desencadeia-se o processo de resposta celular e a indução da síntese de peptídeos antimicrobianos e proteínas de defesa (Ratcliffe e Whitten, 2004; Little et al., 2005). A reação celular é efetuada pelos hemócitos, células circulantes da hemolinfa que atuam de várias maneiras. Na presença de pequenos organismos, como as bactérias, os hemócitos realizam a fagocitose. Quando o número de bactérias é elevado ou quando parasitas maiores são os responsáveis pela infecção, grupos de hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em torno dos organismos invasores, provocando a morte deles por asfixia ou pela ação de substâncias tóxicas que são liberadas no interior dos nódulos ou cápsulas (Silva, 2000).

Insetos, da mesma forma que outros artrópodes e vertebrados, possuem mecanismos para reconhecer polímeros encontrados exclusivamente em microorganismos com padrões moleculares específicos, os chamados PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*). O reconhecimento se dá através de receptores específicos para essa função, os PRR (do inglês, *pattern recognition receptors*) que podem mediar respostas celulares como a fagocitose,

desencadear cascatas de serino-proteases que ativam respostas de melanização ou regular a síntese e secreção de fatores antimicrobianos (Kavanagh e Reeves, 2004). Um dos PRR mais estudado nos insetos é o Toll que é um receptor transmembrânico com um domínio extracelular contendo regiões ricas em leucinas e um domínio intracelular similar ao do receptor interleucina-1 (Leclerc e Reichhart, 2004).

As abelhas sem ferrão são muito frágeis quando expostas à destruição de seus habitats, os ocos de árvores, que vêm sendo intensamente derrubadas. Buscando áreas não adequadas para estabelecimento de suas colônias podem ser alvo de patógenos. Não foram relatados, ainda, na literatura trabalhos sobre o sistema imune das abelhas sem ferrão. Nesse contexto, propõe-se caracterizar o gene *Toll* na abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* e avaliar sua expressão em abelhas infectadas por bactérias. Compreender a imunidade desses insetos é importante para subsidiar programas de conservação da espécie.

4. Material e Métodos

4.1. Material Biológico

4.1.1. Abelhas

Nos experimentos foram utilizadas abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris*, mantidas no Meliponário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG (S 18° 55' / W 45° 17'). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia.

As fases de desenvolvimento das abelhas *M. scutellaris* são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Fases de desenvolvimento de *Melipona scutellaris*

Fases do desenvolvimento	Caracterização
L1	Larva 1
L2	Larva 2
L3	Larva 3
Pw	Pupa de corpo branco, olho branco
Pp	Pupa de corpo branco, olho rosa
Pb	Pupa de corpo branco, olho marrom
Pbl	Pupa de corpo branco, olho marrom escuro
Pbm	Pupa com pigmentação leve, olho marrom escuro
Pbd	Pupa com pigmentação forte, olho marrom escuro
RN	Adulto recém-nascido
N	Nurse (Abelha Nutridora)
F	Forrageira (Abelha Campeira)

Os estágios de larva, referidos na Tabela 1, foram identificados segundo Rossini (1989) e Dias et al. (2001) e os de pupa, segundo Dallacqua (2007) de acordo com a cor do corpo e pigmentação do olho. Em *M. scutellaris*, o 3º instar larval é subdividido em L3-1: alimento líquido na célula de cria, as larvas estão sobre o alimento, curvadas e tem cor perolada; L3-2: alimento com consistência viscosa, as larvas continuam curvadas e sua cor é perolada; L3-3: alimento na célula de cria seco e com consistência sólida, as larvas começam a mudar de posição e tem cor perolada brilhante; LPD: célula de cria sem alimento e, ainda, não teve início o processo de defecação, as larvas estão em forma de vírgula, dentro do alvéolo, tem cor perolada e continuam brilhantes; LD: célula de cria sem alimento e teve início o processo de defecação, as larvas são esbranquiçadas e opacas, estão eretas e com a cabeça voltada para cima.

Para caracterização do gene *Toll* no desenvolvimento de *M. scutellaris*, abelhas de todos os estágios e adultos foram estocadas em 1mL de reagente Trizol (Ludwig Biotec) para posterior extração do RNA total. A quantificação de transcritos *Toll* em abelhas infectadas foi realizada em operárias adultas.

4.1.2. Agente infectante

Foi utilizado como agente causador de infecção em *M. scutellaris* a bactéria *Escherichia coli*_XL1Blue (Gram-negativa), que foi plaqueada em meio Luria-Bertani (LB) sólido (triptona, extrato de Levedura, NaCl e agar) e deixada em estufa 37°C por 24h. Em seguida, as colônias foram coletadas em 1mL de PBS 1X estéril com o auxílio de alça bacteriológica e centrifugadas por 10min a 10000g para formação do *pellet*. O *pellet* foi lavado com PBS 1X três vezes e ressuspensionado em 1mL de PBS 1X estéril. Após lavagem as colônias foram incubadas por uma hora em banho-maria à 60°C, para inativação. A suspensão de bactérias foi quantificada em espectrofotômetro (CG Analítica) a 600nm. Nesse comprimento de onda, a unidade de absorbância corresponde a 10⁹ bactérias/mL. Após leitura, as culturas foram diluídas em PBS 1X estéril para 10⁴ células/mL.

4.2. Extração de RNA Total e Confecção do cDNA

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIZOL (GIBCO) segundo recomendações do fabricante. A abelha foi macerada em 1mL de Trizol para cada 100mg de tecido, agitado em vórtex e incubado por 5min a 30°C. Adicionados 0,2mL de clorofórmio para cada mL de Trizol, agitando-se por 15s e incubando-se a 30°C por 2min, seguidos de centrifugação a 12000g por 15min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para microtubo de 1,5mL ao qual foram adicionados 500µL de isopropanol para cada mL. As amostras foram incubadas *overnight* a -20°C. Posteriormente, foram centrifugadas a 12000g por 30min, a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7500g por 5min à 4°C. Depois da secagem ao ar, o material foi ressuspensionado em água DEPC e quantificado em espectrofotômetro (CG Analítica) a 260nm.

O DNA genômico contaminante foi removido utilizando-se 10U de Dnase I para cada 10µg de RNA. À reação adicionou-se ainda 10U de inibidor de RNase (Invitrogen). A reação foi realizada incubando-se por 40min a 37°C, com posterior aquecimento a 70°C por 10min para inativação da enzima.

A síntese de cDNA (RT) foi feita utilizando-se o sistema de síntese *M-MLV transcriptase reverse* (Promega) e Oligo dT (15) (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é

sintetizada através de transcrição reversa. A segunda fita é gerada por PCR com o uso de *primers* específicos.

4.3. RT-PCR Semiquantitativo

Um microlitro da reação de RT foi utilizado para amplificar o fragmento gênico *MsToll* utilizando 200µM de dNTP, 2mM de MgCl₂, Tampão 1X, 6pmol de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA Polimerase (Real-biotech).

A amplificação foi processada em um ciclo inicial de 95°C por 5min, seguido de trinta e cinco ciclos de 95°C por 40s, 58°C por 40s 72° por 1min. e extensão final a 72° por 5min.

Os *primers* foram desenhados com base na sequência do gene predito *Toll* de *Apis mellifera* (GenBank: XM_396158), Forward: 5' GCTGGAGAATGGATACCAACACA 3' e Reverse 5' CGTCCCCAAACACTTTCCAA 3'. O gene codificador da proteína ribossomal (RP49) foi utilizada como gene endógeno para normalização da reação (F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT, R: 5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'). Em estudo realizado por Lourenço e colaboradores (2008) em *A. mellifera* o gene RP49 foi considerado o único gene entre todos analisados (*act*, *rp49*, *ef1-alpha*, *tbp-af*) em que as mudanças nos níveis de expressão entre diferentes estágios de desenvolvimento não foram significativas. Foi feita uma cinética da reação (curva de saturação) para verificar o número de ciclos ideais para cada gene. A densitometria óptica (O.D.) foi analisada em programa IMVDS (*Image MasterTM VDS Software*, versão 2.0-Pharmacia Bioscience). Os valores obtidos foram submetidos à razão mRNA gene analisado/ mRNA RP49, para obtenção da expressão relativa de cada gene nos indivíduos analisados.

4.4. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos *MsRP49* e *MsToll*

Os fragmentos *MsRP49* e *MsToll* foram inseridos em vetor plasmidial pGEM-T Easy (Promega) e a reação de ligação foi processada de acordo com instruções do fabricante.

O produto da reação de ligação (3µL) foi misturado levemente com 200µL de células eletrocompetentes *E. coli* XL1Blue, colocados em cuveta gelada e eletroparados 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 shaker a 250g e plaqueado em 100µL de meio LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina.

Colônias transformadas (clones positivos ou colônias brancas) foram replicadas em 5mL de meio LB líquido adicionado de Ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37°C por 16-24h, sob agitação. Centrifugou-se 1,5mL a 6000g, descartando o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 200µL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5M, pH 8,0; Tris-HCl 1M, pH 7,4) e incubadas no gelo por 5min. Em seguida foram adicionados 200µL de solução II (NaOH 2M, SDS 10%) recém preparada e homogeneizada por inversão. Após a lise celular foram adicionados 150µL de solução III (KoAC 3M) e 2µL de RNase (10mg/mL) e incubado por 10min. Centrifugação por 15min a 13000g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, ao qual foram adicionados 500µL de isopropanol. O *pellet* foi lavado com 600µL de etanol 70% gelado e ressuspendido em 20µL de água Mili-Q. O plasmídeo foi quantificado a 260nm em espectrofotômetro (CG Analítica) e visualizado em gel de agarose 0,8%. Os Clones positivos foram sequenciados em MegaBace (AMERSHAM) utilizando protocolo padrão. As análises de bioinformática foram realizadas por meio de ferramentas de bioinformática (BLAST, CLUSTALW, *CAP3 Contig Assembly Program*, Prosite, ProDom, ExPASy translate, *Search Conserved Domains on a Protein*).

4.5. Infecção das Abelhas

Para quantificar os transcritos do gene *MsToll* em *M. scutellaris*, operárias foram infectadas com bactéria Gram-negativa.

O controle para avaliação do efeito da injeção constou de operárias injetadas com 1µL de PBS 1X. No experimento para análise da resposta imune em abelhas infectadas, as operárias foram inoculadas com 1µL de *E. coli* (4,6 x 10⁴ cells/mL). Os indivíduos foram colocados em placa de Petri forradas com papel de filtro e mantidas em estufa a 32°C e 75% de umidade relativa (ASTM). Após 24h realizou-se a extração do RNA total e análise por PCR tempo real (qPCR).

4.6. Análise por RT-PCR em Tempo Real

A quantificação dos mRNA de *MsToll* induzidos pela infecção com bactérias foi realizada pela técnica por PCR Tempo Real, a qual é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA ciclo a ciclo.

As reações de RT-PCR foram realizadas simultaneamente para *MsToll* e *RP49*, em placas de leitura ópticas de 96-well, em triplicata. Cada reação continha 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 5.0pmol de cada *primer*, 1µL cDNA em um volume final de 10µL (completado com água Mili-Q). A normalização da reação foi feita com o mRNA do gene constitutivo *RP49*.

Os *primer* para os genes *Toll* e *RP49* foram desenhados usando *Primer Express software* (Applied Biosystem).

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 C_T foi definido como o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores do C_T foram calculados pelo *real-time sequencer detection software* (Applied Biosystems) e foram usados para calcular a expressão do mRNA do gene *MsToll* relativo ao mRNA do gene normalizador *RP49*. Os níveis de expressão foram calculados relativos aos controles (injetados com PBS) usando $2^{-\Delta\Delta C_T}$ equation (Livak and Schmittgen 2001).

Para padronização e análise de eficiência dos *primers* foram feitas reações com diluições seriadas de cDNA: sem diluição, 1:10; 1:100; 1:1000 e construção de curvas de regressão linear para cada par de *primer*. A eficiência da reação foi avaliada pelo valor *slope*, dado pela curva, aplicado à fórmula $E=10^{-1/\text{slope}}$ (o valor “E” deve ser próximo a 2).

O *threshold* e a *base line* foram ajustados automaticamente pelo sistema. Os valores de C_T foram transformados em valores de quantificação de acordo com User Bulletin n°. 2 Applied Biosystems.

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, pois os *primers* flanqueiam um Intron. Sendo satisfatório o resultado,

foi processada a reação de qPCR com as amostras dos grupos controle e experimental (infectado).

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico StatView for Windows versão 4.57. (Abacus Concepts, Inc., Copyright 1992 -1996) utilizando análise de variância (ANOVA) e para verificação de possíveis diferenças entre as médias de cada fator a ser estudado, foi utilizado o teste *t-student's*.

5. Resultados

5.1. Clonagem e sequenciamento de fragmento dos genes *MsRP49* e *MsToll* e análise “*in silico*”

Nos experimentos de RT-PCR semiquantitativo e qualitativo, foram usados *primers* específicos para os genes *RP49* e *Toll* de *Apis mellifera* que resultaram em uma banda cada em *M. scutellaris* (Figura 1), as quais foram purificadas do gel de agarose 1,5%. As bandas purificadas foram clonadas em pGEM-T Easy Vector (Promega) segundo recomendações do fabricante.

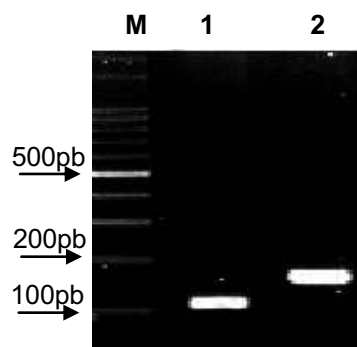


Figura 1: RT-PCR semiquantitativo dos fragmentos dos genes *MsToll* e *MsRP49*. Produtos de RT-PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. M- marcador 100pb (Vivantis); 1- amplicon do *MsToll*; 2- amplicon do *MsRP49*.

Cada fragmento gênico (*MsRP49* e *MsToll*) foi sequenciado quatro vezes para confirmação dos resultados. Para excluir sequências de vetores utilizou-se VecScreen-Blast. O fragmento do gene *MsRP49*, sem o vetor, apresentou 150pb, enquanto o fragmento do gene *MsToll* mostrou 101pb .

Utilizando *CAP3 Contig Assembly Program* (BioEdit), as seqüências dos fragmentos dos genes *MsRP49* e *MsToll* foram alinhadas, formando um único *contig* cada. Utilizando-se a ferramenta de alinhamento Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) comparou-se as seqüências de *MsRP49* e *MsToll* com as seqüências de *Apis mellifera* depositadas no GenBank (RP49, AF441189 e *Toll*, XM_396158) com resultados de 89% e 90% de identidade, respectivamente (Figura 2).

RP49_Melipona_scutellaris	-----CGTCATATGTTGCCAACTGGTTTCAGAAA	29
RP49_Apis_mellifera	IATGGAAGTAACAAAAAACTCGTCATATGTTGCCAACTGGTTTATAGAAA	250

RP49_Melipona_scutellaris	GGTTTGTAGTACACAATSTTAAGGAATTAGAAGTTTGTATGATGCAGAATA	79
RP49_Apis_mellifera	AGTTTGGTACATAATSTCAAGGAAGTGGAAAGTTTAAATGATGCAGAAACA	300

RP49_Melipona_scutellaris	GAAAATTCTGTGCTGAGATTGCTCACGGAGTAAGCAGTAAAAACGTAAA	129
RP49_Apis_mellifera	GAAAATTTGTGCTGAAATTGCTCATGGGGGAGCAGTAAAAACGTAAA	350

RP49_Melipona_scutellaris	TCCATTGTTGAACGTGCTCAA-----	150
RP49_Apis_mellifera	TCCATTGTTGAACGTGCTCAACAACCTTTCAATAAGAGTAAGTTATGCCAG	400

Toll_Melipona_scutellaris	-----GCTGGAGAATGGATACCAACACAAATTGCACGTT	34
Toll_Apis_mellifera	TTTTCGTGATTGGTTAGCTGGAGAATGGATACCAACACAAATCGCGCGTT	2650

Toll_Melipona_scutellaris	CTGTACAGGATCTAGGCGAACGATAGTGGTGTATCACCAGAACTTTTGT	84
Toll_Apis_mellifera	CTGTTGAAGAATCTAGGCGAACGATAGTAGTTTATCACCAGAACTTTTGT	2700
	**** *	
Toll_Melipona_scutellaris	GAAAGTGTGTTGGGGACG-----	101
Toll_Apis_mellifera	GAAAGTGTGTTGGGGACGAATGGAATTTAGAGTGGCGCATTGTCAAGCACT	2750

Figura 2: Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos das cds parciais da proteína ribossomal (RP49) e do receptor *Toll* de *M. scutellaris* com mRNA da RP49 e *Toll* de *Apis mellifera*. Identidade de 89% para RP49 e 90% para *Toll*.

As seqüências de aminoácidos de fragmentos *MsRP49* e *MsToll* foram deduzidas pelo programa Expasy Translate (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>):

MsRP49 → RHMLPTGFRKVLVHNVKEVLMMQNRKFCAEIAHGVSSKKRKSIVERAQ

MsToll → AGEWIPTQIARSVQDSRRITIVLSPNFLESVWG

A análise “*in silico*” dos domínios protéicos dos fragmentos *MsRP49* e *MsToll* foram realizadas nos bancos de dados Prosite (<http://expasy.org/prosite/>), ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/form.php>) e Search Conserved Domains on a Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

No fragmento sequenciado do cDNA da proteína ribossomal de *M. scutellaris* (MsRP49) foram identificados dois domínios relacionados a proteínas ribossomais, por meio de análise pelo ProDom. A busca no NCBI também apresentou domínios ligados a proteínas ribossomais (Figura 3). Utilizando o Prosite a sequência parcial obtida de RP49 de *M. scutellaris* não apresentou similaridade com nenhum domínio protéico depositado nesse banco.

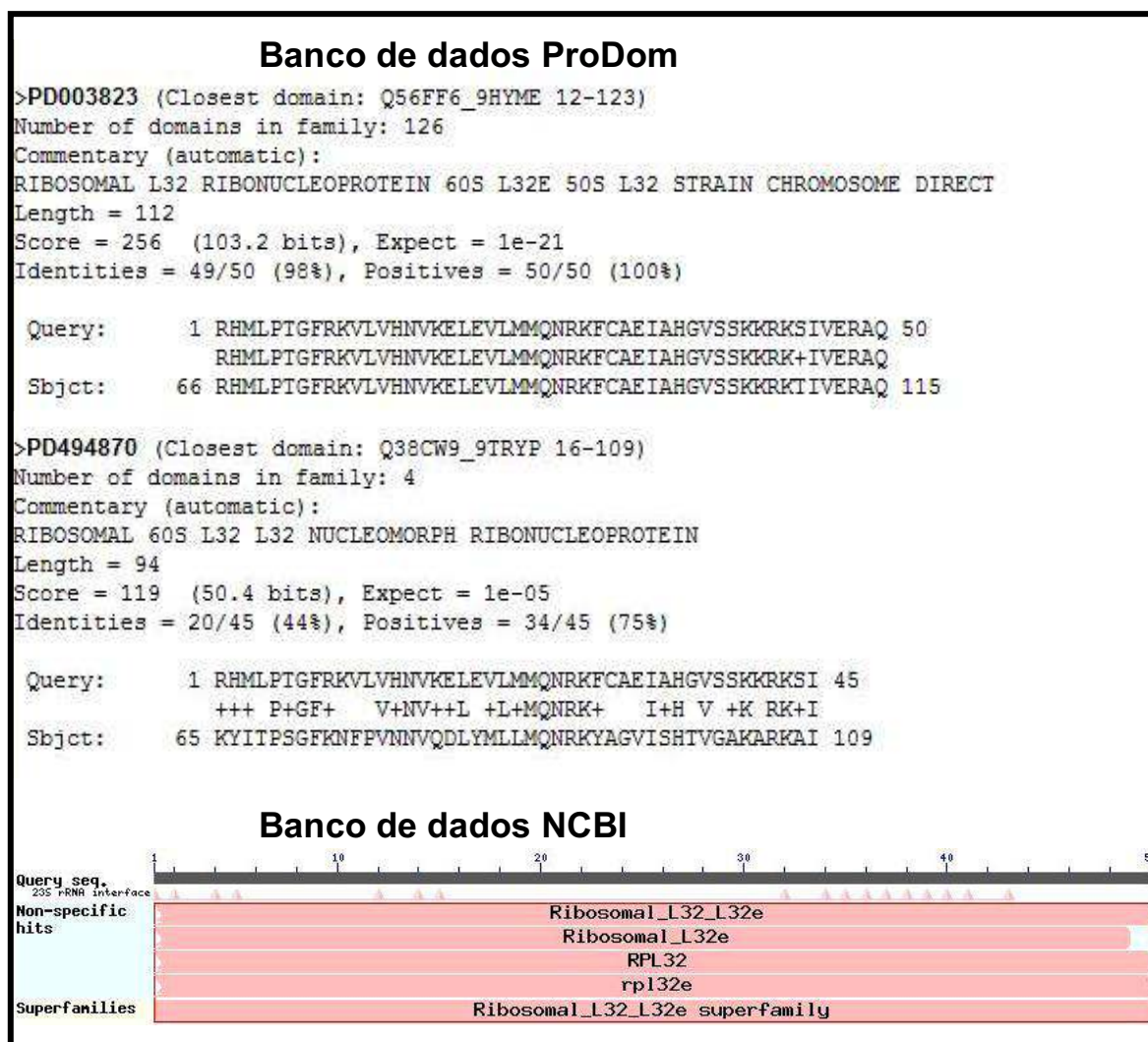


Figura 3: Análise de domínio do fragmento sequenciado do cDNA da RP49 de *M. scutellaris* utilizando o programa ProDom e *Search Conserved Domains on a Protein*.

A pesquisa por motivos protéicos para o sequenciamento parcial do *MsToll* pelo ProDom revelou identidade com a família PD002366, que corresponde a receptores *Toll-like*. Análises de domínios pelo Prosite e NCBI mostraram, também, relação aos receptores Toll, classificando o *MsToll* como

pertencente a superfamília TIR (Figura 4). O domínio Toll/ interleukin-1 receptor (TIR) pertence ao grupo de sinalizadores intracelulares encontrados em MyD88, interleucina-1 e os receptores Toll. Ele contém três regiões altamente conservadas e medeia a relação proteína-proteína entre os “*Toll like receptors*” e os componentes da via de transdução (Marchler-Bauer et al., 2007).

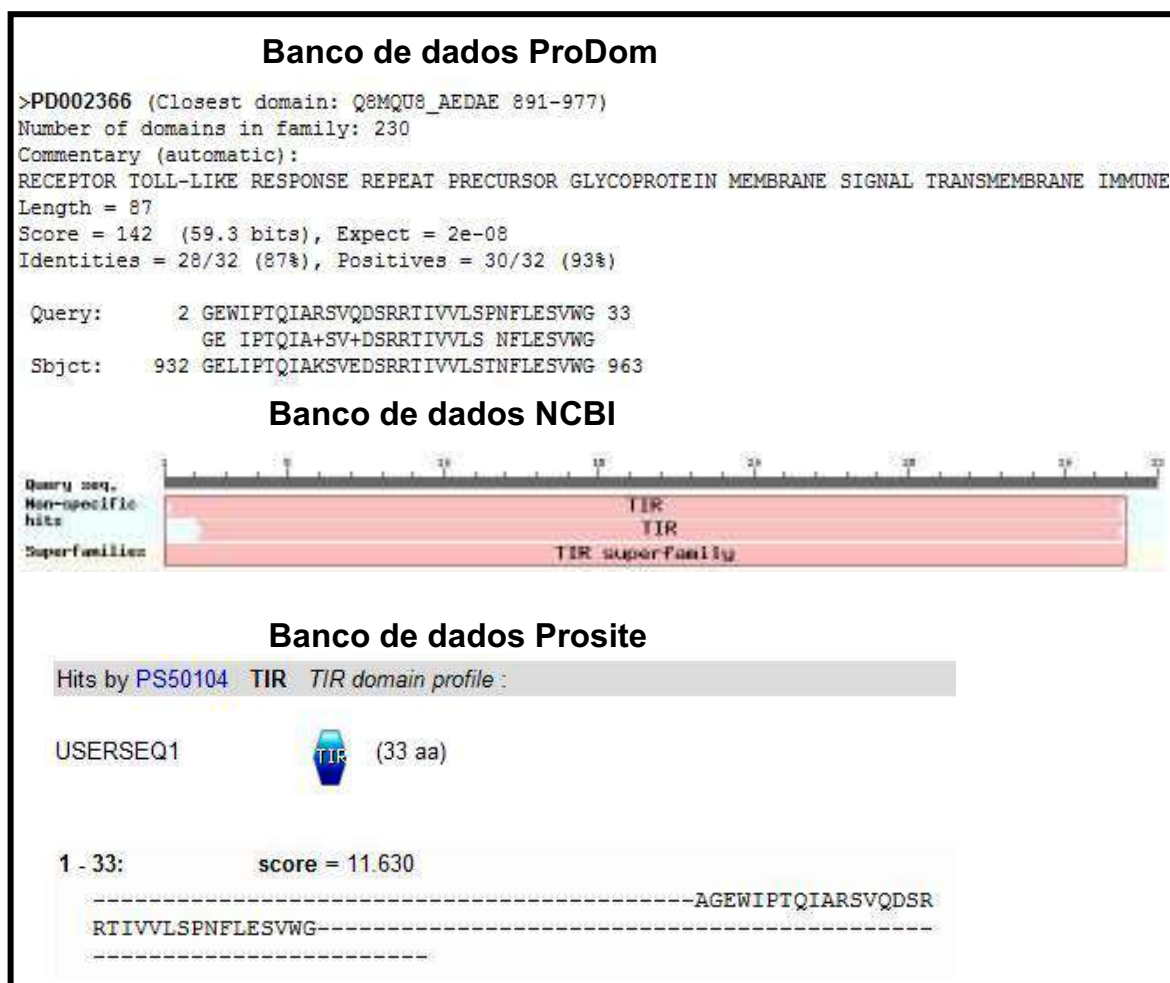


Figura 4: Análise do domínio do fragmento parcial *MsToll* utilizando o programa ProDom, Search Conserved Domains on a Protein (NCBI) e Prosite.

Foi realizado alinhamento entre as proteínas Toll de *M. scutellaris* (fragmento parcial), *A. mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Nasonia vitripennis* e *Aedes aegypti* mostrando que a região analisada é altamente conservada entre esses insetos.

Melipona	-----AGEWIPTQIARSVQD	15
Apis	DKDKLYDAFISYSHKDEDFVNVLPKLENGPKPKLCLHFRDWLAGEWIPTQIARSVEE	887
Nasonia	DRDKSYDAFISYSHKDEEFVLKELVAKLEDGPKPYRLCIHIRDWLAGEWIPMQIARSVEE	901
Aedes	DKDKLYDAFISYSHKDEEFITEHLVPTLEKEPMNFKTCWHVRDWMPEGELIPTQIAKSVED	945
Drosophila	DKDKKFDADFISYSHKDQSFIEDYLVLPQLEHGPQKFQQLCVHERDWLVGGHIPENIMRSVAD	844
	* * * : * : * * :	
Melipona	SRRTIVLSPNFLESVWG-----	33
Apis	SRRTIVLSPNFLESVWGRMEFRVAHCQALSERRSKVILILYDEIGPINNLDPELKAYMS	947
Nasonia	SRRTIVLSPNFIESVWGRMEFQAAHKQALSEKRARLIVVVYGEIGPTDELEPELRLAYLQ	961
Aedes	SRRTIVLSTNFLESVWGRMEFRTAHLTSMEKKRARVIVIIYGDIGSIEDLDPELKAYLK	1005
Drosophila	SRRTIIVLSQNFIFKSEWARLEFRAAHRSALENGRSRIIVIIYSDIGDVEKLDEELKAYLK	904
	*****:*** ***: * *	

Figura 5: Alinhamento da sequência parcial da proteína *MsToll* com outras proteínas Toll de insetos, utilizando o resultado do programa ClustalW. As posições conservadas em todas as proteínas estão identificadas com um asterisco abaixo. Na margem direita está indicada a posição dos aminoácidos. Sequências utilizadas e respectivo número de acesso no GenBank: *M. scutellaris*, *A. mellifera* (XM_396158), *Drosophila melanogaster* (AAQ64937), *Nasonia vitripennis* (XP_001604577) e *Aedes aegypti* (AAM97775). (*) aminoácidos idênticos, (:) e (.) aminoácidos similares.

5.2. Expressão de *MsToll* durante o desenvolvimento de *Melipona scutellaris*

As reações de RT-PCR foram feitas em tubos separados, mantendo a mesma proporção de todos os reagentes e, também, temperatura de anelamento de *primers* a 58°C, tanto para *MsRP49* quanto para *MsToll*. A partir de uma curva cinética da fase log de amplificação para os genes *MsToll* e *MsRP49* (considerando a leitura de densidade óptica), determinou-se que o número ideal de ciclos para as reações de PCR para que não houvesse saturação era 30 ciclos para *MsToll* e 33 ciclos para *MsRP49*.

Para o cálculo dos níveis relativos de mRNA de *MsToll* foram feitos três experimentos independentes, com normalização pela expressão do gene *MsRP49* e cálculo das médias e desvio padrão. A expressão de transcritos de *MsToll* ocorreu ao longo de todo desenvolvimento da *M. scutellaris*, com flutuação na expressão dos transcritos dentro das fases larval, pupal e adultos (Figura 6), segundo as análises de densitometria óptica. No estágio larval, os indivíduos apresentam menor expressão quando comparados com os estágios de pupa e adulto. Foi observado pico máximo em abelhas nutridoras.

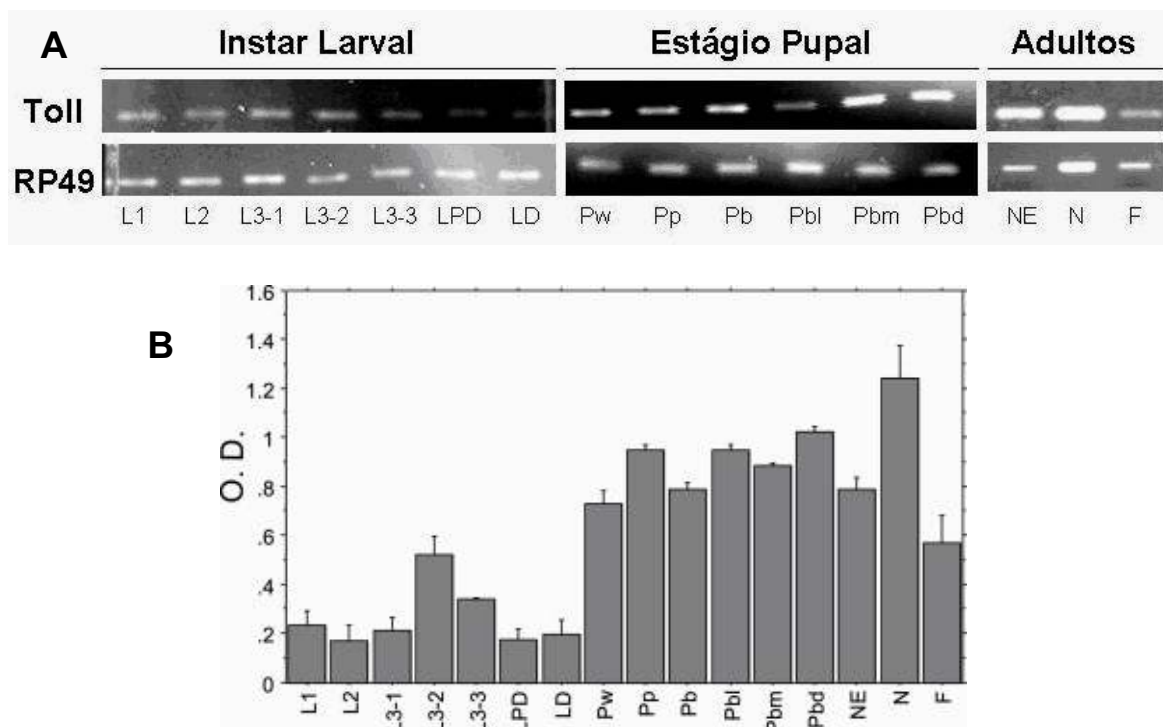


Figura 6: Perfil de expressão do gene *MsToll* em larvas, pupas e adultos de *Melipona scutellaris*. **(A)** Visualização em gel de agarose 1,5% dos transcritos *MsToll* durante o desenvolvimento de *M. scutellaris*. **(B)** Análises feitas por densitometria óptica (O.D.) a partir de RT-PCR semiquantitativa, submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O gene da proteína ribossomal 49 (RP49) foi usado como gene endógeno normalizador. As fases do desenvolvimento analisadas foram L1 (larva 1), L2 (larva 2), L3-1 (larva 3 estágio 1), L3-2 (larva 3 estágio 2), L3-3 (larva 3 estágio 3), LPD (larva pré-defecante), LD (larva defecante), Pw (pupa olho branco), Pp (pupa olho rosa), Pb (pupa olho marrom), Pbl (pupa olho marrom escuro), Pbm (pupa olho marrom escuro e corpo com pigmentação leve), Pbd (pupa olho marrom escuro e corpo com pigmentação forte).

5.3. Expressão do gene *MsToll* em diferentes tecidos

A avaliação do perfil de expressão do *MsToll* tecido específico foi realizada em intestino médio, intestino posterior, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e cabeça de operárias nutridoras (Figura 7). Essa fase foi escolhida por ter apresentado o maior padrão de expressão quando avaliada a expressão de *MsToll* durante o desenvolvimento de *M. scutellaris*. Os resultados mostraram expressão significativamente maior (ANOVA, $p < 0.05$) do gene *MsToll* no intestino (médio e posterior) do que nos demais tecidos. Em túbulos de Malpighi foi detectada a menor expressão de transcritos.

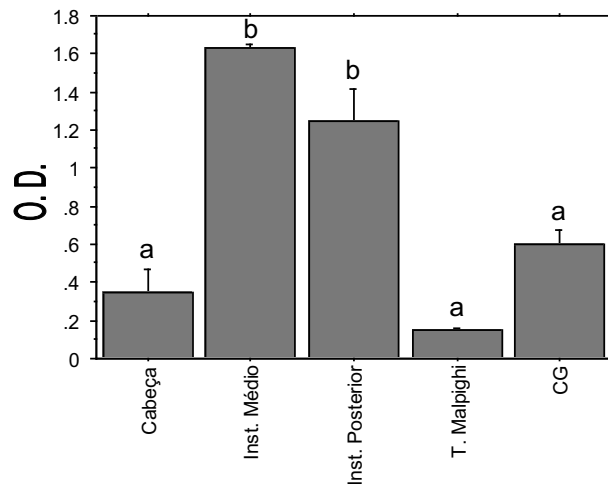


Figura 7: Transcritos do *MsToll* (cds parcial) em tecidos de *Melipona scutellaris*. Análises feitas por densitometria óptica (O.D.) a partir de RT-PCR semiquantitativa, submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O gene da proteína ribossomal 49 (RP49) foi usado como gene endógeno normalizador. A expressão foi analisada em intestino médio e posterior, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso (CG) e cabeça de operárias nutridoras. Diferentes letras significam as diferenças entre os grupos (ANOVA, $p < 0.05$).

5.4. Modulação do gene *MsToll* por bactéria gram-negativa

Para quantificar a expressão do gene *MsToll* em operárias infectadas realizou-se RT-PCR em tempo real após 24 horas da injeção com *E. coli*. A infecção com bactéria gram-negativa promoveu aumento de quatro vezes na produção de mRNA do gene *MsToll* (Figura 8).

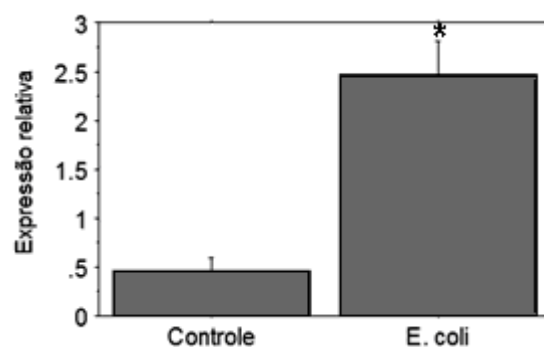


Figura 8: Quantificação do mRNA do gene *MsToll* por PCR Tempo Real. Controle: representa abelhas injetadas com PBS. *E. coli*: abelhas infectadas com essa bactéria. * representa aumento significativo de quatro vezes na expressão desse gene ($p < 0,01$).

6. Discussão

Considerando os estudos sobre o sistema imune dos invertebrados, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune das abelhas sem ferrão é inexistente. Ao lado da defesa social apresentada por indivíduos que vivem em sociedades, a sobrevivência depende, além de outros fatores, da presença de um eficiente sistema de defesa individual, que garantirá que o organismo patogênico seja rapidamente eliminado.

Nos insetos, os genes codificadores de uma série de moléculas antimicrobianas são induzidos por infecção e após algumas horas essas moléculas são secretadas na hemolinfa (Engström, 1998; Manetti et al., 1998). Primeiramente, para produção dessas moléculas os patógenos devem ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão. Os receptores *Toll* são fundamentais para ativação do sistema imune inato nos invertebrados através do reconhecimento de PAMPs. Em 2006, Evans e colaboradores, identificaram em *Apis mellifera* cinco receptores Toll: Toll1, Toll2/18w, Toll6, Toll8/Trex/Tollo e Toll10, no entanto, não é conhecido nenhum dado na literatura referente à expressão do gene *Toll* na abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*.

Neste trabalho buscamos identificar e caracterizar um gene *Toll* durante o desenvolvimento de *M. scutellaris*. Também avaliamos sua expressão em tecido específico e em abelhas infectadas com bactéria gram-negativa tentando estabelecer sua ligação com o sistema imune.

As abelhas armazenam dentro das colméias suas fontes de alimento (pólen, néctar e mel) tornando-se atraentes para agentes patogênicos (Schmid-Hempel, 1998). As abelhas sem ferrão apresentam grande variedade de microorganismos associados a elas, como bactérias (Machado, 1971; Cruz-Landim, 1996), fungos (Gilliam et al., 1990) e ácaros (Eickwort, 1990). Esses microorganismos podem ser mutualistas, sendo fundamentais para a conversão metabólica ou preservação dos alimentos em ambientes úmidos e quentes (Gilliam, 1997; Ramos, 1997). Os microorganismos podem, também, ser parasitas ou comensais, sendo que alguns podem causar doenças em abelhas como, *Paenbacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*, responsáveis, respectivamente,

pelas doenças *American foulbrood* e *European foulbrood* na abelha *A. mellifera* (Lauro et al., 2003; Piccini et al., 2004).

As análises “*in silico*” dos fragmentos *MsRP49* e *MsToll* mostraram que as sequências obtidas de *M. scutellaris* são ortólogas dos genes de *A. mellifera*, pois, o fragmento parcial *MsRP49* possui domínios semelhantes a proteínas ribossomais e, também, apresentou 89% de identidade a *RP49* de *A. mellifera*. A clonagem parcial do *MsToll*, primeiro gene do sistema imune isolado em abelha sem ferrão, caracterizou-se por fazer parte do domínio TIR, um domínio intracelular homólogo ao do Toll/receptor de IL-1, que é altamente conservado nos animais (Leulier e Lemaitre, 2008). Na análise de alinhamento da sequência de aminoácidos do *Toll* mostra que esse domínio é conservado entre os insetos.

A expressão do gene *MsToll* foi investigada durante os estágios do desenvolvimento (larva, pupa e adulto) de *M. scutellaris* por meio de RT-PCR semiquantitativa. Nos estágios larvais as abelhas apresentaram baixa expressão do gene *Toll*, alguns autores acreditam que as larvas de *A. mellifera* podem ser estéreis inicialmente, e ao serem alimentadas com néctar e pólen (alimento larval) pelas operárias, adquirem a flora bacteriana das mesmas (Snowdon e Cliver, 1996; Gilliam, 1997). Em *Melipona*, após o aprovisionamento, a rainha realiza oviposição em cima da camada mais líquida do alimento (Sakagami e Zucchi, 1963), camada que também contém bactérias, principalmente do gênero *Bacillus* (Ramos, 1997; Santos, 2007). O fato de baixa expressão pode estar relacionado a processos evolutivos que levaram as larvas a reconhecerem essa microbiota do alimento como não patogênica.

O alimento larval é composto de três produtos principais: pólen e carboidratos, que foi previamente coletado das flores e estocado separadamente em potes de mel ou de pólen, e proteínas secretadas pelas glândulas hipofaringenea (Roubik, 1982). De acordo com Hartfelde e Engels (1988), o alimento larval das abelhas sem ferrão contém 40-60% de água, 5-12% açúcar e 0,2 a 1,3% aminoácidos. Mesmo o alimento larval sendo rico em nutrientes não constitui fonte principal de microorganismos. Ramos, 1997 observou grande número de microorganismos no mel ($2,2 \times 10^5$ ufc/mL) e pólen ($4,0 \times 10^4$ ufc/mL) e números significativamente menores no alimento larval ($4,0 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^1$ ufc/mL) sendo, principalmente, bactérias do gênero *Bacillus* (Gilliam et al., 1990).

Nesse trabalho os indivíduos adultos apresentaram maior expressão do *MsToll* em relação a larvas e pupas. Abelhas recém-nascidas e indivíduos adultos (nutridoras e forrageiras) adquirem os microorganismos externos a colméia quando começam a alimentação. A inoculação microbial e a colonização do intestino são resultados do consumo de pólen e da trofalaxia, processo de alimentação em que um indivíduo transfere para outro o alimento que se encontra dentro do seu próprio tubo digestivo por regurgitação (Gilliam et al., 1983). Nossos dados mostraram que a maior expressão do gene *MsToll* em adultos é acentuada em operárias nutridoras, esse maior número de transcritos nos permite associar diretamente a atividade desempenhada por essas operárias com maior contaminação por microorganismos. Nutridoras trabalham o tempo todo com bactérias presente no pólen, mel e realizam trofalaxia com campeiras que acabaram de chegar do ambiente externo.

Os insetos abrigam rica e complexa comunidade de microorganismos no seu intestino e em outras regiões do organismo. Esta microbiota pode interagir de diferentes formas que vai desde a patogênese até o mutualismo (Dillon e Dillon, 2004). Avaliando a expressão do fragmento *MsToll* em diferentes tecidos de operária nutridora percebemos sua maior expressão em intestino (médio e posterior). No intestino de *A. mellifera* é encontrado cerca de 1% de leveduras, 29% de bactérias gram-positivas, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bacterium*, *Streptococcus* e *Clostridium* e 70% de bactérias gram-negativas ou gram variáveis, incluindo *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* (Tisset et al., 1970; Gilliam et al., 1988). Em *Melipona*, ainda, não foram relatados dados sobre a microbiota intestinal. A elevada transcrição do gene *MsToll* no intestino pode estar relacionada ao fato desse tecido ter mais contato diretamente com bactéria do que outros tecidos.

Neste trabalho infectamos operárias com bactéria gram-negativa, *Escherichia coli* e avaliamos a transcrição do *MsToll* após 24 horas da aplicação. Nas abelhas controle, somente a injeção com PBS 1X foi realizada. Nossos dados mostraram uma expressão, do gene *MsToll*, quatro vezes maior em operárias infectadas com bactéria gram-negativa, comparado a injúria (injeção com PBS 1X).

A via Toll é ativada por bactérias gram-positivas e fungos pela ligação do receptor a PAMPs e peptidoglicanos e, também, pela ligação à substâncias da membrana de bactérias gram-negativas (Medzhitov e Janeway, 1997; Hoffmann, 2003; Bischoff et al., 2004). Em *Drosophila* já foi demonstrado que a via Toll, também, é componente essencial da resistência viral em moscas (Zambon et al., 2005). Estudos em *Drosophila* mostraram que via Toll é ativada, preferencialmente, quando as infecções são causadas por bactérias gram-positivas e fungos e a via Imd (immune deficiency) é responsável pela produção de peptídeos antimicrobianos em resposta a infecção por bactérias gram-negativas (Tanji e Tony Ip, 2005). Lourenço, 2007 realizou infecção de bactérias (gram-positivas e gram-negativas) e fungos em *A. mellifera* e não observou preferência entre as vias Toll e Imd na produção dos peptídeos antimicrobianos. Os dados obtidos por Lourenço (2007) e Evans et al. (2006) reforçam a hipótese de que não exista em *A. mellifera* ativação da via por especificidade de agente infeccioso. Nossos resultados sugerem que a abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, apresenta resposta imune semelhante à abelha *A. mellifera*.

Embora haja uma tendência para pensar que o sistema imune dos invertebrados seja tão simples em comparação com a imunidade dos vertebrados, a diversidade de insetos leva a um enorme potencial de variação e especialização celular e molecular. A biodiversidade desses organismos tem proporcionado modelos importantes para estudos de suas estratégias de defesa, as quais podem fornecer informações relevantes para o combate de pragas agrícolas e na descoberta de moléculas antimicrobianas que podem ser exploradas pelo homem.

7. Referencias Bibliográficas

- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I.G., Michel, T., Hoffmann, J.A., Royet, J., 2004. Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nature Immunology* 5, 1175-1180.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P., 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry* 269, 28569-28575.

- Christe, P., Oppliger, A., Bancalà, F., Castella, G., Chapuisat, M., 2003. Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters* 6, 19-22.
- Cruz-Landim, C., 1996. Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata anthioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Journal of Hymenoptera Research* 5, 264-272.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology* 49, 71-92.
- Eickwort, G.C., 1990. Association of mites with social insects. *Annual Review Entomology* 35, 469-488.
- Engström, Y., 1998. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insect*. Chapman & Hall, London.
- Evans, J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honeybee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85, 105-111.
- Gilliam, M., 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155 (11), 1-10.
- Gilliam, M., Lorenz, B.J., Richardson, G.V., 1988. Digestive enzymes and microorganisms in honey bees, *Apis mellifera*: influence of streptomycin, age, season and pollen. *Microbios* 55, 95-114.
- Gilliam, M., Mojett, J.O., Kaujeld, N.M., 1983. Examination of the floral nectar of citrus, cotton, and Arizona desert plants for microbes. *Apidologie* 14, 299-302.
- Gilliam, M., Roubik, D., Lorenz, B., 1990. Microorganisms associated with pollen, honey and brood provision in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21, 89-97.
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- Kavanagh, K., Reeves, E.P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenecity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 101-112.
- Lauro, F.M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassu, M., Bertolini, G., 2003. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive sample with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology* 81, 195-201.
- Leclerc, V., Reichhart, J.M., 2004. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunology Reviews* 198, 59-71.
- Leulier, F., Lemaitre, B., 2008. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics* 9 (3), 165-178.

- Little, T.J., Hultmark, D., Read, A.F., 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology* 6, 651-654.
- Machado, J.O., 1971. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura* 23 (5), 625-633.
- Manetti, A.G.O., Rosetto, M., Marchini, M., 1998. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall, London.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A.Jr., 1997. Innate Immunity: impact on adaptative immune response. *Current Opinion in Immunology* 9 (4), 9-33.
- Piccini, C., Antúnez, K., Zunino, P., 2004. An Approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. *Journal of Apicultural Research* 43 (3), 101-104.
- Ramos, M.A., 1997. Estudo da flora microbiana em colméia de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811. Dissertação de Mestrado. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 79p.
- Ratcliffe, N., Whitten, M., 2004. SGM Symposium 63: Microbe-vector interactions in vector borne diseases. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roubik, D.W., 1982. Seasonality in colony food storage, brood productions and adult survivorships studies of *Melipona* in tropical forest (Hymenoptera, Apidae). *Entomological Society* 55, 789-800.
- Sadd, B.M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., Schmid-Hempel, P., 2005. Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters* 1, 386-388.
- Sakagami, S.F., Zucchi, R., 1963. Oviposition process in a stingless bee, *Trigona* (*Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera)). *Studia Entomology* 5, 497-509.
- Santos, A.L., 2007. Identificação da flora microbiana em colméias de meliponina. Dissertação de Mestrado. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 46p.
- Schmid-Hempel, 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press, Princeton.
- Silva, P.I., 2000. Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia, USP, 169p.
- Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31, 1-26.

- Spivak, M., Reuter, G.S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555-565.
- Tanji, T., Tony Ip, Y., 2005. Regulators of the toll and imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends in immunology* 26 (44), 193-198.
- Tisset, C., Durand, C., Taliergio, Y.P., 1970. Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. *Journal of Medicine Veterinary* 146, 1471-1492.
- Traniello, J.F.A., Rosengaus, R.B., Savoie, K., 2002. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 6838-6842.
- Zambon, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2005. The Toll pathway is important for antiviral response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (20), 7257-62.