

GEISYANE FRANCO DA LUZ TEIXEIRA

**HETEROCRONIA NA MATURAÇÃO CUTICULAR E IMUNIDADE PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA EM OPERÁRIAS ADULTAS DE *Apis mellifera* (APIDAE: APINI)**

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

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadoras: Carolina Gonçalves Santos

Luanda Medeiros Santana

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T226h
2020

Teixeira, Geisyane Franco da Luz, 1989-

Heterocronia na maturação cuticular e imunidade primária e secundária em operárias adultas de *Apis mellifera* (Apidae: Apini) / Geisyane Franco da Luz Teixeira. – Viçosa, MG, 2020. 57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-57.

1. Abelhas. 2. Melanina. 3. Quitina. 4. Expressão gênica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

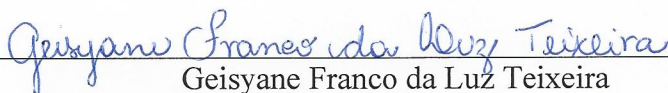
GEISYANE FRANCO DA LUZ TEIXEIRA

**HETEROCRONIA NA MATURAÇÃO CUTICULAR E IMUNIDADE PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA EM OPERÁRIAS ADULTAS DE *Apis mellifera* (APIDAE: APINI)**

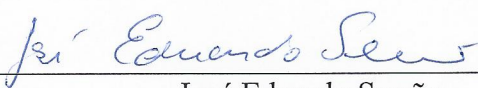
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Geisyane Franco da Luz Teixeira
Autora



José Eduardo Serrão
Orientador

*A Deus,
a Edilberto dos Anjos Teixeira e
à minha família
por todo apoio, sacrifício e amor...*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me inspirar a sempre entender as belezas do mundo natural, pois elas me mostram Sua criatividade, amor e fineza. Por ter me ajudado a manter-me centrada diante das desafiadoras responsabilidades de esposa, professora e pesquisadora.

À minha família, especialmente à vovó Luiza Maria de Siqueira Franco, mamãe Severina Marta Siqueira Franco, irmãs Giselle Ramos e Cristiane Oliveira, por todo o apoio na vida e nos estudos, mesmo a 2.700 km de distância nos últimos seis anos.

Ao meu marido, Edilberto dos Anjos Teixeira, pelo incentivo para eu ingressar na pós-graduação e por ter deixado quase tudo pra trás para me apoiar no processo. minha inspiração todas as manhãs e dono do meu amor eternamente.

À Universidade Federal de Viçosa por investir em mim nos últimos seis anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela excelência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pela orientação e exemplo de profissionalismo e eficiência. A sua contribuição para a minha vida profissional foi muito além da pesquisa. Me destes a base e o espaço suficientes para eu crescer, sem tirar a minha originalidade e sem deixar eu me perder dos objetivos e resultados que precisava alcançar.

Às melhores coorientadoras, Luanda Medeiros Santana e Carolina Gonçalves Santos por toda a paciência ao ensinar-me as técnicas para análises de Biologia Molecular e por terem me ajudado na elaboração da Tese. “-Vocês são causa direta de eu ter chegado até aqui da maneira como cheguei”.

Ao Prof. Weyder Cristiano Santana pela atenção, artigos, troca de ideias e solicitude na montagem das minicolônias no Apiário Central-UFV.

Ao Lulu (Gecelmino Correia) que me acompanhou e ajudou durante as montagens das minicolônias no Apiário Central e no Apiário Alecrim. Pelo apoio, atenção, café e conversas meu muito obrigada.

Ao Seu Ferreira (Geraldo Neri Ferreira) e ao Apiário Alecrim que salvou meu experimento, quando não havia mais esperança. Pelas viagens a Guaraciaba e Paula Cândido

para pegar amostras, e por ter me ajudado com a sobrevivência das minicolônias, meu muito obrigada.

A Toninho (Antônio Alves) pelas primeiras orientações e ajuda nas montagens das primeiras minicolônias.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos na pessoa do Prof. Gustavo Ferreira Martins e da maravilhosa Renata Cristina Barbosa por toda a atenção, paciência e disponibilização de espaço, tempo, equipamentos, reagentes e materiais para as análises de Biologia Molecular.

Ao Laboratório de Citogenética de Insetos pela obtenção das imagens histológicas.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, Laboratório de Biologia Molecular de Insetos e Apiário Central pelo apoio.

Às Profas. Lenira Lacerda (UFMA) e Gisele Azevedo (PET-UFMA) pelos conselhos em decisões importantíssimas para meu desempenho profissional e acadêmico. Suas influências sobre mim serão para sempre.

A Virgínia Teles Dohanik pelo apoio e amizade.

A Luís Carlos Martinez pelo apoio na análise dos dados.

À Werônica Célia Starlino Dias por ter acompanhado parte do projeto e ter dado contribuições importantes na etapa de montagem das minicolônias e obtenção de dados.

À Raissa Santana por todo apoio e parceria durante a graduação e pós-graduação.

À Mayara Badaró Arthidoro Castro pelo apoio à marcação das abelhas e coleta de amostras.

A Carlos Eduardo Amato Teixeira pelas adaptações feitas na caixa de transporte de *Apis mellifera* sem as quais minha Etapa II não teria dado certo.

“Existe um mistério muito grande que, no entanto, faz parte do dia-a-dia. Todos os seres humanos participam dele, embora muito poucos reflitam sobre ele. A maioria simplesmente o aceita, sem mais indagações. Esse mistério é o tempo. Existem calendários e relógios que o medem, mas significam pouco, ou mesmo nada, porque todos nós sabemos que uma hora às vezes parece uma eternidade e, outras vezes, passa como um relâmpago, dependendo do que acontece nessa hora. Tempo é vida. E a vida mora no coração.”

ENDE, Michael.

Momo e o Senhor do Tempo.

São Paulo: Martins Fontes, 1995.

RESUMO

TEIXEIRA, Geisyane Franco Luz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Heterocronia na maturação cuticular e imunidade primária e secundária em operárias adultas de *Apis mellifera* (Apidae: Apini).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadoras: Carolina Gonçalves Santos e Luanda Medeiros Santana

A cutícula e a matriz peritrófica em insetos funcionam como barreiras primárias atuando como primeiras linhas de defesa contra patógenos. Defesas imunes secundárias mediadas por células e por substâncias antimicrobianas são utilizadas quando as primárias não são suficientes. Entre elas estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e a enzima lisozima que atuam diretamente contra os microrganismos invasores. Como os insetos podem regular plasticamente suas defesas conforme o risco de infecção, estudos sobre como a imunidade das abelhas sociais responde às diferentes pressões de patógenos ao longo de sua vida e das diferentes atividades realizadas são importantes para a melhoria de estratégias de manejo desses polinizadores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar componentes das respostas imunes primária e secundária de operárias adultas de *Apis mellifera* nutridoras e campeiras com diferentes idades, e quando assumindo precocemente funções externas à colônia. As quantidades de melanina na cutícula tegumentar, de quitina na matriz peritrófica e a expressão de *cpr14* foram usadas para medir barreira primária. As expressões de *abaecina*, *defensina*, *himenoptaecina* e *lisozima* foram usadas para medir a diferença na resposta imune secundária. A expressão de *malvolio* foi usada para detectar estímulo precoce para realização de atividades externas à colônia. As amostras consistiram de nutridoras e campeiras ou guardas obtidas de minicolônias compostas por operárias da mesma idade realizando tarefas diferentes (“*single-cohort colony*”) e de minicolônias com transição natural entre as tarefas conforme a idade. Campeiras tiveram maior quantidade de melanina na cutícula que nutridoras, mas não quando o efeito da idade foi anulado, indicando a aquisição gradual deste pigmento no tegumento de abelhas adultas de *A. mellifera* e corroborando a heterocronia na diferenciação cuticular do tegumento. A quantidade de quitina na matriz peritrófica foi semelhante tanto entre as operárias de diferentes idades e funções, quanto entre aquelas de mesma idade e diferentes funções, sugerindo que a resposta imune primária exercida pela matriz peritrófica não difere entre as fases da vida adulta da operária. A expressão de *cpr14* foi similar entre nutridoras e campeiras e entre operárias com diferentes funções e mesma idade. Expressão de *mvl* variou entre operárias de mesma idade e funções diferentes, mostrando que a expressão

desse gene está relacionada ao início das atividades de forrageio e aceleração da maturação comportamental. As expressões dos AMPs foram diferentes entre operárias com diferentes funções e mesma idade indicando que a atividade das operárias estimula a expressão gênica para substâncias efetoras contra microrganismos. A expressão de lisozima foi semelhante entre os grupos em todas as etapas experimentais. Como a complexidade estrutural da cutícula do tegumento é alcançada apenas em operárias mais velhas, as colônias ficam mais vulneráveis quando operárias nutridoras assumem precocemente atividades de forrageio. A expressão diferenciada do gene *mvl*, acelerando a mudança de função das operárias, e dos genes para defesa imune naquelas assumindo precocemente funções externas à colônia, evidenciam investimento em mecanismos de defesa secundária quando a defesa primária da cutícula ainda não está completamente desenvolvida.

Palavras-chave: Quitina da matriz peritrófica. Melanina cuticular. Peptídeos antimicrobianos. Expressão gênica.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Geisyane Franco Luz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Heterochrony in cuticular maturation and primary and secondary immunity in adult workers of *Apis mellifera* (Apidae: Apini)**. Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: Carolina Gonçalves Santos and Luanda Medeiros Santana.

The cuticle and peritrophic matrix in insects function as primary barriers acting as first lines of defense against pathogens. Secondary immune defenses mediated by cells and antimicrobial substances are used when the primary ones are not sufficient. Among them are antimicrobial peptides (AMPs) and the enzyme lysozyme that act directly against invading microorganisms. As insects can plastically regulate their defenses according to the risk of infection, studies how the immunity of social bees responds to the different pressures of pathogens along their lives and the different activities carried out are important to improve management strategies for these pollinators. The aim of the present study was to evaluate components of the primary and secondary immune responses of adult workers of *Apis mellifera* at different ages and performing tasks, and when early assuming functions external to the colony. The amounts of integumentary melanin, chitin in the peritrophic matrix and the expression of *cpr14* were used to measure primary barrier. The gene expressions *abaecin*, *defensin*, *himenoptaecin* and *lysozyme* were used to measure the difference in secondary immune response. The expression of *malvolio* was used to detect early stimulus to activities outside the colony. Normally age (nurse and foragers) and precocious (guards and foragers) workers were obtained from single-cohort and normally minicolonies. Foragers had a greater amount of melanin in the cuticle than nurses ones, but not when the effect of age was canceled, indicating the gradual acquisition of this pigment in the tegument of adult bees of *A. mellifera* and corroborating the heterochrony in the cuticular differentiation of the tegument. The amount of chitin in the peritrophic matrix was similar both among workers of different ages and functions, and among those of the same age and different functions, suggesting that the primary immune response exerted by the peritrophic matrix does not differ between the stages of the worker's adult life. The expression of *cpr14* was similar between nurturers and field workers and between workers with different functions and the same age. Expression of *malvolio* varied among workers of the same age and different functions, showing that the expression of this gene is related to the beginning of foraging activities and acceleration of behavioral maturation. The expressions of AMPs were different among workers with different

functions and the same age, indicating that the activity of bees stimulates the expression of effector substances against microorganisms. Lysozyme expression was similar between groups at all experimental stages. As the structural complexity of the cuticle of the integument is reached only in older bees, colonies are more vulnerable when nurse workers take on foraging activities early. The differentiated expression of the *mvl* gene, accelerating the change in function, and of the defense genes in workers, assuming early functions external to the colony, show investment in secondary defense mechanisms when the primary cuticle defense is not yet fully developed.

Keywords: Peritrophic matrix chitin. Cuticular melanin. Antimicrobial peptides. Age polyethism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Abelhas	21
2.2 Seleção de amostras sem contaminação por <i>Nosema</i> sp.	24
2.3 Histologia	24
2.3 Análises de expressão gênica	27
2.3 Análise estatística	35
3 RESULTADOS	36
3.1 Quantidade de melanina cuticular	36
3.2 Quantidade de quitina na matriz peritrófica	38
3.3 Expressão dos genes de defesa imune	40
4 DISCUSSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Os insetos possuem um sistema de defesa imune inata capaz de diferenciar moléculas próprias e estranhas. Ele é composto por elementos preventivos (defesas primárias) e reativos (defesas secundárias) para conter infecções. Estruturas físicas que estão em contato direto com o ambiente externo, como a cutícula e a matriz peritrófica (MP), funcionam como barreiras imunes primárias de defesa impedindo que agentes infecciosos entrem na cavidade do corpo (Derksen & Granados 1988; Moret & Moreau 2012; Klowden 2013). As defesas secundárias são necessárias quando os agentes patogênicos são capazes de violar as defesas primárias e entrar na hemocela (Vilcinskas & Gotz 1999; Klowden 2013).

Componente da defesa primária, o polissacarídeo quitina pode ser encontrado na cutícula e na MP conferindo força e estabilidade às estruturas. Na cutícula ele se localiza apenas na procutícula e interage com proteínas para exercer função mecânica, conferindo força e dureza. Na MP, localizada no intestino médio, ele forma uma rede de microfibrilas que se associa à uma matriz de carboidratos e proteínas que, entre outras funções, provê proteção mecânica para o epitélio intestinal e barreira física contra parasitas e patógenos que entram com a ingestão de alimentos (Terra 1990; Klowden 2013).

Himenópteros possuem matriz peritrófica do tipo-I produzida por todo ou por grande parte do epitélio do intestino médio e formada por secreção sequencial e agregação diferencial dos componentes (Teixeira *et al.* 2015; Marques-Silva 2005). A MP separa fisicamente o lúmen do intestino médio em espaços endoperitrófico e ectoperitrófico que compartimentalizam os processos da digestão do alimento (Terra 2001).

As defesas secundárias são subdivididas em duas grandes categorias: imunidade celular e humoral. A imunidade celular envolve hemócitos e processos como fagocitose, nodulação e encapsulamento dos patógenos, os dois últimos frequentemente acompanhados de melanização. A imunidade humoral ocorre através de substâncias antimicrobianas como a

fenoloxidase (importante para produção de melanina), espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (AMPs) que eliminam os invasores restantes (Klowden 2013). Os AMPs circulam livremente na hemolinfa e são secretados principalmente pelo corpo gorduroso e, em menores quantidades, pelos hemócitos e células epidérmicas (Bulet & Stocklin 2005). A maioria deles atua reduzindo a produção de ATP do invasor por alterações na permeabilidade da bicamada lipídica e despolarização parcial da membrana. Em *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae) há seis AMPs conhecidos, incluindo o abaecina (ABA), o himenoptaecina (HYM) e defensinas (DEF) (Casteels *et al.* 1990; Casteels *et al.* 1993; Casteels-Jonsson *et al.* 1994; Klowden 2013; Doublet *et al.* 2017).

As vias de sinalização nuclear Toll e Imd (*Immune Deficiency*) são as principais reguladoras da produção de AMPs em abelhas e dependem do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para serem iniciadas. Receptores transmembrana fazem o reconhecimento de moléculas específicas e iniciam uma cascata citoplasmática que resulta na translocação de fatores de transcrição para o núcleo e a transcrição de produtos dos genes antimicrobianos. Toll é ativada pelo ligante Spaetzle devido à presença de bactérias Gram (+) e fungos na hemolinfa. A via Imd é ativada por proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRPs) presentes em bactérias Gram (-) (Evans *et al.* 2006; Klowden 2013; Barribeau *et al.* 2015).

Outro componente da resposta humoral é a enzima lisozima que está presente constitutivamente em baixos níveis na hemolinfa de insetos e atua como enzima efetora com atividade glicosidase, hidrolisando componentes do peptidoglicano da parede da célula bacteriana para causar lise celular (Jollès & Jollès 1984). Há três genes para lisozima em abelhas, dos quais a lisozima-1 é importante na defesa contra infecção bacteriana em larvas de *A. mellifera* (Glinski & Jarosz 1993; Hoffmann 1995; Evans *et al.* 2006).

A melanina faz parte tanto da defesa primária quanto da defesa secundária como componente da resposta imune humoral, atividades antimicrobianas (por causar estresse oxidativo e levar ao encapsulamento de invasores), cicatrização de feridas, coloração e esclerotização da cutícula do exoesqueleto (Lavine & Strand 2001; Andersen 2010; Sugumaran 1991; Klowden 2013).

A melanização cuticular e esclerotização ocorrem simultaneamente através da via biossintética de hidroxilação de tirosina em L-DOPA (dihidroxifenilalanina) pela tirosina hidroxilase. Ela é seguida de catálise pela DOPA-descarboxilase para a produção de dopamina que é um precursor para a síntese de melanina e dos agentes escleróticos e de pigmentação *N*-acetildopamina (NADA) e *N*- β -alanildopamina (NBAD). A esclerotização começa quando NADA e a NBAD são oxidadas em quinonas pela ação de fenoloxidasas (tirosinase e lacase) que então reagem com proteínas cuticulares, estabilizando a estrutura da cutícula (Lavine & Strand 2001; Andersen 2010; Klowden 2013).

Proteínas cuticulares e quitinases são importantes nos insetos para restringir a perda de água e para a digestão (mantendo a estrutura intestinal sólida), muda e defesa contra patógenos. A expressão de peritrofinas, proteínas cuticulares e quitina desacetilase é maior em operárias nutridoras do que em campeiras de *A. mellifera* (Seehuus *et al.* 2013). Esse maior investimento na manutenção da “armadura corporal” em nutridoras pode ser explicado pela diferença na dieta e exposição a patógenos e outros microrganismos durante tarefas de limpeza da colônia. A proteína cuticular CPR14 é importante tanto para o escurecimento quanto para a esclerotização da cutícula sendo importante para a diferenciação e manutenção da cutícula adulta (Soares *et al.* 2007). **(Figura 1)**.

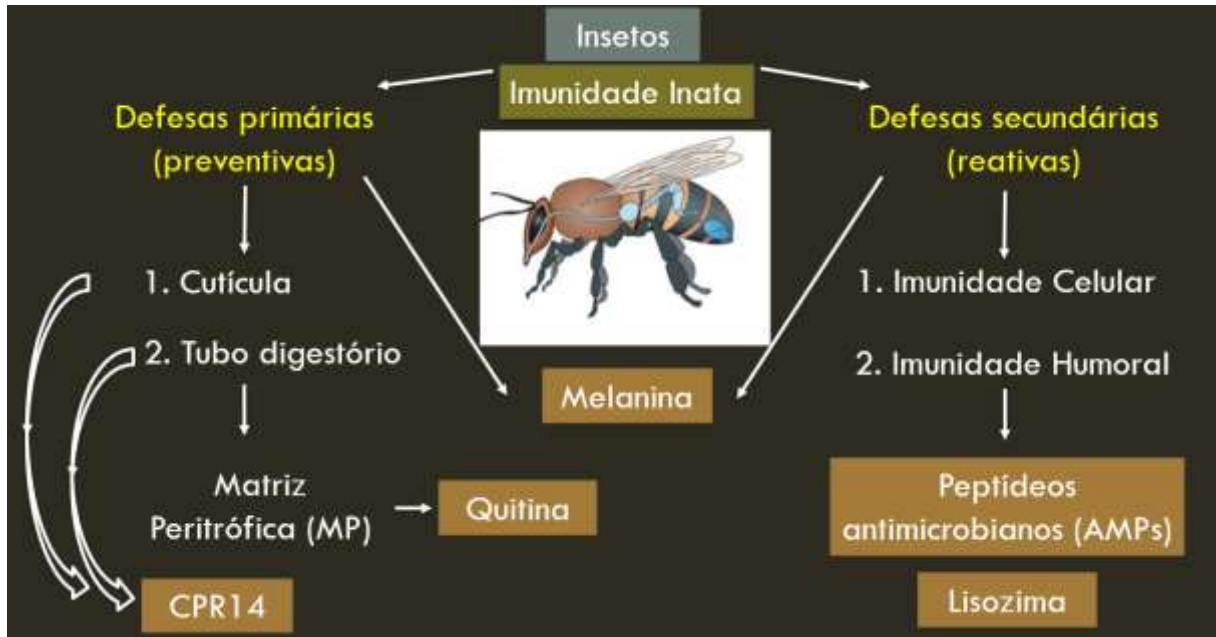


Figura 1 – Componentes da imunidade inata primária e secundária em insetos. A proteína cuticular CPR14 e a quitina da matriz peritrófica fazem parte das defesas primárias. Os peptídeos antimicrobianos e a enzima lisozima são efetores de defesa secundária. A melanina faz parte tanto de processos de defesa primária quanto secundária.

Apesar de não contar com o mecanismo imune adaptativo mediado por anticorpos, a especificidade da ação antimicrobiana em insetos tem sido bem estabelecida com memória imune (denominada “*specific immune priming*” para diferenciá-la da mediada por anticorpos em vertebrados) e interações genóticas entre patógenos e hospedeiros (Kurtz 2005; Sadd *et al.* 2005; Sadd & Schmid-Hempel 2006; Lemaitre & Hoffmann 2007; Freitak *et al.* 2009; Barribeau *et al.* 2014; Salmela *et al.* 2015; Harwood *et al.* 2019).

Meta-análise de expressão gênica imune em *A. mellifera* indicou vários genes envolvidos em respostas comuns a múltiplos patógenos e outros seguindo um padrão específico de expressão em resposta a *Nosema* (Microspora, Nosematidae) ou *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae)/vírus (Doublet *et al.* 2017). Genes para os peptídeos antimicrobianos HYM e DEF, assim como a CPR14 são diferencialmente expressos em respostas imunes generalizadas, enquanto genes para ABA e lisozima 1 são expressos em respostas específicas contra bactérias (Daffre *et al.* 1994; Lavine & Strand 2001; Evans 2006; Doublet *et al.* 2017).

Operárias adultas de *Apis* infectadas por *N. ceranae* podem apresentar diferentes padrões expressões de AMPs que variam de supressão à forte expressão, conforme o modo de infecção (experimental ou natural), a idade das abelhas, as funções realizadas na colônia e a duração do período pós-infecção (Badaoui *et al.* 2017; Li *et al.* 2017). Já as infecções causadas por *Varroa* e por vírus/*Varroa* suprimem as expressões para HYM, DEF e ABA em operárias recém-emergidas (Yang & Cox-Foster 2005).

A expressão para alguns AMPs em operárias adultas de *Apis* pode ser considerada constitutiva quando não é alterada diante de desafios de infecção. Expressão de *defensina*, por exemplo, não se modifica, em operárias com sete e 14 dias, em resposta à infecção na colônia pela bactéria causadora da doença “*American foulbrood*” (AFB) em larvas (López-Uribe *et al.* 2017).

Redução na expressão de AMPs em operárias adultas de *Apis* também pode estar associada a imunosenescência dessas abelhas. À medida que a operária vai envelhecendo e executando tarefas mais externas à colônia, vários componentes e atividades, direta ou indiretamente, relacionados ao sistema imune são reduzidos. Isso ocorre no número e performance fagocítica de hemócitos, atividade de encapsulamento, quantidade de corpo gorduroso e consequente produção induzida de AMPs na hemolinfa (Bedick *et al.* 2001; Wilson-Rich *et al.* 2008; Laughton *et al.* 2011; Hystad *et al.* 2017). Alguns componentes do sistema imune, no entanto, podem permanecer inalterados, como resposta de melanização e a produção de AMPs para atuar em barreiras primárias de defesa (Jefferson *et al.* 2013). Existe ainda a possibilidade de reversão da imunosenescência. Isso pode ser observado no aumento na proliferação de hemócitos em casos nos quais operárias são forçados a reverter de campeiras a nutridoras (Amdam *et al.* 2005)

A comparação entre operárias de *Apis* obtidas de colônias “*single-cohort*” (constituídas inteiramente por operárias de mesma idade) indicam que idade e atividade

influenciam sobre a resposta imunológica dessas abelhas. Senescência intrínseca às idades e funções, influencia negativamente a expressão de defesas imunes. Mesmo possuindo mesmas idades, operárias apresentam diferenças nos padrões de expressão relativa de AMPs, com expressão mais forte de *defensina* em nutridoras do que em campeiras (Lourenço *et al.* 2019; Byhrø *et al.* 2019). No entanto, maior expressão tecido-específica de AMPs na glândula hipofaríngea de campeiras em relação a nutridoras indicam investimento em defesas contra microrganismos adquiridos durante forrageio (Vannette *et al.* 2015).

O investimento em defesas é dispendioso e os insetos podem regulá-las plasticamente de acordo com as situações de risco de infecção (Wilson & Reeson 1998; Wilson *et al.* 2001). Diferentes fenótipos de coloração da cutícula estão pleiotropicamente associados a essa plasticidade nos parâmetros imunes em insetos (Fedorka *et al.* 2013a; 2013b). Em indivíduos melânicos (morfos escuras que exibem concentração alta de melanina) das espécies polimórficas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera, Pyralidae) um conjunto de defesas relacionadas à cutícula aumenta sua capacidade para sobreviver a ataques de fungos (Dubovskiy *et al.* 2013). Mudanças na densidade populacional de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) ativam a profilaxia dependente de densidade (DDP) que resultam em mudanças fenotípicas, caracterizadas por lagartas verdes e pretas produzidas, respectivamente, em baixa e alta densidade. As lagartas pretas são mais resistentes ao vírus entomopatogênico *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) devido a maiores expressões de barreiras primárias de defesa, evidenciada pelo aumento na espessura do epitélio, da matriz peritrófica e do seu conteúdo de quitina (Silva *et al.* 2013; 2016a). *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera, Tenebrionidae) pode apresentar os fenótipos preto ou marrom de coloração da cutícula, conforme a densidade populacional, ligados à resistência a fungos patogênicos como o resultado de suas defesas cuticulares (Barnes & Siva-Jothy 2000). Besouros pretos apresentam cutícula mais espessas, com alto

grau de melanização e estabilidade química em resposta ao estresse por radiação ultravioleta, proporcionando maior resistência, ou pelo menos retardando a invasão de patógenos (Silva *et al.* 2016b).

Recentes declínios nas populações de abelhas solitárias e sociais, assim como as misteriosas perdas de colônias da abelha eussocial *A. mellifera* conhecida como síndrome de *Colony Collapse Disorder* (CCD) são alarmantes devido à importância ecossistêmica e aos serviços econômicos cruciais que as abelhas exercem como polinizadores (Michener 2007; Silveira *et al.* 2002). No Brasil, não há dados oficiais sobre a ocorrência de CCD, mas há amplos registros de declínios e perdas de colônias nos últimos 13 anos (Pires *et al.* 2016). Estas perdas intensificaram o interesse sobre a exposição e defesa de abelhas a patógenos (vanEngelsdorp *et al.* 2009; Rolff & Reynolds 2009; Nazzi *et al.* 2012). Os microsporídios endopatógenos *N. apis* e *N. ceranae* tem sido amplamente estudados, pois afetam negativamente a saúde individual e coletiva das abelhas podendo levar à imunossupressão (Higes *et al.* 2008; Bacandritsos *et al.* 2010; Holt *et al.* 2013; Aufauvre *et al.* 2014; Budge *et al.* 2015).

Apis mellifera vive em colônias perenes com milhares de indivíduos (Michener 2007). O polietismo etário na realização das atividades de manutenção da colônia pelas operárias consiste em tarefas específicas realizadas conforme a idade da abelha (Seeley 1982). Entre as tarefas estão a limpeza de células (0-2 dias), cuidado com a cria (operárias nutridoras) (2-11 dias), armazenamento de alimentos (11-20 dias), forrageio (operárias campeiras) (mais de 20 dias) (Seeley 1982; Michener 1969; 1974; Silveira *et al.* 2002; Johnson 2005). Além dessas tarefas, operárias guardas representam fenótipo comportamental intermediário entre cumprir tarefas dentro da colônia e procurar comida no exterior patrulhando a entrada da colônia, inspecionando as abelhas e excluindo indivíduos não pertencentes a ela (Moore *et al.* 1987; Breed *et al.* 2004). Altas taxas de mortalidade de campeiras alteram a dinâmica populacional

da colônia e induzem operárias a assumir tarefas em idades muito mais jovens que o normal, o que pode acelerar falha da colônia. (Khoury *et al.* 2011).

Operárias de *A. mellifera* em diferentes estágios de desenvolvimento tem diferenças nas respostas imunes, uma vez que elas estão sujeitas a diferentes pressões de patógenos ao longo de sua vida e das atividades realizadas quando adultas (Wilson-Rich *et al.* 2008; Rolff & Reynolds 2009; Koleoglu *et al.* 2017). Alteração na expressão do gene *malvolio* (*mvl*) em indivíduos parasitados por *V. destructor*/vírus induzem forrageio precoce em operárias provavelmente como uma resposta adaptativa contra a transmissão de patógenos dentro colônia (Alaux *et al.* 2011; Natsopoulou *et al.* 2016; Zanni *et al.* 2017). Malvolio é uma proteína transmembrana de transporte de manganês e, provavelmente, ferro e tem sido associada à atividade de forrageio, pois está ligada a capacidade de responder à sacarose e sua expressão no cérebro de operárias é maior em campeiras do que em nutridoras (Orgad *et al.* 1998; Ben-Shahar *et al.* 2004; Seehuus *et al.* 2013).

Apis mellifera possui heterocronia na maturação do exoesqueleto de operárias adultas caracterizada por um atraso na esclerotização e melanização após a ecdise, com operárias recém-emergidas apresentando menor intensidade de pigmentação e de processo de esclerotização em relação às campeiras (Elias-Neto *et al.* 2014). Assim, estudos sobre as influências da heterocronia cuticular em *A. mellifera* nas características relacionadas às respostas imunes e sua efetiva proteção contra agentes infecciosos são importantes para o desenvolvimento de estratégias para melhoria da saúde dessas abelhas.

O objetivo deste trabalho foi analisar componentes das defesas imunes primária e secundária em operárias adultas de *A. mellifera* com diferentes idades e execução de tarefas, e quando assumindo precocemente atividades externas à colônia. A quantidade de melanina na cutícula tegumentar, de quitina na matriz peritrófica e a expressão do gene para proteína cuticular CPR14 foram usados para avaliar a barreira primária. As expressões de genes que

codificam três peptídeos antimicrobianos (abaecina, defensina e himenoptaecina) e uma enzima relacionada à imunidade (lisozima) foram usadas como marcadores para medir a resposta imune secundária. A expressão de *mvl* foi usada para detectar estímulo precoce às atividades externas à colônia. A hipótese testada é que as operárias regulam as respostas secundárias de defesa de modo diferente quando respostas primárias não estão completamente desenvolvidas e a operária vai assumir tarefas com maior desafios imunológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Abelhas

Quadros de cria e alimentos obtidos de colônias de *A. mellifera* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e no Apiário Alecrim em Viçosa, Guaraciaba e Paula Cândido (Minas Gerais, Brasil) foram utilizados para montagem de minicolônias experimentais de dois modos distintos denominados de Etapa I e Etapa II.

2.1.1 Montagem das colônias experimentais da Etapa I

Nove quadros de cria com pupas de olho preto foram retirados de colônias e mantidos a 34 °C e umidade relativa de 75 - 85%. As operárias que emergiram das células de cria foram coletadas e marcadas com tinta no tórax. As nascidas no mesmo dia receberam a mesma cor para posterior identificação da idade. As minicolônias foram montadas com presença de rainha fisogástrica e livre acesso ao ambiente externo, mas com menores números de operárias, quadros de cria e de alimento em relação às condições naturais. Além dessas operárias, cada minicolônia recebeu cerca de 800 operárias marcadas recém-emergidas de, pelo menos, três colônias diferentes. As minicolônias consistiram de caixas de madeira com laterais de vidro removíveis e tampa superior. Elas continham um quadro de cria na parte inferior e um quadro de alimento na região superior da caixa. Três minicolônias (M1, M2 e M3) serviram como fonte de amostras nesta etapa.

2.1.2 Montagem das colônias experimentais da Etapa II

As minicolônias desta etapa (“*single-cohort colonies*”) tinham as mesmas características de montagem da anterior, exceto por suas operárias serem apenas recém-emergidas (cerca de 4.000 mil operárias com 1 a 3 dias de idade) não marcadas. O objetivo desta manipulação foi estimular a mudança precoce de função das operárias adultas e, assim, anular o efeito da idade sobre os aspectos imunológicos analisados no presente estudo (Robinson *et al.* 1989).

Dentre as minicolônias montadas nesta etapa, uma (M4) apresentou campeiras precoces, mas as limitadas quantidades de alimento e operárias inibiram a postura da rainha e alimentação larval pelas nutridoras. A caixa enxameou quando apenas amostras de campeiras tinham sido retiradas para análise histológica. Outra minicolônia (M5) foi montada com um quadro de alimento a mais em relação à anterior e com um quadro de cria contendo apenas larvas retirado de uma colônia. A atividade das nutridoras foi estimulada, mas não houve desenvolvimento precoce de campeiras. A atividade mais externa à colônia desenvolvida precocemente foi a de guarda.

Para portar o quadro de alimento a mais, a M5 foi montada em caixa de madeira usada para o transporte de colônia de abelhas *Apis* adaptada para que uma das laterais fosse removível e a outra possuísse saída de campeiras ao meio externo com tela excludora de rainha, evitando o enxameamento.

2.1.3 Coleta de operárias

As coletas das operárias foram iniciadas dois dias após a completa montagem de cada minicolônia. As amostras consistiram de 15 operárias nutridoras, 15 campeiras ou 15 guardas

de cada minicolônia (exceto em casos de enxameamento antes do fim da coleta). As nutridoras foram coletadas quando executavam o comportamento de alimentação das crias, inserindo a cabeça em células contendo larvas. Já as campeiras foram obtidas na entrada das colônias ao chegarem de atividade de forrageio com pólen nas corbículas. As guardas foram manualmente retiradas com auxílio de pinça após longo período posicionadas na entrada do ninho e em defesa contra abelhas intrusas. As coletas da Etapa I foram realizadas nos meses de maio, agosto e setembro de 2018 e as da Etapa II em maio e junho de 2019 (**Figura 2**).

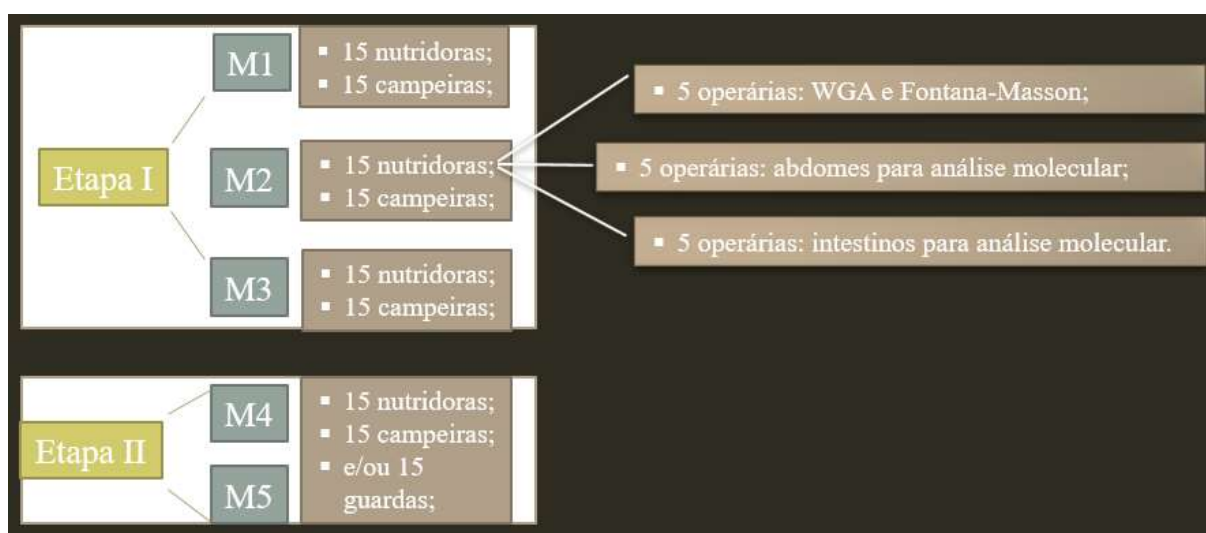


Figura 2 – Número de amostras coletadas em cada grupo de análise comparativa (nutridoras e campeiras ou guardas) de três minicolônias na Etapa I (M1, M2, M3 compostas por operárias com transição natural entre as tarefas conforme a idade) e duas minicolônias na Etapa II (M4 e M5 “single-cohort”). Quinze operárias de cada grupo experimental (cinco de cada colônia) da Etapa I e 10 operárias da Etapa II foram coletadas para análises histológicas (WGA e Fontana-Masson) da cutícula abdominal e da matriz peritrófica intestinal. Os mesmos números para cada grupo e cada etapa foram coletados para análises de expressão gênica (RT-PCR e qPCR). O número final usado para as análises comparativas foi determinado após exclusão das amostras contaminadas por *Nosema*.

A função das operárias como nutridoras foi confirmada pelo maior desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas. A maioria das operárias campeiras coletadas apresentaram essas glândulas pouco ou não desenvolvidas.

2.2 Seleção de amostras sem contaminação por *Nosema* sp.

As colônias utilizadas para obtenção dos quadros de crias apresentaram contaminação por *N. ceranae*. O número de esporos por operária medido em duas colônias durante as semanas de coleta de amostras foi de 2.800.000 e 6.450.000 em M2 e M3. Em cada uma delas, uma gota de um macerado de 10 campeiras em 10 mL de água destilada foi submetida a contagem de esporos em hemocitômetro (Human *et al.* 2013).

Além dessa verificação, todas as amostras foram avaliadas individualmente quanto à presença de esporos através de cortes histológicos do intestino médio ou de PCR convencional (detalhes na Seção 2.4.4). Aquelas com esporos foram descartadas de todas as análises.

2.3 Histologia

Para análise histológica da matriz peritrófica e tegumento abdominal, as operárias foram dissecadas em solução salina para insetos (0,1M NaCl; 0,1M Na₂HPO₄; 0,1M KH₂PO₄) e o intestino médio e o segundo tergito abdominal foram extraídos e fixados em solução de Zamboni (Stefanini *et al.* 1967) por 24 horas à 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M e desidratadas em série alcoólica crescente (70, 80, 90, 99%). A seguir, os tergitos foram transferidos para metanol absoluto por 12 horas para extração da camada de cera epicuticular. As amostras de intestino e tergitos foram embebidas em glicolmetacrilato (HistoResina Leica) e seccionadas.

2.3.1 Quantificação de Melanina na Cutícula

Cortes longitudinais com 3 µm de espessura do tegumento de 40 operárias da Etapa I e de 13 operárias da Etapa II (**Tabela 1**) foram corados para melanina pelo método Fontana-

Masson, em que a solução de prata amoniacal é reduzida à prata metálica como resultado da presença de melanina (Bancroft & Gamble 2008). Os cortes foram hidratados em água destilada e, em seguida, impregnados em solução de nitrato de prata amoniacal por 60 minutos a 60 °C e por 24 horas a 12 °C. Posteriormente, amostras foram submetidas à solução de cloreto de ouro (0,2%) por 10 minutos e redução em tiosulfato de sódio (5%) por 5 minutos, intercalados por lavagens em água destilada (Bancroft & Gamble 2008).

Tabela 1 - Descrição das amostras utilizadas para quantificação de melanina no tegumento abdominal de operárias de *Apis mellifera* usando o método Fontana-Masson.

Etapa I					
Atividade	Colônia	Nº de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M1	2	11 dias	Apiário	Maio de 2018
Nutridora	M1	2	7 dias	Central UFV	
Nutridora	M2	1	4 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Nutridora	M2	3	5 dias		
Nutridora	M2	2	8 dias		
Nutridora	M2	1	9 dias		
Nutridora	M2	3	3 dias		
Nutridora	M3	3	4 dias		
Nutridora	M3	1	5 dias		
Nutridora	M3	2	10 dias		
Campeira	M1	1	17 dias		
Campeira	M1	1	21 dias	Central UFV	
Campeira	M1	1	24 dias	UFV	
Campeira	M2	2	21 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Campeira	M2	2	20 dias		
Campeira	M3	4	26 dias		
Campeira	M3	8	20 dias		
Campeira	M3	1	30 dias		
Etapa II					
Atividade	Colônia	Número de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M5	5	9 a 11 dias	Apiário	Junho de 2019
Guarda	M5	6	10 a 12 dias	Central	
Campeira	M4	2	7 a 12 dias	UFV	Maio de 2019

Cinco secções de cada operária foram então fotografadas em microscópio Olympus BX-60 com objetiva de 40x, acoplado a um sistema de captura de imagens Q Color 3 Olympus e a média de escuridão em escala de cinza dos pixels de cada imagem foi obtida usando ImageJ, versão 1.52a (www.imagej.net). A escala varia de 0 a 255, com 0 sendo preto puro e 255 sendo branco puro. A quantificação de melanina foi realizada utilizando o valor médio de escala de cinza para áreas de tamanho semelhante selecionadas em cada imagem. A média dessas cinco medidas foi utilizada para evitar a pseudo-repetição. Cada média foi calibrada através da diferença em relação a secções de cutículas não coradas da mesma operária.

2.3.2 Quantificação de Quitina na Matriz Peritrófica

Secções longitudinais de 1 μm de espessura dos intestinos médios de 19 operárias da Etapa I e de 7 da Etapa II (**Tabela 2**) foram usadas para quantificar a presença de quitina na matriz peritrófica. As secções do intestino médio foram lavadas em PBS 0,1 M, transferidas para albumina sérica bovina 0,05% em PBS e incubadas durante 24 h em aglutinina de germe de trigo (WGA) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) na presença de N-acetilglicosamina 0,2 M (1:5) (Peters & Latka 1986). Após a incubação, as amostras foram lavadas em água destilada e seladas com sacarose à 50% em PBS. As secções do intestino médio foram fotografadas com microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 com objetiva de 40x, acoplado a um sistema de captura de imagens Q Color 3 Olympus e as imagens analisadas com o software ImageJ para determinar a presença e quantidade de quitina na matriz peritrófica utilizando o mesmo método de obtenção de média de escuridão em escala de cinza dos pixels (0 a 255) usado para melanina. A média da emissão de fluorescência em cinco cortes por operária foi utilizada como dado de quantidade de quitina

por amostra. Após a análise em microscopia de fluorescência, as mesmas amostras foram coradas com hematoxilina e eosina para confirmação das regiões com matriz peritrófica.

Tabela 2 - Descrição das amostras utilizadas para quantificação de quitina na matriz peritrófica de operárias de *Apis mellifera* usando WGA-FITC.

Etapa I					
Atividade	Colônia	Número de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M1	1	11 dias	Apiário	Maio de 2018
Nutridora	M1	3	7 dias	Central UFV	
Nutridora	M2	1	5 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Nutridora	M2	2	8 dias		
Nutridora	M3	2	4 dias		
Nutridora	M3	1	5 dias	Apiário Central UFV	Maio de 2018
Campeira	M1	1	17 dias		
Campeira	M1	1	21 dias		
Campeira	M1	1	24 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Campeira	M2	1	21 dias		
Campeira	M2	1	20 dias		
Campeira	M3	1	26 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Campeira	M3	1	20 dias		
Campeira	M3	2	20 dias		
Etapa II					
Atividade	Colônia	Número de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M5	4	9 a 11 dias	Apiário	Junho de 2019
Guarda	M5	2	10 a 12 dias		Central UFV
Campeira	M4	3	7 a 12 dias		

2.4 Análises de expressão gênica

2.4.1 Dissecção das operárias

Dez operárias de cada grupo experimental e de cada colônia foram dissecadas em solução salina para insetos (0,1M NaCl; 0,1M Na₂HPO₄; 0,1M KH₂PO₄) no mesmo dia da coleta, com pinças previamente limpas e tratadas com RNase AWAY (83931; Sigma-Aldrich). O intestino médio de cinco delas foi removido e as paredes dos tecidos rompidas para remoção dos resíduos alimentares de seu interior. Os abdômes foram extraídos das outras

cinco operárias. As amostras de intestino médio e abdome foram individualizadas em microtubos contendo 250 e 350 μL de Tri-Reagent (Sigma–Aldrich; MRC), respectivamente, sendo cinco indivíduos de cada estrutura para cada grupo e colônia. Os microtubos foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da extração do RNA.

2.4.2 Extração de RNA

Para seguir com a extração de RNA, depois de descongeladas as amostras de abdome e intestino das operárias foram homogeneizadas, o volume final completado para 500 μL de Tri-Reagent e centrifugadas a $12000 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitação das cutículas. O sobrenadante foi transferido para 100 μL de clorofórmio, agitação por 15 segundos e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a $12000 \times g$ por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase aquosa foi coletada e o RNA precipitado com incubação overnight em 250 μL de isopropanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A interfase e a fase orgânica foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior isolamento do DNA. Após incubação no isopropanol, o material foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado de RNA foi lavado duas vezes em 500 μL de etanol 75% seguido de centrifugação a $12.000 \times g$ por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O etanol foi removido e o precipitado foi submetido a secagem por inversão dos microtubos em fluxo laminar por 30 minutos seguido de banho seco a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O RNA foi ressuscitado em 20 μL de água livre de nuclease e incubado em banho seco a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A quantidade e qualidade da extração foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) para leitura em 260 nm. A qualidade das amostras foi avaliada pela razão da leitura 260/280 nm, sendo que aquelas menores que 1,8 ou maiores que 2,0 foram submetidas a uma nova precipitação por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A

essas foram adicionados 180 μL de água livre de nuclease e 200 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25: 24: 1), seguido de agitação por inversão e centrifugação a 13000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para 20 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e agitada por inversão. A fase aquosa foi coletada e o RNA precipitado com adição de 500 μL de etanol absoluto gelado overnight a - 80 °C. Após centrifugação a 13000 x g por 20 minutos à 4 °C, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado com 500 μL de etanol 70% seguido de centrifugação a 13000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do etanol, o precipitado foi secado por inversão em fluxo laminar. O RNA foi ressuscitado em 40 μL de água livre de nuclease, quantificado como descrito anteriormente e armazenado a - 80 °C.

2.4.3 *Tratamento do RNA com DNase*

RNAs das amostras negativas para contaminação por *N. apis* e *N. ceranae* foram tratadas com DNase para evitar contaminação com DNA genômico. A cada 1 μg de RNA, foram adicionados 1 μL de DNase RQ1 (Promega), 1 μL de tampão da enzima e água ultrapura para um volume final de 9 μL (Etapa I) ou 10 μL (Etapa II). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, seguindo-se inativação da enzima a 65 °C com adição de RQ1 DNase Stop Solution.

2.4.4 *Extração de DNA para seleção de amostras sem contaminação por Nosema*

Após a remoção da fase aquosa contendo RNA, o DNA genômico foi extraído das fases orgânicas armazenadas em TriReagente. A essas foram adicionados 150 μL de etanol absoluto gelado, seguido de homogeneização por inversão, incubação por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 1900 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com adição de 500 μL de solução de nitrato de

sódio 0,1 M em etanol 10% pH 8,5, seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, intercalada com agitação vigorosa a cada 5 minutos, e centrifugação a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 600 µL de etanol 75% e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente intercalado com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Seguiu-se centrifugação a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C, descarte do sobrenadante e secagem do DNA em fluxo laminar por 20 minutos, seguido de 10 minutos a 55 °C em banho seco. O DNA foi ressuspenso em 40 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, quantificado em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) e armazenado a -20 °C.

2.4.5 PCR seleção de amostras sem contaminação por *Nosema*

Para detecção das amostras contaminadas com *Nosema*, foram realizadas reações de PCR utilizando primers específicos para rRNA da pequena subunidade 16S de *N. apis* e *N. ceranae* (**Tabela 3**) (Forsgren & Fries 2010).

Tabela 3 - Sequências dos primers usados nos experimentos de PCR para detecção de *Nosema* spp. em operárias de *Apis mellifera*.

Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon	Referência
NaF	CTAGTATATTTGAATATTTGTTTACAATGG	278 pb	
NcF	TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT	316 pb	Forsgren & Fries (2010)
NacR	GTCGCTATGATCGCTTGCC		

Para um volume final de 20 µL, foram utilizados 10 µL de Taq DNA polimerase (GoTaq® Colorless Master Mix ou GoTaq® Green Master Mix Promega), 8 µL de água livre de nuclease, 0,5 µL de cada primer (R e F) a 10 µM e 1µL de DNA genômico na concentração de até 125 ng/µL. As reações foram acompanhadas por controles negativo (sem

DNA) e positivo (pool de DNA de operárias campeiras contaminadas). As condições para as reações foram: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72 °C. Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2% e corados com GelRed™ (Biotium). Os RNAs das amostras que não apresentaram contaminações (seis operárias da Etapa I e oito da Etapa II) foram utilizados para as análises de expressão gênica dos genes para defesa imune usando as reações em cadeia da polimerase convencional semiquantitativa (PCR) ou em tempo real (qPCR) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Descrição das amostras utilizadas para análise de expressão gênica em operárias de *Apis mellifera* usando PCR semiquantitativa e em tempo real.

Etapa I					
Atividade	Colônia	Número de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M3	1	4 dias		
Nutridora	M2	1	5 dias	Apiário Alecrim	Agosto e setembro de 2018
Nutridora	M2	1	4 dias		
Campeira	M2	3	20 dias		
Etapa II					
Atividade	Colônia	Número de operárias	Idade	Origem	Período de coleta
Nutridora	M5	4	Entre 9 e 11 dias	Apiário Central UFV	Junho de 2019
Guarda	M5	4	Entre 10 e 12 dias		

2.4.6 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram utilizadas enzimas transcriptase reversa de dois fabricantes, Promega e New England BioLabs, com protocolos distintos conforme descrito a seguir.

Os RNAs da Etapa I tratados com DNase foram transferidos para microtubos contendo 1 µL de primer oligo(dT) a 0,5 µg/µL e água livre de nuclease para volume final de 15 µL. As amostras foram aquecidas até 70 °C por 5 minutos e logo após resfriadas em gelo. A seguir foi adicionado 5 µL de tampão 5x da enzima, 6 µL de dNTP mix a 10 mM e 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (Promega) seguidos de incubação a 42 °C por 60 minutos. Ao final, a transcriptase reversa foi inativada a 70 °C por 10 minutos.

Os RNAs da Etapa II tratados com DNase foram transferidos para microtubos contendo 2 µL de primer oligo(dT) a 50 µM e 1 µL de dNTP mix a 10 mM. As amostras foram aquecidas até 65 °C por 5 minutos e logo após resfriadas em gelo. A seguir foi adicionado 2 µL de tampão 10x da enzima, 1 µL de transcriptase reversa M-MuLV (New England BioLabs), 0,2 µL de inibidor de RNase e água livre de nuclease para volume final de 20 µL seguidos de incubação a 42 °C por 60 minutos. A transcriptase reversa foi inativada a 65 °C por 20 minutos.

A integridade dos cDNAs foi testada em PCR convencional para expressão do gene *proteína ribossomal L32 (rpL32)* e armazenado a - 20 °C.

2.4.7 Análise da expressão gênica por qPCR e PCR semi-quantitativa

2.4.7.1 Seleção de genes para análise de expressão

Para as análises de expressão gênica foram escolhidos os seguintes genes relacionados a mecanismos de defesa: aqueles para os peptídeos antimicrobianos abaecina (ABA), Defensina - 1 (DEF), himenoptaecina (HYM), gene para expressão da enzima lisozima (LYS), para expressão da proteína cuticular 14 (CPR14). A expressão do gene *malvolio (mvl)* foi analisada para acompanhar as mudanças precoces de função das operárias (Evans *et al.*

2006; Doublet *et al.* 2017). As amplificações dos genes para defesa selecionados foram feitas utilizando primers previamente descritos (Evans 2006; Mello *et al.* 2019; Yang e Cox-Foster 2005) (**Tabela 5**).

Como genes de referência para normalização de uma possível variação no cDNA foram testados inicialmente o *proteína ribossomal L32* (anterior *rp49*) e o *actina (act)* (Lourenço *et al.* 2008). Destes, o *rpL32*, foi o mais estável no material deste estudo, sendo utilizado em todas as comparações.

Tabela 5 - Sequências dos primers usados nos experimentos de PCR semiquantitativa e em tempo real para análise de expressão gênica em operárias de *Apis mellifera*.

Gene	Nome	Sequências (5'-3')	Referência
<i>cpr14</i>	Proteína cuticular 14 (CPR14)	F:CGCCGGCATTACATCAA R:CGGAGGCTCAGGGTCGGTTCT	Mello <i>et al.</i> (2019)
<i>Abaecina (aba)</i>	Abaecina (ABA)	F:CAGCATTCGCATACGTACCA R:GACCAGGAAACGTTGGAAAC	Evans (2006)
<i>Defensina-1 (def)</i>	Defensina-1 (DEF)	F:TGTCGGCCTTCTCTTCATGG R:TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	Yang & Cox-Foster (2005)
<i>Lisozima – 1 (lys)</i>	Lisozima-1 (LYS)	F:ACACGGTTGGTCACTGGTCC R:GTCCCACGCTTTGAATCCCT	Yang & Cox-Foster (2005)
<i>Himenoptaecina (hym)</i>	Himenoptaecina (HYM)	F:CTCTTCTGTGCCGTTGCATA R:GCGTCTCCTGTCATTCCATT	Evans (2006)
<i>Malvolio (mvl)</i>	Malvolio (MVL)	F:GCAACATTGCCAACAATAGC R:CCCAGTGATGCGGTAAATCT	Seehuus <i>et al.</i> (2013)
<i>Ribosomal protein L32 (rpL32)</i>	Proteína ribossomal L32 (RPL32)	F:CGTCATATGTTGCCAACTGGT R:TTGAGCACGTTCAACAATGG	Lourenço <i>et al.</i> (2008)

2.4.7.2 RT-PCR

Reações de amplificação com 30 ciclos foram utilizadas para análise semiquantitativa da expressão de *cpr14*. Cada 25 µl finais de reação continha 1 µL de cDNA (50 ng/µL), 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 9,5 µL de água livre de nuclease e 1 µL de cada primer a 10 µM na concentração inicial. O controle negativo foi utilizado com omissão

do cDNA. As condições para as reações foram 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos e elongação final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%, corado com GelRed™ (Biotium) e fotografados com sistema de documentação de gel com câmera Canon integrada (MicroDOC BASIC, Cleaver Scientific).

As imagens obtidas foram utilizadas para mensurar a intensidade das bandas como método de quantificação, utilizando o software ImageJ, versão 1.52a (www.imagej.net). A unidade de expressão relativa (UER) foi determinada pela razão entre a intensidade da banda do *cpr14* e do *rpL32* para cada amostra.

2.4.7.3 PCR quantitativa em tempo real

As eficiências dos primers para qPCR foram testadas por meio de análises de curva padrão através de quantificação absoluta e curva de dissociação utilizando cinco pontos de diluições (1; 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000) seriadas de cDNA (concentração inicial 5 ng/μL; concentrações) num sistema Rotor-Gene Q (QIAGEN). As reações foram montadas da seguinte forma: 5 μL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 1 μL de cDNA, 0,5 μL de cada primer (F e R) a 10 μM e 3 μL de água ultrapura para um volume final de 10 μL.

As eficiências de amplificação dos primers das reações de qPCR foram calculadas com base no slope da curva padrão utilizando ThermoFisher Scientific qPCR Efficiency Calculator (www.thermofisher.com).

As reações de PCR em tempo real com cDNA (5 ng/μL) das amostras de abdome de nutridoras, campeiras e guardas das diferentes colônias foram realizadas em triplicatas técnicas, utilizando o sistema Rotor-Gene Q (QIAGEN) e a GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) nas mesmas condições descritas para a quantificação absoluta. As reações

ocorreram nas condições de 95 °C por 2 minutos e 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e hibridização por 60 segundos a 60 °C, sendo a aquisição da fluorescência realizada nesse último passo. Uma curva de dissociação (90 segundos a 50 °C e aumento de 1 °C até alcançar 95 °C por 5 segundos) foi gerada após cada corrida para verificar ausência de amplificações não específicas.

A abundância dos transcritos foi calculada em relação aos valores dos Cqs dos genes alvos e do gene de referência *rpL32*. Para as representações gráficas, as expressões relativas médias foram calculadas utilizando a metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen 2001).

2.5 Análise estatística

Distribuições foram analisadas usando o teste Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$). Teste t ou Análise de Variância (Fatorial) foram usados para as análises das quantidades de melanina, quitina e expressão de *cpr14*. Teste de Regressão Linear Simples foi utilizado para testar a relação entre quantidade de melanina na cutícula e a idade das operárias. Para todos os testes estatísticos a significância foi definida como 0,05%.

Para comparar as expressões gênicas entre nutridoras e guardas ou campeiras foram realizadas análises de randomização (2000 interações) no software REST 2009 com nível de significância de 0,05% (Pfaffl *et al.* 2002).

3 RESULTADOS

3.1 Quantidade de melanina cuticular

Nas operárias com diferentes idades, a quantidade de melanina na cutícula do tegumento diferiu entre nutridoras e campeiras ($t = 6,7$; $P < 0,00001$; $n = 40$ operárias), e apresentou uma correlação positiva com a idade ($R^2 = 0,68$, $SE = 4,45$) (**Figura 3**). Em nutridoras, a quantidade de melanina foi de $30,83 \pm 3,94$, enquanto as campeiras apresentaram um valor igual a $67,30 \pm 3,75$. Observamos também variação desse parâmetro entre as nutridoras de diferentes colônias, ($F_{2,17} = 3,6$; $P = 0,048$), com valores iguais a $47,46 \pm 6,45$, $22,85 \pm 5,18$ e $33,06 \pm 6,37$ em M1, M2 e M3, respectivamente. O mesmo não ocorreu quando comparamos as campeiras entre as minicolônias ($F_{2,17} = 2,21$; $P = 0,14$), com $49,72 \pm 9,38$, $68,8 \pm 5,72$ e $70,89 \pm 4,62$ em M1, M2 e M3, respectivamente.

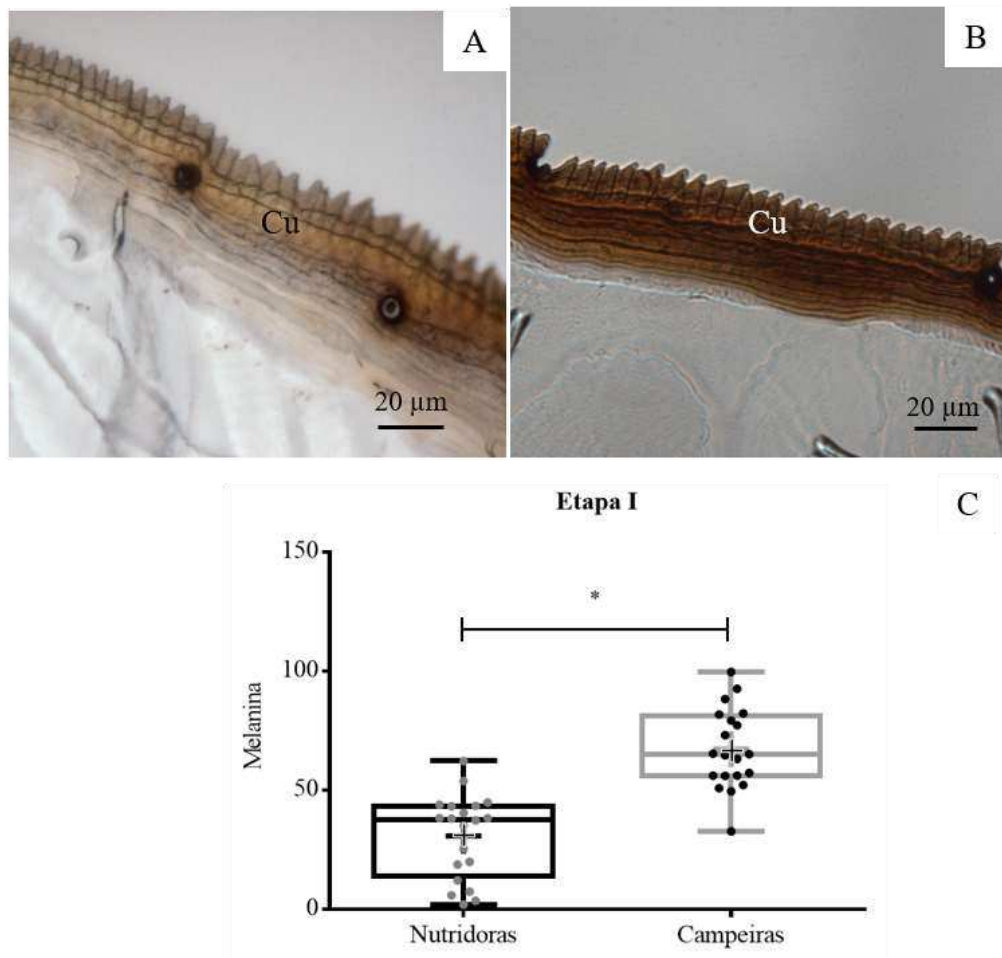


Figura 3 - Secções transversais do segundo tergito abdominal de operárias nutridoras (n=20) (A) e campeiras (n=20) (B) de *Apis mellifera* mostrando a presença de melanina na cutícula (Cu) (Fontana-Masson). (C): Quantificação (intensidade de escuridão) de melanina na cutícula. Círculos representam indivíduos. Caixas mostram distância interquartil com linha indicando mediana. +: indica a média. Barras verticais representam valores máximo e mínimo. Asterisco representa diferenças significativas ($P < 0,05$).

Em operárias de idades semelhantes desempenhando diferentes funções, não houve variação desse parâmetro ($t = 1,02$; $P = 0,33$; $n = 13$ operárias) quando comparadas nutridoras ($54,49 \pm 9,22$) e guardas/campeiras ($42,99 \pm 6,82$) (**Figura 4**).

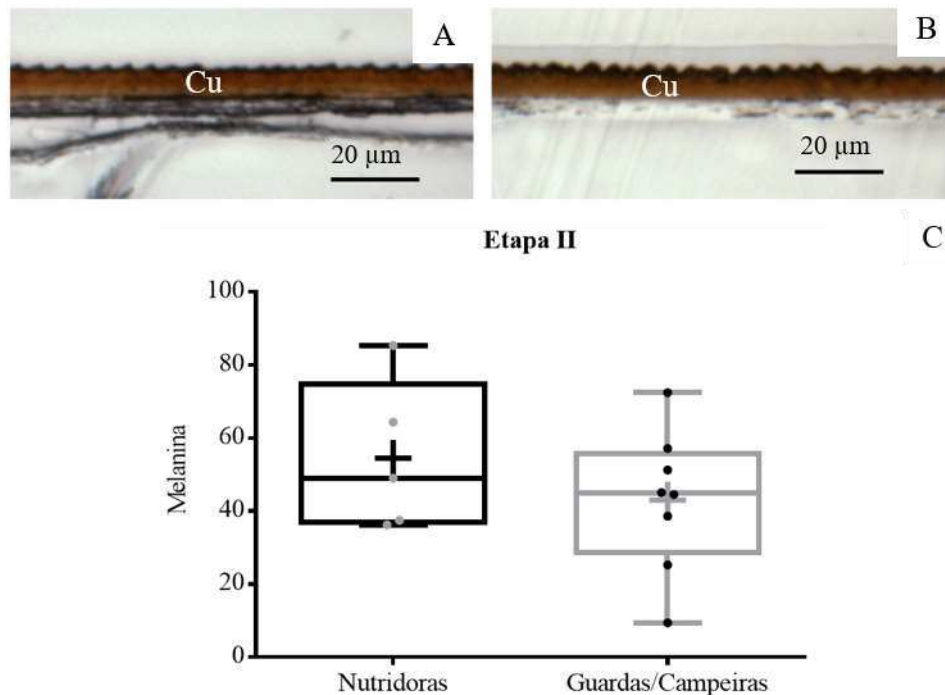


Figura 4 - Secções transversais do segundo tergito abdominal de operária *Apis mellifera* com mesma idade nas funções de nutridoras (A) e campeiras/guardas (B) mostrando a presença de melanina na cutícula (Cu) (Fontana-Masson). (C): Quantidade de semelhante de melanina na cutícula (intensidade de escuridão) ($P > 0,05$). Círculos representam indivíduos. Caixas mostram distância interquartil com linha indicando mediana. +: indica a média. Barras representam valores máximo e mínimo.

3.2 Quantidade de quitina na matriz peritrófica

A quantidade de quitina na matriz peritrófica não variou com idade e função ($t = 0,85$; $P = 0,40$; $n = 19$ operárias; Nutridoras: $30,86 \pm 2,078$; Campeiras: $33,41 \pm 2,16$) ou só com a função ($t = 0,73$; $P = 0,49$; $n = 9$ operárias; Nutridoras: $46,97 \pm 0,08$; Guardas/Campeiras: $46,66 \pm 0,37$) das operárias analisadas (Figura 5). Não houve variação desse parâmetro entre as minicolônias (nutridoras: $F = 3,3$; $P = 0,098$; campeiras: $F = 0,04$; $P = 0,96$).

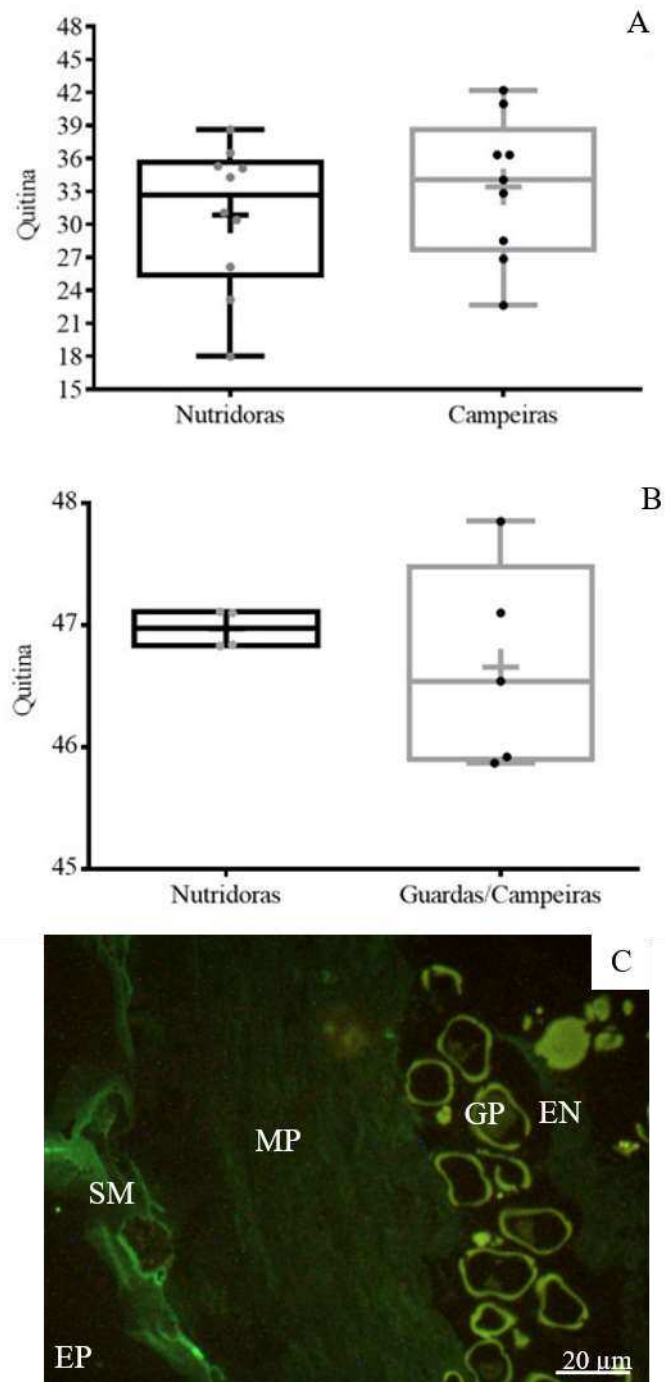


Figura 5 - Quantidade de quitina na matriz peritrófica do intestino médio de operárias *Apis mellifera*. **(A)**: operárias nutridoras e campeiras com idades diferentes. **(B)**: Operárias nutridoras e guarda/campeiras com idades semelhantes. Círculos representam indivíduos. Caixas mostram distância interquartil com linha indicando mediana. +: indica a média. Barras representam valores máximo e mínimo. Valores semelhantes pelo teste t (A: $t = 0,85$; B: $t = 0,73$; $P > 0,05$). **(C)**: Secção histológica mostrando matriz peritrófica (MP) com quitina marcada por WGA-FITC, matriz peritrófica (MP), espaço endoperitrófico (EN), epitélio intestinal (EP), grãos de pólen (GP) no lúmen intestinal e as regiões com secreção de matriz peritrófica após síntese (SM).

3.3 Expressão dos genes para defesa imune

Operárias não contaminadas com *N. apis* e *N. ceranae* foram selecionadas para as análises de expressão gênica. (**Figura 6**). Não foram detectadas amostras com *N. apis*, apenas com *N. ceranae*.

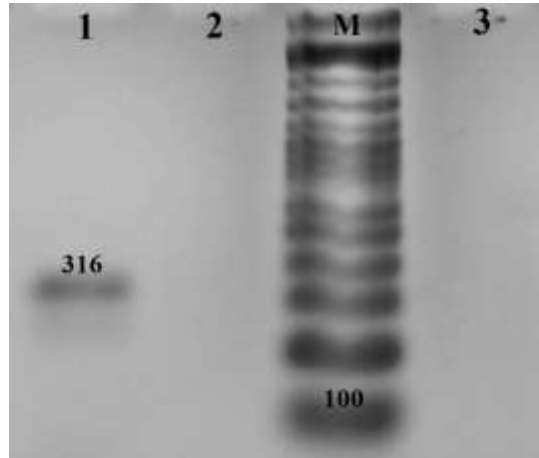


Figura 6 - Gel representativo da reação de PCR para detecção de *Nosema ceranae* em operárias de *Apis mellifera*. (1): controle positivo; (2): controle negativo; (3): amostra sem contaminação. M: marcador de 100 bp a 10 kb (Cellco).

PCR da expressão de *rpL32*, analisada após eletroforese em gel e caracterizada por bandas bem definidas e sem arraste, indicou as boas condições dos cDNAs sintetizados (**Figura 7**) e todos os primers utilizados mostram eficiência entre 95 e 110% (**Tabela 6**).

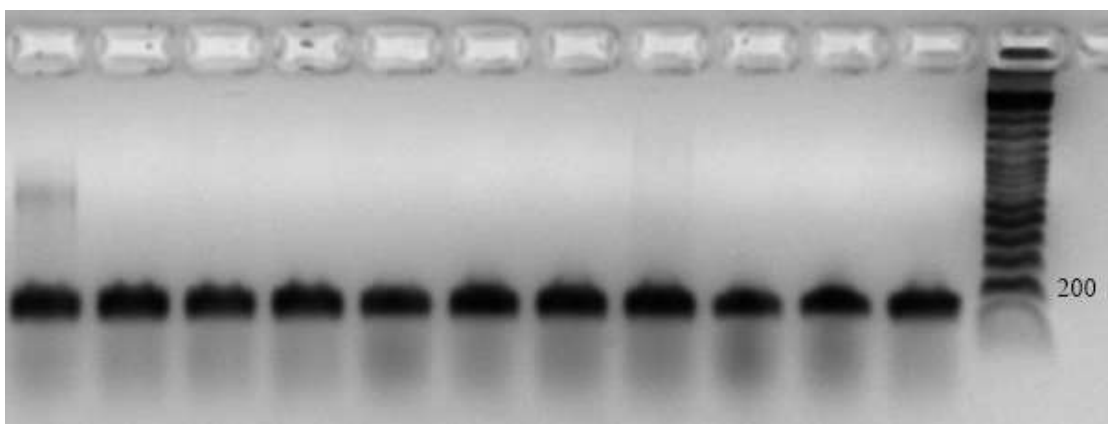


Figura 7 - Gel de agarose (2%) da PCR da expressão de *rpL32* para verificação da qualidade do cDNA de operárias de *Apis mellifera*.

Tabela 6 – Eficiência de amplificação e coeficiente de correlação (R^2) dos seis primers usados nas análises de PCR em tempo real.

Primer	R^2	Eficiência
<i>def</i>	0,98	108,00%
<i>lys</i>	0,99	108,00%
<i>mvl</i>	0,99	109,00%
<i>aba</i>	0,99	98,84%
<i>hym</i>	0,99	108,73%
<i>rpL32</i>	0,99	103,54%

A expressão relativa do gene para proteína cuticular CPR14 foi semelhante entre nutridoras ($0,44 \pm 0,24$) e campeiras ($0,32 \pm 0,14$) com idades diferentes ($t = 0,42$; $P = 0,72$; $n = 4$ operárias), e entre nutridoras ($0,88 \pm 0,07$) e guardas ($0,92 \pm 0,04$) com idades semelhantes ($t = 0,53$; $P = 0,62$; $n = 8$ operárias) (**Figura 8**).

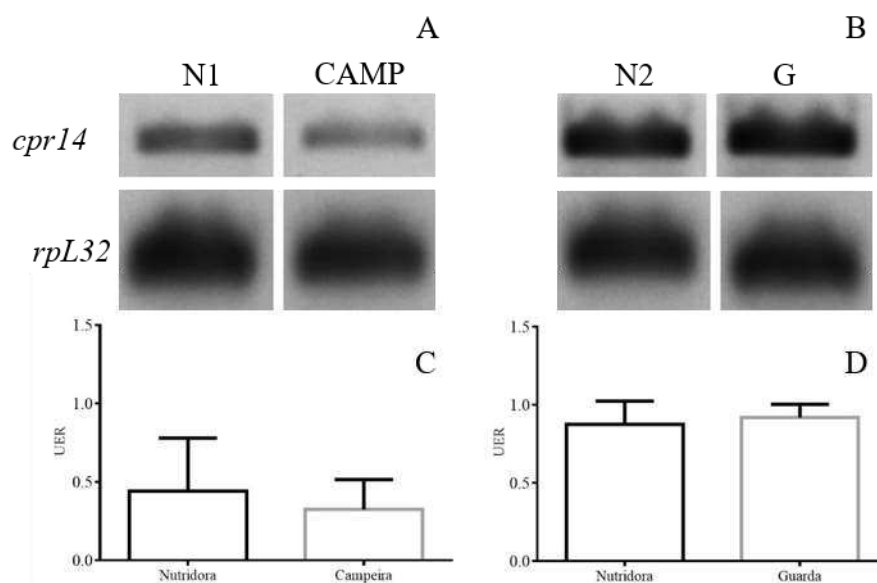


Figura 8 - Análise da expressão do gene *cpr14* em operárias de *Apis mellifera*. **(A)**: Gel de agarose da expressão por PCR semiquantitativa em nutridoras (N1) e campeiras (CAMP) com diferentes idades. **(B)**: Gel de agarose da expressão por PCR semiquantitativa de nutridoras (N2) e guardas (G) com idades semelhantes. **(C)**: Unidade de Expressão Relativa (UER) em nutridoras e campeiras com mesma idade. **(D)**: Unidade de Expressão Relativa (UER) em nutridoras e guardas. O gene *rpL32* foi usado como referência. Os grupos de cada etapa não diferiram entre si na expressão de *cpr14* (Teste t; $P > 0,05$).

As expressões relativas dos genes para defesa *mvl*, *lys*, *def*, *hym* e *aba* foram semelhantes (REST 2009, $P > 0,05$) em operárias nutridoras e campeiras de *A. mellifera* com idades diferentes (**Figura 9**).

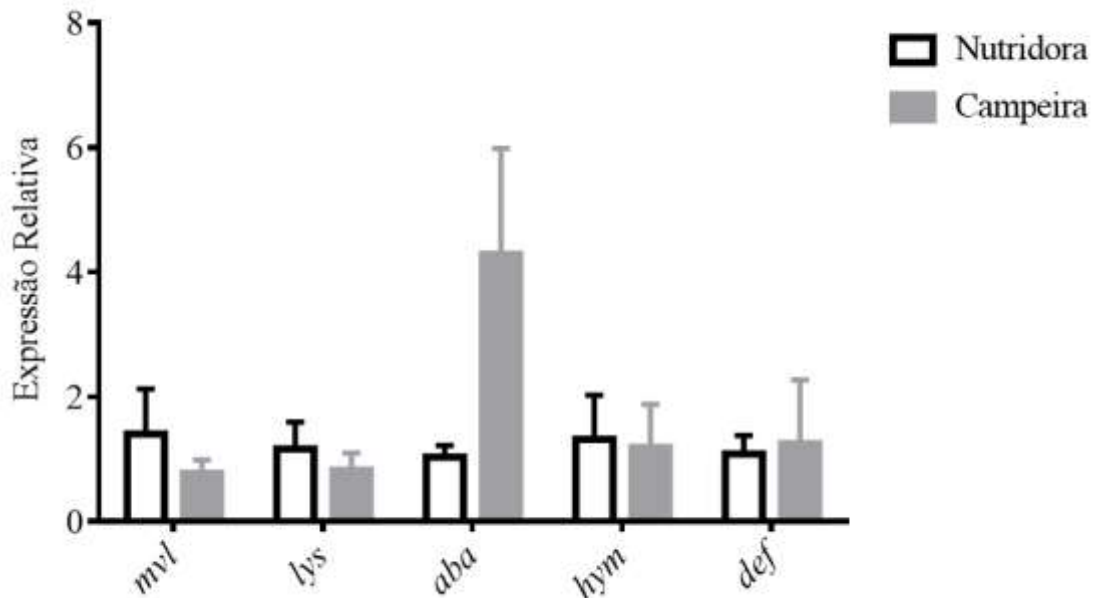


Figura 9 - Expressão relativa dos genes para *mvl*, *lys*, *aba*, *hym* e *def* em operárias nutridoras e campeiras de *Apis mellifera* com idades diferentes. Não houveram diferenças significativas (REST 2009, $P > 0,05$)

Nas operárias nutridoras e guardas com mesma idade, as expressões dos genes, *mvl*, *aba*, *hym* e *def* foram diferentes, enquanto para o gene *lys* foi semelhante. Os *mvl*, *hym* e *def* foram mais expressos nas operárias guardas enquanto o *aba* foi menos expresso nessas operárias (**Figura 10; Tabela 7**).

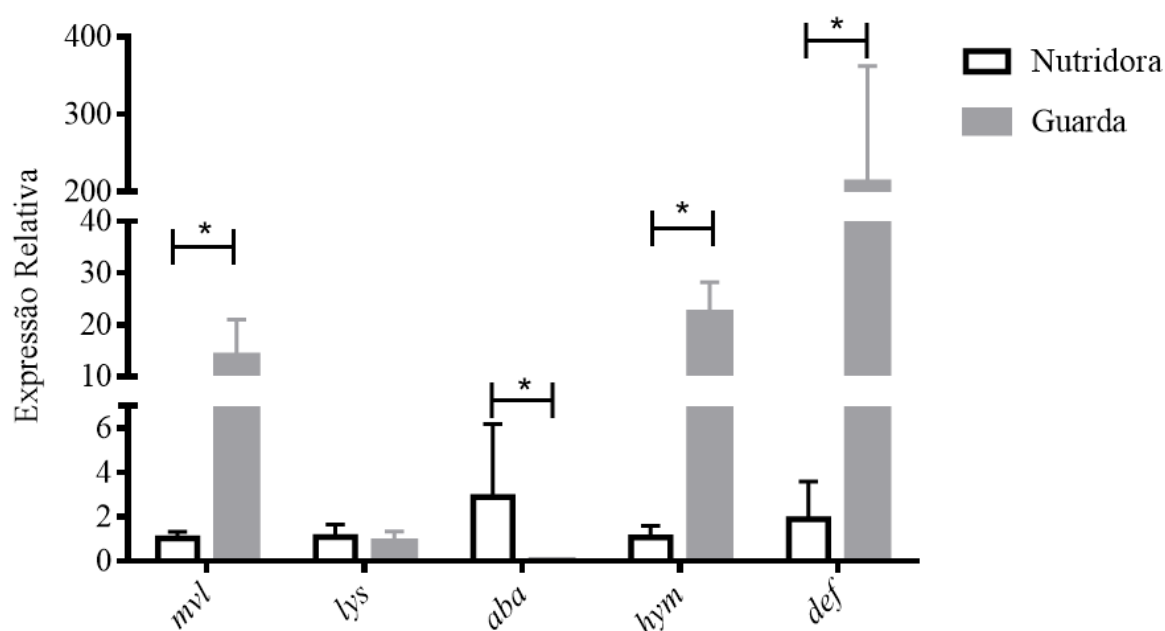


Figura 10 - Expressão relativa dos genes para *mvl*, *lys*, *aba*, *hym* e *def* em operárias nutridoras e guardas de *Apis mellifera* com mesma idade. Caixas representam média. Barras indicam erro padrão. *: diferenças significativas (REST 2009, $P < 0,05$).

Tabela 7 – Quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (média \pm se) e análise de expressão gênica relativa (REST 2009) de cinco genes em operárias nutridoras e guardas de *Apis mellifera* com idades similares.

GENE	$2^{-\Delta\Delta CT}$		REST 2009
	Nutridora	Guarda	
<i>mvl</i>	1,03 \pm 0,17 (n=3)	13,89 \pm 7,11 (n=4)	P = 0,04; Fator médio = 8,83.
<i>lys</i>	1,10 \pm 0,32 (n=3)	0,86 \pm 0,48 (n=3)	P = 0,63;
<i>def</i>	1,89 \pm 0,85 (n=4)	211,0 \pm 150,8 (n=4)	P = 0,04; Fator médio = 44,33.
<i>hym</i>	1,09 \pm 0,30 (n=3)	22,17 \pm 6,02 (n=3)	P = 0,01; Fator médio = 19,75.
<i>aba</i>	2,89 \pm 1,65 (n=4)	0,02 \pm 0,01 (n=3)	P = 0,04; Fator médio = 0,012.

4 DISCUSSÃO

A presença de esporos de *N. ceranae* nas minicolônias utilizadas, provavelmente é resultante do livre acesso das operárias à exploração dos recursos naturais nos ambientes dos apiários. *Nosema* spp. tem ocorrência natural em colônias de *A. mellifera* em todo o Brasil, mas não há dados sobre como os níveis de infecção podem impactar a viabilidade das colônias (Fries *et al.* 2013; Teixeira *et al.* 2013). O uso apenas de operárias individuais sem contaminação por *Nosema* spp. para as análises evitou que os dados obtidos sofressem influência da infecção.

Heterocronia é uma mudança evolutiva que retarda ou acelera o tempo em que ocorrem certos eventos do desenvolvimento (West-Eberhard 2005). Em abelhas corbiculadas eussociais, a heterocronia cuticular é observada no atraso dos processos de pigmentação e esclerotização da cutícula do exoesqueleto nas operárias recém-emergidas em relação ao que é observado nas campeiras, com as nutridoras apresentando menor intensidade de pigmentação e esclerotização em relação às campeiras (Elias-Neto *et al.* 2014). Isso não é observado em abelhas solitárias, que, diferente das eussociais, deixam o ninho imediatamente após emergirem como adultas e seu exoesqueleto cuticular está pronto para as condições ambientais externas (Elias-Neto *et al.* 2014). Tanto a maior quantidade de melanina na cutícula do exoesqueleto de campeiras em relação às nutridoras quanto a semelhança dessa quantidade entre nutridoras e guardas/campeiras precoces evidenciam a aquisição gradual deste pigmento no tegumento de operárias adultas de *A. mellifera* e corroboram a heterocronia na diferenciação cuticular do tegumento proposta por Elias-Neto *et al.* (2014).

Os resultados aqui obtidos também indicam que a velocidade do processo de pigmentação e esclerotização não é alterada mesmo quando as operárias passam por mudanças fisiológicas para antecipar suas atividades na colônia. Estes dados estão de acordo com as hipóteses de que a susceptibilidade da colônia à doenças pode aumentar se nutridoras

iniciarem atividades externas à colônia prematuramente, expondo-se ao ambiente externo, quando a barreira imune primária contra patógenos exercida pela cutícula ainda não está completamente desenvolvida (Wilson-Rich *et al.* 2008; Elias-Neto *et al.* 2014; Koleoglu *et al.* 2017). A velocidade desse processo pode estar associada à intrincada rede bioquímica para a produção da melanina e agentes de esclerotização e pigmentação que envolvem ativação e inativação de inúmeras enzimas, assim como várias etapas de hidroxilação, descarboxilação, oxidação e isomerização (Andersen 2010; Klowden 2013).

Hipóteses evolutivas consideram como fatores chaves para o surgimento da socialidade a combinação de características adaptativas, fortalecendo grupos recém-formados, e o surgimento de mutações, silenciando comportamentos de dispersão e aumentando a permanência no ninho dos novos indivíduos produzidos (Nowak *et al.* 2010). Neste sentido, a cutícula imatura no momento da emergência do adulto atuaria em ambas as vias através da possibilidade de modulação química de seus componentes para comunicação e impedindo dispersão dos novos indivíduos adultos produzidos devido ao exoesqueleto imaturo (Elias-Neto *et al.* 2014). A melanização, e, conseqüentemente, esclerotização maior da cutícula do tegumento de operárias campeiras em relação às nutridoras em *A. mellifera* aqui observada corrobora essa hipótese.

A imaturidade cuticular aqui observada nas operárias mais novas de *A. mellifera* não é uma desvantagem quanto à proteção uma vez que elas passam os primeiros dias dentro do ninho onde temperatura e umidade são controladas e há mecanismos comportamentais de proteção contra doenças (Michener 1974; Human *et al.* 2006; Rolff & Reynolds 2009; Elias-Neto *et al.* 2014). A complexidade estrutural necessária para as intensas atividades de forrageio são alcançadas na segunda metade da vida adulta onde aumentam os riscos de exposição a patógenos (Wilson-Rich *et al.* 2008; 2009; Elias-Neto *et al.* 2014; Koleoglu *et al.* 2017).

A heterocronia na maturação da cutícula em *A. mellifera* reforçada pelas quantidades de melanina encontradas neste trabalho traz mais detalhes sobre o as defesas imunológicas dessas abelhas. *Apis mellifera*, as abelhas primitivamente eussociais *Bombus terrestris* Linnaeus e *Bombus impatiens* Cresson (Hymenoptera, Apidae) e as abelha solitária *Megachile rotundata* Fabricius (Hymenoptera: Megachilidae) possuem um similar repertório de genes imunes composto por apenas um terço daquele de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) e *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) (Evans *et al.* 2006; Barribeau *et al.* 2015; Sadd *et al.* 2015). Isso pode indicar que em vez da socialidade reduzir a necessidade de genes imunes, a complexidade imune reduzida teria surgido primeiro e facilitado ou fortalecida a evolução dos grupos sociais como forma de permitir defesas sociais (Barribeau *et al.* 2015). Dessa forma as abelhas sociais, utilizam mais estratégias comportamentais de defesa em relação aos patógenos do que estratégias fisiológicas. Essa estratégia de uso da imunidade social (limpeza, hábitos higiênicos do ninho, remoção de larvas infectadas e uso de compostos antimicrobianos nos materiais de construção do ninho) e refletida na maior quantidade de funções cerebrais com quatro vezes mais neurônios que *D. melanogaster* (Fefferman *et al.* 2007; Rolff & Reynolds 2009; Sadd *et al.* 2015).

Quantidades semelhantes de quitina na matriz peritrófica de operárias nutridoras e campeiras com idades diferentes, assim como de nutridoras e guardas/campeiras precoces com idades semelhantes de *A. mellifera*, indicam que a resposta imune primária exercida pela matriz peritrófica contra patógenos não difere entre as fases da vida adulta das operárias. Apesar de sofrerem diferentes pressões por patógenos, como no caso de *Nosema* spp. que não estão presentes em operárias recém-emergidas, a matriz peritrófica está sob outras pressões seletivas relacionadas às outras funções exercidas por ela. Isso é diferente do observado em Lepidoptera, pois a concentração de quitina na matriz peritrófica aumenta em resposta à exposição aos riscos de infecção como mecanismo de defesa (Silva *et al.* 2016a).

O maior investimento na barreira primária exercida pelo trato digestivo em nutridoras em relação a campeiras, dado este observado em trabalhos anteriores analisando expressão gênica de peritrofinas e quitina (Seehuus *et al.* 2013), não foi reforçado pelos dados de quantificação de quitina na matriz peritrófica aqui obtidos. O sistema digestivo de nutridoras tenderia a manter a matriz peritrófica mais resistente em relação as campeiras como resultado da pressão da conversão de proteínas e gorduras em geleia real, e também, da ingestão de substâncias contaminadas durante o reconhecimento e limpeza da colônia pelas nutridoras (Seehuus *et al.* 2013). Por outro lado, em *A. mellifera* e em *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) a permeabilidade da matriz peritrófica é semelhante em operárias nutridoras e campeiras (Oliveira *et al.* 2019). No entanto, a não diferença na quantidade de quitina na matriz peritrófica entre os grupos aqui estudados indica que essa maior expressão de quitina encontrada em outro estudo pode estar associada a processos de estruturação das cutículas que revestem os intestinos anterior e posterior.

As expressões de *cpr14* foram similares entre nutridoras e campeiras com idades diferentes e entre nutridoras e guardas precoces com idades similares. Essa proteína é abundante durante e após o escurecimento e a esclerotização da cutícula indicando que ela é necessária para a diferenciação e manutenção da mesma em operárias adultas de *A. mellifera* (Soares *et al.* 2007). Os resultados aqui obtidos indicam que essa função é igualmente exercida em operárias adultas com diferentes idades ou funções na colônia.

A expressão de *mvl* é semelhante entre nutridoras e campeiras com idades diferentes, mas é oito vezes maior nas guardas precoces que nas nutridoras da mesma idade. Esse segundo resultado, pode estar relacionado ao início das atividades de forrageio (Orgad *et al.* 1998; Ben-Shahar *et al.* 2004; Seehuus *et al.* 2013; Natsopoulou *et al.* 2016; Doublet *et al.* 2017). Neste caso, o aumento da expressão desse gene acelera a alteração comportamental e a atividade de forrageio nas operárias da minicolônia montada apenas com operárias recém-

nascidas. Essa aceleração já havia sido observada em operárias com *Varroa* como uma resposta adaptativa contra a transmissão de patógenos dentro colônia (Alaux *et al.* 2011; Natsopoulou *et al.* 2016; Zanni *et al.* 2017).

As expressões dos genes *aba*, *hym* e *def* para peptídeos antimicrobianos, foram semelhantes entre nutridoras e campeiras com idades diferentes, embora maior expressão de peptídeos antimicrobianos ocorra nas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de campeiras que em nutridoras (Vanette *et al.* 2015). Possíveis diferenças de expressão entre as operárias aqui analisadas podem não ter sido detectadas porque as análises foram realizadas com o abdômen completo das operárias e não em um órgão específico. Os resultados não corroboram estudos anteriores de que a senescência em operárias *Apis* reduz expressões desses peptídeos em campeiras (Bedick *et al.* 2001; Wilson-Rich *et al.* 2008; Laughton *et al.* 2011; Hystad *et a.* 2017).

Nas operárias desempenhando diferentes funções com a mesma idade, as expressões de três genes para peptídeos antimicrobianos foram diferentes. Enquanto nas operárias guardas precoces os *hym* e *def* foram, respectivamente, 19 e 44 vezes mais expressos do que em nutridoras, *aba* teve sua expressão diminuída em 0,012 vezes. Enquanto HYM e DEF são peptídeos antimicrobianos de ações gerais que agem contra uma maior diversidade de microrganismos invasores, ABA é considerado de ação específica contra algumas bactérias (Casteels *et al.* 1990; Bulet & Stocklin 2005; Doublet *et al.* 2017). Essas mudanças de expressões que ocorrem entre operárias de idades diferentes e similares desempenhando diferentes tarefas na colônia, indicam que, quando o efeito da idade sobre as expressões desses genes é anulado e as operárias começam a modificar sua fisiologia e comportamento para assumir atividades precocemente, há um maior investimento na produção de substâncias efetoras de ação geral contra microrganismos, talvez para aumentar a resistência às pressões das condições ambientais externas ao ambiente protegido da colônia.

O gene para lisozima tem expressões semelhantes entre os grupos de operárias em todas as etapas experimentais. Isso pode ser devido ao fato que essa enzima é caracterizada como constitutivamente presente em baixos níveis na hemolinfa de insetos (Evans *et al.* 2006). Entretanto, diferenças na expressão dessa enzima foram reportadas em diferentes órgãos (Vanette *et al.* 2015) e em operárias infectadas por vírus e *N. ceranae* (Yang & Cox-Foster 2005; Aufauvre *et al.* 2014).

A quantificação de melanina na cutícula tegumentar de operárias adultas de *A. mellifera* indicam que as operárias em diferentes idades e execução de tarefas na colônia podem apresentar diferenças ontogenéticas na constituição dessa barreira primária. Como a complexidade estrutural da cutícula do tegumento, necessária para as intensas atividades de forrageio, é alcançada apenas em operárias mais velhas, as colônias ficam mais vulneráveis quando operárias nutridoras assumem precocemente atividades de campeiras. A expressão diferenciada do gene *mvl* acelerando o processo de mudança de função, assim como a maior expressão de *hym* e *def* nas operárias assumindo precocemente funções mais externas, evidencia maior investimento em mecanismos de defesa secundária quando a defesa primária exercida pela cutícula ainda não está completamente desenvolvida.

No geral, este estudo mostra que as operárias de *A. mellifera* regulam as respostas secundárias de defesa de modo diferente, quando as defesas primárias não estão completamente desenvolvidas e a operária estiver exposta ao ambiente externo não protegido da colônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaux, C.; Dantec, C.; Parrinello, H.; Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC genomics*, 12,496.
- Amdam, G. V.; Aase, A. L. T.; Seehuus, S. C.; Fondrk, M. K.; Norberg, K.; Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.*, 40(12), 939-947.
- Andersen, S. O. (2010) Insect cuticular sclerotization: a review. *Ins. Biochem. Mol. Biol.*, 40, 166–178.
- Aufauvre, J.; Misme-Aucouturier, B.; Viguès, B.; Texier, C.; Delbac, F.; Blot, N. (2014) Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One*, 9, e91686.
- Bacandritsos, N.; Granato, A.; Budge, G.; Papanastasiou, I.; Roinioti, E.; Caldon, M.; Falcaro, C.; Gallina, A.; Mutinelli, F. (2010) Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.*, 105, 335-340.
- Badaoui B.; Fougeroux A.; Petit F.; Anselmo A; Gorni C.; Cucurachi M.; *et al.* (2017) RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 12(3): e0173438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173438>.
- Bancroft, J. D.; Gamble, M. (2008) Theory and practice of histological techniques. 6th ed. Editora: Elsevier Health Sciences, Philadelphia.
- Barnes, A. I.; Siva-Jothy, M. T. (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. Biol. Sci.*, 267, 177–182.
- Barribeau, S. M.; Sadd, B. M.; du Plessis, L.; Brown, M. J.; Buechel, S. D.; Cappelle, K.; *et al.* (2015). A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biol.*, 16(1), 83.
- Barribeau, S. M.; Sadd, B. M.; du Plessis, L.; Schmid-Hempel, P. (2014). Gene expression differences underlying genotype-by-genotype specificity in a host–parasite system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(9), 3496-3501.
- Bedick, J. C.; Tunaz, H.; Aliza, A. N.; 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. *Comp. Biochem. Phys. C: Toxicol. Pharmacol.*, 130(1), 107-117.
- Ben-Shahar, Y.; Dudek, N. L.; Robinson, G. E. (2004) Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.*, 207, 3281-3288.

- Breed, M. D.; Guzmán-Novoa, E.; Hunt, G. J. (2004). Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annu. Rev. Ent.*, 49, 271-298.
- Budge, G. E.; Pietravalle, S.; Brown, M.; Laurenson, L.; Jones, B.; Tomkies, V.; Delaplane, K. S. (2015) Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PLoS One*, 10, e0133228.
- Bulet, P.; Stocklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.*, 12, 3-11.
- Byhrø, E. M. H.; Salmela, H.; Vitlic, A.; Wang, Y.; Münch, D.; Amdam, G. V. (2019). Different activation of immune-related genes in honey bee nurses and foragers (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 50(4), 463-471.
- Casteels, P.; Ampe, C.; Jacobs, F.; Tempst, P. (1993) Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, 268, 7044–7054.
- Casteels, P.; Ampe, C.; Riviere, L.; Van Damme, J.; Elicone, C.; Fleming, M.; Jacobs, F.; Tempst, P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, 187, 381–386.
- Casteels-Jonsson, K.; Zhang, W.; Capaci, T.; Casteels, P.; Tempst, P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire posttranslational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.*, 269, 28569–28575.
- Daffre, S.; Klysten, P.; Samakovlis, C.; Hultmark, D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 152–162.
- Derksen, A. C. G.; Granados, R. R. (1988) Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 167, 242–250.
- Doublet, V. *et al.* (2017) Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, 18, 207.
- Dubovskiy, I. M.; Whitten, M. M. A.; Kryukov, V. Y.; Yaroslavtseva, O. N.; Grizanov, E. V.; Greig, C.; Mukherjee, K.; Vilcinskis, A.; Mitkovets, P. V.; Glupov, V. V.; Butt, T. M. (2013) More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc Biol. Sci.*, 280, 2013058.
- Elias-Neto, M.; Nascimento, A. L.; Bonetti, A. M.; Nascimento, F. S.; Mateus, S.; Garófalo, C. A.; Bitondi, M. M. G. (2014) Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie*, 45, 397–408.
- Evans, J. D. (2006) Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.*, 93, 135-139.

Evans, J. D.; Aronstein, K.; Chen, Y. P.; Hetru, C.; Imler, J. 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, 645–56.

Fedorka, K. M.; Copeland, E. K.; Winterhalter, W. E. (2013a) Seasonality influences cuticle melanization and immune defense in a cricket: support for a temperature-dependent immune investment hypothesis in insects. *J. Exp. Biol.*, 216, 4005–4010.

Fedorka, K. M.; Lee, V.; Winterhalter, W. E. (2013b) Thermal environment shapes cuticle melanism and melanin-based immunity in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Evol. Ecol.*, 27, 521–531.

Fefferman, N. H.; Traniello, J. F.; Rosengaus, R. B.; Calleri, D. V. (2007) Disease prevention and resistance in social insects: modeling the survival consequences of immunity, hygienic behavior, and colony organization. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 61, 565–577.

Forsgren, E.; Fries, I. (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.*, 170, 212–217.

Freitak, D.; Heckel, D. G.; Vogel, H. (2009). Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *P. Roy. Soc. B: Biol. Sci.*, 276(1667), 2617–2624.

Fries, I.; Brodschneider, R.; Dietemann, V.; Dively, G.; Ellis, J. D.; Forsgren, E.; *et al.* (2013) Standard methods for *Nosema* research. *J. Apicult. Res.*, 52, 1–28.

Glinski Z.; Jarosz, J. (1993) Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta*, 28, 69–78.

Harwood, G.; Amdam, G.; Freitak, D. (2019). The role of vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *J. insect physiol.*, 112, 90–100.

Higes, M.; Juarranz, Á.; Dias-Almeida, J.; Lucena, S.; Botías, C.; Meana, A.; *et al.* (2013). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.*, 5, 530–536.

Hoffmann, J. A. (1995) Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.*, 7, 4–10.

Holt, H. L.; Aronstein, K. A.; Grozinger, C. M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14, 799.

Human, H.; Brodschneider, R.; Dietemann, V.; Dively, G.; Ellis, J. D.; Forsgren, E.; *et al.* (2013) Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *J. Apicult. Res.*, 52, 1–53.

Human, H.; Nicolson, S. W.; Dietemann, V. (2006) Do honeybees, *Apis mellifera scutellata*, regulate humidity in their nest? *Naturwiss.*, 93, 397–401.

- 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(9).
- Jefferson, J. M.; Dolstad, H. A.; Sivalingam, M. D.; Snow, J. W. (2013). Barrier immune effectors are maintained during transition from nurse to forager in the honey bee. *Plos one*, 8(1).
- Johnson, B. R. (2005). Limited flexibility in the temporal caste system of the honey bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 58, 219–226.
- Jollès, P.; Jollès, J. (1984) What's new in lysozyme research? *Mol. Cell Biochem.*, 63, 165–189. doi:10.1007/BF00285225.
- Khoury, D. S.; Myerscough, M. R.; Barron, A. B. (2011). A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PloS one*, 6(4).
- Klowden, M. J. (2013) *Physiological systems in insects*. Academic Press.
- Koleoglu, G.; Goodwin, P. H.; Reyes-Quintana, M.; Hamiduzzaman, M. M.; Guzman-Novoa E. (2017) Effect of *Varroa destructor*, Wounding and *Varroa* homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PLoS One*, 12, e0169669.
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in immunology*, 26(4), 186-192.
- Laughton, A. M.; Boots, M.; Siva-Jothy, M. T. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *J. insect physiol.*, 57(7), 1023-1032.
- Lavine, M. D.; Strand, M. R. (2001) Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudaletia includens*. *J. Ins. Physiol.*, 47, 965–974.
- Lemaitre, B.; Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 697-743.
- Li, W.; Evans, J. D.; Li, J.; Su, S.; Hamilton, M.; Chen, Y. (2017). Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitology research*, 116(12), 3265-3274.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- López-Urbe, M. M.; Fitzgerald, A.; Simone-Finstrom, M. (2017). Inducible versus constitutive social immunity: examining effects of colony infection on glucose oxidase and defensin-1 production in honeybees. *R. Soc. Open Sci.*, 4(5), 170224.
- 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.

- Lourenço, A. P.; Martins, J. R.; Torres, F. A. S.; Mackert, A.; Aguiar, L. R.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P. (2019). Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology. *Exp. Gerontol.*, 119, 174-183.
- Marques-Silva, S.; Serrão, J. E.; Mezêncio, J. M. S. (2005) Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. *Acta Histochem.*, 107, 23–30.
- Mello, T. R. P.; Aleixo, A. C.; Pinheiro, D. G.; Nunes, F. M. F.; Cristino, A. S.; Bitondi, M. M. G.; Barchuk, A. R.; Simões, Z. L. P. (2019) Hormonal control and target genes of ftz-fl expression in the honeybee *Apis mellifera*: a positive loop linking juvenile hormone, ftz-fl, and vitellogenin. *Insect Mol. Biol.*, 28, 145-159.
- Michener, C. D. (1969) Comparative social behavior of bees. *Annu. Rev. Ent.*, 14, 299–342.
- Michener, C. D. (1974) The social behavior of the bees. Harvard University Press, Cambridge.
- Michener, C. D. (2007) The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Moore, A. J.; Breed, M. D.; Moor, M. J. (1987) The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Anim. Behav.*, 35, 1159-1167.
- Moret, Y.; Moreau, J. (2012) The immune role of the arthropod exoskeleton. *Invert. Surviv. J.* 9, 200–206.
- Natsopoulou M. E.; McMahon D. P.; Paxton R. J. (2016) Parasites modulate within colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 70, 1019-31.
- Nazzi, F.; Brown, S. P.; Annoscia, D.; Del Piccolo, F.; Di Prisco, G.; Varricchio, P; *et al.* (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens*, 8, e1002735.
- Nowak, M. A.; Tarnita, C. E.; Wilson, E. O. (2010) The evolution of eusociality. *Nature*, 466, 1057.
- Oliveira, A. H.; Fernandes, K. M.; Gonçalves, W. G.; Zanuncio, J. C.; Serrão, J. E. (2019) A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. *Arthrop. Struct. Dev.*, 53, 100885.
- Orgad, S.; Nelson, H.; Segal, D.; Nelson, N. (1998). Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant malvolio. *J. Exp. Biol.*, 201, 115-120.
- Peters, W.; Lotka, I. (1986) Electron-microscopic localization of chitin using colloidal gold labeled with wheat-germ-agglutinin. *Histochemistry*, 84, 155–160.

- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 30, e36-e36.
- Pires, C. S. S.; Pereira, F. D. M.; Lopes, M. T. D. R.; Nocelli, R. C. F.; Malaspina, O.; Pettis, J. S.; Teixeira, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 51(5), 422-442.
- Robinson, G. E.; Page, R. E.; Strambi, C.; Strambi, A. (1989) Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. *Science*, 246, 109-112.
- Rolff, J.; Reynolds, S. (2009) *Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms*. Oxford University Press.
- Sadd, B. M.; Barribeau, S. M.; Bloch, G.; De Graaf, D. C.; Dearden, P.; Elisk, C. G.; *et al.* (2015) The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Gen. Biol.*, 16, 76.
- Sadd, B. M.; Kleinlogel, Y.; Schmid-Hempel, R.; Schmid-Hempel, P. (2005). Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology letters*, 1(4), 386-388.
- Sadd, B. M.; Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16(12), 1206-1210.
- Salmela, H.; Amdam, G. V.; Freitak, D. (2015). Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS pathogens*, 11(7).
- Seehuus, S. C.; Taylor, S.; Petersen, K.; Aamodt, R. M. (2013) Somatic maintenance resources in the honeybee worker fat body are distributed to withstand the most life-threatening challenges at each life stage. *PloS One*, 8, e69870.
- Seeley, T. D. (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11, 287–293.
- Silva, F. W. S.; Araujo, L. S.; Azevedo, D. O.; Serrão, J. E.; Elliot, S. L. (2016b) Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiol. Entomol.*, 41, 121–126.
- Silva, F. W. S.; Serrão, J. E.; Elliot, S. L. (2016a) Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. *Ecol. Entomol.*, 41, 451–458.
- Silva, F. W. S.; Viol, D. L.; Faria, S. V.; Lima, E.; Valicente, F. H.; Elliot, S. L. (2013) Two's a crowd: phenotypic adjustments and prophylaxis in *Anticarsia gemmatalis* larvae are triggered by the presence of conspecifics. *PLoS One*, 8, e61582.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*, Belo Horizonte.
- Soares, M. P.; Elias-Neto, M.; Simões, Z. L.; Bitondi, M. M. (2007) A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Ins. Biochem. Mol. Biol.*, 37, 1272-1282.

Stefanini, M.; De Martino, C.; Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173-174.

Sugumaran, M. (1991) Molecular mechanism for mammalian melanogenesis: comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.*, 293, 4–10.

Teixeira, A. D.; Marques-Araújo, S.; Zaniccio, J. C.; Serrão, J. E. (2015) Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron.*, 68, 91–97.

Teixeira, E. W.; dos Santos, L. G.; Sattler, A.; Message, D.; Alves, M. L. T. F. A.; Martins, M. F.; Grassi-Sella, M. L.; Francoy, T. M. (2013) *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 114, 250–254.

Terra, W. R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Ent.*, 35, 181–200.

Terra, W. R. (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Ins. Biochem.*, 47, 47-61.

ThermoFisher Scientific. qPCR Efficiency Calculator. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>. Acesso em: 06 de jan. de 2020.

vanEngelsdorp, D.; Evans, J. D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B. K.; Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; Underwood, R.; Tarpy, D. R.; Pettis, J. S. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One*, 4, e6481.

Vannette, R. L.; Mohamed, A.; Johnson, B. R. (2015) Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci. Rep.*, 5, 16224.

Vilcinskas, A.; Gotz, P. (1999) Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Adv. Parasitol.*, 43, 267–313.

West-Eberhard, M. J. (2005) Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 6543–6549.

Wilson, K.; Cotter, S. C.; Reeson, A. F.; Pell, J. K. (2001) Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.*, 4, 637–649.

Wilson, K.; Reeson, A. F. (1998) Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions? *Ecol. Entomol.*, 23, 100–101.

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*). *J. Ins. Physiol.*, 54, 1392–1399.

Wilson-Rich, N.; Spivak, M.; Fefferman, N. H.; Starks, P. T. (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu. Rev. Ent.*, 54, 405-423.

Yang, X.; Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 7470-7475.

Zanni, V.; Galbraith, D. A.; Annoscia, D.; Grozinger, C. M.; Nazzi, F. (2017) Transcriptional signatures of parasitization and markers of colony decline in Varroa-infested honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, doi: 10.1016/j.ibmb.2017.06.002.