

SAMIRA VEIGA RAVAIANO

**ESTUDO DA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO, DOS HEMÓCITOS
E DOS EFEITOS DO IMIDACLOPRIDO E DA INFECÇÃO
BACTERIANA NAS POPULAÇÕES DE HEMÓCITOS DE *Melipona
quadrifasciata***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R252e
2017 Ravaiano, Samira Veiga, 1987-
Estudo da morfologia do coração, dos hemócitos e dos
efeitos do imidacloprido e da infecção bacteriana nas populações
de hemócitos de *Melipona quadrifasciata* / Samira Veiga
Ravaiano. – Viçosa, MG, 2017.
vii, 88f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão. 2. *Melipona quadrifasciata*. 3.
Meliponini. 4. Microscopia eletrônica. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de
Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

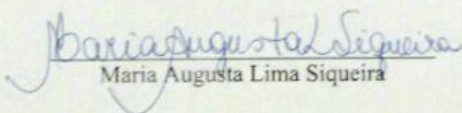
CDD 22 ed. 595.79

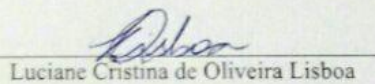
SAMIRA VEIGA RAVAIANO

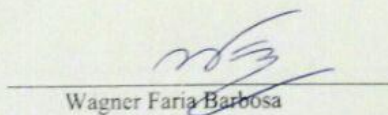
**ESTUDO DA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO, DOS HEMÓCITOS E DOS
EFEITOS DO IMIDACLOPRIDO E DA INFECÇÃO BACTERIANA NAS
POPULAÇÕES DE HEMÓCITOS DE *Melipona quadrifasciata***

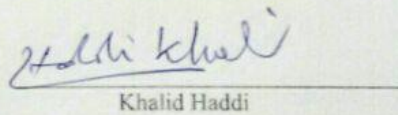
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

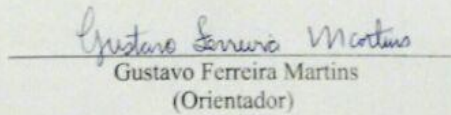
APROVADA: 27 de julho de 2017.


Maria Augusta Lima Siqueira


Luciane Cristina de Oliveira Lisboa


Wagner Faria Barbosa


Khalid Haddi


Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

Ao meu marido, Kenzo, pelo companheirismo,
amizade, compreensão e amor sem medidas.
E aos meus pais, que estiveram sempre presentes
me apoiando e, como sempre, me dedicando o
amor mais puro e incondicional...
...Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por me acolher e possibilitar minha formação.

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor Gustavo Martins, por ser um orientador sempre presente, pelos conselhos e orientação que foram além do conhecimento científico, pelo exemplo de seriedade e profissionalismo.

Ao professor Lúcio Campos, pela co-orientação, pelos ensinamentos, pela disponibilidade de sempre, pelos bons papos dos mais diversos assuntos e pelo carinho sempre a mim dedicado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia e do Departamento de Biologia Geral, pelos ensinamentos e todo auxílio prestado.

Aos técnicos do Apiário, pela presteza e atenção de sempre e pelo papo leve e agradável.

Ao apoio técnico da Renata (a melhor técnica de laboratório), Raquel, Henrique, Wagner e Hudson, a contribuição de vocês foi imprescindível.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, os que ainda estão presentes e os que já seguiram novos rumos pelos conselhos e momentos de descontração. Em especial à Carol, Renata, Natália, Camila e Raquel, minhas queridas amigas do “Café com pão”, as risadas com vocês são intermináveis e o apoio sempre sincero.

À Juliana Malta, minha amiga tão querida, que dividiu comigo minhas angústias e alegrias, dentro e fora da vida acadêmica. Nós nos identificamos.

Aos meus amigos do coração, da turma BIO 05/02 da UFOP, por, mesmo distantes, estarem sempre presentes, me apoiando e me “colocando para cima” quando o cansaço começava a tomar conta de mim, por sempre me fazerem sorrir e pela amizade que nunca me falta. Amo vocês.

À minha avó Lúcia e meus tios por estarem sempre ao meu lado, confiando e torcendo por mim. E à família do Kenzo, pelo apoio de sempre. Obrigada por tudo

Ao meu irmão, **Ciro**, pelo amor, amizade e compreensão dos meus momentos de irritação. Por me incentivar, pela torcida e mostrar que acredita em mim sempre. Amo você.

Aos meus pais, **Zezé e Binha**, por serem exemplos de vida, integridade, de respeito ao próximo e de perseverança. Por me ampararem quando tropecei. A vocês devo os melhores ensinamentos da minha vida. Amo vocês.

Ao meu marido, **Kenzo**, por sempre confiar em mim e em meu potencial, por não me deixar desistir nunca, por me permitir saber que o seu ombro amigo estará sempre ao meu alcance, por me amar e me fazer feliz. Amo muito você.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Meliponini.....	1
1.2. Sistema circulatório: morfologia do coração.....	3
1.3. Resposta imune dos insetos.....	6
1.4. Inseticidas.....	10
1.5. Alterações no sistema imune de indivíduos expostos a inseticidas e patógenos.....	12
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
3. OBJETIVOS.....	27
4. CAPÍTULO I. A morfologia do coração de <i>Melipona quadrifasciata</i> (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) é conservada entre diferentes castas e sexos.....	28
5. CAPÍTULO II. Análise morfológica e contagem total e diferencial de hemócitos circulantes de fêmeas adultas de <i>Melipona quadrifasciata</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	46
6. CAPÍTULO III. Alterações na resposta imune celular de <i>Melipona quadrifasciata</i> (Hymenoptera: Meliponini) ocasionadas por imidacloprido e pela infecção por <i>Escherichia coli</i>	65
7. CONCLUSÕES.....	81

RESUMO

RAVAIANO, Samira Veiga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Estudo da morfologia do coração, dos hemócitos e dos efeitos do imidacloprido e da infecção bacteriana nas populações de hemócitos de *Melipona quadrifasciata*.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Abelhas sem ferrão são importantes polinizadores de plantas nativas e cultivadas, com um papel essencial na manutenção dos ecossistemas. Diversos fatores estão contribuindo para o declínio das populações desses polinizadores, como o uso de inseticidas neonicotinoides e a infecção por patógenos. Além de ter impacto direto à sobrevivência dos insetos, inseticidas podem causar efeitos subletais a organismos não-alvo, como as abelhas, podendo impor custos significativos à sua imunidade. O presente trabalho trata do estudo comparado do tubo dorsal pulsátil ou coração (e tecidos associados) e dos principais hemócitos (prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos) nos diferentes sexos e castas de *M. quadrifasciata*, através de diversas técnicas de microscopia, e também da avaliação da contagem total e diferencial de hemócitos, após a exposição oral de operárias com imidacloprido e a infecção por *Escherichia coli*. Forrageiras foram submetidas a cinco tratamentos: 1) exposição a imidacloprido; 2) infecção por bactéria; 3) tratamento com inseticida e bactéria; 4) controle, sem nenhum dos dois tratamentos; e 5) controle, com injeção apenas de meio LB. Esses tratamentos foram submetidos a um esquema fatorial com um tratamento adicional ($2^2 + 1$). A morfologia do coração, assim como dos músculos alares e das células pericardiais, é semelhante entre os sexos e castas e ao observado em outros insetos. Entretanto, seu coração possui uma expansão na porção abdominal final e os cardiomiócitos são dispostos em um círculo aberto. As características morfológicas dos hemócitos são similares entre os indivíduos estudados. As forrageiras possuem menor quantidade de hemócitos quando comparadas a abelhas mais jovens. A quantidade relativa de hemócitos das forrageiras altera mediante exposição ao imidacloprido e à *E. coli*, causando aumento em algumas células e diminuição em outras, mas não causaram alterações significativas à contagem total dos mesmos. O presente trabalho nos permite conhecer melhor os sistemas circulatório e imune, e entender como seus hemócitos respondem à exposição ao imidacloprido simultaneamente à infecção bacteriana em *M. quadrifasciata*.

ABSTRACT

RAVAIANO, Samira Veiga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Study of the morphology of the heart, hemocytes and the effects of imidacloprid and bacterial infection on the hemocyte populations of *Melipona quadrifasciata*.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins. Co-adviser: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Stingless bees are important pollinators of native and cultivable plants, with a key role in maintaining ecosystems. The decline in the population of these pollinators has been detected and, although this is a multifactorial cause, exposure to pesticides, mainly neonicotinoids and infection by pathogens are considered to cause this decline. Insecticides affect the survival or can cause sublethal effects on non-target insects, including costs on their immunity. In the present study we studied the morphology of the dorsal tube or heart (and associated tissues) and the hemocytes (prohemocytes, plasmatocytes and granulocytes) in the different sexes and castes of *M. quadrifasciata*, through various microscopy techniques. In addition, the total and differential hemocyte counts were performed after the oral exposure of bee workers with imidacloprido and infection with the bacterium *Escherichia coli*. For this, the foragers were submitted to different treatments: 1) exposure to imidacloprid; 2) infection with bacteria; 3) treated with the insecticide and the bacterium; 4) control, without either treatments; and 5) control, with injection of bacteria-free medium. These treatments were submitted to a factorial scheme with an additional treatment ($2^2 + 1$). The morphology of the heart, as well as of the alary muscles and the pericardial cells, are similar considering male, female, and the different castes. The gross morphology of the heart is also similar to other insects, however, the organ has an expansion at its final abdominal portion and the cardiomyocytes are arranged in an open circle, typical of bees. The morphology of the hemocytes are also similar among the individual. We also observed that foragers or aged bees have a smaller number of hemocytes when compared to younger ones. The relative amount of hemocytes of foragers changes upon exposure to imidacloprid and *E. coli*, causing increase in some cells and decrease in others, but did not cause significant changes to the total count of cells. The present work improve the knowledge about the heart anatomy and the immune system, and how hemocytes respond to exposure to insecticides combined with infection by a bacterium in the stingless bee *M. quadrifasciata*.

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Meliponini

A tribo Meliponini, pertencente à ordem Hymenoptera e família Apidae, compreende indivíduos de pequeno a médio porte e popularmente conhecidos como “abelhas indígenas sem ferrão” por possuírem ferrão atrofiado, sendo incapazes de ferroar (Nogueira-Neto 1997, Heard 1999, Michener 2007). Todas as espécies dessa tribo possuem um comportamento eusocial, com complexas interações sociais e divisão de trabalho (que é definida conforme a idade), sobreposição de gerações e castas bem definidas (Kerr et al. 1996 Michener 2007). Os meliponíneos são incluídos no grupo dos corbiculados (indivíduos que utilizam uma estrutura chamada corbícula, localizada na tíbia do último par de pernas que serve para coletar pólen), da subfamília Apinae, juntamente com Apini, Bombini e Euglossini (Michener 2007). Esse é um grupo monofilético que habita regiões tropicais e subtropicais da América, África, Austrália e parte da Ásia (Roubik 1993; Camargo e Pedro 1992).

O sistema de determinação sexual nos meliponíneos é haplodiploide, onde os machos são originados de ovos não fertilizados, sendo haploides, enquanto que as fêmeas se originam de ovos fertilizados, sendo, portanto, diploides (Velthuis et al. 2005). Existem duas castas entre as fêmeas: as rainhas (férteis), que são responsáveis pela postura da maioria dos ovos e por manter a coesão da colônia através de controle feromonal e incapazes de viverem sozinhas (não realizam forrageamento), e as operárias (estéreis ou semi-estéreis), que são a força de trabalho da colônia, sendo responsáveis pela coleta de alimento, alimentar a cria e a rainha, limpeza, construção, manutenção e defesa da colônia (Kerr et al. 1996, Michener 2007).

A polinização eficiente é de extrema importância para manter o equilíbrio do ecossistema, bem como a manutenção de espécies cultiváveis. Cerca de 30% dos alimentos consumidos por humanos são polinizados por abelhas (Slaa et al 2006). Os Meliponini são um grupo de alto potencial polinizador nos trópicos, pois são diversificados e abundantes, possuem colônias perenes, com centenas ou milhares de operárias, têm alta capacidade de recrutamento de companheiras de ninho e são generalistas, embora abelhas individuais tendam, em uma viagem de forrageamento, a se especializar em uma espécie floral (constância floral) (Heard 1999, Imperatriz-

Fonseca et al. 2006, Slaa et al. 2006). Essas abelhas são relevantes polinizadores de espécies vegetais selvagens e cultiváveis e fazem parte de um dos principais grupos de polinizadores de espécies nativas do Brasil, desempenhando um papel ecológico essencial na manutenção da biodiversidade (Kerr et al. 1996) e contribuindo para manutenção das populações de plantas e, por consequência, de animais (Janzen 1980, Antonini et al. 2006).

Há divergências com relação ao número de gêneros e espécies desse grupo devido à abundância de espécies crípticas (Michener 1990, 2007). Em alguns casos, estima-se que no Brasil existem mais de 200 espécies, além de muitas outras ainda sequer descritas (Silveira et al. 2002), em outro caso é relatado a presença de mais de 500 espécies no país (Imperatriz-Fonseca et al. 2006), enquanto uma terceira estimativa relata a presença de aproximadamente 300 espécies distribuídas pelos biomas brasileiros (Moure et al. 2007). Mais recentemente, cerca de pouco mais de 400 espécies foram reconhecidas como pertencentes à tribo Meliponini (Camargo e Pedro 2013).

Na tribo Meliponini encontra-se a espécie *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (1836), que é objeto de estudo do presente trabalho. Essa é uma abelha sem ferrão popularmente conhecida como “mandaçaia” com ampla distribuição no Brasil (Silveira et al. 2002), ocorrendo do Rio Grande do Sul à Paraíba, também na Argentina (Oeste de Misiones) e no sudoeste do Paraguai (Moure e Kerr 1950). Esse meliponíneo possui duas subespécies (*M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*), cuja principal diferença encontra-se nas faixas amarelas presentes do segundo ao quinto terço em machos e operárias, que são descontínuas na primeira subespécie e contínuas na segunda (Ducke 1916 - citado por Batalha-Filho et al. 2009, Schwarz 1932).

2 – Sistema circulatório: morfologia do coração

O sistema circulatório dos insetos é aberto e responsável pelo transporte de nutrientes, resíduos, hormônios e os fatores imunes (Klowden 2007, Chapman 2013). Esse sistema é formado principalmente por hemocele, hemolinfa e órgão pulsáteis, onde o principal responsável pelo bombeamento da hemolinfa é o vaso dorsal. O vaso dorsal é um órgão tubular e muscular, que fica abaixo da cutícula e se estende longitudinalmente ao longo da linha média dorsal do inseto, com diâmetro mais ou menos constante ao longo do comprimento, ou ampliado na parte anterior ou posterior

da região abdominal (Fig. 1). Anteriormente, esse vaso termina abruptamente na maioria dos insetos, enquanto posteriormente, geralmente ele termina em um fundo cego, com exceção indivíduos das ordens Diplura, Archaeognatha, Zygentoma e alguns Ephemeroptera (Gillott 2005, Pass et al. 2006, Chapman 2013, Hillyer 2015 e 2016).

O vaso dorsal se divide em uma aorta torácica e um coração abdominal (Chapman 2013, Hillyer 2015 e 2016) (Fig. 1). A aorta é um canal passivo, sem perfurações, normalmente mais fino que o coração e que se estende do tórax até a cabeça por onde passa a hemolinfa (Klowden 2007). O coração é constituído por cardiomiócitos, que consistem em células musculares multinucleadas e estriadas e que se dispõem de forma helicoidal ou circular em torno do tubo (Snodgrass 1956 citada por Poiani e Cruz-Landim 2006, Poiani e Cruz-Landim 2006, Chapman 2013).

O coração possui aberturas laterais, chamadas *ostia*, pelas quais ocorre passagem de hemolinfa. Existem dois tipos básicos de *ostia* que são encontrados nos insetos. Um tipo é caracterizado pela extensão dos cardiomiócitos para o lúmen do vaso, formando válvulas, essas compartimentalizam o coração em câmaras e permitem o influxo da hemolinfa na diástole e impedem seu refluxo durante a sístole, são *ostia* incurrentes. Essas *ostia* ocorrem aos pares, normalmente um por segmento, e podem ocorrer de dois ou três pares, em piolhos (Phthiraptera) e alguns Heteroptera, a 12 pares, em Blattodea e Orthoptera. Em contraste à essa *ostia*, existe as *ostia* excurrentes, que garante que a hemolinfa flua apenas para fora do coração e são restritas a pouco grupos de insetos (Thysanura, Orthoptera, Plecoptera e Embioptera) (Pass et al. 2006, Ejaz e Lange 2008 Chapman 2013).

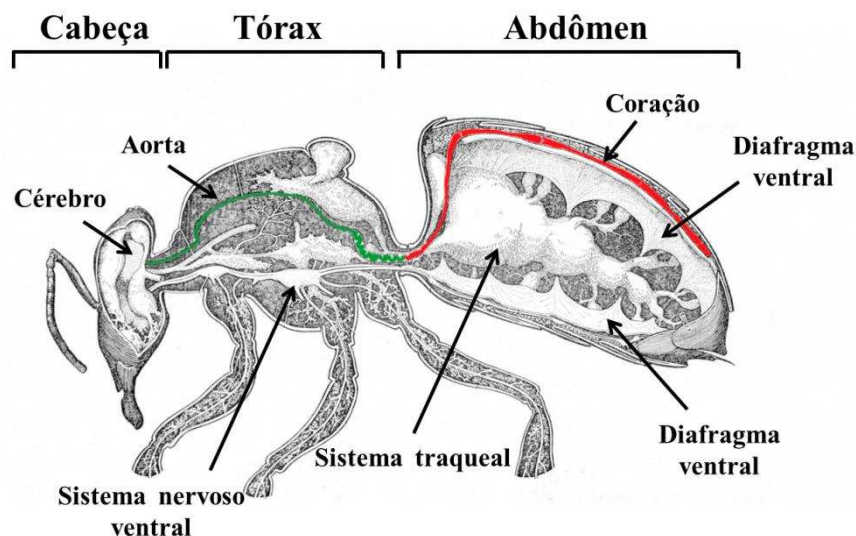


Figura 1: Esquema da secção longitudinal de operária de *Apis mellifera* mostrando o vaso dorsal e outros sistemas. Em evidência a aorta torácica (verde) e o coração abdominal (vermelho). Modificado de Snodgrass (1910).

O coração dos insetos pode alternar periodicamente o fluxo da hemolinfa e impulsioná-la em direção à cabeça (direção anterógrada – mais comum) ou em direção à parte posterior do abdômen (direção retrógrada). Durante as contrações anterógradas, a hemolinfa entra no lúmen do coração via *ostia* incurrentes, que no caso de *Anopheles gambiae* (Diptera) são localizadas em cada segmento abdominal, e sai do vaso através de uma abertura excurrente localizada perto da cabeça. Já nas contrações retrógradas, a hemolinfa entra no coração através de um par de *ostia* localizados na junção toraco-abdominal e saem por aberturas excurrentes localizadas no segmento abdominal terminal (Glenn et al. 2010, Hillyer 2016).

Três tipos celulares ocorrem em associação com o coração: músculos alares, células pericardiais e hemócitos. Os músculos alares são feixes de fibras musculares que ocorrem aos pares e tem origem na cutícula da parede lateral do inseto. Esses feixes se estendem até a lateral do coração apoiando-o fisicamente auxiliando em sua sustentação (Curtis et al. 1999, Gillott 2005, Klowden 2007). Entretanto, a região de contato dos músculos alares com o coração pode variar entre os insetos. Por exemplo, em abelhas, os feixes vão se abrindo como leque até tocar a lateral do vaso (Cruz-Landim 2009), já em mosquitos, eles se abrem em estruturas semelhantes a cestas de basquete (Glenn et

al. 2010, Martins et al. 2011). Acredita-se que, além da sustentação, é possível que os músculos alares também auxiliem no influxo da hemolinfa durante a diástole e no controle da abertura e fechamento das *ostia*, uma vez que em *A. gambiae* e *Drosophila melanogaster* elas foram observadas no centro das ramificações desses músculos (Curtis et al. 1999, Glenn et al. 2010). Ligado aos músculos alares é possível encontrar tecido conectivo que, juntos, formam o diafragma dorsal logo abaixo do coração. Esse diafragma se estende por todo abdômen e, além de auxiliar na sustentação desse órgão, cria um compartimento chamado sinus pericardial que abriga o vaso dorsal (Klowden 2007).

Ao longo de todo o comprimento do coração e entre os músculos alares encontram-se as células pericardiais. Essas são células ovais, derivadas da mesoderme e podem ser encontradas isoladas ou agrupadas em cordões (Klowden 2007, Poiani e Cruz-Landim 2007). A principal função das células pericardiais, ou nefrócitos, é auxiliar na manutenção da homeostase, regulando a composição da hemolinfa, livrando-a de substâncias tóxicas, através da filtração e endocitose de macromoléculas coloidais e solúveis (Klowden 2007, Denholm e Skaer 2009). Elas possuem dobras ou invaginações na membrana, que podem otimizar sua função, uma vez que aumenta a superfície de contato da célula, facilitando a endocitose dos compostos a serem metabolizados e/ou armazenados (Poiani e Cruz-Landim 2007, Denholm e Skaer 2009). Além desta função de desintoxicação, há evidências que as células pericardiais também sintetizam e secretam proteínas antimicrobianas na hemolinfa (Klowden 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que a interação entre os sistemas circulatório e imune são importantes para uma resposta imune adequada. Durante uma infecção, observa-se o acúmulo de patógenos na superfície do coração do inseto, principalmente em regiões próximas às *ostia*, chamadas periostiais. As regiões periostiais são também um dos principais locais de agregação de hemócitos no corpo do inseto. Alguns desses hemócitos são residentes desses locais, enquanto outros, que estavam circulantes na hemolinfa, migram para esse local após alguns minutos de infecção e se ligam à musculatura do coração, dos músculos alares e uns aos outros e passam a ser considerados também hemócitos periostiais. Essas regiões constituem um ponto onde a resposta imune ocorre na superfície do coração por apresentarem um alto fluxo de hemolinfa, aumentando a probabilidade dos hemócitos encontrarem os patógenos a fim

de realizar de forma eficiente a fagocitose. A região periostial também é local onde se encontram agregados de células pericardiais, essa proximidade dos dois tipos celulares parece ser essencial para a rápida eliminação de produtos tóxicos que possam ser liberados da degradação dos patógenos (Hillyer et al. 2007, King e Hillyer 2012, 2013, Hillyer 2015).

3 – Resposta imune dos insetos

Diferentemente dos vertebrados, que possuem as imunidades inata e adquirida (Du Pasquier 2001), os invertebrados possuem apenas a inata (Lavine e Strand 2002, Luo et al. 2003, Jiang 2008). Ela inclui uma série de ações coordenadas entre células do sistema imune que agem diretamente contra os microrganismos realizando fagocitose, nodulação e encapsulação, além de fatores humorais tais como moléculas de adesão celular e peptídeos antimicrobianos (Lavine e Strand 2002).

A primeira linha de defesa dos insetos contra patógenos e corpos estranhos são a cutícula e a matriz peritrófica, que consistem em uma barreira estrutural e química responsável por prevenir ou retardar o contato desses agentes com os sistemas no interior do inseto. A cutícula reveste todo exterior do inseto, bem como porções iniciais e finais do aparelho digestivo, espiráculos e sistema traqueal (Chapman 2013, Gillott 2005). Uma vez que patógenos ultrapassem essa barreira física e cheguem à hemocele (cavidade do corpo), eles estarão em contato com hemolinfa. A hemolinfa é um fluido extracelular no corpo dos insetos, análoga ao sangue em mamíferos na medida em que transporta nutrientes, resíduos e várias micro e macromoléculas. Na hemolinfa, os patógenos encontrarão os hemócitos e todo o mecanismo de defesa inata envolvendo respostas celular e humoral (Jiravanichpaisal et al. 2006).

A resposta imune celular se refere à atividade dos diversos tipos de hemócitos, células de defesa suspensas na hemolinfa, que reconhecem uma variedade de corpos estranhos pela interação direta dos receptores de superfície celular com as moléculas do organismo invasor, ou indiretamente pelo reconhecimento de receptores da resposta humoral que opsonizam a superfície do invasor (Lavine e Strand, 2002). A resposta humoral resulta da ação de proteínas e é responsável por processos de coagulação de hemolinfa, produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*), liberação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, liberação de

complexos enzimáticos e melanização (Jiravanichpaisal et al. 2006, Schmidt et al. 2001, Vilmos e Kurucz 1998, Garcia-Lara et al. 2005). Há uma sobreposição entre defesa humoral e celular, já que muitos fatores humorais afetam a função dos hemócitos, ao mesmo tempo que os hemócitos são importantes fontes de fatores humorais (Lavine e Strand 2002, Ribeiro e Brehelin 2006).

Os hemócitos podem ser classificados segundo dois critérios. O primeiro divide os hemócitos de acordo com sua localização, enquanto segundo os divide por características morfológicas (Hillyer 2015). Utilizando a localização anatômica, essas células podem ser divididas em duas populações: os hemócitos circulantes, que se encontram livres na hemolinfa, e os hemócitos sésseis, que se encontram ligados aos tecidos, como parede torácica e abdominal e superfícies de órgãos internos (Cruz-Landim 2009, King e Hillyer 2013, Hillyer 2015). Já pelas características morfológicas consideram-se características nucleares, citoplasmáticas e ultraestruturais (Brayner et al. 2005, Araújo et al. 2008, Amaral et al. 2010, Hwang et al. 2015).

O número e tipo dos hemócitos é espécie-específica e pode variar conforme a idade do inseto (Gupta 1979, Götz e Boman 1985 - citados por Amaral et al. 2010). Apesar de haver algumas divergências quanto à classificação dos hemócitos, uma tentativa de uniformização da nomenclatura dessas células foi realizada, caracterizando os principais hemócitos encontrados em insetos como: prohemócitos, granulócitos, plasmócitos, esferulócito e oenocitoides (Lavine e Strand 2002). Essa classificação coincide com a proposta para abelha *Apis dorsata* (Perveen e Ahmad 2017). Entretanto, em *M. scutellaris* foram encontrados apenas quatro tipos de hemócitos, sendo eles: prohemócitos, granulócitos, plasmátócitos e oenocitoides (Amaral et al. 2010). Já em *A. mellifera*, além desses quatro hemócitos encontrados em *Melipona*, ainda foram descritos os coagulócitos e células binucleadas (El-Mohandes et al. 2010).

A origem embrionária dos hemócitos é mesodérmica. Durante o período pós-embrionário, essas células podem se originar a partir de órgãos hematopoéticos (como por exemplo, em *Drosophila melanogaster*) ou por divisão de células preexistentes, os prohemócitos, que se dividem ativamente originando os demais tipos de hemócitos, como os plasmátócitos e os granulócitos, funcionando como células-tronco (Lanot et al 2001, Hoffman et al. 1979 – citado por Cruz-Landim 2009). Os granulócitos e os

plasmatócitos são os hemócitos que participam diretamente das defesas celulares na maioria dos insetos. Os mecanismos de defesa incluem a fagocitose, formação de agregados ou nódulos de hemócitos e encapsulação de corpos estranhos (Jiravanichpaisal et al. 2006, Lavine e Strand 2002, Strand 2008, Ribeiro e Brehelin 2006).

A fagocitose é um processo baseado no reconhecimento, no englobamento e na destruição intracelular de patógenos (Blandin e Levashina 2007, Marmaras e Lampropoulou 2009). Ela pode ser também uma resposta imune contra as células em processo de morte e restos celulares que são gerados durante o desenvolvimento do inseto (Jiravanichpaisal et al. 2006, Marmaras e Lampropoulou 2009). Esse processo é muito eficiente, já que pode ser acompanhado da liberação de substâncias microbicidas e tóxicas, decorrente da degranulação das células (Martin et al. 1995), e de espécies reativas de oxigênio (Hampton et al. 1998, Kurtz 2002). Os granulócitos e plasmatócitos são células fagocíticas, estendendo protrusões finas e rígidas, chamadas filopódios, ao perceberem a presença de microrganismos estranhos. Eles podem agir em conjunto ou separadamente durante o processo fagocitose (Silva et al. 2000, Russo et al. 2001, Lavine e Strand 2002, Kwon et al. 2014, Hwang et al. 2015).

Na nodulação, é formado um agregado multicelular de hemócitos que aprisiona um grande número de patógenos, por exemplo bactérias (Marmaras e Lampropoulou 2009). Ocorre a degranulação dos granulócitos, o que libera na hemolinfa substâncias sinalizadoras que atraem os plasmatócitos para a região e aglutinam os microrganismos, formando uma estrutura amorfa que circunda e imobiliza os mesmos. O nódulo assim formado compreende, além do agente infectante morto ou melanizado, vários hemócitos mortos ao seu redor, circundados por camadas de hemócitos vivos (Miller et al. 1994, Dean et al. 2004).

A encapsulação de organismos ou estruturas estranhas é uma reação de defesa muito comum em insetos (Götz e Boman 1985 – citado por Cruz-Landim 2009), e refere-se à ligação do hemócitos a alvos maiores como protozoários, nematódeos e ovos de parasitoides, que são muito grandes para serem fagocitados. Dessa forma, há uma aglomeração de células, que formam várias camadas em torno do invasor, que é morto

pela produção local de radicais livres ou por asfixia (Strand e Pech 1995, Meyer-Fernandes Jr et al. 2000, Nappi e Ottavian 2000, Marmaras e Lampropoulou 2009).

Normalmente, os primeiros hemócitos que chegam ao local da infecção são os granulócitos. Após detectar a presença de um organismo estranho, essas células se agregam em torno dele e liberam o conteúdo de seus grânulos na hemolinfa, atraindo, assim, os plasmatócitos. Em seguida, os plasmatócitos chegam para formar uma camada de células, que se torna rígida. Geralmente, a formação de cápsulas é acompanhada pela produção de melanina a partir de dopamina, e tem um papel central na defesa contra uma variedade de patógenos e na cicatrização de feridas. Durante a síntese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas e inativam ou matam grande parte dos microrganismos (Silva et al. 2000, Marmaras e Lampropoulou 2009). A formação de nódulos e de cápsulas parece idêntica quando se observa ao nível ultraestrutural, o que sugere que seja o mesmo processo contra alvos diferentes (Lavine e Strand 2002). Além disso, os hemócitos também são capazes de migrarem em direção a alvos como corpos apoptóticos e restos de células a partir de tecidos danificados e os fagocitarem, além de estarem envolvidos em mecanismos de desintoxicação (Sabri e Tariq 2004, Parkash 2008).

Os insetos possuem mecanismos para identificar o que é “próprio” e o que “não é próprio”, como por exemplo, “corpos estranhos”, incluindo patógenos, e assim iniciar as reações de defesa. Esses mecanismos são responsáveis por reconhecer moléculas exclusivas de microrganismos, os chamados PAMPs (do inglês: *pathogen associated molecular patterns*). Os PAMPs são expressos normalmente por microrganismos e podem ser reconhecidos como “moléculas de assinatura” de indivíduos invasores, são essenciais para esses indivíduos sobreviverem e possuem pouca variação de um microrganismo para o outro (Medzhitov 2001, Teixeira et al. 2002). Por exemplo, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, que são produzidos por bactérias e não por células eucariotas (Medzhitov 2001). Os padrões moleculares dos PAMPs são reconhecidos por receptores específicos chamados receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*), os quais podem ser solúveis (humorais) ou ancorados na membrana celular dos hemócitos (Gillespie et al. 1997, Lavine e Strand 2002, Medzhitov e Janeway 2002, Passare e Medzhitov 2005). Eles podem regular

síntese de peptídeos antimicrobianos, mediar a fagocitose ou desencadear cascatas que podem ativar a melanização (Kavanagh e Reeves 2004).

Um conjunto PRR importante e amplamente conhecido são os receptores do tipo *Toll*, que foram descobertos primeiro em *Drosophila*, com função em uma via que controla a formação do eixo dorso-ventral de embriões. Esses são proteínas transmembranas, caracterizados por um domínio intracelular homólogo ao receptor de interleucina 1 (IL-1R) denominado domínio Toll/IL-1R (TIR) e um domínio extracelular rico em repetições de leucina (“leucine-rich-repeat” - LRR). Esse último responsável por reconhecer os PAMPs de invasores (Hashimoto et al. 1988 – citado por Medzhitov 2001).

Em insetos sociais, pode haver diferenças na capacidade imune entre sexos e castas. Em forrageiras da espécie *A. mellifera*, há uma drástica redução no número de hemócitos, bem como no volume da hemolinfa e na capacidade de formação de nódulos em resposta a bactérias (Wille e Rutz 1975 – citado por Schmid et al. 2008, Bedick et al. 2001, Amdam et al. 2004). Contudo, essa redução não é restrita somente às operárias, pois rainhas e machos também sofrem com a perda de hemócitos, e essa perda está relacionada à idade dos indivíduos e não à sua função na colmeia (Schmid et al. 2008). Em abelhas da espécie *Bombus terrestris*, os machos possuem uma resposta imune menos intensa do que as fêmeas, uma vez que apresentaram um menor grau de encapsulação e melanização em implantes de náilon artificialmente introduzidos (Gerloff et al. 2003).

4 – Inseticidas

Apesar de sua extrema importância ecológica para polinização de espécies de plantas nativas (Kerr et al. 1996, 2001, Imperatriz-Fonseca et al. 2006), um declínio da população de abelhas sem ferrão tem sido relatado (Lima et al. 2016). Dentre as principais causas desse problema podemos citar a fragmentação dos habitats, ação de parasitos e patógenos e o uso não-sustentável de ecossistemas agrícolas, principalmente quanto ao uso de pesticidas (Richards e Kevan 2002, Freitas et al. 2009, Whitehorn et al. 2012). Acredita-se que esses dois últimos fatores influenciam diretamente na dinâmica dos componentes do sistema imune das abelhas e de insetos em geral (Disale et al. 2013, El-Aziz e Awad 2010, Pandey et al. 2008).

A preocupação com impacto dos pesticidas sobre os polinizadores, incluindo abelhas, tem crescido. Em resposta a essa preocupação, experimentos estão sendo desenvolvidos em laboratórios e em campo, inclusive utilizando abelhas como bioindicadores (Marletto et al. 2003, Desneux et al. 2007, Mommaerts e Smaghe 2011, Sanchez-Bayo e Goka 2014). Esses polinizadores, independentemente de uma exposição oral ou tópica, são muito sensíveis a inseticidas, podendo esses causar a mortalidade ou, ainda efeitos subletais nas abelhas (Lima et al 2016). Esses efeitos compreendem interferências na formação corporal, orientação, capacidade cognitiva (memória e aprendizagem), capacidade de forrageamento e caminhar em espécies como *A. mellifera* (Thompson 2002, Decourtye et al. 2004b, El Hassani et al. 2005, Belzunces et al. 2012) e *M. quadrifasciata* (Barbosa et al. 2015, Tomé et al. 2012, 2015).

Vários compostos residuais de pesticidas encontrados no pólen e mel foram avaliados a fim de identificar aqueles de maior risco para as abelhas e verificou-se que resíduos de inseticidas piretroides e neonicotinoides, incluindo imidacloprido, apresentaram maior risco (Sanchez-Bayo e Goka, 2014). Os neonicotinoides são inseticidas sistêmicos que agem como agonistas de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR), neurotransmissor responsável por transmissão de impulsos nervosos para as células musculares (Matsuda et al. 2001, revisado por Lima et al. 2016). Diversos efeitos subletais causados por esse grupo de inseticida vêm sendo relatado ultimamente. Tiametoxam e clotianidina ocasionaram uma drástica redução na produção da prole na abelha solitária *Osmia bicornis* (Sandrock et al. 2014). Resultado semelhante observado para colônias de *B. terrestris* tratadas com imidacloprido (Whitehorn et al. 2012). Imidacloprido apresentou também efeitos subletais em larvas e adultos de *M. quadrifasciata*, prejudicando o desenvolvimento dos corpos cogumelares no cérebro, bem como o comportamento de caminhar, a capacidade de voo e a respiração de operárias (Tomé et al. 2012, 2015).

Imidacloprido, o primeiro neonicotinoide comercializado, se tornou o mais vendido no mundo (Elbert et al. 2008), devido a sua eficiência em proteger a cultura contra insetos aéreos e do solo, uma vez que, em razão da sua sistemicidade, protege sementes, raízes e partes aéreas das plantas (Laurent e Rathahao 2003). Entretanto, devido à possibilidade de acúmulo desse inseticida em pólen, néctar e cera, o seu uso

pode causar riscos elevados à população de abelhas (Laurent e Rathahao 2003, Mullin et al. 2010). O uso de imidacloprido, assim como outros neonicotinoides (exemplo clotianidina e tiametoxam), foram temporariamente proibidos pela Comissão Europeia (2013).

5 – Alterações no sistema imune de indivíduos expostos a inseticidas e patógenos

A exposição a inseticidas pode afetar diferentes tecidos e células dos insetos, incluindo os hemócitos (Patnaik 2002). Sabe-se que a contagem total e diferencial dos hemócitos (CTH e CDH, respectivamente) é uma ferramenta útil para estimar eficiência do sistema imune dos insetos. A contagem dos hemócitos pode fornecer informações sobre a defesa celular dos mesmos contra esses agentes químicos, uma vez que podem sofrer alterações significativas quando expostas inseticidas (Hwang et al. 2015, Brandt et al. 2016). Ela pode ser útil também em determinar recomendações sobre o uso dos inseticidas para o controle de pragas (Haq et al. 2005).

O estresse causado pelos agroquímicos pode interferir no número de algumas células, algumas vezes aumentando e outras diminuindo. Por exemplo, o tratamento com Monodhan 36 e o Sevin aumentaram número total dos hemócitos no coleóptero *Popillio japonico* (Disale et al. 2013). Por outro lado, o tratamento com inseticidas a base de nim reduziram a quantidade dessas células no lepidóptero *Danais chrysippus* (Pandey et al. 2008). Exposição às doses de campo dos neonicotinoides imidacloprido, triaclopride e clotianidina também reduziram a quantidade de hemócitos, assim como, a capacidade de encapsulação e atividade antimicrobiana de operárias de *A. mellifera* (Brandt et al. 2016). Os inseticidas imidacloprido, etofenproxi e diafenthiuron, além de causarem alterações na CTH e CDH de *A. dorsata*, ainda mostraram diferentes graus de anormalidade nas células, como mudanças na forma da célula (Perveen e Ahmad 2017).

Assim como os inseticidas, infecções por bactérias ou toxinas derivadas das mesmas também causam alterações na CTH e CDH de insetos. Em larvas de lepidópteros a infecção por *Bacillus thuringiensis* causou diminuição na CTH (Ericsson et al. 2009, El-Aziz e Awad 2010), assim como operárias de *A. mellifera* quando infectadas pela bactéria *Serratia marcescens* (Burritt et al. 2016). Resultados diferentes foram observados em *B. terrestris* desafiados com lipopolissacarídeos (componente da

membrana) de bactérias gram-negativas (Korner e Schmid-Hempel 2004) e de larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera) infectados pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que tiveram a CTH aumentada quando comparados aos não infectados (Horohov e Dunn 1982). Bactérias também podem alterar a CDH dos insetos, com alguns tipos de hemócitos aumentando em número, enquanto outros diminuem (El-Aziz e Awad 2010, Hwang et al. 2015).

Existem poucos trabalhos que tiveram como objeto de estudos de hemócitos de abelhas sem ferrão (Amaral et al. 2010), nenhum envolvendo a dinâmica hemocitária após serem expostas a inseticidas ou patógenos. A maioria dos esforços concentram-se no estudo do sistema imune inato, sob exposição ou não de patógenos de abelhas melíferas (Amdam et al. 2004, Wilson-Rich et al. 2008, Schmid et al. 2008, Negri et al. 2014, Brandt et al. 2016, Burritt et al. 2016, Perveen e Ahmad 2017) e do gênero *Bombus* (Gerloff et al. 2003, Korner e Schmid-Hempel 2004). Portanto, trabalhos que avalie os hemócitos, bem como a dinâmica dos mesmos diante ao estresse provocado por inseticidas e microrganismos na abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* são importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral I M R, Moreira-Neto J F, Pereira G B, Franco M B, Beletti M E, Kerr W E, Bonetti A M, Ueira-Vieira C (2010). Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron*. 41: 123-129.
- Amdam G V, Simoes Z L, Hagen A, Norberg K, Schroder K, Mikkelsen O, Kirkwood T B, Omholt S W (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*. 39: 767-773.
- Antonini Y, Costa R G, Martins R P (2006). Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lapeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. *Brazilian Journal of Biology*. 66(2A): 463-471.
- Araújo H C R, Cavalcanti M G S, Santos S S, Alves L C, Brayner F A (2008). Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron*. 39: 184-189.
- Barbosa W F, Tomé H V V, Bernardes R C, Siqueira M A L, Smaghe G, Guedes R N C (2015). Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34(9): 2149-2158.
- Batalha-Filho H, Melo G A R, Waldschmidt A M, Campos L A O, Fernandes-Salomão T M (2009). Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*. 26(2): 213-219.
- Bedick J C, Tunaz H, Nor Aliza A R, Putnam S M, Ellis M D, Stanley D W (2001). Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 130: 107-117.
- Belzunces L P, Tchamitchian S, Brunet J L (2012). Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43: 348-370.

- Blandin S A, Levashina E A (2007). Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunological Review Copenhagen*. 219: 8-16.
- Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprido, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. 86: 40–47.
- Brayner F A, Araújo H R C, Cavalcanti M G S, Alves L C, Peixoto C A (2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron*. 36: 359-367.
- Burritt N L, Foss N J, Neeno-Eckwall E C, Church J O, Hilger A M, Hildebrand J A, Warshauer D M, Perna N T, Burritt J B (2016). Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS ONE*. 11(12): e0167752.
- Camargo J M F, Pedro S R M (1992). Systematic, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*. 23:1-32.
- Camargo J M F, Pedro S R M (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure J S, Urban D, Melo G A R (Orgs) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region – online version. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 29 de junho de 2017.
- Carvalho G A (2001). The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*. 10: 10-15.
- Chapman R F (2013). *The insects: structure and functions*. Cambridge University Press. Fifth Edition. 929p.
- Comissão Européia (2013). Bee health: EU-wide restrictions on pesticide use to enter into force. European Commission, Brussels.
- Cruz-Landim C (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora SciELO-Ed UNESP, São Paulo. 408 p.

- Curtis N J, Ringo J M, Dowse H B (1999). Morphology of the pupal heart, adult heart and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*. 240: 225-235.
- Dean P, Potter U, Richards E H, Edwards J P, Charnley A K, Reynolds S E (2004). Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*. 50: 1027-1036.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M H (2004). Effects of imidacloprido and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 410-419.
- Denholm B, Skaer H (2009). Bringing together components of the fly renal system. *Curent Opinions in the Genetics & Development*. 19: 526-532.
- Desneux N D, Decourtye A, Delpuech J M (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*. 52: 81-106.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (46): 18466-18471.
- Disale C S, Dubal, R S, Disale S D (2013). Effect of some insecticides on haemocytes of Japanese beetle, *Popillio japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Interdisciplinary Research Journal*. 3(2): 40-42.
- Du Pasquier L (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 129(1): 1-15.
- Ducke A (1916). Enumeração dos himenópteros coligidos pela Comissão e Revisão das espécies de abelhas do Brasil. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas do Mato Grosso ao Amazonas. 35: 1-211.
- Ejaz A, Lange A B (2008). Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extradentatum*. *Peptides*. 29: 214-225.

- El Hassani A K, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 82(1): 30-39.
- El-Aziz N M A e Awad H H (2010). Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation dimilim and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*. 41: 203-209.
- Elbert A, Hass M, Springer B, Thielert W, Nauen R (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*. 64: 1099-1105.
- Ericsson J D, Janmaat A F, Lowenberger C, Myers J H (2009). Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *Journal of Invertebrate Pathology*. 100(2): 61-67.
- Fatima M, Tariq M, Gulzar A (2013). Effect of flubendiamide and spirotetramat on the haemocytes of American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pakistan Entomologist*. 35(2): 129-134.
- Freitas B M, Imperatriz-Fonseca V L, Medina L M, Kleinert A M P, Galetto L, Nates-Parra G, Quezada-Euán J J G (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*. 40: 332-346.
- Garcia-Lara J, Needham A J and Foster S J (2005). Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 43: 311-323.
- Gerloff C U, Ottmer B K, Schmid-Hempel P (2003). Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect, *Bombus terrestris*. *Functional Ecology*. 17: 582-589.
- Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*. 42: 611-643.
- Gillott C (2005). *Entomology*. Springer. Third Edition. 831p.

- Glenn JD, King JG, Hillyer, JF (2010). Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *The Journal of Experimental Biology*. 213: 541-550.
- Götz P, Boman H G (1985). Insect immunity. In: Kerkut G A, Gilberts L I (eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford: Pergamon Press. 3: 453-485.
- Gupta A P (1979). Hemocytes types: their structures, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. *In: Gupta A P, Insects 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.
- Haq M R U, Sabri M A, Rashid A (2005). Toxicity of nicotinyl insecticides on the haemocytes of red cotton bug, *Dysdercus koenigii* (Fb.) (Pyrrhocoridae: Hemiptera). *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 1(3): 239-241.
- 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.
- Heard T A (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*. 44: 183-206.
- Hillyer J F (2015). Integrated immune and cardiovascular function in pancrustacea: lessons from the insects. *Integrative and Comparative Biology*. 55(5): 843-855.
- Hillyer J F (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*. 58: 102-118.
- Hillyer J F, Barreau C, Vernick K D (2007). Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito hemocoel. *International Journal for Parasitology*. 37(6): 673-681.

- Hoffman JA et al. (1979). Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. In: Gupta A P. Insect Hemocytes. Cambridge: Cambridge University Press. p. 29-66.
- Horohov D W, Dunn P E (1982). Changes in the circulating haemocyte population on *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. Journal of Invertebrate Pathology. 40: 327-339.
- Hwang S, Bang K, Lee J, Cho S (2015). Circulating hemocytes from larvae of the japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. PLoS ONE. 10(6): e0128519.
- Imperatriz-Fonseca V L, Saraiva A M, Jong D (2006). Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Editora Holos. Ribeirão Preto, SP. 112p.
- Janzen D H (1980). Ecologia vegetal nos trópicos. São Paulo, EDUSP, 79p.
- Jiang C A Jr (2008). The biochemical basis of antimicrobial responses in *Manduca sexta*. Insect Science. 15: 53-66.
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology. 211: 213-236.
- Kavanagh K, Reeves E P (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 28: 101-112.
- Kerr W E, Carvalho G A, Da Silva A C e Assis M G (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. Parcerias Estratégicas. 12: 20-41.
- Kerr W E, Cavalho G A, Nascimento V A (1996). Abelha uruçú: biologia manejo e conservação. Fundação Acagú, 144p.
- King J G, Hillyer J F (2012). Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems. PLOS Pathogens. 8(11): e1003058.

- King J G, Hillyer J F (2013). Spatial and temporal *in vivo* analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biology*. 11: 55-69.
- Klowden M J (2007). *Physiological Systems in Insects*. 2 nd ed. Boston: Academic Press. 688p.
- Korner P, Schmid-Hempel P (2004). *In vivo* dynamics of an immune response in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 87: 59-66.
- Kurtz J (2002). Phagocytosis by invertebrates hemocytes: causes of individual variation on *Panorpa vulgaris scorpionflies*. *Microscopy Research and Technique*. 57: 456-468.
- Kwon H, Bang K, Cho S (2014). Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. *PLoS ONE*. 9(8): e103620.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 230(2): 243-257.
- Laurent F M, Rathahao E (2003). Distribution of [14C] imidacloprido in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 8005-8010.
- Lavine M D, Strand M R (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- Lima M A P, Martins G F, Oliveira E E, Guedes R N C (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bee: peculiarities, underlying bases, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*. 202: 733-747.
- 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.
- Marletto F, Patetta A, Manino A (2003). Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumble bees. *Bulletin of Insectology*. 56: 155-158.

- Marmaras V J, Lampropoulou M (2009). Regulators and signaling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*. 21: 186-195.
- Martin E, Ganz T, Lehrer R I (1995). Defensins and other endogenous peptides antibiotics of vertebrates. *Journal of Leucocyte Biology*. 58: 128-136.
- Martins G M, Ortigão R J M, Pimenta P F P (2011). Morphological features of the heart of six mosquito species as revealed by scanning electron microscopy. *International Journal of Tropical Insect Science*. 31: 98-102.
- Matsuda K, Buckingham S D, Kleier D, Rauh J J, Grauso M, Sattelle D B (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22: 573-580.
- Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 1: 135-145.
- Medzhitov R, Janeway C A Jr (2002). Decoding patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296: 298-300.
- Meyer-Fernandes Jr, Lanz-Mendoza H, Gondim K C (2000). Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys*. 328(1): 152-159.
- Michener C D (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *The University of Kansas Science Bulletin*. 54(4): 75-164.
- Michener C D (2007). *The bees of the world*. The John Hopkins University Press, 2nd edition. 952p.
- Miller J S, Nguyen T, Stanley-Samuelson D W (1994). Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. *PNAS*. 91: 12418-12422.
- Mommaerts V, Smaghe G (2011). Side-effects of pesticides on the pollinator *Bombus*: An overview. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the modern world – pests control and pesticides exposure and toxicity assessment*. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 508–552.

- Moret Y, Schmid-Hempel P (2001). Immune defense in bumble-bee offspring. *Nature*. 414: 506.
- Moure J S, Kerr W E (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. - Apoidea). *Dusenian*. 1: 105-129.
- Moure J M, Urban D, Melo G A R (2007). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058p.
- Mullin C A, Frazier M, Frazier J L, Ashcraft S, Simonds R (2010). High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* .5: e9754.
- Nappi A J, Ottaviani E (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*. 22(5): 469-480.
- Negri P, Quintana S, Maggi M, Szawarski N, Lamattina L, Eguaras M (2014). *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. *Apidologie*. 45(5): 610-617.
- Nogueira-Neto P (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, Nogueirapis, 446p.
- Pandey J P, Tiwari R K, Kumar D (2008). Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danaus chrysippus* following treatment with neem-based insecticides. *Journal of Entomology*. 5(3): 200-206.
- Parkash M (2008). Insect physiology. *Encyclopedia of entomology-3*. Discovery Pub. House PVT. LTD. New Delhi, India. pp. 216-257.
- Pass G, Gereben-Krenn B A, Merl M, Plant J, Szucsich N U, Tögel M (2006). Phylogenetic relationships of the orders of Hexapoda: Contributions from the circulatory organs for a morphological data matrix. *Arthropod Systematic & Phylogeny*. 64(2): 165-203
- Passare C, Medzhitov R (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 560:11-18.

- Patnaik B D (2002). Physiology of insects. Dominant Pub. and Distrib. New Delhi, India. pp. 149-150.
- Pistorius J, Bischoff G, Heimbach U, Stähler M (2009). Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. In: Ooman P A, Thompsons H M (Eds.). Hazards of Pesticides to Bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. 118-126.
- Poiani S B, Cruz- Landim C (2006). Histologia e ultra-estrutura do vaso dorsal de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae) em operárias e rainhas de diferentes idades. Iheringia, Série Zoologia. 96(1): 121-126.
- Poiani S B, Cruz- Landim C (2007). Histology and ultrastructure of pericardial cells of *Scaptotrigona postica* Latrielle (Hymenoptera, Apidae) in workers and queens of different ages. Micron. 38: 766-770.
- Qamar A, Jamal K (2009). Differential haemocyte counts of 5th instar nymphs and adults of *Dysdercus cingulatus* Fabr (Hemiptera: Pyrrhocoridae) treated with acephate, an organophosphorus insecticide. Biology and Medicine. 1(2): 116-121.
- Ribeiro C and Brehelin M (2006). Insect haemocytes: what type of cell is that? Journal of Insect Physiology. 52: 417-429.
- Richards K W, Kevan P G (2002). Aspects of bee biodiversity, crop pollination and conservation in Canada. pp. 77-94. In: Kevan P G, Imperatriz-Fonseca (eds). Pollinating bees – the conservation link between agriculture and nature – Ministry of Environment/Brasília.
- Roubik D W (1993). Tropical pollinators in the canopy and understory: field data and theory for stratum "preferences", Journal of Insect Behavior. 6: 659-673.
- Russo J, Brehélin M, Carton Y (2001). Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. Journal of Insect Physiology. 47: 167- 172.

- Sabri M A, Tariq B (2004). Toxicity of some insecticides on the haemocytes of red pumpkin beetle, *Aulacophora foveicollis* Lucas. Pakistan Entomologist. 26: 109-114.
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014). Pesticide residues and bees – A risk assessment. PLoS ONE. 9(4): e94482.
- Sandrock C, Tanadini L G, Pettis J S, Biesmeijer J C, Potts S G and Neumann P (2014). Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. Agricultural and Forest Entomology. 16: 119-128.
- Schmid M R, Brockmann A, Pirka C W W, David W. Stanley D W, Tautz J (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. Journal of Insect Physiology. 54: 439-444.
- Schmidt O, Theopold U and Strand M (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. BioEssays. 23: 344-351.
- Schwarz H F (1932). The genus *Melipona* IV. The type genus of the Meliponidae or stingless bee. Bulletin of the American Museum of Natural History. 63: 231-460.
- Silva C, Dunphy G, Rau M E (2000). Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Developmental and Comparative Immunology. 24: 367-379.
- Silveira F A, Melo G A R, Almeida E A B (2002). Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte. 253p.
- Slaa J E, Chaves L A S, Malagodi-Braga K S, Hofstede F E (2006). Stingless bee in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie. 37: 293-315.
- Snodgrass R E (1910). The anatomy of the honey bee. Government Printing Office, Washington. 162p.
- Snodgrass R E (1956). Anatomy of honeybee. New York, Vail-Ballow. 334p.
- Strand M R (2008). The insect cellular immune response. Insect Science. 15: 1-14.

- Strand M R, Pech L L (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*. 40: 31-56.
- Tavares M G, Irsigler A S T, Campos L A O (2003). Testis length distinguishes haploid from diploid drones in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera:Meliponinae). *Apidologie*. 34: 449-455.
- Teixeira M M, Almeida I C, Gazzinelli R T (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection*. 4(9): 883-866
- Tomé H V V, Barbosa W F, Martins G F, Guedes R N C (2015). Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*. 124: 103-109.
- Tomé H V V, Martins G F, Lima M A P, Campos L A O, Guedes R N C (2012). Imidacloprido-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE*. 7(6): e38406.
- Velthuis H H W, Koedam D, Imperatriz-Fonseca V L (2005). The males of *Melipona* and other stingless bee, and their mothers. *Apidologie*. 36: 169-185.
- Vilmos P, Kurucz E (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. 62: 59-66.
- Whitehorn P R, O'Connor S, Wackers F L, Goulson D (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*. 336 (6079): 351-352.
- Wille H, Rutz W (1975). Relationship between juvenile hormone titre and haemocytes in adult summer honeybees. *Schweizerische Land-wirtschaftliche Forschung*. 14: 330-353.
- Wilson-Rich N, Dres S T, Starks P T (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 54: 1392-1399.

OBJETIVOS

- Comparar o coração de machos, rainhas e operárias recém-emergidas e forrageiras de *M. quadrifasciata* através de técnicas de microscopia.
- Descrever os principais tipos de hemócitos (prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos) através das microscopias óptica e eletrônica de transmissão e realizar as contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH) de rainhas, operárias recém-emergidas, nutrízes e forrageiras de *M. quadrifasciata*.
- Estudar os efeitos da exposição ao neonicotinoide imidacloprido e à infecção por *Escherichia coli* na CTH e CDH de operárias forrageiras de *M. quadrifasciata*.

CAPÍTULO I

A morfologia do coração de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em diferentes castas e sexos

Resumo

O coração dos insetos é um órgão contrátil tubular, que se localiza longitudinalmente na região mediana do abdômen e bombeia hemolinfa na cavidade do corpo do inseto. Associado lateralmente ao coração encontram-se os músculos alares, cuja principal função é a sustentação do órgão, e as células pericardiais, que auxiliam na filtragem da hemolinfa. O presente trabalho objetivou descrever a morfologia do coração de rainhas e operárias recém-emergidas, forrageiras e machos de *Melipona quadrifasciata* através das microscopias óptica, eletrônica de varredura e confocal de varredura a laser. O coração de *M. quadrifasciata* possui localização e morfologia semelhante à de outros grupos de insetos, porém, apresenta uma expansão na porção final do mesmo. Os cardiomiócitos do órgão são dispostos de maneira circular com uma interrupção, formando um círculo aberto, com seus núcleos localizados tanto central quanto periféricamente nas fibras. Os músculos alares encontram-se intimamente ligados à parede das laterais do órgão, com células pericardiais entremeadas a esses músculos. As válvulas cardíacas ocorrem aos pares e se abrem para a cavidade corporal do inseto através das *ostia*. Não foram observadas diferenças entre os indivíduos dessa espécie, o que sugere que essas características sejam semelhantes. Esse estudo forneceu uma análise detalhada da estrutura do coração de *M. quadrifasciata*, contribuindo para um maior conhecimento da morfologia em diferentes indivíduos dessa espécie de abelha.

1 – Introdução

Os insetos possuem um sistema circulatório aberto composto pela hemocele, hemolinfa e órgãos pulsáteis, dentre os quais, o de maior relevância é o vaso longitudinal dorsal. Esse é um órgão linear tubular que se estende por todo o comprimento do corpo do inseto e constitui o principal sistema de bombeamento de hemolinfa. O vaso dorsal é dividido em duas partes: a aorta, localizada no tórax, e coração (parte contrátil), localizada no abdome (Klowden 2007, Das et al. 2008, Chapman 2013, Hillyer 2016). O coração é composto por células musculares estriadas e multinucleadas (cardiomiócitos) com disposição helicoidal ou circular (Snodgrass 1956 citada por Poiani e Cruz-Landim 2006, Poiani e Cruz-Landim 2006, Chapman 2013), é geralmente fechado na parte posterior, com exceção de indivíduos das ordens Diplura, Archaeognatha, Zygentoma e alguns Ephemeroptera (Gillot 2005), e possui aberturas laterais pareadas chamadas *ostia*. Essas *ostia* ocorrem em pares (geralmente, um por segmento abdominal) e, em sua maioria, permitem a entrada da hemolinfa e seus componentes no lúmen do coração, sendo assim conhecidas como incurrentes. Entretanto, além das *ostia* incurrentes, as *ostia* excurrentes (que permitem a saída da hemolinfa) ocorrem no coração de alguns grupos de insetos, incluindo Orthoptera, Thysanura e Plecoptera (Gillot 2005, Klowden 2007, Chapman 2013).

Associado ao coração é possível encontrar músculos alares (MA), células pericardiais (CP) e hemócitos. Os primeiros são feixes musculares que ocorrem em pares e se originam na parede lateral da cutícula do inseto, eles se ramificam, dando origem à miofibrilas, e tem por função dar sustentação ao coração e auxiliar na diástole do mesmo (Curtis et al. 1999, Gillot 2005, Klowden 2007, Glenn et al. 2010, Martins et al. 2011). As CP são células dispostas na lateral do coração, organizadas tanto de forma individual bem como agrupadas, e auxiliam na filtragem da hemolinfa a fim de eliminar substâncias tóxicas, sendo também chamadas de nefrócitos (Curtis et al. 1999, Klowden 2007, Poiani e Cruz-Landim 2006, Chapman 2013). Flanqueando lateralmente o coração pode-se observar também hemócitos (células do sistema imune), que se acumulam principalmente próximo às *ostia*, onde eles podem se ligar à musculatura alar ou do coração e entre si. Diferentemente dos hemócitos encontrados livres, os encontrados na região periostial podem ser sésseis e neste local conseguem realizar fagocitose de maneira rápida (King e Hillyer 2012).

Melipona quadrifasciata (Meliponini) é uma abelha sem ferrão popularmente conhecida como “mandaçaia” e faz parte do diversificado grupo de abelhas altamente eusociais (Michener 2007) e de importantes polinizadores de espécies vegetais tropicais e subtropicais (Heard 1999, Silveira et al. 2002). Assim como os demais himenópteros, essa espécie tem o sistema haplo-diploide de determinação de sexo (onde os machos são haploides e as fêmeas diploides) (Cook 1993). As abelhas do gênero *Melipona* possuem um mecanismo trofogenético para determinação de casta: quando um indivíduo duplo heterozigoto para os dois *loci* envolvidos na determinação de casta é devidamente alimentado dá origem a uma rainha, quando é homozigoto para um ou dois *loci* dá origem a uma operária (Kerr 1948, Kerr et al. 1975, Kerr et al. 1996). Essas condições geram indivíduos morfologia, comportamento, funções e longevidade diferentes (Kerr et al. 1996).

Embora a morfologia do coração de alguns grupos de insetos seja bem descrita, como por exemplo, em mosquitos (Glenn et al. 2010, Martins et al. 2011, Leódido e al. 2013, League et al. 2015), e tendo inclusive *Drosophila* como modelo (Curtis et al. 1999, Tao e Schulz 2007, Das et al. 2008, Lehmacher et al. 2012, Rotstein e Paululat 2016), trabalhos dessa natureza não são abundantes em abelhas. Sendo assim, a fim de diminuir um pouco essa lacuna, o nosso objetivo neste trabalho foi descrever a região do coração do tubo dorsal de machos, rainhas e operárias recém-emergias e forrageiras de *M. quadrifasciata* e verificar se existem possíveis diferenças na morfologia desse órgão nos indivíduos dessa espécie.

2 - Material e métodos

2.1 – Coleta, dissecação de abelhas

As abelhas foram coletadas de quatro colônias de *M. quadrifasciata* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa-MG. As forrageiras, indivíduos que normalmente possuem 25 ou mais dias de idade (Kerr et al. 1996), foram capturadas com um frasco de vidro na entrada das colônias, entre 9h e 10h da manhã, período em que grande parte das forrageiras já retornaram às colônias após a atividade de forrageamento do período da manhã. Para a obtenção das rainhas e das operárias recém-emergidas (RE) (indivíduos com 2 a 5 dias de idade), favos de cria foram mantidos no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade

Federal de Viçosa, a uma temperatura de 28 ± 3 °C, umidade relativa de 75 ± 10 % e luminosidade de 12 horas, em placa de Petri contendo solução de mel (50% água e mel de *Apis mellifera*), até os indivíduos emergirem. Os opérculos das células de cria foram retirados com uma pinça. Devido a dificuldade de se obter machos, esses foram coletados de mais de uma maneira: capturados voando próximos às colônias, recém-emergidos dentro da colônia ou a partir de favos de cria. Para os dois últimos, os indivíduos foram deixados em placa de Petri com alimento no insetário, até atingirem a maturidade sexual. Dessa forma, os machos utilizados no trabalho teriam, em média, 18 dias ou mais, idade que machos do gênero *Melipona* atingem a maturidade de sexual e capacidade voar (van Veen et al. 1997).

As abelhas foram anestesiadas a frio (mais ou menos 4 °C) e dissecadas em tampão fosfato de sódio (PBS; 0,1 M e pH 7,2). O abdômen dos indivíduos foram abertos lateralmente com uma tesoura de dissecação e os órgãos viscerais para exposição do coração na carcaça. Essas amostras foram utilizadas nas microscopias de luz e eletrônica de varredura (MEV). Para a microscopia *laser* confocal, o coração foi separado da carcaça. Amostras para microscopia de luz e confocal foram fixadas em solução fixadora Zamboni (ácido pícrico e formaldeído; pH 7,3) e amostras para MEV foram fixadas em glutaraldeído 2,5% com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,3). Amostras fixadas foram fotografadas (câmera Zeiss, AxioCam ERc5s) em lupa estereoscópica (Zeiss, Stemi 2000-C).

2.2 – Microscopia óptica

Sete tubos dorsais de cada grupo de indivíduo, fixados e aderidos à carcaças, foram lavadas em PBS, desidratadas em uma série crescente de álcool (70%-100%) e embebidas em historesina Leica (Microsystems Heidelberg Mannheim, Germany). As amostras foram incluídas em moldes de plástico e armazenadas em uma câmara a vácuo para polimerização. Secções de 3 µm foram obtidas com navalhas de vidro acopladas ao micrótomo. As secções foram colocadas em lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina e montadas com o meio de montagem Eukitt (Fluka, St. Louis, MO, USA). O material foi fotografado (câmera Olympus, Q-Color 3) utilizando-se o microscópio óptico (Olympus BX60).

2.3 - Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Corações isolados e fixados de forrageiras, operárias e rainhas recém-emergidas e machos de *M. quadrifasciata* (n=5/grupo de indivíduo) foram lavados em 0,1 % Triton X-100 por 30 minutos. Amostras foram incubadas em Faloidina- FITC (Sigma Aldrich, Sigma- Aldrich Brasil Ltda) 1:500 por uma hora e vinte minutos ao abrigo da luz e lavadas três vezes em PBS, por cinco minutos cada. Em seguida foram incubadas em TO-PRO 3 (Life Technologies) 1:900 por 30 minutos ao abrigo da luz, lavadas três vezes em PBS, por dez minutos cada. Após as incubações, as amostras foram montadas em lâminas histológicas com meio de montagem à base de mowiol. O material foi analisado e fotografado no MCVL Zeiss 510 Meta no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

2.4 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Corações mantidos na carcaça foram fixados, lavados em PBS, desidratados em série etanólica (70-100%) e submetidos à secagem em ponto crítico Balzers CPD 030. Após a secagem, o material foi montado em suportes de alumínio para posterior metalização com ouro no metalizador Quorum Q150R S. As imagens foram adquiridas no MEV LEO VP1430 no NMM/UFV. Foram utilizados 3 indivíduos de cada sexo e casta.

3 – Resultados e discussão

O coração de *M. quadrifasciata* consiste em um tubo localizado na linha mediana dorsal do abdômen (Fig 1A). Associados lateralmente ao órgão estão as CP e os MA (Fig. 1D, E, 2A). A localização e organização desse órgão são comuns a todas os indivíduos de *M. quadrifasciata* estudados e semelhante ao observado em outros insetos (Curtis et al. 1999, Poiani e Cruz-Landim 2006, Glenn et al. 2010, Martins et al. 2011). O coração é compartimentalizado no abdômen em uma região chamada sinus pericardial (Cruz-Landim 2009, Chapman 2013, Klowden 2007).

A extremidade distal do coração, próximo ao final do abdômen, é dilatada em relação ao restante do órgão e possui um fundo cego (Fig.1A, B). Essa dilatação inclui as duas últimas câmaras cardíacas, como notificado também para abelhas da tribo Meliponini, Euglossini (Wille 1958, 1963). Essa dilatação provavelmente tem a finalidade de potencializar o mecanismo de propulsão da hemolinfa, uma vez que pode

ter uma maior força muscular, e isso pode ser considerado uma característica mais especializada entre os grupos de abelhas (Wille 1958). Apesar disso, a função dessa especialização ainda não foi investigada.

Os cardiomiócitos que compõem o coração de *M. quadrifasciata* são dispostos de maneira a formar um círculo aberto e em uma única camada (Fig. 2A, B), sendo esta uma característica não conservada para os insetos, uma vez que em adultos de vários insetos, como *Sphinx ligustre* (Wasserthal e Wasserthal 1977), *Calpodex* (Locke 1989) (Lepidoptera), *Rhodnius prolixus* (Chiang et al. 1990) (Hemiptera), *Baculum extradentatum* (Ejaz e Lange 2008) (Phasmatodea), *Aedes aegypti* (Leódido et al. 2013) e *Anopheles gambiae* (Glenn et al. 2010, League et al. 2015) (Diptera), foi observada uma disposição helicoidal dos cardiomiócitos. Entretanto, a implicação da diferença na disposição dos cardiomiócitos nos insetos ainda é desconhecida. A união das extremidades dessas fibras musculares bem como os espaços entre as fibras em abelhas é realizada por um material amorfo extracelular, considerado parte do tecido conectivo (Cruz-Landim 2009). Nas fibras cardíacas de *M. quadrifasciata*, dependendo da posição dos cortes, estriações transversais características de músculo estriado podem ser vistas (Fig. 2B, 3A, B) e, eventualmente, durante o processamento do material para MEV, a musculatura cardíaca e o tecido amorfo associado foram rompidos, possibilitando a visualização externa e interna da parede do órgão (Fig. 2C, D).

Os núcleos dos cardiomiócitos possuem cromatina descondensada com um nucléolo evidente (Fig. 2E, F) e se dispõem central ou periféricamente (Fig. 2B, F), conforme observado em *S. postica* (Poiani e Cruz-Landim 2006). Entretanto, o mesmo não acontece, por exemplo, com a mosca *Protophormia terraenovae* (Angioy et al. 1999), onde os núcleos geralmente estão voltados para o lúmen e com *A. aegypti* (Leódido 2013), onde os núcleos podem estar voltados tanto para a superfície interna quanto para a externa do órgão, o que nos faz acreditar que a disposição desses núcleos não seja uma característica conservada nos insetos, embora ainda não se saiba a consequência disso.

Aberturas correspondentes às *ostia* são observadas aos pares ao longo do coração (Fig. 3A, B). Cada *ostium* possui uma válvula formada pelas projeções das fibras musculares em direção ao lúmen do coração (Fig. 3C, D), compartimentalizando esse

órgão em câmaras (Fig. 3E, F), como observado em outros insetos (Nogueira e Souza 1991, Ejaz e Lange 2008, Glenn et al. 2010). A estrutura da parede do coração na região das válvulas apresenta-se mais fina e sua morfologia se assemelha à descrita para as válvulas incurrentes, que permite a entrada da hemolinfa do sinus pericardial para a luz do órgão durante a diástole e impede o refluxo da mesma durante a sístole (Nogueira e Souza 1991, Pass et al. 2006, Poiani e Cruz-Landim 2006, Glenn et al. 2010, Chapman 2013). O número de *ostia* varia entre os grupos de insetos, podendo variar de dois ou três pares, em piolhos (Phthiraptera) e alguns Heteroptera, a 12 pares, em Blattodea e Orthoptera, entretanto, em abelhas adultas, como *M. quadrifasciata*, assim como nos demais aculeados, há cinco pares dessa estrutura, sendo um par por segmento (Cruz-Landim 2009, Chapman 2013). As células que compõem essa válvula possuem núcleos maiores que os dos cardiomiócitos, em alguns núcleos é possível verificar um pouco de cromatina condensada e mais de um nucléolo (Fig. 3C).

Os MA são fibras com as estriações características das fibras musculares que se originam em pontos concentrados nos tergitos (Fig. 4A) de *M. quadrifasciata* como um conjunto de fibras musculares grandes e abrindo-se como um leque até as duas laterais do coração, onde se conectam através de ramificações (Fig. 4B, C). Conformação semelhante a essa foi revisada por Cruz-Landim (2009) para abelhas e descrita para *A. gambiae* (Glenn et al. 2010) e para outras seis espécies de mosquitos (Martins et al. 2011), embora nesses dois últimos casos ao invés de se abrir em leque, os MA se abrem formando uma estrutura semelhante a uma cesta de basquete. Acreditamos que essa conformação em ramificações aumenta a área de contato desses músculos com o coração dando maior estabilidade à sustentação do órgão. Essas fibras musculares em *M. quadrifasciata* são polinucleadas (Fig. 4D), semelhante ao observado para *A. aegypti* (Leódido et al. 2013).

Ao MEV, nota-se um material amorfo na face ventral do coração ao qual os MA também se ligam fisicamente (Fig. 2C, 4B). Esse material pode ser considerado parte do tecido conectivo que, junto com os MA, podem formar o diafragma dorsal dessa espécie (Miller et al. 1979, Cruz-Landim 2009) e auxiliar na sustentação do coração (Gereben-Krenn e Pass 1999). Além da função de sustentação, é possível que os MA auxiliem na contração peristáltica facilitando a diástole e, por consequência, a entrada da hemolinfa no coração, uma vez que, em *A. gambiae* as *ostia* só foram observadas no centro da

ramificação de cada feixe de MA, o que indica que, mesmo que indiretamente, esses músculos podem controlar a abertura e fechamento das válvulas (Glenn et al. 2010). Entretanto, isso parece não ser imprescindível para o peristaltismo do coração, já que o mesmo possui a capacidade de exercer a contração mesmo quando fora do corpo do inseto, indicando uma contração miogênica (Sanger e McCann 1968, Miller et al. 1979, Cruz-Landim 2009).

As CP estão dispostas associadas às ramificações dos MA (Fig. 2A, 5A), localização semelhante ao observado para outros insetos (Crossley 1972, Miller et al. 1979, Chiang et al. 1990, Poiani e Cruz-Landim 2007, Das et al. 2008, Glenn et al. 2010, Leódido et al. 2013). Essas células ovais possuem citoplasma volumoso e núcleos pequenos quando comparados ao tamanho da célula, com cromatina relativamente descondensada e com presença de um, eventualmente dois ou três, nucléolos (Fig. 5C, D). As CP podem ser encontradas individualizadas ou, mais comumente, agrupadas formando cordões. No último caso, o agrupamento pode ocorrer de forma tão íntima, que as CP se assemelham a células polinucleadas ou a um sincício, embora quando vistas no microscópio confocal, é possível ver os limites celulares (Fig. 2A). Quando observadas no MEV e em algumas secções histológicas, é possível ver a irregularidade da superfície dessas células indicando, novamente invaginações ou dobras na membrana plasmática (Fig. 5B, D). Essas dobras podem agir de forma a aumentar a superfície de contato da célula com a hemolinfa, facilitando a captação de compostos e otimizando sua função (Denholm e Skaer 2009). Os agrupamentos em cordões dessas células observadas em todos os indivíduos estudados em *M. quadrifasciata*, e que também foram verificados em operárias e rainhas de *S. postica* (Poiani e Cruz-Landim 2006 e 2007), podem talvez funcionar como uma barreira seletiva, uma vez que limita o contato direto de determinadas substâncias como algumas áreas da superfície.

Próximo às válvulas e na região periostial, tanto na luz do coração quanto na superfície externa do mesmo de todos os indivíduos de *M. quadrifasciata*, foram observados hemócitos (Fig. 3D), células responsáveis pela resposta imune celular (Lavine e Strand 2002, Chapman 2013). A detecção de hemócitos próximos ao coração era esperada, uma vez que eles se encontram em suspensão na hemolinfa que flui através das *ostia* ou aderidos aos órgãos viscerais (Cruz-Landim 2009, Glenn et al. 2010). Essa localização é estratégica, pois essa região está sujeita a um acúmulo de

patógenos que podem ficar presos no diafragma dorsal ou na abertura estreita da *ostia* e propicia uma ação rápida dessas células. Essas duas condições indicam que boa parte da resposta imune celular pode ocorrer nessa região, além do mais, na região periostial estão presentes de várias CP, cuja proximidade com os hemócitos é essencial para a rápida absorção de produtos gerados da degradação de patógenos. Esses fatos sugerem uma forte interação entre o sistema circulatório e imune (King e Hillyer 2012).

De modo geral, características da morfologia do coração, como a disposição em um círculo aberto das fibras cardíacas e de seus núcleos e a dilatação de fundo cego na porção final do órgão, bem como a disposição e morfologia das CP e MA foram similares entre forrageiras, operárias e rainhas recém-emergidas e machos de *M. quadrifasciata*, e foi bastante semelhante também à estrutura desse órgão em *S. postica* (Poiani e Cruz-Landim 2006), assim como em outros Meliponini (Wille 1958, 1963). A localização do coração e posicionamento dos MA e CP em relação ao mesmo também foram observados em outros grupos de insetos (Curtis et al. 1999, Gereben-Krenn e Pass 1999, Glenn et al. 2010, Martins et al. 2011). Dessa forma, nossos resultados indicam que, apesar de possuírem algumas características comuns a outros grupos de insetos, os indivíduos de *M. quadrifasciata* também possuem caracteres morfológicos que são peculiares às abelhas.

4 – Figuras

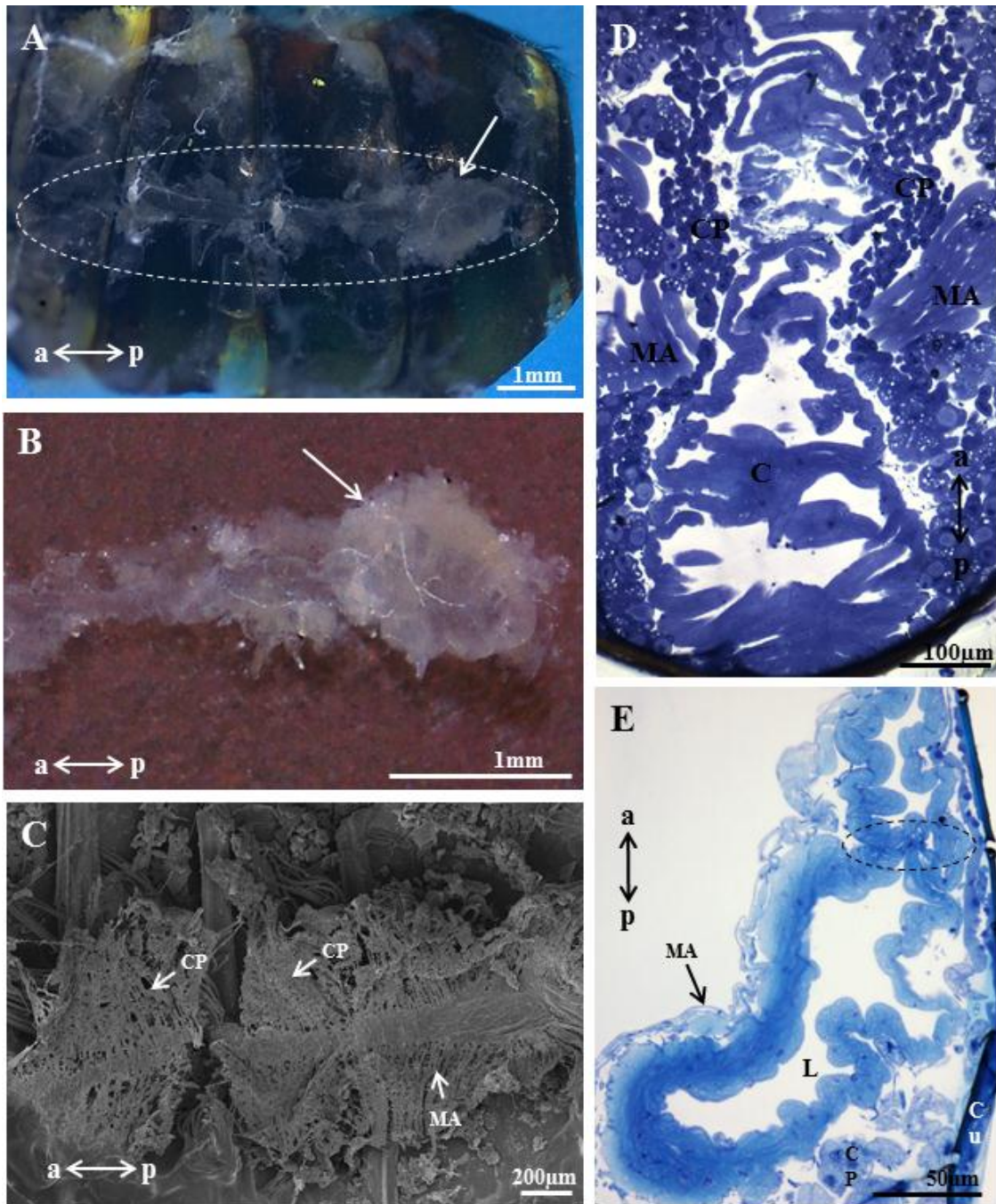


Figura 1: Morfologia geral do coração de *M. quadrifasciata* analisada no microscópio estereoscópio (A e B), MEV (C) e no microscópio de luz (D e E). (A) Coração de forrageira (pontilhado) aderida à parede dorsal do abdômen, com a seta indicando a dilatação na porção final. (B) Porção final do coração de uma rainha com a dilatação de fundo cego (seta). (C) Coração de uma forrageira aderida à parede dorsal do abdômen com músculos alares e células pericardiais associados. (D) Coração (C) de forrageira com células pericardiais (CP) e músculos alares (MA) associados. (E) Dilatação do coração de uma rainha com músculos alares (MA) associados e uma válvula (pontilhado) separando o coração em câmaras. L: lúmen; Cu: cutícula; a: região anterior e p: região posterior do corpo.

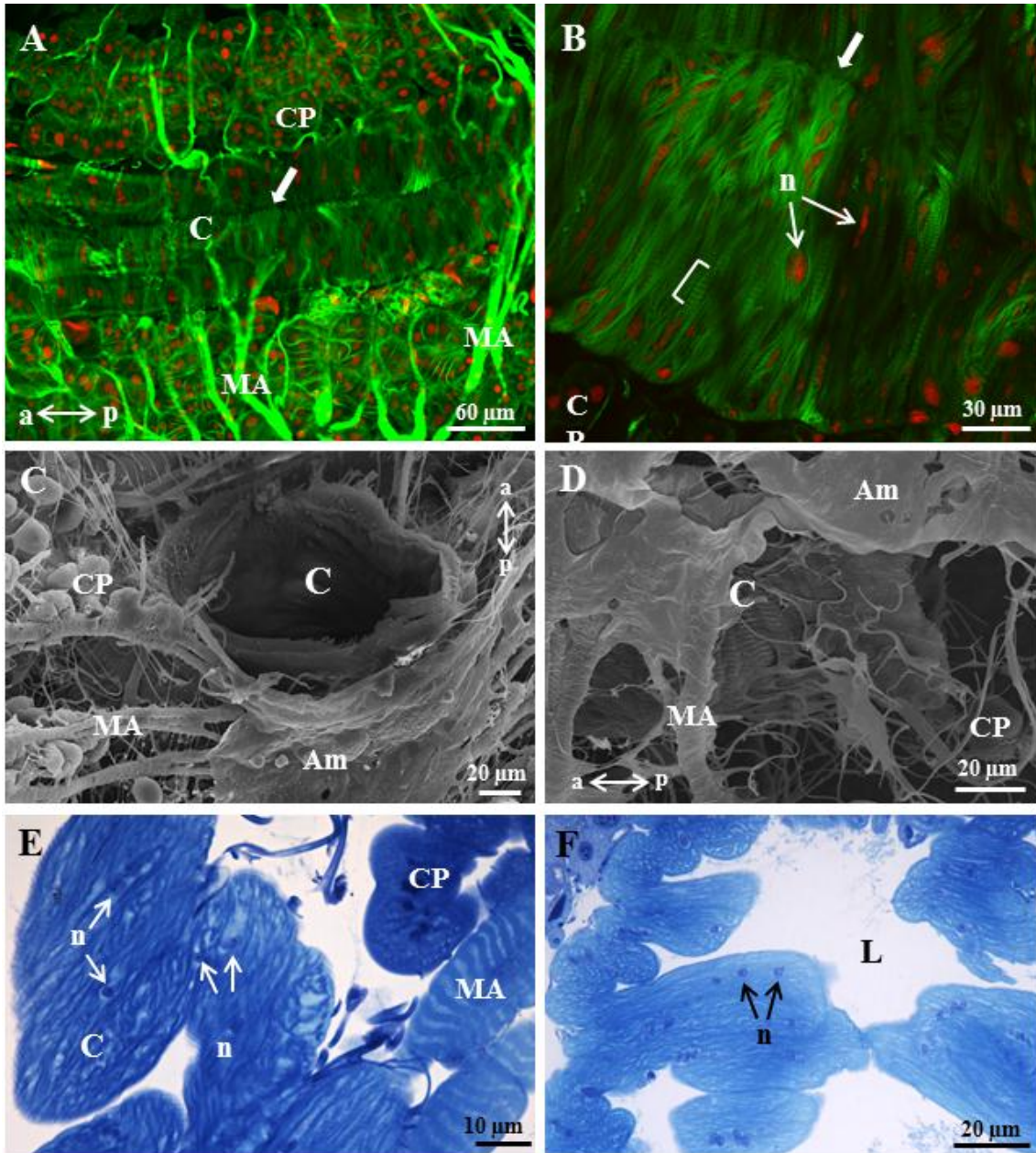


Figura 2: Morfologia do coração de *M. quadrifasciata* ao MCVL (A e B), MEV (C e D) e ao microscópio de luz (E e F). **(A)** Coração (C) de operária recém-emergida, com músculos alares (MA) e células pericardiais (CP) arranjadas, em sua maioria, em cordões associados lateralmente ao órgão. A seta indica a união das extremidades do círculo interrompido de fibras musculares que forma o tubo cardíaco. **(B)** Detalhe do coração de operária recém-emergida mostrando os cardiomiócitos com seus núcleos (n) periféricos e centrais e estriações (colchete). A seta indica a união das extremidades do círculo interrompido de fibras musculares que forma o tubo cardíaco; CP: células pericardiais. **(C)** Coração (C) fraturado de macho, com material amorfo (Am) na face ventral do coração. MA: músculos alares; CP: células pericardiais. **(D)** Coração (C) de forrageira evidenciando sua estriação com material amorfo (Am) rompido e músculos alares (MA); CP: célula pericardial. **(E)** Detalhe do músculo do coração (C) de uma forrageira mostrando o núcleo (n) dos cardiomiócitos e células pericardiais (CP) e músculos alares (MA) associados. C: coração. **(F)** Detalhe do coração de uma operária recém-emergida, mostrando o núcleo (n) dos cardiomiócitos, com cromatina descondensada. L: lúmen; a: região anterior e p: região posterior do corpo.

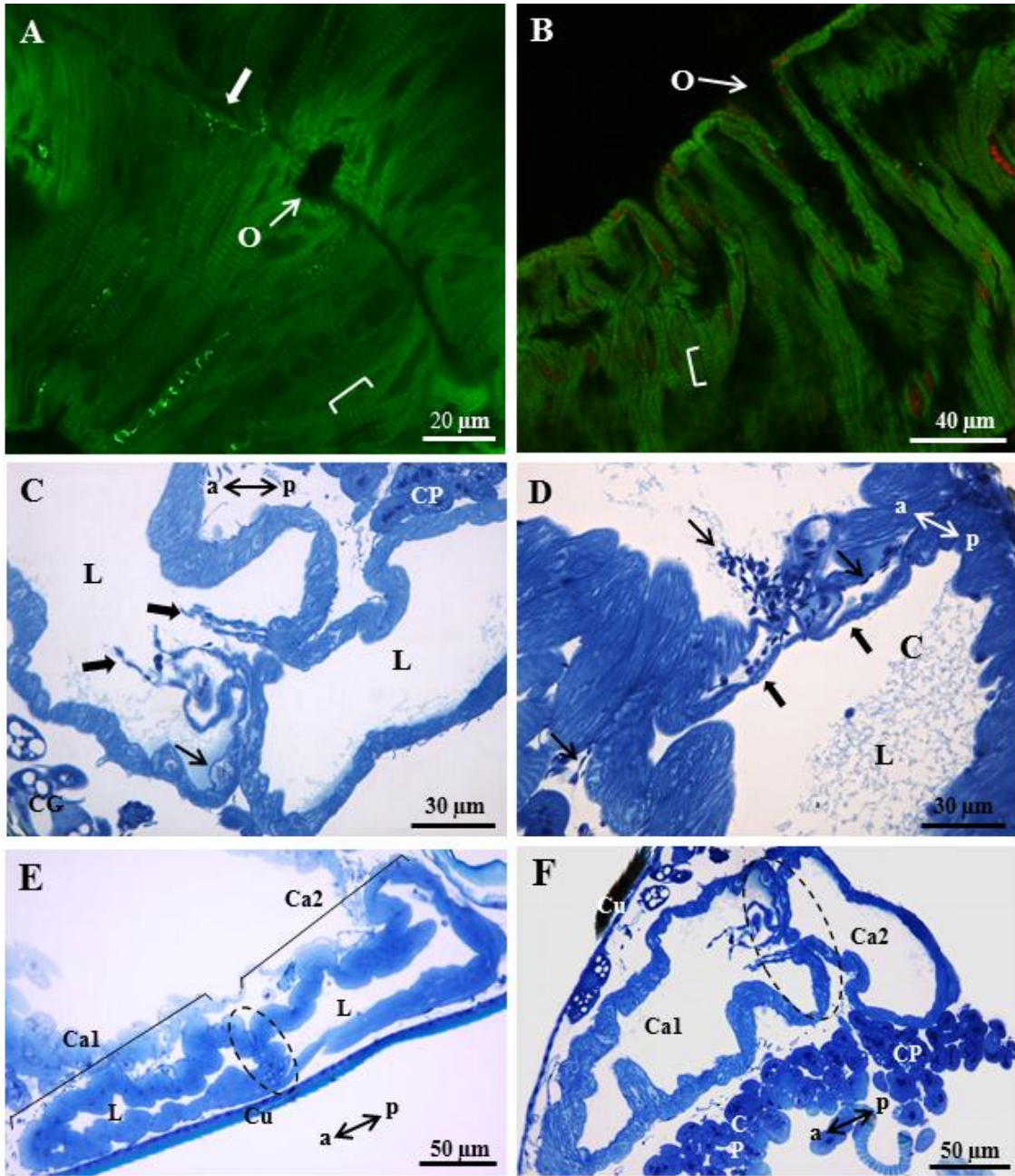


Figura 3: Morfologia do coração de forrageiras de *M. quadrifasciata* ao MCVL (A e B) e microscópio de luz (C-E). (A) Detalhe do coração evidenciando o *ostium* (O), a ligação das extremidades de cardiomiócitos (seta larga) e estriações (colchete) dessas células. (B) Detalhe do coração evidenciando o *ostium* (O), as estriações (colchete) dos cardiomiócitos, bem como seus núcleos (marcações em vermelho). (C) Projeções das fibras cardíacas (seta larga) em direção ao lúmen (L) do coração formando as válvulas. Célula que compõe a válvula (seta fina), com núcleo maior que o dos cardiomiócitos. CP: células pericardiais; CG: corpo gorduroso. (D) Hemócitos (seta fina) passando pela válvula do coração (C) e aderidos à parede do mesmo; (E) e (F) Duas câmaras (Ca1 e Ca2) do coração de operária recém-emergida e forrageira, respectivamente, separadas por válvulas (pontilhado). CP: células pericardiais; L: lúmen; a: região anterior e p: região posterior do corpo.

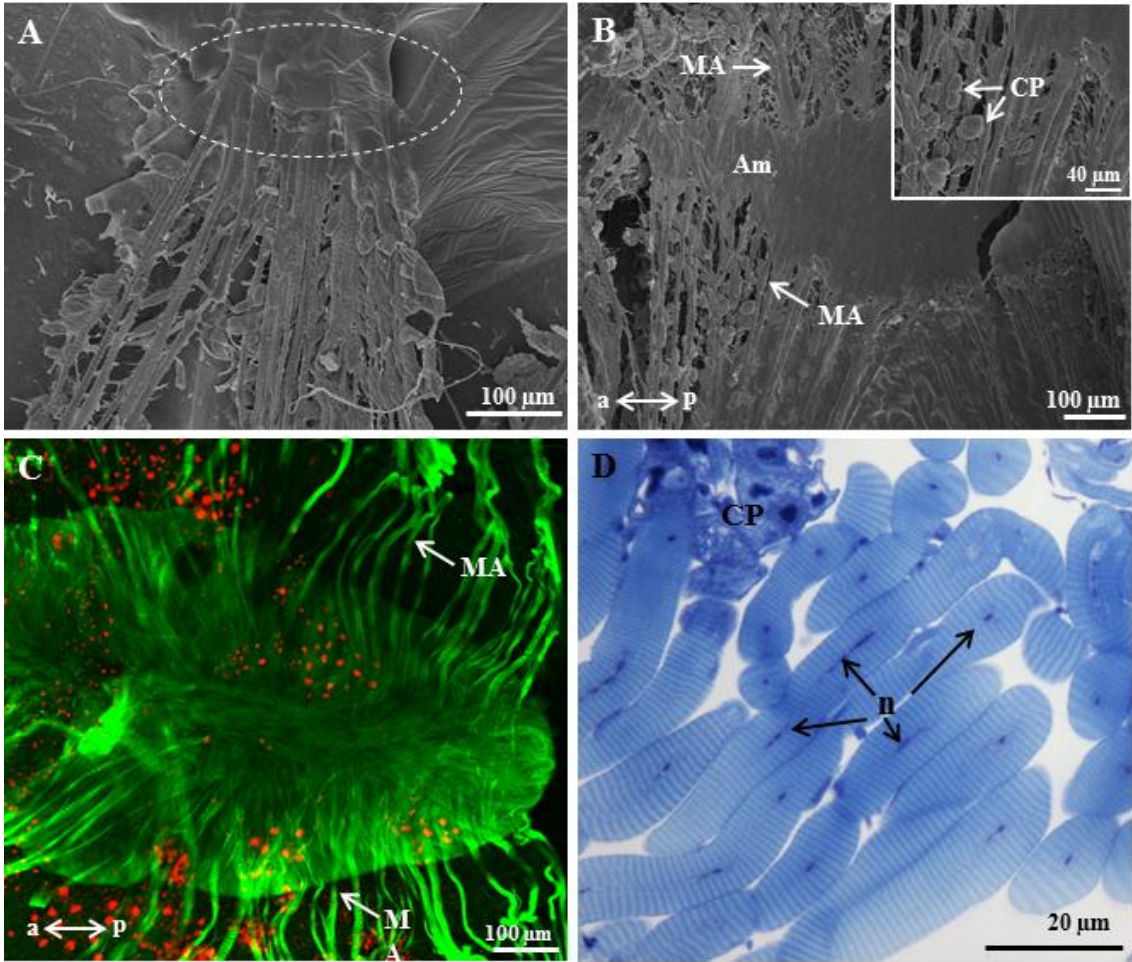


Figura 4: Músculos alares de forrageiras (A e B) e rainhas (C e D) de *M. quadrifasciata*. (A) Feixe de músculos alares inseridos na cutícula da lateral do abdômen do indivíduo (pontilhado). (B) Músculos alares (MA) se inserindo na lateral do coração e do material conjuntivo amorfo (Am) que cobre o coração, com células pericardiais (CP) entremeadas às fibras. (C) MCVL dos músculos alares (MA) chegando na lateral da região dilatada do coração. (D) Corte histológico dos músculos alares evidenciando suas estrias e seus diversos núcleos (n) e com algumas células pericardiais (CP). a: região anterior e p: região posterior do corpo.

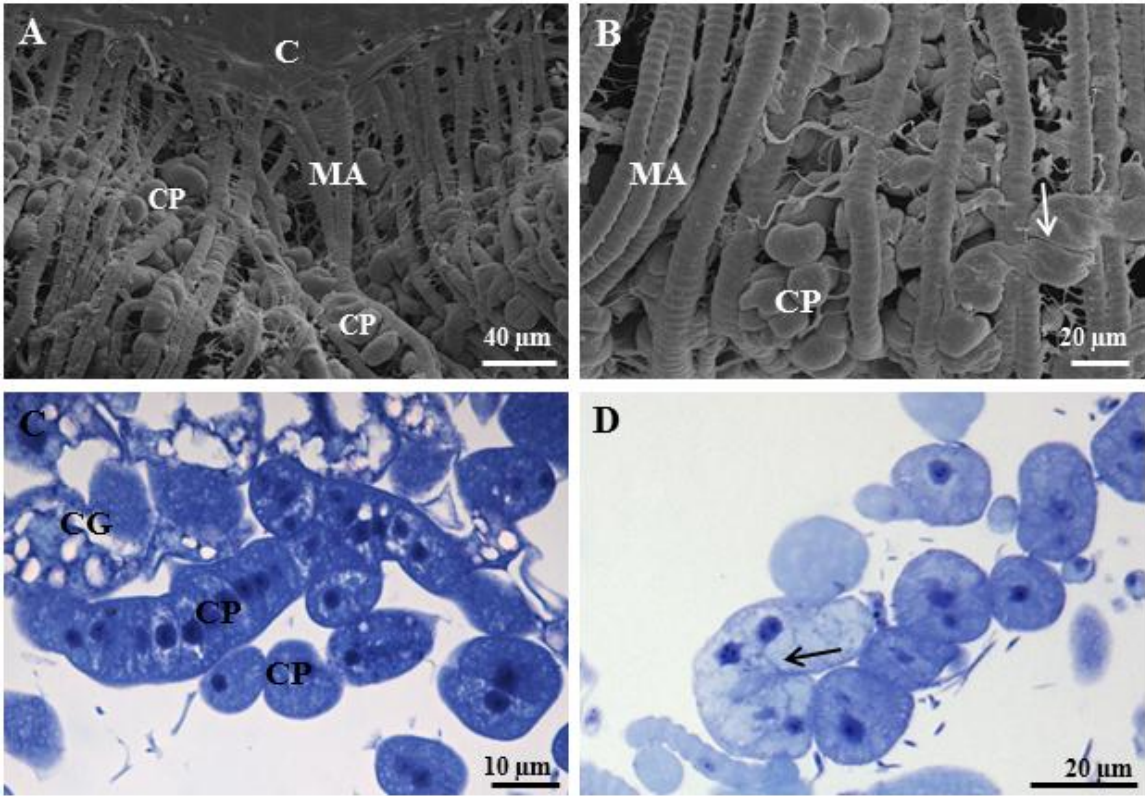


Figura 5: Morfologia de células pericardiais de *M. quadrifasciata* ao MEV (A e B) e microscópio de luz (C e D). (A) Disposição das células pericardiais (CP) de operárias recém-emergidas entre as fibras do músculo alar (MA) e próximo a lateral do coração (C). (B) Células pericardiais (CP) de forrageiras entre fibras do músculo alar estriado (MA), mostrando invaginações na membrana (seta). (C) Células pericardiais (CP) isoladas ou agrupadas em cordão de operárias recém-emergidas. (D) Células pericardiais de machos com seus núcleos com cromatina descondensada, mostrando mais de um nucléolo em alguns deles e invaginações na membrana (seta).

5 – Referências bibliográficas

- Angioy A M, Boassa D, Dulcis D (1999). Functional morphology of the dorsal vessel in the adult fly *Protophormia terranova* (Diptera, Calliphoridae). *Journal of Morphology*. 240: 15-31.
- Chapman R F (2013). *The Insects: structure and functions*. Cambridge University Press. Fifth Edition. 929p.
- Chiang R G, Chiang J A, Davey K G (1990). Morphology of the dorsal vessel in the abdomen of the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology*. 204: 9-23.
- Cook J M (1993). Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*. 71: 421-435.
- Crossley A C (1972). The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insects: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue & Cell*. 4(3): 529-560.
- Cruz-Landim C (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora SciELO-Ed UNESP, São Paulo. 408p.
- Curtis N J, Ringo J M, Dowse H B (1999). Morphology of the pupal heart, adult heart and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*. 240: 225-235.
- Das D, Aradhya R, Ashoka D, Inamdar M (2008). Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. *Cell and Tissue Research*. 331: 565-570.
- Denholm B, Skaer H (2009). Bringing together components of the fly renal system. *Curent Opinions in the Genetics & Development*. 19: 526-532.
- Ejaz A, Lange A B (2008). Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extradentatum*. *Peptides*. 29: 214-225.

- Gereben-Krenn B A, Pass G (1999). Circulatory organs of Diplura (Hexapoda): the basic design in Hexapoda? *Journal of Insect Morphology & Embryology*. 28: 71-79.
- Gillot C (2005). *Entomology*. Springer. Third Edition. 834p.
- Glenn J D, King J G, Hillyer J F (2010). Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *The Journal of Experimental Biology*. 213: 541-550.
- Heard T A (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*. 44: 183-206
- Hillyer J F (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*. 58: 102-118.
- Kerr W E (1948). Estudo sobre o gênero *Melipona*. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*. 5: 181-276.
- Kerr W E, Akahira Y, Camargo C A (1975). Sex determination in bee. IV. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata*. *Genetics*. 81: 749-759.
- Kerr W E, Carvalho G A, Nascimento V A (1996). *Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação*. Ed. Fundação Acangaú. 144p.
- King J G, Hillyer J F (2012). Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems. *PLOS Pathogens*. 8(11): 1-15
- Klowden M J (2007). *Physiological systems in insects*. 2 nd ed. Boston: Academic Press. 688p.
- Lavine M D, Strand M R (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- League G P, Onuh O C, Hillyer J F (2015). Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology*. 218: 370-380.

- Lehmacher C, Abeln B, Paululat A (2012). The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Structure and Development*. 41: 459-474.
- Leócido A C M, Ramalho-Ortigão M, Martins G F (2013). The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Structure & Development*. 42: 539-550.
- Locke M (1989). Secretion by insect heart muscle cell. *Journal of Insect Physiology*. 35(1): 53-56.
- Martins G M, Ortigão R J M, Pimenta P F P (2011). Morphological features of the heart of six mosquito species as revealed by scanning electron microscopy. *International Journal of Tropical Insect Science*. 31: 98-102.
- Michener C D (2007). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 913p.
- Miller T A, Benedeczky I, Rózsa K S (1979). Ultrastructure of the muscles of the dorsal diaphragm in *Lacusta migratoria*. *Cell and Tissue Research*. 203: 93-105.
- Nogueira N F S, Souza W (1991). Scanning electron microscopy of the dorsal vessel of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 86(1): 19-24.
- Pass G, Gereben-Krenn B A, Merl M, Plant J, Szucsich N U, Tögel M (2006). Phylogenetic relationships of the orders of Hexapoda: contributions from the circulatory organs for a morphological data matrix. *Arthropod Systematic & Phylogeny*. 64(2): 165-203
- Poiani S B, Cruz- Landim C (2006). Histologia e ultra-estrutura do vaso dorsal de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae) em operárias e rainhas de diferentes idades. *Iheringia, Série Zoologia*. 96(1): 121-126.
- Poiani S B, Cruz- Landim C (2007). Histology and ultrastructure of pericardial cells of *Scaptotrigona postica* Latrielle (Hymenoptera, Apidae) in workers and queens of diferente ages. *Micron*. 38: 766-770.
- Rotstein B, Paululat A (2016). On the morphology of the *Drosophila* heart. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 3(15): 1-14.

- Sanger J W, MacCann F V (1968). Ultrastructure of moth alary muscles and their attachment to the heart wall. *Journal of Insect Physiology*. 14: 1539-1544.
- Silveira F A, Melo G A R, Almeida E A B (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte. 253pp.
- Snodgrass R E (1956). *Anatomy of honeybee*. New York, Vail-Ballow. 334p.
- Tao Y, Schulz R A (2007). Heart development in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 18: 3-15.
- van Veen J W, Sommeijer M J, Meeuwsen F (1997). Behaviour of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*. 44: 435-447.
- Wasserthal L T, Wasserthal W (1977). Innervation of heart and alary muscles in *Sphinx ligustri* L. (Lepidoptera). *Cell and Tissue Research*. 184: 467-486.
- Wille A (1958). A comparative study of dorsal vessel of bees. *Annals of Entomological Society of America*. 51(6): 538-546.
- Wille A (1963). Phylogenetic significance of an unusual African stingless bee, *Meliponula bocandei* (Spinola). *Revista de Biologia Tropical*. 11(1): 25-45.

CAPÍTULO II

Análise morfológica e contagem total e diferencial de hemócitos circulantes de fêmeas adultas de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Resumo

O sistema imune dos insetos envolve os mecanismos de defesa humoral e celular. O primeiro resulta da ação de fatores humorais, tais como peptídeos antimicrobianos, e o segundo resulta da ação direta das células desse sistema (hemócitos) para a eliminação de agente estranhos através de fagocitose, nodulação e encapsulação. Neste trabalho, nós descrevemos a morfologia e realizamos contagem total e diferencial de hemócitos de fêmeas de *Melipona quadrifasciata*. Os granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos de rainha e operárias de diferentes idades foram analisadas por técnica microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os prohemócitos são as menores células e menos abundantes, com alta razão núcleo/citoplasma. Os granulócitos foram normalmente arredondados, assim como seu núcleo, e são caracterizados pela presença de diversas vesículas eletrondensas em seu citoplasma. Os plasmatócitos apresentam uma variedade de formas, que podem ser de ovalada à fusiforme, possuem núcleo oval e podem apresentar vesículas. Granulócitos e plasmatócitos apresentaram inclusões endocíticas e foram considerados células fagocitárias. Os granulócitos são os hemócitos mais abundantes dentre todos os indivíduos, enquanto os prohemócitos aparecem em menor quantidade. O número total de células foi menos abundante em forrageiras, enquanto a maior quantidade foi observada em nutrizes. Com esses resultados podemos observar que a quantidade de hemócitos vai diminuindo à medida que as abelhas vão ficando mais velhas.

1 – Introdução

Os indivíduos da tribo Meliponini são importantes polinizadores de espécies vegetais e consideradas um dos principais grupos de polinizadores do Brasil, sendo responsáveis por até 90% da polinização de espécies nativas. Dependendo do bioma, desempenham um papel ecológico essencial, contribuindo para manutenção das populações de plantas e, por consequência, de animais (Janzen 1980, Kerr et al. 1996, Imperatriz-Fonseca et al. 2006, Slaa et al. 2006). A abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (1836) (Meliponini), conhecida como “mandaçaia”, pode ser encontrada no Brasil, da Paraíba ao Rio Grande do Sul, também na Argentina e Paraguai (Moure e Kerr 1950, Silveira et al. 2002). Apesar de toda a importância ecológica para a polinização de espécies de plantas nativas (Kerr et al. 2001, Imperatriz-Fonseca et al. 2006), as populações de abelhas sem ferrão têm diminuído drasticamente devido, principalmente, à ação de meleiros, destruição de habitats, ação de patógenos e uso de inseticidas (Freitas et al. 2009). Acredita-se que os dois últimos fatores podem influenciar diretamente na dinâmica dos componentes do sistema imune das abelhas e de insetos em geral (Disale et al. 2013, El-Aziz e Awad 2010, Pandey et al. 2008).

Na hemolinfa, os patógenos entram em contato com os mecanismos de defesa inata envolvendo respostas humoral e celular (Jiravanichpaisal et al. 2006). A resposta humoral envolve a ação de proteínas e é responsável por processos de coagulação, produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de complexos enzimáticos e melanização (Jiravanichpaisal et al. 2006, Schmidt et al. 2001, Vilmos e Kurucz 1998, Garcia-Lara et al. 2005). Já a resposta celular se refere à atividade dos diversos tipos de hemócitos, células de defesa sésseis e suspensas na hemolinfa (Jiravanichpaisal et al. 2006, Lavine e Strand 2002, Strand 2008, Ribeiro e Brehelin 2006). Porém, há uma sobreposição entre defesa humoral e celular, já que muitos fatores humorais afetam a função dos hemócitos, ao mesmo tempo em que os hemócitos são importantes fontes de muitas moléculas humorais (Lavine e Strand 2002, Ribeiro e Brehelin 2006).

É conhecido que o tipo e/ou quantidade dos hemócitos são passíveis de variação conforme a idade do inseto, podendo ser também espécie-específicos (Gupta 1979, Götz e Boman 1985 – citados por Amaral et al. 2010). Em insetos sociais, podem haver diferenças na capacidade imune entre sexos e castas. Em abelhas da espécie *Bombus*

terrestris, os machos são menos imunocompetentes do que as fêmeas (Gerloff et al. 2003), já em forrageiras da espécie *Apis mellifera*, há uma drástica redução no número de hemócitos com a idade (Schmid et al. 2008, Bedick et al. 2001, Amdam et al. 2004).

A morfologia dos hemócitos é uma das principais ferramentas utilizadas para sua classificação, principalmente características nucleares, citoplasmáticas e ultraestruturais (Brayner et al. 2005, Araújo et al. 2008, Amaral et al. 2010, Hwang et al. 2015). Os principais tipos de hemócitos encontrados em insetos são prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitoides (Lavine e Strand 2002). As células do sistema imune responsáveis pela defesa celular na maioria dos insetos são os granulócitos e os plasmatócitos, que participam da fagocitose, formação de nódulos e encapsulação de corpos estranhos (Jiravanichpaisal et al. 2006, Lavine e Strand 2002, Strand 2008, Ribeiro e Brehelin 2006). Os prohemócitos estão envolvidos no processo de hematopoese, pois se dividem ativamente originando os demais tipos de hemócitos (Yamashita e Iwabuchi 2001, Lavine e Strand 2002).

Visto que os hemócitos possuem um papel crucial na resposta imune dos insetos aos agentes externos, o objetivo deste trabalho foi realizar as contagens total e diferencial (CTH e CDH) e descrever os principais tipos de hemócitos (prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos) através das microscopias óptica e eletrônica de transmissão, em rainhas recém-emergidas e operárias de diferentes idades (nutrizes coletadas no ninho, forrageiras e operárias recém-emergidas) de *M. quadrifasciata*.

2 – Material e métodos

2.1 – Obtenção das abelhas

As abelhas foram obtidas a partir de colônias de *Melipona quadrifasciata* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa-MG. As nutrizes, abelhas com menos de 14 dias (Kerr et al. 1996) foram capturadas dentro das colônias, enquanto que as forrageiras, indivíduos que normalmente possuem 25 ou mais dias de idade (Kerr et al. 1996), foram capturadas com um frasco de vidro na entrada das colônias, entre 9h e 10h da manhã, período em que grande parte das forrageiras já retornaram às colônias após a atividade de forrageamento do período da manhã. Para a obtenção das rainhas e das operárias recém-emergidas (RE) (indivíduos

com 2 a 5 dias de idade), favos de cria foram mantidos no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, a uma temperatura de 28 ± 3 °C umidade relativa de 75 ± 10 %, em placa de Petri cobertas com papel filtro, contendo solução de mel (50% água e mel de *Apis mellifera*), até os indivíduos emergirem. Os opérculos das células de cria foram retirados com uma pinça.

2.2 – Coleta de hemolinfa

Para coleta da hemolinfa, 20µl de solução anticoagulante (0.098 M de NaOH, 0.145 M de NaCl, 0.017 M de EDTA e 0.041 M de ácido cítrico, pH 4.5) foi injetada no primeiro segmento do abdômen de abelhas anestesiadas a frio (mais ou menos 4 °C) utilizando uma seringa para insulina (BD Ultra-fine, agulha com calibre de 0,25 mm) (Araújo et al. 2008). Em seguida, uma leve pressão foi feita no abdômen da abelha com a mão para expulsar uma gotícula de hemolinfa através do orifício criado após a retirada da agulha. A hemolinfa expulsa foi coletada com uma micropipeta e ponteiros previamente siliconadas com SigmaCote (Sigma) e usada para caracterização morfológica por microscopia de luz e para contagem total e diferencial das células.

2.3 – Contagem total de hemócitos (CTH)

Para determinação do número total de células, após a injeção do anticoagulante, 10µL de hemolinfa foi dispensada diretamente e sem diluição em câmara de Neubauer melhorada e a contagem foi feita sob microscópio óptico (trinocular Primo Star, Zeiss) com aumento de 400x. Dez repetições foram realizadas para cada grupo de indivíduo.

2.4 – Caracterização morfológica e contagem diferencial (CDH) dos hemócitos por microscopia de luz

Após injeção de 20µL de solução anticoagulante, a quantidade máxima de hemolinfa extravasada foi coletada como descrito acima e transferida para lâminas de vidro com o auxílio da pipeta, formando linhas paralelas, permanecendo em repouso por no mínimo 20 minutos à temperatura ambiente para aderência das células e secagem da lâmina. Em seguida, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com solução Giemsa em tampão Sörensen (0,06M, pH 6,8), na proporção 1:30 (v/v), por 15 minutos à temperatura ambiente e, então lavadas em água corrente para remoção do resíduo mesmo (Amaral et al. 2010).

Para cada grupo de abelhas, foram analisadas seis lâminas com um pool de hemolinfa de três indivíduos cada.

As células foram identificadas e caracterizadas em microscópio óptico trinocular Primo Star, Zeiss, e fotografadas com câmera digital Axio Cam ERc5s. Para contagem diferencial, trezentas células foram consideradas por lâmina para se estimar o número médio de três tipos hemócitos (plasmatócitos, granulócitos e prohemócitos) por indivíduo. Para a medição do comprimento dos hemócitos, foi utilizado o programa *Image ProPlus 4.5* e foi aferido o diâmetro das células e comprimento maior das células que não eram redondas.

2.5 – *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Para análise de MET, as amostras da hemolinfa dos diferentes indivíduos estudados foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml não siliconizados, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) acrescido de 3% de sacarose e mantidas no fixador por no mínimo 1 hora à 4 °C. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, seguido de lavagem em tampão fosfato (PBS – 0,1 M, pH 7,6). As amostras foram desidratadas por uma série alcóolica ascendente (70 a 100%) e pré-infiltrados com uma mistura de etanol e resina LRWhite na proporção 1:1 por uma hora, seguida pela infiltração em resina 100% por 2 horas. A cada etapa do processo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 1 minuto para formação de pellets. Em seguida, as amostras infiltradas foram levadas à polimerização por no mínimo 12 horas a 60°C, ainda em microtubos. Após esta, cortes ultrafinos de 70 nm foram obtidos no ultramicrotomo (RCM Products Power Tome-X) utilizando uma navalha de diamante (Diatome). Os cortes foram então contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 0,2% E, posteriormente, observados em MET Zeiss EM 109 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.6 – *Análise estatística*

Os dados de contagem e tamanho celular foram analisados por análise de variância (ANOVA) com posterior comparação de médias pelo teste de Tukey. Dados que não obedeceram homocedasticidade foram analisados por análise de variância não-

paramétrica (Teste Kruskal-Wallis) com posterior comparação das médias pelo teste de Dunn. O software usado foi o SigmaPlot 12.5.

3 – Resultados

3.1 – Caracterização morfológica dos hemócitos

Os três principais tipos celulares (prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos) responsáveis pela resposta imune celular foram encontrados na hemolinfa de todos os indivíduos de *M. quadrifasciata* estudados.

3.1.1 – Prohemócitos

Os prohemócitos foram as menores células encontradas na hemolinfa da espécie estudada, variando de $4,71 \pm 0,09 \mu\text{m}$ em rainhas a $6,18 \pm 0,13 \mu\text{m}$ em forrageiras. O comprimento dessas células foi diferente considerando os diferentes indivíduos, exceto entre as operárias RE e as rainhas, que são semelhantes entre si ($F_{1,3} = 45,51$; $P < 0,001$; Tab. 1). São células redondas ou ligeiramente ovais, com núcleo proporcionalmente grande que ocupa a maior parte do volume celular. O citoplasma mostrou-se restrito a uma pequena faixa periférica (Fig. 1A, B). Na eletromicrografia, o núcleo apresentou cromatina dispersa com nucléolo evidente, poucas organelas evidentes, com mitocôndrias de formato oval, poucos ribossomos e poucas vesículas eletrondensas proporcionalmente grandes (Fig. 1B).

3.1.2 – Granulócitos

Os granulócitos, assim como seu núcleo, apresentaram-se redondos ou levemente ovais. O núcleo, normalmente, ocupou uma posição central, apresentando uma coloração violeta quando corado com Giemsa e observado sob o microscópio de luz. O citoplasma apresentou caráter levemente basófilo, com uma coloração azul claro (Fig. 1C). As forrageiras apresentaram os granulócitos de maior comprimento ($11,98 \pm 0,27 \mu\text{m}$) e foram significativamente diferentes dos demais indivíduos, que foram semelhantes entre si ($F_{1,3} = 36,50$; $P < 0,001$) (Tab. 1). Na MET, o núcleo apresentou pouca heterocromatina e não tinha nucléolo evidente. No seu citoplasma foi possível identificar perfis mitocondriais arredondados e alongados e alguns ribossomos puderam também ser observados. Vesículas eletrondensas características da célula foram

evidentes, bem como, algumas vesículas eletrólucidas (Fig. 1D). Muitas vezes os granulócitos apresentaram uma membrana irregular com alguns filopódios presentes, em decorrência disso, em algumas células, foi possível ver processos de endocitose (Fig. 2A).

3.1.3 – *Plasmatócitos*

Os plasmatócitos apresentaram-se como células polimórficas, podendo ser fusiforme, ovaladas, em formato de meia lua e algumas vezes foi possível observar pseudópodes (Fig. 1E, F; 2B). Esse tipo celular foi o maior entre os três tipos de hemócitos, com seu comprimento variando de $9,52 \pm 0,23 \mu\text{m}$ em operárias recém-emergidas a $14,83 \pm 0,36 \mu\text{m}$ em forrageiras. O comprimento dos plasmatócitos foi significativamente diferente entre os diferentes indivíduos, com exceção das rainhas recém-emergidas e das nutrizes em que ele foi semelhante ($F_{1,3} = 38,56$; $P < 0,001$; Tab. 1). Seu citoplasma apresentou certa basofilia, indicada pela coloração azul clara. Seu núcleo mostrou-se oval e normalmente central, apresentando-se altamente basófilo, representado pela sua coloração violeta forte (Fig. 1C). Ao MET, o núcleo apresentou cromatina homogeneamente distribuída, porém com algumas regiões de heterocromatina. No citoplasma, foram observados perfis mitocondriais arredondados e alongados e em algumas células foi possível observar uma quantidade expressiva de ribossomos, vesículas eletrondensas em quantidade variada e diversas vesículas eletrólucidas provenientes de processos endocíticos (Fig. 1F; 2C, D).

3.2 – *Quantidade total e diferencial dos hemócitos*

A CTH considerou o número total de células por microlitro de hemolinfa. A quantidade de células encontrada foi diferente entre os indivíduos ($F_{1,3} = 15,28$; $P < 0,001$), porém a quantidade de células das operárias RE não foi significativamente diferente em relação às nutrizes e às rainhas. As nutrizes apresentaram a maior quantidade relativa de células ($236,78 \times 10 \pm 23,10 \times 10$), enquanto as forrageiras foram a que apresentaram a menor quantidade ($78,40 \times 10 \pm 9,93 \times 10$). As operárias RE ($179,43 \times 10 \pm 14,34 \times 10$) e as rainhas recém-emergidas ($156,45 \times 10 \pm 16,99 \times 10$) mostraram quantidades intermediárias, embora o CTH das operárias RE apresentaram semelhanças significativas tanto com as nutrizes quanto com as rainhas (Fig.3).

Quanto à contagem diferencial, os prohemócitos se apresentaram em menor quantidade nas forrageiras ($16,17 \pm 2,52$) e em maior nas rainhas recém-emergidas ($35,80 \pm 6,84$), entretanto as nutrizes ($24,83 \pm 3,41$) e operárias recém-emergidas ($21,83 \pm 5,50$) mostraram-se estatisticamente semelhantes tanto às forrageiras quanto às rainhas ($H_{1,3} = 8,87$; $P = 0,03$; Fig. 4A). Já os granulócitos foram as células mais abundantes em todos os indivíduos, ocorrendo em maior quantidade em nutrizes ($209,00 \pm 4,24$) e forrageiras ($203,66 \pm 10,40$) e menor em operárias e rainhas recém-emergidas ($169,67 \pm 14,36$ e $166,60 \pm 7,15$, respectivamente) ($F_{1,3} = 4,85$; $P = 0,01$; Fig. 4B). Nos plasmatócitos, os valores de forrageiras ($79,50 \pm 11,52$), rainhas ($99,40 \pm 9,43$) e operárias recém-emergidas ($90,66 \pm 4,19$) foram semelhantes entre si e diferente de nutrizes ($63,83 \pm 5,68$), que apresentaram a menor quantidade desse hemócito ($F_{1,3} = 3,47$; $P = 0,03$; Fig. 4C).

4 – Discussão

Os prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos são as principais células envolvidas na resposta imune celular, dessa forma, no presente trabalho, essas células foram consideradas para contagem total e diferencial entre as diferentes castas de *M. quadrifasciata* (Lavine e Strand 2002, Ribeiro e Brehelin 2006, Strand 2008). Os prohemócitos de *M. quadrifasciata* se apresentaram como o menor hemócito dentre os estudados e com o núcleo ocupando a maior parte do espaço citoplasmático. O que é consistente com a morfologia dos mesmos em outros insetos, como *Melipona scutellaris* (Amaral et al. 2010), *Aedes aegypti* (Araújo et al. 2008), o besouro *Allomyrina dichotoma* (Hwang et al. 2015), *Papilio demoleus* (Jalali e Salehi 2008) e *Culex quinquefasciatus*, onde também foi possível a observação de um evidente nucléolo (Brayner et al. 2005). Esses hemócitos se apresentaram em menor quantidade em *M. quadrifasciata*, semelhante ao observado por Mohandes et al. (2010) em *Apis mellifera*.

Os granulócitos de *M. quadrifasciata* apresentaram morfologia semelhante aos encontrados em espécies do mesmo gênero, além de lepidópteros e dípteros (Amaral et al. 2010, Silva et al. 2002, Araújo et al. 2008, Negreiro et al. 2009, Lavine e Strand 2002). Esse hemócito, assim como os plasmatócitos, são as principais células a realizarem fagocitose nos insetos. Na presença de microrganismos, essas células podem

sofrer intensas alterações morfológicas, apresentando membrana plasmática muito irregular, filopódios e/ou pseudópodes e, em alguns casos, alterações em suas vesículas citoplasmáticas (Lavine e Strand 2002, Kwon et al. 2014, Hwang et al. 2015). Em *M. quadrifasciata*, os granulócitos apresentaram diversas vesículas eletrondensas e algumas eletrólucidas e, o que sugere que essa célula tem um papel importante na resposta imune celular da abelha, uma vez que, quando o inseto é desafiado por agentes externos como bactérias e fungos, esses componentes do citoplasma sofrem alteração (Hwang et al. 2015).

Os plasmatócitos foram as células com maior variação de forma, e isso é uma característica desse tipo de hemócito, podendo também apresentar expansões citoplasmáticas como filopódios e pseudópodes (Silva et al. 2002, Araújo et al. 2008, Jalali e Salehi 2008, Amaral et al. 2010, Hwang et al. 2015). A morfologia dessa célula em *M. quadrifasciata* foi muito semelhante ao observado em *M. scutellaris* (Amaral et al. 2010) e *A. aegypti* (Araújo et al. 2008). Em geral, os plasmatócitos são o tipo de hemócito mais frequente em muitos insetos, sendo muitas vezes mais abundante que os granulócitos (Mohandes et al. 2010, Araújo et al. 2008, Jalali e Salehi 2008, Negreiro et al. 2009, Silva et al. 2002).

Assim como os granulócitos, os plasmatócitos têm participação ativa na resposta imune celular (Lavine e Strand 2002, Lanot et al. 2001). Em *M. quadrifasciata*, essas células também parecem ter um papel importante na defesa do indivíduo a microrganismos, uma vez que aparentemente realiza fagocitose, como observado em *M. scutellaris* (Amaral et al. 2010).

A contagem total de hemócitos tem sido uma ferramenta muito utilizada para avaliar a imunocompetência dos insetos, e essa tem sido largamente utilizada em trabalhos que consideram somente um estágio da vida do inseto, principalmente o estágio larval, onde a quantidade de hemolinfa se apresenta de forma mais abundante (Amaral et al. 2010, Andrade et al. 2010, Stoepler et al. 2013, Hwang et al. 2015). Contudo, há uma necessidade de se conhecer a dinâmica do sistema imune inato ao longo da ontogenia do inseto, principalmente nas abelhas sociais, onde o polietismo etário ocorre. Por isso, o presente trabalho utilizou a contagem total de hemócitos como uma forma de conhecer essa dinâmica em *M. quadrifasciata*.

As forrageiras de *M. quadrifasciata* apresentaram uma menor quantidade total de hemócitos, enquanto as nutrizes apresentaram a maior quantidade. Resultados semelhantes a esses foram observados em *A. mellifera* (Schmid et al. 2008). As abelhas melíferas adultas têm seu número de hemócitos drasticamente reduzido à medida que elas envelhecem, e isso ocorre para operárias, rainhas e zangões. Essa redução da imunocompetência celular estaria relacionado ao envelhecimento do indivíduo e não à tarefa que ele exerce na colônia (Schmid et al. 2008). E esse envelhecimento é conhecido por impactar outros grupos de insetos também, como nos mosquitos *A. aegypti* (Hillyer et al. 2005) e *Anopheles gambiae* (King e Hillyer 2013).

Nossos dados revelaram uma redução no número de hemócitos em forrageiras em relação aos indivíduos mais jovens, como nutrizes e fêmeas recém-emergidas de *M. quadrifasciata*, o que pode ser resultado de uma morte celular programada (Amdam et al. 2005). Isso pode ser uma vantagem evolutiva, visto que a produção e manutenção dessas células pode representar um custo energético (Zuk e Stoehr 2002). Dessa forma, essa condição poderia ser benéfica para a colônia, uma vez que as forrageiras estão no estágio final da vida das operárias e enfrentam uma maior taxa de mortalidade devido ao forrageamento.

5 – Tabelas e figuras

Tabela 1: Comprimento médio dos prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos nas fêmeas de *Melipona quadrifasciata* estudadas. As letras diferentes em cada linha indicam diferenças entre os comprimentos médios dos hemócitos nos diferentes indivíduos baseado no teste de Tukey.

	Comprimento dos hemócitos (μm) \pm erro			
	Campeira	Nutriz	Rainha	Recém-energida
Prohemócito	6,18 \pm 0,13	5,59 \pm 0,11	4,71 \pm 0,09	4,9 \pm 0,06
Granulócito	11,98 \pm 0,27	9,63 \pm 0,23	9,27 \pm 0,22	8,98 \pm 0,18
Plasmatócito	14,83 \pm 0,36	11,93 \pm 0,47	11,3 \pm 0,35	9,52 \pm 0,23

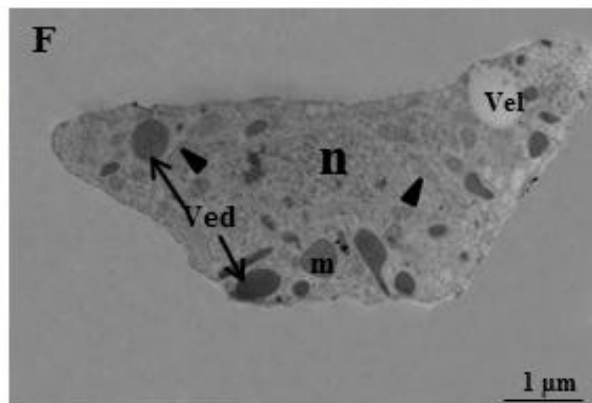
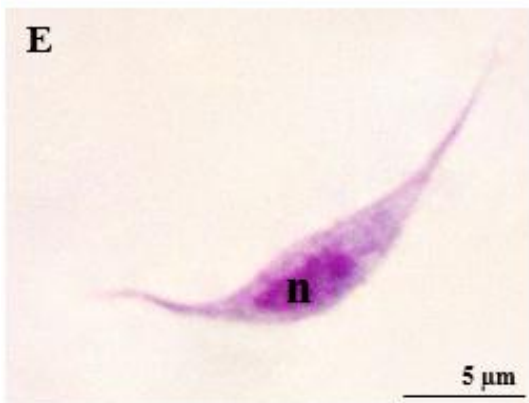
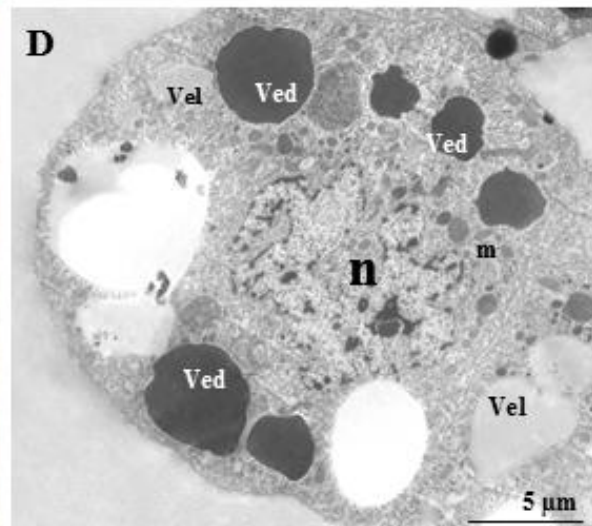
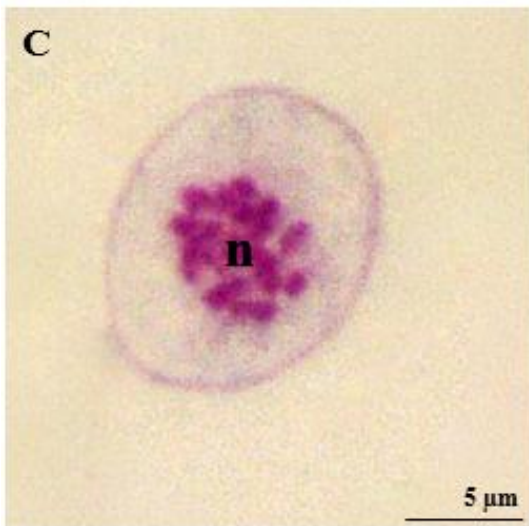
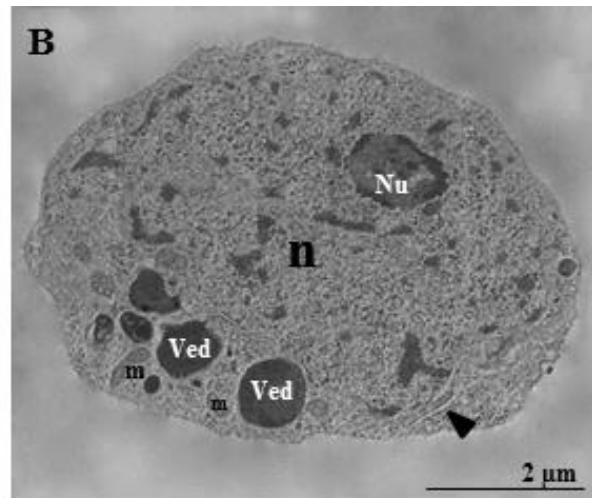
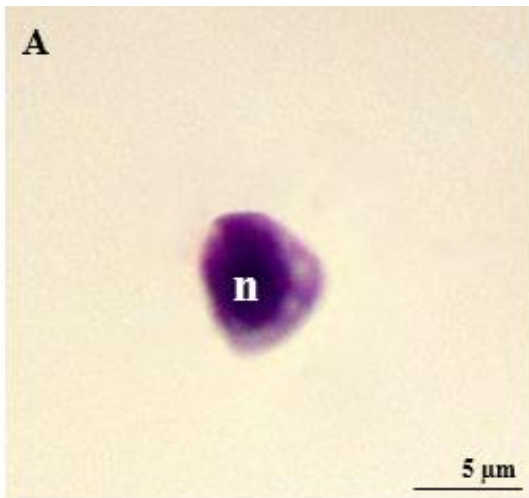


Figura 1. Morfologia de hemócitos corados com Giemsa (A, C, E) e ao MET (B, D, F) de *Melipona quadrifasciata*. Prohemócitos de forrageiras (A) e nutriz (B) com núcleo (n) ocupando a maior parte do volume da célula e nucléolo (Nu) evidente, poucas vesículas eletrondensas (Ved), perfis mitocondriais (m) e ribossomos (cabeça de seta). Granulócitos de forrageiras (C) e RE (D) com núcleo (n) arredondado, diversas vesículas eletrondensas (Ved), vesículas eletronlúcidas (Vel) e perfis mitocondriais (m). Plasmatócitos de forrageiras (E) e rainha (F) com núcleos (n) ovais, vesículas eletrondensas (Ved), vesículas eletronlúcidas (Vel) e perfis mitocondriais (m) e ribossomos (cabeça de seta).

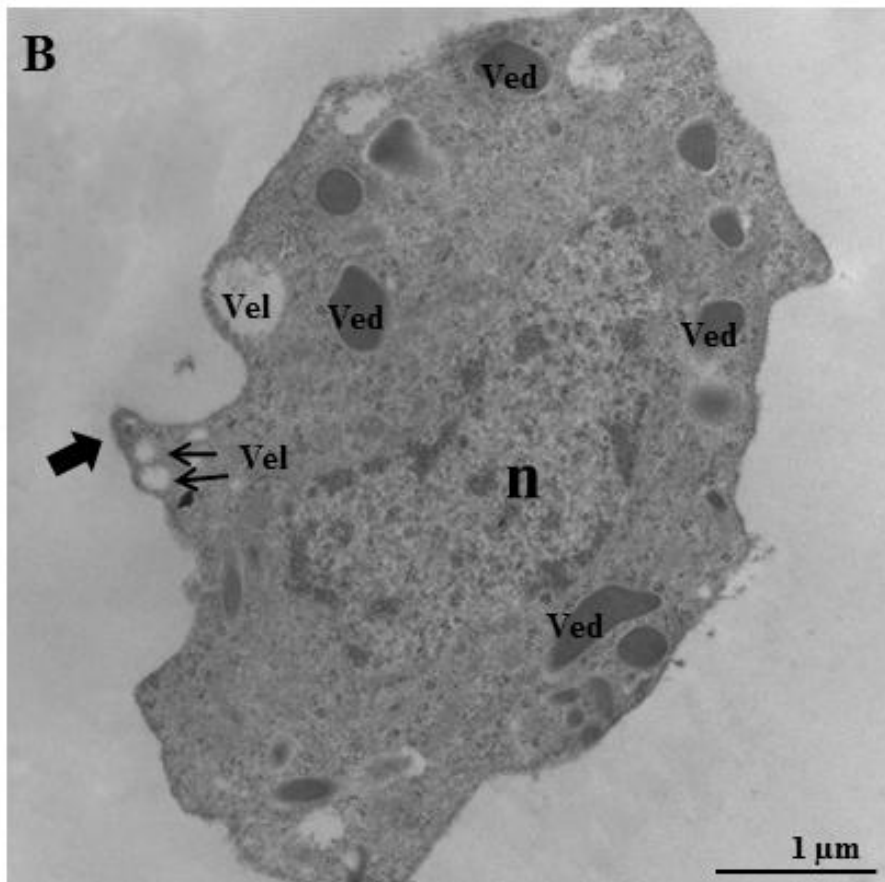
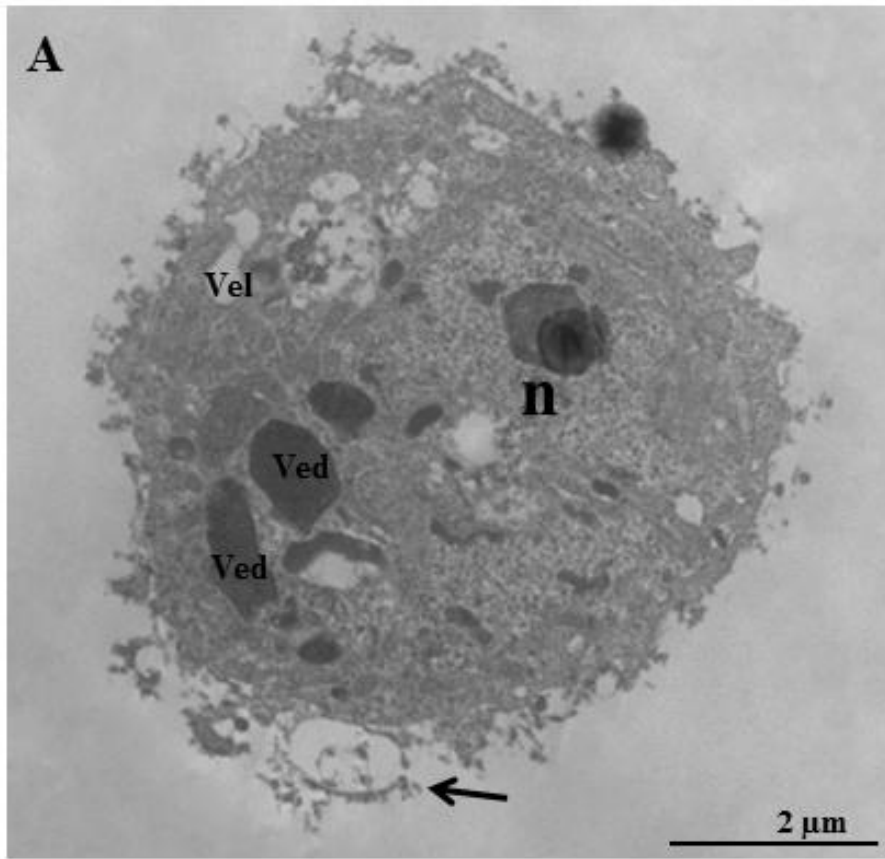


Figura 2: Eletromicrografias de hemócitos de *Melipona quadrifasciata*. **(A)** Granulócito de nutriz apresentando superfície irregular e emitindo filopódios (seta fina). **(B)** Plasmatócitos de nutriz emitindo pseudópodes (seta larga) realizando fagocitose. N=núcleo, Ved=vesículas eletrondesas, Vel=vesículas eletronlúcida, m=perfis mitocondriais.

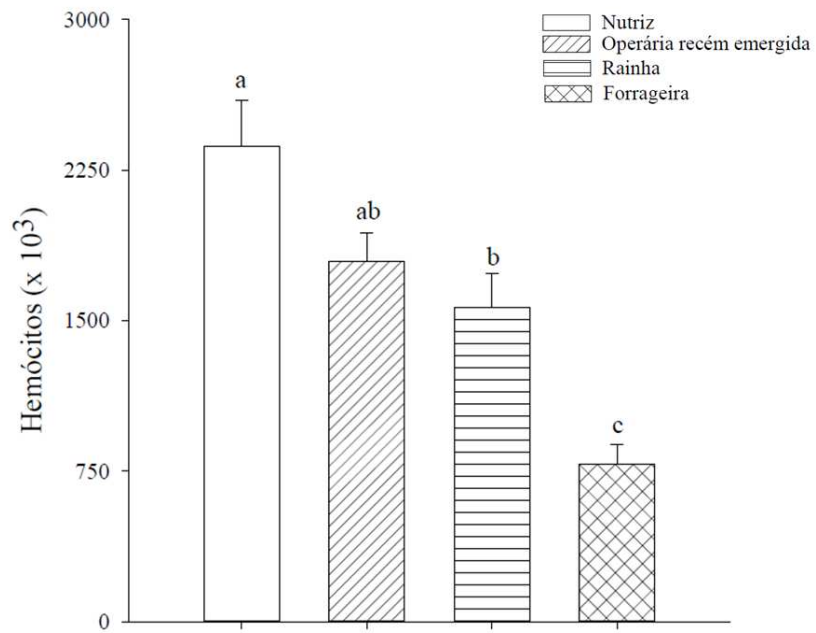


Figura 3: Contagem total de hemócitos (CTH) de *Melipona quadrifasciata*. As letras diferentes em cada linha indicam diferenças entre os comprimentos dos hemócitos nos diferentes indivíduos baseado no teste de Tukey ($P < 0,001$).

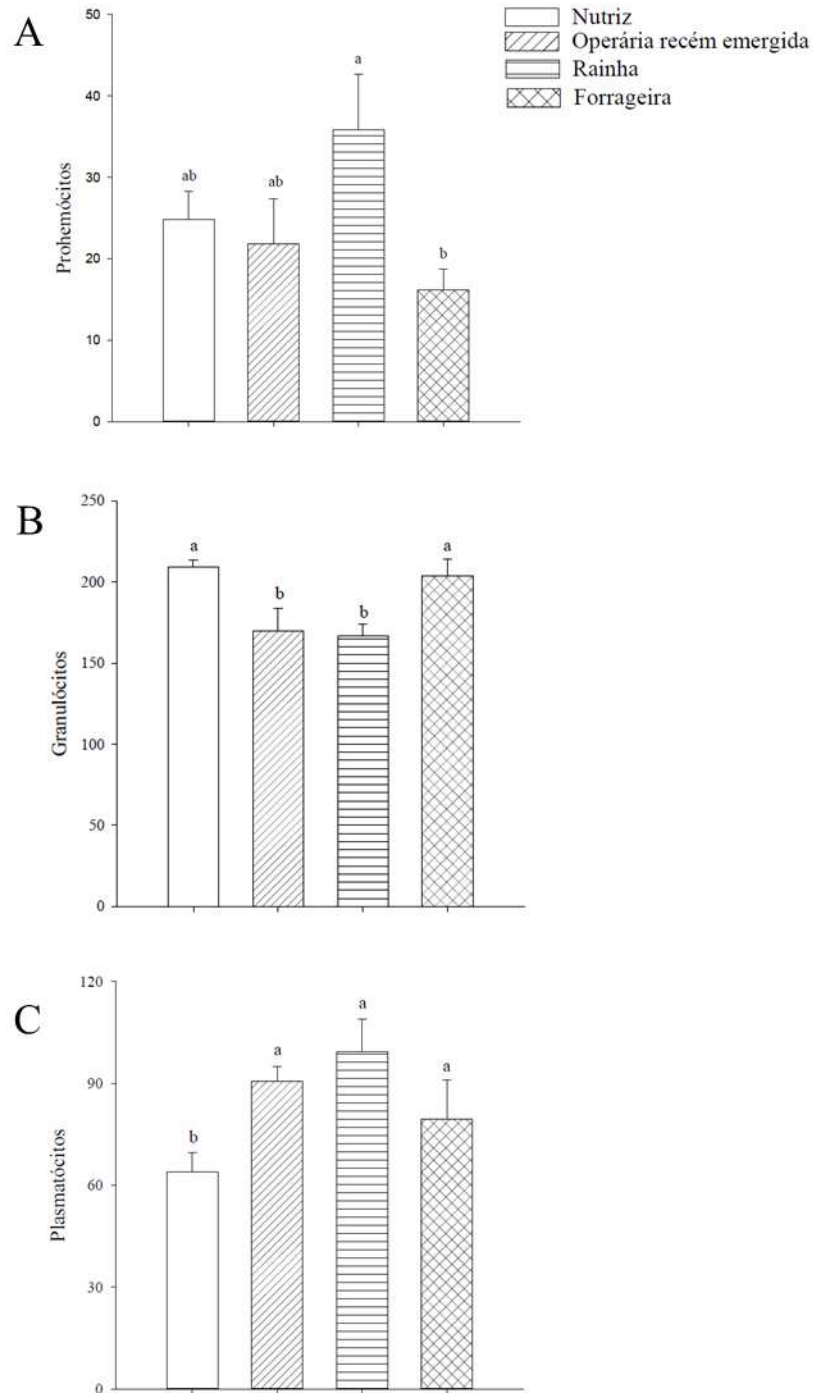


Figura 4: Contagem diferencial de hemócitos (CDH) de *Melipona quadrifasciata* a cada 300 células contadas. **(A)** CDH dos prohemócitos ($P = 0,03$). **(B)** CDH dos granulócitos ($P = 0,01$). **(C)** CDH dos plasmatócitos ($P = 0,03$). As letras diferentes em cada coluna indicam diferenças entre as quantidades dos hemócitos nos diferentes indivíduos baseado no teste de Tukey.

6 – Referências bibliográficas

- Amaral I M R, Neto J F M, Pereira G B, Franco M B, Beletti M E, Kerr W E, Bonetti A M, Ueira-Vieira C (2010). Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron*. 40: 123-129.
- Amdam G V, Simoes Z L, Hagen A, Norberg K, Schroder K, Mikkelsen O, Kirkwood T B, Omholt S W (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*. 39: 767-773.
- Andrade F G, Negreiro M C C, Levy S M, Fonseca I C B, Flvio Moscardi F, Falleiros A M F (2010). Hemocyte quantitative changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by AgMNPV. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(2): 279-284.
- Araújo H C R, Cavalcanti M G S, Santos S S, Alves L C, Brayner F A (2008). Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron*. 39: 184-189.
- Bedick J C, Tunaz H, Nor Aliza A R, Putnam S M, Ellis M D, Stanley D W (2001). Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 130: 107-117.
- Brayner F A, Araújo H R C, Cavalcanti M G S, Alves L C, Peixoto C A (2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron*. 36: 359-367.
- Disale C S, Dubal, R S, Disale S D (2013). Effect of some insecticides on haemocytes of japanese beetle, *Popillio japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Interdisciplinary Research Journal*. 3(2): 40-42.

- El-Aziz N M A e Awad H H (2010). Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*. 41: 203-209.
- Freitas B M, Imperatriz-Fonseca V L, Medina L M, Kleinert A M P, Leonardo Galetto L, Guiomar Nates-Parra G, Quezada-Euán J J G (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*. 40: 332-346.
- Garcia-Lara J, Needham A J and Foster S J (2005). Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 43: 311-323.
- Gerloff C U, Ottmer B K, Schmid-Hempel P (2003). Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect, *Bombus terrestris*. *Functional Ecology*. 17: 582-589.
- Götz P e Boman H G (1985). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford.
- Gupta A P (1979). Hemocytes types: their structures, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. *In: Gupta A P, Insects hemocytes, development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hillyer J F, Schmidt S L, Fuchs J F, Boyle J P, Christensen B M (2005). Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology*. 7: 39-51.
- Hwang S, Bang K, Lee J, Cho S (2015). Circulating hemocytes from larvae of the japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. *PLoS ONE*. 10(6): e0128519.
- Imperatriz-Fonseca V L, Saraiva A M and De Jong D (2006). Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. *Holos*, Ribeirão Preto, 111 pp.

- Jalali J, Salehi R (2008). The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. *Munis Entomology & Zoology Journal*. 3(1): 199-216.
- Janzen D H (1980). *Ecologia vegetal nos trópicos*. São Paulo, EDUSP, 79p.
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213-236.
- Kerr W E, Carvalho G A, Da Silva A C, Assis M G (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*. 12: 20-41.
- Kerr W E, Cavalho G A, Nascimento V A (1996). *Abelha uruçú: biologia manejo e conservação*. Fundação Acagú, 144p.
- King J G, Hillyer J F (2013). Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biology*. 11: 55-69.
- Kwon H, Bang K, Cho S (2014). Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. *PLoS ONE*. 9(8): e103620.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 230: 243-257.
- Lavine M D and Strand M R (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- Mohandes S S E, Nafea E A, Fawzy A M (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*. 3(1): 213-220.
- Negreiro M C C, Carvalho R B R, Andrade F G, Levy S M, Moscardi F, Falleiros A M F (2009). Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. *Iheringia, Série Zoologia*. 99(1):66-70.

- Pandey J P, Tiwari R K, Kumar D (2008). Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danaus chrysippus* following treatment with neem-based insecticides. *Journal of Entomology*. 5(3): 200-206.
- Ribeiro C, Brehelin M (2006). Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*. 52: 417-429.
- Schmid M R, Brockmann A, Pirka C W W, David W. Stanley D W, Tautz J (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*. 54: 439-444.
- Schmidt O, Theopold U, Strand M (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays* 23: 344-51.
- Silva C, Dunphy G, Rau M E (2000). Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 367-379.
- Slaa E J, Chaves L A S, Malagodi-Braga K S, Hofstede F E (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 37(2): 293-315.
- Stoepler T M, Castillo J C, Lill J T, Eleftherianos I (2013). Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. *PLoS ONE*. 8(8): e70978.
- Strand M R (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*. 15: 1-14.
- Vilmos P and Kurucz E (1998). Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. 62: 59-66.
- Wilson-Rich N, Dres S T, Starks P T (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 54: 1392-1399.
- Yamashita M, Iwabuchi K (2001). *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology*. 47: 325-331.

Zuk M, Stoehr A M (2002). Immune defense and host life history. *The American Naturalist*. 160: 9-22.

CAPÍTULO III

Alterações na resposta imune celular de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini) ocasionadas por imidacloprido e pela infecção por *Escherichia coli*

Resumo

Abelhas são polinizadores globais e, apesar de sua importância na manutenção do ecossistema natural e agrícola, a redução acentuada de suas populações vem sendo constatada. Essa redução é tida como resultado de uma causa multifatorial, sendo algumas delas a exposição aos pesticidas e infecção de patógenos, que podem afetar o sistema imunológico. No presente trabalho, foram estudados os efeitos da ingestão do inseticida neonicotinoide imidacloprido e da infecção pela bactéria *Escherichia coli* sobre a variação do número de hemócitos de forrageiras da abelha *Melipona quadrifasciata*. Realizamos a contagem total de hemócitos (CTH) e a contagem diferencial (CDH) de três hemócitos (prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos) em cinco tratamentos diferentes. A CTH e CDH foram alteradas de maneira diferente aos dois fatores estudados. Os prohemócitos apresentaram um aumento em sua quantidade apenas com o fator inseticida. Os plasmatócitos apresentaram alteração quando houve interação entre os dois fatores. Para o fator inseticida, houve um aumento significativo no número dessa célula quando a abelha foi exposta ao imidacloprido na ausência de *E. coli*, entretanto, mediante a infecção, não foi verificada alteração significativa desse hemócito; para o fator bactéria, independente da presença ou ausência do imidacloprido, a infecção diminuiu a quantidade dos plasmatócitos. O tratamento com o inseticida diminuiu a quantidade de granulócitos, enquanto a infecção pela bactéria a aumentou. Com o presente trabalho, constatamos que imidacloprido e *E. coli* causaram impactos significativos no número relativo dos três hemócitos estudados em *M. quadrifasciata*, entretanto não afetaram de forma significativa a CTH.

1 - Introdução

Indivíduos da espécie *Melipona quadrifasciata* são altamente sociais e fazem parte de um diversificado grupo de abelhas nativas sem ferrão que compõe a tribo

Meliponini, sendo encontradas em áreas pantropicais (Michener 2007). As abelhas sem ferrão são consideradas agentes polinizadores fundamentais de plantas nativas e cultiváveis, como tomates (Del Sarto et al. 2005, Bispo dos Santos et al. 2009), pimentões (Cruz et al. 2005) e berinjelas (Nunes-Silva et al. 2013), contribuindo para a manutenção da flora e, por consequência, da fauna local (Janzen, 1980, Antonini 2006).

Apesar da importância ecológica e agrícola das abelhas, tem sido observado um declínio preocupante da população das mesmas, comprometendo a sustentabilidade dos serviços de polinização realizados por esses insetos (Potts et al. 2010, Cameron et al. 2011, Lautenbach et al. 2012). O mais provável é que esse declínio tenha causa multifatorial, sendo as principais: fragmentação e perda de habitats, mudanças climáticas, diminuição da diversidade de recursos, disseminação de patógenos, parasitos e uso de pesticidas na agricultura (Potts et al. 2010, Ratnieks e Carreck 2010, Lima et al 2016). Nesse último caso, as abelhas, mesmo fazendo parte das espécies não-alvo, acabam sendo muito atingidas por serem muito sensíveis aos seus efeitos adversos, mesmo em doses subletais (Tomé et al. 2012, Barbosa et al. 2015a e 2015b, Lima et al. 2016).

Os inseticidas neurotóxicos neonicotinoides, incluindo imidacloprido, são altamente tóxicos às abelhas e foram descritos com um dos principais possíveis causadores da redução da população de polinizadores (revisado por Lima et al. 2016), sendo referido inclusive como um dos responsáveis pela perda de colônias de abelhas na Europa e Estado Unidos (Bonmatin et al. 2005, Chauzat et al 2006, Johnson et al 2010). Esse grupo de inseticida interage com receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR), agindo como agonistas dos mesmos, o que leva a uma ativação constante das sinapses colinérgicas, hiperexcitação e eventual morte dos indivíduos (Casida e Quistad 2004, Jeschke e Nauen 2008, Lima et al, 2016). Além disso, como um inseticida sistêmico, o imidacloprido é absorvido pela planta e se espalha por todos os tecidos através do sistema vascular, podendo se acumular nas folhas, pólen e néctar incorrendo em um alto risco para as abelhas (Laurent e Rathahao 2003, Elbert et al. 2008, Mullin et al. 2010).

Normalmente as abelhas entram em contato com baixas concentrações de neonicotinoides, levando a efeitos subletais em vários órgãos (Alaux et al. 2010, Tomé et al. 2012 e 2015, Barbosa et al. 2015a e 2015b) e no sistema imune (Brandt et al.

2016, Perveen e Ahmad 2017). O sistema imune inato dos insetos é composto de três partes principais: 1) barreiras físicas, como cutícula e matriz peritrófica; 2) respostas humorais; e 3) respostas celulares (Gillott 2005, Jiravanichpaisal et al. 2006, James e Xu 2012, Chapman 2013). A resposta humoral é uma resposta não específica, sistêmica ou localizada, onde ocorre a ação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), liberação de espécie reativa de oxigênio (ROS), coagulação da hemolinfa e melanização (Jiravanichpaisal et al. 2006, James e Xu 2012). Já a resposta celular envolve diretamente a ação dos hemócitos, que ficam suspensas na hemolinfa ou aderidas em órgãos vitais. Esses hemócitos são capazes de realizar fagocitose, nodulação e encapsulação (Schmidt et al. 2001, Lavine e Strand 2002, James e Xu 2012).

Os hemócitos podem variar em morfologia, nomenclatura, número e função em diferentes táxons de insetos, bem como para sexo, casta (no caso de insetos sociais) e idade (Lavine e Strand 2002, Schmid et al. 2008, James e Xu 2012). Os principais hemócitos encontrados nos insetos são: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitoides e esferulócitos (Lavine e Strand 2002), embora os mais comumente detectados em abelhas sejam os quatro primeiros (Amaral et al 2010, El-Mohandes et al 2010, Perveen e Ahmad 2017). Entretanto, os que participam diretamente da resposta imune celular são os granulócitos e plasmatócitos (Lavine e Strand 2002, Jiravanichpaisal et al. 2006, Ribeiro e Brehelin 2006, Schmid et al. 2008). Os prohemócitos são também células muito importantes, pois, apesar de não atuar diretamente na defesa celular, eles são células indiferenciadas e agem como células tronco originando os demais hemócitos (Lanot et al. 2001, Yamashita e Iwabuchi 2001, Lavine e Strand 2002).

As contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH, respectivamente) são algumas das ferramentas utilizadas para avaliar a competência imune de um inseto, uma vez que seus números podem sofrer alterações quando o inseto é exposto a algum agente externo, como inseticidas e bactérias, fornecendo assim informações úteis sobre a imunidade da espécie contra esses agentes (Haq et al. 2005, King e Hillyer et al. 2013, Hwang et al. 2015, Brandt et al. 2016). No presente trabalho, objetivamos avaliar a resposta imune celular, através da CTH e CDH considerando os principais hemócitos (prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos) de operárias forrageiras da abelha sem

ferrão *M. quadrifasciata* que foram e não expostas ao neonicotinoide imidacloprido e à bactéria *Escherichia coli*.

2 - Material e métodos

2.1 – Obtenção das abelhas

As forrageiras de *M. quadrifasciata*, indivíduos que normalmente possuem 25 ou mais dias de idade (Kerr et al. 1996), foram obtidas a partir de quatro colônias mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa-MG. As mesmas foram capturadas com um frasco de vidro na entrada das colônias, entre 9h e 10h da manhã, período em que grande parte das forrageiras já retornou às colônias após a atividade de forrageamento do período da manhã. Essas forrageiras, antes da exposição ao teste toxicológico, foram mantidas em uma caixa de madeira (30x30x30 cm) e privadas de alimento por 1 hora no escuro e à temperatura ambiente.

2.2 - Ensaio com inseticida e bactéria

O inseticida usado foi o imidacloprido (Evidence WG, 700 g a.i./L, grânulos dispersáveis em água, Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil), diluído em solução de 50% sacarose preparada com água destilada para se obter a dose subletal de DL_{1} igual a 2,92 ng i.a./abelha (Tomé comunicação pessoal). A bactéria utilizada *Escherichia coli* K-12 ($1,3 \times 10^7$ U.F.C/ml), cultivadas em placas de Petri contendo 2,5% de Luria-Bertani (LB) e 1,5% de ágar e cultivadas em LB líquido 24 horas antes da injeção nas abelhas, foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular de Bactérias da UFV.

O experimento foi realizado em esquema fatorial com um tratamento adicional ($2^2 + 1$) sendo o fator 1 determinado pelo inseticida (abelha contaminada ou não), o fator 2 pela bactéria (abelha inoculada ou não), e o tratamento adicional correspondeu abelhas não expostas, mas com perfuração para injeção do meio LB esterilizado. Assim cinco tratamentos foram estabelecidos: 1) forrageiras tratadas só com inseticida; 2) forrageiras tratadas só com a bactéria; 3) forrageiras tratadas com inseticida e bactéria; 4) forrageiras que não foram expostas nem ao inseticida nem à bactéria; e 5) forrageiras que, embora não tenham sido expostas nem ao inseticida nem à bactéria, sofreram perfuração para injeção de meio LB estéril. Três abelhas foram tratadas por grupo de tratamento por colônia de abelha.

As forrageiras foram expostas ao inseticida em tubos cilíndricos de vidro (15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) providos com 10 µL de solução de 50% de sacarose com inseticida e selados com parafilme. Abelhas não expostas ao imidacloprido receberam apenas solução de sacarose isenta do inseticida. Após o completo consumo das soluções, as abelhas foram transferidas para um recipiente de plástico de 200 ml, providas com solução de sacarose e sem inseticida em um microtubo perfurado, e mantidas à temperatura de 28 ± 3 °C, umidade relativa de 75 ± 10 % por 24 horas (Tomé et al. 2015). Após esse período, os indivíduos dos tratamentos 2 e 3 foram inoculados, utilizando seringa para insulina (BD Ultra-Fine, agulha com calibre de 0,25 mm), com 10 µL da suspensão de LB com *E. coli*, enquanto os indivíduos do tratamento 5 foram injetados apenas com 10 µL de LB esterilizado. Uma hora após a injeção, a hemolinfa foi coletada e analisada para CTH e CDH.

2.3 - Coleta de hemolinfa

Para coleta da hemolinfa, 20µl de solução anticoagulante (0.098 M de NaOH, 0.145 M de NaCl, 0.017 M de EDTA e 0.041 M de ácido cítrico, pH 4.5) foi injetada no primeiro segmento do abdômen de abelhas anestesiadas a frio (mais ou menos 4 °C) utilizando uma seringa para insulina (Araújo et al. 2008). Em seguida, uma leve pressão foi realizada no abdômen da abelha, para expulsar uma gotícula de hemolinfa no orifício criado após a retirada da agulha. Uma micropipeta e ponteiras previamente siliconadas com SigmaCote (Sigma) foram utilizadas para coletar a hemolinfa para contagem total e diferencial das células.

2.4 - Contagem total de hemócitos (CTH)

Para a CTH, após a injeção do anticoagulante, 10µL de hemolinfa foram coletados conforme o item 2.3 e dispensados diretamente (sem diluição) em câmara de Neubauer melhorada e a contagem foi feita ao microscópio óptico (trinocular Primo Star, Zeiss) com aumento final de 400x.

2-5 - Contagem diferencial de hemócitos (CDH)

Após ter sido feito todos os tratamentos, 20µL de solução anticoagulante foi injetado e coletada a quantidade máxima de hemolinfa extravasada de cada abelha foi coletada conforme descrito no item 2.3 e transferida para lâminas de vidro com o

auxílio da pipeta, permanecendo em repouso por no mínimo 20 minutos à temperatura ambiente para aderência das células e secagem da lâmina. Em seguida, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com solução Giemsa em tampão Sörensen (0,06M, pH 6,8), na proporção 1:30 (v/v), por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente para remoção do resíduo do corante (Amaral et al. 2010).

As células foram identificadas em microscópio óptico e fotografadas com câmera digital Axio Cam ERc5s. Para a CDH, foram consideradas trezentas células por lâmina para se estimar o número médio de três tipos hemócitos (plasmatócitos, granulócitos e prohemócitos) por indivíduo.

2.6 – Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial com tratamento adicional ($2^2 + 1$) utilizando o pacote [expdes] do programa R (R, 2016, vs. 3.3.2). Os fatores foram inseticida (imidacloprido) e bactéria (*E. coli*), com dois níveis cada (presença e ausência dos mesmos), enquanto o tratamento adicional foi aquele em que os indivíduos foram injetados apenas com meio LB estéril. O teste de normalidade usado foi o Shapiro-Wilk e todos os dados mostraram distribuição normal.

3 – Resultados e discussão

3.1 - Contagem diferencial de hemócitos

Os resultados da CDH mostraram que, apesar dos hemócitos terem apresentado diferenças significativas quanto aos fatores inseticida e infecção por bactéria de forma independente e quanto à interação entre eles, a quantidade dessas células não mostrou diferença quando os fatores eram comparados em conjunto com o tratamento adicional (indivíduos injetados apenas com meio LB estéril). Apenas o fator inseticida alterou a quantidade de prohemócitos ($F_{1,15} = 21,60$; $P < 0,001$) (Fig. 1). Abelhas que não foram expostas ao imidacloprido apresentaram uma menor quantidade (praticamente metade) dessas células ($7,50 \pm 0,53$) do que as expostas ($14,12 \pm 1,22$). O tratamento com neonicotinoides em geral aumenta o número de prohemócitos em insetos. Por exemplo, a porcentagem de prohemócitos aumentou após tratamento com imidacloprido em

adultos da abelha *Apis dorsata* (Perveen e Ahmad 2017) e do percevejo *Dysdercus koenigii* (Haq et al. 2005). É possível que a proliferação de prohemócitos ocorra para suprir a demanda para formação de outros hemócitos (Lanot et al. 2001) relacionada com a manutenção da homeostase do inseto exposto ao inseticida.

Para a variável plasmatócito, houve interação entre o fator inseticida e infecção pela bactéria ($F_{1,15} = 25,82$; $P < 0,05$), por isso, um estudo do desdobramento de um fator dentro de cada nível do outro fator foi feito. Indivíduos expostos ao imidacloprido tiveram maior número de plasmatócitos ($89,38 \pm 7,31$) que aqueles não expostos ($47,63 \pm 3,31$) quando em ambos os casos não houve inoculação da bactéria ($F_{1,15} = 29,35$; $P < 0,0001$). Diferentemente, quando os indivíduos foram inoculados com a bactéria, o número de plasmatócitos daqueles expostos ao inseticida ($43,75 \pm 8,18$) foi semelhante àqueles não expostos ao inseticida ($30,13 \pm 3,54$) ($F_{1,15} = 3,13$; $P = 0,10$) (Fig. 2). Populações de plasmatócitos parecem aumentar diante do tratamento com diferentes inseticidas. Por exemplo, o imidacloprido também provocou aumento da população de plasmatócitos em *A. dorsata* (Perveen e Ahmad 2017) e o espirotetramat em *Helicoverpa armigera* (Fatima et al. 2013). Assim como reportado na literatura, o aumento na contagem de plasmatócitos pode significar uma reação do sistema imune de *M. quadrifasciata* a estresse causado pelo inseticida.

No fator bactéria, independentemente da exposição dos indivíduos ao imidacloprido, as abelhas que não foram infectadas com *E. coli* tiveram maior número de plasmatócitos que aquelas infectadas ($P < 0,05$). Para as abelhas não tratadas com inseticida, os indivíduos não inoculados com bactérias apresentaram $47,63 \pm 3,31$ células, enquanto as inoculadas apresentaram $30,13 \pm 3,54$ ($F_{1,15} = 5,16$; $P = 0,04$). Já para as abelhas tratadas, indivíduos não infectados apresentaram $89,38 \pm 7,31$ plasmatócitos e os infectados $43,75 \pm 8,18$ ($F_{1,15} = 35,05$; $P = 0,0001$) (Fig. 2). A redução da quantidade de plasmatócitos de *M. quadrifasciata* em circulação após a infecção por *E. coli* pode ser decorrente da adesão dessa célula a órgãos viscerais ou à parede da hemocele (Chain e Anderson 1982). Também é possível que a diminuição na quantidade dos plasmatócitos possa ocorrer pelo seu recrutamento para formação de nódulo e fagocitose (Marmaras e Lampropoulou 2009).

No caso dos granulócitos, a ANOVA indicou diferença significativa para fatores bactéria e inseticida de forma independente, contudo, a interação desses fatores não foi significativa ($F_{1,15} = 3,93$; $P = 0,07$). Com relação ao inseticida, as abelhas não tratadas com imidacloprido apresentaram uma maior quantidade de granulócitos ($253,62 \pm 3,92$) que as tratadas ($219,50 \pm 9,83$) ($F_{1,15} = 30,48$; $P < 0,001$) (Fig. 3A). Assim como o observado para os plasmatócitos, a diminuição na quantidade de granulócitos após à exposição ao inseticida pode ser um reflexo da reação do sistema imune à invasão desse agente externo.

Após a infecção por *E. coli*, as abelhas apresentaram um número maior de granulócitos ($251,31 \pm 6,36$) quando comparadas às do que as não infectadas ($221,81 \pm 9,62$) ($F_{1,15} = 22,78$; $P = 0,002$) (Fig. 3B). Aumento no número de granulócitos acontece quando insetos são desafiados com bactérias (Horohov e Dunn 1982; Hwang et al. 2015). Esse resultado era esperado, uma vez que esses hemócitos são conhecidos por responder à presença de microrganismos com aumento em sua quantidade bem como mudanças morfológicas, como por exemplo, a formação de filopódios e alteração na quantidade e tamanho de grânulos citoplasmáticos (James e Xu 2012, Hwang et al. 2015), uma vez que sua principal função é a fagocitose (Ribeiro e Brehélin 2006).

3.2 – Contagem total de hemócitos

A CTH pode fornecer uma medida indireta de imunocompetência celular dos insetos e vários estudos relataram alteração no número de hemócitos circulantes após imunoestimulação (Pandey et al. 2008, Disale et al. 2013, King e Hillyer 2013, Hwang et al. 2015, Brandt et al. 2016). Entretanto, essas abelhas não apresentaram diferenças significativas quanto ao CTH dos fatores bactéria ($F_{1,15} = 0,42$; $P = 0,53$) e inseticida ($F_{1,15} = 0,02$; $P = 0,89$) isoladamente, tão pouco quanto a interação entre eles ($F_{1,15} = 0,72$; $P = 0,41$). Contudo, quando todos os fatores juntos são comparados ao tratamento adicional (abelhas injetadas com o meio LB esterilizado), houve diferença significativa ($F_{1,15} = 13,73$, $P = 0,002$), com o tratamento adicional apresentando um valor total de hemócitos maior que os demais tratamentos (Fig. 4). Nossos resultados relacionados ao fator inseticida contrastaram com os observados em operárias de *A. mellifera*, que após terem sido expostas a neonicotinoides, entre eles imidacloprido, apresentaram a CTH reduzida (Brandt et al. 2016). Mas ao mesmo tempo são similares aos observados em

operárias de *A. mellifera* cuja CTH não alterou após a exposição ao imidacloprido, mesmo elas estando enfraquecidas por *Nosema* (Alaux et al. 2010). Os resultados para fator infecção de *M. quadrifasciata* por bactéria também são diferentes do verificado em larvas de *Allomyrina dichotoma* (Coleoptera), que, após terem sido infectadas com *E. coli*, apresentaram um aumento na CTH (Hwang et al. 2015). Embora um aumento na CTH também tenha sido constatado em *A. gambie* (Diptera) injetados apenas com meio LB esterilizado (King e Hillyer 2013), assim como em *M. quadrifasciata*, sua consequência ainda não está esclarecida.

Além de terem impactos diretos sobre a sobrevivência dos insetos, patógenos e inseticidas também impõe custos significativos à imunidade (Alaux et al. 2010). Apesar disso, nossos resultados mostraram que a dose de imidacloprido que as operárias de *M. quadrifasciata* foram expostas não foram suficientes para causar uma alteração significativa quanto à CTH nos fatores analisados. Isso, talvez, deva-se à compensação pela alteração relativa dos hemócitos, onde a quantidade de um tipo celular pode aumentar, enquanto outro pode diminuir. Embora a CTH não tenha se alterado, outros parâmetros da imunidade individual, como componentes da imunidade humoral de *M. quadrifasciata*, podem ter sido ativados, como por exemplo, a produção de peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (Jiravanichpaisal et al. 2006, Antunez et al. 2009), o que precisa ser ainda investigado para esta espécie.

Embora as respostas celulares, incluindo mudanças em CTH e CDH, após a exposição a inseticidas e a bactérias seja comumente observada em insetos, a forma como essas respostas acontecem pode variar. No presente estudo constatamos que a quantidade relativa dos três hemócitos de *M. quadrifasciata* variou de forma diferente aos tratamentos a que os insetos foram submetidos e que a CTH não apresentou alterações significativas quanto aos fatores inseticida e bactéria de maneira isolada nem da interação entre eles, embora tenha mostrado uma quantidade maior no tratamento adicional quando comparado a todos os fatores juntos.

4 – Figuras

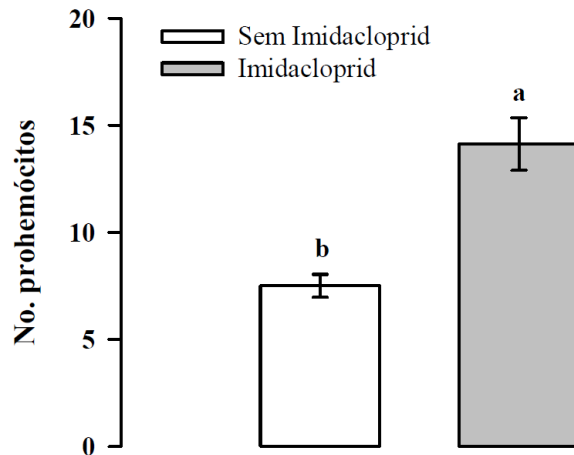


Figura 1: Contagem diferencial dos prohemócitos de forrageiras de *M. quadrifasciata*. Após 24h da exposição ao inseticida, houve um aumento na quantidade do prohemócito nas abelhas tratadas em comparação às não tratadas. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,001$).

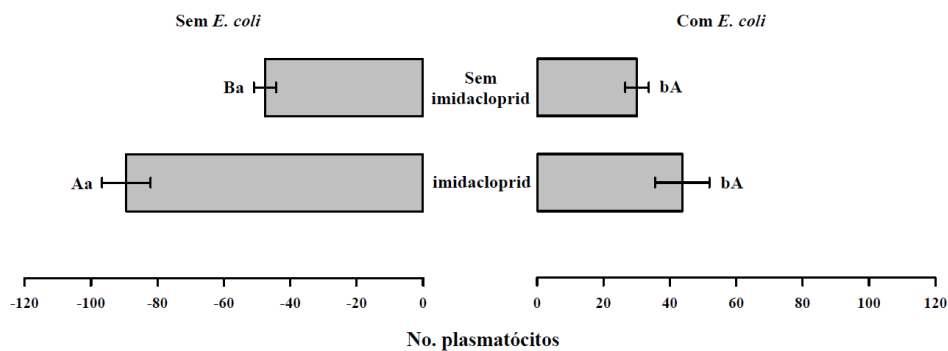


Figura 2: Contagem diferencial dos plasmatócitos de forrageiras de *M. quadrifasciata*. A interação entre os fatores inseticida e bactéria causou alteração na quantidade do plasmatócito: 1) Fator inseticida (análise na vertical): exposição ao imidacloprido, na ausência de *E. coli*, provocou aumento no número de células comparado à indivíduos não expostos, enquanto que na presença da bactéria, o inseticida não influenciou significativamente na quantidade desses hemócitos; 2) Fator bactéria (análise na horizontal): a infecção por *E. coli* diminuiu a quantidade de células independente da exposição ou não ao imidacloprido. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$); letras maiúsculas: diferenças no fator inseticida; letras maiúsculas: diferenças no fator infecção por bactéria.

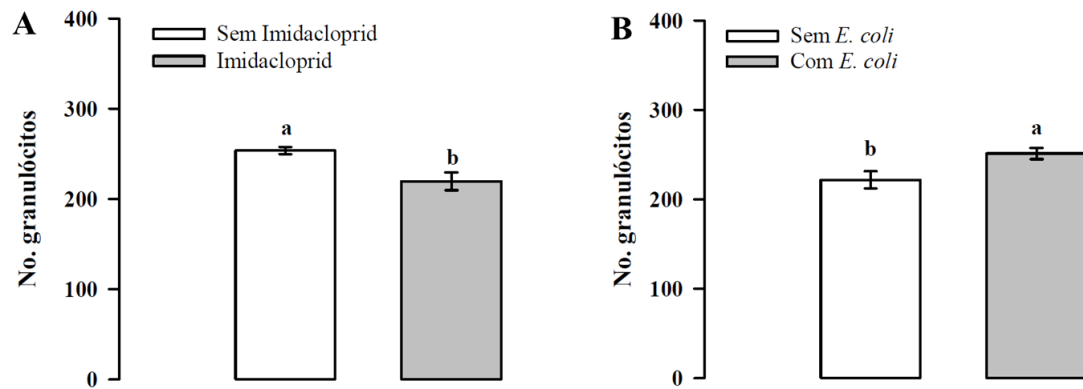


Figura 3: Contagem diferencial dos granulócitos de forrageiras de *M. quadrifasciata*. (A) Fator inseticida - A exposição ao imidacloprido provocou redução na quantidade do granulócitos nas abelhas expostas em comparação às não expostas ($P < 0,001$). (B) Fator bactéria - Inoculação da *E. coli* provocou aumento na quantidade de granulócitos nas abelhas infectadas em comparação às não infectadas ($P = 0,002$). Letras diferentes representam diferenças significativas.

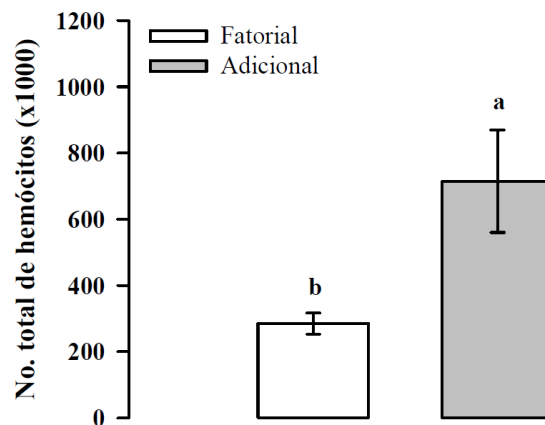


Figura 4: Contagem total de hemócitos de forrageiras de *M. quadrifasciata*. Todos os fatores juntos apresentaram uma quantidade de hemócitos inferior à quantidade do tratamento adicional (indivíduos foram injetados com meio LB estéril). Letras diferentes representam diferenças significativas ($P = 0,002$).

5 - Referências

- Amaral I M R, Moreira-Neto J F, Pereira G B, Franco M B, Beletti M E, Kerr W E, Bonetti A M, Ueira-Vieira C (2010). Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron*. 41: 123-129.
- Antonini Y, Costa R G, Martins R P (2006). Floral preferences of a Neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. *Brazilian Journal of Biology*. 66: 463-471.
- Barbosa W F, Meyer L, Guedes R N C, Smaghe G (2015a). Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*. 24: 130-142.
- Barbosa W F, Tomé H V V, Bernardes R C, Siqueira M A L, Smaghe G, Guedes R N C (2015b). Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34(9): 2149-2158.
- Bispo dos Santos S A, Roselino A C, Hrcir M, Bego L R (2009). Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Genetics and Molecular Research*. 8: 751-757.
- Bonmatin J M, Moineau I, Charvet R, Collin M E, Fleche C, Bengsch E R (2005). Behavior of imidacloprido in fields. Toxicity for honey bees. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D, eds. *Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems*. New York: Springer. pp 483-494.
- Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprido, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. 86: 40-47.
- Brayner F A, Araújo H R C, Santos S S, Cavalcanti M G S, Alves L C, Souza J R B, Peixoto C A (2007). Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Medical and Veterinary Entomology*. 21: 112-120.

- Cameron S A, Lozier J D, Strange J P, Koch J B, Cordes N, Solter L F, Griswold T L (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(2): 662-667.
- Cassida J E, Quistad G B (2004). Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *Journal of Pesticide Science*. 29: 81-86.
- Chain B M, Anderson R S (1982). Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. *Journal of Insect Physiology*. 28(4): 377-384.
- Chapman R F (2013). *The insects: structure and functions*. Cambridge University Press. Fifth Edition. 929p.
- Chauzat M P, Faucon J P, Martel A C, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*. 99: 253-262.
- Cruz D O, Freitas B M, Silva L A, Silva E M S, Bomfim I G A (2005). Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40(12): 1197-1201.
- Cruz-Landim C (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora SciELO-Ed UNESP, São Paulo. 408 p.
- Del Sarto M C L, Peruquetti R C, Campos L A O (2005). Evaluation of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*. 98(2): 260-266.
- Disale C S, Dubal, R S, Disale S D (2013). Effect of some insecticides on haemocytes of Japanese beetle, *Popillio japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Interdisciplinary Research Journal*. 3(2): 40-42.
- El-Aziz N M A, Awad H H (2010). Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*. 41: 203-209.

- Elbert A, Hass M, Springer B, Thielert W, Nauen R (2008). Applied aspect of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*. 64: 1099-1105.
- El-Mohandes S S, Nafea E A, Fawzy A M (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. *Egyptian Academic Journal of Biological Science*. 3(1): 213-220.
- Fatima M, Tariq M, Gulzar A (2013). Effect of flubendiamide and spirotetramat on the haemocytes of american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pakistan Entomologist*. 35(2): 129-134.
- Gillott C (2005). *Entomology*. Springer. Third Edition. 831p.
- Haq M R U, Sabri M A, Rashid A (2005). Toxicity of nicotinyl insecticides on the haemocytes of red cotton bug, *Dysdercus koenigii* (Fb.) (Pyrrhocoridae: Hemiptera). *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 01(3): 239-241.
- Hwang S, Bang K, Lee J, Cho S (2015). Circulating hemocytes from larvae of the Japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. *PLoS ONE*. 10(6): e0128519.
- James R R, Xu J (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109: 175-182.
- Janzen D H (1980). *Ecologia vegetal nos trópicos*. São Paulo, EDUSP, 79p.
- Jeschke P, Nauen R (2008). Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*. 64: 1084-1098.
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213-236.
- Johnson R M, Ellis M D, Mullin C A, Frazier M (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*. 41: 312-331.

- King J G, Hillyer J F (2013). Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biology*. 11: 55-69.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 230(2): 243-257.
- Laurent F M, Rathahao E (2003). Distribution of (14)C imidacloprido in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 8005-8010.
- Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann C F (2012). Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *PLoS ONE*. 7(4): e35954.
- Lavine M D, Strand M R (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- Lima M A P, Martins G F, Oliveira E E, Guedes R N C (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bee: peculiarities, underlying bases, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*. 202: 733-747.
- Marmaras V J, Lampropoulou M (2009). Regulators and signaling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signaling*. 21: 186-195.
- Mullin C A, Frazier M, Frazier J L, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis J S (2010). High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*. 5: e9754.
- Nunes-Silva P, Hrnčir M., Silva C I, Roldão Y S, Imperatriz-Fonseca V L (2013). Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie*. 44(5): 537-546.
- Pandey J P, Tiwari R K, Kumar D (2008). Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danaus chrysippus* following treatment with neem-based insecticides. *Journal of Entomology*. 5(3): 200-206.

- Perveen N, Ahmad M (2017). Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. Saudi Journal of Biological Science. 24: 1016-1022.
- Potts S G, Biesmeijer J C, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin W E (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecology Evolution. 25(6): 345-353.
- Ratcliffe N, Gagen S J (1976). Cellular defense reaction of insects hemocytes *in vivo*: nodulo formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 28: 383-382.
- Ratnieks F L W, Carreck N L (2010). Clarity on honey bee collapse? Science. 327: 152-153.
- Ribeiro C, Brehelin M (2006). Insect haemocytes: what type of cell is that? Journal of Insect Physiology. 52: 417-429.
- Schmid M R, Brockmann A, Pirka C W W, David W. Stanley D W, Tautz J (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. Journal of Insect Physiology. 54: 439-444.
- Schmidt O, Theopold U and Strand M (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. BioEssays. 23: 344-351.
- Tomé H V V, Martins G F, Lima M A P, Campos L A O, Guedes R N C (2012). Imidacloprido-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. PLoS ONE. 7(6): e38406.
- Yamashita M, Iwabuchi K (2001). *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. Journal of Insect Physiology. 47: 325-331.

CONCLUSÕES

- As características morfológicas gerais do coração de *M. quadrifasciata*, bem como dos músculos alares e células pericardiais são semelhantes entre os diferentes indivíduos aqui estudadas, e ao observado para outros insetos. Adicionalmente, algumas peculiaridades observadas em abelhas foram detectadas na presente espécie, como a disposição em círculo aberto dos cardiomiócitos e uma dilatação de fundo cego na porção final do coração.
- A morfologia dos três hemócitos estudados (prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos) em indivíduos de *M. quadrifasciata* é consistente com o observado para outros insetos. Dentre esses hemócitos, os mais abundantes foram os granulócitos, enquanto o que apresentaram menor número foram os prohemócitos. Verificamos também que as forrageiras apresentaram uma CTH menor do que os indivíduos mais jovens, mostrando que o envelhecimento impacta o número de hemócitos circulantes causando sua diminuição.
- O neonicotinoide imidacloprido e a bactéria *E. coli* causaram alterações significativas na quantidade relativa de prohemócitos, plasmatócitos e granulócitos em forrageiras de *M. quadrifasciata*. O imidacloprido causou um aumento na quantidade de prohemócitos uma redução dos granulócitos. A infecção por *E. coli* provocou um aumento na quantidade dos granulócitos. Já nos plasmatócitos, houve uma interação entre os fatores inseticida e bactéria, de modo que, a exposição ao imidacloprido, na ausência de *E. coli*, provocou aumento no número de células comparado a indivíduos não expostos, enquanto que na presença da bactéria, o inseticida não influenciou significativamente na quantidade desses hemócitos. Adicionalmente, infecção por *E. coli* diminuiu a quantidade de células independentemente da exposição ou não ao imidacloprido. Entretanto, esses fatores não causaram alterações significativas na CTH dessas abelhas.