

THAÍS ANDRADE VIANA

**ALTERAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE INATA E DESINTOXICAÇÃO EM
Melipona quadrifasciata (APIDAE: MELIPONINI) APÓS A EXPOSIÇÃO
ORAL AOS BIOINSETICIDAS AZADIRACTINA E ESPINOSADE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

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

T

V614a
2018 Viana, Thaís Andrade, 1992-
Alterações na resposta imune inata e desintoxicação em
Melipona quadrifasciata (Apidae: Meliponini) após a exposição
oral aos bioinseticidas azadiractina e espinosade : . / Thaís
Andrade Viana. – Viçosa, MG, 2018.
v, 35f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.23-35.

1. Abelhas. 2. Inseticidas vegetais. 3. Hemócitos. 4.
Melipona quadrifasciata. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Mestrado em Entomologia.
II. Título.

CDD 595.799

THAÍS ANDRADE VIANA

**ALTERAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE INATA E DESINTOXICAÇÃO EM
Melipona quadrifasciata (APIDAE: MELIPONINI) APÓS A EXPOSIÇÃO
ORAL AOS BIOINSETICIDAS AZADIRACTINA E ESPINOSADE**

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

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.


Wagner Faria Barbosa


Luanda Medeiros Santana


Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Gustavo Ferreira Martins e minha coorientadora Prof.^a Anete Pedro Lourenço, pela orientação, confiança, disponibilidade e conselhos.

Ao Prof. Lúcio por fornecer o material para execução da pesquisa. À Dra. Samira Ravaiano pelo auxílio nos experimentos.

Obrigada aos pós-docs Khalid Haddi, Roberto Dias, Luanda Medeiros e principalmente ao Wagner Barbosa por todo apoio, dedicação, parceria e auxílio no decorrer do trabalho. Aprendi muito com vocês!

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UFVJM, principalmente à mestranda Adriana Dias por todo apoio e cooperação durante os experimentos lá realizados.

Ao Laboratório de Immunovirologia da UFV pela disponibilidade do equipamento e atendimento.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da UFV, principalmente à Renata Barbosa pela cooperação durante o mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Programa de Pós-graduação em Entomologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente a Deus, por mais um sonho concedido e realizado.

Aos meus pais, Claudeth Maria de Andrade e Gilmar Sales Viana por toda dedicação parental. Aos meus irmãos Kelly Letícia e João Augusto por todo carinho e apoio. Ao meu sobrinho Asaph que cada vez mais me enche de alegria. Ao apoio e reconhecimento de toda família Andrade inclusive minhas tias Elizabeth, Margareth e Bernadeth.

Ao meu namorado e companheiro César Augusto Ferreira por sempre me apoiar, incentivar e me conceder à oportunidade de ser mãe. A minha princesa Liah, que nem imagina a felicidade que me traz e ainda nem chegou a este mundo. Eu amo vocês!

A minha amiga mestra Laura Nascimento e ao meu amigo doutorando Marco Aurélio, por me fornecer apoio, amizade e amor nessa nossa jornada.

A todos que acompanharam a minha jornada, sou eternamente grata!!

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. Introdução.....	1
1.1. As abelhas Melipona	1
1.2. Sistema imune em insetos	3
1.3. Inseticidas e a defesa dos insetos	7
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3.0. Materiais e métodos	10
3.1. Abelhas	10
3.2. Bioinseticidas e concentrações para os bioensaios	13
3.3. Exposição aos bioinseticidas	13
3.5. Extração do RNA e síntese do cDNA.....	14
3.6. PCR em tempo real.....	15
3.7. Quantificação relativa de Transcritos	16
3.8. Ensaio com bactéria e inseticida	16
3.9. Coleta de hemolinfa e contagem total de hemócitos.....	17
3.10. Análise Estatística.....	17
4.0. Resultados e Discussão	18
5.0. Conclusões	22
6.0. Referências Bibliográficas	23

RESUMO

VIANA, Thaís Andrade, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Alterações na resposta imune inata e desintoxicação em *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) após a exposição oral aos bioinseticidas azadiractina e espinosade.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientadora: Anete Pedro Lourenço.

A redução das populações de abelhas no Brasil e no mundo tem chamado atenção ultimamente. Dentre os fatores que influenciam esse declínio pode-se citar o uso indiscriminado de agroquímicos e a exposição a patógenos. Diversos estudos vêm sendo conduzidos envolvendo os efeitos toxicológicos de diferentes agroquímicos em abelhas, mas os Meliponíneos são negligenciados, apesar de serem importantes polinizadores nativos da região neotropical. No presente trabalho foram investigados os efeitos subletais de dois bioinseticidas (azadiractina e espinosade) na resposta imune inata e de desintoxicação em *Melipona quadrifasciata* após a exposição oral aguda. Realizamos a análise da expressão de Vitelogenina (Vg) e Superóxido dismutase (SOD), através da quantificação relativa da expressão gênica feita por qPCR. Adicionalmente, a contagem total de hemócitos (CTH) circulantes também foi realizada após exposição aos bioinseticidas e infecção com a bactéria *Escherichia coli*. A expressão da Vg foi reduzida e não houve alteração no SOD nos indivíduos expostos aos dois bioinseticidas em relação ao controle. A CTH aumentou em indivíduos expostos em comparação ao controle (indivíduos não expostos), como também, a CTH é aumentada em abelhas não expostas e infectadas com bactéria em comparação com as sem infecção. Portanto, apesar dos bioinseticidas serem considerados mais seguros, a contaminação com azadiractina e espinosade pode prejudicar as colônias de abelhas sem ferrão. Os dados aqui expostos, fornecem mais informações sobre estudos toxicológicos na imunidade de abelhas, a fim de gerar estratégias conservacionistas para os mesmos.

ABSTRACT

VIANA, Thaís Andrade, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Changes in innate immune response and detoxification in *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) after oral exposure to bioinsecticides azadirachtin e spinosad.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins. Co-adviser: Anete Pedro Lourenço.

The reduction of bees populations in Brazil and worldwide has recently attracted attention. Among the factors that influence this decline is the indiscriminate use of agrochemicals and infections by pathogens. Several studies have been performed involving the toxicological effects of different agrochemicals on bees, but the Meliponini bees are neglected, although they are important pollinators in the Neotropical region. In the present work, we investigated the sublethal effects of two bioinsecticides (azadirachtin and spinosad) on the innate immune response and detoxification in *Melipona quadrifasciata* after the acute oral exposure. We analyzed the expression of Vitelogenin (Vg) and Superoxide dismutase (SOD) by qPCR. Additionally, the total hemocyte count (THC) was performed after the exposure to bioinsecticides and infection with the bacteria *Escherichia coli*. The expression of Vg was reduced, and there was no change in the levels of SOD in exposed individuals compared to the control. The THC increased in bioinsecticides exposed workers and in workers infected with bacteria compared to their respective controls. Therefore, although bioinsecticides are considered relatively safe, contamination with azadirachtin and spinosad can harm colonies of stingless bees. Our data provide more information for toxicological studies on bee immunity to generate conservation strategies for the bees.

1. Introdução

1.1. As abelhas *Melipona*

Os polinizadores, como as abelhas, são um componente crucial para plantas em floração (Kearns et al., 1998; Lundberg e Moberg, 2003). Entre as abelhas, as corbiculadas (aquelas que possuem corbícula - estrutura franjada e côncava na perna posterior de operárias para coleta de pólen e outras substâncias) formam um grupo monofilético composto por quatro tribos: Apini, Euglossini, Bombini e Meliponini (Michener, 2000; Gullan e Cranston, 2012; Michener, 2013).

A tribo Meliponini pertence à subfamília Apinae, dentro da família Apidae na ordem Hymenoptera, e são popularmente chamadas de “abelhas indígenas sem ferrão” por possuírem ferrão atrofiado (Michener, 2000; Silveira et al., 2002; Michener, 2013). *Melipona* é o gênero com maior número de espécies dentro desta tribo (Silveira et al., 2002), possuindo abelhas de tamanho médio (8-15 mm) que nidificam em galhos de árvores, formigueiros ou cupinzeiros abandonados no solo, troncos ocos ou mortos (Keer et al., 1996; Michener, 2000; Kwapong et al. 2010). Espécies desse gênero são encontradas nas regiões subtropicais do hemisfério sul (Kwapong et al., 2010), apresentando um papel crucial para a polinização da vegetação nativa (Michener, 2000), notado pela relação de interdependência, pois asseguram o fluxo gênico dessas plantas (Paim e Oliveira, 2011) que podem depender da vibração que essas abelhas fazem durante a visitação floral para que a polinização seja efetivada (Heard, 1999).

As abelhas do gênero *Melipona* vivem em colônias e são eussociais, uma vez que apresentam divisão de trabalho, diferenciação de castas e sobreposição de gerações (Hölldobler e Wilson, 2009). Em sua colônia encontram-se três tipos de indivíduos: os machos, as operárias e a rainha, os quais possuem papéis distintos nessa sociedade (Nieh e Roubik, 1995; Kerr et al. 1996; Jarau et al., 2000). Os machos são indivíduos haploides hemizigóticos, produzidos a partir de ovos não fecundados, embora, raramente machos diploides homozigóticos podem também ser produzidos, contudo com fitness reduzido (Velthuis et al., 2005; Harpur et al., 2013). Basicamente, o papel do macho na colônia é a cópula com as rainhas virgens durante o voo nupcial (Kerr et al. 1996; Michener, 2013). As duas castas de fêmeas

desenvolvem-se a partir de ovos fertilizados, sendo assim indivíduos diploides heterozigóticos (Harpur et al., 2013).

As operárias são responsáveis pela maioria dos trabalhos dentro da colônia: como limpeza, produção de cera, alimentação da rainha, proteção contra inimigos externos, coleta de recursos externos e eliminação de detritos (Michener, 2013). A divisão do trabalho realizado pelas operárias se modifica de acordo com a necessidade da colônia, ou de acordo com a idade da abelha, o que é denominado polietismo etário. Ocasionalmente, as operárias também podem colocar ovos tróficos que servem para alimentação, ou para a produção de machos haploides (Kerr et al., 1996).

A rainha é a única fêmea fértil da colônia e a sua produção é feita através de uma diferenciação na qualidade da alimentação (Kerr, 1949; Velthuis et al., 2005; Michener, 2000), além de ter uma predisposição genética, onde os níveis de expressão do gene feminizer são maiores em rainhas do que em operárias e machos (Brito et al., 2015). As rainhas que realizam a postura de ovos apresentam uma dilatação do abdômen chamado de fisogastria (Kerr, 1949) e garantem a coesão entre a organização e atividade da colônia através de feromônios (Kwapong et al., 2010). Quando existe uma rainha poedeira ativa, as outras rainhas virgens podem ser eliminadas pelas operárias (Kerr, 1949), sendo que a maioria das espécies do gênero *Melipona* são monogínicas, ou seja, com apenas uma rainha ativa na colônia (Michener, 2013).

Somente no Brasil já foram descritas cerca de 300 espécies de meliponíneos, dentre elas foram identificadas 40 espécies de *Melipona* incluindo a *Melipona quadrifasciata* (Pedro, 2014), que é a espécie estudada no presente trabalho. Ela é de ampla distribuição, sendo encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiânia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe (Pedro, 2014). A *M. quadrifasciata anthidioides* é um importante polinizador de ecossistemas neotropicais, conhecida popularmente por “mandaçaia”, além de ser uma espécie produtora de mel (Slaa et al., 2006; Dos Santos et al., 2009).

1.2. Sistema imune em insetos

O sistema de defesa dos insetos é representado, primariamente, por barreiras estruturais como o exoesqueleto rígido, o sistema respiratório (traqueias) e o digestório, além dos túbulos de Malpighi (Klowden, 2013). Uma vez ultrapassada estas barreiras físicas, os insetos possuem mecanismos para reconhecimento de elementos estranhos que atingem o seu interior (a hemolinfa), pois os reconhecem por não fazerem parte do seu corpo, ocorrendo, então, a ação do sistema imunológico. A imunidade dos insetos é inata, pelo fato deles não apresentarem memória imunológica, diferentemente do que ocorre em vertebrados (Klowden, 2013), embora já tenham sido identificadas espécies as quais capacidade de reação pode ser aumentada a exposições/contaminações subsequentes (Gullan e Cranston, 2012). A imunidade inata em insetos compreende a resposta celular, a resposta humoral e a melanização (Marmaras et al., 1996; Strand, 2008; Klowden, 2013). As respostas celulares e humorais podem se sobrepôr devido à interdependência entre elas (Lavine e Strand, 2002; Ribeiro e Brehélin, 2006).

A resposta imune é iniciada por receptores de reconhecimento (PRRs – pattern recognition receptors) presentes na membrana das células imunes que respondem a componentes tais como peptídeoglicanos ou lipopolisacarídeos presentes em microrganismos, ligando-se aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's – pathogen associated molecular patterns). Estes PRRs desencadeiam sinalizações que podem provocar a morte do patógeno por fagocitose, ativar a melanização ou até mesmo iniciar cascatas de sinalização intracelular como a do Toll e IMD para síntese dos peptídeos antimicrobianos (Figura 1) (Klowden, 2013).

A resposta celular é mediada por ação dos hemócitos que resulta na fagocitose, formação de nódulos e encapsulação. Enquanto a resposta humoral é gerada principalmente por moléculas solúveis como peptídeos antimicrobianos (AMP's) (Figura 1), algumas proteínas do tipo complementar e complexos enzimáticos que regulam a melanização e a coagulação (Strand, 2008). A melanização é resultado da ação da fenoloxidase, cuja forma precursora é a profenoloxidase, que é clivada formando a fenoloxidase. Esta reação deposita pigmentos de melanina ao redor de ferimentos ou até mesmo em objetos considerados estranhos ao corpo do inseto (Klowden, 2013). Se

houver uma infecção, variados processos podem ocorrer, além dos citados acima, como a opsonização e o sequestro de ferro pela transferrina, também já descritos em insetos (Klowden, 2013).

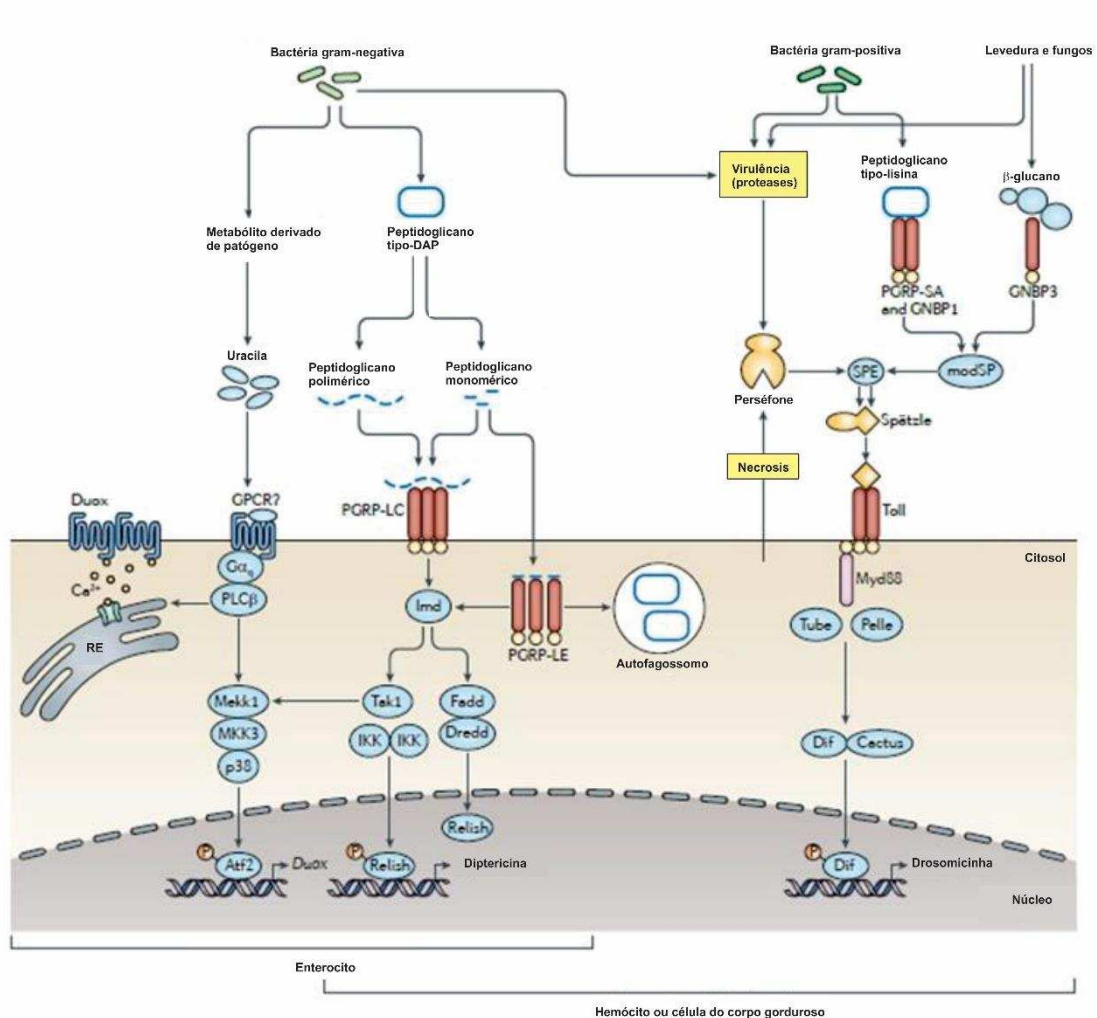


Figura 1: Vias de sinalização intracelular Toll e Imd responsáveis pela síntese de peptídeos antimicrobianos. Esquema das vias em *Drosophila*. Estas vias podem agir em conjunto para ativar a resposta imune. Adaptado de Buchon et al. (2014).

Os hemócitos podem ser identificados e classificados de acordo com sua localização, como também por suas características morfológicas, fisiológicas e histoquímicas (Strand, 2008; Hillyer, 2015). Os principais hemócitos encontrados nos insetos são os prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenócitos (Lavine e Strand, 2002), todos já descritos em *Apis dorsata* (Perveen e Ahmad, 2017). Em *Melipona scutellaris* e *Apis mellifera* foram encontrados prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos e

oenocitoides (Amaral et al., 2010; El-Mohandes et al., 2010), além desses, também foram identificados os coagulócitos e células binucleadas para *A. mellifera* (El-Mohandes et al., 2010). Os prohemócitos são células indiferenciadas que originam os demais hemócitos, enquanto que os granulócitos e plasmatócitos constituem as células principais em termos de resposta imune celular (Lanot et al., 2001; Yamashita e Iwabuchi, 2001; Jiravanichpaisal et al., 2006; Ribeiro e Brehélin, 2006; Strand, 2008).

A fagocitose é principalmente realizada pelos plasmatócitos e os granulócitos, que fazem o reconhecimento, endocitose e destruição dos corpos estranhos (Lamprou et al., 2007; Marmaras e Lampropoulou, 2009). Caso a fagocitose não contenha o invasor, pode ocorrer a nodulação, que é a formação de um aglomerado de células em torno dele (Marmaras e Lampropoulou, 2009). A encapsulação pode ocorrer até mesmo em alvos maiores, contudo, com a formação de várias camadas celulares em volta, produzindo a morte por asfixia ou por intoxicação por radicais livres gerados na reação da fenoloxidase (Nappi e Ottaviani, 2000; Marmaras e Lampropoulou, 2009). Mas essa resposta pode variar de acordo com a espécie, idade, bem como com o sexo e as castas em insetos sociais (Lavine e Strand, 2002; Schmid et al., 2008; Klowden, 2013). Quando os insetos reagem à invasão de patógenos ocorre à alteração da quantidade dessas células no sistema imune (Brunham et al., 1993; Marmaras e Lampropoulou, 2009), podendo também alterar quando há exposições aos inseticidas (Brandt et al., 2016; Perveen e Ahmad, 2017). Além destas funções, os hemócitos possuem um papel importante no metabolismo da fenoloxidase, no transporte e na estocagem de nutrientes, na coagulação e na cicatrização, como também na desintoxicação dos insetos (Klowden, 2013).

Na resposta humoral são reconhecidos vários peptídeos antimicrobianos (AMP's) em abelhas tais como apidaecinas, hymenopteacinas, abaecinas e defensinas (Evans et al., 2006), que possuem modos de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Casteels-Josson et al., 1993, 1994, Casteels et al., 1989, 1990, 1994; Bulet et al., 1999). Os AMP's estão envolvidos na resposta imune de abelhas contra infecções (Lourenço et al., 2009, 2013), exposições a inseticidas (Garrido et al., 2016), como também contra outros patógenos (Christen et al., 2016; Hu et al., 2017). Além dessas moléculas

efetoras, acredita-se que a transferrina participe indiretamente da resposta imune através do sequestro do ferro que irá impedir o crescimento e desenvolvimento do patógeno (como observado em *Drosophila* por Yoshiga et al., 1997). A expressão de transferrina é aumentada quando ocorre a exposição a algum patógeno (Kucharski e Maleszka, 2003; Lourenço et al., 2013).

Algumas vias de sinalização intracelular (Toll, Imd, JNK e JAK/STAT) são importantes para a imunidade e desenvolvimento, além de serem responsáveis pela regulação da expressão dos AMP's (Evans et al., 2006). Os genes pertencentes a essas vias perderam representatividade nas abelhas em comparações com dípteros (*Drosophila* e *Anopheles*) (Evans et al., 2006; Barribeau et al., 2015). A transcrição dos genes envolvidos nas vias Toll, Imd, JNK e JAK/STAT são aumentadas após exposição aos inseticidas e/ou patógenos (Lourenço et al., 2013; Hu et al., 2017).

A vitelogenina é uma proteína envolvida com o armazenamento de nutrientes (Gullan e Cranston, 2012). Além de ter uma função no crescimento do ovócito e suprimento de energia para o embrião (Guidugli et al., 2005), ela participa em múltiplos processos regulatórios incluindo imunidade, resistência ao estresse oxidativo, dinâmica hormonal, comportamento relacionado à alimentação e longevidade (Amdam e Omholt, 2003; Amdam et al., 2003, 2005, 2006; Seehuus et al., 2006; Dallacqua et al., 2007). Essa proteína também pode ser considerada como responsável pela imunidade transgeracional, atuando na transferência da imunidade da mãe para a prole (Salmela et al., 2015). As alterações na expressão da Vg podem servir como indicador imune, servindo como parâmetro para os níveis de estresse energético e para os efeitos subletais de inseticidas (Abbo et al., 2017). Por exemplo, a expressão de Vg foi reduzida em *A. mellifera* quando ocorre uma infecção ou injúria, bem quando houve exposição a inseticidas (Lourenço et al., 2009; Steinmann et al., 2015; Garrido et al., 2016; Abbo et al., 2017).

O sistema de desintoxicação também constitui uma forma de defesa dos insetos, contribuindo para a manutenção da homeostasia. Essas defesas são realizadas através de enzimas que podem metabolizar substâncias tóxicas oriundas de xenobióticos como os pesticidas (Klowden, 2013). As enzimas Citocromo Monooxigenases P450 são as principais envolvidas na tolerância e

resistência a todas as classes de inseticidas (Johnson et al., 2006; Li et al., 2007). Como as enzimas das subfamílias CYP3, CYP4, CYP6 e CYP9, assim como a superóxido dismutase (SOD), catalase e thioredoxin peroxidase já foram descritas por mediar a desintoxicação de inseticidas e acaricidas (Mao et al., 2011; Derecka et al., 2013; Chaimanee et al., 2016; Christen et al., 2016). Em operárias de *A. mellifera*, a expressão dos genes envolvidos na resposta de desintoxicação pode ser aumentada após a exposição aos inseticidas imidacloprido, clorpirifós e coumafós; já em rainhas, a expressão destes genes pode ser reduzida após exposição ao imidacloprido e coumafós (Schmehl et al., 2014; Chaimanee et al., 2016; Hu et al., 2017).

Apesar de se conhecer sobre a imunidade celular e humoral dos insetos, pouco se sabe sobre as diferentes vias imunológicas e seu funcionamento em diversas abelhas. Com o advento do sequenciamento do genoma de *A. mellifera* foi possível uma gama de estudos sobre insetos sociais, incluindo os sobre sistema imune (Consortium, 2006). Esses estudos foram precursores de outros com abelhas, como com *M. quadrifasciata*, onde seu genoma foi sequenciado (Kapheim et al., 2015), e dos 190 genes identificados como de resposta imune em *A. mellifera*, 172 foram encontrados em *M. quadrifasciata* (Kapheim et al., 2015).

1.3. Inseticidas e a defesa dos insetos

Um processo importante para a produção alimentícia é o combate de insetos pragas através dos inseticidas, os quais são aplicados em diversas culturas (Gullan e Cranston, 2012). Dentre os principais inseticidas utilizados, podemos citar os das famílias dos organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e bioinseticidas. Grande parte dos inseticidas possuem atividade neurotóxica, e seus mecanismos de ação podem inibir a acetilcolinesterase (organofosfatos e carbamatos), inibir os canais de sódio (piretroides), ou até funcionar como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina (neonicotinoides) (Gullan e Cranston, 2012).

Alguns inseticidas vêm sendo desenvolvidos com princípio ativo de origem natural (denominados bioinseticidas), que na visão popular, acredita-se que estes possam ser menos agressivos ao ambiente e aos polinizadores (Rattan, 2010). O Nim, por exemplo, é um extrato obtido de sementes da

árvore *Azadirachta indica*. Seu princípio ativo, a azadiractina, age no cérebro, bloqueando o transporte e a liberação do hormônio protoracicotrópico, que influencia na liberação de ecdisteroides, impedindo a muda (Gullan e Cranston, 2012). Para *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), a azadiractina também possui um efeito secundário considerado neurotóxico, inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase, não ocorrendo à quebra da acetilcolina, ocasionando, portanto, a hiperexcitabilidade devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (Senthil Nathan et al., 2008).

Outro exemplo de bioinseticida em ascensão no mercado é o espinosade, cujo princípio ativo é derivado da mistura de dois componentes: a spinosyn A e spinosyn D, as quais são produzidas a partir da fermentação pelo actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Salgado, 1998). O efeito do espinosade é neurotóxico, pois abre os canais iônicos da membrana pós-sináptica, levando a condução do estímulo nervoso, ou seja, sua ação é agonista aos receptores nicotínicos de acetilcolina. Além disso, também pode comprometer o funcionamento do sistema nervoso central por agir nos receptores GABA (ácido gama-amino) (Salgado, 1998).

Os inseticidas e biosinseticidas podem ter efeitos subletais diversos em insetos, incluindo os polinizadores (Desneux et al., 2007). Os resíduos destes (bio) inseticidas permanecem em campo (Guedes et al., 2016), podendo afetar insetos através do contato com a superfície de plantas contaminadas (Koch e Weisser, 1997; Prier et al., 2001) ou pela coleta de recursos contaminados. No caso de abelhas, estes recursos podem ser levados para as colônias onde serão distribuídos através da trofalaxia ou alimentação das crias (Rortais et al., 2005; Krupke et al., 2012; revisado por Lima et al., 2016).

Os efeitos subletais dos inseticidas podem comprometer tanto operárias quanto rainhas das abelhas. Operárias dos gêneros *Apis*, *Bombus* e *Melipona*, por exemplo, podem ter sua capacidade de forrageamento, memória, aprendizagem e orientação comprometidas por doses subletais de inseticidas (Desneux et al., 2007; Mommaerts et al., 2010; Henry et al., 2012; Tomé et al., 2012; Tomé et al., 2015), além de poder interferir na reprodução de rainhas (De Souza et al., 2007; Desneux et al., 2007; Mommaerts et al., 2010; Potts et al., 2010; Henry et al., 2012). Em abelhas sem ferrão, os inseticidas podem alterar o desenvolvimento larval das rainhas (Dos Santos et al., 2016), afetar a

sobrevivência das larvas (Barbosa et al., 2015), como também interferir no consumo de alimentos (Bernardes et al., 2017).

Os efeitos subletais dos inseticidas em abelhas podem ainda incluir alterações nas populações de hemócitos, assim como alterar a expressão gênica de proteínas envolvidas com a imunidade e a desintoxicação (Brandt et al., 2016; Chaimanee et al., 2016; Christen et al., 2016; Garrido et al., 2016; Abbo et al., 2017). Por exemplo, o estresse ocasionado pelos inseticidas Monodhan36 e Sevin aumenta o número total de hemócitos circulantes (CTH) no coleóptero *Popillio japonica*, em contrapartida, a CTH diminui após exposição aos neonicotinoides e piretroides nas espécies de abelhas *A. mellifera* e *A. dorsata* (Disale et al., 2013; Brandt et al., 2016, 2017; Perveen e Ahmad, 2017).

A expressão da Vg também sofre alteração em *A. mellifera*, podendo aumentar após exposição a diferentes concentrações dos inseticidas imidacloprido, tiametoxan, acetamiprido e clotianidina, assim como, reduzir posteriormente ao tratamento com acaricidas e com imidacloprido (Christen et al., 2016; Garrido et al., 2016; Abbo et al., 2017). Nos genes conhecidos por mediar a desintoxicação de *A. mellifera*, a expressão pode aumentar ou diminuir após exposição ao inseticida imidacloprido e coumatós (Chaimanee et al., 2016; Hu et al., 2017). Essas alterações na expressão dependem da idade e casta da abelha (rainha, nutriz e forrageira), do inseticida e doses utilizadas, bem como do gene analisado.

As pesquisas sobre o efeito de inseticidas na resposta imune de polinizadores são quase exclusivamente focadas em espécies dos gêneros *Apis* e *Bombus* (Dos Santos et al., 2016; Lima et al., 2016). Diferentemente disso, estudos toxicológicos em outros gêneros mais diversos como, por exemplo, *Melipona* são escassos (Michener, 2000; Pedro, 2014; Lima et al., 2016). Portanto, trabalhos que avaliem o estresse imune diante a exposição a inseticidas e/ou patógenos nas abelhas sem ferrão são de extrema importância.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Testar os efeitos dos bioinseticidas azadiractina e espinosade através da exposição oral aguda na resposta imune inata e no processo de desintoxicação de operárias recém-emergidas de *M. quadrifasciata* em comparação com abelhas não expostas.

2.2. Objetivos específicos

- Testar os efeitos de azadiractina e espinosade na expressão gênica da Vitelogenina e na enzima Superóxido dismutase em operárias recém-emergidas em comparação com abelhas não expostas através da PCR em tempo real (qPCR).
- Avaliar os efeitos na imunidade celular através da contagem total de hemócitos (CTH) de operárias recém-emergidas expostas e não expostas aos dois bioinseticidas e à infecção pelas bactérias *Escherichia coli*.

3.0. Materiais e métodos

3.1. Abelhas

Abelhas da espécie *M. quadrifasciata* foram coletadas em colônias presentes no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa - UFV, na cidade de Viçosa, Minas Gerais (20° 45' 14" S e 42° 52' 55" O) (Figura 2). Três colônias foram utilizadas para garantir a variabilidade genética do experimento (Oldroyd e Fewell, 2007). Favos de cria com pupas no estágio de olho escuro (aproximadamente 20 dias de pupação) foram retirados das colônia (Figura 3) e armazenados em placas de Petri em incubadoras do tipo B.O.D. em escuridão, a 28°C e 70% de umidade relativa (Teles et al., 2007; Borges et al., 2012; Tomé et al., 2012).

Os opérculos das células de cria foram retirados com uma pinça para possibilitar a emergência dos adultos. As abelhas recém-emergidas (≤ 24 h) foram retiradas das placas e classificadas de acordo com os caracteres morfológicos (Figuras 4 e 5) (Kerr, 1949; Michener, 2013). Somente operárias recém-emergidas com até 24h de idade foram utilizadas nos experimentos. Após a emergência, os indivíduos permaneceram na estufa até três dias de

idade, sendo alimentados com uma mistura de 50% de mel com 50% de água destilada e pólen fermentado ad libitum (Borges et al., 2012), para posterior execução dos ensaios.

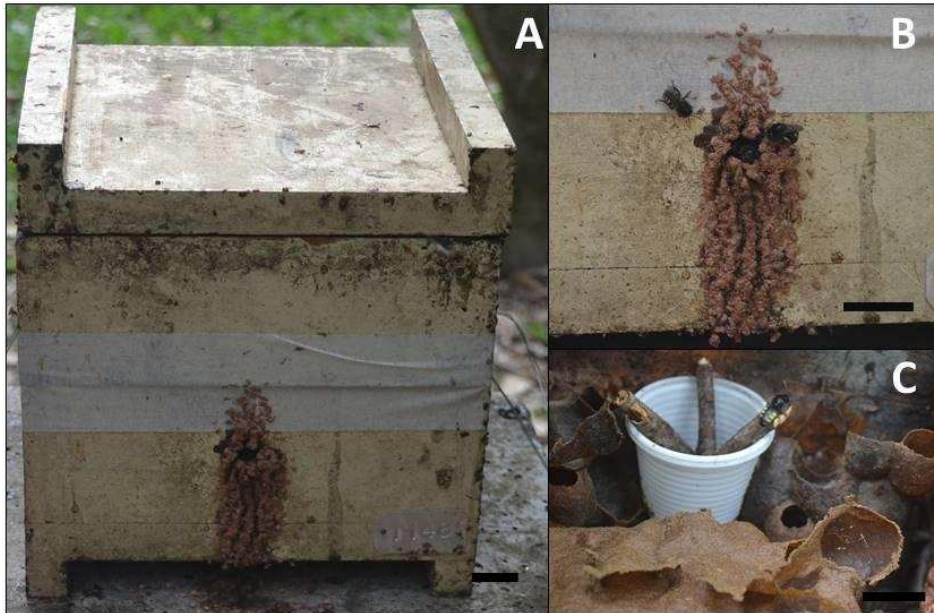


Figura 2: A. Colônia de *M. quadrifasciata* em caixa de madeira no apiário da UFV. B. Entrada para colônia, característica desta espécie. C. Interior da colônia. Escala: 2 cm.



Figura 3: Favo de cria de *M. quadrifasciata* com invólucro aberto, com pupas de olho escuro (aproximadamente 20 dias de pupação). Escala: 1 cm.

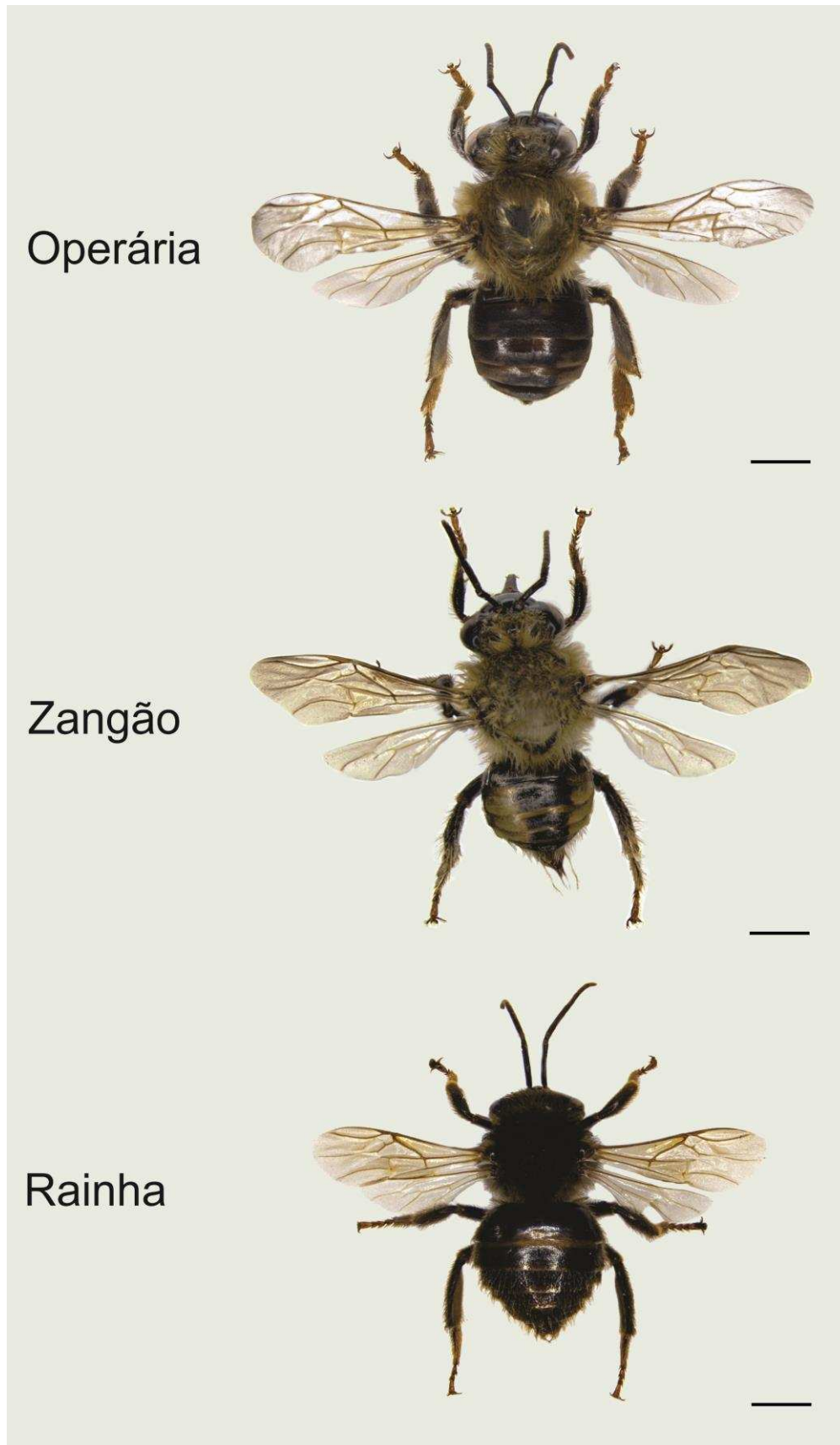


Figura 4: Vista dorsal de abelhas recém-emergidas de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). De cima para baixo: uma operária, um zangão e uma rainha. Escala: 2 mm.

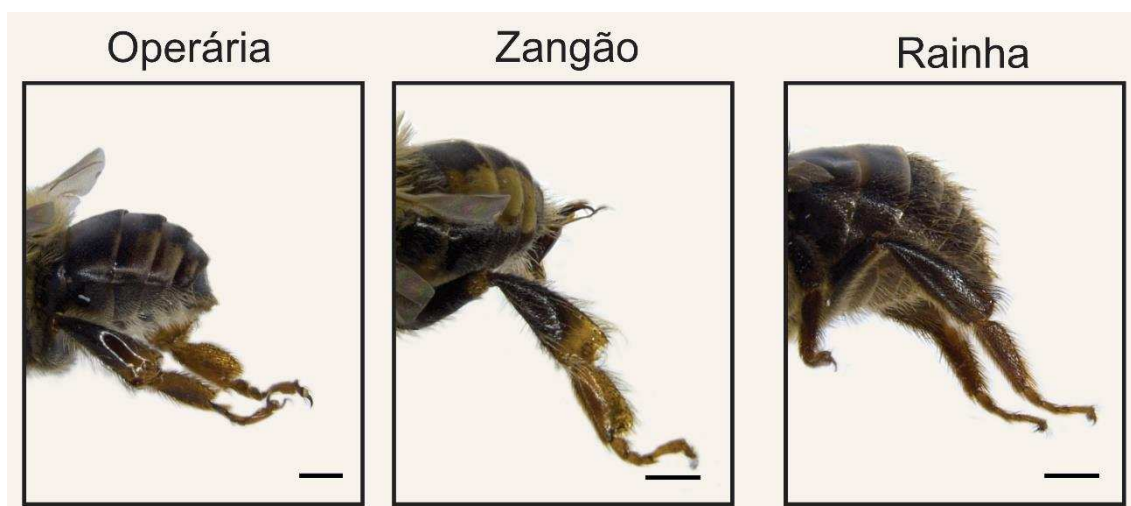


Figura 5: Vista lateral das pernas posteriores de abelhas recém-emergidas *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). Da esquerda para a direita: uma operária, um zangão e uma rainha. Somente as operárias possuem corbícula (dilatação) na sua última perna. Escala: 1 mm.

3.2. Bioinseticidas e concentrações para os bioensaios

Formulações comerciais dos bioinseticidas azadiractina (Cursor, 10 g i.a. Kg⁻¹, Biocard Indústria Química LTDA, Curitiba, PR, Brasil) e espinosade (Tracer, 480 g i.a. L⁻¹, Dow AgroScience, Santo Amaro, SP, Brasil) foram diluídas em uma solução de 50% de mel e 50% de água destilada (v/v) e utilizadas para se obter, respectivamente, uma dose subletal final de 6 e 5.29 ng i.a./abelha. A maior dose, que não ocasionava letargia nas abelhas foi escolhida para azadiractina, de acordo com pré-testes. A solução de espinosade foi escolhida baseada na DL₅ (dose letal) para essas abelhas (Tomé et al., 2015).

3.3. Exposição aos bioinseticidas

Abelhas foram alimentadas com 2 µl de solução de mel contaminada (azadiractina – 6 ng ou espinosade – 5.29 ng) ou controle (solução não contaminada com inseticida - solução 50% mel e 50% água destilada (v/v)), após jejum de 18h. As abelhas com quatro dias de idade foram individualmente transferidas para vidros cilíndricos selados com parafilme (Parafilm M, PPP Co., Chicago, IL, USA) durante 15 min até se alimentarem (adaptado de Tomé et al., 2015). Posteriormente à exposição, as abelhas ficaram em incubadora

durante 24h, recebendo uma mistura de 50% de mel com 50% de água destilada e pólen fermentado.

3.4. Ensaio para análise da expressão gênica

Abelhas de três colônias foram oralmente expostas, sendo utilizados cinco indivíduos para cada bioinseticida (azadiractina e espinosade) e cinco para o controle (não tratados), totalizando 15 indivíduos por colônia. Elas foram coletadas e individualmente analisadas, devido ao possível polimorfismo genético (Fonseca, 1973; Crozier e Consul, 1976).

3.5. Extração do RNA e síntese do cDNA

Para extração do RNA total, somente o abdômen de abelhas foi utilizado, devido a este ter uma maior quantidade de corpo gorduroso e hemolinfa (Klowden, 2013; Chaimanee et al., 2016), onde os genes (número de acesso em GenBank na Tabela 1) que foram analisados são mais expressos (Klowden, 2013; Chaimanee et al., 2016). O abdômen de cada abelha foi estocado em 500 µl de Trizol (Invitrogen) a - 80 °C para isolamento posterior do RNA total. A extração do RNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Deoxyribonuclease I, Invitrogen) para eliminação de possível DNA genômico contaminante.

A concentração e a qualidade do RNA foram mensuradas por leitura no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) a 260 nm e cálculo da razão 260nm/280nm, respectivamente. A reação de transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 µg de RNA total, 1 µl transcriptase reversa (NextGeneration MMLV RNase H Minus First-Strand cDna Synthesis Kit, DNA express) e Oligo dT(20) primer (Invitrogen) ou ReadyMade™ Primer Oligo dT, 20mer (10 ug) em presença de inibidores de RNase (RNase OUT, Invitrogen) em um volume final de 20 µL, a ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas dos fabricantes.

3.6. PCR em tempo real

As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas técnicas. As reações de amplificação foram feitas utilizando 5 µL do Tampão de Reação EvaGreen qPCR LOW ROX, 0,2 µL de HotStart Taq DNA Polimerase (NextGeneration ECO EvaGreen HotStart q PCR Kit LOW ROX, DNAexpress), 1 µL de cDNA diluído 5x, entre 0,15 à 0,2 µL conforme do estoque do primer com concentração 10µM (Tabela 1), completando com água ultrapura para obter um volume final de 10 µL. As condições da reação foram 95 °C durante 10 minutos, e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, logo após foi feita a curva de melting com 95 °C por 15 segundos e 55 °C por 1 minuto e para finalizar 95 °C por 15 segundos. A especificidade dos primers foi analisada pela curva de melting. Os primers utilizados para *M. quadrifasciata* foram desenhados utilizando-se Primer3 versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) utilizando-se as sequências depositadas em GenBank (Tabela 1), exceto para o gene de referência. O gene de referência escolhido foi rpL32, cujas sequências dos primers são às de *A. mellifera*. Estes primers funcionaram muito bem em *M. quadrifasciata* e é um gene de referência adequado para análises de qPCR (Lourenço et al., 2008). Foi feito o teste de eficiência dos primers.

Tabela 1: Sequências sense e antisense dos primers do gene de referência, gene codificadores de enzimas antioxidantes e gene envolvidos no desenvolvimento. As sequências de nucleotídeos desses genes estão depositadas no GenBank, sendo utilizadas para desenho dos primers para *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Gene	Número de acesso no GenBank	Primer	Tamanho do amplicon
ribosomal protein L32 (rpL32)*	AF441189	Sense 5' CGTCATATGTTGCCAACTGGT3' Antisense 5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'	150 pb
Vitelogenina Vg	KQ435944.1	Sense 5'GCTGCAGCATCCTCAAGACT3' Antisense 5'CCTCTCCATGCAGTGGAACT3'	140 pb
superoxide dismutase SOD – 1	KQ435693.1	Sense 5'TGTGCGTCATGTTGGAGATT3' Antisense 5'GATCAGCATGAACCACCAGA3'	137 pb

*primers desenhados para *A. mellifera* (Lourenço et al. 2008)

3.7. Quantificação relativa de Transcritos

A quantificação relativa dos transcritos do gene alvo foi calculada a partir da diferença dos valores médios de Ct (threshold PCR cycle) de cada triplicata técnica em relação aos valores médios de Ct de cada triplicata do gene de referência rpL32, de acordo com as instruções do User Bulletin #2 (Applied Biosystems). Primeiramente foram feitas as médias dos Ct das três leituras técnicas de cada amostra, tanto do gene alvo quanto do gene referência. De cada amostra, subtraiu-se o valor da média de $Ct_{\text{gene alvo}}$ do $Ct_{\text{gene referência}}$, obtendo-se o ΔCt . Posteriormente escolheu-se um ΔCt que corresponda a um calibrador (foi escolhida uma amostra do controle) e normalizam-se todos os valores subtraindo pelo ΔCt escolhido. Obtivemos então, o $\Delta \Delta Ct$. Finalmente, o valor final de quantificação relativa foi dado pelo $2^{-\Delta \Delta Ct}$, onde o calibrador é igual a um. Os resultados da quantificação por PCR em tempo real para cada gene foram agrupados de acordo com o tratamento e submetidos à análise de variância ($p < 0,05$).

3.8. Ensaio com bactéria e inseticida

A bactéria utilizada foi a *E. coli* K-12 ($1,3 \times 10^7$ U.F.C/ml), cultivadas em placas de Petri contendo 2,5% de meio Luria Bertani (LB) e 1,5% de ágar e cultivadas em LB líquido armazenadas no freezer -80°C até a injeção nas abelhas. As bactérias foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular de Bactérias da UFV.

O experimento foi realizado em esquema fatorial, sendo o primeiro fator determinado pela exposição (abelha expostas ou não para cada inseticida), o segundo fator pela bactéria (abelha inoculada ou com perfuração para injeção do meio LB esterilizado). Seis tratamentos foram estabelecidos: 1) operárias tratadas com espinosade e meio LB estéril; 2) operárias tratadas com azadiractina e meio LB estéril; 3) operárias tratadas com alimento não contaminado e meio LB estéril (controle 1); 4) operárias tratadas com alimento não contaminado e bactéria (controle 2); 5) operárias tratadas com espinosade e bactéria; e 6) operárias tratadas com azadiractina e bactéria. Três colônias foram utilizadas para o experimento, sendo 3 indivíduos por grupo dos tratamentos supracitados, totalizando 18 indivíduos por colônia.

Após a alimentação com as soluções contaminadas ou não (item 3.3), as abelhas dos tratamentos 1, 2 e 3 foram injetadas com 10 µL da suspensão de LB esterilizado com o uso de uma seringa para insulina (BD Ultra-Fine, agulha com calibre de 0,25 mm), enquanto as abelhas dos tratamentos 4, 5 e 6 foram inoculadas com 10 µL de LB com *E. coli*. A injeção foi feita no primeiro segmento do abdômen das abelhas anestesiadas a frio (mais ou menos 4 °C). Uma hora após a injeção, a hemolinfa foi coletada e analisada para CTH.

3.9. Coleta de hemolinfa e contagem total de hemócitos

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 seringa (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 ponteiros previamente siliconadas com SigmaCote (Sigma) foram utilizadas para coletar a hemolinfa para CTH. 10µL de hemolinfa foram coletados individualmente 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.

3.10. Análise Estatística

Os dados de expressão de Vg foram analisados utilizando o modelo linear generalizado baseado na distribuição Gamma dos resíduos (nenhuma transformação foi capaz de normalizar a distribuição dos resíduos) e os tratamentos foram contrastados pelo teste de χ^2 ($p = 0,05$) (PROC GENMOD; SAS Institute, 2008). A expressão de SOD e a CTH (transformada para \log_{10}) foram analisadas utilizando o modelo linear geral baseado na distribuição Gaussiana dos resíduos (PROC GLM; SAS Institute, 2008), posteriormente, o teste de Tukey foi realizado ($p = 0,05$). A CTH foi analisada considerando o esquema fatorial 2x3 [fator 1: infecção bacteriana (sem e com infecção); fator 2: exposição aos bioinseticidas (controle, azadiractina e espinosade)]. A Correlação de Pearson ($p = 0,05$) foi utilizada os dados de expressão do Vg e a CTH (PROC CORR; SAS Institute, 2008).

4. Resultados e Discussão

A exposição aos bioinseticidas azadiractina e espinosade alterou a expressão da Vg ($\chi^2 = 9,81$; $df = 2$; $p = 0,007$) nas operárias de *M. quadrifasciata*. As abelhas que foram expostas aos bioinseticidas tiveram uma menor expressão da Vg em relação ao controle (azadiractina: $\chi^2 = 3,89$; $df = 1$; $p = 0,0486$; espinosade: $\chi^2 = 5,85$; $df = 1$; $p = 0,015$) (Figura 6a). Os níveis de Vg também diminuíram quando abelhas do gênero *Apis* são expostas aos inseticidas imidacloprido, e acaricidas coumafós e tau-fluvinato (Chaimanee et al., 2016; Garrido et al., 2016; Abbo et al., 2017), bem quando ocorre uma injúria ou infecção por vírus e bactéria (Lourenço et al., 2009; Steinmann et al., 2015), podendo resultar em um encurtamento da vida útil da abelha (Nelson et al., 2007). Este efeito negativo ocorre possivelmente devido ao gasto de energia diante da resposta imune (Schmid-Hempel e Ebert, 2003), onde ocorre um redirecionamento de recursos entre a reprodução, sobrevivência, forrageamento e sistema imune (Moret e Schmid-Hempel, 2001; Rolff e Siva-Jothy, 2002; Lourenço et al., 2009). Acredita-se que isto também possa ocorrer com outras proteínas relacionadas ao armazenamento energético como a hexamerina e a lipoforina (Lourenço et al., 2009).

A expressão do gene SOD pode ser alterada quando há exposição a inseticidas (Chaimanee et al., 2016). Em *A. mellifera*, os níveis de expressão de SOD diminuem em operárias, mas aumentam em rainhas quando são expostos a baixas concentrações de imidacloprido e coumafós, indicando que uma pequena quantidade de inseticida pode desencadear a resposta de desintoxicação (Chaimanee et al., 2016). Sabe-se que após exposição ao espinosade, nas mesmas doses utilizadas no nosso estudo, a atividade do voo foi prejudicada em *M. quadrifasciata*. Além disso, após exposição crônica à azadiractina ocorre a redução da sobrevivência e a massa corporal das larvas dessas abelhas, assim como ocorre a produção de indivíduos deformados, em doses ainda mais baixas das que foram utilizadas neste estudo (Barbosa et al., 2015; Tomé et al., 2015). Apesar disso, não houve diferença significativa na expressão relativa do gene SOD em nenhuma das exposições em relação ao controle ($F_{2,40} = 0,78$; $p = 0,463$) (Figura 6b). Estes resultados sugerem que o tempo após a alimentação não foi suficiente para desencadear maior

expressão do gene ou então a dose utilizada foi pequena para induzir uma resposta na expressão do SOD. Embora os prejuízos ocasionados pelos bioinseticidas em abelhas sem ferrão sejam são comprovados (Lima et al., 2016).

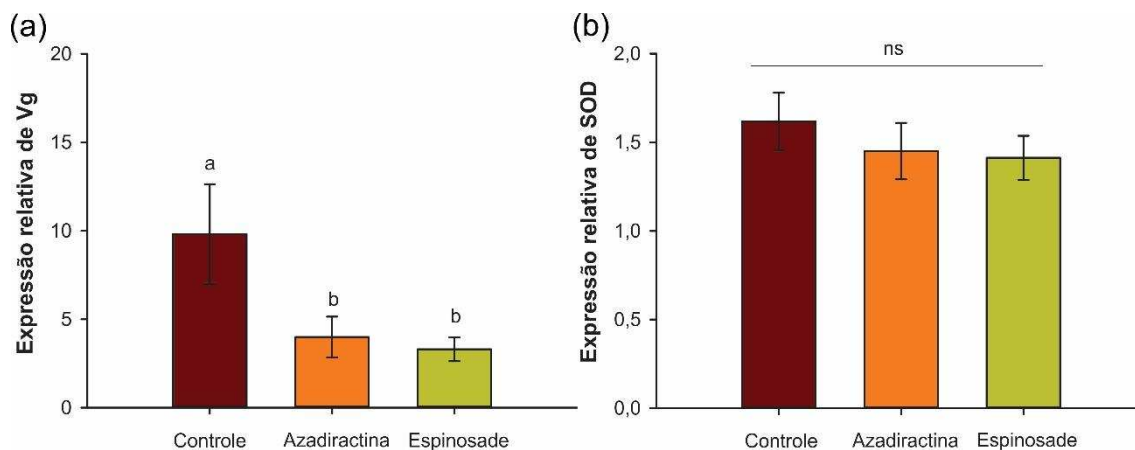


Figura 6: Expressões relativas de Vg (a) e SOD (b) em operárias de *Melipona quadrifasciata* expostas e não expostas (controle) aos bioinseticidas (azadiractina e espinosade) via ingestão de solução de mel contaminado. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de χ^2 em (a), ns indica não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F (b).

Houve interação significativa entre os fatores exposição aos bioinseticidas e a infecção por *E. coli* na CTH ($F_{2,46} = 5,29$; $p = 0,009$) e, portanto, os fatores foram desdobrados para análise posterior. As abelhas alimentadas com solução não contaminada e infectadas (controle 1) tiveram uma quantidade significativa maior de hemócitos em comparação com as abelhas do controle sem infecção (controle 2) ($p = 0,001$) (Figura 7). A alteração no número de hemócitos circulantes após imunoestimulação ocorre em insetos, podendo considerar a CTH como uma medida indireta da resposta celular (King e Hillyer, 2013; Hwang et al., 2015; Brandt et al., 2016; Brandt et al., 2017). Portanto, o número de hemócitos circulantes reflete a capacidade do organismo em lidar com desafios imunes (Kraaijeveld et al., 2001; Doums et al., 2002), então este aumento é uma resposta diante à infecção bacteriana. Entretanto, quando as abelhas foram expostas ao azadiractina e ao espinosade, não houve diferença significativa na CTH entre as infectadas com bactérias ou sem infecção ($p = 0,903$; $p = 1,000$ respectivamente). Mas houve um aumento na CTH mesmo sem infecção nas abelhas alimentadas com inseticidas, comprovando que somente os inseticidas aumentam o número de

hemócitos circulantes nos indivíduos. Outros componentes da imunidade podem ter sido alterados, como a produção de peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e atividade da profenoloxidase (Gregorc et al., 2012; Collison et al., 2017; Czerwinski e Sadd, 2017; Simmons e Angelini, 2017). Estudos sobre estes componentes pode ajudar a compreender como ocorre a interação das vias da imunidade para abelhas *M. quadrifasciata*, bem como abelhas sem ferrão.

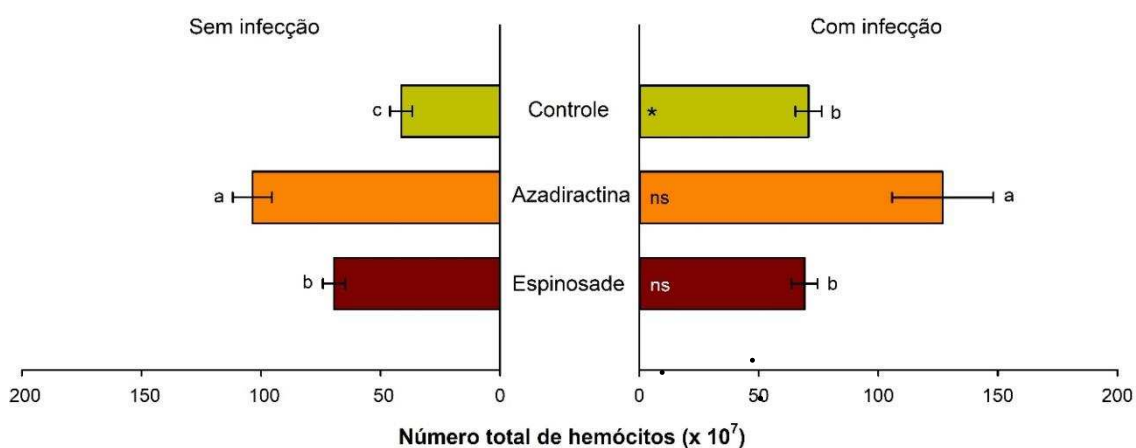


Figura 7: Contagem total de hemócitos em operárias de *Melipona quadrifasciata* expostas aos bioinseticidas (azadiractina e espinosade) via ingestão de solução de mel contaminada e/ou infectadas com bactéria via injeção de *Escherichia coli*. Indivíduos não expostos aos bioinseticidas (controle) se alimentaram de solução de mel não contaminada. Indivíduos não desafiados com bactéria foram injetados com meio LB estéril. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de exposição (controle, azadiractina ou espinosade) dentro de cada nível de infecção (sem ou com infecção) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Asterisco indica diferença significativa entre os níveis de infecção (sem ou com infecção) dentro de cada nível de exposição (controle, azadiractina ou espinosade) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A exposição tanto à azadiractina ($p < 0,001$) quanto ao espinosade ($p < 0,001$) aumentou CTH circulantes em comparação com o controle se tratando de operárias não infectadas (Injetadas com LB estéril). Estes resultados são semelhantes ao observado para *P. japonica* (Coleoptera) após exposição ao Monodhan 36 e Sevin. Acredita-se que a principal causa deste aumento é a liberação de hemócitos circulantes na hemolinfa relacionado à multiplicação de prohemócitos, resultando na recuperação do sistema imunológico em resposta a exposição aos inseticidas (Disale et al., 2013; Perveen e Ahmad, 2017;

Ravaiano et al. 2017). No entanto, são diferentes dos resultados observados para *A. mellifera* (Brandt et al., 2016, 2017) e *M. quadrifasciata* (Ravaiano, 2017), onde a CTH, respectivamente, pode reduzir ou manter-se estável sob exposição de inseticidas. Isto sugere que os efeitos na CTH se manifestam diferentemente de acordo com o inseticida, espécie ou idade da abelha (Perveen e Ahmad, 2017). Apesar disso, a causa dessa alteração ainda não está esclarecida.

Os indivíduos expostos à azadiractina tiveram uma CTH maior em comparação com os alimentados com solução não contaminada (controle 2) ($p = 0,003$) e infectados com *E. coli* (Figura 7). Contudo, a CTH não foi diferente entre as abelhas dos dois tipos de tratamentos, alimentadas com solução não contaminada (controle 2) e expostas ao espinosade e infectados com bactéria ($p = 1,000$). Isso aconteceu provavelmente porque a infecção induziu o aumento da CTH nos indivíduos alimentados com solução não contaminada suprimindo, portanto, a diferença que existiu quando não houve infecção.

Os resultados encontrados nesta pesquisa demonstraram que as quantidades de transcritos de Vg são reduzidas após exposição aos dois bioinseticidas. Além disso, ocorre um aumento simultâneo na quantidade de hemócitos quando as abelhas são expostas (sem infecção) em comparação com as alimentadas com solução não contaminada (controle sem infecção). Embora não exista uma correlação negativa significativa entre os transcritos de Vg e a CTH ($p = 0,054$), ela é contrária ao que já havia sido descrito em *A. mellifera*, onde há uma correlação positiva com a quantidade de Vg e hemócitos (Amdam et al., 2004; 2005). Em abelhas forrageiras ocorre uma redução no número de hemócitos que está diretamente relacionada com a diminuição dos títulos de zinco. Tendo em vista que a Vg é uma glicoproteína que se liga ao zinco que protege contra o estresse oxidativo e apoptose em diversas linhas celulares (Amdam et al., 2004; Hystad et al., 2017), a diminuição do zinco é mediada pela diminuição de Vg, e a redução do Vg é ocasionada pelas altas taxas de hormônio juvenil no fim da vida adulta de abelhas (Amdam et al., 2004; Dallacqua et al., 2007). Isso sugere que essa correlação positiva não seja absoluta, isto é, outros fatores, como a idade e a espécie da abelha, ou o tipo de imunestimulação, podem afetar a proliferação de hemócitos independentemente da síntese de Vg.

Os efeitos da exposição aos bioinseticidas na imunidade de *M. quadrifasciata* ainda não estão claros, sugerindo ser necessário investigar como estes podem interferir na imunidade celular e humoral, assim como em outras espécies de abelhas sem ferrão, procurando entender como reagem a um desafio imune.

5. Conclusões

O estudo da imunidade em *M. quadrifasciata*, desenvolvido no presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- É visto que a expressão da Vg é reduzida em abelhas expostas aos bioinseticidas em comparação com as não expostas. Todavia, essa proteína deve favorecer a integridade imune da abelha.
- A expressão do SOD não foi alterada em nenhuma das exposições em relação com abelhas não expostas, sugerindo que o tempo ou a dose utilizada não foram suficientes para desencadear uma resposta neste gene.
- Abelhas recém-nascidas infectadas com *E. coli* sem exposição são capazes de gerar uma resposta imune contra estes patógenos através do aumento de hemócitos circulantes.
- Abelhas injetadas com LB estéril e expostas aos bioinseticidas apresentaram uma maior CTH em comparação com não expostas.
- Abelhas infectadas com *E. coli* e expostas ao Azadiractina tiveram uma maior quantidade de hemócitos circulantes em comparação com não expostas (controle 2). Não havendo diferença entre as últimas e as expostas ao espinosade, sugerindo que o Azadiractina pode desencadear uma maior resposta celular em comparação com o Espinosade, ou então a infecção aumentou a CTH nos indivíduos do controle 2 suprimiu a diferença que houve nas expostas ao espinosade quando não houve infecção.
- A especificidade de ativação de uma determinada via da imunidade ainda precisa ser mais estudada em *M. quadrifasciata*, sugerindo que ocorra uma interação entre as respostas imunes. Entretanto, não houve uma correlação entre a quantidade de transcritos de Vg e a CTH de hemócitos em abelhas expostas aos inseticidas em relação às não exposta.

6. Referências Bibliográficas

- Abbo, P.M., Kawasaki, J.K., Hamilton, M., Cook, S.C., DeGrandi-Hoffman, G., Li, W.F., Liu, J., Chen, Y.P. 2017. Effects of Imidacloprid and Varroa destructor on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Sci.* 24, 467–477. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12335>
- Amaral, I.M.R., Neto, J.F.M., Pereira, G.B., Franco, M.B., Beletti, M.E., Kerr, W.E., Bonetti, A.M., Ueira-Vieira, C. 2010. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron* 41, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.10.003>
- Amdam, G.V., Omholt, S.W. 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.* 223, 451–464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Aase, A.L.T.O., Seehuus, S.C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., Hartfelder, K. 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40, 939–947. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- Amdam, G. V., Csondes, A., Fondrk, M.K., Page, R.E. 2006. Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. *Nature* 439, 76–78. <https://doi.org/10.1038/nature04340>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W. 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1799–1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>
- Amdam, G. V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W. 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39, 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.02.010>
- Ament, S.A., Chan, Q.W., Wheeler, M.M., Nixon, S.E., Johnson, S.P., Rodriguez-Zas, S.L., Foster, L.J., Robinson, G.E. 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *J. Exp. Biol.* 214, 3808–3821. <https://doi.org/10.1242/jeb.060244>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.01.003>
- Barbosa, W.F., Tomé, H.V. V., Bernardes, R.C., Siqueira, M.A.L., Smagghe, G., Guedes, R.N.C. 2015. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2149–2158. <https://doi.org/10.1002/etc.3053>
- Barribeau, S.M., Sadd, B.M., du Plessis, L., Brown, M.J., Buechel, S.D., Cappelle, K., Carolan, J.C., Christiaens, O., Colgan, T.J., Eler, S., Evans, J., Helbing, S., Karaus, E., Lattorff, H.M.G., Marxer, M., Meeus, I., Näpflin, K., Niu, J., Schmid-Hempel, R., Smagghe, G., Waterhouse, R.M., Yu, N., Zdobnov, E.M., Schmid-Hempel, P. 2015. A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biol.* 16, 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0628-y>
- Bernardes, R.C., Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Guedes, R.N.C., Lima, M.A.P. 2017. Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. *Apidologie* 48, 275–285. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0473-3>
- Borges, A.A., Humann, F.C., Tavares, M.G., Campos, L.A.O., Hartfelder, K. 2012. Gene copy number and differential gene expression in haploid and diploid males of the stingless bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insectes Soc.* 59, 587–598. <https://doi.org/10.1007/s00040-012-0259-1>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R. 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>
- Brandt, A., Grikscheit, K., Siede, R., Grosse, R., Meixner, M.D., Büchler, R., 2017. Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04734-1>
- Brito, D. V., Silva, C.G.N., Hasselmann, M., Viana, L.S., Astolfi-Filho, S., Carvalho-Zilse, G.A. 2015. Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.008>
- Brunham, R.C., Plummer, F.A., Stephens, R.S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect.*

- Immun. 61, 6, 2273-2276. <https://doi.org/10.1128/iai.00021-18>
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S. 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329–344. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00015-4)
- Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P., 1993. Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 12, 1569–78.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* 269, 28569–28575.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387–2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. 1990. Isolation and characterisation of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee *Apis mellifera*. *Eur. J. Biochem.* 187, 381–386.
- Casteels, P., Romagnolo, J., Castle, M., Casteels-Josson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. 1994. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum and combating acquired resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 26107–26115.
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., Pettis, J.S. 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Physiol.* 89, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.004>
- Christen, V., Mittner, F., Fent, K. 2016. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Technol.* [acs.est.6b00678](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00678). <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00678>
- Collison, E.J., Hird, H., Tyler, C.R., Cresswell, J.E. 2017. Effects of neonicotinoid exposure on molecular and physiological indicators of honey

- bee immunocompetence. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0541-3>
- Consortium, T.H.G.S. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949. <https://doi.org/10.1038/nature05260>
- Crozier, R.H., Consul, P.C. 1976. Conditions for genetic polymorphism in social Hymenoptera under selection at the colony level. *Theor. Popul. Biol.* 10, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(76\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0040-5809(76)90002-2)
- Czerwinski, M.A., Sadd, B.M. 2017. Detrimental interactions of neonicotinoid pesticide exposure and bumblebee immunity. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jez.2087>
- Dallacqua, R.P., Simões, Z.L.P., Bitondi, M.M.G. 2007. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Soc.* 54, 70–76. <https://doi.org/10.1007/s00040-007-0913-1>
- De Souza, E.A., Neves, C.A., Campos, L.A. de O., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. 2007. Effect of mating delay on the ovary of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) queens. *Micron* 38, 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.08.005>
- Derecka, K., Blythe, M.J., Malla, S., Genereux, D.P., Guffanti, A., Pavan, P., Moles, A., Snart, C., Ryder, T., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Schuster, E., Stöger, R. 2013. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068191>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J. M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Disale, C.S., Dubal, R.S., Disale, S.D. 2013. Effect of some insecticides on haemocytes of Japanese beetle. *Online Int. Interdiscip. Res. J.* 3, 40–42.
- Dos Santos, C.F., Acosta, A.L., Dorneles, A.L., Dos Santos, P.D.S., Blochtein, B. 2016. Queens become workers: Pesticides alter caste differentiation in bees. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep31605>
- Dos Santos, S.A., Roselino, A.C., Hrncir, M., Bego, L.R. 2009. Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genet. Mol. Res.* 8, 751–757.

<https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr015>

- Doums, C., Moret, Y., Benelli, E., Schmid-Hempel, P. 2002. Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecol. Entomol.* 27, 138–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00388.x>
- 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. Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 3, 213-220.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15, 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Fonseca, V.L.I. 1973. Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata* (Hym., Apidae, Meliponinae). *Bol. de Zool e Biol. Mar.*, 30, 30, 633-640.
- Garrido, P.M., Porrini, M.P., Antúnez, K., Branchiccela, B., Martínez-Noël, G.M.A., Zunino, P., Salerno, G., Eguaras, M.J., Ieno, E. 2016. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Vet. Res.* 47. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0335-z>
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D. 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.* 58, 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>
- Guedes, R.N.C., Smaghe, G., Stark, J.D., Desneux, N. 2016. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 43–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023646>
- Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G. V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett.* 579, 4961–4965. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.085>
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. 2012. *Os insetos: um resumo de entomologia*. Editora Roca Quarta Edição.
- Harpur, B.A., Sobhani, M., Zayed, A. 2013. A review of the consequences of

- complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 146, 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01306.x>
- Heard, T.A., 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol* 44, 183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A. 2012. A common pesticide devreases foraging success and survival in Honey Bees. *Science* 80, 336, 348–350. <https://doi.org/10.1126/science.1215039>
- Hillyer, J.F. 2015. Integrated immune and cardiovascular function in pancrustacea: lessons from the insects. *Integrative and Comparative Biology*. pp. 843–855. <https://doi.org/10.1093/icb/icv021>
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 2009. The Superorganism: The beauty, elegance, and strangeness of insect societies, *Nature*. <https://doi.org/10.1038/456320a>
- Hu, Y.T., Wu, T.C., Yang, E.C., Wu, P.C., Lin, P.T., Wu, Y.L. 2017. Regulation of genes related to immune signaling and detoxification in *Apis mellifera* by an inhibitor of histone deacetylation. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep41255>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128519>
- Hystad, E.M., Salmela, H., Amdam, G.V., Münch, D. 2017. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>
- Jarau, S., Hrncir, M., Zucchi, R., Barth, F.G. 2000. Recruitment behavior in stingless bees, *Melipona scutellaris* and *M. quadrifasciata*. I. Foraging at food sources differing in direction and distance. *Apidologie* 31, 81–91. <https://doi.org/10.1051/apido:2000108>
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>

- Johnson, R.M., Wen, Z., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2006. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ. Entomol.* 99, 1046–1050. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.4.1046>
- Kapheim, K.M., Pan, H., Li, C., Salzberg, S.L., Puiu, D., Magoc, T., Robertson, H.M., Hudson, M.E., Venkat, A., Fischman, B.J., Hernandez, A., Yandell, M., Ence, D., Holt, C., Yocum, G.D., Kemp, W.P., Bosch, J., Waterhouse, R.M., Zdobnov, E.M., Stolle, E., Kraus, F.B., Helbing, S., Moritz, R.F.A., Glastad, K.M., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D., Hauser, F., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Pinheiro, D.G., Nunes, F.M.F., Soares, M.P.M., Tanaka, E.D., Simoes, Z.L.P., Hartfelder, K., Evans, J.D., Barribeau, S.M., Johnson, R.M., Massey, J.H., Southey, B.R., Hasselmann, M., Hamacher, D., Biewer, M., Kent, C.F., Zayed, A., Blatti, C., Sinha, S., Johnston, J.S., Hanrahan, S.J., Kocher, S.D., Wang, J., Robinson, G.E., Zhang, G. 2015. Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science* 80, 348, 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4788>
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M. 1998. Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83>
- Kerr, W.E. 1949. Algumas comparações entre a abelha europeia (*Apis mellifera* L.) e as abelhas nativas brasileiras (Meliponini). *O Solo*, v. 1, p. 40-47.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. 1996. Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. Vol. 2. Fundação Acangaú.
- 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 Biol.* 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-55>
- Klowden, M.J., 2013. *Physiological systems in insects: third edition, physiological systems in insects: third edition.* <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04120-0>
- Koch, H., Weisser, P. 1997. Exposure of honey bees during pesticide application under field conditions. *Apidologie* 28, 439–447. <https://doi.org/10.1051/apido:19970610>
- Kraaijeveld, A.R., Limentani, E.C., Godfray, H.C.J. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila*

- melanogaster. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 259–261.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1354>
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K. 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>
- Kucharski, R., Maleszka, R. 2003. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 3, 27. <https://doi.org/10.1673/031.003.2701>
- Kwapong, P., Aidoo, K., Combey, R., Karikari, A. 2010. Stingless bees: importance, management and utilization: a training manual for stingless beekeeping. Editora Unimax Macmillan Ltd. Ghana: Accra North.
- Lamprou, I., Mamali, I., Dallas, K., Fertakis, V., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J. 2007. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology* 121, 314–327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02576.x>
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M. 2001. Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230, 243–257. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0123>
- Lavine, M.D., Strand, M.R. 2002. Insect Haemocytes and their Role in Immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 25–47. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. 2007. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 202, 733–747. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>
- Lourenço, A.P., Guidugli-Lazzarini, K.R., Freitas, F.C.P., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P. 2013. Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.001>

- Lourenço, A.P., Mackert, A., Cristino, A.S., Simões, Z.L.P. 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee , *Apis mellifera* , by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372–385. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Lourenço, A.P., Martins, J.R., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P. 2009. Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 71, 70–87. <https://doi.org/10.1002/arch.20301>
- Lundberg, J., Moberg, F. 2003. Mobile link organisms and ecosystem functioning: Implications for ecosystem resilience and management. *Ecosystems* 6, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s10021-002-0150-4>
- Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12657–12662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109535108>
- Marmaras, V.J., Charalambidis, N.D., Zervas, C.G. 1996. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 119–133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)31:2<119::AID-ARCH1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:2<119::AID-ARCH1>3.0.CO;2-V)
- Marmaras, V.J., Lampropoulou, M. 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell. Signal.* <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- Michener, C.D. 2013. The meliponini, in: *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*. pp. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_1
- Michener, C.D. 2000. *The bees of the world*, The Johns Hopkins University Press. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0290:FMBLZH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0290:FMBLZH]2.0.CO;2)
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G., Smagghe, G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19, 207–215. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0406-2>
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P. 2001. Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35107138>
- Nappi, A.J., Ottaviani, E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in

- invertebrates. BioEssays. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4)
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G. V. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. PLoS Biol. 5, 0673–0677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Nieh, J.C., Roubik, D.W. 1995. A stingless bee (*Melipona panamica*) indicates food location without using a scent trail. Behav. Ecol. Sociobiol. 37, 63–70. <https://doi.org/10.1007/BF00173900>
- Oldroyd, B.P., Fewell, J.H. 2007. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. Trends Ecol. Evol. 22, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.06.001>
- Paim, G.F., Oliveira, F.F. 2011. Análise multicritério para construção de cenários de risco à desertificação: qual a relação destes ambientes com a diversidade de abelhas? In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR, 15, Curitiba. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR. Curitiba: INPE, 2011, p. 3135-3141.
- Pedro, S.R. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology 61, 348–354. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>
- Perveen, N., Ahmad, M. 2017. Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. Saudi J. Biol. Sci. 24, 1016–1022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.011>
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. Trends Ecol. Evol. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Prier, K.R.S.R.S., Lighthart, B., Bromenshenk, J.J., 2001. Adsorption model of aerosolized bacterial spores (*Bacillus subtilis* Variety *niger*) onto free-flying honey bees (Hymenoptera: Apidae) and its Validation. Environ. Entomol. 30, 1188–1194. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.6.1188>
- Ravaiano, S.V. 2017. Estudo da morfologia do coração, dos hemócitos e dos efeitos do imidacloprido e da infecção bacteriana nas populações de hemócitos de *Melipona quadrifasciata*. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

- Rattan, R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
- Ribeiro, C., Brehélin, M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Rolff, J., Siva-Jothy, M.T. 2002. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9916–9918. <https://doi.org/10.1073/pnas.152271999>
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71–83. <https://doi.org/10.1051/apido:2004071>
- Salgado, V.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60, 91–102. <https://doi.org/10.1006/pest.1998.2332>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitak, D. 2015. Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog.* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Schmehl, D.R., Teal, P.E.A., Frazier, J.L., Grozinger, C.M. 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 71, 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.10.002>
- Schmid-Hempel, P., Ebert, D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.* 18, 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00013-7)
- Schmid, M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W.W., Stanley, D.W., Tautz, J. 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 54, 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G. V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 962–967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Senthil Nathan, S., Young Choi, M., Yul Seo, H., Hoon Paik, C., Kalaivani, K., Duk Kim, J. 2008. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE)

- activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.07.005>
- Simmons, W.R., Angelini, D.R. 2017. Chronic exposure to a neonicotinoid increases expression of antimicrobial peptide genes in the bumblebee *Bombus impatiens*. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep44773>
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. 1. ed. Belo Horizonte: Fernando Araújo Silveira.
- Slaa, E., Sánchez Chaves, L., Malagodi-Braga, K., Hofstede, F. 2006. Stingless bees in applied pollination : practice and perspectives. *Apidologie* 37, 293–315. <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., Dainat, B. 2015. Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129956>
- Strand, M.R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Teles, A., Mello, T., Barchuk, A., Simões, Z. 2007. Ultraspiracle of the stingless bees *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona depilis*: cDNA sequence and expression profiles during pupal development. *Apidologie* 38, 462–471. [https://doi.org/Doi 10.1051/Apido:2007035](https://doi.org/Doi%2010.1051/Apido:2007035)
- Triplehorn, C.A., Johnson, N.F. 2011. *Estudo dos insetos*. 7 ed. São Paulo: Cengage Learning.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>
- Tomé, H.V.V., Martins, G.F., Lima, M.A.P., Campos, L.A.O., Guedes, R.N.C. 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>
- Velthuis, H.H.W., Koedam, D., Imperatriz-Fonseca, V.L. 2005. The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie* 36, 169–

185. <https://doi.org/10.1051/apido:2005014>
- Vit, P., Roubik, D.W., Pedro, S.R.M. 2012. Pot-Honey: A legacy of stingless bees, pot-Honey: A legacy of stingless bees. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Yamashita, M., Iwabuchi, K. 2001. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47, 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00144-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00144-X)
- Yoshiga, T., Hernandez, V.P., Fallon, a M., Law, J.H. 1997. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12337–12342. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12337>