

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE APITOXINA POR ABELHAS *Apis*
mellifera L. E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS AO ESTRESSE**

MELINA STOIAN MODANESI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Agosto – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE APITOXINA POR ABELHAS *Apis*
mellifera L. E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS AO ESTRESSE**

MELINA STOIAN MODANESI

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof.Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Agosto – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
- SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M689p Modanesi, Melina Stoian, 1982-
Produção de apitoxina por abelhas *Apis mellifera* L. e seu efeito na expressão de genes relacionados ao estresse / Melina Stoian Modanesi. - Botucatu : [s.n.], 2012
vii, 34 f. : tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012

Orientador: Ricardo De Oliveira Orsi
Inclui bibliografia

1. Abelha. 2. Abelha européia. 3. Abelha - Veneno. 4. Genética - Expressão. 5. Veneno. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Dedicatória

A meus pais João Francisco Modanesi e Marisa Stoian Modanesi, por todos os ensinamentos, amor incondicional, apoio nos momentos necessários. Sempre me orientando pelos caminhos da vida e com as mãos estendidas, me ajudando a levantar quando sem querer ou perceber tropeçava nos obstáculos da vida. Agradeço a educação e princípios que me ensinaram e sem os quais não teria chegado até aqui.

À minha sobrinha Melissa Lima Modanesi, pelos sorrisos largos em cada reencontro, a cada lágrima e saudade nas despedidas, a cada descoberta feita, cada obstáculo vivido e superado, juntas sempre. Por me fazer ver a vida de uma maneira muito mais bonita e cheia de cor.

AMO VOCÊS

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por tê-la abençoado com pessoas maravilhosas.

Aos meus avós, Miguel e Alice, Domingos e Yolanda, sempre vivos em meu coração e um dia nos reencontraremos.

Ao meu irmão Bruno, pelos novos e velhos tempos e a todos os meus familiares, que torceram por mim e me apoiaram.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela paciência, atenção, ensinamentos, conversas, conselhos, compreensão, puxões de orelha. Tudo isso enriqueceu em muito a minha vida, não só acadêmica como também pessoal.

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla pela oportunidade, disponibilidade de equipamentos e conhecimentos na área de genética molecular.

Aos meus amigos Gislaine, Mariana, Érica, Priscila, Rodrigo, David, Jean, pelas risadas, abraços, choros, alegrias, festas, pizzas. Amigos de antes, amigos de alma, amigos para a vida toda. À Aline, que me acolheu e abriu as portas da sua casa e vida, compartilhando um pouquinho comigo a família tão maravilhosa que possui.

À minha família da Apicultura: Thais, Edison, Samir e Adriana. Tornamos-nos mais do que amigos, realmente somos uma família. Agradeço pela amizade, carinho, paciência e espero que tenhamos muitos espetinhos, bolos, almoços. E claro, muitas coletas de veneno, afinal família precisa permanecer unida até nas ferroadas!!!

Ao funcionário Wilson Ricardo Moreno, por toda a ajuda despendida.

Aos secretários da seção de pós-graduação, Seila Cristina Cassineli Vieira e Carlos Pazini Júnior pela atenção e ajuda nas questões burocráticas.

A todo corpo docente e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
– UNESP, pelos ensinamentos e oportunidades.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de
estudos.

AGRADEÇO MUITO A TODOS.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	01
Considerações Iniciais.....	02
Abelhas <i>Apis mellifera</i> e sua importância.....	02
Apitoxina.....	05
Estresse.....	09
Referências Bibliográficas.....	13
CAPÍTULO II.....	19
Resumo.....	20
Abstract.....	21
1. Introdução.....	22
2. Materiais e Métodos.....	23
2.1. Local do experimento e abelhas utilizadas.....	23
2.2. Tratamentos utilizados.....	24
2.3. Avaliação da expressão gênica.....	25
2.4. Análise Estatística.....	27
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	28
Agradecimentos.....	30
Referências.....	30
CAPÍTULO III.....	33
Implicações.....	34

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados.....	26
Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão para tempo (segundos) a primeira ferroadada (TPF) e número de ferrões na bolinha (NFB) de abelhas <i>A. mellifera</i> africanizadas em função do período do dia.....	27
Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão para a produção de veneno (miligramas) de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas em função do período do dia e tempo de coleta.....	27
TABELA 4. Médias e desvio padrão da quantificação relativa do gene defensina em abelhas externas e internas, em função dos diferentes tratamentos em abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

	Página
Figura 1. Coletor Elétrico de Veneno, formado por uma placa de vidro e filamentos que conduzem a corrente elétrica.....	09

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Abelhas *Apis mellifera* e sua importância

A abelha é um inseto milenar, presente em toda a história da humanidade. Pesquisas arqueológicas mostraram que as abelhas sociais já produziam e estocavam mel antes mesmo do surgimento do homem na Terra (Pereira et al., 2002).

Esses insetos apresentavam enorme importância para o homem e eram considerados sagrados por muitas civilizações como a grega, romana e egípcia. Existem relatos de que os egípcios criavam abelhas em potes de barro no ano 2.400 a.C.; mas, a palavra colmeia teve sua origem na Grécia, onde os gregos colocavam enxames em recipientes com formatos de sinos, feitos de palha trançada, chamados de *colmo* (Guedes, 2005).

Com o passar do tempo, as abelhas começaram a assumir grande papel na economia e foram consideradas um símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes. Também fizeram parte de brasões, cetros, coroas, moedas e mantos reais (Pereira et al., 2002).

Por meio de Aristóteles, algumas descobertas surgiram para o desenvolvimento da apicultura, mas só a partir do século XVII é que houve considerável avanço no desenvolvimento e um maior aperfeiçoamento das técnicas de manejo. Com o surgimento do microscópio, Swammerdam (1637-1680) descobriu que quem comandava a colmeia era a rainha, pois até então acreditava-se que fosse um “rei”. Algumas outras descobertas foram feitas ao longo dos anos, mas uma das mais comentadas e de grande importância foi a descoberta do “espaço abelha” por Lorenzo Lorain Langstroth, em 1851. Ele descobriu que para os favos não grudarem uns nos outros e para que as abelhas pudessem transitar entre os favos, precisaria haver um espaço de 6 a 9 mm entre eles. Essa descoberta facilitou muito o manejo e até hoje esse espaçamento é utilizado como padrão na apicultura (Rocha, 2008).

No Brasil, antes da introdução da espécie *Apis mellifera*, existiam as abelhas nativas, também conhecidas por meliponídeos, abelhas sem ferrão e como eram manejadas pelos indígenas, são chamadas também de “abelha indígena”. Podemos citar algumas espécies como a Abelha Mirim (*Trigona mínima*), Irapuá (*Trigona ruficus*), Jataí (*Tetragonisca angustula*), Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*). Essas

abelhas, até 1838, eram as únicas produtoras de mel e principais polinizadoras (Lopes et al., 2005).

Então em 1839 a atividade apícola, propriamente dita, teve seu início no Brasil por meio da introdução de abelhas da espécie *Apis mellifera*, no estado do Rio de Janeiro. Essa introdução ocorreu por meio do Padre Antonio Pinto Carneiro com a autorização de Dom Pedro II, com o direito exclusivo de importar abelhas da Europa para satisfazer a corte real por meio da alimentação (mel) e produção de velas (cera). As abelhas que existiam no sul do Brasil provinham principalmente de Assunção no Paraguai e imigrantes europeus. As autorizações para as importações prosseguiram, disseminando assim a apicultura no Brasil (Pegoraro, 2007).

A introdução das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*), foi de grande importância, porém sua produção não era tão elevada. Há relatos de apicultores que por volta de 1950, alguns enxames se extinguíram por problemas ambientais. Para tentar melhorar a produtividade apícola, em 1956, o professor Warwick Stevam Kerr da Universidade de São Paulo, introduziu a sub-espécie africana *Apis mellifera scutellata*, considerada mais produtiva e resistente à doenças, para testes experimentais. Ocorreu um acidente e rainhas africanas fecundadas fugiram e os zangões provenientes dessas rainhas cruzaram com as existentes aqui, gerando assim as abelhas africanizadas. Essa miscigenação de raças européias e africanas resultou no surgimento de um polihíbrido que foi denominado de *Apis mellifera* Africanizada (Gonçalves, 2000).

Essas abelhas possuíam alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos, alta produção de mel, rápida capacidade de reprodução e enxameação, proporcionando um rápido povoamento das regiões e apiários. Todos esses fatores contribuíram para que as abelhas africanizadas ocupassem quase todo continente americano (Gonçalves, 2001; Krebs, 2001).

São muito defensivas, produtivas, organizadas e possuem funções específicas dentro da colméia. A colméia é constituída por três castas: Rainha, Operárias e Zangões (Embrapa, 2003).

A rainha possui a função de ovoposição, colocando em média 2.000 ovos por dia e secreta feromônios para que haja: coesão entre as operárias, construção de realeiras (quando a rainha está muito velha), enxameação (caso o enxame precise ir embora ou se dividir), também possui influência sobre a fisiologia das operárias inibindo o desenvolvimento de seus ovários. Ela é a principal responsável pela passagem dos genes adiante. Pode viver até cinco anos e deve ser única na colmeia.

O zangão tem como função a reprodução, podendo viver até 80 dias e com número de indivíduos na colméia podendo chegar a 400 (Embrapa, 2003).

As operárias possuem funções específicas de acordo com a idade que apresentam. Após a emergência, do 1º ao 3º dia, recebem o nome de “abelha operária faxineira” e exercem a função de limpar os quadros, favos e colméia. Do 4º ao 14º dia são chamadas de “abelha operária nutriz” e tem como função alimentar as larvas e a rainha. As larvas de até três dias e a rainha são alimentadas com a geléia real que é produzida por meio da junção de secreções das glândulas mandibulares e encefálicas. As larvas, após passado esse período de três dias, são alimentadas com uma mistura de mel e pólen. Do 14º ao 19º dia recebem o nome de “abelha operária engenheira” e tem como função a secreção de cera (produzidas nas glândulas cerígenas presentes do 4º ao 7º segmento abdominal) para a construção de favos e fechamento dos opérculos. Do 19º ao 21º são chamadas de “abelha operária guardiã” e são responsáveis por fazer a guarda da colônia contra inimigos e possíveis invasores. Dos 21 dias até a morte recebem o nome de “abelha operária campeira” e fazem toda a coleta externa da colmeia como o néctar, pólen, resinas e água. As operárias vivem em média 42 dias. O número de operárias na colméia pode variar bastante podendo chegar de 80.000 até a 100.000 (Embrapa, 2003).

O néctar colhido é importante, pois posteriormente será transformado em mel por meio de enzimas como a invertase, amilase e glicose-oxidase e servirá de alimento energético para as operárias, larvas acima de três dias e zangões. O pólen serve de alimento protéico para os indivíduos já citados e essa colheita tem um importante papel para o meio ambiente por meio da polinização. As resinas colhidas são moldadas com a enzima 13-glicosidase presente na saliva das abelhas e então recebem o nome de própolis. Essa própolis é importante para vedar frestas dentro da colmeia, recobrir possíveis invasores mortos para que não haja proliferação de fungos e microorganismos e limpeza dos favos. A água é colhida principalmente para a termorregulação da colmeia em dias muito quentes (Braga, 1998).

O Brasil é um país propício para a apicultura e apresenta um alto índice de área de cobertura vegetal, que somada aos recursos hídricos naturais, apresenta uma enorme biodiversidade de flora, e assim, as abelhas podem desempenhar seu papel de polinizadoras, proporcionando a perpetuação de espécies vegetais que, por sua vez, fornecem os recursos necessários à atividade apícola (MCT, 2001).

A apicultura é uma atividade rentável e sobretudo ecológica, podendo ser desenvolvida em, praticamente, todo o espaço geográfico brasileiro, desde que

possua condições climáticas favoráveis e uma vegetação rica em floradas, sendo uma atividade sustentável e de grande importância econômica (Lima, 2005).

A criação de abelhas é uma atividade que promove a melhoria da qualidade de vida através da geração de ocupação e renda e não degrada o meio ambiente, nem contamina ou esgota os recursos naturais e possibilita às famílias a prática de outras atividades agrícolas (CBA; FAPIC, 2008).

Apitoxina

A palavra apitoxina vem do latim e significa: *apis* - abelha e *toxikon* – veneno. O veneno é utilizado pelas abelhas como uma das formas de defesa e proteção da colmeia. Isso ocorre devido à eficiente comunicação entre as abelhas por meio de feromônios de alarme produzidos pelas células da glândula de veneno (isopentilacetato) e das glândulas mandibulares (2-heptanona) das operárias. Esses feromônios sinalizam para as demais operárias da colmeia onde está o possível inimigo (Nogueira-Couto; Couto, 2002).

Segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, os requisitos da apitoxina são: Características Sensoriais (próprias ao produto) e Requisitos físico-químicos (Umidade: máximo 3%; teor protéico: 50% a 85%); Fosfolipase A: 17 a 19 U mg⁻¹ de proteína. O acondicionamento do produto deve ser com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação, não se autorizando aditivos (Brasil, 2001).

Na colmeia quem possui ferrão são: a rainha e as operárias. O ferrão da rainha é usado na luta contra rivais. Quando nasce uma rainha, a primeira coisa que se faz é procurar outras realeiras (local onde se desenvolve a rainha), para destruí-las, evitando assim o nascimento de outras rainhas. Se nascerem duas rainhas simultaneamente, vão brigar até que só uma sobreviva. A rainha consegue usar seu ferrão várias vezes, pois ele não é farpado, não ficando preso à vítima (Winston, 2003)

O veneno é produzido por uma glândula (glândula ácida ou de veneno) e armazenado na bolsa ou reservatório de veneno. A glândula de veneno localiza-se na região posterior do abdômen, entre o reto e os ovários. Histologicamente trata-se de um túbulo excretor fino de comprimento variável, podendo ser bifurcado na região

distal e na proximal apresenta uma dilatação em forma de saco denominado reservatório (Cruz-Landim e Abdalla, 2002).

É a partir das idades de 10 e 15 dias que as glândulas ácidas das operárias tornam-se aparentemente mais desenvolvidas. Este grau de desenvolvimento decai um pouco nas operárias com 25 e 30 dias, pois o auge da produção precisa acontecer quando a abelha está na fase de guardiã. Outro fato a ser notado é que nas operárias recém-emergidas até com cinco dias, os sacos de veneno acham-se quase que vazios de secreção, ao contrário do que ocorre com as operárias das outras idades (Cruz-Landim et al., 2002). Alves Jr. (1987) demonstrou que o tamanho da glândula influencia na quantidade de veneno encontrado no reservatório de operárias com 28 dias de idade pós-emergência.

Na *A. mellifera*, a composição do veneno varia de acordo com a sub espécie, fase do desenvolvimento e com os hábitos alimentares. As principais alterações encontradas são variações nas concentrações das proteínas do veneno ao longo das estações do ano, demonstrando uma influência do meio (Abreu, 1996).

Funari et al. (2001) realizaram estudo comparativo entre a produção e liberação de veneno durante a ferroada por abelhas africanizadas e híbridas europeias, resultantes do cruzamento entre abelhas italianas com africanizadas e cárnicas com africanizadas. Constataram que as africanizadas liberaram maior quantidade de veneno, mesmo tendo apresentado um menor volume no reservatório.

O veneno produzido pela *Apis mellifera* é um líquido transparente, incolor e muito solúvel em água. Possui, aproximadamente, 50 componentes identificados, sendo muitos deles tóxicos para vários animais. O comportamento de ferrear das abelhas é, geralmente, desencadeado pela competição por alimento e pelo comportamento defensivo, protegendo assim toda a colônia contra possíveis invasores (Cruz-Landim et al., 2002).

O veneno injetado em uma ferroada contém aproximadamente 50 µg de matéria seca. As principais proteínas presentes são a Melitina (50% do peso seco do veneno), Fosfolipase A2 (12% PSV), fator degranulador de mastócitos (3% PSV), hialuronidase (3% PSV) e apamina (2% PSV). Além disso, estão presentes aminas biogênicas, entre elas histamina (1 % PSV), dopamina (0,5% PSV) e noradrenalina (0,5% PSV). Também estão presentes muitos acetatos voláteis que, presumivelmente, estimulam o comportamento defensivo de outras abelhas (Cruz-Landim et al., 2002).

A toxicidade desses venenos é atribuída a três componentes protéicos: enzimas (Fosfolipases A2 e Hialuronidase), grandes peptídeos (Melitina, Apamina e

Peptídeo degranulador de mastócitos - PDM) e pequenas moléculas (Peptídeo e Aminas biogênicas), que possuem atividades alérgicas e farmacológicas. Os fatores alergênicos são enzimas como fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfotases, proteínas antigênicas que inoculadas durante a ferroada, iniciam respostas imunes responsáveis pela hipersensibilidade de alguns indivíduos e pelo início da reação alérgica (Cardoso et al., 2003).

Fosfolipases A2 são enzimas dependentes de Ca^{2+} e liberam ácidos graxos e lisofosfolídeos. Seu mecanismo de ação está relacionado à destruição de fosfolípidos levando à ruptura da membrana, com conseqüente formação de "poros", lise celular e assim, permitindo a entrada do veneno nas células. Além do seu papel fundamental no metabolismo de lipídeos, estas enzimas estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem participar de uma variedade de funções biológicas, como regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor (De Maria et al., 2007).

Tanto as Fosfolipases A2 quanto a Melitina são tóxicas, porém quando agem juntamente seus efeitos são potencializados, fazendo com que a lise celular ocorra mesmo na presença de baixas concentrações desses componentes. A Melitina e Fosfolipase A2 agem de forma sinérgica sobre os fosfolípidos das membranas, resultando no comprometimento de sua integridade e da membrana mitocondrial, comprometendo a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória, ocasionando dano tecidual. Essa atividade é exercida sobre diversos grupos celulares como hemácias, células musculares, hepatócitos, fibroblastos, mastócitos e leucócitos. (Lima et al., 2003).

A hialuronidase faz com que o ácido hialurônico fique mais fluido, facilitando a difusão dos componentes do veneno através dos espaços intercelulares dos tecidos, sendo conhecido como "fator propagador" (Cardoso et al., 2003).

A Apamina está presente em apenas 2% da matéria seca. Age no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), bloqueando a transmissão de impulsos inibitórios. A injeção de apamina em ratos mostrou que esta afeta especificamente as estruturas motoras e auditivas (Vélez, 2010).

O peptídeo degranulador de mastócitos (PDM) é o principal responsável pela liberação dos mediadores de mastócitos e basófilos, como a histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos.

Desempenha papel no quadro de intoxicação histamínica observada nas fases iniciais da ferroadada (Cardoso et al., 2003)

Em indivíduos que levam múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas, geralmente é detectada hemólise intensa acompanhada por insuficiência renal, causada pela ação da apamina, melitina e fosfolipase A2 sobre a membrana eritrocitária. Os indivíduos acometidos por milhares de ferroadas evoluem rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal agudas. Nos casos letais, os indivíduos apresentam necrose tubular aguda com presença de cilindros de hemoglobina e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais. Os músculos esqueléticos apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação. Alguns indivíduos apresentam lesões com presença de necrose muscular. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento (Barraviera, 1994). Ferreira et al. (1995) demonstraram que após a inoculação de peçonha de abelha em ratos, ocorreu lesão necrotizante cardíaca aguda, similar ao infarto humano.

Apesar dos efeitos deletérios, a apitoxina também possui efeitos benéficos e segundo Leite et al. (2005), a apiterapia (uso de produtos apícolas em benefício do homem) tem sido usada para vários problemas de saúde, tais como eczemas, úlceras tópicas, infecções como laringite e mastite, problemas reumatológicos, cardiovasculares, pulmonares e ortopédicos, além de auxiliar na inibição do câncer ovariano, esclerose múltipla e possui efeito antibiótico.

Os efeitos da apiterapia também foram constatados em animais, sendo capaz de atuar na reprodução de bovinos elevando a produção de esperma; uso como analgésico em ratos; tratamento para o câncer, elevando a sobrevivência de ratos tratados com a apitoxina; reduz o número de aberrações cromossômicas em ratos expostos à radiação gama, além de suas propriedades reumatológicas e antiinflamatórias também confirmadas em humanos (Leite et al., 2005).

O tratamento por meio da apiterapia muitas vezes consiste na aplicação direta da apitoxina por meio das ferroadas ou por meio de cápsulas e cremes (Maia, 2002).

Para que o veneno possa ser utilizado sem que haja a necessidade da aplicação direta da ferroadada, alguns métodos de colheita foram aperfeiçoados. Uma das maneiras para a extração do veneno é forçar a ferroadada da abelha em uma membrana para separar o ferrão e o veneno, sendo este despejado em um recipiente para que seja recolhido e armazenado. Outra maneira, seria matar as abelhas para

extrair o veneno de sua massa corporal por remoção cirúrgica da glândula de veneno (Durán et al., 2011).

Outro método é a utilização de coletores elétricos colocados na entrada da colmeia, o que permite a colheita de veneno livre de impurezas (Figura 1) (Leite et al., 2005). Esse coletor possui filamentos que conduzem a corrente elétrica, uma bateria e uma placa de vidro onde esse veneno será depositado. Quando o coletor é colocado no alvado (entrada da colmeia) as abelhas pousam sobre ele, ocorrendo um pequeno choque que promove contração da musculatura acessória do aparato de veneno. Assim, certa quantidade de veneno é liberada sobre uma placa de vidro. A fase volátil evapora ficando somente o veneno seco (Dussart; Bartholomé, 2007).



Figura 1: Coletor Elétrico de Veneno, formado por uma placa de vidro e filamentos que conduzem a corrente elétrica.

Estresse

O termo estresse vem do inglês “stress” e foi introduzido pelo fisiologista alemão Hans Selye em 1936. Foi utilizado para traduzir uma resposta do organismo a um estressor ou a alguma situação estressante. Trata-se por uma expressão genérica referente a ajustes fisiológicos, tais como ritmo cardíaco e respiratório, temperatura corporal e pressão sanguínea, os quais ocorrem durante a exposição do animal a condições adversas (Margis, 2003; Wielebnowski, 2003).

Segundo Fraser et al. (1975), um animal apresenta-se em estado de estresse quando necessita alterar de maneira extrema sua fisiologia ou seu comportamento para adaptar-se a aspectos diversos do seu ambiente e manejo. Essa adaptação envolve uma série de alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais que funcionam para manter o equilíbrio de suas funções.

Carrasco & Van de Kar (2003) definiram estresse como “respostas organizadas na tentativa de aumentar a sobrevivência do indivíduo e são representadas por alterações das funções autônomas, secreção de múltiplos hormônios e mudanças de comportamento”.

Segundo Margis et al. (2003), o termo estresse denota o estado gerado pela percepção de estímulos que, ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação, caracterizado pelo aumento de adrenalina, produzindo diversas manifestações sistêmicas, com distúrbios fisiológicos. Desta maneira, o estresse representa uma resposta fisiológica para um grande desvio do esperado, capaz de perturbar o equilíbrio homeostático (Magalhaes, 1998; Andrade, 2002; Smith, 2003; Wielebnowski, 2003; Lima et al., 2006).

Em decorrência dessa resposta ao estresse, e junto ao desconforto, o bem-estar do animal fica prejudicado. O alívio adequado desses sintomas promove o bem-estar geral do animal, além de apresentar um efeito positivo sobre sua vida (Hellebrekers, 2002).

O estresse pode ser classificado em agudo e crônico. O estresse agudo pode ser caracterizado pelo estado em que um organismo se apresenta após as alterações geradas pelo estresse por meio de tempos curtos, mas com intensidade exagerada. O estresse crônico é quando o organismo não consegue controlar as alterações, causadas por algum desconforto, levando um longo período para se restabelecer (Andrade, 2002).

Kindlovits (1999) classifica os agentes estressores em psicológicos, somáticos (físicos) e comportamentais. Destacam-se como agentes psicológicos a apreensão, ansiedade, medo, frustração, pavor, novidade e fatores sociais. Entre os somáticos estão incluídos sons, sinais visuais, odor estranho, contatos inesperados, calor, frio e pressão. Os agentes comportamentais são: isolamento, superpopulação, proximidade de animais de espécies antagônicas, fadiga de transporte, exercício muscular exaustivo, disputa territorial e/ou hierarquia entre animais de um mesmo grupo, modificação de ritmo biológico, jejum prolongado, presença ou não de fêmeas no grupo social e privação de água.

Os insetos apresentam um grande número de mecanismos de defesa. Muitos insetos, incluindo as abelhas *Apis mellifera*, possuem comportamento adverso a predadores, patógenos, e agentes estressores do ambiente onde se encontra o enxame (Hatano et al., 2008; Francke et al., 2008).

Muitas evidências têm sugerido que o estresse modula a resposta imune e, um componente importante para esta resposta nos insetos, é a presença da defensina. As defensinas são peptídeos e podem atuar como elo entre a imunidade inata e a adaptativa, ativando a defesa de longa duração ou imunidade adaptativa (Basset, 2003), sendo secretada pela hemolinfa (Vizioli et al., 2000).

Os níveis de defensina na hemolinfa podem ser alterados por meio de agentes patogênicos que desencadeiam uma resposta imunológica, como por exemplo, o ácaro *Varroa destructor* (Evans, 2006).

Além disso, outros fatores podem interferir nos níveis de defensina, como sons, estímulos visuais, odor, proximidade de outros animais, disputa pelo território, dentre outros (Ursic-Bedoya; Lowenberger, 2007). Desta forma, a extração de veneno e liberação de feromônios de alarme podem promover níveis de estresse nas abelhas e, conseqüentemente, desencadear uma resposta imunológica e o aumento de expressão de genes para a síntese de defensina.

O nível de estresse das abelhas pode ser monitorado por meio da alteração na expressão de genes relacionados a esta situação, entre eles os genes que codificam a defensina, proteína de defesa (Scharlaken et al., 2008).

A actina é um gene constitutivo e é expressa em vários tecidos para assegurar as funções celulares (Alberts et al., 2002; Lewin, 2004). Esse tipo de gene tem sido estudado em diferentes tecidos para compreensão dos padrões de expressão gênica dentro das respectivas velocidades de evolução (Zhang et al., 2004). Desempenha funções de transporte intracelular e está associada à motilidade das células, endocitose, citocinese e na adesão celular (Brakebusch; Fassler, 2003; Engqvist-Goldstein; Drubin, 2003; Ascough, 2004). Este gene constitutivo serve como referência para análise semi-quantitativa (ASQ) de outros genes induzidos e amplificados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) (Bagaldo et al., 2006)

Além da comparação em ASQ, o uso de um gene constitutivo em diagnósticos moleculares, serve como referência da amplificação da técnica de PCR, conferindo confiabilidade ao exame, eliminando assim possibilidade de reações falso-negativas, por contaminação ou pipetagem errada do DNA genômico (DNAg) ou das enzimas (Wiedorn; Goldmann, 2003; Zhao; et al, 2005).

Embora o veneno possua propriedades terapêuticas, sua extração provoca estresse dentro da colmeia e entre seus indivíduos, pois quando as abelhas ferroam o vidro do coletor colocado no alvado o veneno fica depositado na placa, e há a liberação de ferormônios de defesa fazendo com que outras abelhas também ferroem o vidro. Desta forma, mesmo não promovendo a morte das abelhas, não se tem conhecimento do quanto este pode influenciar na colmeia. Pressupõe-se que estes manejos realizados promovam alterações comportamentais que podem interferir nas atividades de rotina do enxame, ocasionando um estresse, que pode ser tanto agudo quanto crônico, nas abelhas.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram verificar o efeito do período (manhã e tarde) e tempo de colheita (30 e 60 minutos) na produção de veneno por abelhas *Apis mellifera* africanizadas e a influência deste manejo na expressão de genes relacionados ao estresse.

A presente pesquisa resultou em um artigo, intitulado “**EFEITO DO ESTRESSE NA PRODUÇÃO DE APITOXINA EM *Apis mellifera* L.**”, o qual será submetido à Revista Apidologie, conforme as suas regras de publicação.

Referências Bibliográficas

ABREU, R. M. M. **Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae).** 1996. 102f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

ALBERTS, B.; et al. *Molecular Biology of the Cell.* **Garland Science**, 2002.

ALVES JR, V. V. **Estudo do tamanho da glândula ácida em operárias de *Apis mellifera* (L.) descendentes de rainhas cruzadas com um zangão.** 1987. 99f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista , 1987.

ANDRADE, A. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 386p.

ASCOUGH, K.R. Endocytosis: Actin in the Driving Seat. **Current Biology**, v.14, p.124-6, 2004.

BAGALDO, A. R.; et al. Utilização de indicadores de atividade celular no desenvolvimento pós-natal do jejuno e íleo de bezerros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p.128-138, 2006.

BARRAVIERA, B. Acidentes por abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada.** Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1994. p. 339-344.

BASSET, C.; et al. Innate immunity and pathogen-host interactions. **Vaccine**, v.21, p.12-23, 2003.

BRAGA, A.S. **Apicultura: o caminho para a cidadania.** Salvador, Bahia, 1998. 270p.

BRAKEBUSCH, C.; FASSLER, R. The integrin–actin connection, an eternal love affair. **The EMBO Journal**, v.22, p.2324–2333, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico para fixação de identidade de apitoxina.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 16 fev.2012.

CARDOSO, J. L. C.; et al. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).

CARRASCO, G.A.; van de KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.235-272, 2003.

CBA. Confederação Brasileira de Apicultura; FAPIC. Federação das Associações dos Apicultores do Estado do Pará. **AMAZONPEC 2008. I Seminário da Cadeia Produtiva Apícola da Amazônia.** Belém/PA, 2008. Disponível em: <http://www.apitrack.com/pdf/Brasil_Amazonia_Seminarioa_08_2008.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas exócrinas das abelhas.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 181p.

DE MARIA, L.; et al. Phospholipase and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.74, p. 290-300, 2007.

DURÁN, X. A.; CIFUENTES, Y. L.; ULLOA, D. M. Evaluación de dos frecuencias de colecta de apitoxina extraída de colmenas de *Apis mellifera* L. durante la época estival en la Región de La Araucanía. Idesia. **Arica**, v.29, p.145-150, 2011.

DUSSART, E.; BARTHOLOMÉ, Y. **Taller elaboración de subproductos de la miel y lãs colmenas.** Managua, Nicaragua, 2007. 51p.

EMBRAPA. Embrapa meio norte. **Organização social e desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera***, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br//fonteshtml/mel/spmel/index.htm>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

ENGQVIST-GOLDSTEIN, A.E.Y.; DRUBIN, D.G. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.19, p. 287-332, 2003.

EVANS, J. D. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease **J. Invert. Pathol.**, v.93, p.135–9, 2006.

FERREIRA, D. B.; et al. An infarctlike myocardial lesion experimentally induced in Wistar rats with Africanized bee venom. **J. Pathol**, v.177, p.95-102, 1995.

FRANCKE, D. L.; et al. Pea aphid dropping behavior diminishes foraging efficiency of a predatory ladybeetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p.118-124, 2008.

FRASER, D.; RITCHIE, J. S. D.; FRASER, A. F. The term stress in a veterinary context. **Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 131, p. 653-662, 1975.

FUNARI, S.R.C.; et al. Venom production by africanized honeybees (*Apis mellifera*) and africanized-european hybrids. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.7, p.190-198, 2001.

GONÇALVES, L. S. Perspectivas da exploração da apicultura com abelhas africanizadas no contexto apícola mundial. 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: XIII Congresso Brasileiro de Apicultura. Confederação Brasileira de Apicultura, 2000.

GONÇALVES, L.S. Impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e pela competição das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* com seu parasita obrigatório, o pseudoclone de *Apis mellifera capensis*, 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: V Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto, 2001.

GUEDES, P. **As abelhas no mundo: Mais antigas que o homem.** O Mundo das Abelhas. São Paulo: Escala, p.17, 2005.

HATANO, E. et al. Do aphid colonies amplify their emission of alarm pheromone? **Journal of Chemical Ecology**, Lexington, v. 34, n. 9, p. 1149-1152, 2008.

HEDRICK, H.B. et al. **Principles of meat science**. 3.ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing, 1994. 354p.

HELLEBREKERS, L.J. Fisiopatologia da dor em animais e sua consequência para a terapia analgésica. In: **Dor em animais**. São Paulo, 2002, p.69-79.

KINDLOVITS, A. **Clínica e terapêutica em primatas neotropicais**. Juiz de Fora: Editora UFJF, 1999. v. 7, p. 31-32.

KREBS, C. J. **Ecology**. San Francisco: Benjamin Cummings Press, 2001, 695p.

LEITE, G. L. D.; ROCHA, S. L. Apitoxina. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 7, n.1, p.115-125, 2005.

LEWIN B. **Genes VIII**. 8.ed. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, 2004.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n.3/4, p.113-117, 2006.

LIMA, P. R.; et al. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.9, n.2, 2003.

LIMA, S. A. M. de. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LOPES, M.; FERREIRA, J.B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v.2, n.4, 2005.

MAGALHÃES, H. M. **Farmacologia veterinária: temas escolhidos**. Guaíba : Agropecuária, 1998. 34p.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, Porto Alegre, p. 65-74, 2003.

MCT. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Plataformas tecnológicas para a Amazônia legal:** cadeia produtiva de apicultura no Estado de Roraima. Projeto nº. RRAP-021. Brasília, 27p, 2001.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura:** manejo e produtos. Jaboticabal: Funep, 2002. 191p.

PEGORARO, A. **Técnicas para boas práticas apícolas,** Curitiba: Layer, 2007.

PEREIRA, F. M.; et al Produção de mel. **Embrapa.** 2002. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa>>. Acesso em: 06 fev. 2012.

PEREIRA, F. M.; VILELA, S. L. O. **Estudo da cadeia produtiva do mel no estado de Alagoas.** SEBRAE. 2003. 65p.

ROCHA, J.S. Manual técnico: **Apicultura.** PROGRAMA RIO RURAL Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento Superintendência de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro. 2008.

SCHARLAKEN, B; et al. Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Dev Comp Immunol.**, v.32, n.8, p.883-9, 2008.

SMITH, T. **Monitoring stress in zoo Animals, zoo research guidelines.** London: Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland, 2003.

URSIC-BEDOYA, R. J.; LOWENBERGER. C.A. *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. **Dev. Comp. Immunol.**, v.3, p.109–120, 2007.

VÉLEZ, G.M. Insuficiencia renal aguda por picadura múltiple de abejas africanizadas. **Nefrologia**, v.30, n.5, p.531-8, 2010.

VIZIOLI, J. et al. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, v.9, p.75–84, 2000.

WIEDORNK.H.; GOLDMANN T. Direct and Indirect In Situ PCR. In: BARTLETT J. M. S.; STIRLING D. **Methods in Molecular Biology: PCR Protocols**. Totowa: Humana Press Inc., 2003, p.433-444.

WINSTON, M. L. **A Biologia da Abelha**. 1.ed. Porto Alegre: Magister LTDA, 2003, 245p.

WIELEBNOWSKI, N. Stress and distress: evaluating their impact for the wellbeing of zoo animals, **Journal American of Veterinary Association**, New York, v. 223, n.7, p. 973–7, 2003.

ZHANG, L.; et al. Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly than Tissue-Specific Genes. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, n.2, p.236-9, 2004.

ZHAO, F. L.; et al. Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. **PNAS**, v.102, n.31, p.11100-11105, 2005.

CAPÍTULO II

EFEITO DO ESTRESSE NA PRODUÇÃO DE APITOXINA EM *Apis mellifera* L.

Resumo: Os objetivos do presente trabalho foram verificar o efeito do período (manhã e tarde) e tempo de colheita (30 e 60 minutos) na produção de veneno por abelhas *Apis mellifera* africanizadas e a influência desse manejo na expressão de genes relacionados ao estresse. Foram utilizadas cinco colméias de abelhas *Apis mellifera* L. As colheitas de veneno e abelhas ocorreram três vezes por semana (manhã às 09h00 e tarde às 14h00), em dias intercalados, de acordo com os seguintes tratamentos: *T1*: manhã/30 minutos; *T2*: manhã/60 minutos; *T3*: tarde/30 minutos; *T4*: tarde/60 minutos. O veneno foi colhido por meio de coletores elétricos. O nível de estresse das abelhas foi monitorado pela alteração na expressão do gene defensina (proteína de defesa). Como controle interno foi usado o gene da actina. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$). Pode-se concluir que o T2 apresentou produção de veneno significativamente maior e uma menor expressão de gene defensina relacionado ao estresse comparado aos demais tratamentos.

Palavras-chave: abelhas/expressão gênica/veneno

EFFECT OF STRESS IN THE APITOXIN PRODUCTION OF *Apis mellifera* L.

Abstract: The objectives of this study was to investigate the effect of period (morning and afternoon) and harvest time (30 and 60 minutes) in the production of poison in *Apis mellifera* bees and the influence of management on the expression of genes related to stress. Collection of venom and bee took place three times a week (morning at 9 a.m. and afternoon at 2 p.m.), every other day, according to the following treatments: T1: morning/30 minutes, T2: morning/60 minutes, T3: afternoon / 30 minutes, T4: afternoon/60 minutes. Venom was collected by electric collector. The stress level of the bees was monitored by changes in gene expression of defensin (protein defense). Was used as internal control of the actin gene. The results were evaluated by ANOVA followed by Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$). It can be concluded that T2 had significantly higher production of poison and a lower defensin gene expression related to stress compared to other treatments.

Keywords: bees / gene expression / venom

1. INTRODUÇÃO

A palavra apitoxina vem do latim e significa: *apis* - abelha e *toxikon* – veneno, sendo utilizado pelas abelhas como uma das formas de defesa e proteção na colmeia. A glândula de veneno das operárias libera feromônios (isopentilacetato e 2-heptanona) que sinalizam para as demais operárias da colmeia onde está o possível inimigo. (Nogueira-Couto; Couto, 2002).

O veneno é produzido por uma glândula (glândula ácida ou de veneno) localizada na região posterior do abdômen, entre o reto e os ovários (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). É a partir de 10 a 15 dias de idade que as glândulas ácidas das operárias tornam-se aparentemente mais desenvolvidas. Este grau de desenvolvimento decai um pouco com 25 e 30 dias, pois o auge da produção precisa acontecer quando a abelha está na fase de guardiã, para proteção da colônia. Outro fato a ser notado é que nas operárias recém-emergidas até com cinco dias, os sacos de veneno acham-se quase que vazios de secreção, ao contrário do que ocorre com as operárias em outras idades (Cruz-Landim et al., 2002).

Na *Apis mellifera*, a composição do veneno varia de acordo com a sub espécie, fase do desenvolvimento e hábitos alimentares. As principais alterações encontradas são variações nas concentrações das proteínas do veneno ao longo das estações do ano, demonstrando uma influência do meio (Abreu, 1996).

O veneno injetado em uma ferroadada contém aproximadamente 50 µg de matéria seca. As principais proteínas presentes são a melitina (50% do peso seco do veneno), fosfolipase A2 (12% PSV), fator degranulador de mastócitos (3% PSV), hialuronidase (3% PSV) e apamina (2% PSV). Além disso, estão presentes aminas biogênicas, entre elas histamina (1 % PSV), dopamina (0,5% PSV) e noradrenalina (0,5% PSV) (Cruz-Landim et al., 2002). Também estão presentes muitos acetatos voláteis que, presumidamente, estimulam o comportamento defensivo de outras abelhas (Abreu et al., 2010).

A apitoxina usada na apiterapia (uso de produtos apícolas em benefício do homem) tem auxiliado em problemas de saúde, tais como eczemas, úlceras tóxicas, infecções como laringite, problemas reumatológicos (artrite, artrose), cardiovasculares, pulmonares e ortopédicos, além de auxiliar na inibição do câncer ovariano, esclerose múltipla e possuir efeito antibiótico (Son et al. 2007; Ghabili et al. 2009).

A colheita do veneno pode ser realizada por meio de coletores elétricos colocados na entrada da colmeia, contendo filamentos que conduzem uma corrente elétrica, promovendo desta forma contração da musculatura acessória de liberação do veneno, sem promover mortalidade nas abelhas (Dussart; Bartholomé, 2007).

Entretanto, embora não cause a morte das abelhas, não há conhecimento da influência desse manejo sobre a colmeia. Pressupõe-se que existam alterações comportamentais com interferência nas atividades de rotina do enxame, ocasionando um estresse agudo ou crônico, nas abelhas.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram verificar os efeitos do período (manhã e tarde) e tempo de colheita (30 e 60 minutos) na produção de veneno por abelhas *Apis mellifera* africanizadas e a influência desse manejo na expressão de genes relacionados ao estresse.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e abelhas utilizadas

O experimento foi conduzido na Área de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizado na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22^o49' de latitude Sul e 48^o24' de longitude Oeste com clima Cfa de acordo com a classificação de Köppen (Koppen e Geiger, 1928) e altitude média de 623 metros.

Foram utilizadas cinco colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., alojadas em colmeias de madeira modelo Langstroth, pintadas externamente com tinta óleo de coloração verde claro e mantidas em cavaletes de 50 cm de altura. As colônias selecionadas foram padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento. Durante o período experimental, sempre que necessário, cada colmeia recebeu, semanalmente, xarope de açúcar (50% água + 50% açúcar cristal) por meio de alimentador tipo “Bordman”.

Para medir o comportamento defensivo dos enxames selecionados, foi realizado o teste de defensividade, de acordo com metodologia descrita por Stort (1972) e Brandeburgo e Gonçalves (1990). O teste consistiu em balançar uma bola preta de

camurça, presa a um barbante, durante um minuto em frente ao alvado (entrada) da colmeia. Foram anotados os tempos para primeira ferroadada (TPF) e o número de ferrões deixados na bola de camurça (NFB). Os testes foram repetidos em triplicata. Valores acima de 36 ferroadadas designaram colmeias defensivas.

2.2 Tratamentos utilizados

As colheitas de veneno e das abelhas para a avaliação de expressão de genes relacionados ao estresse ocorreram três vezes por semana, em dias intercalados, nos meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012, sendo as cinco colmeias utilizadas no mesmo dia para o mesmo tratamento, de acordo com os seguintes tratamentos:

Tratamento 1: Colheita de veneno no período da manhã, com duração de 30 minutos;

Tratamento 2: Colheita de veneno no período da manhã, com duração de 60 minutos;

Tratamento 3: Colheita de veneno no período da tarde, com duração de 30 minutos;

Tratamento 4: Colheita de veneno no período da tarde, com duração de 60 minutos.

A colheita ocorreu, no período da manhã, com início sempre às 09h00 e no período da tarde às 14h00, por meio de coletor elétrico constituído por filamentos de arame com corrente elétrica de aproximadamente seis volts, e uma placa de vidro para a queda do veneno liberado pelas abelhas (Dussart; Bartholomé 2007). Ao término de cada colheita, os coletores foram retirados e encaminhados ao Laboratório do Setor de Apicultura, e os vidros contendo o veneno, mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, até a evaporação da fase volátil. Após, o veneno foi raspado com auxílio de espátula, pesado, armazenado em eppendorf e mantido em freezer.

As variáveis climáticas (temperatura média, velocidade do vento, índice pluviométrico e umidade relativa do ar) foram fornecidas pelo Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus de Botucatu.

Os dados referentes à análise dos genes relacionados ao estresse foram processados no Laboratório de Genética do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

2.3 Avaliação da expressão gênica

As colheitas das abelhas para a expressão dos genes relacionados ao estresse foram realizadas antes e após a colocação dos coletores de veneno. Para isto, foram colhidas dez abelhas operárias internas e dez abelhas operárias campeiras, com o auxílio de uma pinça. Após a colheita, as abelhas foram imediatamente armazenadas em freezer a -80°C para extração de RNA.

Para a extração de RNA, a cabeça de cada abelha operária foi separada do corpo com o auxílio de um bisturi descartável (Scharlaken et al., 2008). Cada amostra foi composta de um “pool” de cinco cabeças e a extração do RNA foi feita pelo meio do método TRIzol, utilizando-se para cada amostra 500 μl de TRIzol (GIBCO BRL) para romper as células e liberar seu conteúdo. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1%, e quantificados com o aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

Após o tratamento do RNA com DNase, uma solução de oligo dT (N=18) 0,75 mM; oligos aleatórios (N=8) 0,15 mM; dNTP 0,75 mM e 11 μl RNA tratado com DNase na etapa anterior, foi preparada e incubada a 65°C por 5 minutos e depois colocada no gelo por 1 minuto. A esta preparação, adicionou-se tampão 1x; DTT 0,005 M; RNase out 40 U e 100 U da enzima super script III. Essa preparação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima.

O nível de estresse das abelhas foi monitorado pela alteração na expressão do gene defensina (que codifica a proteína de defesa) (Scharlaken et al., 2008). Como controle interno, para as reações de PCR quantitativo, foi utilizado o gene da actina (Scharlaken et al., 2008).

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos; um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A determinação da expressão dos genes foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real

(Real-time PCR), em triplicatas. Em cada reação foi feita um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água.

As sequências e informações dos oligonucleotídeos utilizados apresentam-se na tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados.

Gene	Número de acesso no Gene Bank	Sequencia dos Primers 5'-3'	Amplificado (pb)	Ta (°C) ^a	E (%) ^b
Actina	AB023025	TGCCAACACTGTCCTTTCTG AGAATTGACCCACCAATCCA	155	661	991,17
Defensina	U15955.1	GTCGGCCTTCTTTCATGG TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	200	661	887,06

^aTa Temperatura ótima de anelamento específica de cada primer

^bE Mensuração da eficiência da reação de Rel Time PCR (calculada por meio da curva padrão)

Para se calcular a eficiência dos oligonucleotídeos, foram feitas quatro diluições das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. A eficiência (E) foi calculada através da fórmula $E=10(-1/\text{inclinação})$. A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), na qual CP (do inglês crossing point) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está acima da fluorescência de fundo. A quantificação relativa dos genes foi calculada de acordo a seguinte expressão:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}} \Delta CP_{\text{alvo}}}{\Delta CP_{\text{endógeno}} E_{\text{endógeno}}} \quad (\text{controle} - \text{amostra})$$

Os dados foram calculados usando como controle as abelhas colhidas antes da colocação dos coletores em relação às outras cinco colheitas após a retirada dos coletores.

2.4 Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi comparada por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias. Foi considerado como estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$ (Zar, 1996).

3. RESULTADOS

Os dados climáticos referentes ao período do estudo foram: temperatura mínima de $17,2 \pm 1,9$ °C, temperatura máxima de $30,6 \pm 2,2$ °C, precipitação pluviométrica de $5,0 \pm 6,6$ mm, umidade relativa do ar de $60,13 \pm 10,4\%$, radiação solar de $477,1 \pm 80,0$ cal/cm², insolação de $8,1 \pm 3,4$ hora decimal e velocidade do vento de $99,7 \pm 39,8$ km dia⁻¹.

Tanto o tempo para primeira ferroada (segundos) quanto o número de ferrões deixados na bola de carmuça, nos testes de defensividade, não apresentaram diferenças significativas entre os períodos manhã e tarde (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão para tempo (segundos) a primeira ferroada (TPF) e número de ferrões na bolinha (NFB) de abelhas *A. mellifera* africanizadas em função do período do dia.

Período	TPF (s)	NFB
Manhã	$1,4 \pm 0,7^a$	$51,8 \pm 14,4^a$
Tarde	$1,3 \pm 0,8^a$	$50,3 \pm 17,2^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

Com relação à produção de veneno, observou-se maior colheita quando utilizou-se 60 minutos no período da manhã, o qual diferiu de forma significativa dos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão para a produção de veneno (miligramas) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas em função do período do dia e tempo de coleta.

Tempo (min)	Manhã	Tarde
30	33,7±13,0 aA	24,6±10,0 aA
60	49,1±13,0 bB	24,9±6,0 aA

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

Os resultados referentes à quantificação relativa (R) do gene defensina, com a utilização do gene actina como endógeno, em função dos diferentes tratamentos, estão apresentados na tabela 4.

TABELA 4: Médias e desvio padrão da quantificação relativa do gene defensina em abelhas externas e internas, em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

Tratamento	Externas	Internas
1	2,02±1,60 Aa	1,84±1,70 ABa
2	1,23±0,96 Aa	0,16±0,17 Aa
3	1,35±1,37 Aa	2,97±1,65 Ba
4	0,59±0,38 Aa	0,56±0,60 ABa

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

Tratamento 1: Colheita de veneno no período da manhã, com duração de 30 minutos; *Tratamento 2:* Colheita de veneno no período da manhã, com duração de 60 minutos; *Tratamento 3:* Colheita de veneno no período da tarde, com duração de 30 minutos; *Tratamento 4:* Colheita de veneno no período da tarde, com duração de 60 minutos.

A quantificação relativa do gene defensina nas abelhas externas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. As abelhas colhidas no interior do enxame mostraram diferença significativa entre os tratamentos 2 e 3 ao longo do período experimental, sendo que o tratamento três apresentou maior estresse para as abelhas internas.

Não foi observada diferença na quantificação entre as abelhas externas e internas de todos os tratamentos.

4. DISCUSSÃO

As abelhas utilizadas no presente experimento podem ser consideradas defensivas independentemente do período do dia em que foi realizada a colheita de veneno, de acordo com a classificação de Stort (1972), na qual as abelhas são classificadas mansas se deixarem até 36 ferrões na bola de camurça.

Observou-se também que não houve influência das variáveis climáticas com a defensividade dos enxames utilizados neste trabalho. Da mesma forma, Lomele et al. (2010), não encontraram correlações significativas entre tempo de primeira ferroadada e número de ferrões na bola de camurça com as variáveis climáticas. Por outro lado, Funari et al. (2004), ao estudarem as abelhas africanizadas e suas híbridas, observaram que os fatores meteorológicos tiveram grande influência no comportamento defensivo dos enxames.

A maior produção de veneno ocorreu no período da manhã com duração de 60 minutos. Uma causa provável para esse resultado seria o comportamento de forrageamento das abelhas. Malerbo-Souza et al. (2011) observaram que no final da primavera e no começo do verão, as abelhas colheram néctar ao longo de todo o dia, com preferência para as horas mais quentes do dia, ou seja, entre 10 e 14h, quando a temperatura ficou entre 15 e 30°C. Dessa forma, um maior fluxo de abelhas resultaria em maior quantidade de campeiras passando pelo coletor e liberando veneno por meio do estímulo elétrico.

Até o momento não existem estudos usando a técnica de Real Time PCR para a quantificação da expressão de genes relacionados ao estresse, em abelhas *Apis mellifera*, provocado por meio dos manejos realizados na produção dos produtos apícolas, como para a produção de apitoxina.

A quantificação da expressão do gene defensina foi utilizada neste estudo por ser um gene que tem sua expressão alterada quando as abelhas sofrem algum estímulo estressor devido alguma alteração em seu sistema imune (Ursic-Bedoya; Lowenberger,

2007). Como a maior colheita de veneno ocorreu no período da manhã e sugere-se que esta produção seja devido ao maior fluxo de abelhas campeiras, pode-se inferir que estas poderiam estar expostas a uma maior gama de agentes patógenos quando fazem a atividade de forrageamento.

Na presente pesquisa, a expressão do gene defensina nas abelhas externas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Porém, observou-se aumento significativo da expressão deste gene nas abelhas internas da colmeia do tratamento três (tarde / 30 minutos) em relação ao tratamento dois (manhã / 60 minutos).

Esta maior expressão do gene defensina nas abelhas internas poderia estar relacionada com o aumento dos feromônios de alarme liberados no momento da extração do veneno por meio do estímulo elétrico (isopentilacetato e 2 heptanona), promovendo um estado de alerta nas demais abelhas para proteção da colmeia, aumentando assim, o desconforto e possivelmente o estresse. Além disso, a menor expressão do gene no tempo de colheita de 60 minutos poderia ser explicada pela adaptação das abelhas aos feromônios de alarme liberados no coletor ou a uma redução natural da expressão da defensina.

Pode-se concluir que a maior produção de veneno ocorreu no período da manhã, com duração de uma hora, com menor expressão de gene defensina.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

Abreu, R. M. (1996) Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). 1996. 102f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Abreu, R.M.; et al. (2010) Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Micron.*, v.41, p.172-5.

Brandeburgo, M. A. M.; Gonçalves, L. S. (1990) Environmental influence on the aggressive (defense) behaviour and colony development of africanized bees (*Apis mellifera*). *Ciência e Cultura*, v. 42, n. 10, p. 759-771.

Cruz-Landim, C.; Abdalla, F. C. (2002) Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto: FUNPEC, 181p.

Dussart, E.; Bartholomé, Y. (2007) Taller elaboración de subproductos de la miel y lãs colmenas. Managua, Nicaragua, 51p.

Funari, S. R. C.; et al. (2004) Influência da fumaça e capim limão (*Cymbopogon citratus*) no comportamento defensivo de abelhas africanizadas e suas híbridas européias (*Apis mellifera* L). *Boletim da Indústria Animal*, v.61, n.2, p.121-125.

Ghabili, K.; et al. (2009) Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med. Hypotheses*, v.73, p.459–460.

Koppen, W.; Geiger, R. (1928) *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes.

Lomele, R. L.; et al. (2010) Produtos naturais no comportamento defensivo de *Apis mellifera* L. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v.32, n.3, p.285-291.

Malerbo-Souza, D.T.; Silva, F. A. S. (2011) Comportamento forrageiro da abelha africanizada *Apis mellifera* L. no decorrer do ano. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. Maringá, v. 33, n. 2, p.183-190.

Nogueira-Couto, R. H. N.; Couto, L. A. (2002) *Apicultura: manejo e produtos*. Jaboticabal: Funep, 191p.

Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.*, v.45, p.29.

Scharlaken, B; et al. (2008) Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. *Dev Comp Immunol.*, v.32, n.8, p.883-9.

Son, D.J.; et al.(2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Ther.*, v.115, p. 246–270.

Stort, A. C. (1972) Estudo genético da agressividade da *Apis mellifera*. *Ciência e Cultura*, v. 24, n. 5, p. 208.

Ursic-Bedoya, R. J.; Lowenberger. C.A. (2007) *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.*, v.3, p.109–120.

Zar, J. H. (1996) *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 718p.

CAPÍTULO III

Implicações

A atividade apícola tem crescido e se desenvolvido ao longo dos anos e por isso é necessário que técnicas de manejo acompanhem esse crescimento, visando uma maior produção, qualidade dos produtos e bem-estar animal.

Devido ao fato de não existirem estudos conclusivos sobre a produção de apitoxina como o melhor horário e duração para se realizar a extração, procurou-se neste trabalho conciliar a produtividade com o menor estresse que possa interferir nas atividades dos enxames utilizando técnicas moleculares como ferramenta para esta mensuração.

A colocação dos coletores em horários adequados, de acordo com a atividade de forrageamento das abelhas, pode ser uma técnica de grande valia para o aumento da produtividade na apicultura.

A avaliação da expressão do gene defensina em abelhas demonstrou ser um bom método de avaliação do estresse causado na produção de veneno, podendo ser usado futuramente como indicativo de estresse na produção de outros produtos apícolas.

Espera-se que este trabalho possa contribuir para a cadeia apícola e para a produção aliada ao bem estar das abelhas. Entretanto, sugerem-se novos estudos para verificar o quanto a produção de veneno muda ao longo do ano e se outros genes estariam relacionados ao estresse provocado pela extração de veneno. Dessa maneira um cronograma de manejo de extração poderia ser realizado.