
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**Padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de
abelha *Apis mellifera* africanizada**

NICOLE PAVAN BUTOLO DEBONI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Fevereiro - 2020

NICOLE PAVAN BUTOLO DEBONI

Padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha *Apis mellifera* africanizada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta C. Ferreira Nocelli

Co-orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências *campus* Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro - SP
Fevereiro
2020**

D287p

Deboni, Nicole Pavan Butolo

Padronização do cultivo in vitro de hemócitos de abelha *Apis mellifera* africanizada / Nicole Pavan Butolo Deboni. -- Rio Claro, 2020

95 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Coorientador: Osmar Malaspina

1. Abelhas. 2. Sistema imune. 3. Hemolinfa. 4. Contagem total de hemócitos. 5. Cultura primária de hemócitos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

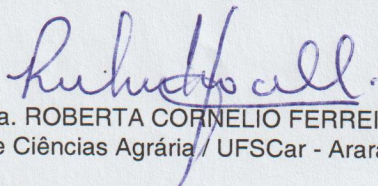
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha *Apis mellifera* africanizada

AUTORA: NICOLE PAVAN BUTOLO DEBONI

ORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

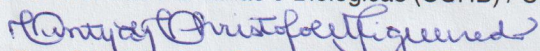
COORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI
Centro de Ciências Agrária / UFSCar - Araras

Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
Centro de Ciências Humanas e Biológicas (CCHB) / UFSCar - Sorocaba



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
Centro Universitário Herminio Ometto - FHO / UNIARARAS

Rio Claro, 27 de fevereiro de 2020

“É preciso correr muito para ficar no mesmo lugar. Se você quer chegar a outro lugar, corra duas vezes mais.”
(Alice no País das Maravilhas – Lewis Carroll)

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço imensamente a todos aqueles, que mesmo nos meus momentos de fraqueza, acreditaram e me incentivaram a continuar.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) que me recebeu de braços abertos e me encantou com sua qualidade ensino, e também ao Programa de Biologia Celular e Molecular, que conta com docentes maravilhosos.

À Profa. Dra. Roberta C. F. Nocelli pela orientação durante o mestrado, pelo apoio durante todo o trabalho, por confiar em nossas ideias mirabolantes e ser sempre tão proativa como orientadora. Você é um exemplo de professora a seguir!

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela coorientação, e pelas oportunidades dadas ao trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, por ceder diversas vezes o espaço de seu laboratório para o desenvolvimento de minha pesquisa. Bem como a técnica Dra. Bibiana Souza, que ajudou com diversos testes e ideias.

Aos demais docentes do Programa de Biologia Celular e Molecular, que sempre estiveram dispostos a ajudar e sanar as diversas dúvidas que surgem durante esse período de estudo.

Aos amigos que fiz do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), principalmente a Adna Dorigo, Tatiane Grella, Lucas Miotelo e Annelise Rosa. Agradeço pelas incontáveis horas de trabalho que passamos juntos, compartilhando conhecimentos, conversando, e principalmente, nos apoiando, com a ajuda de vocês todos os fardos foram mais leves. Adoro vocês!

Ao colaborador Sérgio Pascon, por auxiliar nas coletas das abelhas.

A Necis, secretária do CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais), por sua prestatividade, estando sempre disposta a nos ajudar. Você é ótima!

Aos meus pais, Alfredo e Simone, por serem essas pessoas incríveis, que sempre foram e serão minha fonte de inspiração, minha fonte de vida, de determinação. Que além de meus pais são meus melhores amigos, as pessoas com quem sempre posso contar, que ouviram e apaziguaram meus medos e desesperos, e também comemoraram as minhas vitórias, por menores que fossem. Eu devo tudo a vocês, e lhes dou o meu amor incondicional. Pais, vocês são os amores da minha vida, amo vocês demais!

Ao meu marido Thiago, que me ajudou a passar pelos diversos momentos difíceis, crises existenciais, momentos de loucura, tristeza, e ainda assim se manteve forte ao meu lado, e quis casar comigo (rsrs). Você é um exemplo de força e inspiração, e é o amor da minha vida. Te amo demais!

À minha amiga, comadre, braço direito (e às vezes o esquerdo também rs) e coorientadora, Patricia Azevedo. Você foi um dos maiores presentes que a pós-graduação pôde me dar, a sua força de vontade e capacidade de enfrentar desafios são impressionantes, eu tenho uma admiração enorme por você. Muito obrigada pelos conselhos, pela ajuda nas horas difíceis, e por mostrar os meus erros, sempre com o intuito de me ajudar a melhorar e nunca para me magoar. Muito obrigada Paty, por ser essa pessoa incrível na minha vida, te adoro!

Ao Luciano (Skiter), que além de aceitar dividir a Patricia comigo (rsrs), também me ajudou diversas vezes nesses dois anos de mestrado, principalmente com a terrível estatística. Obrigada Lu!

Agradeço à Deus.

RESUMO

Apesar da importância das abelhas como polinizadores, o declínio de suas populações tem sido alarmante e, constantemente, associado ao contato desses insetos com agrotóxicos. No caso de intoxicação, um dos primeiros sistemas afetados é o sistema imune, já que ele constitui a primeira barreira de defesa e manutenção do organismo. Contudo, avaliações dos impactos causados por agentes externos nesse sistema ainda são escassas e mensuradas de maneira indireta. Assim, buscando testes mais específicos a nível celular, o presente trabalho propôs a padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha *Apis mellifera* africanizada, para posteriores estudos ecotoxicológicos. Tal padronização demandou o estabelecimento de diversos parâmetros, dentre eles a quantidade de células para o início do cultivo, a melhor temperatura e o estágio de desenvolvimento para coleta da hemolinfa, o método adequado para extração de hemolinfa, a determinação do meio de cultura ideal, das condições laboratoriais, etc. Primeiramente observou-se que as larvas de abelha *A. mellifera* africanizada em quinto instar possuíam uma quantidade significativamente maior de hemócitos circulantes ($p < 0,001$) do que os outros estágios avaliados (recém emergidas e forrageiras), sendo assim, foi estabelecida a coleta da hemolinfa de larvas cultivadas *in vitro*, a fim de minimizar as chances de contaminações da cultura celular. Além disso, a temperatura também se mostrou um fator importante na variação da quantidade de hemócitos, estabelecendo-se a faixa de 32 ± 2 °C como ideal para a coleta. Diversas técnicas de extração de hemolinfa das larvas também foram testadas. A técnica de extração, a partir de uma pequena incisão na região da cabeça da larva com o auxílio de uma tesoura oftalmológica, foi padronizada. A qualidade da amostra foi estabelecida por meio da leitura em turbidímetro, obtendo-se um valor de referência (22.432,35 - 24.504,87) dado em unidades nefelométricas de turbidez (NTUs) para as amostras de hemolinfa. Após as padronizações iniciais estabeleceu-se o cultivo dos hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada em quinto instar criadas *in vitro*, em que o meio de cultura Grace's demonstrou o melhor desempenho para manutenção e proliferação celular, havendo uma média de 669 mil células após 24 horas de incubação e 1.141 mil após 96 horas de incubação. As fotomicrografias em microscópio invertido com contraste de fase também permitiram observar a proliferação celular no meio Grace's. A caracterização celular foi obtida por análise morfológica, através de uma característica dos hemócitos em que as células tornam-se alongadas devido ao reconhecimento de um agente estranho (placa de cultura); após as medições, essas células foram comparadas com outras encontradas em demais trabalhos com hemócitos de abelha no mesmo estágio de desenvolvimento, permitindo inferir que as células cultivadas eram hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada.

Palavras chave: sistema imune, hemolinfa, contagem total de hemócitos, cultura primária de hemócitos.

ABSTRACT

Despite the importance of bees as pollinators, the decline in their populations has been alarming and, constantly, associated with the contact of these insects with pesticides. In the case of intoxication, one of the first systems affected is the immune system, since it constitutes the body's first defense and maintenance barrier. However, assessments of the impacts caused by external agents in this system are still scarce and indirectly measured. Thus, looking for more specific tests at the cellular level, the present work proposed the standardization of *in vitro* cultivation of Africanized bee hemocytes *Apis mellifera*, for further ecotoxicological studies. Such standardization demanded the establishment of several parameters, among them the quantity of cells for the beginning of the culture, the best temperature and the development stage for the collection of hemolymph, the appropriate method for extraction of hemolymph, the determination of the ideal culture medium, laboratory conditions, etc. Firstly, it was observed that the larvae of Africanized *A. mellifera* bees in the fifth instar had a significantly greater amount of circulating hemocytes ($p < 0.001$) than the other evaluated stages (newly emerged and forage), thus, collection of the hemolymph of larvae grown *in vitro*, in order to minimize the chances of contamination of cell culture. In addition, temperature also proved to be an important factor in the variation in the amount of hemocytes, establishing the range of 32 ± 2 °C as ideal for collection. Several techniques for extracting hemolymph from the larvae were also tested. The extraction technique, from a small incision in the larvae head region with the aid of ophthalmic scissors, was standardized. The quality of the sample was established by reading it in a turbidimeter, obtaining a reference value (22,432.35 - 24,504.87) given in nephelometric turbidity units (NTUs) for the hemolymph samples. After initial standardization, the cultivation of hemocytes of Africanized bee larvae *A. mellifera* in fifth instar created *in vitro* was established, in which Grace's culture medium demonstrated the best performance for cell maintenance and proliferation, with an average of 669 thousand cells after 24 hours of incubation and 1,141 thousand after 96 hours of incubation. The photomicrographs in an inverted microscope with phase contrast also made it possible to observe cell proliferation in Grace's medium. The cellular characterization was obtained by morphological analysis, through a characteristic of the hemocytes in which the cells become elongated due to the recognition of a foreign agent (culture plate); after the measurements, these cells were compared with others found in other studies with bee hemocytes at the same stage of development, allowing to infer that the cultured cells were hemocytes of *A. mellifera* Africanized bee larvae.

Keywords: immune system, hemolymph, total hemocyte count, primary culture of hemocytes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS	14
3. CAPÍTULO 1	15
4. CAPÍTULO 2	43
5. CAPÍTULO 3	64
6. DISCUSSÃO GERAL	84
7. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas desempenham um papel ecossistêmico essencial, já que atuam como as principais polinizadoras de inúmeras espécies vegetais, sejam estas cultivadas ou silvestres. Além disso, grande parte destas plantas participam diretamente da alimentação humana tanto que, em 2018, o valor agregado pela polinização sobre os cultivos agrícolas foi de R\$ 43 bilhões (POTTS *et al* 2010; WOLOWSKI *et al* 2019). No entanto, tem-se observado em todo o mundo uma elevada redução nas populações desses insetos, sejam eles silvestres ou manejados, apesar de nem todas as perdas serem relatadas e/ou documentadas (POTTS *et al* 2010; PIRES *et al* 2016).

A alta taxa de mortalidade das abelhas tem sido relacionada a diversos fatores, como: perda de habitats, diminuição de florestas nativas, redução das áreas de forrageamento e de nidificação, inserção de espécies exóticas, introdução de doenças, competição com as espécies nativas, uso indiscriminado ou incorreto de agrotóxicos, mudanças climáticas, etc. (GOULSON *et al* 2015; BIERMEIJER; SLAA, 2006). Comumente tais fatores atuam em conjunto sobre as colônias, já que desencadeiam inúmeros eventos que culminam no enfraquecimento destas e, conseqüentemente, no seu sistema de defesa (ALAUX *et al* 2010a; BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010; JONES *et al* 2005; NAZZI; PENNACCHIO, 2018; NEGRI *et al* 2017) como, por exemplo, o forrageamento em áreas contaminadas que pode ocasionar a imunossupressão individual e social, e promover um efeito cíclico de enfraquecimento da colônia (BONCRISTIANI *et al* 2012; GREGORC *et al* 2012; NAZZI; PENNACCHIO, 2018; SCHMEHL *et al* 2014).

A imunidade das abelhas conta com um sistema dividido em sistema imune inato e sistema imune social e, assim como todos os insetos, não possuem sistema imune adquirido, uma vez que não possuem memória imunológica e, tampouco, receptores celulares capazes de reconhecer antígenos específicos (LAVINE; STRAND, 2002).

O sistema imune social consiste nas ações coletivas que visam evitar a infecção dos membros de um grupo de insetos, sendo elas: proteger o ninho de insetos contaminados,

evitar locais com fungos ou outros contaminantes, incorporar substâncias químicas anticontaminantes ao ninho, saneamento (limpeza do ninho), aplicação de substâncias antimicrobianas na ninhada, transferência de componentes imunes para os ovos, etc. (MEUNIER, 2015).

O sistema imune inato compreende fatores intrínsecos do indivíduo, permitindo o reconhecimento e morte de invasores. Esse sistema é constituído pelas barreiras físicas, fisiológicas, celulares e inflamatórias, todas bastante desenvolvidas nos insetos. As barreiras físicas são compostas por uma barreira externa formada pelo tegumento (cutícula e epiderme), que atua na proteção contra agentes externos, seguida pelo revestimento e a presença de mucos intestinais, caso haja ingestão de alguma substância ou patógeno nocivo, pela hemolinfa e diversas moléculas citotóxicas, dentre elas, as células de defesa denominadas hemócitos (CRUZ-LANDIM, 2009; LAVINE; STRAND, 2002). Já as barreiras celulares e inflamatórias são responsáveis por dois tipos de reações do sistema imune inato dos insetos, a reação humoral e a reação celular. A reação humoral consiste na coagulação da hemolinfa, melanização e ação de proteínas, enquanto a reação celular está relacionada à atividade dos hemócitos, os quais permanecem circulantes na hemolinfa ou imóveis ao redor de determinados órgãos (ARMSTRONG; MELCHIOR; QUIGLEY, 1996; CRUZ- LANDIM, 2009; KAVANAGH; REEVES, 2004).

Os hemócitos foram caracterizados em 1985, por Gupta, de acordo com sua morfologia, histoquímica e características funcionais e classificados em sete tipos: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos. Estas células desempenham funções como a fagocitose, a nodulação, a encapsulação, a citotoxicidade, a secreção de enzimas e a coagulação da hemolinfa após a ruptura da cutícula e epiderme, que podem variar de acordo com a idade, função, localização e ações hormonais (CRUZ-LANDIM, 2009; GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997; LAVINE; STRAND, 2002).

Apesar da importância e das inúmeras funções desempenhadas no organismo das abelhas, metodologias que avaliem diretamente os impactos ambientais, patológicos ou

tóxicos sobre esses tipos celulares são escassos e grande parte dos estudos são voltados à sua caracterização e quantificação, sendo a última dividida em dois tipos: a contagem total, que representa o número total de hemócitos por mm³ de hemolinfa; e a contagem diferencial, que mostra a quantidade ou porcentagem de cada tipo de célula no material amostrado (CRUZ-LANDIM, 2009). Tais metodologias permitem inferir como agentes bióticos (patógenos, parasitas, etc.) e abióticos (agrotóxicos, alterações ambientais, etc.) afetam a capacidade de defesa desses insetos.

Alguns fatores abióticos, como os inseticidas, acaricidas e fungicidas são capazes de alterar o número de hemócitos circulantes, a atividade humoral, a regulação de fatores de transcrição responsáveis por respostas antivirais, a superexpressão de enzimas de detoxificação, bem como tornarem as abelhas susceptíveis a diversos patógenos (ALAUX *et al* 2010b; BRANDT *et al* 2016; BRANDT *et al* 2017; DOMINGUES *et al* 2017; GARRIDO *et al* 2013a; MASON; TENNEKES; SÁNCHEZ-BAYO, 2013; TAVARES *et al* 2017; VIDAU *et al* 2011). Além disso, fatores bióticos como ácaros, bactérias e fungos, também podem causar alterações no número de hemócitos, na atividade humoral, promover suscetibilidade a outras doenças, alterar a expressão de genes da imunidade e reduzir a concentração de proteínas relacionadas ao sistema imune (ALAUX *et al* 2010b; BULL *et al* 2012; BURRITT *et al* 2016; GILLIAM; SHIMANUKI, 1967; GREGORC *et al* 2012; KOLEOGLU *et al* 2018; LÓPEZ *et al* 2017; TAVARES *et al* 2017). Sendo assim, as avaliações desses efeitos sobre o sistema imune das abelhas são essenciais, já que permitem compreender as causas do enfraquecimento e perda das colônias de abelhas e como elas atuam nos organismos desses insetos.

Entretanto, técnicas que permitam avaliações mais específicas, tanto celulares quanto moleculares dos efeitos de diferentes fatores bióticos (ex.: doenças) e abióticos (ex.: agrotóxicos), sobre os sistemas das abelhas, como o sistema imune, são necessárias. Uma opção viável são as técnicas de cultivo *in vitro* que, além de garantir uma maior especificidade aos experimentos, permite também controlar as variáveis experimentais,

tornando os experimentos facilmente reprodutíveis além de mais rápidos, quando comparados aos experimentos *in vivo* (ALVES; GUIMARÃES, 2010; ROGERO *et al* 2003).

Essa área de pesquisa se mostra bastante próspera desde 1917 com o primeiro estudo simples realizado com tecidos cultivados diretamente na hemolinfa ou com soluções salinas (GLASER, 1917). Atualmente há mais de 500 linhagens celulares estabelecidas, que estão envolvidas em diversos processos biológicos (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; SMAGGHE; GOODMAN; STANLEY, 2009). Contudo, não há muitos relatos de cultura de hemócitos tanto em abelhas quanto em outros insetos, sendo que a grande maioria das culturas celulares são feitas com células de insetos das ordens Lepidoptera e Diptera (LYNN, 2001). Um trabalho realizado por Muller e colaboradores (1999) estabeleceu uma linhagem celular de hemócitos do mosquito *Anopheles gambiae* (vetor da Malária), que permaneceu viável por 2 anos, visando estudos *in vitro* com hormorregulação e expressão gênica imuno-regulada da interação patógeno e inseto. Gateff e colaboradores (1998) realizam estudos com hemócitos de mutantes homozigotos de *Drosophila* que, ao reagirem com genes supressores de tumor sanguíneo, apresentavam hipertrofia de órgãos hematopoiéticos e proliferação excessiva de hemócitos. Samakovlis e colaboradores (1992) conseguiram estabelecer uma linhagem celular de *Drosophila* testando o mesmo gene supressor de tumor supracitado, que causou uma resposta imune ativando 60% das células e diversas reações em cascata.

Apesar de existirem diversas culturas primárias e secundárias de células de abelha, ainda não foi determinada uma linhagem celular (GENERSCH *et al* 2013), bem como as pesquisas com hemócitos de abelhas também é escasso. Alguns pesquisadores, como Negri e colaboradores (NEGRI *et al* 2012; NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014; NEGRI *et al* 2015) trabalham com hemócitos e hemolinfa extraídos de abelhas adultas e larvas, com intuito de demonstrar o efeito de patógenos, dietas e ferimentos na cutícula, diretamente sobre o sistema imune das abelhas. Contudo, suas pesquisas não possuem o objetivo de manter uma cultura primária por um longo período de tempo, mas sim fazer análises em períodos inferiores a 24 horas. Portanto, o presente trabalho buscou padronizar métodos confiáveis e

em condições controladas para o cultivo de hemócitos *in vitro* utilizando *A. mellifera* (híbrido africanizado) por um período de tempo que permita posteriormente a análise do efeito de diferentes ingredientes ativos diretamente sobre o sistema imune das abelhas, sendo escolhido o período de 96 horas que, foi estabelecido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (1998a, 1998b, 2013) como o período máximo para a determinação dos danos e mortes causados pelos agrotóxicos sobre as abelhas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estabelecer um método para o cultivo *in vitro* de hemócitos de abelhas *Apis mellifera* africanizada para posteriores estudos de toxicidade.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as variações na quantidade de hemócitos de abelhas em diferentes estágios de desenvolvimento frente às oscilações de temperatura que são comumente observadas em regiões com clima tropical, a fim de estabelecer o melhor estágio de desenvolvimento e as melhores condições de coleta dos indivíduos para obtenção dos hemócitos;
- Padronizar uma técnica de extração de hemolinfa de larvas de abelha *A. mellifera* livre de contaminações;
- Comparar os meios Grace, Schneider e Leibovitz's L-15 para cultura de hemócitos quanto a sua executabilidade, tempo de manutenção da cultura e viabilidade celular;
- Confirmar, por meio de análises morfológicas, o tipo celular cultivado *in vitro*.

3. CAPÍTULO 1

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na revista **PLoS One** portanto, está editado conforme as normas da revista.

A high quality and uncontaminated method for hemolymph collection from larvae honeybees

Nicole Pavan Butolo^{1,*}, Patricia Azevedo^{2,*}, Luciano Delmondes de Alencar², Caio E. C. Domingues¹, Lucas Miotelo¹, Osmar Malaspina¹, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli³

¹Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brazil.

²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP), Campinas, SP, Brazil.

³Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brazil.

***Corresponding authors:** nicole.butolo@gmail.com (NPB); azevedo.p89@gmail.com (PA).

Resumo

O drástico declínio de abelhas tem sido associado à diversos fatores, dentre eles a supressão do sistema imunológico devido ao exacerbado uso de agrotóxicos. Um método bastante utilizado para avaliar tais impactos sobre o sistema imunológico desses insetos é a contagem de hemócitos circulantes na hemolinfa; contudo, a extração de hemolinfa de larvas mostra-se bastante dificultosa, uma vez que o material coletado comumente apresentar contaminações com outros tecidos e fluídos gastrointestinais, o que inviabiliza e dificulta a contagem. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um método de extração de hemolinfa de larvas de abelha *Apis mellifera* com alta qualidade e facilmente reprodutível. Foram testados os seguintes métodos de extração: agulha 30G, pinças de ponta fina, seringa hipodérmica, capilares e tesoura oftalmológica. A hemolinfa foi obtida por uma incisão na região lateral direita da larva para todos os métodos, exceto com a extração da tesoura oftalmológica em que a hemolinfa foi extraída da região da cabeça da larva. A fim de avaliar a pureza do material coletado, a análise de turbidez das amostras com o auxílio do turbidímetro foi proposta, testada e avaliada. Os resultados mostraram que, dentre todos os métodos de extração testados, o método de extração com o uso da tesoura oftalmológica foi o que proporcionou as amostras mais límpidas e livre de contaminações, além de permitir a coleta de uma maior quantidade de hemolinfa (aproximadamente 20 μ L). Portanto, estabeleceu-se uma faixa de referência entre 22.432,35 a 24.504,87 NTUs (unidades nefelométricas de turbidez), na qual as amostras coletadas podem ser consideradas de alta qualidade e livres de contaminação.

Palavras chave: método de extração, turbidimetria, sistema imunológico, valores de referência, incisão em tesoura.

Introdução

A abelha *Apis mellifera* é mundialmente utilizada como organismo modelo em diversos estudos, já que é uma espécie amplamente conhecida biologicamente, possui abrangente distribuição geográfica, é facilmente manejada e mantida em laboratórios, é um ótimo indicador de qualidade ambiental e o visitante mais frequente em culturas agrícolas [1, 2, 3]. Sendo assim, diversas pesquisas em diferentes áreas do conhecimento utilizam essa espécie, dentre eles estudos que avaliam os impactos causados por agrotóxicos [4, 5, 6, 7], as interações hospedeiro – parasita [8, 9, 10, 11, 12, 13], ensaios comportamentais [14, 15, 16] e, em nível molecular nas áreas de genômica, transcriptômica e epigenética [17, 18, 19, 20].

Apesar de sua importância, o declínio de suas populações tem aumentado drasticamente devido, principalmente, a perda e fragmentação de habitats, queimadas, desmatamento, aumento de parasitas e doenças, mudanças climáticas e principalmente pelo uso intensivo de agrotóxicos [2, 21, 22, 23, 24]. Os agrotóxicos agem em diferentes sistemas nesses insetos, sendo que o sistema imunológico, por ser o primeiro sistema de defesa de um organismo, é extremamente afetado. Além disso, as abelhas possuem um sistema imunológico altamente sensível quando comparadas a outros insetos, com apenas 2/3 dos genes de imunidade [25].

Caso um agente ou molécula estranho ultrapasse os primeiros obstáculos do sistema imune inato dos insetos, as barreiras físicas, as reações humorais e celulares serão os próximos mecanismos a serem ativados [26, 27, 28]. A reação humoral consiste na melanização da hemolinfa devido a processos oxidativos e ação de proteínas, enquanto a reação celular consiste na ação de células de defesa, os hemócitos, que desempenham diversas funções como: fagocitose, nodulação, encapsulação, secreção de enzimas, coagulação da hemolinfa, transporte de nutrientes [26, 29, 30].

A hemolinfa das abelhas é composta por diversas proteínas e os diferentes tipos de hemócitos [31, 32, 33, 34, 35, 36]. As concentrações de hemócitos variam de acordo com os

estágios de desenvolvimento e a casta das abelhas, sendo que em larvas normalmente se encontra uma concentração de 10.000 hemócitos/mL de hemolinfa [37], em operárias e zangões 21.000 hemócitos/mL de hemolinfa [38] e em rainhas 1.000 a 4.000 hemócitos/mL de hemolinfa [26]. Desta maneira, um método bastante utilizado para avaliar diferentes impactos sobre o sistema imune das abelhas é a contagem dos hemócitos circulantes na hemolinfa.

Pesquisas constataram que em colônias expostas aos agrotóxicos imidacloprido, tiametoxam, tiacloprido e fipronil houve um aumento do número de hemócitos circulantes na hemolinfa de abelhas adultas de *A. mellifera* como resposta imediata do sistema imune para defesa do organismo [39, 40, 41]. Em contrapartida, experimentos de exposição prolongada de abelhas adultas e rainhas ao tiacloprido, imidacloprido e clotianidina indicaram uma redução no número de hemócitos e na atividade oxidativa da hemolinfa; essa variação na quantidade de hemócitos se dá pela idade das abelhas, casta, dose do inseticida e tempo de exposição [27, 42]. Ainda, o parasitismo pelo ácaro *Varroa* causa redução no número de hemócitos, proteínas e enzimas da hemolinfa [43, 44], bem como a contaminação pelo fungo *Nosema ceranae* [40]. Além disso, pesquisas relataram alteração na atividade do sistema imune em larvas de abelhas *A. mellifera* expostas a agrotóxicos, como superexpressão de enzimas de detoxificação [45] e a susceptibilidade a vírus [46], também as larvas de abelhas nativas brasileira *Melipona scutellaris* mostraram-se 320 vezes mais sensíveis do que as larvas de *A. mellifera* quando expostas ao inseticida dimetoato [47].

Contudo, apesar de estudos que avaliam os impactos no sistema imunológico das abelhas serem importantes e esclarecedores, eles acabam sendo prejudicados ou evitados devido à dificuldade da extração de um material de qualidade e sem contaminações, uma vez que, se não isolada corretamente, a hemolinfa pode ser contaminada por outros tecidos, o que prejudica estudos celulares e moleculares. No estágio larval essa dificuldade mostra-se ainda maior, já que a manipulação do material biológico precisa ser minuciosa para que não haja dano aos tecidos e consequente perda do material, além de haver grande quantidade de corpo gorduroso na larva, o que dificulta ao isolamento adequada dos mesmos [48].

Existem diferentes técnicas de extração da hemolinfa no estágio larval descritas na literatura, dentre elas puncionar o abdômen com um capilar fino [49], fazer uma pequena incisão no segundo terço lateral da larva [36], puncionar a cutícula com auxílio de pinças finas [28], puncionar a cutícula com uma fina agulha hipodérmica (calibre 30) [50, 51], ou então perfurar a cutícula lateral com um alfinete de 0.45mm de diâmetro [52]. Entretanto, após a execução de todas essas técnicas em laboratório, nenhuma mostrou-se suficientemente desejável no que diz respeito à pureza da hemolinfa. Sendo assim, o presente trabalho objetivou padronizar uma técnica de extração de hemolinfa de larvas de abelha *A. mellifera* livre de contaminações, sejam elas por corpo gorduroso ou por fluídos gastrointestinais. Além disso, uma comparação entre todos os métodos de extração de hemolinfa de larvas foi realizada, a fim de demonstrar suas dificuldades, viabilidade e pureza do material coletado.

Material e métodos

Pesquisas com invertebrados não necessitam de aprovação do comitê de ética no Brasil.

Material biológico

Favos de abelhas *A. mellifera* africanizada contendo larvas em quinto instar em fase pré-defecantes, quando ainda é possível observar o intestino repleto de material com coloração amarelada (alimento) [26], foram coletados de três colônias não parentais e livres de doenças e parasitas, localizadas no apiário do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil (Latitude: 22°23'48.1"S; Longitude: 47°32'33.1"W). Posteriormente, os favos foram acondicionados em estufa incubadora, com temperatura regulada a 34°C (± 2) e umidade a 80% (± 5), no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP.

Técnicas de extração da hemolinfa

Materiais utilizados na extração

Para as diferentes técnicas de extração testadas foram utilizados diferentes materiais, dentre eles: pinça histológica de ponta fina de 11cm confeccionada em aço inoxidável (Argos®, modelo 1040), capilares (0,22mm Drummond Microcaps® e de 0,8-1,1mm Kimax Capillary®), agulha 30G, seringa hipodérmica de 1mL e tesoura oftalmológica de 9cm confeccionada em aço inoxidável (Argos®, modelo 4004).

Vale ressaltar que para amostras estéreis as extrações devem ser realizadas em câmara de fluxo laminar, com material previamente esterilizado por luz ultravioleta durante 25 minutos. Além disso, recomenda-se a desinfecção das larvas por meio de imersão em álcool 70% durante 1 minuto e, posteriormente, lavagem por imersão em água autoclavada durante 1 minuto por duas vezes; deixá-las secar sobre papel filtro autoclavado durante aproximadamente 2 minutos [53, 54] ou realizar a criação de larvas *in vitro* em ambiente estéril.

Extração com uso de agulha 30G

A técnica de extração de hemolinfa de larvas com o uso de agulha 30G [50, 51] foi realizada com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL acoplada a uma agulha fina hipodérmica. As larvas foram imobilizadas entre os dedos indicador e polegar da mão não dominante do pesquisador, a fim de expor a lateral da larva (usualmente a lateral direita), e a agulha foi inserida na cutícula lateral da mesma. Uma leve pressão foi aplicada ao corpo da larva para que o conteúdo na lateral extravasasse e, com auxílio de uma micropipeta automática, a hemolinfa foi coletada a partir do orifício puncionado e acondicionada em tubos de polipropileno para posterior análise (Fig 1A e 1B).

Extração com uso de pinça com ponta fina

Para a extração da hemolinfa com o uso de pinça de ponta fina de 11cm confeccionada em aço inoxidável (Argos®, modelo 1040), as larvas foram imobilizadas como a técnica de imobilização descrita no item 3.2.1, afim de expor a lateral da larva e, com o auxílio de uma pinça de ponta fina a cutícula lateral da larva foi puncionada [28]. Uma leve pressão foi aplicada para que a hemolinfa extravasasse pelo orifício aberto, o conteúdo exposto foi coletado com o auxílio de uma micropipeta automática e acondicionado em tubo de polipropileno para posterior análise (Fig 1C e 1D).

Extração com o uso seringa

A extração de hemolinfa de larvas utilizando-se uma seringa foi testada, a fim de avaliar a viabilidade e facilidade da mesma. Vale ressaltar que esta técnica não é descrita na literatura. Para tanto, utilizou-se a técnica de imobilização descrita no item 3.2.1, a fim de expor a lateral da larva e a agulha 30G, previamente acoplada a uma seringa hipodérmica, foi inserida na cutícula lateral da larva. A hemolinfa foi então aspirada com o auxílio da seringa e acondicionada em tubos de polipropileno para posterior análise (Fig 1E e 1F).

Extração com o uso de capilares

A extração da hemolinfa por meio de capilares foi testada segundo proposto por Randolt et al. [49]. Sendo assim, utilizou-se a técnica de imobilização descrita no item 3.2.1, e o capilar foi inserido na lateral exposta da mesma, até que a cutícula fosse rompida. O conteúdo interno foi coletado por diferença de pressão e retirado com o auxílio de um bulbo de borracha. Foram utilizados dois tamanhos de capilares: de 0,22mm (Drummond Microcaps®) e de 0,8-1,1mm (Kimax Capillary®) (Fig 1G e 1H).

Extração com o uso de tesoura oftalmológica

A extração da hemolinfa de larvas utilizando-se a tesoura oftalmológica de 9cm confeccionada em aço inoxidável (Argos®, modelo 4004) foi testada e, diferentemente das

outras técnicas descritas, a hemolinfa não é retirada por meio de punção lateral e sim por meio de uma pequena incisão na região da cabeça. A presente técnica não foi descrita na literatura e está sendo proposta de forma inédita neste trabalho.

Inicialmente, a larva foi mantida imóvel de acordo com técnica de imobilização descrita no item 3.2.1, e a região da cabeça foi totalmente exposta (Fig 1I e 1J). Posteriormente, uma pequena incisão foi realizada na cutícula correspondente à região da cabeça da larva e procedeu-se com a aplicação de uma leve pressão sobre o corpo até o extravasamento da hemolinfa. O líquido foi coletado com o auxílio de uma micropipeta automática e acondicionado em tubo de polipropileno para posterior análise. Vale ressaltar que a punção também pode ser realizada com uma pinça de ponta fina (Argos®, modelo 1040), contudo, a tesoura proporciona maior precisão e não causa debridaç o tecidual, garantindo maior qualidade da amostra e agilidade na extração.

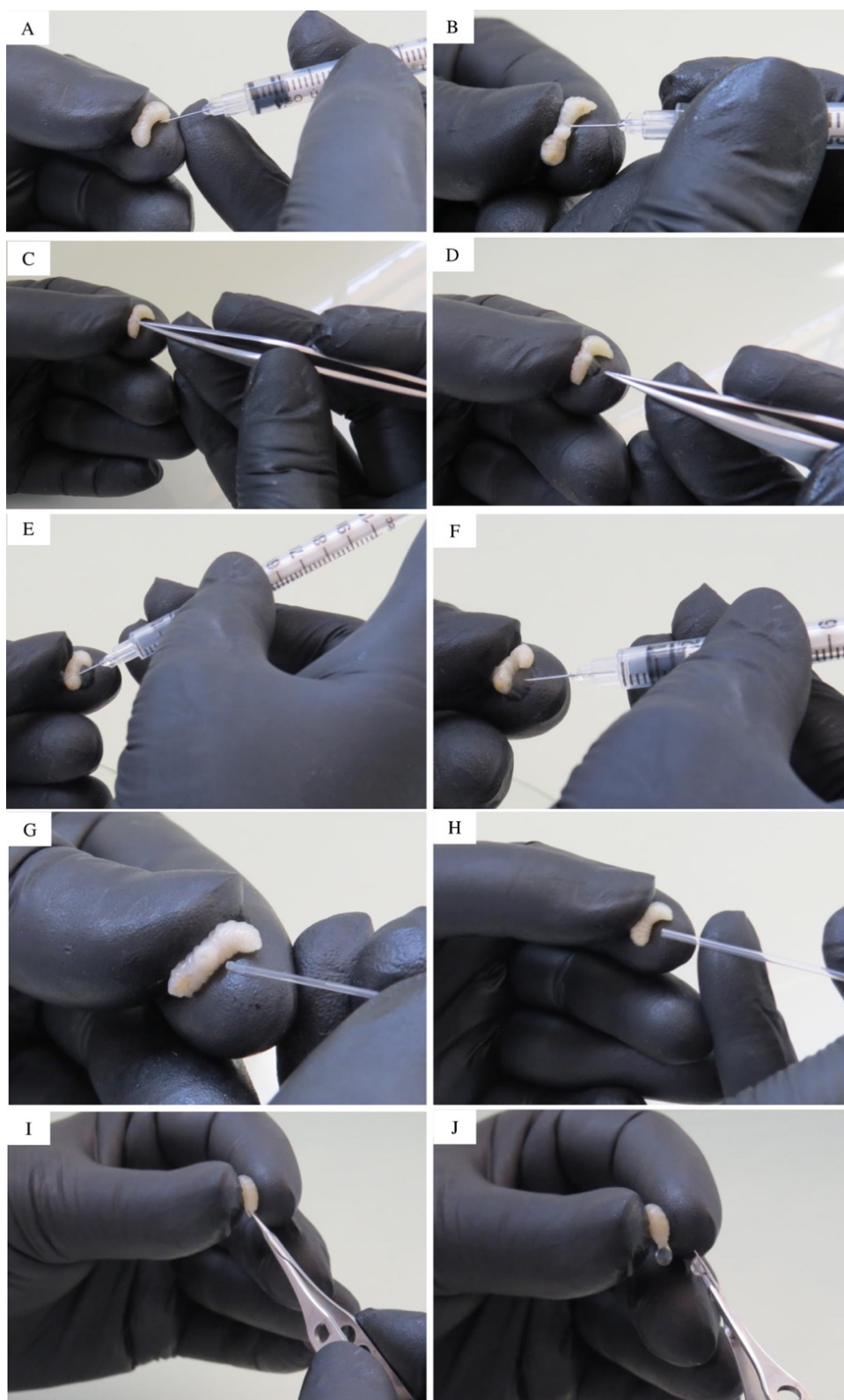


Fig 1. Diferentes técnicas de extração da hemolinfa de larvas de quinto instar de *A. mellifera* africanizada. (A e B) Extração da hemolinfa de larvas com o uso de agulha 30G; (C e D) Extração da hemolinfa de larvas com o uso de pinça de ponta fina; (E e F) Extração da hemolinfa de larvas com o uso de seringa hipodérmica; (G) Extração da hemolinfa de

larvas com o uso de capilar de 0,22mm; (H) Extração da hemolinfa de larvas com o uso de capilar de 0,8-1,1mm; (I e J) Extração da hemolinfa de larvas com o uso de tesoura oftalmológica.

Avaliação da viabilidade das diferentes técnicas de extração

Microscopia de luz

Após extraídas, amostras de hemolinfa proveniente das diferentes técnicas de extração foram avaliadas e fotomicrografadas sob microscópio de luz (OLYMPUS®, modelo BX51). Para isso, as amostras foram coradas com azul de metileno 0,2% na proporção 1:1 (5 µL de azul de metileno e 5 µL de amostra) e observadas em câmara de Neubauer (Marienfield, Lauda-Königshofen®, Germany).

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital (OLYMPUS®, modelo DP-71) adaptada ao microscópio e a um computador (Dell®). Para a aquisição das imagens utilizou-se o software DP Controller®.

Dosagem do teor proteico – método de Bradford

A fim de determinar a concentração de proteínas presentes nas amostras extraídas a partir de cada uma das técnicas, realizou-se o método de Bradford [55]. Inicialmente, fez-se uma curva de calibração a partir do padrão de albumina de soro bovino (BSA) com concentração previamente conhecida. Posteriormente, adicionou-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad®) a 0,01% e realizou-se a leitura em leitora de placa (Hexis®, modelo Versamax) a 595nm.

Para as análises das amostras de hemolinfa, provenientes das diferentes técnicas de extração testadas, utilizou-se 10µL de hemolinfa diluída em 990µL de água destilada (diluição de 100x). Utilizou-se 5µL das amostras diluídas de hemolinfa, que foram dispostas em uma placa de 96 poços juntamente com 195µL do reagente proteico adicionados. Após 10 minutos da reação em temperatura ambiente fez-se a leitura em leitora de placas a 595nm.

Os valores obtidos foram analisados e comparados com a curva de calibração, a fim de estabelecer a concentração de proteínas presentes nas amostras.

Quantificação do grau de turvação da amostra

Método do Turbidímetro

A análise de turbidez das amostras foi proposta já que as diferentes técnicas de extração apresentaram hemolinfa com diferentes propriedades, desde a ocorrência de sólidos até amostras leitosas. Para isso utilizou-se um turbidímetro (Hach®, modelo 2100Q) previamente calibrado de acordo com as indicações do fabricante. Vale ressaltar que foram utilizados os padrões de formazina em diferentes concentrações de NTU (unidades de turbidez nefelométricas), sendo elas: 20 NTU, 100 NTU, 800 NTU e, após a calibração, 10 NTU para confirmação da calibração. Posteriormente, procedeu-se as leituras das amostras de hemolinfa extraídas de acordo com as diferentes técnicas mencionadas. Para tanto, as amostras foram diluídas 2.500 vezes, para que a leitura se enquadrasse na faixa de leitura do aparelho, adicionando 10 µL de hemolinfa (extraída de uma larva) a 24.990 µL de água destilada, totalizando 25mL, volume este necessário para a leitura no turbidímetro. Após as leituras, os valores obtidos em NTU foram multiplicados pelo fator de diluição afim de se obter o valor real em NTUs de turbidez. No total foram realizadas 30 leituras (30 larvas) de hemolinfas extraídas de cada uma das diferentes técnicas testadas. Além disso, para confirmar a robustez e reprodutibilidade dos testes, as extrações de acordo com as diferentes técnicas, bem como as leituras no turbidímetro, foram repetidas em três dias diferentes totalizando 90 leituras para cada técnica.

Análises estatísticas

As análises de turbidez e de quantificação de proteína realizadas para as diferentes técnicas de extração foram comparadas utilizando-se o programa R (R Core Team). Primeiramente, os dados obtidos foram submetidos à análise ANOVA e, verificando a

normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk (paramétricos), posteriormente foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro ($p < 0,005$). Além disso, os valores de referências estabelecidos para as análises de turbidez (método do turbidímetro) também foram gerados utilizando-se o programa R (R Core Team).

Resultados

Avaliação da viabilidade das diferentes técnicas de extração

Microscopia de luz

Após a extração da hemolinfa das larvas de quinto instar de *A. mellifera* africanizada, utilizando-se as diferentes técnicas propostas, observou-se uma turbidez elevada (Fig 2) em grande parte das amostras, invalidando as propriedades físicas desejáveis na hemolinfa que são a limpidez e a translucidez, conforme descrito na literatura [26]. Sendo assim, tais variações na turbidez foram avaliadas, a fim de confirmar os diferentes tipos celulares presentes nas amostras, através da visualização sob microscópio de luz e contagem em câmara de Neubauer. Notou-se que as massas responsáveis por deixar as amostras turvas e leitosas consistiam em partes do corpo gorduroso das larvas [56].

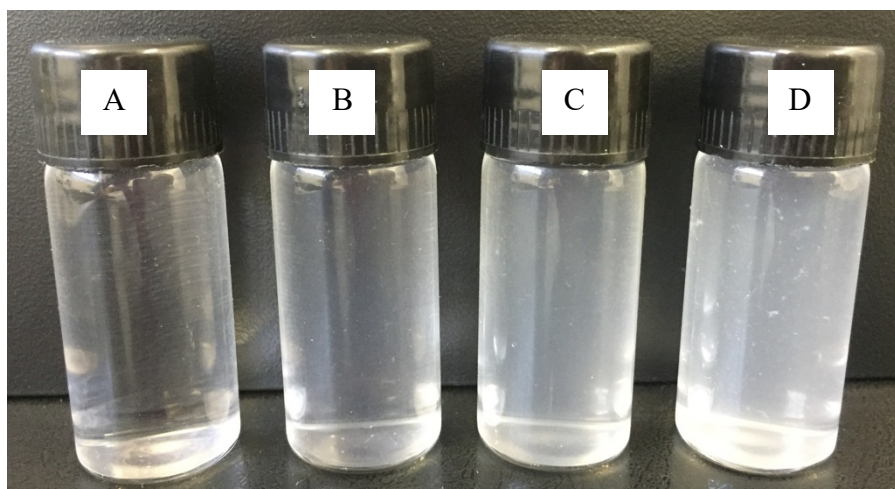


Fig 2. Turbidez observada visualmente nas diferentes amostras de hemolinfa de larvas em quinto instar extraídas a partir das diferentes técnicas de extração propostas e diluídas 2.500 vezes em água destilada. (A) Extração da hemolinfa com auxílio de tesoura

oftalmológica; (B) Extração da hemolinfa com auxílio de seringa hipodérmica; (C) Extração da hemolinfa com auxílio de agulha 30G (D) Extração da hemolinfa com o auxílio de pinça com ponta fina. As quatro diferentes amostras foram diluídas 2.500x para visualização no microscópio de luz de campo claro.

As fotomicrografias permitem observar que a hemolinfa obtida pela técnica de extração com a pinça de ponta fina (Fig 3C e 3D) possui mais materiais particulados quando comparada com as imagens que mostram as técnicas de extração que utilizam a agulha 30G (Fig 3A e 3B) e seringa hipodérmica (Fig 3E e 3F). As fotomicrografias obtidas pela técnica de extração com o auxílio da seringa permitem inferir que o material particulado da amostra está mais disperso, o que dificulta a visualização da mesma. Provavelmente, a sucção da seringa durante a retirada da hemolinfa pode ter homogeneizado a amostra e promovido a lise celular e, conseqüentemente, mistura dos materiais. Finalmente, as amostras de hemolinfa obtidas pela técnica da retirada com a tesoura oftalmológica mostraram-se as mais viáveis, uma vez que além de serem as menos turvas visualmente, não apresentaram células provenientes de outros tecidos bem como materiais contaminantes, além de serem as mais fáceis de avaliar nas fotomicrografias obtidas (Fig 3G e 3H). A extração realizada pela técnica dos capilares foi inviável, já que os capilares ficavam entupidos logo após a perfuração da cutícula larval, o que inviabilizou a observação das amostras retiradas a partir desta técnica (S1 Vídeo 1 e S2 Vídeo 2).

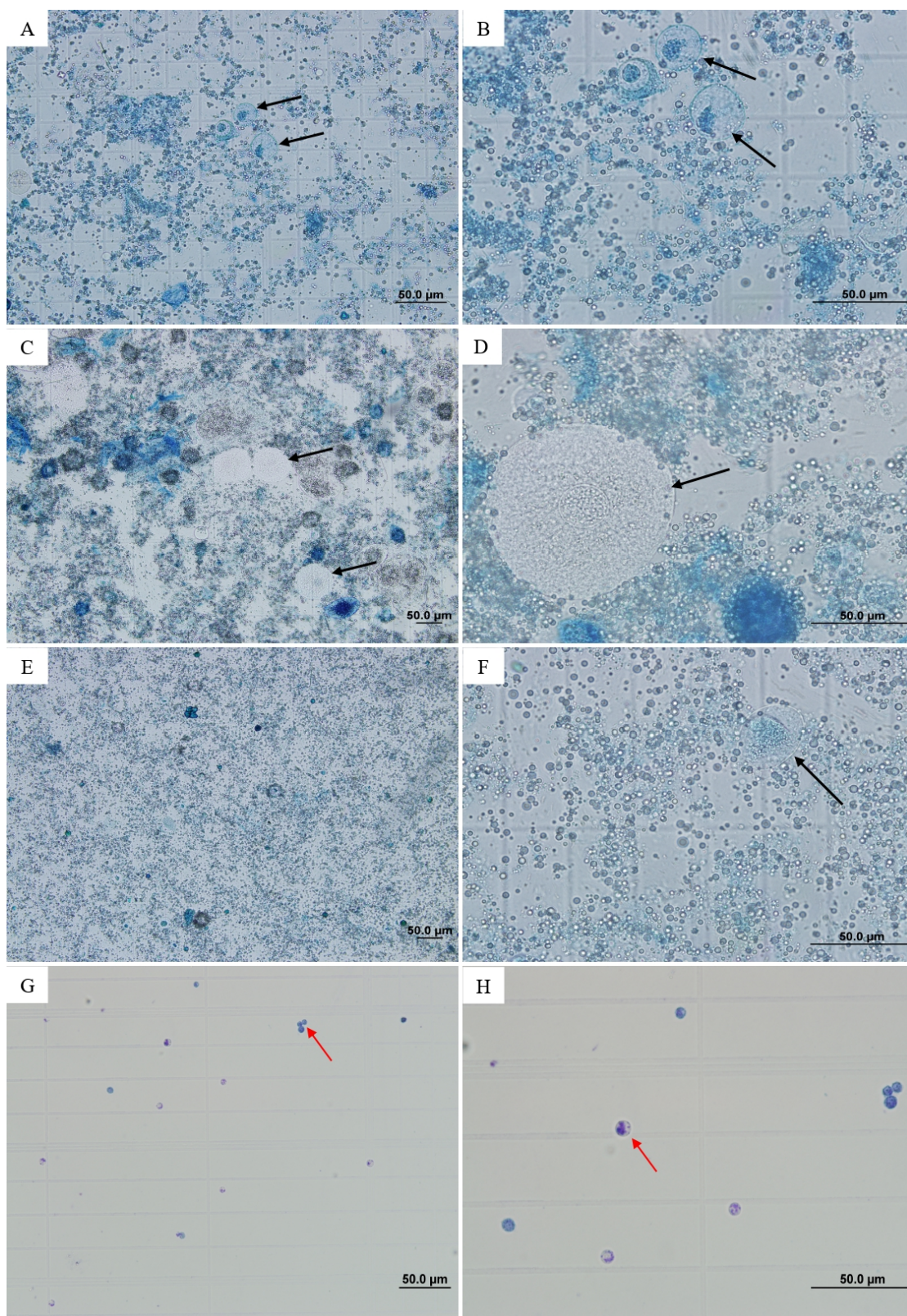


Fig 3. Fotomicrografias da câmara de Neubauer contendo amostras de hemolinfa de larvas de quinto instar de *A. mellifera* obtidas pelas diferentes técnicas de extração e coradas com azul de metileno 0,2%. (A) Extração com o uso de agulha 30G no aumento de 100x; (B) Extração com o uso de agulha 30G no aumento de 400x; (C) Extração com o uso de pinça de ponta fina no aumento de 100x; (D) Extração com o uso de pinça de ponta fina no aumento de 400x; (E) Extração com o uso de seringa hipodérmica no aumento de

100X; (F) Extração com o uso de seringa hipodérmica no aumento de 400x; (G) Extração com o uso de tesoura oftalmológica no aumento de 200x; (H) Extração com o uso de tesoura oftalmológica com aumento de 400x. Setas pretas indicam células do corpo gorduroso. Setas vermelhas indicam os hemócitos.

Dosagem do teor proteico – método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas nas amostras extraídas por meio das diferentes técnicas propostas não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, avaliados ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,005$) (Fig 4). Segundo a hipótese inicial, a elevada quantidade de diferentes tipos celulares, bem como de diferentes tecidos e/ou de contaminações poderiam elevar o teor proteico das amostras turvas, quando comparadas com as amostras límpidas. Contudo, a quantificação de proteínas não foi capaz de diferir os grupos de amostras obtidas a partir das diferentes técnicas de extração e, portanto, a hipótese inicial foi refutada.

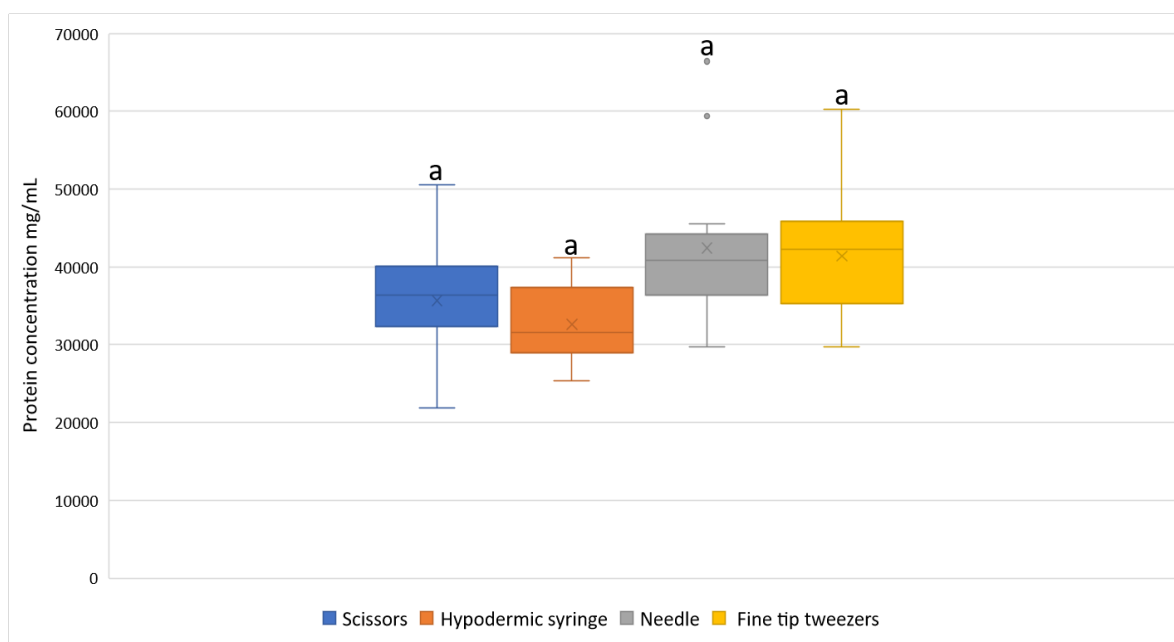


Fig 4. Boxplots comparando as concentrações de proteínas em mg/mL (método de Bradford) das amostras de hemolinfa de larvas de quinto instar de *A. mellifera* obtidas a partir das diferentes técnicas de extração. Boxplots seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ($p < 0,005$). Scissors:

tesoura; Hypodermic syringe: seringa hipodérmica; Needle: agulha; Fine tipe tweezers: pinça de pontas finas.

Quantificação do grau de turvação das amostras

Método do Turbidímetro

Todas as leituras de turbidez das amostras proveniente das diferentes técnicas de extração de hemolinfa de larvas de *A. mellifera* mostraram diferenças estatísticas entre si, ao nível de significância de 0,01% ($p < 0,001$), porém não apresentaram diferenças entre os dias em que foram realizadas as análises (Tabela 1).

Tabela 1. Valores das medidas de turbidez das amostras em NTUs. Comparação entre os três dias de coletas de amostras testadas em turbidímetro, entre as quatro diferentes técnicas testadas para a extração da hemolinfa

Tratamentos	NTU dia 1	NTU dia 2	NTU dia 3
Tesoura oftalmológica	23992 d	23391 d	23600 d
Pinça de ponta fina	176442 a	179216 a	176675 a
Agulha 30G	120200 b	122000 b	120950 b
Seringa hipodérmica	78683 c	802667 c	78475 c
CV %	6.1876	6.1449	5.2375
HSD	4158.40	4188.95	3522.41
p Valor	<0.001	<0.001	<0.001

As médias seguidas pela mesma letra da coluna não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey.

As amostras de hemolinfa de larvas extraídas com pinça de ponta fina apresentaram uma média aproximada de 177.44 NTUs. Já as amostras de hemolinfa extraídas de larvas com a agulha 30G apresentaram uma média aproximada de turbidez de 121.050 NTUs, enquanto as amostras de hemolinfa de larvas extraídas com a seringa apresentaram uma média de turbidez aproximada de 79.141 NTUs. Finalmente, a técnica de extração de

hemolinfa de larvas utilizando-se a tesoura apresentou uma média de turbidez de 23.661 NTUs mostrando-se, dentre todas as técnicas de extração testadas, a menos turva e, consequentemente, com a menor quantidade de material sólido suspenso, bem como a técnica que permitiu a coleta da maior quantidade de hemolinfa, aproximadamente 20 μL (Tabela 2).

Tabela 2. Volumes de hemolinfa extraídos em cada uma das técnicas. Comparação entre os volumes de hemolinfa entre as quatro técnicas de extração

Tratamento	Volume de hemolinfa
Tesoura oftalmológica	20 μL
Pinça de ponta fina	<10 μL
Agulha 30G	10 μL
Seringa hipodérmica	10 μL

Além disso, os testes foram repetidos por mais duas vezes, a fim de confirmar sua robustez e reprodutibilidade. De acordo com as análises estatísticas, a leitura de turbidez das amostras extraídas com a tesoura oftalmológica em três dias diferentes (réplica experimental) não apresentou diferença significativa ao nível de 1% ($p < 0,001$) (Fig 5), confirmando a replicabilidade do método.

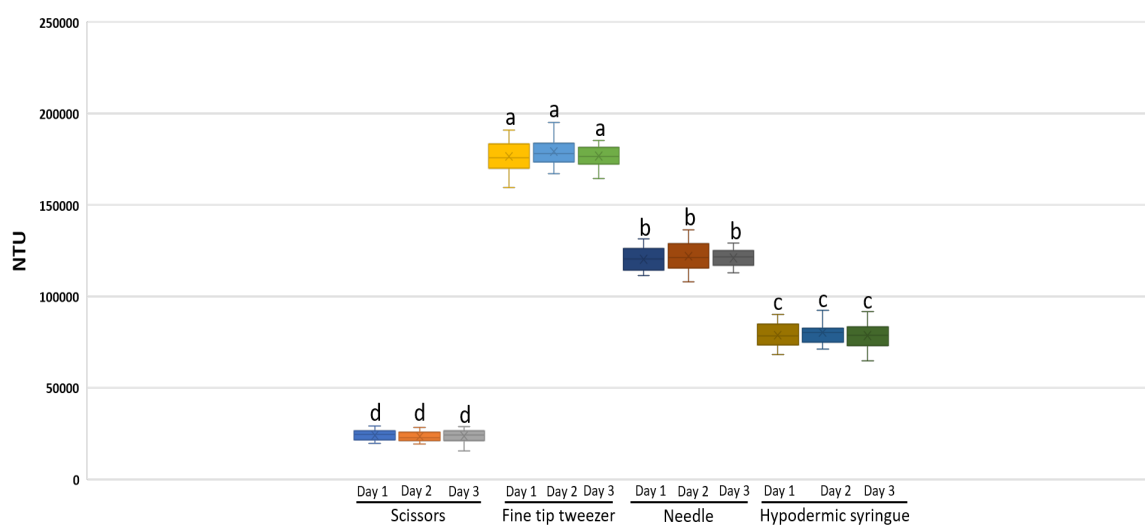


Fig 5. Boxplots comparando a turbidez das amostras de hemolinfa extraídas a partir dos diferentes métodos de extração de hemolinfa de larvas de quinto instar de *A.*

mellifera testados, em três dias diferentes. Boxplots seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,01% de probabilidade ($p < 0,001$). Scissors: tesoura; Hypodermic syringe: seringa hipodérmica; Needle: agulha; Fine tipe tweezers: pinça de pontas finas.

Determinação do valor de referência

A fim de estabelecer um teste rápido e acessível para verificar a pureza da hemolinfa extraída a partir de larvas em quinto instar, um intervalo de confiança (IC) foi calculado, tomando como base os valores de turbidez obtidos das amostras cuja hemolinfa foi extraída com o auxílio de tesoura oftalmológica, já que foram as que se mostraram menos turvas ou contaminadas com outros tecidos, de acordo com as fotomicrografias avaliadas. Entretanto, intervalos de referência não existem para o tipo de leitura proposta, e poucos são os estudos que envolvem valores de referência em invertebrados. Assim, utilizaram-se métodos descritos para vertebrados [57, 58] que também foram brevemente descritos de forma bastante semelhante para invertebrados [59] a fim de se obter um valor de referência a ser utilizado como parâmetro de avaliação da pureza da hemolinfa.

O valor de referência foi determinado a partir do intervalo de confiança calculado com base nos valores de NTUs obtidos das leituras no turbidímetro, para as amostras extraídas com tesoura oftalmológica. Sendo assim, a média dos NTUs foi de 23.468 ± 1.036 (desvio padrão), ou seja, o intervalo de confiança para que a leitura dada em NTU seja aceitável como uma hemolinfa límpida e pura é de 22.432 até 24.504.

Discussão

Após as análises dos diferentes métodos de extração da hemolinfa de larvas em quinto instar de *A. mellifera* africanizada, comprovou-se que o método mais eficaz foi o da extração com tesoura oftalmológica, realizando uma pequena incisão na região da cabeça. Além de mais rápido e menos susceptível à contaminação, uma vez que o contato com a mão

do pesquisador e a mistura de outros tecidos da própria larva com a hemolinfa coletada tornam-se mais improváveis, as amostras apresentaram uma pureza e qualidade significativamente maior quando comparadas com os outros métodos de extração. A técnica de extração de hemolinfa de larvas proposta também permitiu a retirada de uma quantidade maior de hemolinfa, aproximadamente 20 μ L, quando comparada às outras técnicas que não passam de 10 μ L.

A dificuldade de manejo e punção na larva de *A. mellifera* acontece, principalmente, pelo estágio de desenvolvimento do inseto. No quinto instar larval a cutícula não está totalmente esclerotizada, o que dificulta sua manipulação, bem como órgãos e sistemas que não estão totalmente desenvolvidos e delimitados [60]. Também é um estágio que se caracteriza pela demasiada quantidade de corpo gorduroso, ocupando quase todo o espaço visceral [26, 60, 61], e pelo aumento do tamanho ou número de células de alguns tecidos, fazendo com que tais modificações também influenciem na diferenciação e distribuição dos mesmos [45, 62]. Já no estágio de pré-pupa, a quantidade de corpo gorduroso reduz drasticamente, pois uma parte deste tecido se dissocia, restando uma maior quantidade no abdômen, o que, nas abelhas adultas, facilita a coleta de hemolinfa, pois o corpo gorduroso estará quase todo concentrado em apenas uma região, evitando a mistura dos tecidos [26, 63, 64].

O corpo gorduroso, além de ser um tecido de estocagem das larvas [26], também é responsável por sintetizar as proteínas existentes na hemolinfa [65]. Desta forma, inferiu-se que a elevada quantidade de células estaria diretamente relacionada com a elevada quantidade de proteínas nas amostras. Contudo, a quantificação de proteínas pelo método de Bradford [55] não mostrou diferenças significativas entre os diferentes métodos de extração. Segundo Zaia et al. [66], os lipídeos podem interagir com as proteínas presentes na amostra e impedir que elas reajam com o corante, impossibilitando uma quantificação correta das proteínas, assim como a interação dos reagentes de Bradford com os lipídeos também pode causar uma turbidez na amostra, o que impossibilita uma leitura adequada. Portanto, concluiu-se que as amostras possuíam uma alta taxa de lipídeos, confirmando a

hipótese da contaminação pelo corpo gorduroso, já que este tecido possui elevada taxa de lipídeo, que são essenciais para o desenvolvimento das larvas [26, 60, 61].

As características físicas das amostras permitiram avaliar a pureza das mesmas, uma vez que as diferentes técnicas de extração testadas apresentaram diferentes intensidades de turbidez, ou seja, quanto mais turva era a amostra, maiores eram as quantidades de ‘massas’ observadas, as quais foram posteriormente identificadas como células do corpo gorduroso, tanto a olho nu quanto sob microscópio de luz [26, 56, 67, 68, 69]. Portanto, devido a inviabilidade da quantificação de proteínas para classificação da pureza das amostras de hemolinfa extraídas das larvas, optou-se pela caracterização física de turbidez procedendo-se leituras no turbidímetro. O turbidímetro, ou sensor óptico de retroespalhamento, mede a quantidade de material sólido suspenso a partir da emissão de feixes de luz em um ângulo de 90° através da amostra que está sendo analisada. Tais feixes são desviados quando atingem partículas sólidas nas amostras, fazendo com que o fotodetector detecte diferentes intensidades de luz, que são convertidas em fotocorrente, que finalmente é medida em unidades nefelométricas de turbidez (NTU) [70, 71].

Apesar da viabilidade e simplicidade do método, não existem relatos na literatura acerca de protocolos para leitura de turbidez provenientes de amostras líquidas corporais com a finalidade de avaliar sua pureza. Além disso, os métodos descritos na literatura para a coleta de hemolinfa de larvas são inviáveis no que diz respeito a pureza, já que os mesmos caracterizam as amostras de hemolinfa de larvas como nebulosas e esbranquiçadas, associando essas características a amontoados celulares. Contudo, tais amontoados são característicos de tecido do corpo gorduroso, o que torna a contagem e caracterização celular errônea, já que o tecido possui tipos celulares diferentes dos encontrados na hemolinfa [36, 72].

Dessa forma, o método de caracterização da hemolinfa por meio da avaliação de sua turbidez se mostra uma técnica simples, barata e bastante viável para medida de pureza de líquidos corpóreos, sendo também facilmente reproduzível em outros laboratórios. Ainda, a partir dos resultados obtidos, e por meio da análise estatística realizada, foi possível

determinar um valor de referência ideal para classificar a hemolinfa como pura, de acordo com a turbidez das amostras de hemolinfa extraídas de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada [57, 58, 59]. O valor de referência estabelecido servirá como padrão para futuros testes com esse tipo de material, que dependam de amostras não contaminadas.

Conclusão

A técnica de coleta de hemolinfa por meio da pequena incisão realizada na região da cabeça da larva de *A. mellifera* se mostrou bastante vantajosa quando comparada com outras técnicas de extração deste material. A técnica proposta é simples, precisa e acessível, pois não envolve o uso de equipamentos caros que necessitam ser constantemente calibrados, além de não requerer um treinamento por parte da pessoa que manipulará o material biológico e permitirá a coleta de uma maior volume de material. Ainda, o protocolo desenvolvido permite uma coleta mais rápida, reduzindo o tempo de contato da hemolinfa com o ar e, conseqüentemente, sua melanização, bem como menor probabilidade de contato com a mão da pessoa que procederá a extração, o que é essencial para testes que demandam assepsia das amostras.

Portanto, a técnica de extração de hemolinfa proposta poderá ser utilizada em diversas análises, bem como ser útil para estudos destinados a avaliação da hemolinfa das larvas de abelhas quando relacionadas à estudos imunológicos.

Informação suplementar

S1 Vídeo. Extração com capilar (0,22mm).

S2 Vídeo. Extração com capilar (0,8-1,1mm).

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS (UNESP – Rio Claro -SP/Brasil) e o Professor Mário Sergio Palma pelo fornecimento da infraestrutura. Agradecemos também as agências de fomento, CNPq e FAPESP, que financiaram essa pesquisa (CNPq 400540/2018-5; FAPESP 2017/21097-3). E a CAPES pela concessão da bolsa de estudos para a autora.

Contribuições dos autores

Conceitualização: Patricia Azevedo and Roberta C. F. Nocelli.

Obtenção dos dados: Nicole Pavan Butolo.

Análises formais: Nicole Pavan Butolo, Patricia Azevedo, and Luciano Delmondes de Alencar.

Aquisição de recursos: Roberta C. F. Nocelli and Osmar Malaspina.

Investigação: Nicole Pavan Butolo and Patricia Azevedo.

Metodologia: Nicole Pavan Butolo, Patricia Azevedo, Luciano Delmondes de Alencar and Lucas Miotelo.

Administração do projeto: Patricia Azevedo, Nicole Pavan Butolo and Roberta C. F. Nocelli.

Recursos: Roberta C. F. Nocelli and Osmar Malaspina.

Supervisão: Nicole Pavan Butolo, Patricia Azevedo, Roberta C. F. Nocelli and Osmar Malaspina.

Validação: Nicole Pavan Butolo, Patricia Azevedo, Luciano Delmondes de Alencar, Caio Domingues and Lucas Miotelo.

Escrita – Preparação da versão original: Patricia Azevedo, Nicole Pavan Butolo and Caio Domingues.

Escrita – Revisão & Edição: Patricia Azevedo, Nicole Pavan Butolo, Luciano Delmondes de Alencar, Lucas Miotelo, Osmar Malaspina and Roberta C. F. Nocelli.

Referências

1. Chambó ED, Garcia RC, Oliveira NTE, Júnior JBD. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). Revista Brasileira de Agroecologia. 2010; 5(1): 37-42.
2. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 2015; 347(6229): 1255957. doi: 10.1126/science.1255957
3. Cham KO, Rebelo RM, Oliveira RP, Ferro AA, Viana-Silva FEC, Borges LO, et al. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Ibama/Diqua. 2017; pp. 105.
4. Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Nocelli RCF, Malaspina O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Microscopy research and technique. 2014; 77(4): 274-281. doi: 10.1002/jemt.22339
5. Rossi CA, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P, Malaspina O. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Microscopy research and technique. 2013; 76(5): 552-558. doi: 10.1002/jemt.22199
6. Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environmental toxicology. 2014; 29(10): 1122-1133. doi: 10.1002/tox.21842
7. Roat TC, Carvalho SM, Nocelli RCF, Silva-Zacarin EC, Palma MS, Malaspina O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. Archives of environmental contamination and toxicology. 2013; 64(3): 456-466. doi: 10.1007/s00244-012-9849
8. Cornman RS, Schatz MC, Johnston JS, Chen YP, Pettis J, Hunt G, et al. Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honeybee *Apis mellifera*. BMC genomics. 2010; 11(1): 602. doi: 10.1186/1471-2164-11-602
9. Nazzi F, Le Conte Y. Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honeybee, *Apis mellifera*. Annual Review of Entomology. 2016; 61: 417-432. doi: 10.1146/annurev-ento-010715-023731
10. Gregorc A, Alburaki M, Sampson B, Knight P, Adamczyk J. Toxicity of selected acaricides to honeybees (*Apis mellifera*) and Varroa (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) and their use in controlling Varroa within honey bee colonies. Insects. 2018; 9(2): 55. doi: 10.3390/insects9020055
11. Locke B. Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. Apidologie. 2016; 47(3): 467-482. doi: 10.1007/s13592-015-0412-8
12. Higes M, García-Palencia P, Urbieta A, Nanetti A, Martín-Hernández R. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). Veterinary pathology. 2019. doi: 10.1177/0300985819864302

13. Gregorc A, Silva-Zacarin EC, Carvalho SM, Kramberger D, Teixeira EW, Malaspina O. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: a comparative study in Africanized and Carniolan honeybees. *Chemosphere*. 2016; 147: 328-336. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030
14. Woyciechowski M, Kabat L, Król E. The function of the mating sign in honey bees, *Apis mellifera* L.: New evidence. *Animal Behaviour*. 1994; 47(3): 733-735. doi: 10.1006/anbe.1994.1101
15. Janson S, Middendorf M, Beekman M. Searching for a new home - scouting behavior of honeybee swarms. *Behavioral Ecology*. 2006; 18(2): 384-392. doi: 10.1093/beheco/arl095
16. Pankiw T, Page Jr RE, Fondrk MK. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honeybees (*Apis mellifera*). *Behavioral ecology and sociobiology*. 1998; 44(3): 193-198. doi: 10.1007/s002650050
17. Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 2006; 443(7114): 931. doi: 10.1038/nature05260
18. Lyko F, Maleszka R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends in Genetics*. 2011; 27(4): 127-131. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.003
19. Beye M, Härtel S, Hagen A, Hasselmann M, Omholt SW. Specific developmental gene silencing in the honeybee using a homeobox motif. *Insect molecular biology*. 2002; 11(6): 527-532. doi: 10.1046/j.1365-2583.2002.00361.x
20. Kucharski R, Maleszka R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey-bee, *Apis mellifera*. *Gene*. 1998; 211(2): 343-349. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00114-0
21. Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT (eds). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Bonn, Germany. 2016; 552.
22. Wolowski M, Agostini K, Rech A, Varassin I, Maués M, Freitas L, et al. Sumário para tomadores de decisão do 1 Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. 2018. doi: 10.5935/978-85-5697-762-5
23. Brasil. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais – IBAMA. Relatório de Comercialização de Agrotóxicos, 2014. Disponível em: http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=546. Acesso em: 12 ago. 2019.
24. Ferreira CRRPT, Camargo MLB, Vegro CLR. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012. *Análises e Indicadores do Agronegócio*. 2012; 7(7): 1-5.
25. Chan QW, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ. The innate immune and systemic response in honeybees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC genomics*. 2009; 10(1): 387. doi: 10.1186/1471-2164-10-387

26. Cruz-Landim C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. 1 st ed. São Paulo: Ed. UNESP; 2009.
27. Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honeybees (*Apis mellifera* L.). Journal of insect physiology. 2016; 86: 40-47. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.01.001
28. Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honeybee (*Apis mellifera*). Journal of insect physiology. 2008; 54(10-11): 1392-1399. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.07.016
29. Cunha SMA, Cunha RA, Landim CDC. Hemócitos presentes na hemolinfa e *Polystes versicolor* (Hym., Vespidae). Revista peruana de entomologia. 1977.
30. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect biochemistry and molecular biology. 2002; 32(10): 1295-1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9
31. Erban T, Harant K, Kamler M, Markovic M, Titera D. Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. Apidologie. 2016; 47(6): 805-817. doi: 10.1007/s13592-016-0437-7
32. Bania J, Stachowiak D, Polanowski A. Primary structure and properties of the cathepsin G/chymotrypsin inhibitor from the larval hemolymph of *Apis mellifera*. European journal of biochemistry. 1999; 262(3): 680-687. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00406.x
33. Bindokas V, Greenberg B. Biological effects of a 765-kV, 60-Hz transmission line on honeybees (*Apis mellifera* L.): Hemolymph as a possible stress indicator. Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association. 1984; 5(3): 305-314. doi: 10.1002/bem.2250050303
34. Ma L, Wang Y, Zhang W, Wang H, Liu Z, Xu B. Alterations in protein and amino acid metabolism in honeybees (*Apis mellifera*) fed different L-leucine diets during the larval stage. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2016; 19(3): 769-774. doi: 10.1016/j.aspen.2016.07.005
35. Randolt K, Gimple O, Geissendörfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller MJ, et al. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honeybee worker larvae and adults. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America. 2008; 69(4): 155-167. doi: 10.1002/arch.20269
36. Chan QW, Howes CG, Foster LJ. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. Molecular & Cellular Proteomics. 2006; 5(12): 2252-2262. doi: 10.1074/mcp.M600197-MCP200
37. Gilliam M, Shimanuki H. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honeybee hemocytes. Journal of invertebrate pathology. 1967; 9(3): 387-389. doi: 10.1016/0022-2011(67)90074-2

38. Snodgrass RE. Anatomy of the honeybee. 1 st ed. Reino Unido: Cornell University Press. 1956.
39. Domingues CE, Abdalla FC, Balsamo PJ, Pereira BV, Alencar HM, Costa MJ, et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepatonephrotic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*. 2017; 186: 994-1005. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.133
40. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*. 2010; 12(3): 774-782. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.
41. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS one*. 2011; 6(6): 21550. doi: 10.1371/journal.pone.0021550
42. Brandt A, Grikscheit K, Siede R, Grosse R, Meixner MD, Büchler R. Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 46-73. doi: 10.1038/s41598-017-04734-1
43. Koleoglu G, Goodwin PH, Reyes-Quintana M, Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E. *Varroa destructor* parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitology research*. 2018; 117(4): 1175-1183. doi: 10.1007/s00436-018-5796-8
44. Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC, Church JO, Hilger AM, Hildebrand JA, et al. Sepsis and hemocyte loss in honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS One*. 2016; 11(12): e0167752. doi: 10.1371/journal.pone.0167752
45. Tavares DA, Dussaubat C, Kretzschmar A, Carvalho SM, Silva-Zacarin EC, Malaspina O, et al. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental pollution*. 2017; 229: 386-393. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.092
46. Fine JD, Cox-Foster DL, Mullin CA. An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honeybee larvae. *Scientific reports*. 2017; 7(40499). doi: 10.1038/srep40499
47. Dorigo AS, Rosa-Fontana AS, Soares-Lima HM, Galaschi-Teixeira JS, Nocelli RCF, Malaspina O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PloS one*. 2019; 14(3): e0213109. doi: 10.1371/journal.pone.0213109
48. Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbronson C, Mowery JD, Cohen A, et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honeybee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116(5): 1792-1801. doi: 10.1073/pnas.1818371116
49. Randolt K, Gimple O, Geissendörfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller MJ, et al. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honeybee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and*

- Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America. 2008; 69(4): 155-167. doi: 10.1002/arch.20269
50. Gilliam M, Shimanuki H. Coagulation of hemolymph of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.). *Experientia*. 1970; 26(8): 908-909. doi: 10.1007/BF02114255
 51. Tripathi RK, Dixon SE. Haemolymph esterases in the female larval honeybee, *Apis mellifera* L., during caste development. *Canadian Journal of Zoology*. 1968; 46(5): 1013-1017. doi: 10.1139/z68-141
 52. Richardson RT, Ballinger MN, Qian F, Christman JW, Johnson RM. Morphological and functional characterization of honeybee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*. 2018; 49(3): 397-410. doi: 10.1007/s13592-018-0566-2
 53. Martins GF, Guedes BAM, Silva LM, Serrão JE, Fortes-Dias CL, Ramalho-Ortigão JM, Pimenta PFP. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Tissue and Cell*. 2011; 43(2): 83-90. doi: 10.1016/j.tice.2010.12.003
 54. Furtado WC, Azevedo DO, Martins GF, Zanuncio JC, Serrão JE. Histochemistry and ultrastructure of urocytes in the pupae of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). *Microscopy and Microanalysis*. 2013; 19(6): 1502-1510. doi: 10.1017/S1431927613013445
 55. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
 56. Oliveira VP, Cruz-Landim C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências*. 2003; 11(2): 195-205.
 57. Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2008; 44(6): 429-432. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541945006>
 58. Paoliello M, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do Sul do Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2001; 9: 315-319.
 59. Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic toxicology*. 2009; 93(4): 225-233. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.05.006
 60. Chapman RF. The insects: structure and function. 4th ed. Reino Unido: Cambridge university press; 1998.
 61. Cruz-Landim C. Estudo do corpo gorduroso de *Apis mellifera adansonii* ao microscópio óptico e eletrônico. In: Congresso Brasileiro de Apicultura. 1975; (3): 137-144.

62. Roat TC, Cruz-Landim C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. *Micron*. 2010; 41(4): 382-389. doi: 10.1016/j.micron.2010.01.003
63. Borsuk G, Ptasińska AA, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J. A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PloS one*. 2017; 12(1): e0170487. doi: 10.1371/journal.pone.0170487
64. Garido MP, Martin ML, Negri P, Martin EJ. A standardized method to extract and store hemolymph from *Apis mellifera* and the ectoparasites *Varroa destructor* from protein analysis. *J Apicult Res*. 2013; 52: 67-68. doi: 10.3896/IBRA.1.52.2.13
65. Palli SR, Locke M. The synthesis of hemolymph proteins by the larval epidermis of an insect *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: Hesperidae). *Insect biochemistry*. 1987; 17(5): 711-722. doi: 10.1016/0020-1790(87)90041-2
66. Zaia DA, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*. 1998; 21(6): 787-793.
67. Aljedani DM. Comparing the Histological Structure of the Fat Body and Malpighian Tubules in Different Phases of Honeybees, *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Entomology*. 2018; 15(3): 114-124. doi: 10.3923/je.2018.114.124
68. Poiani SB, Cruz-Landim C. Stored products and presence of acid phosphatase in fat body cells at pre-pupal worker stage of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). *Micron*. 2012; 43(2-3): 475-478. doi: 10.1016/j.micron.2011.11.006
69. Silva-Zacarin ECM, Chauzat MP, Zeggane S, Drainudel P, Schurr F, Faucon JP. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honeybee. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex Research Center. 2012; 696-703.
70. Sadar MJ. Turbidity science. Technical Information Series - Booklet nº. 11. Hach Co. Loveland CO. 1998; 7:8.
71. Chagas D. Relação entre concentração de sólidos suspensos e turbidez da água medida com sensor de retroespalhamento óptico. M. Sc. Thesis, Universidade do Estadual do Sudoeste da Bahia. 2015. Disponível em: <https://www1.ufrb.edu.br/pgea/images/Teses/DENIZE-SAMPAIO-CHAGAS.pdf>
72. Fyfe W. Das Bienenblut. *Schweiz. Bienenztg*. 1942; 65(3): 120-122.

4. CAPÍTULO 2

O artigo referente a este capítulo está em construção e será submetido para publicação na **Global Change Biology**. Sendo assim, o capítulo está editado conforme as regras da revista.

O Impacto da variação térmica sobre o sistema imunológico de abelhas

Nicole P. Butolo^{1*}; Patricia Azevedo², Luciano D. Alencar², Osmar Malaspina¹, Roberta C. F. Nocelli³

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia – Rio Claro/SP

²Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Biologia – Campinas/SP

³Universidade Federal de São Carlos, Departamento de ciências, matemática e educação – Araras/SP

***Autor Correspondente** - Telefone: +55 (19) 99261-9222 E-mail:
nicole.butolo@gmail.com

Tipo de artigo: Artigo de pesquisa primária

Resumo

A temperatura é o parâmetro mais estudado das mudanças climáticas e suas alterações podem impactar a distribuição e sobrevivência de diversas espécies, dentre elas as abelhas, bem como afetar o seu sistema imune. A avaliação da atividade do sistema imune é muitas vezes realizada pela contagem total de hemócitos circulantes na hemolinfa, porém, poucos são os estudos destinados a correlacionar a quantidade de hemócitos circulantes com a temperatura. Sendo assim, objetivou-se avaliar alterações na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa de abelha *Apis mellifera* africanizada em diferentes temperaturas bem como em diferentes estágios de desenvolvimento (larva *in vivo*, larva *in vitro*, recém emergidas e forrageiras). Para isso, foram realizadas contagens totais de hemócitos das abelhas nas temperaturas de 8, 16, 24 e 32 °C e nos diferentes estágios de desenvolvimento. Observou-se que as larvas de abelha *A. mellifera* africanizada possuem uma quantidade significativamente maior de hemócitos circulantes ($p < 0,001$), quando comparadas com os outros estágios de desenvolvimento testados (recém emergidas e forrageiras). Além disso, a temperatura também se mostrou um fator importante na variação de hemócitos circulantes na hemolinfa, já que quanto maior a temperatura, maior é a quantidade de hemócitos circulantes. Portanto, os eventos extremos advindos das mudanças climáticas, como as baixas temperaturas podem impactar diretamente o sistema imunológico das abelhas, tanto à nível individual como à nível colonial, ameaçando a distribuição e sobrevivência de diversas espécies.

Palavras chave: Mudanças climáticas, temperatura, *Apis mellifera* africanizada, sistema imune, células de defesa, contagem total de hemócitos.

Introdução

O crescimento exponencial da população mundial está diretamente relacionado com as mudanças climáticas, uma vez que ações antropogênicas como o uso de combustíveis fósseis, o aumento de processos industriais e o aumento das práticas agrícolas têm levado ao aumento da emissão de gás carbônico e, conseqüentemente, ao aumento da temperatura global média (First, 2019; Pachauri et al., 2014).

As mudanças climáticas envolvem diversos fatores, dentre eles o aquecimento global, mudanças nas distribuições de chuvas, temperaturas e intensidade de fenômenos naturais, como os furacões (Chen et al., 2011). Dentre os parâmetros utilizados para avaliações das mudanças climáticas destaca-se a temperatura, por ser o menos incerto e resumir tais alterações de forma abrangente (Alexander et al, 2006; Loarie et al., 2009; Pachauri et al., 2014). Contudo, apesar da constante preocupação com a elevação da temperatura média global, eventos extremos como invernos mais frios serão cada vez mais frequentes, já que o aumento da temperatura global influencia diretamente as correntes marítimas e fenômenos como o El Niño e a La Niña (Cai et al., 2018; Collins et al., 2010; Trenberth, 1997).

No Brasil, o fenômeno La Niña tem causado alterações nos períodos de chuva e estiagem no Norte e Nordeste, dessalinização de áreas costeiras e estuários, alternância entre invernos extremamente secos/chuvosos no Sudeste, além de resfriamentos anormais durante as estações, principalmente durante o inverno. Esse tipo de resfriamento, com temperaturas ainda mais baixas não somente no inverno, mas em outras estações – como as primaveras frias percebidas no sudeste do Brasil – alteram a sensação térmica e umidade nessas regiões (Andrade et al., 2016; Cai et al., 2018; Grimm et al., 1998; Grimm, 2004; Rodrigues, & McPhaden, 2014). Tais alterações podem impactar drasticamente a distribuição e sobrevivência de diversas espécies, já que causarão um rearranjo nos climas, que implicará em mudanças de habitats, desaparecimentos de espécies, redução da amplitude térmica diária, dentre outros (Pachauri et al., 2014; Easterling et al., 1997; Williams et al., 2007).

As abelhas são um exemplo de organismos extremamente susceptíveis à tais alterações, uma vez que as temperaturas ditam todo seu comportamento, podendo levar a uma redução na distribuição ou até ao desaparecimento das espécies, bem como a mortandade massiva de indivíduos, o que impactará diretamente a produção de alimentos e, conseqüentemente, a qualidade de vida humana (Hilário; Imperatriz-Fonseca; Kleinert, 2000). Portanto, um sistema de defesa efetivo faz-se necessário, no caso o sistema imune, a fim de manter a homeostase do indivíduo e da colônia como um todo (Southwick, 1983; Szymás, & Jedruszuk, 2003). Nos insetos esse sistema está dividido em sistema imune inato e sistema imune social (Lavine, & Strand, 2002).

O sistema imune social consiste no controle de patógenos baseado no comportamento dos indivíduos que pertencem à um grupo como, por exemplo, ações coletivas para evitar infecções (Meunier, 2015). Já o sistema imune inato compreende principalmente barreiras físicas, fisiológicas, celulares e inflamatórias e utiliza dois tipos de reações, a reação humoral e a reação celular (Armstrong et al., 1996; Kavanagh, & Reeves, 2004). A reação humoral consiste na coagulação da hemolinfa, melanização e ação de proteínas, enquanto a reação celular está relacionada à atividade dos hemócitos, que são células de defesa circulantes na hemolinfa ou que permanecem imóveis ao redor de determinados órgãos (Cruz-Landim, 2009; Armstrong et al., 1996). Estas células desempenham diversas funções como: fagocitose, nodulação, encapsulação, citotoxicidade por meio da produção de reativos intermediários de oxigênio, secreção de enzimas e coagulação da hemolinfa após a ruptura da cutícula e epiderme (Cruz-Landim, 2009; Gillespie et al., 1997; Lavine; Strand, 2002).

Caracterizados em 1985 por Gupta, os hemócitos são células facilmente acessíveis e mensuráveis, o que possibilita avaliar a influência de diferentes fatores externos na supressão ou superexpressão do sistema imunológico. Para determinar essas alterações são realizadas contagens de hemócitos, sendo elas a contagem total de hemócitos, que representa o número total de hemócitos por mm³ de hemolinfa, e a contagem diferencial de hemócitos, que mostra a quantidade ou porcentagem de cada tipo de célula no material amostrado (Cruz-Landim, 2009).

Diversos trabalhos já foram realizados comprovando alterações na quantidade de hemócitos em abelhas que foram expostas a algum contaminante, como inseticidas, fungicidas e patógenos (Brandt et al., 2016; Domingues et al., 2017; Alaux et al., 2010), e também relacionadas a alterações na dieta, retirada de vegetação nativa, idade, casta, altitude, etc. (Gilliam, & Shimanuki, 1970; Szymás, & Jedruszuk, 2003; Schmid et al., 2008; Mason et al., 2013; Hystad et al., 2017). Além disso, o estágio de vida das abelhas também influencia na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa, sendo que alguns trabalhos relacionados a contagem de hemócitos demonstram que a quantidade dessas células reduz com o aumento da idade e casta, havendo registros de 21.000 hemócitos/ mL para operárias e zangões (Snodgrass, 1956), 3.824 hemócitos/ mL para rainhas (Cruz-Landim, 2009), 10.640 hemócitos/ mL para larvas de cinco dias e 9.020 hemócitos/ mL para as pupas (Gilliam, & Shimanuki, 1966).

As variações na quantidade de hemócitos do sistema imune dos insetos permite que eles resistam a algumas alterações de temperatura (Bauerfeind, & Fischer, 2014), porém estudos mostram que variações na temperatura causam uma resposta imediata frente esse sistema, podendo aumentar o número de hemócitos ou da atividade enzimática da fenoloxidase, uma proteína responsável pela oxidação e hidroxilação do pigmento presente na hemolinfa, o que causa a melanização (Lavine; Strand, 2002; González- Santoyo; Córdoba-Aguilar, 2012; Catalán et al., 2012; Schmid et al., 2008). Pesquisas indicam que microclimas mais quentes são melhores para indivíduos que estão infectados por patógenos e dependem de ação imunológica (Klugger et al., 1998; Catalán et al., 2012). Porém, aumentos muito severos, podem afetar negativamente esse sistema, atingindo os mecanismos de estresse, ou seja, a defesa celular e humoral (Karl et al., 2011). Assim as abelhas (*A. mellifera*) mantém a temperatura interna da colônia em aproximadamente 34 °C, independentemente da temperatura ambiental (Jones; Oldroyd, 2007), devido a algumas características comportamentais como o agrupamento das abelhas para aquecimento ou agitação das asas para resfriamento interno, promovendo a manutenção da temperatura e consequentemente a saúde da colônia (Bernd, 1979; Free; Simpson, 1963).

Tendo em vista o impacto que a temperatura pode causar na quantidade de hemócitos de abelhas e na elevada variação térmica global que têm sido observada nos últimos anos, com invernos muito frios e verões com drásticos aumentos de temperatura (Hansen et al., 2006), faz-se necessário avaliar variações na quantidade de hemócitos de abelhas de diferentes idades frente à essas oscilações de temperatura. Além disso, o impacto dessas variações sobre o sistema imune das abelhas *A. mellifera* africanizadas, nos permitirá inferir os efeitos desse importante aspecto ambiental sobre um sistema que é crucial para a sobrevivência e manutenção desses insetos e suas colônias.

Material e métodos

Material Biológico

Favos limpos operculados de três colônias não irmãs foram coletados no apiário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – *campus* Rio Claro e posteriormente acondicionados em incubadora à 32 ± 2 °C e umidade relativa de 80%. Em seguida, prosseguiu-se com as coletas das abelhas nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Larvas em 5º instar trazidas diretamente do apiário (*in vivo*) e abelhas forrageiras, foram coletadas nos dias em que a estação meteorológica de Rio Claro, localizada no CEAPLA (Centro de Análise e Planejamento Ambiental) – UNESP, marcou as temperaturas de 8, 16, 24 e 32 °C, ou seja, correspondentes aos diferentes tratamentos testados. Sendo assim, as abelhas forrageiras e larvas *in vivo* não necessitaram de choque térmico em geladeira ou estufa BOD por 10 minutos, uma vez que o tempo entre a coleta e o transporte dos indivíduos até o laboratório correspondeu ao tempo do choque térmico que seria reproduzido artificialmente em laboratório.

Para a contagem de hemócitos das larvas criadas *in vitro*, os indivíduos foram criados de acordo com o método proposto por Aupinel e colaboradores (2005) com modificações (comunicação pessoal). Os experimentos foram conduzidos em placas acrílicas e acondicionados em caixas plásticas em estufa BOD com temperatura (32 ± 2 °C) e umidade

constantes ($90 \pm 5\%$). Quando atingiam o 5º instar, as larvas criadas *in vitro* eram alocadas em placas de Petri e submetidas as diferentes temperaturas testadas, em geladeira para a temperatura de 8 °C e estufa BOD para as temperaturas de 16, 24 e 32 °C, durante 10 minutos (Figura 1A e 1B). Já as abelhas recém emergidas eram trazidas do apiário ao laboratório, onde algumas tinham o tórax pintado com tinta atóxica e eram devolvidas ao apiário para serem coletadas após 21 dias como abelhas forrageiras, mencionadas anteriormente, e outras eram submetidas as diferentes temperaturas propostas no experimento, em geladeira ou estufa BOD, durante 10 minutos (Figura 1C e 1D).

A contagem dos hemócitos de abelhas adultas e recém emergidas foi realizada utilizando-se um pool de duas abelhas por contagem, já que a quantidade de hemolinfa extraída de uma abelha não foi suficiente para realizar a contagem. Utilizaram-se 80 abelhas de cada uma das 3 colônias não irmãs, totalizando 240 indivíduos por contagem. Diferentemente, devido a extração de um maior volume de hemolinfa das larvas, utilizou-se apenas um indivíduo por contagem, ou seja, 40 larvas por colônia, totalizando 120 indivíduos por contagem.

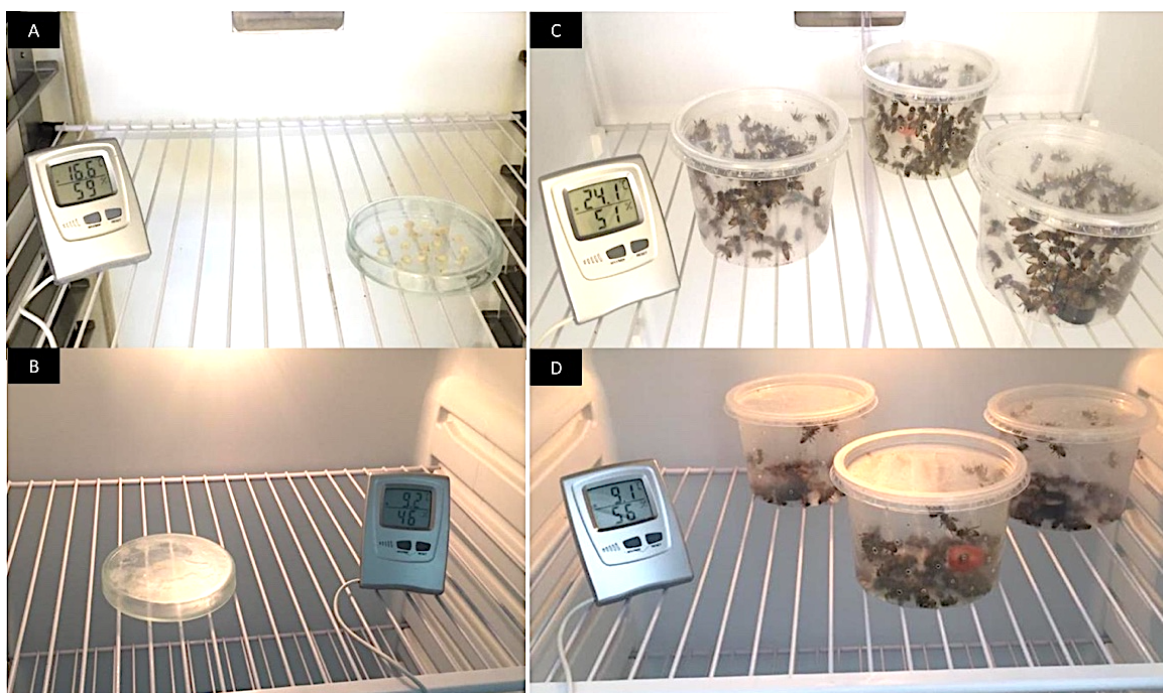


Figura 1. Aclimação das abelhas recém emergidas e larvas criadas *in vitro*. (A) Larvas criadas *in vitro* em 5º instar na estufa BOD a aproximadamente 16 °C; (B) Larvas criadas *in vitro* em 5º instar na geladeira a aproximadamente 9 °C; (C) Abelhas recém emergidas na

estufa BOD a aproximadamente 24 °C; (D) Abelhas recém emergidas na geladeira a aproximadamente 9 °C.

Coleta da hemolinfa

Para coleta da hemolinfa das larvas puncionou-se a cutícula na região do cabeça com o auxílio de uma tesoura oftalmológica conforme metodologia descrita no capítulo 1. Posteriormente, a hemolinfa foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e acondicionada em microtubo de polipropileno de 1,5 mL.

As abelhas recém-emergidas e forrageiras, as mesmas foram anestesiadas previamente a 4°C e, após retirada da cabeça com auxílio da tesoura oftalmológica, a hemolinfa foi coletada da abertura proximal do tórax com auxílio de uma micropipeta e acondicionada em microtubo de polipropileno de 1,5 mL.

Qualquer fluido com coloração amarelada ou marrom, características de fluido gástrico, foi evitado.

Contagem total de hemócitos

A contagem total de hemócitos é utilizada para medir indiretamente a imunocompetência celular. As contagens foram realizadas igualmente para cada um dos grupos experimentais de abelhas *A. mellifera* africanizada: larvas (*in vivo* e criadas *in vitro*), recém-emergidas e forrageiras.

Sendo assim, para cada um dos indivíduos utilizados na contagem de hemócitos foram preparadas soluções contendo 5 µL de hemolinfa e 5 µL do corante azul de metileno totalizando uma proporção final de 1:1 (v:v). Posteriormente, alíquotas de 5 µL da solução hemolinfa-corante foram colocadas em cada um dos lados da câmara de Neubauer (Fig. 2) e, com auxílio do microscópio de luz de campo claro (OLYMPUS, modelo BX51) e objetiva de 40X (aumento total de 400X), procedeu-se a contagem em 5 quadrantes da câmara.

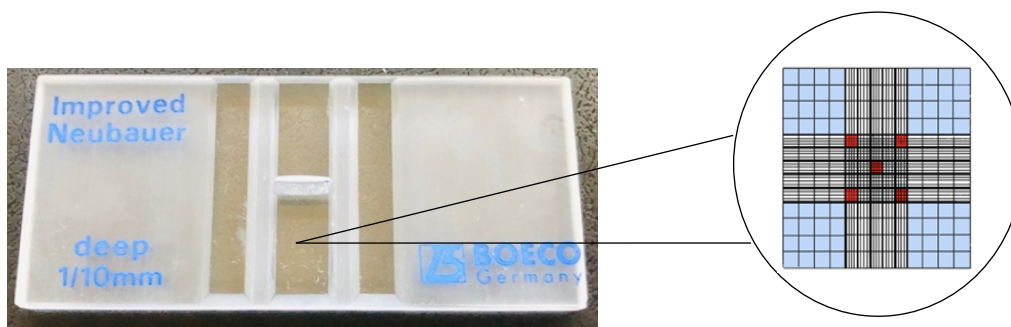


Figura 2. Imagem da câmara de Neubauer (arquivo pessoal) e aumento com os quadrantes contados de cada lado da câmara (foto: <http://waredacaoiscx.gelos.org/camara-de-neubauer-61sekylit3873.html>).

A fim de obter dados estatísticos mais robustos foram realizadas 120 contagens para cada grupo amostral, sendo 40 contagens de cada uma das três colônias diferentes não irmãs. A quantidade de hemócitos por mL da hemolinfa foi obtida pela fórmula adaptada por Domingues e colaboradores (2017):

$$\text{Hemócitos/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de hemócitos contados}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times F.D. \times F.C.$$

O fator de diluição (F.D.) utilizado para todas as amostras é 1 e o fator de correção (F.C.) é 10^4 , número este pré-estabelecido para câmara de Neubauer.

Análises estatísticas

A quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa nos diferentes estágios de desenvolvimento e nas diferentes temperaturas avaliadas foram comparadas utilizando-se o programa R (R Core Team). Primeiramente, os dados obtidos foram submetidos à análise ANOVA e, verificando a normalidade dos dados (paramétricos), posteriormente foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$). Além disso, fez-se uma análise de componentes principais (PCA) a fim de correlacionar a contagem de hemócitos com a temperatura e o estágio de desenvolvimento amostrado.

Resultados

Após realizar a extração da hemolinfa das abelhas nos diferentes estágios de desenvolvimento (larvas *in vivo*, larvas *in vitro*, recém emergidas e forrageiras) e nas diferentes temperaturas (8, 16, 24 e 32 °C) observou-se que haviam diferenças significativas nas quantidades de hemócitos circulantes na hemolinfa ($p < 0,001$), tanto relacionadas com o estágio de desenvolvimento dos indivíduos, como com as temperaturas testadas.

As larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada, tanto retiradas diretamente do apiário (*in vivo*), quanto criadas *in vitro*, possuem maiores quantidades de hemócitos circulantes do que as abelhas adultas. Sendo que dentre elas, as larvas cultivadas *in vitro* apresentaram uma maior quantidade de hemócitos circulantes quando comparadas com as coletadas *in vivo* à 32 °C, nível de significância ($p < 0,001$). Dentre as abelhas adultas, as abelhas recém emergidas possuem menores quantidades de hemócitos do que as abelhas forrageiras ($p < 0,001$) (Fig. 3).

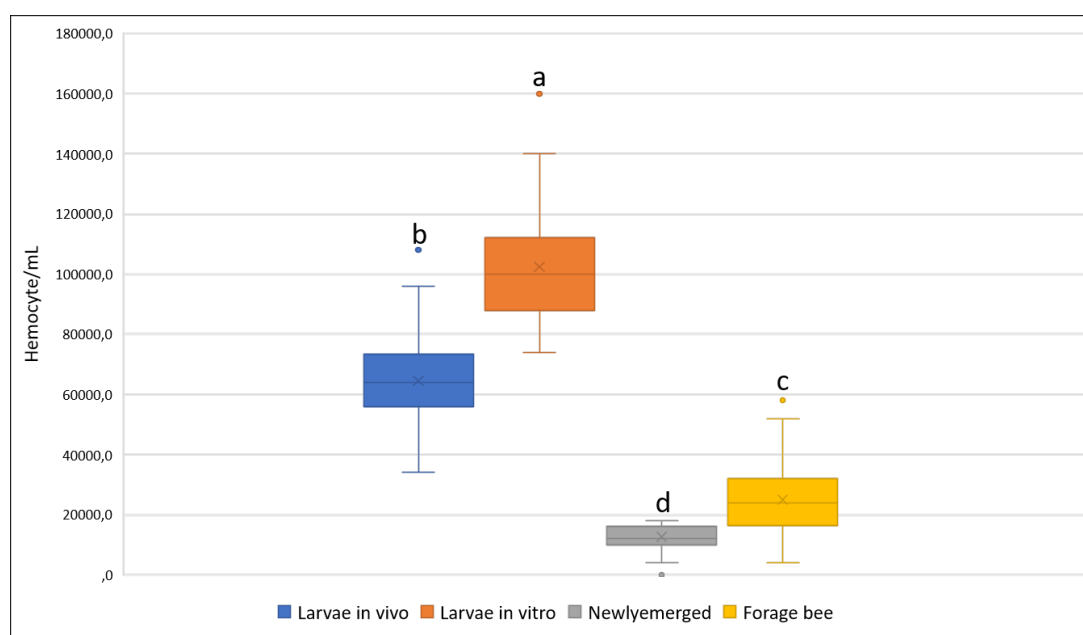


Figura 3. Boxplots mostrando a quantidade de hemócitos por mL de hemolinfa nos diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas *A. mellifera* africanizada: larvas *in vitro*, larvas *in vivo*, recém emergidas e forrageiras a 32 °C (temperatura interna da colônia). Larvae *in vivo*: larva *in vivo*; Larvae *in vitro*: larva *in vitro*; Newlyemerged: recém emergida; Forage bee: abelha forrageira.

Também se notou uma alteração significativa na quantidade de hemócitos circulantes. Quanto às diferentes temperaturas de coleta testadas, nas temperaturas mais baixas, 8 e 16 °C, para os estágios de desenvolvimento larval (*in vitro* e *in vivo*) e forrageiras, a quantidades de hemócitos circulantes na hemolinfa foi mais baixa, quando comparadas com temperaturas mais altas, 24 e 32 °C (Fig. 4).

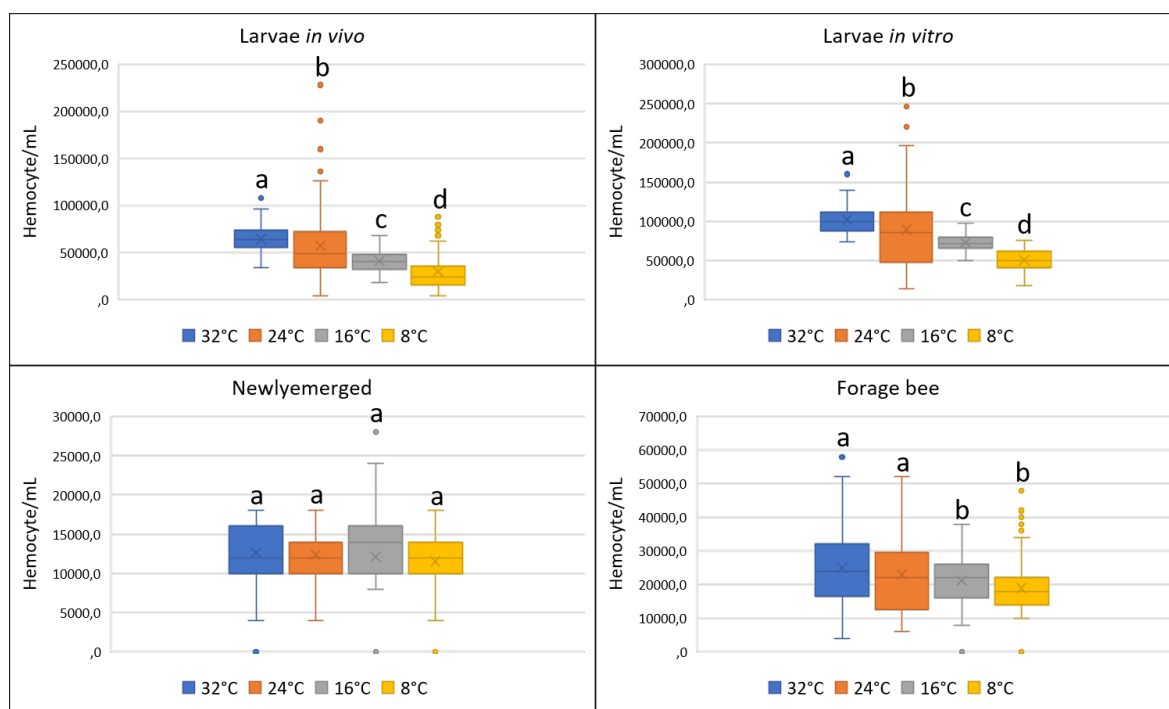


Figura 4. Boxplots mostrando a quantidade de hemócitos por mL de hemolinfa nos diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas *A. mellifera* africanizada: larvas *in vitro*, larvas *in vivo*, recém emergidas e forrageiras, de acordo com as quatro diferentes temperaturas testadas (8, 16, 24 e 32 °C). Larvae *in vivo*: larva *in vivo*; Larvae *in vitro*: larva *in vitro*; Newlyemerged: recém emergida; Forage bee: abelha forrageira; Hemocyte/ mL: hemócitos/ mL.

As abelhas com menores quantidades de hemócitos são as abelhas recém emergidas, seguidas pelas abelhas forrageiras, larvas *in vivo* e larvas *in vitro*. Porém, ao analisamos o percentual de redução de hemócitos circulantes com as variações de temperatura, nota-se que as abelhas que sofreram menores alterações nas quantidades de hemócitos circulantes devido a temperatura são as abelhas recém emergidas, que tem uma redução de 8,2% de

hemócitos da temperatura de 32 °C para 8 °C; já as abelhas forrageiras, apesar de possuírem mais hemócitos circulantes do que as abelhas recém emergidas, apresentam um percentual de variação na quantidade de hemócitos maior, sendo uma redução de 24,5% de hemócitos circulantes da temperatura de 32 °C para 8 °C; entre as larvas o impacto da temperatura é ainda maior, provocando uma redução de 50,8% na quantidade de hemócitos circulantes nas larvas criadas *in vitro* da temperatura de 32 °C para 8 °C e uma redução de 53,8% nos hemócitos circulantes das larvas coletadas *in vivo* da temperatura de 32 °C para 8 °C. A PCA (Fig. 5) evidencia que há correlação entre idade das abelhas e a quantidade de hemócitos frente as diferentes temperaturas.

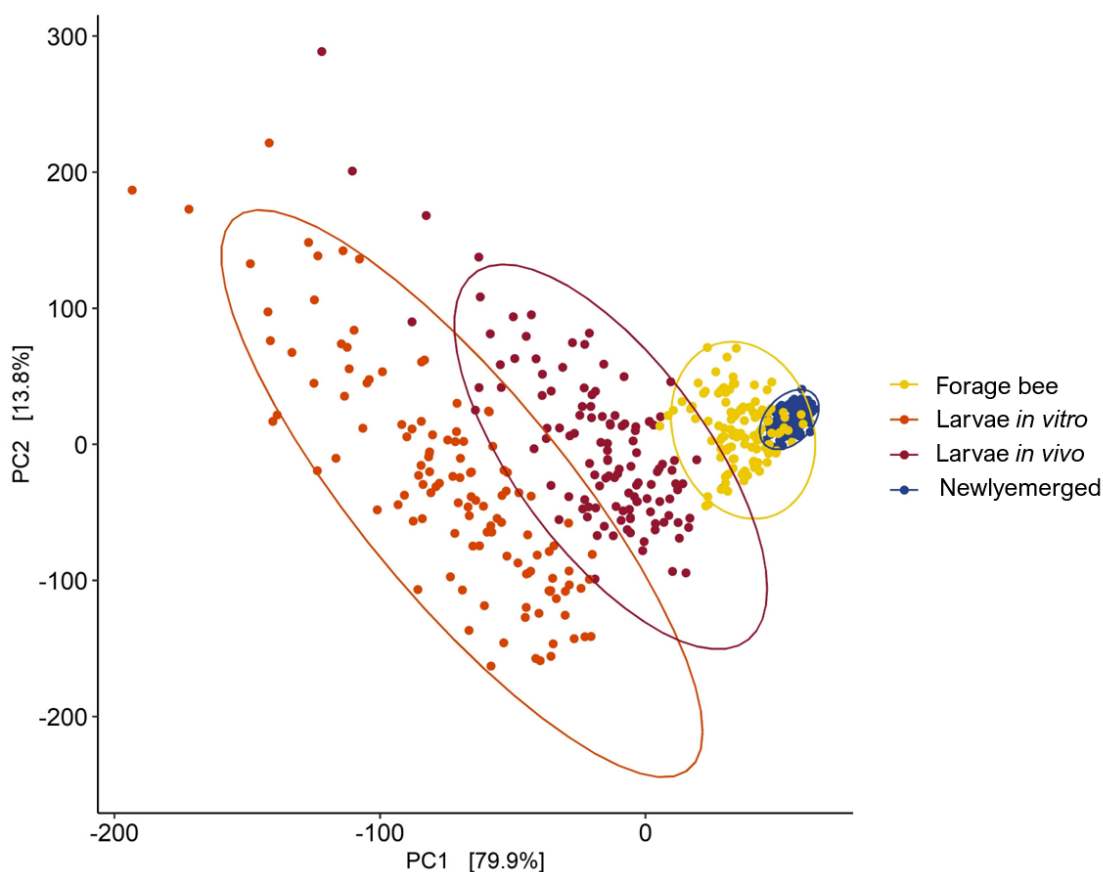


Figura 5. Gráfico PCA demonstrando a distribuição da quantidade de hemócitos presente em cada estágio de desenvolvimento e a sua variação em diferentes temperaturas.

Discussão

O objetivo desse estudo foi analisar a variação na quantidade de hemócitos de abelhas *A. mellifera* em diferentes temperaturas. Com os experimentos realizados pode-se observar que, em temperaturas mais altas, como 32 °C observa-se maiores quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa para qualquer um dos estágios de desenvolvimento, e que essa quantidade de hemócitos decresce conforme as temperaturas diminuem, demonstrando que a redução na temperatura causa redução na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa, podendo afetar a atividade do sistema imunológico das abelhas.

O estágio de desenvolvimento também afeta a quantidade de hemócitos, o que já foi analisado em outras pesquisas, como a de Schmid e colaboradores (2008) que observaram redução na quantidade de hemócitos com o aumento da idade das abelhas. Os autores associaram este fato a substituição da defesa celular pela defesa humoral, como forma de redução do gasto energético para colônia. A hipótese de substituição da defesa celular também se justifica pelo fato das abelhas adultas (forrageiras) possuírem uma quantidade muito maior de fenoloxidase, uma enzima responsável pela oxidação da hemolinfa, do que as abelhas mais jovens (Chan et al., 2006). Com relação ao observado nas abelhas recém emergidas, a pouca interferência da temperatura em sua quantidade de hemócitos pode ser justificada pelo fato delas ainda possuírem grandes quantidades de corpo gorduroso, que produzem peptídeos antipatogênicos, apesar de possuírem baixas quantidades de hemócitos e também uma menor atividade humoral (Wilson-Rich et al., 2008).

Já os estudos que avaliam as respostas imunológicas em baixas temperaturas, observaram que há redução na quantidade de hemócitos e em outras atividades do sistema imune, o que também é observado em outros grupos de animais, como crustáceos e outros insetos (Goedken et al., 2005; Kim et al., 2011; Pandey et al., 2010; Flye-Sainte-Marie et al., 2009; Li et al., 2014).

As pesquisas que relacionam a atividade imunológica das abelhas e variações na temperatura são escassos, porém Steinmann e colaboradores (2015) observaram haver relação entre baixas temperaturas e a redução da expressão de genes relacionados a

imunidade, como forma de reduzir o gasto energético, o que causa imunossupressão e consequentemente aumento na contaminação da colônia com doenças, como o vírus da asa deformada, *Varroa* e *Nosema*. Amdam e colaboradores (2004) também verificaram que as baixas temperaturas impedem o forrageamento adequado das abelhas e reduzem o armazenamento de vitelogenina, uma proteína de reserva necessária para alimentação das larvas, causando a má nutrição das crias, reduzindo o tamanho da colônia, prejudicando o agrupamento dos indivíduos e, consequentemente, a manutenção da temperatura interna.

Starks e colaboradores (2000) também estudaram o efeito da temperatura em colônias infectadas com *Ascosphaera apis* (fungo causador da doença Chalk brood), e observaram que esse fungo se desenvolve nas larvas quando há queda na temperatura da colônia para 30 °C, o que não ocorre em colônias saudáveis; porém colônias enfraquecidas não conseguem realizar o aquecimento da colmeia, culminando na proliferação da doença. Essas consequências da contaminação durante baixas temperaturas afetam diretamente o sistema imunológico, que se torna suprimido (visto redução no número de hemócitos), permitindo o aparecimento de infecções secundárias.

Não é apenas o sistema imune e metabólico que sofre com alterações de temperatura, o sistema nervoso das abelhas também é influenciado. Abelhas criadas em temperaturas constantes de 35-36 °C tem maior capacidade de aprendizagem e memória, quando comparadas com abelhas criadas a 32-33 °C, principalmente devido a alterações morfofisiológicas nos corpos pedunculados, o que pode prejudicar a capacidade de forrageamento das abelhas e consequentemente a quantidade alimento, enfraquecendo a colônia (Groh et al., 2004; Jones et al., 2005; Tautz et al., 2003). Assim, podemos inferir a importância de estudos sobre mudanças climáticas, no caso de eventos extremos advindos de tais mudanças, já que quaisquer alterações na temperatura influenciam nas atividades das colônias.

Os poucos estudos que relacionam as mudanças climáticas e seus efeitos sobre as populações de abelhas mostram que esse efeito ambiental não ocorre isolado, ele está atrelado a outros problemas ambientais como perda e fragmentação de habitats. Brown e

Paxton (2009) trazem em sua revisão alguns efeitos causados pelas alterações climáticas sobre os habitats das abelhas, principalmente a perda de áreas costeiras devido ao aumento do nível do mar, causado pelo derretimento de geleiras (Marengo, 2008). Também haverá o desaparecimento dos oásis no deserto do Saara, que acarretará na morte das abelhas da região que não são capazes de migrar naturalmente; a perda de interações entre abelhas e plantas devido a alteração da flora (que poderão não ter néctar para atrair os polinizadores ou então causar redução do pólen, sendo este fonte de proteína da maioria das abelhas). O processo de desertificação de áreas de floresta também é impendente, como a previsão de desertificação/ savanização da floresta amazônica pelas alterações nas precipitações (Le Conte; Navajas, 2008; Marengo, 2008; Oyama; Nobre, 2003). Além de outros fatores, como o desacoplamento fenológico, em que as plantas alteram seu período de floração devido as alterações climáticas, afetando a obtenção de recursos de diversos grupos de animais, dentre eles as abelhas sazonais (Encinas-Viso; Revilla; Etienne, 2012; Vásquez; Chacoff; Cagnolo, 2009).

Portanto, as mudanças climáticas mostram-se uma ameaça futura iminente, já que poderá alterar características das estações do ano a longo prazo, bem como eventos meteorológicos de curto prazo, como épocas de chuvas ou estiagem, afetando diretamente o forrageamento das abelhas e impactando a biodiversidade desses insetos em todo o mundo (Brown, & Paxton, 2009; Gonzáles-Varo et al., 2013).

Agradecimentos

Os pesquisadores envolvidos agradecem o auxílio prestado pelo Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, por ceder as instalações para a realização de diversos experimentos. A Ms. Adna Suelen Dorigo pelo importante auxílio na criação larval *in vitro*. Ao colaborador Sérgio Pascon, pelo auxílio na coleta das abelhas adultas e larvas. E ao Laboratório de Estudo de Bacias (Lebac) da UNESP, por ceder o uso do turbidímetro e do laboratório.

Agradecemos também as agências de fomento, CNPq e FAPESP, que financiaram essa pesquisa (CNPq 400540/2018-5; FAPESP 2017/21097-3). E a CAPES pela concessão da bolsa de estudos para a autora.

Referências

- Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., *et al.* (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.
- Alexander, L. V., Zhang, X., Peterson, T. C., Caesar, J., Gleason, B., Klein Tank, A. M. G., *et al.* (2006). Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 111(D5).
- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2004). Altered physiology in worker honeybees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of economic entomology*, 97(3), 741-747.
- Andrade, M. P., Magalhães, A., Pereira, L. C., Flores-Montes, M. J., Pardal, E. C., Andrade, T. P., & Costa, R. M. (2016). Effects of a La Niña event on hydrological patterns and copepod community structure in a shallow tropical estuary (Taperaçu, Northern Brazil). *Journal of Marine Systems*, 164, 128-143.
- Armstrong, P. B., Melchior, R., & Quigley, J. P. (1996). Humoral immunity in long-lived arthropods. *Journal of insect physiology*, 42(1), 53-64.
- Arioli, C., Abatti, R., Agostinetto, L., & Botton, M. (2017). Polinizadores em perigo: por que nossas abelhas estão desaparecendo? In *Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território, 4., 2017, Lages, SC. Anais... Alimentos seguros, nutritivos e suficientes. Lages, SC: UNIPLAC, 05 a 07 de jun. 2017.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, 58(2), 107.
- Bauerfeind, S. S., & Fischer, K. (2014). Simulating climate change: temperature extremes but not means diminish performance in a widespread butterfly. *Population Ecology*, 56(1), 239-250.
- Bernd, H. (1979). Thermoregulation of African and European honeybees during foraging, attack, and hive exits and returns. *Journal of Experimental Biology*, 80(1), 217-229.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology*, 86, 40-47.
- Brown, M. J., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416.

- Cai, W., Wang, G., Dewitte, B., Wu, L., Santoso, A., Takahashi, K., *et al.* (2018). Increased variability of eastern Pacific El Niño under greenhouse warming. *Nature*, 564(7735), 201.
- Catalán, T. P., Wozniak, A., Niemeyer, H. M., Kalergis, A. M., & Bozinovic, F. (2012). Interplay between thermal and immune ecology: effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 58(3), 310-317.
- Chan Q.W., Howes C.G. & Foster L.J. (2006). Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*. 5(12), 2252-2262.
- Collins, M., An, S. I., Cai, W., Ganachaud, A., Guilyardi, E., Jin, F. F., *et al.* (2010). The impact of global warming on the tropical Pacific Ocean and El Niño. *Nature Geoscience*, 3(6), 391.
- Corbet, S. A., Fussell, M., Ake, R., Fraser, A., Gunson, C., Savage, A., & Smith, K. (1993). Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological entomology*, 18(1), 17-30.
- Cruz-Landim, C. D. (2009). *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.
- D'Avila, M., & Marchini, L. C. (2005). Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. *Boletim de Indústria Animal*, 62(1), 79-90.
- Domingues, C. E., Abdalla, F. C., Balsamo, P. J., Pereira, B. V., de Alencar Hausen, M., Costa, M. J., & Silva-Zacarin, E. C. (2017). Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*, 186, 994-1005.
- Easterling, D. R., Horton, B., Jones, P. D., Peterson, T. C., Karl, T. R., Parker, D. E., *et al.* (1997). Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*, 277(5324), 364-367.
- Encinas-Viso, F.; Revilla, T. A.; Etienne, R. S. (2012). Phenology drives mutualistic network structure and diversity. *Ecology Letters*, 15 (3), 198-208.
- Esch, H. (1976). Body temperature and flight performance of honeybees in a servo-mechanically controlled wind tunnel. *Journal of comparative physiology*, 109(3), 265-277.
- First, P. J. (2019). Global Warming of 1.5 C An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5 C Above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change. Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty. <https://www.ipcc.ch/sr15/>.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M. A., *et al.* (2009). Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 377(1), 1-11.
- Free J.; Simpson J. (1963). The respiratory metabolism of honeybee colonies at low temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 8, 234-238.

- Freitas, B. (2006). Polinizadores e polinização: o valor econômico da conservação. Disponível em: http://www.reacao.com.br/programa_sbpc57ra/sbpccontrol/textos/breno_freitas.htm. Acesso em: 17 de set de 2019.
- Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42(1), 611-643.
- Gillam, M., & Shimanuki, H. (1966). Total hemocyte counts in hemolymph of immature honeybees. *American Bees Journal*, 106 (10), 304.
- Gilliam, M., & Shimanuki, H. (1970). Total hemocyte counts of honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) from various elevations. *Experientia*, 26(9), 1006-1007.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., Dungan, C., & de Guise, S. (2005). The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, 24(1), 177-184.
- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), 1-16.
- González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., *et al.* (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in ecology & evolution*, 28(9), 524-530.
- Gupta, A. P. (1985). Cellular elements in the hemolymph. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 3, 402-451.
- Grimm, A. M., Ferraz, S. E., & Gomes, J. (1998). Precipitation anomalies in southern Brazil associated with El Niño and La Niña events. *Journal of climate*, 11(11), 2863-2880.
- Grimm, A. M. (2004). How do La Niña events disturb the summer monsoon system in Brazil? *Climate Dynamics*, 22(2-3), 123-138.
- Groh, C., Tautz, J., & Rössler, W. (2004). Synaptic organization in the adult honeybee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4268-4273.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D. W., & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14288-14293.
- Hilário, S. D., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Kleinert, A. (2000). Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Revista brasileira de biologia*, 60(2), 299-306.
- Hystad, E. M., Salmela, H., Amdam, G. V., & Münch, D. (2017). Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honeybee (*Apis mellifera*) worker castes. *PloS one*, 12(9), e0184108.
- Jones, J. C., Helliwell, P., Beekman, M., Maleszka, R., & Oldroyd, B. P. (2005). The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology A*, 191(12), 1121-1129.
- Jones, J. C., Myerscough, M. R., Graham, S., & Oldroyd, B. P. (2004). Honeybee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*, 305(5682), 402-404.

- Jones, J. C.; Oldroyd, B.P. (2007). Nest thermoregulation in social insects. *Advances in Insect Physiology*. 33(153) - 191.
- Karl, I., Stoks, R., De Block, M., Janowitz, S. A., & Fischer, K. (2011). Temperature extremes and butterfly fitness: conflicting evidence from life history and immune function. *Global Change Biology*, 17(2), 676-687.
- Kavanagh, K., & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 101-112.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A., Silva, A. C. D., & Assis, M. D. G. P. D. (2010). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 6(12), 20-41.
- Kim, S. G., Jung, B. W., & Kim, H. (2011). Hemocyanin-derived phenoloxidase activity with broad temperature stability extending into the cold environment in hemocytes of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(2), 103-108.
- Kluger, M. J., Kozak, W., Conn, C. A., Leon, L. R., & Soszynski, D. (1998). Role of fever in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1), 224-233.
- Lavine, M. D., Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1295-1309.
- Le Conte, Y., Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honeybee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.
- Li, B., Xian, J. A., Guo, H., Wang, A. L., Miao, Y. T., Ye, J. M., *et al.* (2014). Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture international*, 22(2), 761-774.
- Loarie, S. R., Duffy, P. B., Hamilton, H., Asner, G. P., Field, C. B., & Ackerly, D. D. (2009). The velocity of climate change. *Nature*, 462(7276), 1052.
- Mason, R., Tennekes, H., Sánchez-Bayo, F., & Jepsen, P. U. (2013). Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *Journal Environmental Immunology Toxicology*, 1(1), 3-12.
- Marengo, J. A. (2008). Water and climate change. *Estudos avançados*, 22(63), 83-96.
- Meunier, J. (2015). Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1669), 20140102.
- Moritz, R. F., & Kryger, P. (1994). Self-organization of circadian rhythms in groups of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral ecology and sociobiology*, 34(3), 211-215.
- Oyama, M. D., & Nobre, C. A. (2003). A new climate-vegetation equilibrium state for tropical South America. *Geophysical research letters*, 30(23).
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., *et al.* (2014). Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and

III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (p. 151). Ipcc.

Pandey, J. P., Mishra, P. K., Kumar, D., Singh, B. M. K., & Prasad, B. C. (2010). Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Research Journal of Immunology, 3(2), 169-177.

Petz, M., Stabentheiner, A., & Crailsheim, K. (2004). Respiration of individual honeybee larvae in relation to age and ambient temperature. Journal of comparative Physiology B, 174(7), 511-518.

Retschnig, G., Williams, G., Schneeberger, A., & Neumann, P. (2017). Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honeybees (*Apis mellifera*). Insects, 8(1), 20.

Rocha, M. C. L. S. A., & ALENCAR, S. (2012). Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: Ibama.

Rodrigues, R. R., & McPhaden, M. J. (2014). Why did the 2011–2012 La Niña cause a severe drought in the Brazilian Northeast? Geophysical Research Letters, 41(3), 1012-1018.

Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W., Stanley, D. W., & Tautz, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. Journal of insect physiology, 54(2), 439-444.

Snodgrass, R. E. (1956). Anatomy of the honeybee. Cornell University Press.

Southwick, E. E. (1983). The honeybee cluster as a homeothermic superorganism. Comparative biochemistry and physiology Part A: Physiology, 75(4), 641-645.

Soares-Lima, H. M. (2017). Efeitos combinados de *Nosema ceranae* e do inseticida imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada.

Starks, P. T., Blackie, C. A., & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. Naturwissenschaften, 87(5), 229-231.

Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., & Dainat, B. (2015). Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honeybees. PloS one, 10(6), e0129956.

Szymaś, B., & Jędruszek, A. (2003). The influence of different diets on haemocytes of adult worker honeybees, *Apis mellifera*. Apidologie, 34(2), 97-102.

Tautz, J., Maier, S., Groh, C., Rössler, W., & Brockmann, A. (2003). Behavioral performance in adult honeybees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(12), 7343-7347.

Trenberth, K. E. (1997). The definition of El Niño. Bulletin of the American Meteorological Society, 78(12), 2771-2778.

Vázquez, D. P.; Chacoff, N. P.; Cagnolo, L. (2009). Evaluating multiple determinants of the structure of plant–animal mutualistic networks. Ecology, 90 (8), 2039-2046.

Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J., *et al.* (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879), 389.

Williams, J. W., Jackson, S. T., & Kutzbach, J. E. (2007). Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100 AD. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5738-5742.

Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*, 54(10-11), 1392-1399.

Xu, J., & James, R. R. (2012). Temperature stress affects the expression of immune response genes in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. *Insect molecular biology*, 21(2), 269-280.

5. CAPÍTULO 3

Uma nova abordagem experimental para testes ecotoxicológicos: cultura celular de hemócitos *in vitro*

Nicole Pavan Butolo^{1,*}, Patricia Azevedo^{2,*}, Luciano Delmondes de Alencar², Adna Suellen Dorigo¹, Osmar Malaspina¹, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli³

¹Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brazil.

²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP), Campinas, SP, Brazil.

³Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brazil.

***Corresponding authors:** nicole.butolo@gmail.com (NPB); azevedo.p89@gmail.com (PA).

Resumo

Dentre os fatores que afetam a sobrevivência das abelhas o uso de agrotóxicos é bastante discutido e avaliado, sabendo-se que diferentes ingredientes ativos amplamente utilizados na agricultura afetam diretamente o sistema imune das abelhas, causando a morte de indivíduos e enfraquecimento das colônias. No entanto, algumas das principais formas de avaliar o sistema imune é pela realização de análises indiretas, demonstrando a necessidade de estudos que permitam a avaliação de diferentes agentes externos diretamente sobre o sistema imune das abelhas, de forma mais específica e controlada, como o cultivo *in vitro* dos hemócitos. O cultivo primário e secundário de diversos tipos celulares de abelhas já foi estabelecido, porém os trabalhos com cultivo de hemócitos, tanto para abelhas quanto para outros grupos de insetos, ainda possui diversas lacunas, e não foi estabelecido por um período que permita a avaliação adequada do efeito dos diferentes ingredientes ativos que precisam ser testados. Assim, esse trabalho objetivou padronizar métodos confiáveis e em condições controladas para o cultivo *in vitro* dos hemócitos de larvas de abelha *Apis mellifera* africanizada (híbrido) em quinto instar (pré-defecantes), que possam ser utilizados em futuros testes ecotoxicológicos, de maneira a determinar moléculas de agrotóxicos que sejam mais seletivas quanto ao inseto alvo, acometendo menos as abelhas, e cooperar com o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Para tanto, 3 diferentes meios amplamente utilizados no cultivo *in vitro* de células de insetos foram testados, sendo o meio Grace, Schneider e Leibovitz (L-15), para avaliar sua capacidade na manutenção dos hemócitos de larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada em quinto instar. Após contagens celulares e avaliações por meio de microscopia de contraste de fase, observou-se que o meio Grace foi o mais efetivo para o cultivo *in vitro* dos hemócitos de larvas de abelha, havendo uma média de 669 mil células após 24 horas de incubação e 1.141 mil após 96 horas de incubação. Para determinação do tipo celular cultivado, utilizou-se avaliação morfológica, com a finalidade de identificar a característica específica dos hemócitos, ou seja, a capacidade dessas células tornarem-se alongadas no processo de reconhecimento de um agente estranho, tais como a placa de cultura. Após as medições essas células foram comparadas com outras encontradas em demais trabalhos com hemócitos de abelha no mesmo estágio de desenvolvimento, permitindo inferir que as células cultivadas são hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada.

Palavras chave: cultivo *in vitro*, cultura primária de abelhas, meio Grace, meio Schneider, meio L15, cultivo de hemócitos.

1. Introdução

Apesar da grande relevância das abelhas como polinizadores de diversas espécies de plantas (ROCHA; ALENCAR, 2012), o registro do declínio populacional desses insetos tem aumentado por todo o mundo, tanto de indivíduos silvestres quanto domesticados, apesar de nem todas as mortes serem registradas ou documentadas (POTTS *et al* 2010; PIRES *et al* 2016). Há um consenso no que diz respeito aos fatores relacionados ao enfraquecimento das colônias, e consequentemente a mortes destes insetos, como por exemplo a perda de habitats, introdução de doenças, o uso indiscriminado ou incorreto de agrotóxicos, etc. (GOULSON *et al* 2015; BIESMEIJER; SLAA, 2006). O efeito negativo de diferentes inseticidas sobre os sistemas vitais para a sobrevivência das abelhas têm sido bastante estudado (BOVI; ZALUSKI; ORSI, 2018; OLIVEIRA *et al* 2014; CRUZ *et al* 2010; CATAE *et al* 2014; GREGORC *et al* 2016; FORFERT *et al* 2017; NICODEMO *et al* 2014), sendo que um desses sistemas afetados pelo uso de agrotóxicos é o sistema imune, já que é um dos principais responsáveis tanto pela defesa, quanto pela homeostase do organismo das abelhas (SOUTHWICK, 1983; SZYMÁS; JEDRUSZUK, 2003).

O sistema de defesa dos insetos inclui o sistema imune inato e social (LAVINE; STRAND, 2002), sendo que o sistema imune social compreende ações coletivas para evitar a contaminação do grupo (ex.: limpeza do ninho, evitar locais contaminados, não permitir a entrada de outros insetos ou então insetos contaminados, etc.) (MEUNIER, 2015), enquanto que o sistema imune inato compreende fatores intrínsecos ao indivíduo, que permitem o reconhecimento e morte de invasores, sendo dividido em barreiras físicas e fisiológicas (ex.: tegumento e mucos intestinais) (CRUZ-LANDIM, 2009; LAVINE; STRAND, 2002), e também em barreiras celulares e inflamatórias, que envolvem dois tipos de reações, as reações celulares, que compreendem a atividade das células de defesa chamadas hemócitos, e reações humorais, que são as atividades desempenhadas pela hemolinfa, como coagulação e melanização, realizadas por diferentes proteínas presentes na mesma (ARMSTRONG; MELCHIOR; QUIGLEY, 1996; CRUZ- LANDIM, 2009; KAVANAGH; REEVES, 2004).

Diversas pesquisas já demonstraram que o uso de diferentes ingredientes ativos pode afetar diretamente o sistema imune das abelhas, seja a sua atividade celular ou humoral. Tanto que, trabalhos realizados com abelhas adultas ou larvas de *Apis mellifera* demonstram que há alterações na quantidade de hemócitos circulantes frente a contaminação com diferentes tipos de agrotóxicos, sejam eles inseticidas neonicotinoides (imidacloprido, tiametoxam, tiacloprido e clotianidina) ou então outras classes de inseticidas (organofosforados, organoclorados e piretóides) e insumos agrícolas (fungicidas e acaricidas). Alguns desses estudos demonstram que há um aumento na quantidade de

hemócitos após a contaminação com esses diferentes agrotóxicos como resposta do sistema imune (ALAUX *et al* 2010; DOMINGUES *et al* 2017; VIDAU *et al* 2011) contudo, outras pesquisas relatam uma redução no número de hemócitos que pode ser explicada pela saúde das colônias utilizadas para os testes, pois colônias que apresentam diferentes níveis de infecção, seja por vírus, ácaros ou bactérias, podem ser imunossuprimidas devido ao sinergismo dessas moléculas químicas e de fatores bióticos, o que reduz a quantidade de hemócitos (BRANDT *et al* 2016; BRANDT *et al* 2017; LÓPEZ *et al* 2017). Além das alterações nas quantidades de hemócitos, os agrotóxicos também podem afetar a transcrição de genes da imunidade, produção de enzimas oxidativas ou detoxificantes (GARRIDO *et al* 2013; GREGORC *et al* 2012; TAVARES *et al* 2017), ou a regulação de fatores de transcrição antivirais, deixando as abelhas susceptíveis a vírus, como o vírus da asa deformada (DI PRISCO *et al* 2013).

Embora os trabalhos citados tenham realizado a avaliação do sistema imune das abelhas frente a diferentes agentes externos, os métodos utilizados para realizar essas avaliações, como as contagens, são pouco específicos, sendo necessária uma forma mais precisa de avaliação desse sistema, como o cultivo *in vitro* das células do sistema imune, os hemócitos, o que permitirá avaliar e compreender de maneira mais específica a resposta do sistema imune das abelhas frente aos diferentes ingredientes ativos utilizados principalmente nas lavouras, permitindo determinar moléculas que sejam mais seletivas ao inseto alvo, bem como o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (AZEVEDO *et al* 2020).

O cultivo *in vitro* permitirá realizar experimentos diretamente sobre as células do sistema imune das abelhas, que além de garantir especificidade, também permitirá controlar variáveis ambientais, reprodutibilidade, além de mais agilidade, quando comparado aos experimentos *in vivo* (ALVES; GUIMARÃES, 2010; ROGERO *et al* 2003). Essa área de pesquisa tem se desenvolvido bastante nos últimos anos (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; SMAGGHE; GOODMAN; STANLEY, 2009), como o trabalho de Müller e colaboradores (1999) em que obtiveram uma linhagem celular de hemócitos do mosquito *Anopheles gambiae* que se manteve viável por dois anos. Também a pesquisa de Samakovlis e colaboradores (1992) que conseguiu estabelecer uma linhagem celular de hemócitos de *Drosophila* para testar genes supressores de tumor, bem como de Gateff (1998) que utilizou cultivos de hemócitos de *Drosophila* para testar os mesmos genes supressores de tumor.

Apesar de ainda não terem sido estabelecidas linhagens celulares de abelhas imortalizadas (GENERSCH *et al* 2013), há diversas culturas primárias com células neuronais e intestinais de *A. mellifera* (GASCUEL *et al* 1991; GASCUEL *et al* 1994; MÖCKEL *et al* 2009; POPPINGA *et al* 2012). Porém, a pesquisa com hemócitos de abelhas é bastante escassa, sendo realizadas em períodos inferiores a 24 horas, buscando demonstrar

o efeito de patógenos, dietas e ferimentos na cutícula, sobre o sistema imune das abelhas em curtos períodos de tempo (NEGRI *et al* 2012; NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014; NEGRI *et al* 2015), demonstrando assim a necessidade de pesquisas destinadas ao cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha que possam ser utilizadas para testes específicos, como os testes ecotoxicológicos, que demandam um período de tempo pré determinado para serem avaliados (OECD, 1998a; OECD, 1998b; OECD, 2013), preenchendo assim uma importante lacuna na pesquisa sobre abelhas e seu essencial sistema de defesa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar métodos confiáveis e em condições controladas para o cultivo *in vitro* de hemócitos de *A. mellifera* africanizada (híbrido).

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Favos de abelhas *A. mellifera* africanizada contendo larvas em primeiro instar foram coletados de três colônias não parentais e saudáveis, localizadas no apiário do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro - São Paulo - Brasil (Latitude: 22°23'48.1"S; Longitude: 47°32'33.1"W), durante dias em que a temperatura ambiente era 32°C ($\pm$ 2°C). Posteriormente, os favos foram acondicionados em estufa incubadora, com temperatura regulada a 34°C ($\pm$ 2°C) e umidade a 90% ($\pm$ 5%), no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP. Após o período de aclimação, as larvas foram criadas de acordo com o método proposto por Aupinel e colaboradores (2005, 2007) com algumas adaptações para *A. mellifera* africanizada (comunicação pessoal), sendo acondicionadas em placas acrílicas e mantidas em caixas plásticas em estufa incubadora BOD (demanda biológica de oxigênio) com temperatura (32 $\pm$ 2°C) e umidade (90 $\pm$ 5%) constantes, e foram alimentadas diariamente até atingirem o quinto instar larval, em fase pré-defecante, quando ainda é possível observar o intestino repleto de material com coloração amarelada (alimento) (CRUZ-LANDIM, 2009; FRANCOY *et al* 2006; MICHELETTE; SOARES, 1993).

2.2. Dissecção e cultura das células do sistema imune

Primeiramente todo o material utilizado para cultivo *in vitro* foi previamente autoclavado, bem como os procedimentos foram todos realizados em câmara de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada com luz ultravioleta durante 25 minutos. Os utensílios utilizados foram esterilizados dentro da câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta durante 25 minutos, evitando-se assim qualquer tipo de contaminação dos materiais necessários para dissecção e cultivo *in vitro* das células.

Após o preparo dos materiais, as larvas pré-defecantes foram previamente anestesiadas em baixa temperatura (4 °C) por 5 minutos, e desinfetadas por meio de imersão em álcool 70% durante 1 minuto e posterior lavagem por duas vezes em água autoclavada durante 1 minuto em cada lavagem, de maneira a retirar o excesso de álcool (modificado de FURTADO *et al* 2013; MARTINS *et al* 2011; GENERSCH *et al* 2013), e deixadas para secar sobre papel filtro autoclavado durante aproximadamente 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a extração da hemolinfa conforme metodologia descrita no capítulo 1, que permitiu extrair aproximadamente 10 µL de hemolinfa pura de cada larva, sem contaminação com outras células ou partes de tecidos.

Para iniciar o cultivo *in vitro*, realizou-se um pool de 30 larvas de 3 colônias diferentes (10 de cada colônia), sendo retirados 10 µL de hemolinfa de cada larva, que foram acondicionados em tubos de polipropileno de 1,5mL previamente autoclavados. Esse material foi centrifugado a 16,100 x g durante 12 minutos a 4 °C, permitindo a formação de um pellet de células (modificado de CHAN; HOWES; FOSTER, 2006). Na câmara de fluxo laminar, o material sobrenadante (hemolinfa) foi descartado.

Ao finalizar o isolamento dos hemócitos, essas células foram gentilmente homogeneizadas com auxílio de uma pipeta (NEGRI *et al* 2014; NEGRI *et al* 2015) e diluídas em 18µL de meio de cultura puro previamente preparado, contendo apenas 1% de gentamicina. Posteriormente, essa solução foi distribuída em placas de 12 poços estéreis (Kasvi®), sendo acondicionados 2 mL de solução em 9 poços, e nos 3 poços restantes foram acondicionados 2 mL de meio de cultura puro com 1% de gentamicina, para servir como controle. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufas incubadoras BOD dentro de caixas plásticas previamente limpas com álcool 70%, com temperatura (32 °C) e umidade (80%) constantes (GENERSCH *et al* 2013), livres da adição de CO₂ (PUDNEY; VARMA; LEAKE, 1979). Por conseguinte, foram avaliadas durante um período pré-determinado de 24, 48, 72 e 96 horas.

Os meios testados para a padronização do cultivo *in vitro* foram: Grace's (G) (SAFC Biosciences®); Schneider (Sch) (Sigma-Aldrich®); e Leibovitz (L-15) (Sigma-Aldrich®), preparados conforme as instruções do fabricante, porém com pH ajustado para 6.6, valor do pH da hemolinfa das larvas (RACHINSKY; HARTFELDER, 1998).

2.3. Avaliação do cultivo celular

2.3.1 Avaliação sob microscópio de contraste de fase

Durante todo o período determinado para o cultivo *in vitro*, as placas de cultura foram observadas sob microscópio invertido com contraste de fase (Carls Zeiss®, modelo Primovert). As observações foram realizadas em diferentes contrastes (Ph1/0,3 e Ph2/0,3) e aumentos (objetivas aumento de 4, 10, 20 e 40X; ocular aumento 10X), o que permitiu

avaliar o desenvolvimento e manutenção das células cultivadas, bem como realizar análises morfológicas, por meio de fotomicrografias obtidas a partir de uma câmera digital (Carls Zeiss®, modelo Axiocam 105 color) acoplada ao microscópio invertido. Para aquisição das imagens utilizou-se o software Zen 2.3 lite.

2.3.2 Contagem celular

A fim de determinar o desenvolvimento e viabilidade das células cultivadas *in vitro* foram realizadas contagens dos diferentes poços da placa de cultura. Primeiramente, foram coletados 8 µL da suspensão celular (células + meio de cultura) e diluídos em 24 µL de solução salina para insetos (0.1 M NaCl; 0.003 M KCl; 0.002 M CaCl₂; 0.002 M NaHCO₃), a fim de se obter uma solução que permitisse a visualização em microscópio de campo claro e posterior contagem das células. Após ser realizada a diluição da suspensão celular em solução salina para insetos, uma nova diluição foi realizada, utilizando-se 10 µL da suspensão celular + solução salina para insetos e 10 µL de corante vital azul de Tripan 0,2% (Sigma-Aldrich®). Ao final obteve-se uma solução de suspensão celular, solução salina para insetos e azul de Tripan 0,2% diluída 10x, que permitiu a contagem das células presentes no cultivo *in vitro* por meio da câmara de Neubauer (Marienfield, Lauda-Königshofen®), onde foram contados 5 quadrantes diferentes. O número total de células foi obtido pela seguinte fórmula, pré-estabelecida (DOMINGUES *et al* 2017) para obtenção do número de células contadas:

$$\text{Número de células/ mL} = \frac{\text{nº de células contadas}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times F.D. \times F.C.$$

O fator de diluição (F.D.) das amostras é 10, pois a solução analisada foi diluída 10 vezes e, o fator de correção (F.C.) é 10⁴, número este pré-estabelecido para câmara de Neubauer.

2.4. Caracterização celular

Para realização da caracterização das células presentes no cultivo *in vitro*, utilizou-se uma técnica de análise morfológica. Para tanto, utilizaram-se imagens obtidas a partir do microscópio invertido com contraste de fase e comparou-se com imagens de outros trabalhos com hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* no mesmo estágio de desenvolvimento também obtidas com microscópio invertido, em que é realizado o cultivo de hemócitos durante 24 horas, utilizando-se 3 diferentes meios de cultura para insetos, meio Grace's (GIM, Hyclone®), TC-100 (Sigma®) e Excell-405 (Sigma®) (NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014).

As medições celulares foram feitas com o programa ImageJ permitindo caracterizar morfolologicamente os hemócitos da larva de abelha *A. mellifera* africanizada. Foram realizadas duas medições diferentes nas imagens, uma medindo o comprimento celular, verificando-se o ponto onde poderia se obter a medida mais longa da célula, e outra medida verificando a largura celular, também verificando-se o ponto onde poderia se obter a medida mais larga da célula (Figura 1). Essas medições foram realizadas nas imagens presentes nos artigos citados e nas imagens obtidas por fotomicrografia durante essa pesquisa.

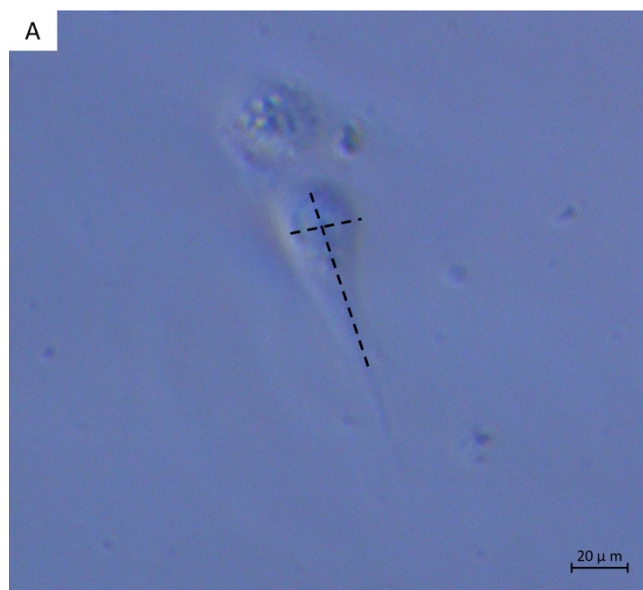


Figura 1 – Esquema demonstrando como foram realizadas as medições nas células. (A) medições realizadas nas imagens obtidas a partir do cultivo *in vitro* realizado nesta pesquisa (objetiva 40x), verificando a largura e comprimento. Linhas tracejadas indicam como foi realizada a medição do comprimento e largura nas células.

2.5 Análise estatística

As análises da quantidade de células nos diferentes meios e tempos testados foram comparadas utilizando-se o programa R (R Core Team). Primeiramente, foi verificada a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk e os dados obtidos foram submetidos à análise ANOVA e, posteriormente foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 1 e 5% de probabilidade de erro ($p < 0,001$ e $p < 0,005$).

Para a caracterização celular, inicialmente também foi utilizado o programa R (R Core Team), onde foi testada a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, e verificou-se que os dados eram paramétricos, sendo então submetidos à análise ANOVA, que avaliou a variância entre as duas variáveis testadas (comprimento e largura das células) (MAGALHÃES; LIMA, 2002).

3. Resultados

3.1. Avaliação e contagem do cultivo celular

3.1.1 Meio de cultura Grace's (SAFC Biosciences®)

Os resultados estatísticos, obtidos a partir dos dados de contagens das células presentes no cultivo *in vitro* nos diferentes horários propostos (24, 48, 72 e 96 horas) demonstraram que no meio Grace houve um aumento contínuo na quantidade de hemócitos cultivados de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada, superior aos outros meios testados, sendo possível observar essa diferença significativa no número de células representadas na Figura 2, onde também estão plotadas as médias das quantidades de células contabilizadas em cada um dos tempos propostos. As imagens obtidas a partir de microscopia de contraste de fase confirmam a proliferação celular ao longo do tempo, principalmente após 96 horas de cultivo no meio Grace (Figura 3).

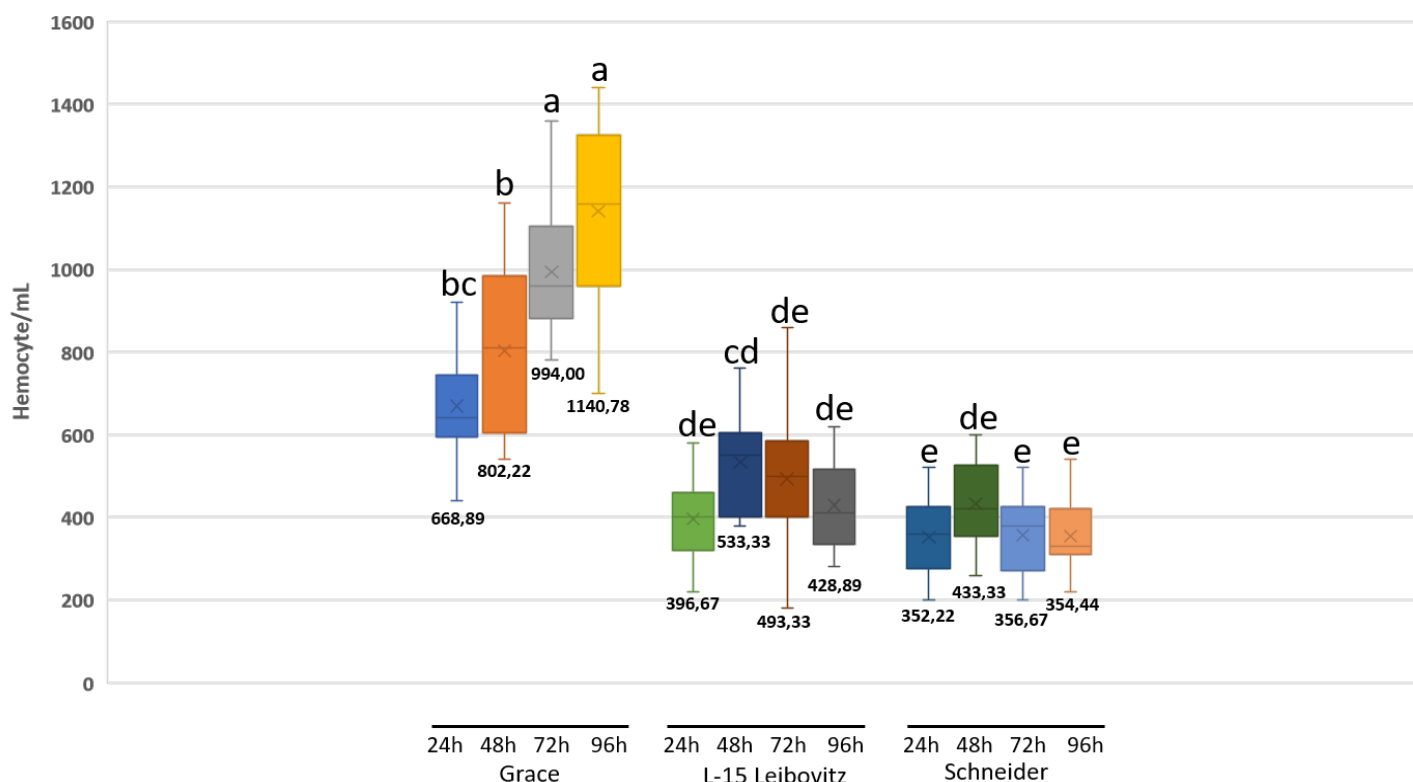


Figura 2 - Comparação da quantidade de hemócitos contados durante os quatro diferentes tempos propostos (24, 48, 72 e 96 horas) para os três meios testados (Grace, L-15 e Schneider). Valores plotados abaixo das barras representam as médias da quantidade de células contadas para cada um dos meios nos diferentes tempos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade de erro. Hemocyte/ mL: hemócitos/ mL.

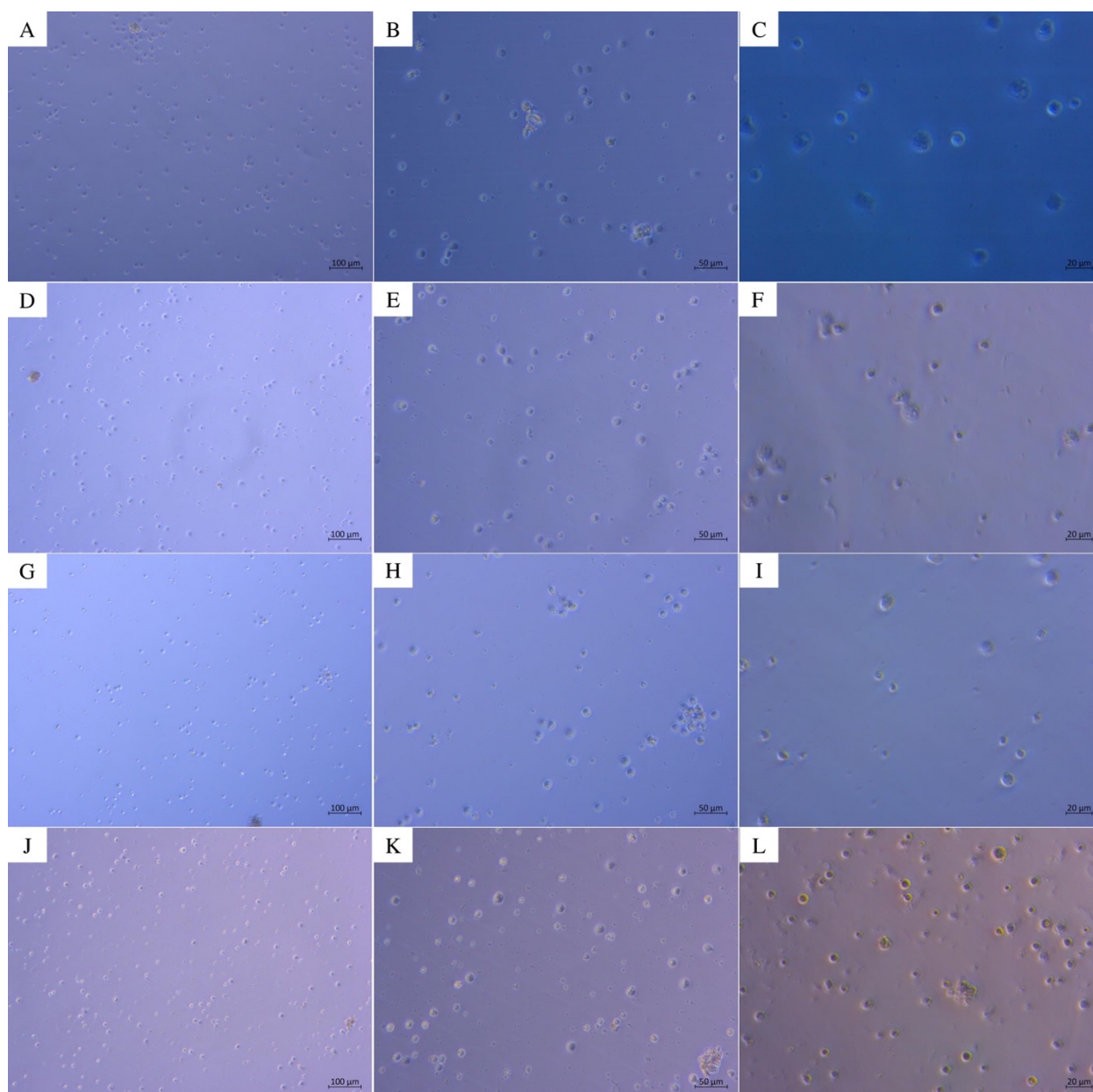


Figura 3 - Fotomicrografias em contraste de fase do cultivo *in vitro* de hemócitos de larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada em meio de cultura Grace. (A) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (B) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 200X(Ph1); (C) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (D) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (E) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (F) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (G) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (H) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (I) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (J) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (K) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (L) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 400X (Ph1).

3.1.2 Meio de cultura Leibovitz's (L-15) (Sigma- Aldrich®)

Para as células incubadas no meio L-15, durante os diferentes tempos propostos (24, 48, 72 e 96 horas) houveram dados estatísticos diferentes do meio Grace. Os resultados demonstraram que o meio L-15 não foi tão satisfatório quanto o meio Grace para manutenção dos hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada em cultura (Figura 2). Porém, avaliando o meio isoladamente, observamos que na contagem de 48 e 72 horas houve um aumento significativo no número de células presentes no cultivo *in vitro* quando comparada a contagem de 24 horas (Figura 4D - 4I). No entanto, a proliferação celular não se manteve, e houve redução no número de células com 96 horas de cultivo. As imagens obtidas a partir de microscopia de contraste de fase também auxiliam na observação dos hemócitos, e a proliferação celular durante os tempos de 48 e 72 horas no meio L-15 (Figura 4).

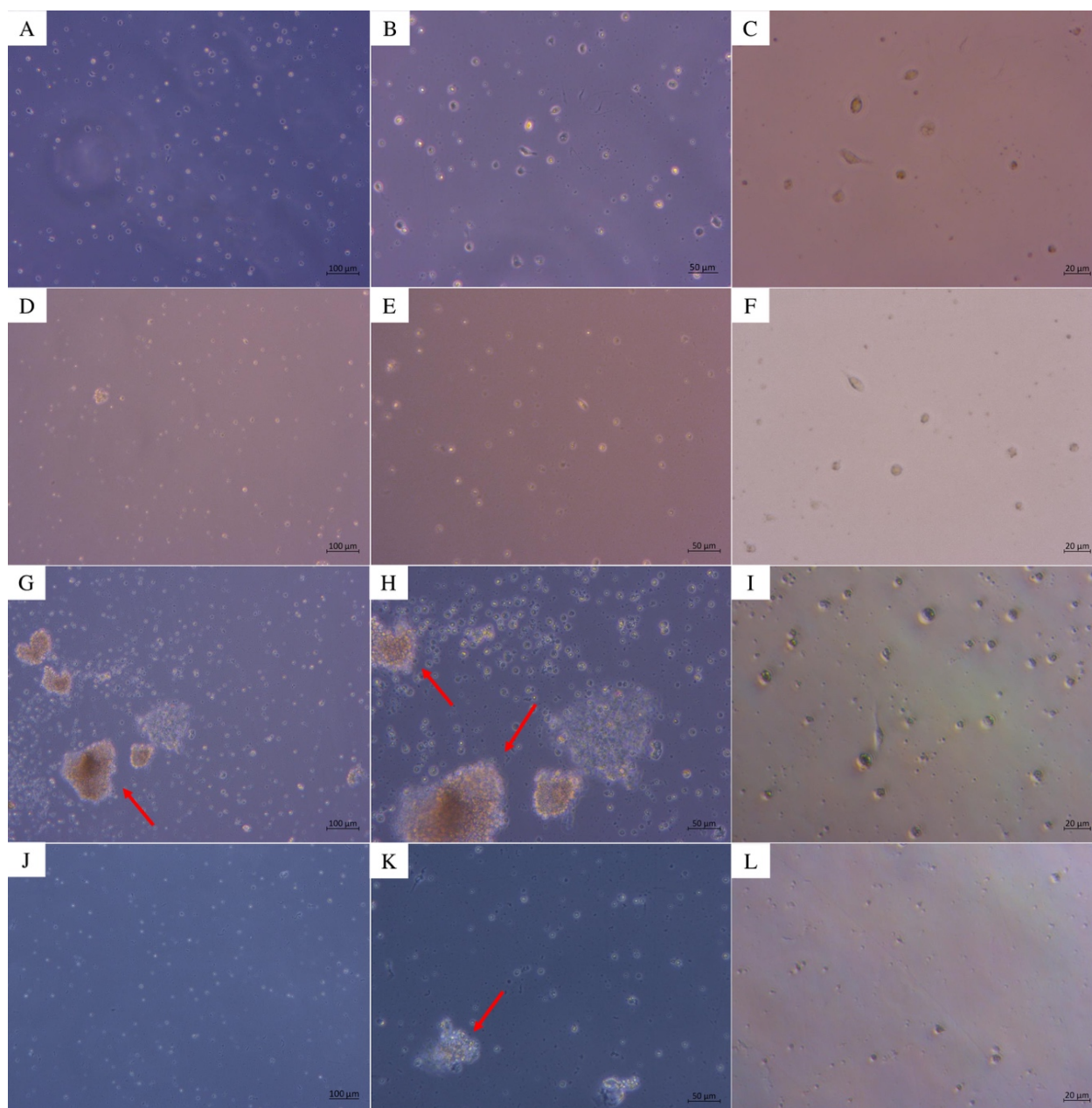


Figura 4 - Fotomicrografias em contraste de fase do cultivo *in vitro* de hemócitos de larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada em meio de cultura L-15. (A) cultivo celular após 24 horas de

incubação em aumento de 100X (Ph1); (B) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (C) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 400X (Ph1); (D) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (E) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (F) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 400X (Ph1); (G) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (H) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (I) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (J) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (K) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (L) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2). Setas vermelhas indicam aglomerados de células, característicos de hemócitos.

3.1.2 Meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich®)

O meio Schneider, em comparação aos outros meios, foi o que apresentou o desempenho menos satisfatório para a manutenção dos hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada, tanto que ao compará-lo com todos os outros meios, nos mesmos tempos, ele apresenta a menor quantidade de células (Figura 2). No entanto, ao ser avaliado isoladamente, pode-se observar que houve um aumento significativo de hemócitos no período de 24 horas para 48 horas; porém essa melhora no desempenho não se manteve nos tempos de 72 e 96 horas, havendo uma drástica redução no número de células, praticamente retornando aos valores iniciais obtidos na contagem após 24 horas de incubação. As imagens obtidas a partir de microscopia de contraste de fase também auxiliam na observação da proliferação dos hemócitos durante 48 horas, e posterior redução após 72 e 96 horas de cultivo (Figura 5).

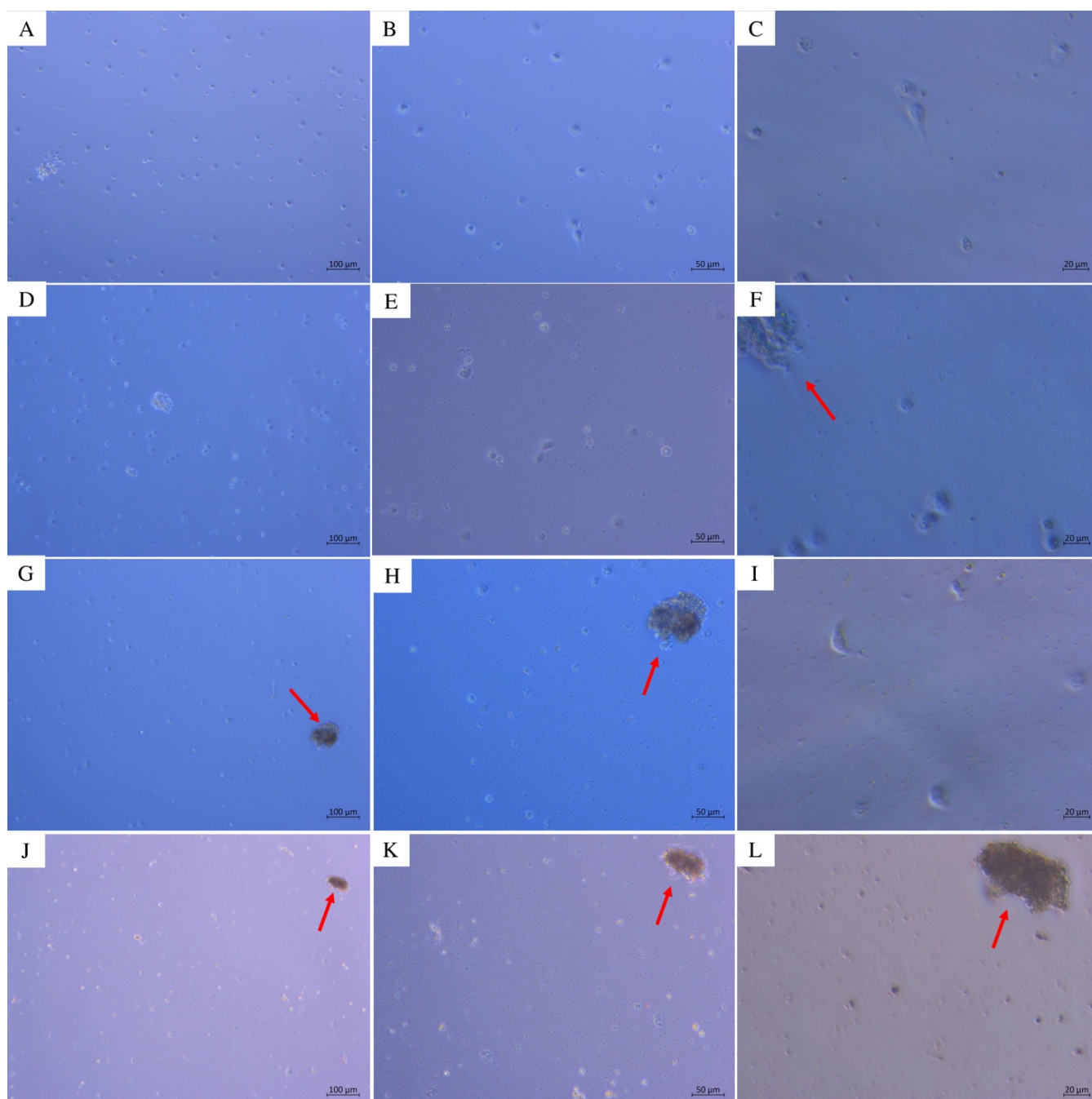


Figura 5 - Fotomicrografias em contraste de fase do cultivo *in vitro* de hemócitos de larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada em meio de cultura Schneider. (A) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (B) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (C) cultivo celular após 24 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (D) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (E) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (F) cultivo celular após 48 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (G) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (H) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (I) cultivo celular após 72 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2); (J) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 100X (Ph1); (K) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 200X (Ph1); (L) cultivo celular após 96 horas de incubação em aumento de 400X (Ph2). Setas vermelhas indicam aglomerados de células, característico de hemócitos.

3.2 Caracterização celular

A caracterização celular realizada a partir da análise morfológica (medições) permitiu determinar inicialmente que as células presentes no cultivo *in vitro* são hemócitos. Tal constatação foi possível devido a capacidade da célula se “espalhar” pela superfície em que se encontra, obtendo um formato alongado (Figura 6).

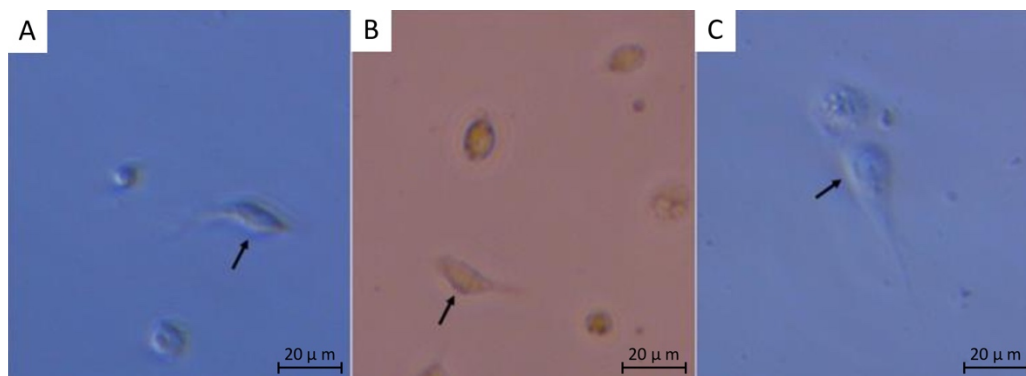


Figura 6 - Fotomicrografias das células cultivadas com formato alongado, demonstrando que estão se espalhando pela superfície da placa de cultura. (A) células cultivadas no meio Grace, após 24 horas de incubação; (B) células cultivadas no meio L-15, após 24 horas de incubação; (C) células cultivadas no meio Schneider, após 24 horas de incubação. Setas indicam algumas das células alongadas, que foram medidas para caracterização celular.

As medições celulares (comprimento e largura) permitiram observar que as células presentes nos artigos citados (Negri et al 2013; Negri et al 2014), que realizam o cultivo de hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera*, possuem dimensões muito semelhantes às cultivadas *in vitro* durante esta pesquisa, não havendo diferença estatística entre as medições (Tabela 1), permitindo afirmar que as células cultivadas eram hemócitos de larvas de abelhas *A. mellifera* africanizada que haviam sido ativadas e se aderiram a superfície plástica da placa de cultura.

Tabela 1 – Análise estatísticas das medições realizadas nas células cultivadas nos artigos citados em comparação com as medições realizadas com as células cultivadas na presente pesquisa.

Dados avaliados	Grau de liberdade	Soma dos quadrados (SQ)	Valor de F	Valor de F crítico	Valor de p
Comprimento	19	370,290729	0,413826	4,413873419	0,528145
Largura	19	22,9070748	3,663455	4,413873419	0,071654

F crítico > F = não há diferença estatística entre os dados avaliados. $p > 0,05$.

4. Discussão

O cultivo *in vitro* de hemócitos de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada, realizado no presente trabalho, permitiu determinar inicialmente um meio de cultura adequado para a incubação dessas células. O meio Grace é recomendado, uma vez que apresentou a maior

quantidade de células após a contagem realizada em câmara de Neubauer, bem como também pôde ser observada a proliferação celular (Figura 3).

Apesar dos três diferentes meios testados serem comumente utilizados em pesquisas com células de insetos, o meio Grace foi o que melhor se adaptou ao cultivo *in vitro* dos hemócitos. Uma possível justificativa para o desempenho desse meio é o fato de ser o que mais se aproxima da composição da hemolinfa (RACHINSKY; HARTFELDER, 1998). Já o meio L-15 foi desenvolvido inicialmente para cultura de células de mamíferos, mas é bastante aplicado em culturas de células de insetos (GENERSCH *et al* 2013). O meio Schneider, formulado especificamente para insetos e comumente utilizado no cultivo de células de *Drosophila* (ECHALIER, 1976; SCHNEIDER, 1978), possui a mesma quantidade de componentes (vitaminas, aminoácidos, sais inorgânicos, dentre outros) que o meio Grace porém, em quantidades inferiores, o que pode ter sido essencial para a manutenção dos hemócitos *in vitro*. Sendo assim, atesta-se a necessidade de testar diversos meios descritos na literatura, para definir qual se adequará corretamente ao tipo celular (LYNN, 1996).

Interessantemente, foi observada uma característica típica dos hemócitos, a capacidade de se espalharem pela superfície na qual se encontram. Essa característica foi descrita como uma forma de ativação da célula, ou seja, quando há o reconhecimento de alguma partícula invasora, seja ela patogênica ou não, a célula se adere a superfície estranha formando pseudópode no intuito de englobar o invasor, sendo essa ativação um processo irreversível para a célula, ou seja, os hemócitos não poderão ser inativados, estando aptos a desencadear mais efeitos imunitários, como a produção de fenoloxidase e consequente melanização da hemolinfa (DEAN *et al* 2004; DAVIES; PRESTON, 1985; CLARK; PECH; STRAND, 1997; NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014). Porém, como pôde ser visto nas fotomicrografias (Figura 3, 4 e 5), as células alongadas (ativadas) não representam a maior parte das células presentes na cultura, pois os hemócitos que não foram ativados, considerados hemócitos em repouso, não são aderentes à superfície plástica da placa de cultura e permanecem suspensos (ELEFThERIANOS *et al* 2009; GILLESPIE; KANOST, 1997). Para o cultivo *in vitro* com o intuito de testar agentes externos sobre essas células é necessário que a maioria delas não estejam ativadas, permitindo que seja observada a sua atividade apenas após a exposição ao composto químico a ser testado.

Outra característica dos hemócitos, que também foi observada, é a aglomeração, representando também uma característica de defesa, pois quando os hemócitos se aglomeram eles podem formar cápsulas ou nódulos em torno do agente invasor (LEVIN *et al* 2005; RATCLIFFE; ROWLEY, 1975; YU; KANOST, 2004). Existem formas de evitar esse tipo

de aglomeração com a adição de anticoagulantes, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) (COODIN; CAVENEY, 1992; NEGRI *et al* 2014), porém ao adicionar esse tipo de componente no cultivo *in vitro* é possível que não se obtenha a resposta adequada dos hemócitos quando forem confrontados com algum agente externo, pois aglomeração é uma resposta imunitária.

Com relação ao período estabelecido para a manutenção do cultivo *in vitro* dos hemócitos, ele foi determinado especificamente para futuros testes de toxicidade com diferentes ingredientes ativos presentes no mercado. Esses testes de toxicidade são pré-estabelecidos, tanto para abelhas adultas (OECD 1998a, 1998b) quanto para larvas (OECD 2013). O período de 96 horas é o período máximo de exposição aguda proposto pelo guia de avaliação para dos danos e mortes causados pelos insumos químicos em abelhas adultas; já para larvas, o protocolo publicado propõe uma aplicação única do insumo no alimento larval durante o quarto dia de desenvolvimento, e então são realizadas as avaliações dos mesmos durante as próximas 72 horas após a contaminação. Dessa forma, o período de 96 horas para análise dos hemócitos em cultura se adequaria tanto para a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos para abelhas adultas, quanto para larvas, pois integra os períodos máximos de exposição aguda para avaliação do efeito de agrotóxicos em ambos os estágios de desenvolvimento.

No entanto, são necessários mais estudos para afirmar se os hemócitos cultivados *in vitro* de larvas também podem ser utilizados para avaliação do sistema imune de abelhas adultas. Negri e colaboradores (2014) afirmaram que a atividade dos hemócitos de abelhas adultas, ao serem avaliadas individualmente são diferentes das atividades das células de larvas, porém, alegam que a atividade multicelular, ou seja, atividade realizada por diversas células, como o encapsulamento ou nodulação, são iguais em ambos os estágios de desenvolvimento. Neste contexto, há a necessidade de mais pesquisas para aferir a viabilidade da utilização da mesma cultura celular para testar a atividade do sistema imune em ambos os estágios, bem como as variações que podem ocorrer após o período de incubação e maneiras mais aprofundadas de caracterização.

Referências

- ALAUX, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774-782, 2010.
- ALVES, E.A.; GUIMARÃES A.C.R. Cultivo celular. 2010.
- ARMSTRONG, P.B.; MELCHIOR, R.; QUIGLEY, J.P. Humoral immunity in long-lived arthropods. **Journal of insect physiology**, v. 42, n. 1, p. 53-64, 1996.
- AUPINEL, P. *et al.* Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of insectology**, v. 58, n. 2, p. 107, 2005.
- AUPINEL, P. *et al.* Une nouvelle méthode *in vitro* pour évaluer les effets à court et moyen terme des pesticides sur les larves d'abeilles. **Bulletin Technique Apicole**, v. 34, n. 2, p. 42-48, 2007.
- AZEVEDO, P. *et al.* Standardization of *in vitro* nervous tissue culture for honeybee: A high specificity toxicological approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110040, 2020.
- BIESMEIJER, J.C.; SLAA, E.J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 240-258, 2006.
- BOVI, T.S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R.O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 239-245, 2018.
- BRANDT, A. *et al.* Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 4673, 2017.
- BRANDT, A. *et al.* The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016.
- CATAE, A.F. *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy research and technique**, v. 77, n. 4, p. 274-281, 2014.
- CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 12, p. 2252-2262, 2006.
- CLARK, K.D.; PECH, L.L.; STRAND, M.R. Isolation and Identification of a Plasmacyte-spreading Peptide from the Hemolymph of the Lepidopteran Insect *Pseudoplusia includens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23440-23447, 1997.
- COODIN, S.; CAVENEY, S. Lipophorin inhibits the adhesion of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes *in vitro*. **Journal of insect physiology**, v. 38, n. 11, p. 853-862, 1992.
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

CRUZ, A.S. *et al.* Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 165, 2010.

DAVIES, D.H.; PRESTON, T.M. The behaviour of insect plasmatocytes *in vitro*: changes in morphology during settling, spreading, and locomotion. **Journal of Experimental Zoology**, v. 236, n. 1, p. 71-82, 1985.

DEAN, P. *et al.* Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 7-8, p. 689-700, 2004.

DI PRISCO, G. *et al.* Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18466-18471, 2013.

DOMINGUES, C.E.C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

ECHALIER, G. *In vitro* established lines of *Drosophila* cells and applications in physiological genetics. In: **Int Conf on Invertebrate Tissue Culture; Applications in Medicine, Biology, and Agriculture**. 1976.

ELEFThERIANOS, I. *et al.* Plasmatocyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 12, p. 1840-1848, 2009.

FORFERT, N. *et al.* Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. **PloS one**, v. 12, n. 10, 2017.

FRANCOY, T.M., *et al.* Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 91-97, 2006.

FURTADO, W.C.A *et al.* Histochemistry and ultrastructure of urocytes in the pupae of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 6, p. 1502-1510, 2013.

GARRIDO, P.M. *et al.* Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 1, p. 113-119, 2013.

GASCUEL, J.; MASSON, C.; BEADLE, D. J. The morphology and ultrastructure of antennal lobe cells from pupal honeybees (*Apis mellifera*) growing in culture. **Tissue and Cell**, v. 23, n. 4, p. 547-559, 1991.

GASCUEL, J. *et al.* Morphological analysis of honeybee antennal cells growing in primary cultures. **Tissue and Cell**, v. 26, n. 4, p. 551-558, 1994.

GATEFF, E.; BREY, P.; HULTMARK, D. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. **Chapman and Hall**, Nova Iorque, p. 189-210, 1998.

GENERSCH, E. *et al.* Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2013.

- GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 611-643, 1997.
- GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255-1257, 2015.
- GREGORC, A. *et al.* Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, v. 147, p. 328-336, 2016.
- GREGORC, A. *et al.* Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 8, p. 1042-1049, 2012.
- IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.J.; AGATHOS, S.N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2003.
- KAVANAGH, K. and REEVES, E.P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.
- LEVIN, D.M. *et al.* A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 5, p. 369-380, 2005.
- LÓPEZ, J.H. *et al.* Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. **Scientific reports**, v. 7, p. 40853, 2017. ALVES, E.A.; GUIMARÃES A.C.R. Cultivo celular. 2010.
- LYNN, D.E. Development and characterization of insect cell lines. **Cytotechnology**, v. 20, n. 1-3, p. 3-11, 1996.
- MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P. **Noções de probabilidade e estatística**. Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
- MARTINS, G.F. *et al.* Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. **Tissue and Cell**, v. 43, n. 2, p. 83-90, 2011.
- MEUNIER, J. Social immunity and the evolution of group living in insects. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 370, n. 1669, p. 20140102, 2015.
- MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v. 24, p. 431-440, 1993.
- MÖCKEL, N.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Establishment of an *in vitro* model for DWV-infections. **Apidologie**, v. 40, p. 666, 2009.
- MÜLLER, W. *et al.* Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 178, p. 205-219, 1999.

- NEGRI, P. *et al.* Abscissic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. **Apidologie**, v. 46, n. 4, p. 542-557, 2015.
- NEGRI, P. *et al.* *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 610-617, 2014.
- NEGRI, P. *et al.* Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. **Apidologie**, v. 44, n. 5, p. 575-585, 2013.
- NEGRI, P. *et al.* Nitric Oxide stimulates melanin production during immune response in *Apis mellifera*. **Biocell**, v. 36, p. 68, 2012.
- NICODEMO, D. *et al.* Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2070-2075, 2014.
- OECD (1998a), *Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>.
- OECD (1998b), *Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070189-en>.
- OECD (2013), *Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>.
- OLIVEIRA, R.A. *et al.* Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014.
- PIRES, C.S.S. *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.
- POPPINGA, L. *et al.* Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.
- POTTS, S.G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- PUDNEY, M.; VARMA, M.G.R.; LEAKE, C.J. Establishment of cell lines from larvae of culicine (*Aedes* species) and anopheline mosquitoes. **TCA manual/Tissue Culture Association**, v. 5, n. 1, p. 997-1002, 1979.
- RACHINSKY, A.; HARTFELDER, K. *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 34, n. 8, p. 646-648, 1998.
- RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vitro*: phagocytosis in a new suspension culture system. **Journal of invertebrate pathology**, v. 26, n. 2, p. 225-233, 1975.

- ROCHA, M.C.L.S.A.; ALENCAR, S. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. **Brasília: Ibama**, 2012.
- ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SAMAKOVLIS, C. *et al.* *In vitro* induction of cecropin genes - an immune response in a *Drosophila* blood cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 188, n. 3, p. 1169-1175, 1992.
- SCHNEIDER, I. *Drosophila* cell and tissue culture. **Biology and genetics of Drosophila**, v. 2, p. 266-315, 1978.
- SMAGGHE, G.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 45, n. 3-4, p. 93-105, 2009.
- SOUTHWICK, E.E. The honey bee cluster as a homeothermic superorganism. **Comparative biochemistry and physiology Part A: Physiology**, v. 75, n. 4, p. 641-645, 1983.
- SZYMAŚ, B.; JEĐRUSZUK, A. The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 34, n. 2, p. 97-102, 2003.
- TAVARES, D.A. *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental pollution**, v. 229, p. 386-393, 2017.
- VIDAU, C. *et al.* Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS one**, v. 6, n. 6, p. e21550, 2011.
- YU, X.Q.; KANOST, M.R. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 9, p. 891-900, 2004.

6. DISCUSSÃO GERAL

O cultivo *in vitro* consiste em técnicas que permitem a manutenção e desenvolvimento de células, tecidos e órgãos em meios artificiais (CARVALHO; ARAÚJO, 2008). As técnicas de cultivo *in vitro* são essenciais para a compreensão do funcionamento dos organismos, pois permitem que as análises sejam realizadas diretamente nas células/tecidos de interesse, garantindo maior especificidade aos experimentos, bem como permitem o controle das variáveis ambientais, o que torna os ensaios facilmente reprodutíveis (ALVES; GUIMARÃES, 2010; ROGERO *et al.* 2003). Em alguns casos possibilita que haja proliferação celular, aumentando o número de células que podem ser testadas (HOFFMANN

et al. 2017), a manipulação das células cultivadas, bem como a identificação de patógenos e compreensão do sistema imune - patógeno (VISVESVARA, 2002), etc.

Apesar do cultivo *in vitro* de células de diversos seres vivos serem realizados frequentemente, os procedimentos para estabelecimento de um novo cultivo envolvem diversos passos, como: o preparo dos espécimes que serão utilizados, desde sua idade, estágio de desenvolvimento, assepsia, controle das variáveis ambientais no dia da coleta, etc. Ainda, é necessário determinar qual meio de cultura é mais viável para proliferação celular, determinar se as células envolvidas no cultivo são aderentes ou suspensas, as condições ideais para o crescimento dessas células (como a temperatura, umidade, gás carbônico, etc.), e uma quantidade mínima de células necessárias para o início da cultura e, posteriormente, também é preciso caracterizar essas células (MÜLLER, 1999a; MÜLLER, 1999b; LOBB *et al.* 2015; LYNN *et al.* 2018; FREYER; HARMS, 2017). Sendo assim, o estágio de desenvolvimento da abelha, bem como a variação de hemócitos nesses diferentes estágios juntamente com as variações ambientais de coletas foram inicialmente avaliadas. Também foram testadas as diversas técnicas de extração de hemolinfa de larvas descritas na literatura, bem como foram propostas novas técnicas.

A avaliação da quantidade de hemócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas mostrou que ocorrem variações significativas no número de hemócitos em todas as idades avaliadas. Essa variação pode ser dada por diversos fatores, como redução dos gastos energéticos da colônia (SCHMID *et al.* 2008), variações nas quantidades de proteínas e enzimas (RANDOLT *et al.* 2008), perda de habitats que pode modificar a alimentação (GOULSON *et al.* 2015; SZYMÁS; JEREDRUSZUK, 2003), casta a qual pertence a abelha (HYSTAD *et al.* 2017), mas principalmente, pela expressão de diferentes genes de imunidade, que são bastante modificados de acordo com a idade das abelhas (WILSON-RICH; DRES; STARKS, 2008).

Além disso, a temperatura também foi um fator que influenciou significativamente, ao nível de 0,01% de confiabilidade, a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa dentre todos os tratamentos testados (diferentes temperaturas). A temperatura pode

influenciar na quantidade de hemócitos circulantes, pois variações extremas na temperatura externa pode inviabilizar a coleta adequada de alimentos, ocasionando a falta de nutrientes que faz com que a colônia precise reduzir o gasto energético, afetando, consequentemente, a nutrição da cria e das operárias que recebem menos alimentos ou de menor qualidade proteica (AMDAM *et al.* 2004). Essa redução do gasto energético promove a redução da expressão de genes da imunidade, relacionados a manutenção da defesa celular das abelhas, reduzindo o número de hemócitos circulantes (STEINMANN *et al.* 2015), o que torna as abelhas adultas e larvas mais susceptíveis a doenças e parasitas, principalmente em baixas temperaturas (STARKS *et al.* 2000).

Assim, verificou-se que tanto a idade das abelhas, quanto as condições ambientais, como a temperatura, alteram a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa. Foi possível observar que um choque térmico, mesmo durante um curto espaço de tempo (10 minutos) causava redução na quantidade de hemócitos, quando comparadas com abelhas que não foram afetadas por baixas temperaturas. Tal impacto foi avaliado quantitativamente, tanto em adultas quanto larvas, por meio da contagem total de hemócitos. Desta forma, estabeleceu-se que a coleta de hemolinfa, para isolamento de hemócitos, em baixas temperaturas não são adequadas, pois há uma redução significativa na quantidade dessas células em todos os estágios de desenvolvimento avaliados, nos levando a estabelecer uma temperatura ideal para coleta, que pode variar de 30 a 34 °C.

Também foi necessário estabelecer qual o estágio de desenvolvimento da abelha *A. mellifera* mais adequado para a coleta de hemolinfa destinada ao cultivo *in vitro*, uma vez que a quantidade de células circulantes existentes e características da hemolinfa, como a atividade de enzimas oxidantes variam de acordo com tais estágios. Sendo assim, o estágio de desenvolvimento da abelha *A. mellifera* que melhor atendeu aos nossos objetivos foi o estágio larval, que além de possuir uma maior quantidade de hemócitos circulantes, sofre uma menor melanização da hemolinfa, a qual prejudica a sobrevivência dos hemócitos fora do organismo (SCHMID *et al.* 2008; WILSON-RICH; DRES; STARKS, 2008); porém, a dificuldade de extração de uma hemolinfa de alta qualidade e não contaminada de acordo

com os métodos de extração descritos na literatura, nos levou a estabelecer um novo método de extração que atendesse nossos objetivos.

Diversas técnicas descritas na literatura para extração da hemolinfa foram testadas, como o uso de agulhas, pinças e capilares (CHAN; HOWES; FOSTER, 2006; GILLIAM; SHIMANUKI, 1970; RANDOLT *et al.* 2008; RICHARDSON *et al.* 2018; TRIPATHI; DIXON, 1968; WILSON-RICH; DRES; STARKS, 2008); contudo, tais métodos de extração da hemolinfa de larvas não se mostraram tão bem definidos como os métodos de extração descritos para abelhas adultas (BORSUK *et al.* 2017; GARRIDO *et al.* 2013b; SZYMAŚ; JEDRUSZUK, 2003). Os artigos que utilizam a extração de hemolinfa larval focam, principalmente, no estudo de características da hemolinfa, como por exemplo, avaliação de proteínas nela existentes (CHAN; HOWES; FOSTER, 2006; CREMONZ; DE JONG; BITONDI, 1998; RANDOLT *et al.* 2008) e, não especificamente para o cultivo *in vitro*. Sendo assim, a presença de outros tipos celulares na hemolinfa não inviabiliza tais protocolos, já que são mais específicos e normalmente possuem diferentes etapas de processamento.

As amostras extraídas de acordo com as técnicas propostas na literatura apresentaram uma elevada turbidez, inexistente na coleta de hemolinfa de abelhas adultas e, para certificar a sua pureza, passaram por avaliação sob microscópio de luz. A visualização permitiu observar diferentes tipos celulares, sendo que grande parte correspondia às células do corpo gorduroso. Essa coleta errônea acontece porque as larvas ainda não possuem os sistemas completamente diferenciados e organizados (CHAPMAN, 1998; ROAT; CRUZ-LANDIM, 2010; TAVARES *et al.* 2017). Além disso, o corpo gorduroso preenche praticamente toda a cavidade das larvas, facilitando a extração deste tecido. Ainda, os intestinos estão localizados próximos ao local frequentemente utilizado para a punção lateral da hemolinfa, o que facilita a contaminação com fluídos gastrointestinais (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM, 2009).

Portanto, devido à dificuldade de extração de uma hemolinfa pura, foi necessário estabelecer um método específico para esta finalidade. A extração com a tesoura oftalmológica, com a realização de um pequeno corte na região da cabeça, além de permitir

a coleta de uma quantidade maior do que as outras técnicas, aproximadamente 20 μ L, apresentou alta qualidade e ausência de outros tipos celulares, que não os hemócitos.

Ainda, visando uma avaliação rápida, barata e eficaz, estabelecemos uma avaliação baseada na turbidez da amostra coletada. Tal turbidez é obtida pela quantidade de sólidos solúveis presentes na amostra, que foi corroborada pelas análises das amostras feitas sob microscópio de luz. Sendo assim, estabeleceu-se uma faixa em NTUs (unidades de turbidez nefelométricas) em que as amostras de hemolinfa se mostram satisfatórias quanto à qualidade e ausência de tipos celulares indesejados. O intervalo de confiança estabelecido para que a leitura dada em NTU seja aceitável como uma hemolinfa límpida e pura é de 22.432 até 24.504. Os valores de referência estabelecidos servirão como padrão para futuros testes com esse tipo de material, que dependam de amostras não contaminadas.

Após a padronização dos parâmetros iniciais, necessários para o início do cultivo *in vitro*, realizaram-se testes com os diferentes meios de cultura propostos. O meio que mais se adequou a manutenção dos hemócitos das larvas de abelha *A. mellifera* africanizada foi o meio Grace. Uma possível justificativa do desempenho desse meio de cultura é a sua composição, pois ele é mais parecido com a hemolinfa das larvas de abelha, bem como possui a maior quantidade de componentes quando comparado aos outros meios avaliados (RACHINSKY; HARTFELDER, 1998). Tais resultados demonstram a necessidade de testar diversos meios descritos na literatura, para definir qual se adequará corretamente ao tipo celular (LYNN, 1996).

Com a escolha do melhor meio para o cultivo *in vitro* dos hemócitos, houve a necessidade de determinar o tipo de célula que estava sendo cultivado, a fim de garantir que eram hemócitos. Para tanto, uma forma de análise morfológica foi utilizada, realizada a partir de medições celulares que eram comparadas com outros trabalhos realizados com hemócitos de abelha *A. mellifera* no mesmo estágio (NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014). Essa característica dos hemócitos que foi averiguada é a capacidade de alongamento da célula, causada pelo reconhecimento de alguma partícula invasora, seja ela patogênica ou não, fazendo a célula se aderir a superfície estranha e formar pseudópode, no intuito de englobar

o invasor (DEAN *et al* 2004; DAVIES; PRESTON, 1985; CLARK; PECH; STRAND, 1997; NEGRI *et al* 2013; NEGRI *et al* 2014). A análise quantitativa dessa característica permitiu inferir que as células cultivadas na presente pesquisa eram hemócitos.

Pelo exposto, conclui-se que os passos iniciais realizados para o estabelecimento da padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha *A. mellifera* africanizada geraram diversos resultados satisfatórios, que incluíram a determinação de um estágio de desenvolvimento ideal para a coleta da hemolinfa para obtenção dos hemócitos, a temperatura em que essa extração deverá ocorrer, bem como o método que deve-se utilizar para extrair corretamente a hemolinfa. Tais resultados não estão descritos na literatura e foram essenciais para o estabelecimento de uma cultura primária de hemócitos de abelha, que foi possível após a determinação de um meio de cultura adequado (Grace), que manteve os hemócitos das larvas de abelha *A. mellifera* africanizada viáveis durante 96 horas de incubação.

7. CONCLUSÕES

1 – Para a padronização do cultivo *in vitro* de hemócitos de abelha *A. mellifera* africanizada fez-se necessário determinar diversos parâmetros iniciais, como a técnica de extração das células desejadas, a temperatura ideal (ambiental e laboratorial) para a coleta da hemolinfa, o número de células viáveis para o início do cultivo *in vitro* e, consequentemente o estágio de desenvolvimento da abelha que possui uma maior quantidade de hemócitos circulantes;

2 – A contagem total de hemócitos permitiu estabelecer qual a melhor temperatura (32 ± 2 °C) e estágio de desenvolvimento para a extração dos hemócitos das abelhas (larvas em quinto instar pré-defecantes);

3 – As técnicas de extração da hemolinfa de larvas descritas na literatura não são as ideais para iniciar um cultivo *in vitro* de hemócitos, pois permitiram a contaminação da hemolinfa por outros tipos celulares ou fluídos gastrointestinais. Sendo assim, foi estabelecida uma nova técnica de extração da hemolinfa de larvas de abelha *A. mellifera* africanizada, na qual uma incisão com tesoura oftalmológica na região da cabeça da larva é realizada. A qualidade das amostras foi garantida por um método de análise de turbidez, determinando um intervalo de confiança (22.432 até 24.504 NTUs), em que a hemolinfa pode ser considerada livre de contaminações;

4 – O meio de cultura que apresentou o melhor desempenho para o cultivo *in vitro* de hemócitos das larvas de abelha *A. mellifera* africanizada foi o meio Grace, sem suplementação, apenas com 1% de gentamicina;

5 – O meio Grace manteve os hemócitos viáveis por 96 horas, sendo este o período máximo para avaliação da exposição aguda pré-estabelecido pela OECD para avaliação dos danos causados pelo uso de agrotóxicos, garantindo a viabilidade de futuros testes ecotoxicológicos diretamente sobre as células do sistema imune das abelhas cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL AUX, C. *et al.* Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology letters**, v. 6, n. 4, p. 562-565, 2010a.
- AL AUX, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774-782, 2010b.
- ALVES, E.A.; GUIMARÃES A.C.R. Cultivo celular. 2010.
- AMDAM, G.V. *et al.* Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 3, p. 741-747, 2004.
- AMIRI, F.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A.; ROUDKENAR, M.H. *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments. **Cell stress and chaperones**, v. 20, n. 2, p. 237-251, 2015.
- ARMSTRONG, P.B.; MELCHIOR, R.; QUIGLEY, J.P. Humoral immunity in long-lived arthropods. **Journal of insect physiology**, v. 42, n. 1, p. 53-64, 1996.
- BIESMEIJER, J.C.; SLAA, E.J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 240-258, 2006.
- BONCRISTIANI, H. *et al.* Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 5, p. 613-620, 2012.
- BORSUK, G. *et al.* A new method for quick and easy hemolymph collection from Apidae adults. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170487, 2017.
- BRANDT, A. *et al.* The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016.
- BRANDT, A. *et al.* Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 4673, 2017.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.

BULL, J.C. *et al.* A strong immune response in young adult honeybees masks their increased susceptibility to infection compared to older bees. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003083, 2012.

BURRITT, N.L. *et al.* Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0167752, 2016.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S.S. Técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas na mamoneira. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 12, p. 2252-2262, 2006.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. Cambridge University Press, 1998.

CLARK, K.D.; PECH, L.L.; STRAND, M.R. Isolation and Identification of a Plasmacyte-spreading Peptide from the Hemolymph of the Lepidopteran Insect *Pseudoplusia includens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23440-23447, 1997.

CREMONZ, T.M.; DE JONG, D.; BITONDI, M.M.G. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**, v. 91, n. 6, p. 1284-1289, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

DEAN, P. *et al.* Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 7-8, p. 689-700, 2004.

DOMINGUES, C.E.C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrocytic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

FREYER, D.; HARMS, C. Kinetic lactate dehydrogenase assay for detection of cell damage in primary neuronal cell cultures. **Bio-protocol**, v. 7, n. 11, p. e2308, 2017.

GARRIDO, P.M. *et al.* Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 1, p. 113-119, 2013a.

GARRIDO, P.M. *et al.* A standardized method to extract and store haemolymph from *Apis mellifera* and the ectoparasite *Varroa destructor* for protein analysis. 2013b.

GATEFF, E.; BREY, P.; HULTMARK, D. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. **Chapman and Hall**, Nova Iorque, p. 189–210, 1998.

GENERSCH, E. *et al.* Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2013.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 611-643, 1997.

- GILLIAM, M.; SHIMANUKI, H. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 9, n. 3, p. 387-389, 1967.
- GILLIAM, M.; SHIMANUKI, H. Coagulation of hemolymph of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.). **Experientia**, v. 26, n. 8, p. 908-909, 1970.
- GLASER, R. W. The growth of insect blood cells *in vitro*. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 1917.
- GOULSON, Dave *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255-1257, 2015.
- GREGORC, A. *et al.* Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 8, p. 1042-1049, 2012.
- GUPTA, A.P. Cellular elements in the hemolymph. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 3, p. 402-451, 1985.
- HOFFMANN, A. *et al.* Comparison of *in vitro*-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n. 9, p. 2565-2581, 2017.
- HYSTAD, E.M. *et al.* Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184108, 2017.
- IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.J.; AGATHOS, S.N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2003.
- JONES, J.C. *et al.* The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of comparative physiology A**, v. 191, n. 12, p. 1121-1129, 2005.
- KAVANAGH, K. and REEVES, E.P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.
- KOLEOGLU, G. *et al.* Varroa destructor parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. **Parasitology research**, v. 117, n. 4, p. 1175-1183, 2018.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.
- LOBB, R.J. *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27031, 2015.
- LÓPEZ, J.H. *et al.* Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. **Scientific reports**, v. 7, p. 40853, 2017.
- LYNN, D.E. Development and characterization of insect cell lines. **Cytotechnology**, v. 20, n. 1-3, p. 3-11, 1996.

- LYNN, D. E. Novel techniques to establish new insect cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 37, n. 6, p. 319-321, 2001.
- LYNN, S.A. *et al.* A convenient protocol for establishing a human cell culture model of the outer retina. **F1000Research**, v. 7, 2018.
- MASON, R.; TENNEKES, H.; SÁNCHEZ-BAYO, F. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. **J Environ Immunol Toxicol**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2013.
- MEUNIER, J. Social immunity and the evolution of group living in insects. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 370, n. 1669, p. 20140102, 2015.
- MÜLLER, H.M. *et al.* A Hemocyte-like Cell Line Established from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Expresses Six Prophenoloxidase Genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 17, p. 11727-11735, 1999a.
- MÜLLER, W. *et al.* Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 178, p. 205-219, 1999b.
- NAZZI, F.; PENNACCHIO, F. Honey bee antiviral immune barriers as affected by multiple stress factors: A novel paradigm to interpret colony health decline and collapse. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 159, 2018.
- NEGRI, P. *et al.* Nitric Oxide stimulates melanin production during immune response in *Apis mellifera*. **Biocell**, v. 36, p. 68, 2012.
- NEGRI, P. *et al.* Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. **Apidologie**, v. 44, n. 5, p. 575-585, 2013.
- NEGRI, P. *et al.* *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 610-617, 2014.
- NEGRI, P. *et al.* Abscissic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. **Apidologie**, v. 46, n. 4, p. 542-557, 2015.
- NEGRI, P. *et al.* Dietary Supplementation of Honey Bee Larvae with Arginine and Abscissic Acid Enhances Nitric Oxide and Granulocyte Immune Responses after Trauma. **Insects**, v. 8, n. 3, p. 85, 2017.
- OECD (1998a), *Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
Doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>.
- OECD (1998b), *Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris
Doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070189-en>.
- OECD (2013), *Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>.

PIRES, C.S.S. *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

POTTS, S.G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

RACHINSKY, A.; HARTFELDER, K. *In vitro* biosynthesis of juvenile hormone in larval honey bees: comparison of six media. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 34, n. 8, p. 646-648, 1998.

RANDOLT, K. *et al.* Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 69, n. 4, p. 155-167, 2008.

RICHARDSON, R.T. *et al.* Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. **Apidologie**, v. 49, n. 3, p. 397-410, 2018.

ROAT, T.C.; CRUZ-LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 382-389, 2010.

ROGERO, S.O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAMAKOVLIS, C. *et al.* In vitro induction of cecropin genes - an immune response in a *Drosophila* blood cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 188, n. 3, p. 1169-1175, 1992.

SCHMID, M.R. *et al.* Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 2, p. 439-444, 2008.

SCHMEHL, D.R. *et al.* Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of insect physiology**, v. 71, p. 177-190, 2014.

SMAGGHE, G.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. Insect cell culture and applications to research and pest management. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 45, n. 3-4, p. 93-105, 2009.

STARKS, P.T. *et al.* Fever in honeybee colonies. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 5, p. 229-231, 2000.

STEINMANN, N. *et al.* Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129956, 2015.

SZYMAŚ, B.; JĘDRUSZUK, A. The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 34, n. 2, p. 97-102, 2003.

TAVARES, D.A. *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental pollution**, v. 229, p. 386-393, 2017.

TRIPATHI, R.K.; DIXON, S.E. Haemolymph esterases in the female larval honeybee, *Apis mellifera* L., during caste development. **Canadian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 1013-1017, 1968.

VIDAU, C. *et al.* Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS one**, v. 6, n. 6, p. e21550, 2011.

VISVESVARA, S. *In vitro* cultivation of microsporidia of clinical importance. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 3, p. 401-413, 2002.

WILSON-RICH, N.; DRES, S.T.; STARKS, P.T. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 10-11, p. 1392-1399, 2008.

WOLOWSKI, M. *et al.* Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. **Espírito Santo: REBIPP**, 2019.