

WALÉRIA CRISTINA DE ARRUDA FURTADO

**ULTRA-ESTRUTURA E TRANSCRIPTOMA DE URÓCITOS DE PUPAS DE
Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

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*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F992u
2013

Furtado, Waléria Cristina de Arruda, 1974-
Ultra-estrutura e transcriptoma de urócitos de pupas de
Melipona quadrifasciata (Hymenoptera : Meliponini) / Waléria
Cristina de Arruda Furtado. – Viçosa, MG, 2013.
viii, 48 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Melipona quadrifasciata*. 2. Abelha - Morfologia.
3. Histoquímica. 4. Abelha - Histologia. 5. Melipona. 6. Cálcio.
7. Cultura de células. 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

WALÉRIA CRISTINA DE ARRUDA FURTADO

ULTRA-ESTRUTURA E TRANSCRIPTOMA DE URÓCITOS DE PUPAS DE
Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA: MELIPONINI)

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

APROVADA: 09 de maio de 2013

Cynthia Canedo Silva

Stênio Nunes Alves

Tânia Maria Fernandes Salomão

Weyder Cristiano Santana

José Eduardo Serrão
(orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e por não me deixar desistir...

Ao Departamento de Biologia Geral e ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Serrão, pela oportunidade, atenção, compreensão e por ter acreditado no desenvolvimento deste trabalho e no meu crescimento profissional.

Aos meus conselheiros professores Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Gustavo Ferreira Martins, pela ajuda nos experimentos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por todos os ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora para qualificação, professores Adilson Ariza Zácaro, Clóvis Andrade Neves, Weyder Cristiano Santana e pesquisador Dihego de Oliveira Azevedo, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos membros da banca de defesa de tese, professoras Cynthia Canedo Silva, Tânia Maria Fernandes Salomão e professores Stênio Nunes Alves, Weyder Cristiano Santana e José Eduardo Serrão, por todos os questionamentos e sugestões que tanto contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural, por terem compartilhado seus conhecimentos e pelo auxílio tão valioso na bancada.

Ao Monteiro, nosso técnico, pela disponibilidade e ajuda na preparação de materiais indispensáveis para execução dos experimentos.

À Beth, secretária eficiente e amiga, por sua simpatia, amizade e presteza.

Ao Núcleo e Microscopia e Microanálise e a todos os funcionários e direção por terem cedido suas instalações e por toda ajuda e atenção.

Ao laboratório de Imunovirologia Molecular, em especial à Carine, Lorena, Michele e Sílvia por cederem seu tempo precioso, suas instalações e equipamentos indispensáveis à conclusão do projeto. Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, meu co-orientador, pela humildade ao compartilhar seu conhecimento... minha admiração!!!

Ao programa REUNI, e aos meus professores orientadores, Mara Garcia Tavares, João Marcos de Araújo e Denilce Meneses Lopes, pela bolsa e pela oportunidade de desenvolvimento de competências docentes.

Aos amigos conquistados na UFV, Rúdo, Dihego, Milton, Monise e Laila, por toda a ajuda, companheirismo, disponibilidade, e amizade sincera... Sempre me lembrarei de vocês!

Aos amigos conquistados ao longo da vida, Simone, Fernanda, Marcelle, Anderson, Adalberto e Fernando Madeira. Vocês fazem meus caminhos menos tortuosos e mais felizes!

Aos meus sobrinhos e afilhados João Victor, Warlei Júnio, Pedro Henrique, Lucas, Lívia, Laysa E Pedro Lucas... que vocês procurem sempre o conhecimento!

Aos meus irmãos Léia, Lane, Lei, Warley, Nessa e Wivi e aos meus cunhados Gunô, Fabrício e Júlia, valeu toda a ajuda e carinho...

Aos meus pais Sr Tentem e Dona Wilma, meu esposo Paulo e minhas filhas Júlia e Ana Luíza, por todo o sacrifício, pelo carinho, compreensão e por suportarem de maneira tão sublime minha ausência em momentos importantes de sua vida nesse período... Toda a minha gratidão!

Aos meus pais “Walter e Wilma e à família Buscapé”
Ao meu esposo Paulo
Às minhas queridas filhas Júlia e Ana Luíza
Eu dedico de todo meu coração este trabalho e este título...

BIOGRAFIA

Waléria Cristina de Arruda Furtado, filha de Walter Pires de Arruda e Wilma Pereira de Arruda, nasceu em 31 de agosto de 1974, na cidade de Ubá – Minas Gerais. Em 1995 ingressou na Universidade Federal de Viçosa e graduou-se em Tecnólogo em Laticínios em julho de 1997 e Bacharel em Tecnologia de Laticínios em março de 1999. Entre 1999 e 2001, cursou o Mestrado em Microbiologia Agrícola. Em julho de 2008 reingressou nesta mesma instituição onde iniciou o curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural sob a orientação do professor Dr. José Eduardo Serrão, concluindo o curso e defendendo a tese em 09 de maio de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
Capítulo 01. Histoquímica e Ultra-estrutura de urócitos de pupas da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i> (Hymenoptera: Meliponini).....	05
Resumo.....	05
Abstract.....	06
Introdução.....	07
Materiais e Métodos.....	09
Resultados.....	11
Discussão.....	14
Conclusão.....	17
Figuras.....	18
Referências Bibliográficas.....	26
Capítulo 02 Transcriptoma de urócitos do corpo gorduroso de pupas da abelha <i>Melipona quadrifasciata</i> (Hymenoptera: Meliponini).....	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Materiais e Métodos.....	33
Resultados e Discussão.....	36
Conclusão.....	38
Figuras.....	39
Lista de Tabelas.....	46
Referências Bibliográficas.....	44

RESUMO

FURTADO, Waléria Cristina de Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2013, **Ultra-estrutura e transcriptoma de urócitos de pupas de *Melipona quadrifasciata* (hymenoptera: meliponini)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Gustavo Ferreira Martins, Leandro Licursi de Oliveira e José Cola Zanuncio.

O corpo gorduroso das abelhas adultas é constituído por trofócitos e enócitos, entretanto, em pupas de abelhas recém-emergidas alguns trofócitos são modificados em células denominadas urócitos, cuja função permanece desconhecida nas abelhas. Este trabalho avaliou a morfologia de urócitos na abelha *Melipona quadrifasciata*, bem como a possibilidade de manutenção dessas células em cultivo primário. Os urócitos de *M. quadrifasciata* são células esféricas de superfície irregular e coloração branca quando observadas ao estereomicroscópio. Podem se apresentar individualizados ou em grupos associados a traqueias. Os urócitos apresentaram um único núcleo, pequeno, esférico e centralizado. O presente trabalho revelou no citosol dos urócitos polissacarídeos neutros, gotas lipídicas, vesículas de proteínas, cálcio e vesículas contendo grânulos de urato. Isto sugere que eles funcionem como células excretoras em pupas da abelha. As células de urato do corpo gorduroso da abelha *M. quadrifasciata* foram purificadas e tiveram seu RNA extraído para construção da biblioteca de cDNA. Foi realizada a PCR dos fragmentos de cDNA e esses foram fracionados em coluna para separação de fragmentos maiores que 200 pb. Seguiu-se o protocolo de ligação dos fragmentos >200pb ao vetor pTZ57R/T e posterior clonagem. O DNA plasmidial foi extraído dos clones e enviado para sequenciamento automático. As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o BLASTn e BLASTx do NCBI. A maior parte das sequências obtidas não encontrou homologia com os dados disponíveis para abelhas, bem como para outros organismos, não resultando em descobertas significativas para o desenvolvimento de conhecimentos sobre os transcritos obtidos para as células de urato neste trabalho.

ABSTRACT

FURTADO, Waléria Cristina de Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, may, 2013, **Ultrastructure and transcriptome of pupal urocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini)**. Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisor: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, Gustavo Ferreira Martins, Leandro Licursi de Oliveira and José Cola Zanuncio.

The fat body of adult bees consists of different cell types as trophocytes and oenocytes, however, in young pupae some trophocytes are modified in cells called urocytes whose function remains unknown in bees. This study evaluated the morphology, transcriptome and the viability to maintain primary culture of urocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. The urocytes of *M. quadrifasciata* are spherical cells with an irregular surface and white color when observed under the stereomicroscope. May present individually or in groups associated with tracheae. The urocytes had a single core, small, spherical and centered. This work revealed the cytosol of urocytes neutral polysaccharides, lipid droplets, vesicles protein, calcium and urate granules containing vesicles. This suggests that they function as excretory cells in bee pupae. The cells of the fat body urate bee *M. quadrifasciata* were purified and their RNA were extracted for cDNA library construction. We performed PCR of cDNA fragments and these were fractionated on a column for separation of fragments larger than 200 bp. This was followed by the protocol binding fragments > 200bp to the vector pTZ57R / T and subsequent cloning. Plasmid DNA was extracted from clones and sent to automated sequencing. The sequences obtained were analyzed using the BLASTn and BLASTx of the NCBI. Most sequences obtained did not find homology with the data available for bees, as well as to other organisms, resulting in no significant findings for the development of knowledge about the transcripts obtained for urocytes in this work

INTRODUÇÃO GERAL

A principal função das abelhas na natureza é a polinização de plantas nativas e cultivadas, sendo responsáveis por cerca de 80% da produção agrícola de sementes e frutas, portanto, são indispensáveis para a manutenção da biodiversidade (KERR, 1996; WIESE, 2005).

Apinae possui o maior número de espécies sociais, tendo representantes em todo o mundo, destacando-se por sua grande diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais. Esta subfamília subdivide-se em quatro tribos: Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (MICHENER, 2000), sendo que a tribo Meliponini agrupa as abelhas sociais sem ferrão, distribuídas na região neotropical desde o norte da Argentina, passando pelo Paraguai ao nordeste do Brasil (MOURE et al., 2008).

A espécie Neotropical de abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata* dividi-se em duas subespécies: *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*. A principal diferença entre elas são as listras amarelas metassomais que são contínuas em *M. quadrifasciata quadrifasciata* e descontínuas em *M. quadrifasciata anthidioides*. A subespécie *M. quadrifasciata quadrifasciata* está distribuída da porção sul desde a Argentina, Paraguai, região sudeste do Rio Grande do Sul ao Sul do Estado de São Paulo. No Brasil, a subespécie *M. quadrifasciata anthidioides*, adaptada a regiões de temperaturas mais elevadas, distribui-se mais ao norte como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Goiás (BATALHA - FILHO et al., 2009; BATALHA - FILHO et al., 2010).

Em virtude da dependência dos recursos florais para extração de pólen e néctar, as abelhas apresentam muitas adaptações à localização e coleta desses recursos, características que as tornam eficientes polinizadoras. A atividade de polinização faz com que as abelhas desempenhem um importante papel na manutenção da diversidade das plantas que, por sua vez, é fundamental na conservação dos ecossistemas (SILVA e PAZ, 2012). As abelhas nativas são importantes polinizadoras, no entanto, perdas de habitat, invasões de espécies exóticas e transformações climáticas parecem ser a causa da diminuição dessas populações (GIANNINI et al., 2012).

As abelhas são insetos holometábolos, isto é, passam por uma fase larval logo após a eclosão do ovo, que é seguida por uma metamorfose, onde ocorrem as mudanças que as transformarão nos insetos adultos (CRUZ - LANDIM, 2008). A fase larval nesse tipo de inseto é uma fase de alimentação intensiva, e os nutrientes obtidos são utilizados para o crescimento, o desenvolvimento da massa corporal e também se acumulam em tecidos de reserva para serem utilizados durante a metamorfose (CHAMPMAN, 1998).

O corpo gorduroso dos insetos é representado por uma massa celular de origem mesodérmica que preenche os espaços existentes entre órgãos na cavidade celomática destes, estando suspenso pela membrana basal, músculos e traqueias. Este é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos, sendo responsável pela síntese e pelo fornecimento da maioria dos componentes da hemolinfa (CHAPMAN, 1998). Em princípio o corpo gorduroso, além de participar do metabolismo intermediário, é o local de armazenamento de reservas como lipídeos, carboidratos e proteínas, que são metabolizados durante a metamorfose, o voo e a reprodução (SNODGRASS, 1935; ROSSEL e WHEELER, 1995; MARTINS et al., 2011; PASCINI et al., 2011).

Geralmente, o corpo gorduroso dos insetos holometábolos é subdividido em parietal ou periférico e perivisceral. A porção parietal é formada por uma massa celular localizada imediatamente abaixo da epiderme, enquanto, a porção perivisceral é formada por uma massa celular que se dispõe em torno dos sistemas digestivo e reprodutor (CHAPMAN, 1998; MARTINS et al., 2011).

O corpo gorduroso é constituído por um conjunto de células que se dispõem em camadas e/ou lóbulos, sendo os tipos celulares mais comuns os trofócitos, os micetócitos, os urócitos e os enócitos, embora este último tipo seja de origem ectodérmica e em muitos insetos não esteja embebido no corpo gorduroso (CHAPMAN, 1998; GULLAN e CRANSTON, 2005).

O corpo gorduroso das abelhas adultas é quase que essencialmente constituído por trofócitos e enócitos (PAES DE OLIVEIRA e CRUZ-LANDIM, 2006), enquanto nas abelhas recém-emergidas são encontrados trofócitos, enócitos e urócitos, estes últimos também denominados trofócitos modificados (PAES DE OLIVEIRA e CRUZ-LANDIM, 2003; DEAN et al., 1985).

Os trofócitos são células de origem mesodérmica e possuem o citoplasma rico em lipídeos, proteínas e glicogênio que fornecem nutrientes e energia usados

principalmente para a locomoção e reprodução (ARRESE & SOULAGES, 2010; MARTINS et al., 2011).

Grânulos de urato foram observados em *Calpodes ethlius* (Lepidoptera) (LOCKE, 1984; DEAN et al., 1985). A origem destes grânulos é principalmente a partir da degradação de proteínas absorvidas da hemolinfa ou do metabolismo dos ácidos nucleicos, resultantes da autofagia do retículo endoplasmático após uma intensa fase de síntese protéica.

Segundo CRUZ -LANDIM (2008), em *M. quadrifasciata anthidioides*, os urócitos começam a se formar quando se inicia o acúmulo de uratos em alguns trofócitos nos últimos estágios larvais e, portanto, funcionam como células excretoras.

Existem duas hipóteses em relação à função realizada pelas células de urato. Uma delas sugere que eles são substitutos dos túbulos de Malpighi durante a metamorfose quando os túbulos das larvas são reabsorvidos e os do animal adulto ainda estão em processo de formação e, portanto, não se abrem para o intestino. Isto acontece principalmente em larvas de himenópteros Apocrita e lepidópteros. Na segunda hipótese, as células de urato armazenam grânulos de urato que são produzidos no interior das células do corpo gorduroso pelo metabolismo das inclusões proteicas resultantes da atividade dos trofócitos, sendo que os urócitos absorvem esses produtos da hemolinfa e acumulam no citoplasma até que possam ser excretados pelos túbulos de Malpighi reduzindo, assim, a concentração de produtos tóxicos na hemolinfa (SNODGRASS, 1935). Nas abelhas a maior incidência de células de urato é verificada no final da fase larval para o início da vida adulta (CRUZ-LANDIM, 2000).

Culturas de células de insetos são amplamente utilizadas na biotecnologia para a síntese de proteínas recombinantes, pesticidas virais e vacinas, bem como, em pesquisa básica em genética, biologia molecular, bioquímica, endocrinologia e virologia. O corpo gorduroso é o principal órgão metabólico dos insetos e o principal local de ativação transcricional e de síntese de moléculas efetoras, tais como peptídeos antimicrobianos (AMPs), que são peças-chave na resposta imune contra várias bactérias e fungos (TZOU et al., 2002)

O presente trabalho pretende desenvolver estratégias para a coleta e manutenção de urócitos do CG de *M. quadrifasciata anthidioides in vitro*, bem como, descrever a morfologia e o transcriptoma, e dessa forma contribuir para o entendimento

das funções que os urócitos desempenham dentro do corpo gorduroso da abelha em sua fase pupal.

CAPÍTULO 1

Histoquímica e Ultra-estrutura de urócitos de pupas da abelha *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini)

Waléria C.A. Furtado, Dihego O. Azevedo, Gustavo F. Martins, José Eduardo Serrão.

RESUMO: O corpo gorduroso (CG) das abelhas adultas é constituído por trofócitos e enócitos, entretanto, em pupas alguns trofócitos são modificados em células denominadas urócitos, cuja função permanece desconhecida nas abelhas. Este trabalho avaliou a morfologia de urócitos da abelha *Melipona quadrifasciata*, bem como a possibilidade de manutenção dessas células em cultivo primário. Os urócitos ou células de urato, de *M. quadrifasciata* são células esféricas de superfície irregular e coloração branca quando observadas ao estereomicroscópio, Podendo se apresentar individualizados ou em grupos associados a traqueias. Os urócitos avaliados apresentaram um único núcleo, pequeno, esférico e centralizado. Os resultados revelaram no citosol dos urócitos polissacarídeos neutros, gotas lipídicas, vesículas de proteínas, cálcio e vesículas contendo grânulos de urato, o que sugere que eles podem funcionar como células excretoras em pupas de *M. quadrifasciata*. Após 24 horas de cultivo dos urócitos já era observada a adesão dos mesmos à lamínula com base na presença de lamelipódeos. Os urócitos mantidos em cultivo primário por 24 a 72h apresentaram, o nucleoplasma elétron transparente, com a cromatina restrita a poucos nódulos condensados próximos ao envoltório nuclear e o citoplasma rico em vesículas com diferentes eletrondensidades e em figuras mielínicas. Os resultados obtidos sugerem que os urócitos têm função no estoque de carboidratos, lipídeos e cálcio em pupas de *M. quadrifasciata* e que estas células podem ser mantidas em cultura por até 72h.

CAPÍTULO 1

Histochemistry and ultrastructure of urocytes pupae bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini)

Waléria C.A. Furtado, Dihego O. Azevedo, Gustavo F. Martins, José Eduardo Serrão

ABSTRACT: The main cell types of the adult bees fat body are trophocytes and oenocytes; however, in pupae of some newly emerged bees, trophocytes are modified into cells called urocytes, which has unknown functions. This study evaluated the morphology of urocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* as well as evaluated the possibility of maintaining these cells in primary culture. The urocytes *M. quadrifasciata* are white spherical cells with irregular surface as observed under stereomicroscope. They may be found individually or in groups associated with tracheae. The urocytes have a single, small and spherical nucleus. The urocytes cytoplasm is rich in neutral polysaccharides, lipid droplets, protein, and granules containing calcium and urate salts. Our findings suggest that urocytes play a role in storage of neutral polysaccharides and calcium in *M. quadrifasciata* pupae and that these cells can be cultured for 72 h.

1- Introdução

As abelhas são parte integrante do ecossistema da região em que vivem e sua principal função na natureza é a polinização de plantas nativas e cultivadas, sendo também responsáveis por cerca de 80% da produção agrícola de sementes e frutas (KERR, 1996; WIESE, 2005). Em virtude da dependência dos recursos florais, as abelhas apresentam adaptações à localização e coleta desses recursos, características que as tornam eficientes polinizadoras (SILVA e PAZ, 2012). Embora as abelhas nativas sejam importantes polinizadoras, perdas de habitat, invasões de espécies exóticas e transformações climáticas parecem ser a causa da diminuição dessas populações (GIANNINI et al., 2012).

Apinae possui o maior número de espécies sociais, tendo representantes em todo o mundo, destacando-se por sua diversidade de comportamentos sociais e por suas múltiplas relações com plantas e animais. Esta subfamília é subdividida em tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (MICHENER, 2000), sendo que Meliponini agrupa as abelhas sociais sem ferrão, também distribuídas na região Neotropical (MOURE et al., 2008).

As abelhas são insetos holometábolos, isto é, passam por uma fase larval logo após a eclosão do ovo, que é seguida por uma fase de pupa, onde ocorrem as mudanças que as transformarão nos insetos adultos (CRUZ - LANDIM, 2008). A fase larval nesse tipo de inseto é uma fase de alimentação intensiva, e os nutrientes obtidos são utilizados para o crescimento e desenvolvimento da massa corporal e que também se acumulam em tecidos de reserva para serem utilizados durante a metamorfose (CHAMPMAN, 1998).

O corpo gorduroso dos insetos é caracterizado por uma massa celular de origem mesodérmica que preenche os espaços existentes entre órgãos na cavidade celomática, estando suspenso pela membrana basal, músculos e traqueias. O corpo gorduroso é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos, sendo responsável pela síntese e pelo fornecimento da maioria dos componentes da hemolinfa (CHAPMAN, 1998). Em princípio, o corpo gorduroso, além de participar do metabolismo intermediário, é o local de armazenamento de reservas como lipídeos, carboidratos e proteínas, que são metabolizados durante a metamorfose, o voo e a reprodução (SNODGRASS, 1935; ROSSEL & WHEELER, 1995; MARTINS et al., 2011; PASCINI et al., 2011).

O corpo gorduroso é constituído por um conjunto de células que se dispõem em camadas e/ou lóbulos, sendo os tipos celulares mais comuns os trofócitos, os micetócitos, os urócitos e os enócitos, embora este último tipo seja de origem ectodérmica e em muitos insetos não esteja embebido no corpo gorduroso (CHAPMAN, 1998; GULLAN & CRANSTON, 2005).

O corpo gorduroso das abelhas mais velhas é quase que essencialmente constituído por trofócitos e enócitos (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2006), enquanto nas abelhas recém-emergidas são encontrados trofócitos, enócitos e urócitos, estes últimos são trofócitos modificados (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003; DEAN et al., 1985)

Os urócitos presentes no corpo gorduroso de alguns insetos não tem sua função esclarecida, havendo duas hipóteses: i) os urócitos seriam substitutos dos túbulos de Malpighi durante a metamorfose quando os túbulos de Malpighi das larvas são reabsorvidos e os do inseto adulto ainda estão em processo de formação, como ocorre em pupas de himenópteros e lepidópteros, ii) na segunda hipótese, as células de urato armazenariam grânulos de sais de urato que seriam produzidos no interior das células do corpo gorduroso pelo metabolismo proteico, bem como, absorvidos da hemolinfa e acumulam no citoplasma até que possam ser excretados pelos túbulos de Malpighi reduzindo, assim, a concentração de produtos tóxicos na hemolinfa (SNODGRASS, 1935). Em abelhas a maior incidência de células de urato é verificada no final da fase larval para o início da vida adulta, quando os túbulos de Malpighi não são funcionais (CRUZ-LANDIM, 2000).

Em *Calpodex ethlius* (Lepidoptera) os grânulos de urato acumulados nos urócitos tem origem a partir da degradação de proteínas absorvidas da hemolinfa ou do metabolismo dos ácidos nucleicos, resultantes da autofagia do retículo endoplasmático rugoso após uma intensa fase de síntese protéica (LOCKE, 1984; DEAN et al., 1985).

Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* os urócitos começam a se formar quando tem início o acúmulo de urato em alguns trofócitos nos últimos estágios larvais indicando uma possível função excretora para estas células (CRUZ -LANDIM, 2008).

O presente trabalho descreveu a histoquímica e a ultra-estrutura de urócitos presentes no corpo gorduroso de pupas de *M. quadrifasciata*. Os dados obtidos poderão ser utilizados para a compreensão das funções dos urócitos em pupas de abelhas.

2- Materiais e Métodos

2.1- Material Biológico

Para a realização de estudos morfológicos das células do corpo gorduroso de *M. quadrifasciata* foram utilizadas pupas de olho branco e rosa, de operárias, obtidas em colônias naturais mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

2.2- Obtenção dos Urócitos

Todos os materiais utilizados nos procedimentos seguintes foram previamente esterilizados em autoclave e secos em estufa. A bancada de trabalho e o estereomicroscópio foram desinfetados com solução de álcool 70% antes do início do trabalho para redução de contaminantes.

No momento da extração dos urócitos, favos contendo pupas de operárias foram coletados e mantidos em placas de vidro em estufa a 28°C. Durante este período, as pupas eram alimentadas com mel por abelhas nutridoras até serem submetidas à dissecação.

Os urócitos apresentam coloração branca e podem ser observados a olho nu, dessa forma, foi estabelecida a seguinte estratégia de coleta: 1) As pupas foram lavadas em solução de água e detergente por 30 segundos e desinfetadas em álcool 70%. 2) A pupa foi espetada, com alfinetes entomológicos, em parafina sólida de coloração escura em meio de cultura *Larval Honey Bee* (LHB) estéril contendo antibióticos de RACHINSKY & HARTFELDER, 1998. 3) As pupas foram dissecadas em estereomicroscópio, com abertura cautelosa do abdome evitando o derramamento do corpo gorduroso total, utilizando-se ponteiras de plástico. 4) Para purificação dos urócitos, o conteúdo da ponteira foi dispensado em gotas de meio LHB limpas e depois, os urócitos foram succionados com ponteiras novas e transferidos para microtubos contendo 1,5mL de LHB. 5) Manutenção dos urócitos em 1,5 mL de meio de cultura LHB, em gelo durante a extração e até a obtenção do número desejado de células (60 a 100 urócitos/pupa). 6) lavagem dos urócitos por três vezes com LHB, seguidas curtas centrifugações (*spins*) e retirada das demais células sobrenadantes com o uso de micropipetas, até a obtenção de um precipitado contendo urócitos como o principal tipo celular. 7) Ressuspensão dos urócitos em 1,5 mL de meio LHB estéril.

2.3- Cultivo Primário de Urócitos

Dos urócitos ressuspensos em 1,5 mL de LHB, aproximadamente 30 células foram transferidas para lamínulas arredondadas e essas mantidas em placas de cultivo à temperatura ambiente por uma hora, para permitir a adesão dos urócitos à lamínula. Em seguida, as lamínulas foram mantidas em estufa a 28°C (MARTINS, 2008) e após 24, 48 e 72h os urócitos foram coletados para as análises.

2.4- Morfologia das Células do Corpo Gorduroso Total

Para a identificação dos tipos celulares que constituem o corpo gorduroso total das pupas, algumas lamínulas contendo células do corpo gorduroso total, foram cultivadas por 24 horas, depois transferidas para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI et al., 1967), lavadas com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (PBS), coradas com Giemsa e observadas ao microscópio de luz.

2.5- Histologia

Os urócitos cultivados por 24, 48 e 72 horas, em meio LHB em microtubos de 1,5 mL, foram transferidos para solução fixadora de Zamboni (STEFANINI et al., 1967). Além disso, amostras de corpo gorduroso total foram obtidas diretamente das pupas e transferidas para solução fixadora de Zamboni. Após a fixação, ambas as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%), embebidas e incluídas em Historesina[®] JB4. Secções com 2µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e fotografadas em um microscópio de luz. Lâminas contendo cerca de 10 secções cada foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: mercúrio bromofenol para evidenciação de proteínas totais (PEARSE, 1985), PAS para evidenciar polissacarídeos e glico-conjugados neutros (PEARSE, 1985), von Kossa para evidenciar sais de cálcio e Hexamina-prata para detecção de sais urato (PEARSE, 1985; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

2.6- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Urócitos em cultivo primário por 24, 48 e 72 horas, aderidos em lamínulas, foram transferidos juntamente com a lamínula para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, contendo sacarose a 2,5%, depois foram lavados no

mesmo tampão duas vezes, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% contendo ferricianeto de potássio 0,8% por uma hora. A seguir as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (70, 80, 90 e 100%), seguindo-se a secagem em ponto crítico, metalização com ouro e observação no MEV LEO VP 1430.

2.7- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Urócitos em cultivo primário por 24, 48 e 72 horas e urócitos recém-isolados, seguiram o protocolo descrito no item 2.6 para (MEV) até a etapa de desidratação, seguindo-se embebição e emblocamento em resina Spurr.

Secções ultrafinas (60-90nm) foram obtidas com navalha de diamante, colocadas em grades de cobre (300 *mesh*), contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em MET Zeiss EM 109.

2.8- Espectroscopia próton-induzida por raios X (EDXS)

Urócitos recém-isolados aderidos em lamínulas seguiram o protocolo descrito no item 2.6 para (MEV) até a etapa de secagem em ponto crítico, seguindo-se metalização com carbono e análise em micro-sonda de incidência de Raios X acoplada ao MEV LEO VP 1430.

3- Resultados

3.1- Cultivo primário de urócitos.

O cultivo das células realizado sobre lamínulas forneceu uma superfície para que as células pudessem aderir. Após 24 h após de cultivo, foi observada a adesão dos urócitos à lamínula evidenciada pela presença de lamelipódeos (Figura 1). Durante o período de cultivo das células houve perda significativa da coloração do urócito que passou de branca a leitosa transparente (dados não mostrados)

3.2- Morfologia das células do corpo gorduroso de pupas de *M. quadrifasciata*.

Os urócitos de pupas de *M. quadrifasciata anthidioides* foram caracterizados como células esféricas de superfície irregular e coloração branca quando observadas ao

estereomicroscópio (Figura 2A), podendo ser encontrados individualizados ou em grupos, associados a traqueias.

Os urócitos aderiram facilmente às superfícies como vidro e plástico durante o processo de extração e quando transferidos para microtubos contendo LHB depositaram no fundo, enquanto trofócitos e enócitos formaram uma camada leitosa transparente na superfície, facilitando a identificação dos tipos celulares. Os trofócitos apareceram como células individualizadas, esféricas e de aspecto transparente leitoso, enquanto os enócitos foram menos abundantes, menores e dispersos entre os trofócitos.

Os urócitos apresentaram um único núcleo, pequeno, esférico e centralizado, com citosol reticulado e corado fracamente em torno do núcleo (Figura 2B). Os trofócitos tiveram dimensões semelhantes às dos urócitos, porém o núcleo foi irregular e o citoplasma rico em vacúolos e inclusões que se coraram fracamente (dados não mostrados), enquanto os enócitos foram menores que os urócitos e apresentaram o citoplasma homogêneo e fortemente corado pelo Giemsa (Figuras 2C e 2D).

3.3- Histologia do corpo gorduroso de pupas de *M. quadrifasciata anthidioides*

Os urócitos mostraram-se íntegros, com núcleo único, centralizado, esférico e evidente, mostrando maior concentração de cromatina descondensada, distribuída de maneira homogênea pelo mesmo. O citosol mostrou aspecto reticulado e com acidofilia homogênea (Figura 3A).

Os trofócitos apresentaram tamanho similar ao dos urócitos, no entanto, possuíram um núcleo irregular, central, rico em cromatina condensada. No citoplasma foram observados grânulos corados pela eosina bem como vacúolos (Figura 3A).

Os enócitos foram diferenciados dos urócitos e trofócitos por apresentarem citoplasma homogeneamente acidófilo, sem presença de inclusões ou grânulos (Figura 3B).

3.4- Histoquímica das células do corpo gorduroso de pupas de *M. quadrifasciata anthidioides*

Os urócitos mantidos em cultivo primário por até 72 h e aqueles obtidos diretamente de pupas apresentaram reação fraca para proteínas totais, sendo mais evidente no núcleo e na região do nucléolo (Figura 4A). Os trofócitos apresentaram reação positiva para proteínas em grânulos citoplasmáticos, enquanto os enócitos

apresentaram reação positiva homogênea tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 4B).

Os urócitos submetidos ao teste de von Kossa para identificação de cálcio, mostraram grande quantidade de grânulos citoplasmáticos marcados positivamente (Figura 5), o que não foi observado para trofócitos e enócitos (dados não demonstrados). Nas amostras de urócitos obtidas diretamente do corpo gorduroso de pupas foram observados grânulos citoplasmáticos positivos para sais de urato (Figura 6A), os quais não foram evidenciados naqueles urócitos mantidos em cultivo primário por 24h (Figura 6B). Ressalta-se que o processo de centrifugação por spins e lavagens sucessivas dessas células no momento da purificação pode ter contribuído para perda dos sais de urato.

Os urócitos mantidos em cultivo primário apresentaram grânulos PAS-positivos no citoplasma próximo ao núcleo (Figura 7A) e na superfície da célula (Figura 7B). Os trofócitos apresentaram grânulos PAS-positivos e os enócitos não apresentaram reação positiva ao PAS (dados não mostrados).

3.5- Ultra-estrutura de urócitos de pupas de *M. quadrifasciata anthidioides*

Os urócitos apresentaram um núcleo bem desenvolvido, de aspecto lobulado, com predominância de cromatina descondensada e nucléolo evidente (Figura 8A). O citoplasma apresentou algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, em continuidade com o envoltório nuclear bem como mitocôndrias esféricas (Figura 8A). O citoplasma apresentou ainda acúmulo de grânulos delimitados por membrana com conteúdo interno apresentando diferentes aspectos (Figura 9A). Alguns grânulos citoplasmáticos apresentaram conteúdo granular eletrondenso na periferia, formando agregados (Figuras 9A e 9B). Grânulos com tamanhos variados, com conteúdos apresentando acúmulo de material uniforme na periferia com baixa eletrondensidade; grânulos com 2,5 µm de diâmetro contendo o interior totalmente preenchido por material fortemente eletrondenso, outros contendo inclusões paracristalinas, bem como acúmulo de gotas lipídicas entre os grânulos também foram observados (Figuras 9A a 9C).

A membrana plasmática mostrou acúmulo de substâncias na superfície externa similar a glicocálix (Figura 8B).

Os urócitos mantidos em cultivo primário por 24 a 72h mostraram o nucleoplasma elétron transparente, com a cromatina restrita a poucos nódulos condensados próximos ao envoltório nuclear (Figura 10A). O citoplasma mostrou-se rico em vesículas com diferentes eletrondensidades e em figuras mielínicas (Figura 10B 10C). Naqueles urócitos com 48 e 72 horas de cultivo primário, ocorreu aumento no tamanho dos nódulos de cromatina condensada na periferia do núcleo, bem como no número de figuras mielínicas no citoplasma, sendo que os grânulos, quando presentes, estavam com conteúdo elétron transparente (Figura 10C).

3.6- EDXS

A espectroscopia próton-induzida por raios X foi realizada no urócito como um todo e em regiões específicas onde foram encontradas grânulos. Nos dois casos os compostos químicos e suas quantidades foram semelhantes, sendo evidenciada a presença de sódio, cálcio, magnésio e fósforo em maiores quantidades (Tabela 1) e no espectro mostrado (Figura 11).

4- Discussão

Os urócitos de pupas de *M. quadrifasciata* apresentaram distribuição aleatória entre o corpo gorduroso sendo células esféricas de superfície irregular e coloração branca, assim como urócitos de rainhas de *Apis mellifera* (CRUZ–LANDIM, 1985), rainhas de formigas *A. disciger* e *A. laevigata* (ROMA et al., 2010) e do grilo *Troglophilus cavicolae* (Orthoptera: Rhaphidophoridae) (LIPOVSEK et al., 2011).

As análises histológicas mostram que os urócitos de pupas de *M. quadrifasciata* apresentam núcleo centralizado, esférico, bem desenvolvido e evidente, com cromatina descondensada distribuída de maneira homogênea e citoplasma de aspecto reticulado similar ao descrito para formiga *Pachycondyla villosa* (Ponerinae) (ZARA & CAETANO, 2004) e para o grilo *T. cavicola* (LIPOVSEK et al., 2011). Entretanto, as análises ultra-estruturais revelaram que o núcleo apresenta pequenos lobos, como reportado para adultos da abelha *Melipona bicolor* (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003) e pupas de *Manduca sexta* (Lepidoptera) (EHRESMANN, 1990). Núcleos lobulados indicam células com alta atividade metabólica, como ocorrem em

trofócitos (CRUZ-LANDIM, 1985) e em células nutridoras de ovários (MARTINS & SERRÃO, 2004).

A principal característica do citoplasma de urócitos de pupas de *M. quadrifasciata* é a presença de grande quantidade de grânulos delimitados por membrana com conteúdos de diferentes aspectos similar ao encontrado nos trofócitos aqui analisados, nos trofócitos de operárias e rainhas virgens de *M. bicolor* (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003), bem como em rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2006), indicando que os urócitos de pupas podem ser trofócitos modificados.

Os urócitos de pupas de *M. quadrifasciata* em cultura ou presentes em amostras de corpo gorduroso total apresentaram reação fraca para a presença de proteínas totais, sendo mais evidente no núcleo e na região do nucléolo, bem como citoplasma reticulado, indicando que os grânulos presentes no citoplasma não armazenam grandes quantidades de proteínas. Foi identificada ainda, pouca ocorrência de retículo endoplasmático rugoso nestas células. Os urócitos de rainhas de *A. mellifera* (CRUZ-LANDIM, 1985) e das formigas *P. villosa* (ZARA & CAETANO, 2004), *Cyphomyrmex rimosus* e *Atta laevigata* (ROMA et al., 2006) também apresentaram pequena quantidade de proteínas armazenadas, o que corrobora os resultados encontrados para *M. quadrifasciata* neste trabalho.

Em pupas de *M. quadrifasciata*, os urócitos apresentam carboidratos no citoplasma como evidenciado pela forte reação PAS. Resultado semelhante foi obtido para o mesmo tipo celular de *A. mellifera* (CRUZ-LANDIM, 1985), *M. parallellus* e *A. laevigata* (ROMA et al., 2006). A presença de reservas de carboidratos nos urócitos indica uma alta atividade metabólica para estas células, pois o glicogênio é a principal reserva de açúcares das células animais utilizada para obtenção de energia para os processos metabólicos das células (NELSON & COX, 2008).

Como esperado, o teste histoquímico de hexamina-prata evidenciou a presença de urato no interior do citoplasma dos urócitos. Por outro lado, o teste de histoquímico de von Kossa associado com as análises de espectrometria por emissão de raios X indica a ocorrência de cálcio no interior dos grânulos citoplasmáticos de urócitos de pupas de *M. quadrifasciata*. Íons cálcio tem importante função em diversas atividades metabólicas de células animais, pois há grande quantidade de proteínas celulares cálcio-dependentes, embora a concentração de íons cálcio livre seja baixa ($< 10^{-4}$ M) no citosol

(ALBERTS et al., 2010). A presença de cálcio no interior dos grânulos citoplasmáticos dos urócitos, sugere que estes estejam na forma de sais de urato, podendo os urócitos serem considerados como células envolvidas na reserva de cálcio. Acúmulo de grânulos contendo cálcio foram demonstrados nos trofócitos de *A. mellifera* (KUTERBACH & WALCOTT, 1986) e nos esferocristais de células do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* (CRUZ-LANDIM & SERRÃO, 1997).

Além de cálcio, os grânulos presentes nos urócitos contém fósforo, magnésio e sódio. Ca e P armazenados em grânulos no camarão *Penaeus semisulcatus* tem função no endurecimento do exoesquelero (AL-MOHANNA & NOTT, 1989) e uma função similar é sugerida para estes compostos inorgânicos presentes em larvas de besouros Cerambycidae e de *Musca domestica* para formação da cutícula das pupas (LIPOVESEK et al., 2012). Além disso, fosfato é o principal ânion intracelular com importantes reações para produção de ATP (ALBERTS et al., 2010). Da mesma forma, em pupas de *M. quadrifasciata*, as reservas de Ca e P, podem estar associadas a produção do exoesqueleto do adulto. O P que ocorre em maior quantidade que o Ca pode ser usado na produção de ATP que fornece energia para os processos celulares, especialmente durante a metamorfose que é uma fase do desenvolvimento do inseto com intenso consumo de energia.

Os íons sódio e magnésio também foram encontrados em grânulos celulares dos caramujos *Helix aspersa* e *Arion rufus* (HOWARD et al., 1981; JANSEN, 1985) porém a função destes elementos inorgânicos permanece para ser esclarecida.

Os urócitos isolados do CG das pupas, mantidos em cultivo primário por 24 a 72h, mostraram quando comparados com os urócitos não cultivados, o nucleoplasma elétron transparente, com a cromatina restrita a poucos nódulos condensados próximos ao envoltório nuclear. Nos urócitos cultivados por 72 h, observou-se aumento nos nódulos de cromatina condensada na periferia do núcleo, bem como de figuras mielínicas no citoplasma, sendo que as vesículas, quando presentes, não apresentavam conteúdo. As mudanças morfológicas observadas como aumento da condensação da cromatina e as modificações citoplasmáticas dos urócitos em cultivo em diferentes tempos, foram semelhantes às encontradas em cultivos primários de enócitos de pupas de *Aedes aegypti* (MARTINS, 2011c) e de trofócitos de *Bombyx mori* (KISHIMOTO et al., 1999). As modificações apresentadas pelos urócitos em cultivo primário sugerem possível o consumo de reservas contidas nos grânulos citoplasmáticos

em virtude de carências nutricionais do meio de cultura LHB. O meio de cultura LHB foi desenvolvido para cultura de células de *A. mellifera*, mas mesmo para esta espécie as células em culturas foram viáveis por curtos períodos de tempos (RACHINSKY & HARTFELDER, 1998). Meios de cultura utilizados para manutenção de células isoladas de tecidos dos insetos geralmente não são eficientes na manutenção das mesmas por longos períodos de tempo (EASTON & HORWATH, 1994; SADRUD-DIN et al., 1996; LYNN, 2001; HUNTER, 2010). Porém, o cultivo primário de urócitos de *M. quadrifasciata* em meio LHB foi eficiente, permitindo a obtenção de um considerável número destas células purificadas, as quais podem ser usadas para estudos que demandam alta quantidade de células específicas.

5- Conclusão

Os resultados encontrados mostram que em pupas de *M. quadrifasciata*, as células de urato estão relacionadas com mecanismos de reserva de nutrientes como cálcio e polissacarídeos. A análise ultra-estrutural de urócitos mantidos em cultura de células sugere a origem dessas células a partir de trofócitos pela similaridade entre seus componentes celulares.

FIGURAS

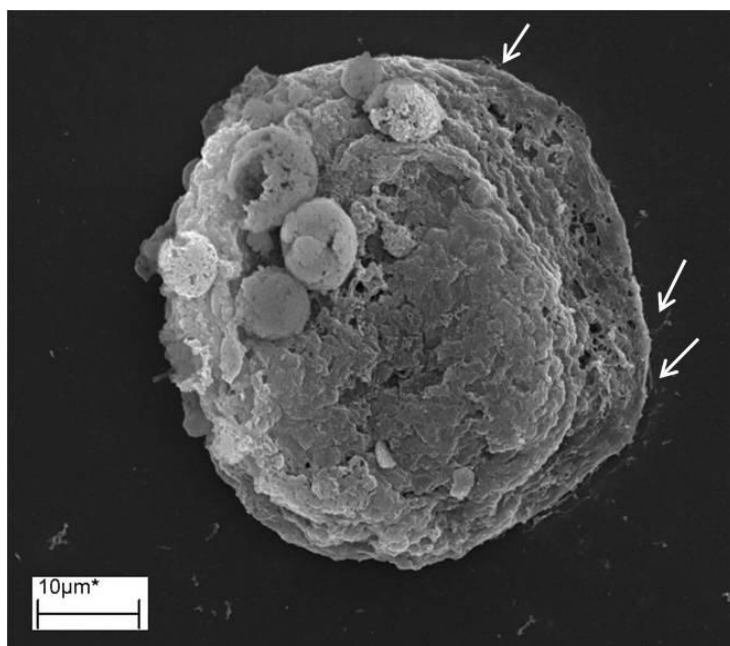


Figura 01- Eletromicrografia de varredura de Urócitos de *Melipona quadrifasciata*. Urócito em cultivo primário em meio LHB pelo período de 48 horas. Célula aderida à lamínula exibindo lamelipódeos (setas).

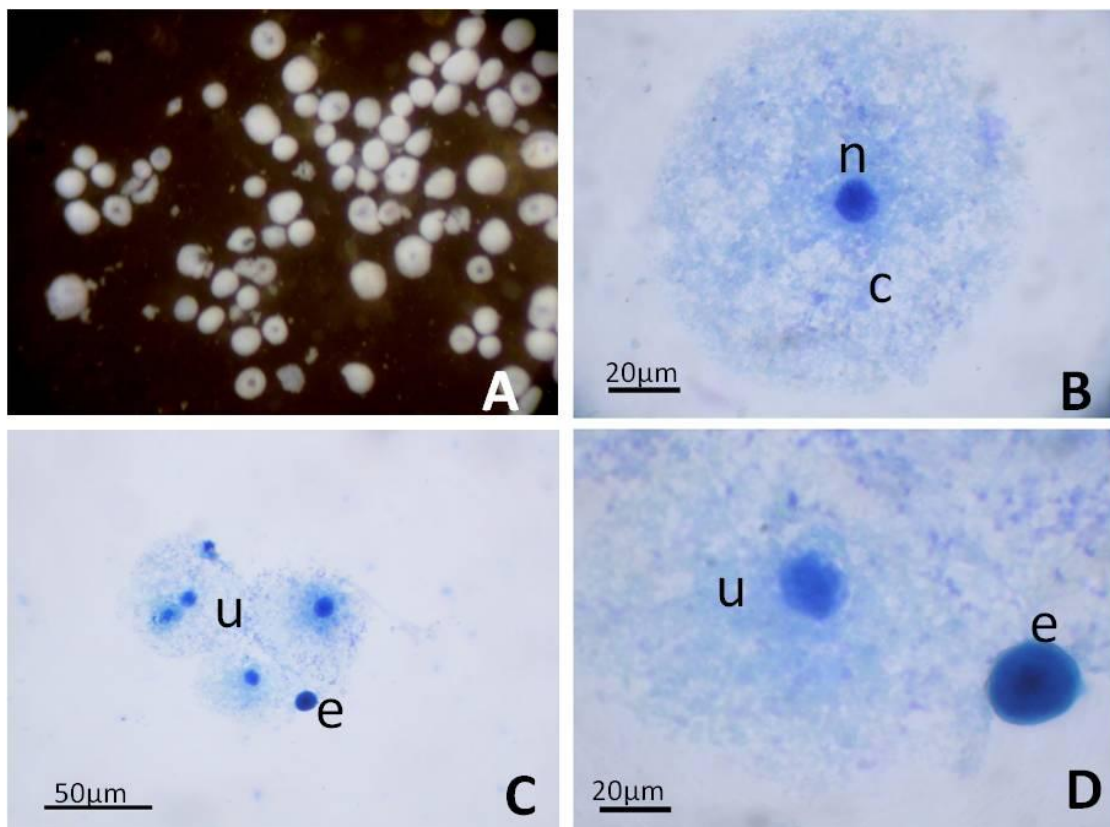


Figura 02- **A.** Urócitos recém-extraídos de pupas de *Melipona quadrifasciata*, observados ao estereomicroscópio. **B.** Urócitos de pupas, cultivados por 24h e corados com Giemsa, (n) núcleo evidente e (c) citoplasma reticulado. **C.** Visão geral dos Urócitos (u), Enócitos (e) de pupas, em cultivo por 24h e corados com Giemsa. **D.** Detalhe de **C.** Urócito (u) de pupas corados com Giemsa, Enócito (e).

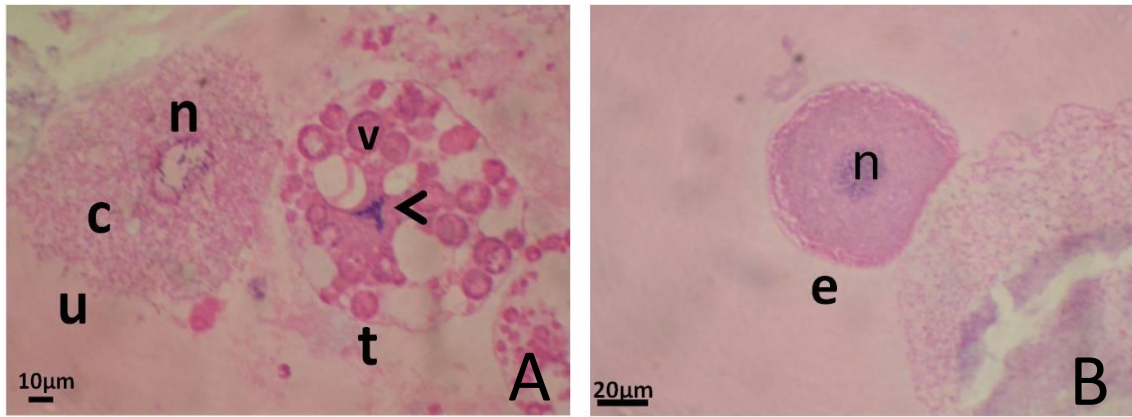


Figura 03- A. Urócito (u), Trofócito (t) de pupas de *Melipona quadrifasciata*, não cultivados, fixados e corados com Hematoxilina e Eosina. **A.** Núcleo do Urócito (n) com predomínio de cromatina descondensada, citoplasma (c) reticulado, corado uniformemente. Notar núcleo de formato irregular do Trofócito (ponta de seta) e vacúolos (v) corados pela eosina no citosol do Trofócito (t). **B.** Enócito, não cultivado, mostrando citoplasma acidófilo homogêneo e núcleo esférico (n).

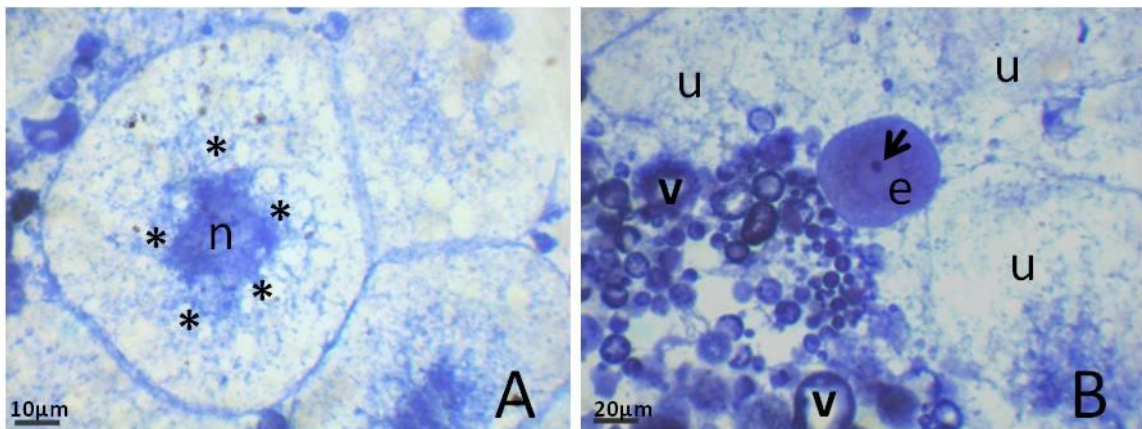


Figura 04- A. Núcleo (n) de Urócito, não cultivado, marcado positivamente pelo mercúrio bromofenol, (*) marcação positiva na região em torno do núcleo do Urócito. **B.** vacúolos (v) de Trofócitos, não cultivados, marcados positivamente pelo mercúrio bromofenol; enócito (e), não cultivado, mostrando reação positiva homogênea para proteínas básicas no citoplasma e no nucléolo (seta); urócitos (u).

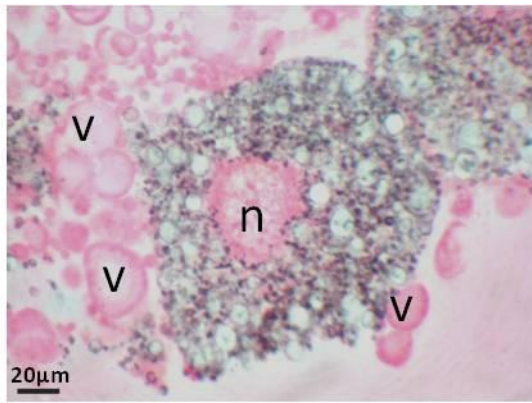


Figura 05- Núcleo (n) de Urócyto não cultivado. Vacúolos (v) de Trofócitos não cultivados. Pontos enegrecidos no citosol do Urócyto evidenciam marcação de cálcio por von Kossa.

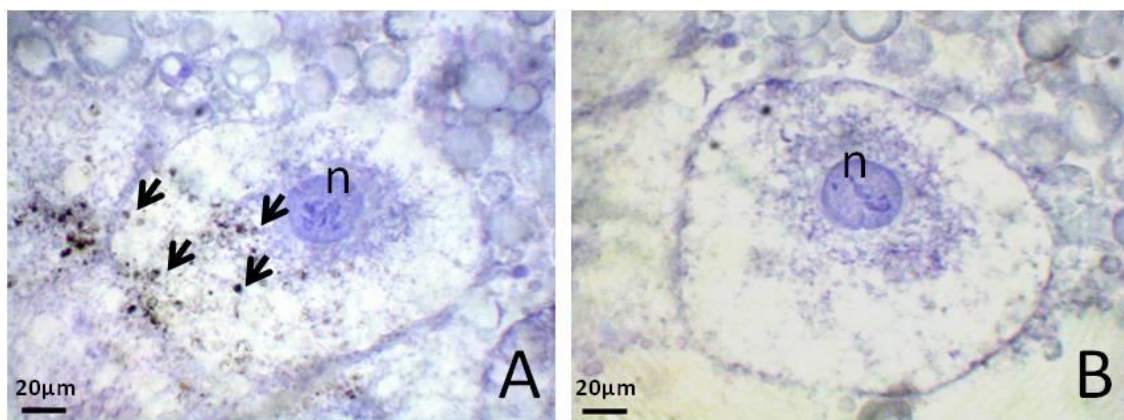


Figura 06- Núcleo (n) de Urócyto. **A.** Marcação pela Hexamima Prata (setas) evidencia grânulos de urato no citosol de Urócytos não cultivados. **B.** Ausência de grânulos de urato em Urócytos mantidas em cultivo por 24h. Núcleo (n) do Urócyto.

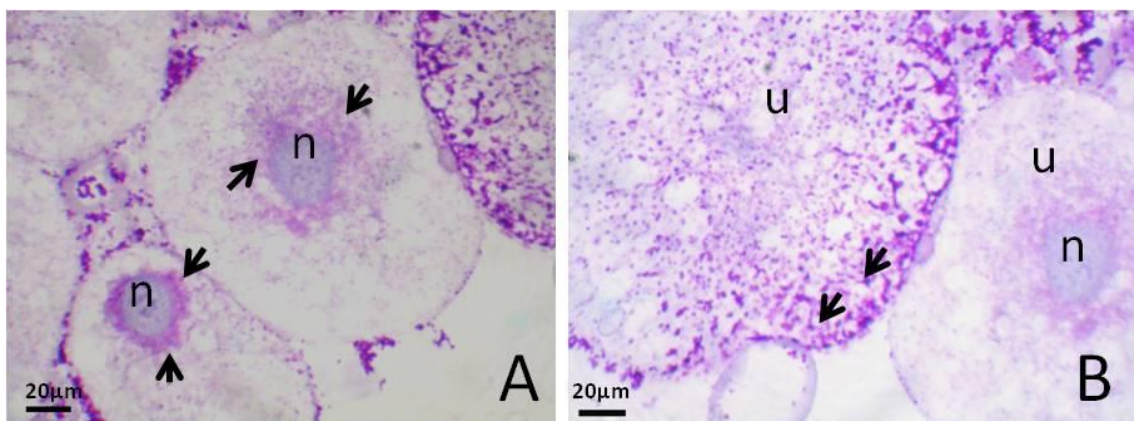


Figura 07- **A.** núcleo (n) de Urócyto em cultivo por 24h. Grânulos PAS positivos (setas) na região do entorno do núcleo. **B.** Setas apontam grânulos PAS positivos na superfície do Urócyto (u) mantido em cultivo por 24h.

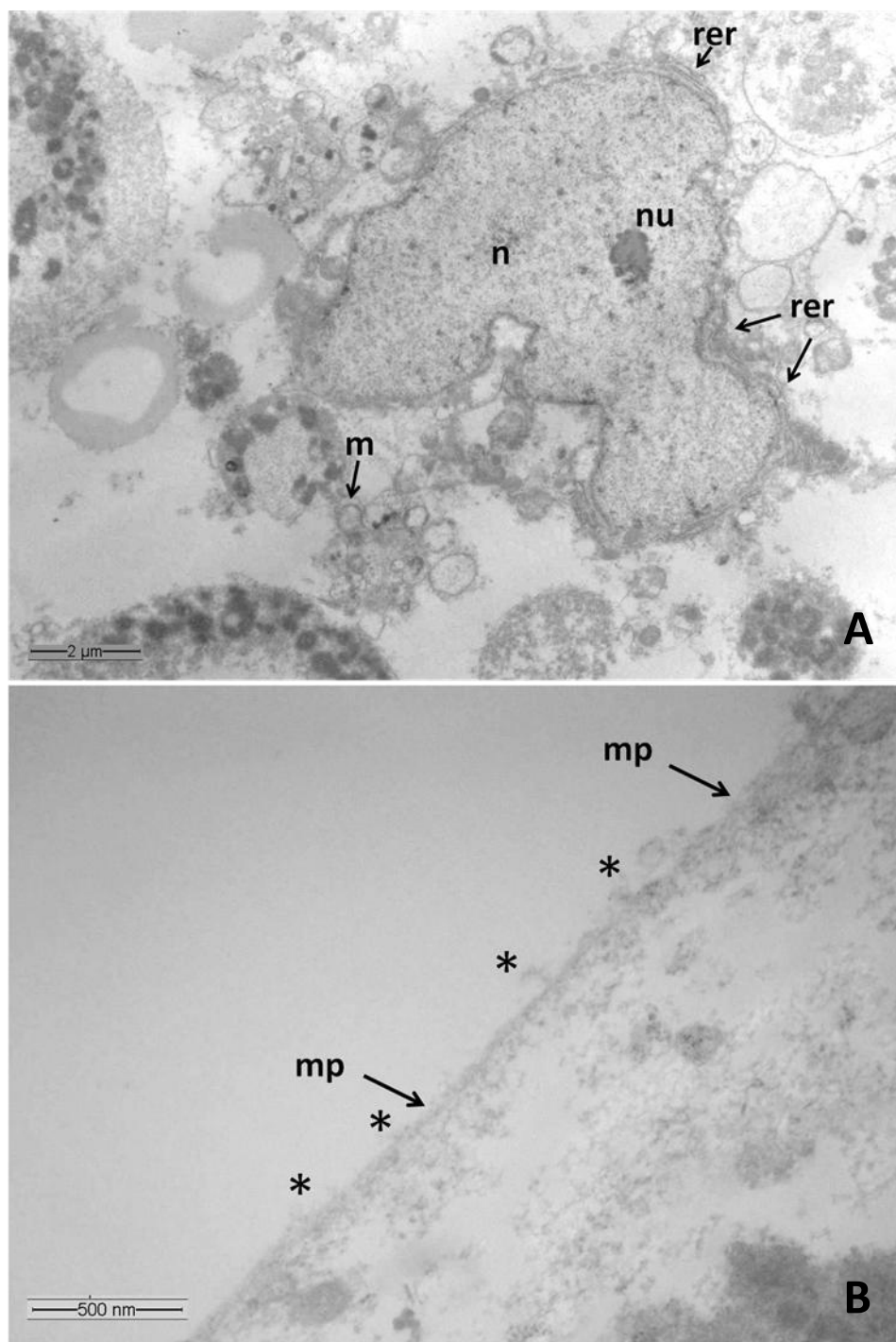


Figura 08- Eletromicrografias de transmissão de Urócitos, não cultivados, de *Melipona quadrifasciata*.

A. Urócito mostrando núcleo de formato irregular (n) com nucléolo (nu) bem definido, retículo endoplasmático rugoso (rer), em continuidade com a membrana nuclear e, no citoplasma, mitocôndrias (m), de formato arredondado. **B.** Membrana plasmática (mp) íntegra, exibindo prolongamentos celulares (*).

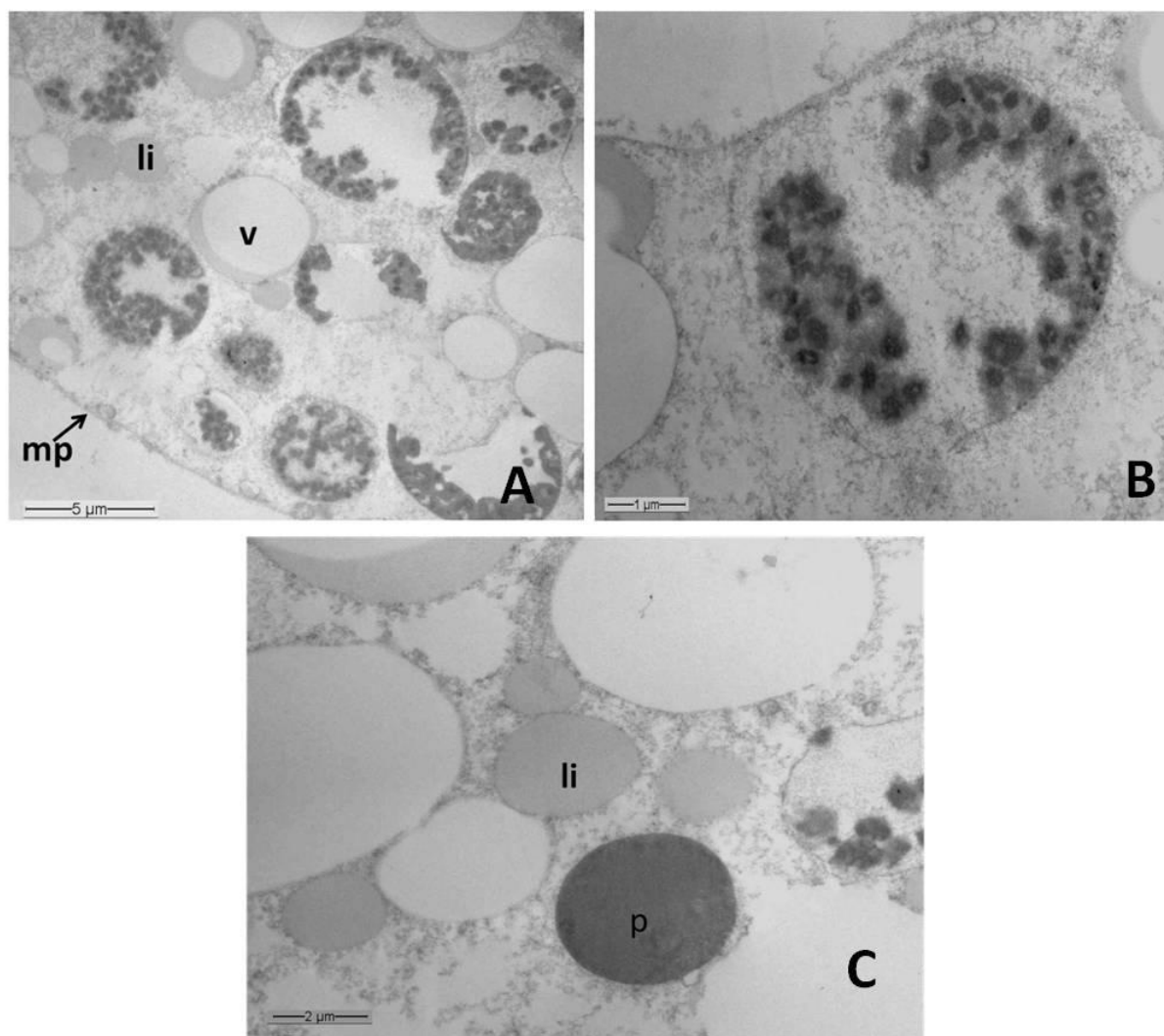


Figura 09- Eletromicrografias de transmissão de Urócitos, não cultivados, de *Melipona quadrifasciata*. **A.** Citosol exibindo gotas lipídicas (li), vesículas (v) com conteúdo granular eletrondenso na periferia. **B** e **C**, detalhe de **A**. **B.** Vesícula contendo inclusões paracristalinas. **C.** Gotas lipídicas (li) e vesículas com depósito de proteínas (p).

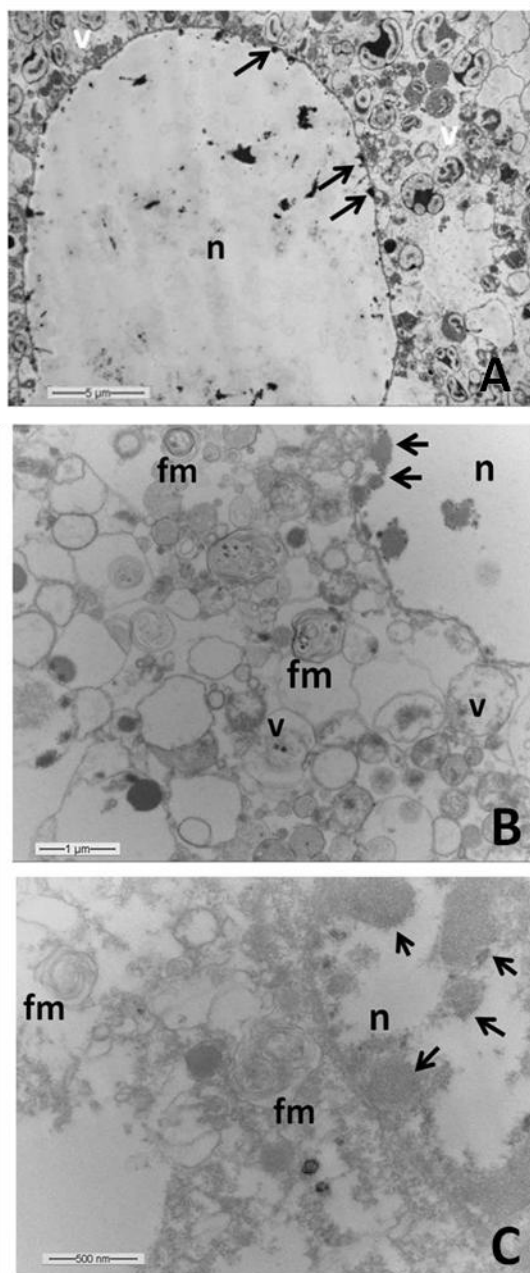


Figura 10- A. Urócitos cultivados em meio LHB

por 24 horas. Núcleo (n), setas indicam o início da formação de nódulos periféricos de condensação de cromatina, citosol exibindo vesículas (v) diversas, menores que 5 μm , delimitadas por membrana. **B.** Urócitos cultivados em meio LHB por 48 horas. Núcleo (n), setas indicam aumento do tamanho dos nódulos periféricos de cromatina condensada, citosol exibindo vesículas diversas (v), algumas menores que 1 μm , delimitadas por membrana e aparecimento de figuras mielínicas (fm). **C.** Urócitos cultivados em meio LHB por 72 horas. Núcleo (n), setas indicam aumento considerável no tamanho dos nódulos periféricos de cromatina condensada, no citosol figuras mielínicas (fm). É possível visualizar algumas vesículas delimitadas por membrana, mas não a identidade de seu conteúdo.

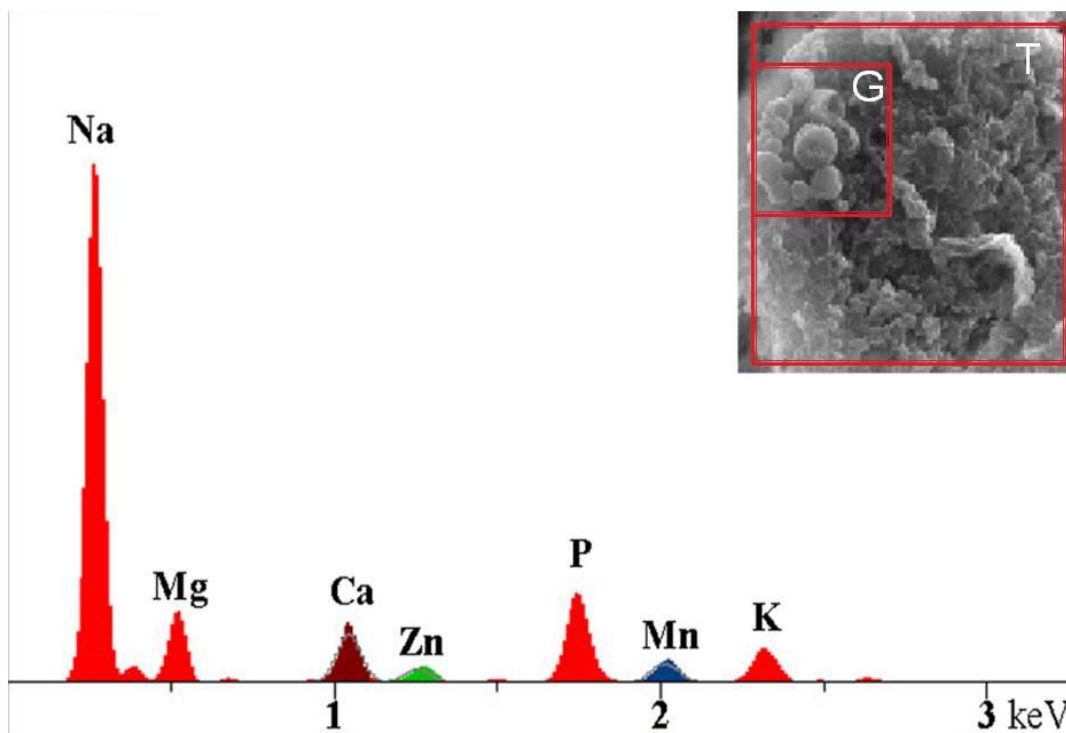


Figura 11- Detecção de Elementos químicos por espectroscopia por emissão de raios X. À direita as áreas (G) região com grânulos e (T) célula total, do Urócito exploradas pela microscopia de varredura e submetidas à sonda de raios X. Abaixo, espectro gerado na análise mostrando os elementos químicos detectados em maior concentração em ambas as análises.

Tabela 1. Detecção de Elementos químicos por espectroscopia por emissão de raios X.

Elemento	Intensidade (c/s)	Erro	Concentração (%/P)*
sódio	118,78	0,925	45,117
magnésio	35,07	0,632	21,640
cálcio	18,41	0,495	19,435
fósforo	42,76	0,713	7,966

* Porcentagem peso do soluto/peso total da solução

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Mohanna SY, Nott JA. (1989). Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology*. 101:535-544.
- Arrese EL, Soulages JL. (2010). Insect fat body: energy, metabolism and regulation. *Annual Review of Entomology*. 55: 207-225.
- Chapman RF. (1998). *The Insects. Structure and function*. 4^aed. Cambridge Press, Cambridge.
- Cruz-Landim C. (1985). Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. *Revista Brasileira de Biologia*. 45:(3) 221-232.
- Cruz - Landim C. (2008) *Abelhas. Morfologia e função de sistemas*. Unesp, São Paulo.
- Cruz-Landim C. (2000). Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genetics and Molecular Biology*. 23:83-88.
- Cruz-Landim C. (1985) Modificações das Células do Corpo Gorduroso de Rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apinae). *Ciência e Cultura*. 37: 471-474.
- Cruz-Landim C, Serrão JE. (1997). Ultraesctructure and Histochemistry of the Mineral Concretions in the Midgut of Bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology*. 47:(1) 21-29.
- Dean RL, Locke M, Collins JV. (1985). Structure of fat body. In: Kerbut GA, Gilbert LI. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. 3: 155-210.
- Ehresmann DD, Graf G, Buckner JS. (1990). Uric acid Translocation From the Fat Body of *Manduca sexta* During the Pupal-Adult Transformation: Effects of, 20-Hydroxyecdysone. *J. Insect Physiol* 1990. 36:173-180.
- Easton, C. M., Horwath, K.L. (1994). Characterization of primary cell cultures derived from fat body of the beetle, *Tenebrio molitor*, and the immunolocalization of a thermal hysteresis protein *in vitro*. *Journal of Insect Physiology* 40:(6) 537-557.
- Giannini TC, Imperatriz-Fonseca VL, Acosta AL, Alves-dos-Santos I, Garófalo CA, Saraiva AM. (2012). Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling*. 244:127-131

- Gullan PJ, Cranston PS. (2005) The Insects: an Outline of Entomology. Blackwell Publishing.
- Howard B, Mitchell PC, Ritchie A, Simkiss K, Taylor M. (1981). The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochemical Journal*. 194:507-511.
- Hunter, W.B. (2010). Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*:Hymenoptera: Apidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology . Animal* 46: 83-86.
- Janssen HH. (1985). Some histological findings on the mid-gut gland of the common garden snail. *Arion rufus* (L.) (Syn. *A. ater rufus* [L.], *A. emporicorum* Fe´russac) *Gastropoda: Stylommatophora*. *Zoologischer Anzeiger*. 215:33-51.
- Junqueira LCU e Junqueira, LMMS. (1983) Técnicas básicas de citologia e histologia. 1ªEd, Santos SP; p123
- Kerr, WE, Almeida, GA, Nascimento, VA. Abelha urucu. (1996). *Biologia, manejo e conservação*. Fundação Acangú, Belo Horizonte.141p.
- Kishimoto A, Nakato H, Izumi S, Tomino S. (1999). Biosynthesis of major plasma in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and Tissue Research*. 297:329-335.
- Kuterbach DA e Walcott B. (1986). Iron-Containing Cells In the Honey-Bee (*apis mellifera*) accumulation during development. *The Journal of Experimental Biology*. 126:389-401.
- Lipovsek S. Letofsky-Papst Hofer F. Pabst M A. Devetak D. (2012). Application of analytical electron microscopic methods to investigate the function of spherites in the midgut of the larval antlion *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Microscopy Research and Technique*. 75:(4)397-407.
- Lipovsek S, Novak T, Janzekovic F, Pabst M A. (2011). Role of the fat body in the cave crickets *Troglophilus cavicola* and *Trolophilus neglectus* (Rhaphidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Arthropod Structure & Development*. 40: 54-63.
- Locke M. (1984). The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: King RC, Akai H. *Insect Ultrastructure*. Plenum Press, New York. 151-197.
- Lynn D. E. (2001). Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 37: 319-321.

- Martins GF. (2008). O corpo gorduroso de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera; Nematocera) (Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos. Tese de doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, Belo-Horizonte MG.
- Martins G F, Serrão JE. (2004). Changes in the reproductive tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) queen after mating. *Sociobiology* 44:(2) 241-254.
- Martins GF, Serrão JE, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP. (2011a). A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 106:(6)742-747.
- Martins GF, Serrão JE, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP. (2011b). Histochemical and Ultrastructural Studies of the Mosquito *Aedes aegypti* Fat Body. Effects of Aging and Diet Type. *Microscopy Research and Technique*. 74:1032-1039.
- Martins GF, Guedes BAM, Serrão JE, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP, Silva LM, Fortes-Dias CL. (2011c). Isolation, primary and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Cell and Tissue Research*. 43:83-90.
- Michener CD. (2000). *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Moure JS, Urban D, Melo GAR. (2008). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba.
- Nelson DE, Cox MM. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5^a ed. Editora: W-H Freeman and Company.
- Paes-de-Oliveira VT e Cruz-Landim C. (2006). Histological and ultrastructural aspects of the fat body in virgin and physogastric queens of *melipona quadrifasciata anthidioides* lepeletier, 1836 (hymenoptera, apidae, meliponini). *Brazilian journal of morphological sciences*. 23: 385-392.
- Paes-de-Oliveira VT e Cruz-Landim C. (2003) Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Sociobiology*, California. 41: 701-709.

- Pascini TV, Martins GF, Serrão JE, Vilela EF, Albeny D S, Ramalho-Ortigão JM. (2011). Systematics, morphology and physiology. Changes in the Fat Body during the Post-Embryonic Development of the Predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. 40:456-461.
- Pearse AGE. (1985). *Histochemistry Theoretical and Applied*. Vol. 2 4^{ed}. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York. 1055 p.
- Rachinsky A e Hartfelder K. (1998). *In Vitro* Biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 34:646-648.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, Bueno OC. (2010) Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*. 4:395-401.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, Bueno OC. (2006) Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*. 37: 234-242.
- Rossel R C, Wheeler D E. (1995). Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Bukley) (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, Oxford. 24: 413-426.
- Sadrud-Din S, Loe MJ, Hakim RS. (1996). In vitro differentiation of isolated stern cells from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *The Journal of Experimental Biology*. 199: 319-325.
- Silva WP, Lima-da-Paz JR. (2011). Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza on line*. 10:(3)146-152.
- Snodgrass R E. (1935). *Principles of insect morphology*. Mc-Graw-Hill, NewYork. 407p.
- Stefanini M, de Martino C, Zamboni L. (1967). *Nature*. 216:173-174
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. (2002). How *Drosophila* combats microbial infection:a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*.5: 102-110.
- Wiese H. (2005) *Apicultura – Novos Tempos*. 2^a Ed. Agro Livros.
- Zara FJ, Caetano FH. (2004). Ultramorphology and histochemistry of fat body cells from last instar larval of the *Pachycondyla* (=Neoponera) *villosa* (Fabricius) (Formicidae: Ponerinae). *Brazilian Journal of Biology*. 64:725-735.

CAPÍTULO 2

Transcriptoma de urócitos do corpo gorduroso de pupas da abelha *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini)

Waléria C.A. Furtado, Dihego O. Azevedo, Leandro Licursi de Oliveira, Gustavo F. Martins, José Eduardo Serrão

Resumo: O corpo gorduroso das abelhas adultas é constituído por trofócitos e enócitos, entretanto, em pupas de abelhas recém-emergidas alguns trofócitos são modificados em células denominadas urócitos, cuja função permanece desconhecida nas abelhas. Neste trabalho, urócitos do corpo gorduroso da abelha *M. quadrifasciata* foram purificados e tiveram seu RNA extraído para construção da biblioteca de cDNA. Foi realizada a PCR dos fragmentos de cDNA e esses foram ligados no vetor pTZ e clonados em *E. coli*. Após sequenciamento dos fragmentos clonados, as sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o BLAST do NCBI. A maioria das sequências obtidas não mostrou homologia com as sequências depositadas no banco de dados disponíveis para abelhas. Foi utilizado um banco de dados sem especificação de organismo para confrontar sequências contendo mais que 200 pb, destas, a maioria foi homóloga em até 98% com sequências de outros vetores de clonagem diferentes daquele usado neste trabalho e com sequências de bacteriófago T4.

CAPÍTULO 2

Transcriptome urocytes fat body of pupae bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini)

Waléria C.A. Furtado, Dihego O. Azevedo, Leandro Licursi de Oliveira, Gustavo F.
Martins, José Eduardo Serrão

Abstract: The fat body of adult bees has different cell types as trophocytes and oenocytes, however, in young pupae some trophocytes are modified in cells called urocytes whose function remains unknown in bees. In this work, urocytes of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* were purified and their RNA were extracted for cDNA library construction. PCR was performed on cDNA fragment and these were inserted into pTZ vector and cloned in *Escherichia coli*. After sequencing of cloned fragments, the sequences obtained were analyzed using the NCBI BLAST. Most of the sequences obtained had no homology with sequences deposited in the database available for bees. We used a database without specifying organism to confront sequences containing more than 200 bp, of these, most were up to 98% homologous with sequences of other cloning vectors different from that used in this study and sequences of bacteriophage T4.

1- Introdução

As abelhas fazem parte do ecossistema da região em que vivem e sua principal função na natureza é a polinização de plantas nativas e cultivadas. Em virtude da dependência dos recursos florais para extração de pólen e néctar, elas apresentam muitas adaptações à localização e coleta desses recursos, características que as tornam eficientes polinizadoras desempenhando, assim, importante papel na manutenção da diversidade das plantas que, por sua vez, é fundamental na conservação dos ecossistemas, no entanto, perdas de habitat, invasões de espécies exóticas e transformações climáticas parecem ser a causa da diminuição dessas populações (GIANNINI et al., 2012).

As abelhas são insetos holometábolos, isto é, passam por uma fase larval logo após a eclosão do ovo, que é seguida por uma metamorfose, onde ocorrem as mudanças que as transformam nos insetos adultos (CRUZ - LANDIM, 2008). A fase larval nesse tipo de inseto é uma fase de alimentação intensiva, e os nutrientes obtidos são utilizados para o crescimento e desenvolvimento da massa corporal e também se acumulam em tecidos de reserva para serem utilizados durante a metamorfose (CHAMPMAN, 1998).

O corpo gorduroso é constituído por um conjunto de células que se dispõem em camadas e/ou lóbulos, sendo os tipos celulares mais comuns os trofócitos, os micetócitos, os urócitos e os enócitos, embora este último tipo seja de origem ectodérmica e em muitos insetos não esteja embebido no corpo gorduroso (CHAPMAN, 1998; GULLAN & CRANSTON, 2005).

Em princípio o corpo gorduroso, além de participar do metabolismo intermediário, é o local de armazenamento de reservas como lipídeos, carboidratos e proteínas, que são metabolizados durante a metamorfose, o voo e a reprodução (SNODGRASS, 1935; ROSSEL & WHEELER, 1995; MARTINS et al., 2011; PASCINI et al., 2011).

O corpo gorduroso das abelhas adultas é quase que essencialmente constituído por trofócitos e enócitos (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2006), enquanto nas abelhas recém-emergidas são encontrados trofócitos, enócitos e urócitos, estes últimos são trofócitos modificados (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003; DEAN et al., 1985).

Os urócitos presentes no corpo gorduroso de alguns insetos não tem sua função esclarecida, havendo duas hipóteses: i) os urócitos seriam substitutos dos túbulos de

Malpighi durante a metamorfose quando os túbulos de Malpighi das larvas são reabsorvidos e os animal adulto ainda estão em processo de formação, como ocorre em pupas de himenópteros e lepidópteros, ii) na segunda hipótese, as células de urato armazenariam grânulos de sais de urato que seriam produzidos no interior das células do corpo gorduroso pelo metabolismo proteico bem como absorvidos da hemolinfa e acumulam no citoplasma até que possam ser excretados pelos túbulos de Malpighi reduzindo, assim, a concentração de produtos tóxicos na hemolinfa (SNODGRASS, 1935). Nas abelhas a maior incidência de células de urato é verificada no final da fase larval para o início da vida adulta, quando os túbulos de Malpighi não são funcionais (CRUZ-LANDIM, 2000).

Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* os urócitos começam a se formar quando tem início o acúmulo de urato em alguns trofócitos nos últimos estágios larvais indicando uma função excretora para estas células (CRUZ -LANDIM, 2008).

O presente trabalho tratou da construção e análise de sequenciamento da biblioteca de cDNA, proveniente de RNA extraído de urócitos presentes no corpo gorduroso de pupas de *M. quadrifasciata*, o que contribuirá para a compreensão das funções destas células.

2- Materiais e Métodos

2.1- Insetos

Para a realização do transcriptoma das células do CG foram utilizadas pupas de olho branco e rosa de operárias de *M. quadrifasciata*, mantidas em colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

2.2- Obtenção dos Urócitos

Todo o material utilizado nos procedimentos seguintes, meio de cultivo, utensílios como pinças e alfinetes entomológicos foram previamente esterilizados em autoclave e secos em estufas. Em todo o experimento foram utilizados microtubos, ponteiros e tubos Falcon novos. A bancada de trabalho e o estereomicroscópio foram desinfetados com solução de álcool 70% antes do início dos procedimentos para redução do número de contaminantes do ambiente.

Pupas de *M. quadrifasciata*, foram primeiramente lavadas em solução de água e detergente por 30 segundos para remoção de sujidades e desinfectadas por imersão pelo mesmo período em solução de álcool 70%, segundo MARTINS (2008). Após esse procedimento, as pupas foram dissecadas em estereomicroscópio em meio de cultura *Larval Honey Bee* (LHB) contendo antibióticos (RACHINSKY & HARTFELDER, 1998).

A dissecação deu-se em placa de petri contendo parafina de cor escura visando facilitar a visualização das células. O abdome da pupa foi aberto com auxílio de uma microtesoura tomando-se cuidado para não haver derramamento do corpo gorduroso total, após, seguiu-se a coleta dos urócitos com auxílio de micropipetas. Os urócitos são distinguíveis de trofócitos e enócitos pelo seu maior tamanho e coloração branca.

Durante a extração e até a obtenção do número desejado de células, (1×10^2 a 5×10^6), os urócitos foram mantidos em RNA later (Invitrogen®) em microtubos de 1,5 mL, em gelo, juntamente com alguns trofócitos, enócitos e gotículas de lipídeos que foram sugados juntos com o meio de cultura no momento da coleta das células.

Para purificação dos urócitos procedeu-se de duas a três lavagens das células com RNA “later” (Invitrogen®), seguidas de centrifugações por meio de curtos *spins*, o que permitia o assentamento destas no fundo dos microtubos e a separação das demais células e outros componentes pela utilização de micropipetas. Quando o “pelet” continha urócitos em sua maioria, estas células foram ressuspensas em RNA “later” (Invitrogen®) para utilização nos demais procedimentos.

2.3- Extração de RNA total e confecção de cDNA

O RNA total foi extraído dos urócitos isolados do CG com o Kit *Micro-FastTrack* (Invitrogen®). O RNA foi obtido, eluído, quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® e analisado quanto à sua integridade em gel de agarose a 1% de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 3µL do RNA eluído foi utilizado para a síntese das primeiras fitas de cDNA, com o Kit *SMARTTM cDNA Library Construction* (Clontech®) utilizando-se a enzima *SMARTScribeTM M-MLV reverse Transcriptase* (Clontech®), 5'PCR primer contendo uma sequência âncora 5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT- 3', CDS III/ PCR primer com a sequência 5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG- 3', seguindo-se incubação por 1 hora a 42°C.

2.4- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação do cDNA foram realizadas a partir de 5' *PCR primer* e do CDS III/ *PCR primer* do Kit *SMARTTM cDNA Library Construction* (Clontech[®]), sendo as reações da PCR adaptadas para o Kit *MASTER MIX* (Promega[®]). Os ciclos da PCR foram realizados como se segue: desnaturação inicial de 95°C por 60s, 26 ciclos de desnaturação a 95°C por 10s e anelamento à 68°C por 6min.

2.5- Fracionamento da Biblioteca de cDNA

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em coluna *CHROMASPIN* do Kit *SMARTTM cDNA Library Construction* (Clontech[®]) de acordo com as orientações do fabricante, seguindo-se a aplicação das alíquotas em gel de agarose 1% para seleção dos fragmentos de DNA maiores que 200 pb.

2.6- Ligação de fragmentos de DNA em vetor e clonagem

Os fragmentos de DNA amplificados que apresentaram mais que 200 pb foram ligados em vetor plasmidial pTZ57R/T com a enzima *T4 DNA LIGASE*, ambos pertencentes ao kit *InsTAclone PCR cloning* (Fermentas[®]). O produto dessa reação de ligação foi utilizado para a transformação de bactérias competentes *E.coli* TOP10F, para obtenção de clones contendo plasmídeos recombinantes com sequências de DNA de interesse. Os clones bacterianos foram monitorados quanto à incorporação ou não dos plasmídeos recombinantes por meio do plaqueamento em LB ágar adicionado de IPTG 0,04%, Xgal 0,06% e ampicilina 0,03% com a seleção de colônias de coloração branca.

2.7- Extração do DNA plasmidial e sequenciamento automático de nucleotídeos

Os clones bacterianos recombinantes foram inoculados, individualmente, em tubos falcon contendo 5mL de meio LB acrescido de ampicilina 0,5%, e incubados por 16 horas a 37°C sob agitação a 180 rpm. Após crescimento, os clones foram submetidos ao isolamento plasmidial pelo Kit *PUREYIELDTM PLASMID MINIPREP SYSTEM* (Promega[®]) como descrito pelo fabricante. Plasmídeos isolados e purificados foram encaminhados para o sequenciamento automático de nucleotídeos na empresa Macrogen, (Korea).

2.8- Análises de bioinformática

Inicialmente foram removidas das sequências obtidas todas as sequências referentes ao plasmídeo pTZ57R/T utilizado para inserção do DNA de interesse. As sequências agora trimadas, foram submetidas a busca de similaridades utilizando-se o BLASTn do NCBI.

Para as análises mais detalhadas de bioinformática, foram utilizados diversos programas computacionais para anotação e agrupamento manual e automático das sequências, como o pipeline “phred| phd2fasta| cap3|”, obtendo-se contigs (sequências únicas combinando os diferentes fragmentos obtidos).

Após a montagem de contigs, seguiu-se uma busca de similaridades utilizando-se o BLASTn e BALSTx contra o banco de dados de proteínas NR do NCBI.

3- Resultados e Discussão

Os urócitos foram dissecados e separados dos trofócitos e enócitos pelas suas características de maior tamanho e coloração branca (Figura 01).

Realizou-se a extração do RNA dos urócitos do corpo gorduroso de *M. quadrifasciata*. A partir do RNA obtido, o cDNA foi sintetizado e amplificado por PCR com o uso de *primers*. O produto da reação de PCR foi fracionado em coluna para seleção dos fragmentos por tamanho como mostrado no esquema (Figura 02). Após o fracionamento as alíquotas contendo cDNA já amplificado foram visualizadas em gel de agarose revelando a presença de fragmentos com diferentes tamanhos (Figura 03). Foram selecionados os fragmentos que apresentaram >200pb para ligação ao vetor pTZ como mostrado no esquema (Figura 02).

Bactérias competentes TOP10 foram transformadas com os plasmídeos PTZ57/R recombinantes. Os clones bacterianos foram monitorados quanto à incorporação ou não dos plasmídeos recombinantes por meio do plaqueamento em LB ágar adicionado de IPTG, Xgal e ampicilina. Colônias de coloração branca foram identificadas como clones positivos e as colônias de coloração azul foram descartadas.

Os clones bacterianos transformantes foram, então, submetidos à extração plasmidial e os plasmídeos recombinantes foram analisados quanto a sua integridade para verificação da viabilidade de envio para sequenciamento (Figura 04). O cDNA

obtido, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® e posteriormente diluído para concentração adequada ao envio para sequenciamento.

As amostras foram enviadas para o sequenciamento automático na empresa Macrogen (Korea) e destas amostras cerca de 75% foram sequenciadas.

Os arquivos recebidos continham os espectros mostrando a qualidade do sequenciamento e as sequências correspondentes às amostras (Figura 05). As sequências obtidas foram primeiramente trimadas para remoção das sequências de vetores plasmidiais. Inicialmente, todas as sequências obtidas foram submetidas a uma pesquisa na plataforma BLAST (NCBI) contra os bancos de dados de *Melipona quadrifasciata* (taxid:166423), *Melipona* (taxid:28651) e *Meliponinae* (taxid:83319) e não se obteve nenhum resultado positivo. Dessa forma, optamos por uma pesquisa mais ampla não especificando o organismo. Das sequências pesquisadas apenas 25 retornaram resultados positivos e foi verificada homologia com diversos tipos de vetores de clonagem e bacteriófagos T4 (Tabela 01).

Para uma análise de bioinformática mais detalhada, após a trimagem das sequências, foram montados 2 contigs e estes submetidos à busca de similaridades pelo uso do BLASTn e BLASTx contra o banco de dados de proteínas NR do NCBI.

Com uso do BLASTn foram obtidas 88 sequências que não apresentaram nenhuma homologia nos bancos de dados disponíveis no GenBank. Possivelmente estes genes ainda não foram descritos nos bancos de dados existentes, e se tratam, portanto, de genes novos. Foram encontradas 99 sequências similares a vetores, 9 sequências similares ao bacteriófago T4 e 9 sequências de 16S de RNA de bactérias. A ocorrência de similaridades com bacteriófagos T4 e RNA bacteriano, pode estar relacionada com a forma como é feita a extração das células de urato que se localizam nas proximidades do intestino da abelha utilizada no experimento. A ocorrência de similaridades com sequências de vetores pode estar ligada a erros metodológicos.

Com o uso do BLASTx foram obtidas 104 sequências similares a vetores e 101 sequências que não apresentaram nenhuma homologia nos bancos de dados disponíveis no GenBank, assim como observado para o BLASTn.

Em virtude dos resultados obtidos, foram adotados critérios mais rigorosos para a montagem de sequências e foram obtidos três contigs. Os contigs obtidos podem ser visualizados a seguir (Figura 06).

A sequência número 1, por ser muito pequena, não apresentou identidade significativa com nenhuma sequência relevante. A sequência número 2 apresentou baixa identidade com *Apis mellifera* regulator of nonsense transcripts 1 (Upf1), apresentando e-value de 0,014 e identidade de 86%. A sequência número 3 apresentou alta identidade com uma sequência do bacteriófago T4, com e-value de 0,0 e identidade de 99%.

4- Conclusão

Foi cumprido o propósito do trabalho de extração do RNA e construção da biblioteca de cDNA das células de urato do CG da abelha *Melipona quadrifasciata*, bem como, a obtenção das sequências a partir do sequenciamento automático, no entanto, não foram identificados peptídeos relevantes nestas células quando confrontou-se estas sequências com aquelas constantes nos bancos de dados disponíveis. A ausência de dados significativos para a avaliação dos transcritos obtidos neste trabalho pode estar relacionada à indisponibilidade de um maior número de dados no sistema para análise e interpretação dos resultados.

FIGURAS

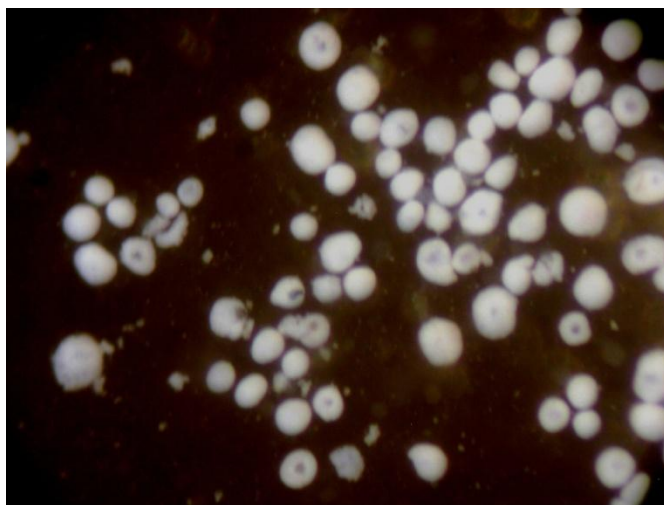


Figura 01- Urócitos de *Melipona quadrifasciata* observados ao estereomicroscópio.

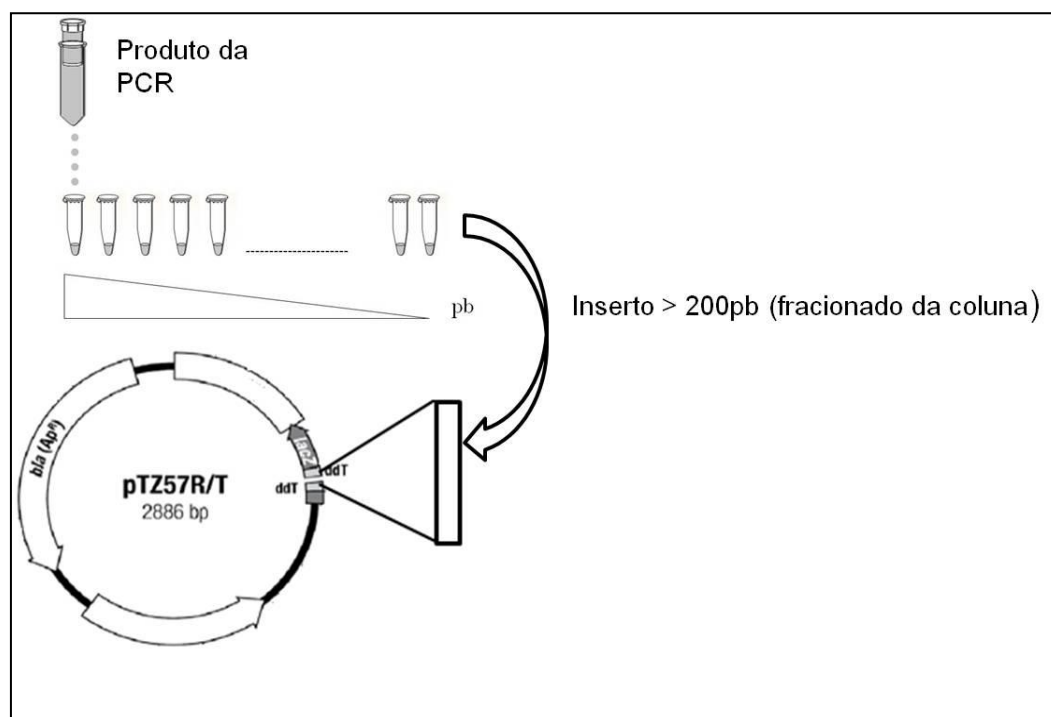


Figura 02- Esquema mostrando a ligação de cDNA>200pb ao vetor pTZ57R/T

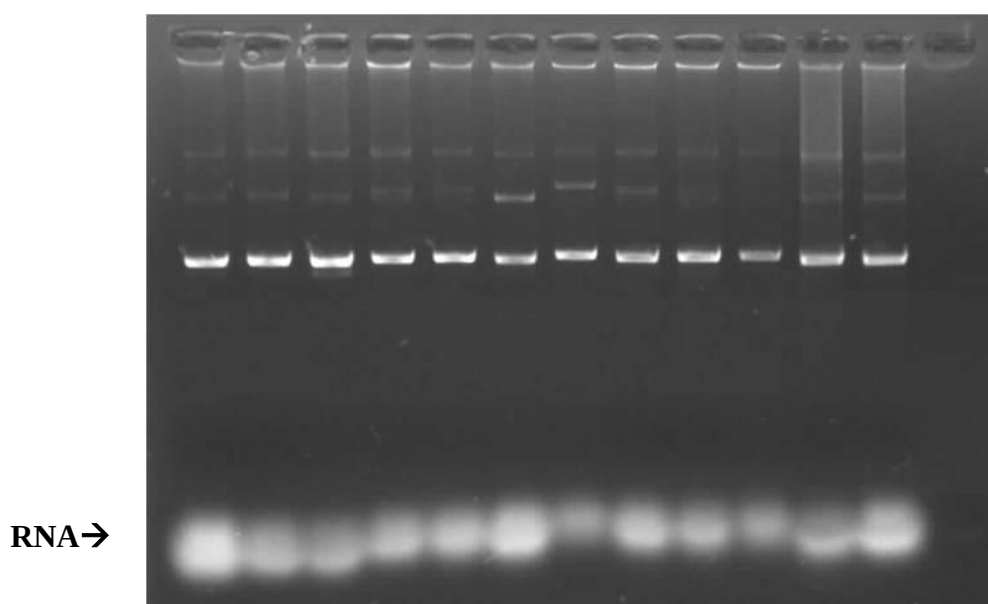


Figura 03- Análise da integridade do plasmídeo extraído e estudo da viabilidade de envio para sequenciamento.

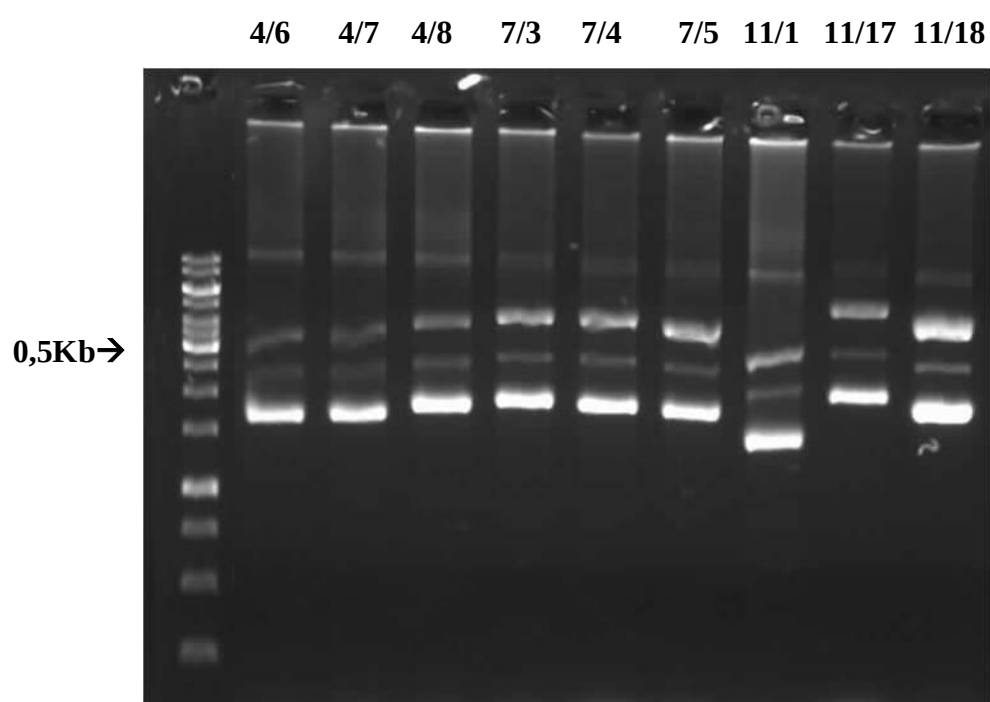
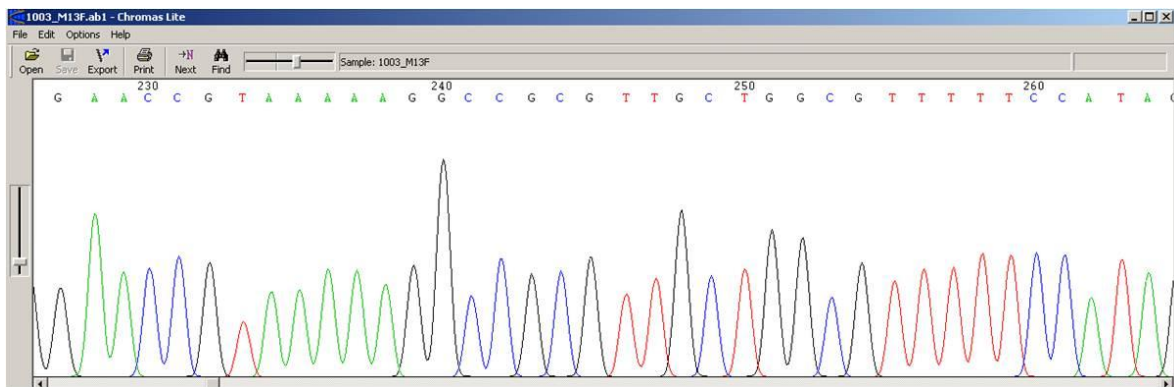


Figura 04- Gel representativo para análise da integridade do plasmídeo extraído e estudo da viabilidade de envio para sequenciamento. Verificação da presença de fragmentos de cDNA de tamanhos médio e grande. 4/6 – Fração 4 - Clones 6, 7 e 8; 7/3 – Fração 7 - Clones 3, 4 e 5; 11/1 – Fração 11 - Clones 1, 17 e 18.



```
>121212-15_o10_1003_M13F.ab1 1664
CCCCGACTTCTCGAATGCATCTAGATTAATGAATCGGCCACGCGCGGGGAGAGGCGGT
TTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTCG
GCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG
GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAA
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC
CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTG
TCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTG
GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG
CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
TTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGAT
TATCAGCAATAACCAGCCAGCCGGAAGGCCGAGCGCAAAATGGTCCTGCAATTTATCCG
CTCCATCCAGCCATTAATTGTTGCCGGAACCTAAATAAGTAGCCGCCATTAAATTTGG
CCACGTGTTTCCATTGTCAAGGATCTGGGTTTACCCCTCGCTTTTGAAGGGTTCTTCAAC
TCCGGTCCCCAAAATAAAGGGAATTCATGTCCCCTTTTTTTTGCAAAAACGGTTACTCTCT
CGTCCCCTATTGTGCAAAAAGTGGGCCAGGTTATCCTTGGGTGAGGCCCCGATATTCC
TTTTGCTCCCCCAAAAATTTTCTTGGGGGGAACACCCCTCTTTTAAGAATGGGCGG
GGCAGTTTTGTGCCCGGGGGGAAAAAAACCCCCCAATAAATATTTTTTACTGGGGC
CAGGGTGAGGAGATATTGTAGTGGGAAAAACGCCCTCTCCCCTCTCTTCTACTTTCTTT
CGAGAAGAGGGG
```

Figura 05- Espectro representativo das amostras enviadas para sequenciamento. Sequência obtida para o clone 03 do fragmento 10.

>Contig_1

GAGAGGGGAGAAGGAAGAAGCGAAGAATTTGAAGCACGTTGGGATTACGT
ACTTTCTTTCTCTTTGACTCTCTCTCGTACGC

>Contig_2

GCGGGCAGTGAAAGAAAGGAAAATAGTAACGGAGAGTAAGCTGCGCGCGA
AACGAAATCGATCGACCGCGTCTCTACGTAAGGGAAGGTTCAAGACTGTAT
GTGCTTTGTATGCATGTATAGCTATGCACGTGATACGGGATTTGCTTTGTCTT
ATGTTCCGCTGGCAGTGCCTTGGTTTTTCGCGTCCATCGTCGTCAGACTGGCA
GTAAAACGCGCGTGTGACAAAAAAGAGAGAAAACAAAGCAAAGA
ATCCAAAGTACAAACGATCGCGGAGAGCGACCGACTACGAACGACGATTGCG
CGCCAAACTCGGAATTACCAAGATGAAAGATCGCAGTGAAATAATAAGGCT
CAAAAAGATATACGTACGGCTACCATACGTTGCGTTCAAACCTGGCTGGCAG
TGCGCGATATTTGGCAGTGACGCGTCTCTTTTTTCTCTTTTTCTCTTTTCTCT
TTCATC

>Contig_3

TCTAGATTACATCCGGATATTCAATCATTAGTTGAGAAAAAATAAATGAAA
GATTATTTTGACTATTGGCTGTCCTGGTTCTGGTAAGAGTACTTGGGCTCGG
AATTTATTGCTAAGAATCCCGGGTTTTATAATATCAATCGTGATGACTATCG
CCAATCTATTATGGCGCATGAAGAACGCGATGAGTACAAGTATACCAAAAA
GAAAGGAGGTATCGTAAGTGGTATGCAGTTTGATACAGCTAAAAGTATTCG
TACGGTGGCGATTCTGTTAAGGGAGTAATCATTTTCAGATACTAACCTGAATC
CTGAACGTCGCCTAGCATGGGAAACTTTTGCCAAAGAATACGGCTGGAAAG
TTGAACATAAAGTGTTTGATGTTTCTGGACTGAATTGGTTAAACGTAAGTCA
AAAACGCGGAATAAGCAGTACCAATTGATGTTTTACGTTCAATGTATAA
AGCATGCGAGAGTATCTCGGTCTTCCAGTATATAATGGGACTCCTGGTAAAC
CAAAAGCAGTTATTTTTGATGTTGATGGTACACTAGCTAAAATGAATGGTCG
TGGTCCTTATGACCTTGAAAAATGCGATACCGATGTTATCAATCCTATGGTG
TTGAACTGTCTAAGATGTATGCTCTTGGGTTATCAAATCGTAGTCGTTTCAG
TCGTGAAAGTGGAATAAAGAAGACCCAACGAAATATTATCGTATGACCCT
AAATGGGTTGAGGACATTGCTGGCGTTCCATTAGTTATGCAATGTCAGCGCG
AACAGGCGATACCCGTAAAGACGATGTAGTTAAAGAAGAAATTTTCTGGA
AACACATTGCACCGCATTTTGACGTGAAATTAGCTATTGATGACCGAACTCA
AGTAGTTGAAATGTGGCGTCGTATCGGTGTTGAATGCTGGCAAGTCGCTTCG
GGAGATTTTAAAGGATCCAGA

Figura 06- Contigs montados para análises de similaridades por confronto com o banco de dados de proteínas NR do NCBI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chapman RF. (1998). The Insects. Structure and function. 4^aed. Cambridge Press, Cambridge.
- Cruz - Landim C. (2008). Abelhas. Morfologia e função de sistemas. Unesp, São Paulo.
- Cruz-Landim C. (2000). Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genetics and Molecular Biology*. 23:83-88.
- Giannini TC, Imperatriz-Fonseca VL, Acosta AL, Alves-dos-Santos I, Garófalo CA, Saraiva AM. (2012). Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling*. 244:127-131
- Gullan PJ, Cranston PS. (2005). The Insects: an Outline of Entomology. Blackwell Publishing.
- Martins GF. (2008). O corpo gorduroso de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera; Nematocera) (Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos. Tese de doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, Belo-Horizonte MG.
- Martins GF, Serrão JE, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP. (2011a) A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 106(6):742-747.
- Martins GF, Serrão JE, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP. (2011b). Histochemical and Ultrastructural Studies of the Mosquito *Aedes aegypti* Fat Body. Effects of Aging and Diet Type. *Microscopy Research and Technique*. 74:1032-1039.
- Paes-de-Oliveira VT e Cruz-Landim C. (2006). Histological and ultrastructural aspects of the fat body in virgin and physogastric queens of *melipona quadrifasciata anthidioides* lepeletier, 1836 (hymenoptera, apidae, meliponini). *Brazilian journal of morphological sciences*. 23: 385-392.
- Paes-de-Oliveira VT e Cruz-Landim C. (2003) Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Sociobiology*. 41: 701-709.
- Pascini TV, Martins GF, Serrão JE, Vilela EF, Albeny D S, Ramalho-Ortigão JM. (2011). Systematics, morphology and physiology. Changes in the Fat Body during

- the Post-Embryonic Development of the Predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. 40:456-461.
- Rachinsky A e Hartfelder K. (1998). *In Vitro* Biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. *In Vitro Cell. Animal Developmental Biology*. 34:646-648.
- Rossel R C, Wheeler D E. (1995). Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Buckley) (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 24: 413-426.
- Snodgrass R E. (1935). *Principles of insect morphology*. Mc-Graw-Hill, NewYork. 407p.

Tabela 01- BLAST ® Basic Local Alignment Search Tool Blast para análise das sequências obtidas.

Clone	Resultado mais provável	nºpb	Identidade	nºGap	E Value
0402	Expression vector pME9, complete sequence	1549	1322/1360 (97%)	17	0.0
0404	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 11a block 10	959	926/955 (97%)	24	0.0
0409	Cloning vector p-4725sox10.cre, complete sequence	815	657/739 (89%)	23	0.0
0501	Enterobacteria phage T4T, complete genome	1793	934/935 (99%)	0	0.0
0503	Cloning vector pG-Sable, complete sequence	1674	1292/1322 (98%)	12	0.0
0508	Cloning vector pG-Sable, complete sequence	1725	1232/1257 (98%)	8	0.0
0517F	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone S32	976	890/968 (92%)	27	0.0
0517R	Expression vector pME9, complete sequence	1734	1325/1363 (97%)	19	0.0
0602	Expression vector pME9, complete sequence	1844	1266/1307 (97%)	12	0,0
0604	Expression vector pME9, complete sequence	1855	1362/1413 (96%)	31	0.0
0606	Cloning vector pJAP8, complete sequence	1874	1202/1279 (97%)	14	0.0
0607	Phagemid cloning vector pTZ19U, complete sequence	1000	824/926 (89%)	11	0.0
0703	Expression vector pMCG50-S, complete sequence	829	776/784 (99%)	3	0.0

Tabela 01- BLAST ® Basic Local Alignment Search Tool Blast para análise das sequências obtidas (continuação)

Clone	Resultado mais provável	nºpb	Identidade	nºGap	E Value
0704	Expression vector pME9, complete sequence	1378	623/817 (76%)	4	3e-119
0712	Expression Vector pHsh-ex, complete sequence	1450	956/1034 (92%)	26	0.0
0713	Expression vector pME9, complete sequence	1681	1381/1418 (97%)	20	0.0
0717	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone S32	844	788/840 (94%)	8	0.0
0801	Enterobacteria phage T4T, complete genome	1677	934/935 (99%)	0	0.0
0807	Cloning vector pMAK27, complete sequence	1678	1415/1466 (97%)	20	0.0
0809	Phagemid cloning vector pTZ19U, complete sequence	1793	1209/1229 (98%)	5	0.0
0901	Synthetic construct neomycin-kanamycin phosphotransferase type III, TrfA transcriptional repressor protein, and phosphinothricin acetyltransferase II genes, complete cds	800	676/687 (98%)	3	0.0
0904	Expression vector pME9, complete sequence	1150	1020/1090 (94%)	10	0.0
0909	Expression vector pME9, complete sequence	978	821/910 (90%)	27	0.0
1107	Eleutheronema tetradactylum DNA, microsatellite:Eletet2	1392	372/413 (90%)	34	3e-139

Tabela 01- BLAST ® Basic Local Alignment Search Tool Blast para análise das sequências obtidas (continuação)

Clone	Resultado mais provável	nºpb	Identidade	nºGap	E Value
1115	Cloning vector pJAP8, complete sequence	1652	1199/1259 (95%)	21	0.0
1118R	Cloning vector pJAP8, complete sequence	1653	1227/1283 (96%)	21	0.0
1118F	Phagemid cloning vector pTZ19U, complete sequence	1580	1217/1251 (97%)	6	0.0