

ANDRÉ HENRIQUE DE OLIVEIRA

**O TRATAMENTO COM ANTI-PERITROFINA 55 ALTERA A
PERMEABILIDADE DA MATRIZ PERITRÓFICA DE OPERÁRIAS
ADULTAS DAS ABELHAS MELIPONA QUADRIFASCIATA E APIS
MELLIFERA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

O48t
2016
Oliveira, André Henrique de, 1991-
O tratamneto com anti-peritrofina 55 altera a permeabilidade da
matriz peritrófica de operárias adultas das abelhas *Melipona*
Quadrifasciata e *Apis Mellifera* / André Henrique de Oliveira. - Viçosa,
MG, 2016.

vi, 22f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.16-22.

1. Abelha sem ferrão. 2. Intestino médio. 3. Digestão.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral.

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

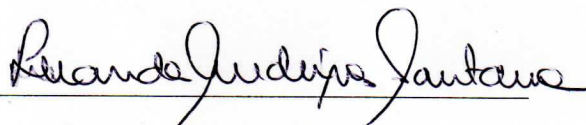
CDD 22. ed. 595.799

ANDRÉ HENRIQUE DE OLIVEIRA


**O TRATAMENTO COM ANTI-PERITROFINA 55 ALTERA A
PERMEABILIDADE DA MATRIZ PERITRÓFICA DE OPERÁRIAS
ADULTAS DAS ABELHAS *MELIPONA QUADRIFASCIATA* E *APIS
MELLIFERA***

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

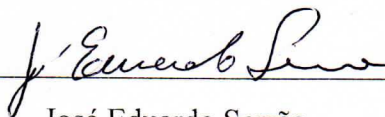
APROVADA: 31 de agosto de 2016.



Luanda Medeiros Santana



Gustavo Ferreira Martins



José Eduardo Serrão
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meus pais, Romero e Sônia, que me apoiaram em cada passo dado por esse caminho que resolvi trilhar e aos meus irmãos, Sarah e Romero, que me serviram de exemplo e motivação para perseguir meu sonho.

AGRADECIMENTO

Este trabalho só foi possível graças ao acompanhamento e colaboração de pessoas e instituições que se esforçaram em concluí-lo. Queria deixar aqui, os meus mais sinceros agradecimentos a todos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Geral pela estrutura fornecida e pela confiança;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro;

Com grande gratidão, agradeço ao meu orientador José Eduardo Serrão, por me confiar uma vaga em seu grupo de pesquisa, me acompanhar durante todo o trajeto percorrido durante o mestrado e por todo o conhecimento que pude adquirir através de sua orientação. O seu profissionalismo e a maneira com que lida com cada pessoa que o cerca é algo admirável, obrigado também por esse ensinamento;

Ao meu antigo orientador e atual amigo, Edmilson Amaral de Souza, por me apresentar o caminho da pesquisa na área de Biologia Celular e me ensinar importantes lições não apenas laboratoriais, mas de vida;

A minha família, Romero, Sônia, Sarah e Romero Filho, por servirem de base a todo alicerce que estou criando. Vocês são os grandes responsáveis por cada conquista minha, deixá-los orgulhosos sempre foi e sempre será o meu grande trabalho de vida;

Ao pessoal do Laboratório de Ultraestrutura Celular e pela ótima convivência durante esses 2 anos de trabalho. Em especial ao Kenner Moraes e Wagner Gonzaga, por me ajudar não apenas com ideias e companheirismo, mas por disponibilizarem seu tempo para me ajudar em todos os passos do trabalho;

Ao Apiário da Universidade Federal de Viçosa e todos os seus funcionários, pela disponibilização no fornecimento do material utilizado e por sua grande disposição;

Aos grandes amigos feitos em terras Viçosenses, que assim como eu, lutaram por um sonho estando em terras distantes. Tive grande sorte de encontrar com todos, o apoio e amizade que criamos foi extremamente importante para mim, obrigado!

Aos amigos de outrora, independente se de Patos de Minas, Rio Paranaíba, Brasília ou qualquer parte do mundo, muito obrigado por todos os momentos que compartilhamos, os bons ou ruins, os de choro ou de festa. O papel de vocês nesse trabalho foi tão importante quanto qualquer outro, porque foram vocês que me ajudaram a carregar esse fardo. Muitos nomes deveriam entrar nesse parágrafo, espero que cada pessoa que conviveu comigo no período de 2014 a 2016 se sinta imensamente agradecida, mas alguns nomes tenho obrigação de citar. Nathany Moraes, Patrícia Moreira, Pedro Pereira, Lays Caroline, Ana Strojake, Anderson Rabelo, Rafael Antônio, Nathan Lima, Sabrina Emerick, Luis Arteaga, Kaique Martins, Victor Mello e Pedro Miquelanti;

Enfim, muitos são os nomes aqui citados, mas todos foram igualmente importantes nessa fase da minha vida. Graças a todos vocês o peso carregado se tornou suportável e essa caminhada se tornou prazerosa e extremamente proveitosa, conhecimentos científicos, profissionais e pessoais adquiridos nesse tempo são, sem sombra de dúvidas, o maior prêmio que poderei levar desse mestrado, mais uma vez, Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS.....	7
DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÃO.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

RESUMO

OLIVEIRA, André Henrique de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **O tratamento com anti-peritrofina 55 altera a permeabilidade da matriz peritrófica de operárias adultas das abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera*.** Orientador: José Eduardo Serrão.

A matriz peritrófica é formada por camadas não celulares de fibrilas de quitina associadas à glicoproteínas e proteoglicanas revestindo o alimento no intestino médio dos artrópodes, servindo como uma barreira entre o conteúdo alimentar e o epitélio do intestino médio. A permeabilidade da matriz peritrófica depende da presença de poros, que é uma das características funcionais. O objetivo foi determinar se a permeabilidade da matriz peritrófica altera ao longo do intestino médio e na presença do anticorpo antiperitrofina 55 em abelhas *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae: Apini). A matriz peritrófica tem espessura média variável entre as regiões anterior e posterior do intestino médio de *A. mellifera* com $0.71 \pm 0.01 \mu\text{m}$ e $0.83 \pm 0.02 \mu\text{m}$ em nutridoras e $0.84 \pm 0.02 \mu\text{m}$ e $0.99 \pm 0.04 \mu\text{m}$ em campeiras, respectivamente. Em *M. quadrifasciata* a espessura foi de $0.66 \pm 0.02 \mu\text{m}$ na região anterior e $0.90 \pm 0.02 \mu\text{m}$ na região posterior de nutridoras, $0.68 \pm 0.01 \mu\text{m}$ na região anterior e $0.96 \pm 0.04 \mu\text{m}$ na região posterior de campeiras. Em operárias de *A. mellifera*, moléculas de dextran com peso molecular de 40 KDa atravessam a matriz peritrófica, enquanto aquelas ≥ 70 KDa não atravessam a matriz. Em *M. quadrifasciata* o limite de passagem ficou entre as moléculas de 4 e 40 KDa, sendo as de peso molecular 4 KDa, as únicas evidenciadas no espaço ectoperitrófico. Abelhas alimentadas com anticorpo anti-peritrofina 55 apresentaram aumento na permeabilidade das moléculas de dextran em ambas as espécies. A matriz peritrófica possui diferenças morfométricas quanto as regiões do intestino médio mas não apresenta diferença na porosidade ao longo do intestino, tendo porém, alteração na permeabilidade da matriz quando em presença do anticorpo anti-peritrofina 55.

ABSTRACT

OLIVEIRA, André Henrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Treatment with anti-peritrophin 55 alters the permeability of the matrix peritrophic in adult worker bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*.** Adviser: José Eduardo Serrão.

The peritrophic matrix is formed by non-cell layers of chitin fibrils associated with glycoproteins and proteoglycans lining the food in the arthropods midgut, serving as a barrier between the food and the midgut epithelium. The permeability of the peritrophic matrix depends on the presence of pores, which is one of its functional features. The objective of this work was to determine the permeability of the matrix peritrophic and changes over midgut in the presence of antibody anti-peritrophin 55 in *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) and *Apis mellifera* (Apidae: Apini). The peritrophic matrix has average variable thickness between the anterior and posterior regions of the midgut of *A. mellifera* with $0.71 \pm 0.01 \mu\text{m}$ and $0.83 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in nurturing and $0.84 \pm 0.02 \mu\text{m}$ and $0.99 \pm 0.04 \mu\text{m}$ in foragers, respectively. In *M. quadrifasciata* the thickness was $0.66 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in the anterior and $0.90 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in the posterior region of nurturing, $0.68 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in the anterior and $0.96 \pm 0.04 \mu\text{m}$ in the posterior region of foragers. In workers of *A. mellifera*, dextran molecules with molecular mass of 40 KDa cross the peritrophic matrix, while those ≥ 70 KDa do not pass through the matrix. In *M. quadrifasciata*, the passage limit was among molecules of 4 and 40 KDa, being the 4 KDa, the only evident in ectoperitrophic space. Bees fed with the antibody anti-peritrophin 55 show an increase in the permeability of dextran molecules in both species. The peritrophic matrix has morphological differences in the midgut regions but shows no difference in porosity throughout the intestine, and however, show changes in permeability of the matrix in presence of antibody anti-peritrophin 55.

INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes regiões do trato digestivo dos insetos, o intestino médio é o principal sítio de digestão e absorção dos alimentos, sendo responsável pela produção das enzimas digestivas e pela absorção da maior parte dos nutrientes (Chapman, 2013). Devido à sua origem endodérmica, o intestino médio não apresenta uma íntima cuticular revestindo o seu epitélio, como os intestinos anterior e posterior, mas o conteúdo alimentar está delimitado pela matriz peritrófica constituída por uma rede de quitina com proteínas associadas (Terra & Ferreira, 1994).

A matriz peritrófica são camadas não celulares que revestem o intestino médio de alguns artrópodes, servindo como uma barreira entre o conteúdo do lúmen e o epitélio do intestino médio desempenhando um papel na proteção do epitélio de danos mecânicos e de agentes patogênicos, toxinas e outras substâncias nocivas (Kuraishi et al., 2011). A matriz peritrófica funciona como uma membrana semipermeável que regula a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos do intestino médio, compartimentalizando o lúmen do intestino médio em diferentes regiões fisiológicas (Terra, 2001; Hegedus, 2009). Sendo assim, a matriz peritrófica representa a primeira barreira que as moléculas ingeridas precisam atravessar para atingir o hemocele (Fiandra et al., 2009, Walski et al., 2014; Silva et al., 2016)

Os tipos de matrizes peritróficas são classificadas a partir de sua formação (Wigglesworth, 1972). A do tipo-I é aquela produzida ao longo de todo o epitélio intestinal, podendo ser formada por secreção sequencial de diferentes componentes, por agregação diferencial de componentes ou por diferença na forma física tomada pelos constituintes da matriz peritrófica, é encontrada em Coleoptera, Dictyoptera, Ephemeroptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, Lepidoptera, Hymenoptera e em dípteros hematófagos adultos. Várias espécies de abelhas possuem matriz peritrófica do

Tipo I. (Peters, 1992; Shao et al., 2001; Kato et al., 2006; Marques-Silva et al. 2005; Teixeira et al., 2015).

A matriz peritrófica tipo-II é secretada constitutivamente pelas células da cárdia, formando um tubo, devido à pressão do material secretado contra as paredes do epitélio, sendo encontrada principalmente em Dermaptera, Isoptera, Embioptera, alguns Lepidoptera e larvas de Diptera (Peters, 1992; Shao et al., 2001; Kato et al., 2006). As camadas individuais surgem a partir de grupos de células que revestem as dobras da cárdia, chamadas zonas de formação. A medida que a matriz peritrófica é depositada ela engloba as partículas ingeridas (Peters, 1979)

O lúmen do intestino médio é dividido em espaço endoperitrófico, um espaço ectoperitrófico e a própria matriz peritrófica. Essa separação espacial permite a ocorrência de diferenças no processo digestivo, sendo as macromoléculas confinadas ao espaço endoperitrófico, onde são parcialmente digeridas. Os produtos da digestão, além de água e sais minerais, se movem através da matriz peritrófica para o espaço ectoperitrófico, onde outras enzimas digestivas finalizam a digestão (revisado por Terra, 2001).

A composição da matriz peritrófica com fibrilas de quitina associadas à glicoproteínas e proteoglicanas sugere que ela auxilie na imobilização de enzimas digestivas, permitindo a aquisição de nutrientes de forma eficiente e a reutilização de enzimas hidrolíticas (Terra, 2001). Em insetos, a matriz peritrófica tem de 3 a 40% de quitina e 20-60% de glicoproteínas e proteoglicanas (20-60%), sendo uma estrutura semipermeável, consideravelmente forte e com característica elástica (Tellam, 1996; Lehane, 1997).

As proteínas da matriz peritrófica são organizadas em diferentes classes (Wang & Granados, 2000). Na classe 1 estão as proteínas que são solúveis em solução tampão

e podem apresentar contaminantes de materiais ingeridos. Na classe 2 estão aquelas que são isoladas da matriz com o uso de detergentes. Na classe 3 estão as peritrofinas que são integrantes da matriz peritrófica, pois são extraídas com o uso de agentes desnaturantes fortes, como a ureia. Na classe 4 estão as proteínas, pouco conhecidas, pois as técnicas normalmente utilizadas para isolamento não extraem estas proteínas da matriz peritrófica (Tellam et al., 1996).

A natureza gelatinosa de alguns dos componentes da matriz peritrófica permite que tenha função lubrificante, auxiliando a passagem de alimento ao longo do intestino, impedindo que as células intestinais sofram traumatismos (Lehane, 1997; Martin et al., 2006). Mutantes de *Bombyx mori* (Lepidoptera) sem a matriz peritrófica tiveram o epitélio do intestino médio desgastado, liberando corpos membranosos da sua superfície para o bolo alimentar (Sudha & Muthu, 1988). Em *Tribolium castaneum* (Coleoptera) deleções de algumas proteínas da matriz peritrófica resultam em um aumento da permeabilidade, com conseqüente perda de gordura corporal e atraso no crescimento em larvas, comprovando que as proteínas associadas à matriz peritrófica são essenciais para a sua estrutura e função (Agrawal et al., 2014)

Insetos fitófagos podem inativar compostos tóxicos de através do processo de ultrafiltração de extração, que é a reação do ácido tânico com proteínas, lipídios, e íons de metais polivalentes no trato digestivo de insetos para formar grandes complexos que são incapazes de penetrar a matriz peritrófica, impedindo sua chegada até as células epiteliais (Barbehenn, 2001). Aleloquímico lipofílicos, tais como a digitoxina, agregados com lipídios formam micelas mistas no intestino que também são eliminados por filtração mediada pela matriz peritrófica (Barbehenn, 1999; Hegedus, 2009).

As funções atribuídas a matriz peritrófica faz com que sua permeabilidade seja de extrema importância, servindo como um ultrafiltro, regulando a troca de nutrientes e

enzimas digestivas; e retendo as partículas alimentares não digeridas, microrganismos e toxinas no espaço endoperitrófico (Martin et al., 2006). Se os diâmetros se encontram no intervalo de 3-8 nm, a matriz peritrófica funcionaria como um ultrafiltro eficaz para algumas proteínas e outros polímeros (Barbehenn & Martin, 1994). Porém, se os poros possuírem um diâmetro de algumas centenas de nanômetros, a matriz atuará como um filtro eficaz apenas para partículas maiores, como bactérias (Lehane, 1997).

Abelhas sociais apresentam duas castas: rainhas e operárias. As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis, que desenvolvem atividades de manutenção da colônia como coleta e transporte do pólen e néctar para alimentação da cria e da rainha, construção dos favos e defesa (Campos, 2003) A capacidade de forrageamento, de até 14 km², das abelhas (Bromenshenk et al., 1985; Ratnieks & Shackleton, 2015), faz com que possam ser continuamente expostas a contaminantes (Jones, 1987; Porrini et al., 2003). Embora essa exposição possa ocorrer por meio de ar, da água e de outros mecanismos, a fonte mais comum de exposição é através da ingestão de pólen e néctar contaminados (Celli & Maccagnani, 2003; Hladun et al., 2015).

A qualidade e/ou a quantidade de frutos e sementes apresenta significativa melhoria graças a polinização realizada por abelhas (Roubik, 1995; Kearns et al., 1998), além de participarem da reprodução da maioria das plantas cultivadas (Couto e Couto, 2002) e selvagens (Ashman, 2004; Calderone, 2012). Aproximadamente 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha (FAO, 2004) e 33% da alimentação humana depende das abelhas (Klein et al., 2007).

O controle de pragas em culturas agrícolas tem sido realizado através do uso de inseticidas e plantas geneticamente modificadas, que podem apresentar toxicidades para insetos benéficos, como as abelhas (Potts et al., 2010). Inseticidas podem causar mortalidade por intoxicação direta (Alston, 2007) causando fragmentação de habitat,

assim como diminuição na abundância da espécie (Brittain, 2010), ao passo que os herbicidas e fertilizantes afetam indiretamente, diminuindo a disponibilidade de recursos florais (Gabriel & Tschardtke, 2007; Holzschuh, 2008). Compostos que interagem com a matriz peritrófica possuem a capacidade de afetar suas propriedades físico-químicas e biológicas, podendo ser alterações leves como a diminuição na eficiência da digestão como alterações mais drásticas como impedir a absorção de nutrientes ou descompartimentalizar processos digestivos (Hegedus, 2009)

Objetivo

Devido seu envolvimento em processos digestivos e seu papel protetor contra patógenos ingeridos, a matriz peritrófica se torna importante alvo de estudos para estratégias de controle de pragas e mesmo conservação ecológica, neste trabalho objetivamos avaliar diferenças morfológicas e na permeabilidade da matriz peritrófica ao longo do intestino médio, assim como alterações de sua permeabilidade na presença do anticorpo antiperitrofina 55 em operárias adultas de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Material Biológico

Operárias adultas de *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* foram coletadas em ninhos localizados no apiário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As coletas foram limitadas a um mesmo ninho para cada espécie. As campeiras foram coletadas com o auxílio de um pote na entrada de cada ninho, após estimulação externa. Para a coleta das nutridoras, os ninhos foram abertos e as abelhas coletadas com o auxílio de um sugador.

Morfometria

As operárias de *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* foram crioanestesiadas e dissecadas em presença de solução de NaCl 125 mM. A seguir os intestinos médios foram removidos, divididos nas regiões anterior e posterior, transferidos para solução fixadora de Zamboni, desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina Leica. Secções com 3 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscopia de luz. As medidas de espessura da matriz peritrófica foram realizadas com o software AxioVison 4.8. Para cada região do intestino médio foram realizadas três medidas de 10 abelhas nutridoras e campeiras de cada espécie. As medidas de espessura da matriz peritrófica foram submetidas ao teste Tukey com 5% de significância.

Permeabilidade da matriz peritrófica

As operárias foram alimentadas com uma dieta contendo dextran conjugado com FITC com diferentes massas moleculares (4, 40, 70, 150 e 2000 KDa) e iguais intensidades de fluorescência. FITC-dextran foram dissolvidos em 1 mL de solução de sacarose a 50% e oferecido diretamente para as abelhas, que estavam imobilizadas em tubos eppendorffs para assegurar a ingestão do alimento. As abelhas foram dissecadas após 1 hora da ingestão da solução de sacarose contendo FITC-dextran e os intestinos médios transferidos para solução fixadora de Zamboni. Posteriormente, os intestinos foram separados em região anterior e posterior e foram desidratados em série crescente de etanol, incluídos em historesina Leica e seccionados a 5 μm de espessura com o auxílio do micrótomo rotativo Leica RM 2255. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53) com filtros para DAPI, FITC, TRITC, e Cy5 e uma câmera XM10 monocromática para imagens microscópicas de fluorescência (1376 \times 1032 pixels de resolução)

Tratamento com anticorpo

Operárias adultas de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* foram coletadas e separadas em recipientes contendo como alimento solução 50% sacarose com anticorpo anti-peritrofina 55 produzida em ratos (Marques-Silva et al., 2005) diluída em 1:500 em água destilada. As operárias foram mantidas a 31 °C, por 12 horas e então separadas em tubos eppendorffs e alimentadas com solução de sacarose 50% e FITC-dextran com diferentes pesos moleculares, dissecadas e os intestinos médios processados como descrito acima.

RESULTADOS

Em operárias nutridoras de *M. quadrifasciata* a espessura da matriz peritrófica foi de $0.66 \pm 0.02 \mu\text{m}$ na região anterior e $0,90 \pm 0.02 \mu\text{m}$ na região posterior do intestino médio. Em operárias campeiras, a matriz peritrófica teve espessura de $0.68 \pm 0.01 \mu\text{m}$ na região anterior do intestino médio e $0.96 \pm 0.04 \mu\text{m}$ na região posterior. Não houve diferença na espessura da matriz peritrófica entre as mesmas regiões do intestino médio de operárias campeiras e nutridoras ($P < 0,05$; $F = 25.28$) (Figura 1).

A região anterior do intestino médio de operárias nutridoras de *A. mellifera* teve a matriz peritrófica com espessura de $0.71 \pm 0.01 \mu\text{m}$, enquanto na região posterior foi de $0.83 \pm 0.02 \mu\text{m}$. Em operárias campeiras, a espessura foi de $0.84 \pm 0.02 \mu\text{m}$ na região anterior e $0.99 \pm 0.04 \mu\text{m}$ na região posterior do intestino médio ($P < 0,05$; $F = 24.25$) (Figura 1).

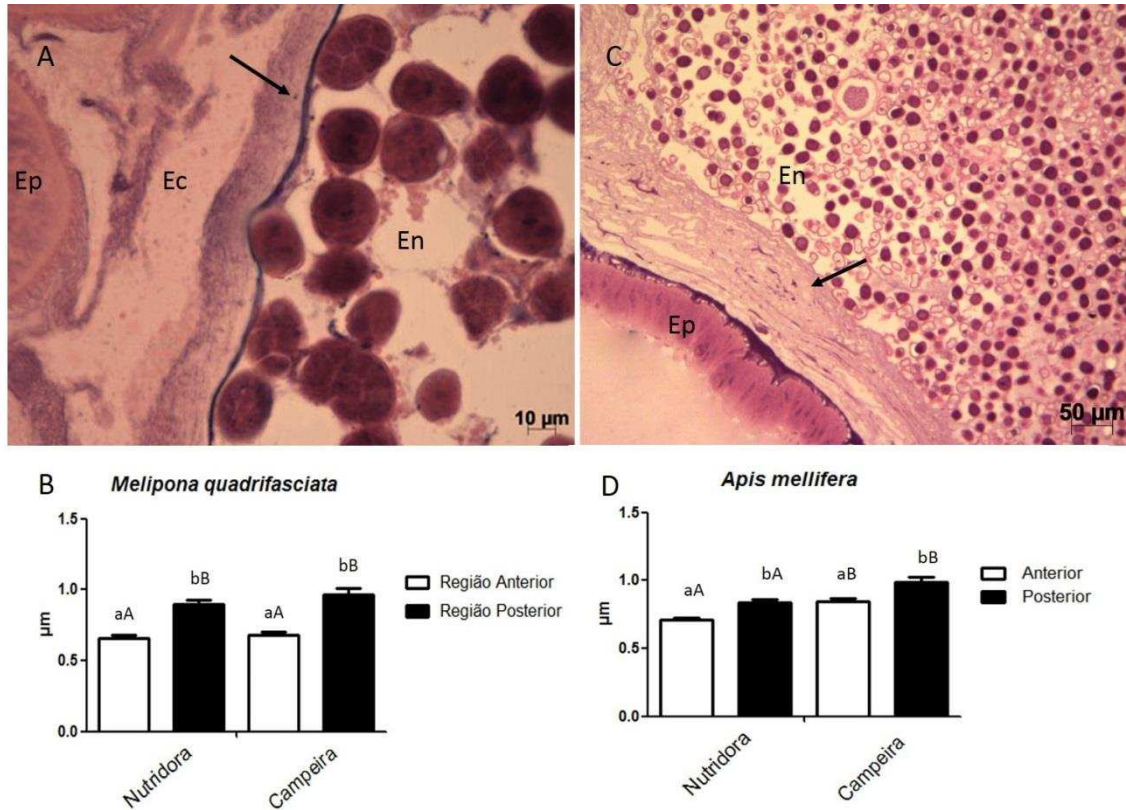


Figura 1: A - Secção histológica de intestino médio de operária campeira de *Melipona quadrifasciata* mostrando a matriz peritrófica (seta) formando os espaços endoperitrófico (En), contendo grãos de pólen, e ectoperitrófico (Ec); Epitélío (Ep) B – Espessura da matriz peritrófica nas regiões do intestino médio de operárias campeiras e nutridoras de *Melipona quadrifasciata*. C - Secção histológica de intestino médio de operária campeira de *Apis mellifera* mostrando a matriz peritrófica (seta) e espaço endoperitrófico (En) contendo grãos de pólen; Epitélío (Ep). D – Espessuras médias da matrix peritrófica nas regiões do intestino médio de operárias campeiras e nutridoras de *Apis mellifera*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as regiões do intestino médio e letras maiúsculas diferenças entre operárias nutridoras e campeiras

Operárias nutridoras e campeiras de *M. quadrifasciata* alimentadas com FITC-dextran mostraram que estas moléculas a partir de 40 KDa estavam restritas ao espaço endoperitrófico, enquanto aquelas com 4 KDa foram encontradas no espaço

ectoperitrófico, indicando sua passagem pela matriz peritrófica (Figura 2 e 3) Em *A. mellifera*, as operárias nutridoras e campeiras mostraram a presença de FITC-dextran com 40 KDa no espaço ectoperitrófico, enquanto as maiores que 70 kDa ficaram restritas ao espaço endoperitrófico. (Figuras 2 e 3) A permeabilidade da matriz peritrófica ao FITC-dextran foi semelhante entre as regiões anterior e posterior do intestino médio em ambas as espécies

Operárias de *M. quadrifasciata* previamente alimentadas com anticorpo anti-peritrofina 55 mostraram aumento na permeabilidade da matriz peritrófica em comparação ao controle, com moléculas de FITC-dextran com 40 KDa no espaço ectoperitrófico (Figura 4). Similarmente em operárias de *A. mellifera*, FITC-dextran com 70 KDa estavam presentes no espaço ectoperitrófico de abelhas alimentadas com anticorpo anti-peritrofina 55 (Figura 4).

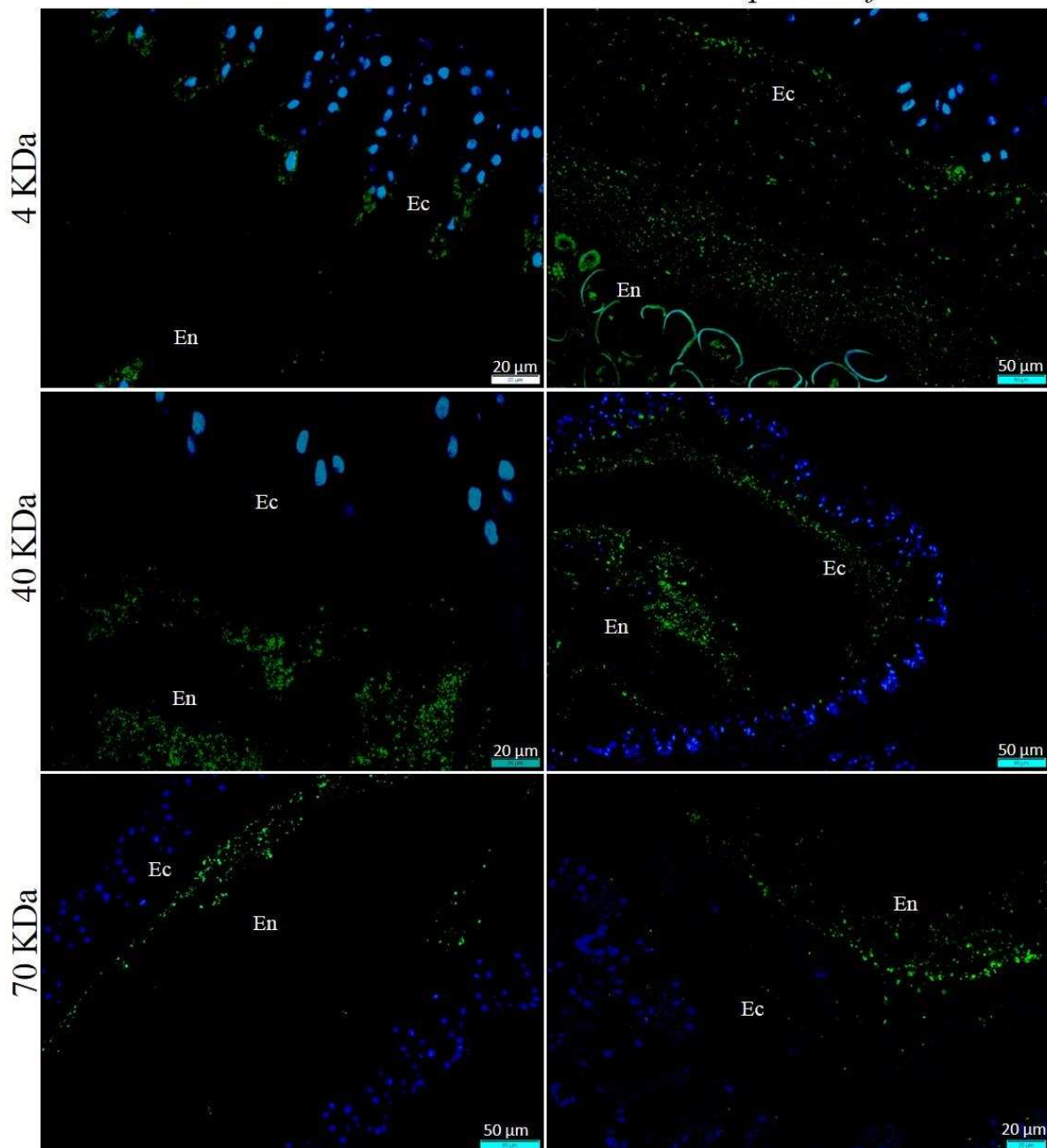


Figura 2: Secções de intestino médio de operárias campeiras de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* alimentadas com moléculas FITC-dextran mostrando moléculas de 40 KDa e de 70KDa no espaço endoperitrófico (En) e a de 4 KDa no espaço ectoperitrófico (Ec) em *M. quadrifasciata*. Em *A. mellifera* moléculas FITC-dextran de 4 KDa e 40KDa em ambos os espaços peritróficos do intestino médio, enquanto as de 70KDa estão limitadas ao espaço endoperitrófico (En). Núcleo evidenciado em azul (DAPI). FITC-dextran evidenciado em verde.

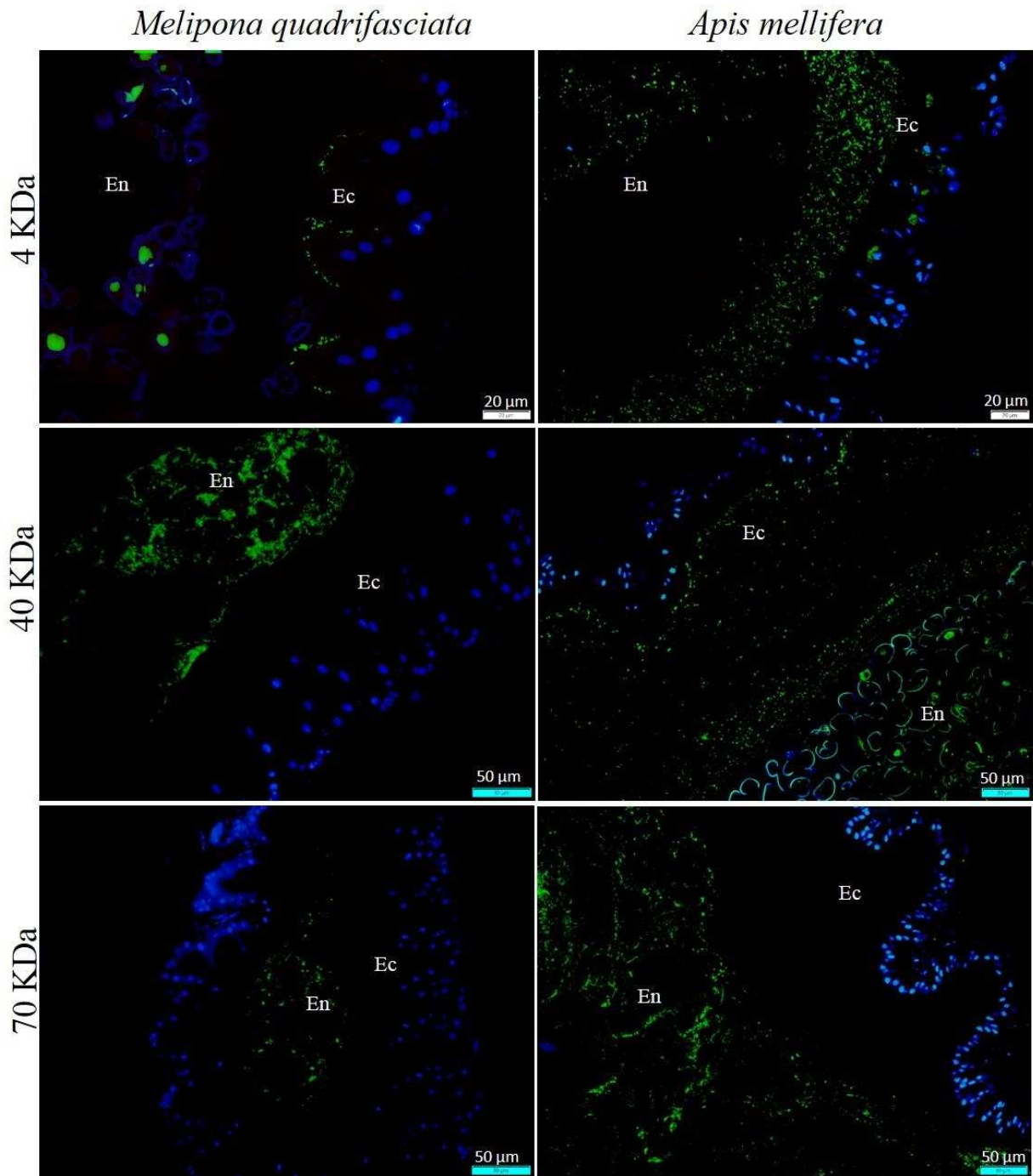


Figura 3: Secções de intestino médio de operárias nutridoras de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* alimentadas com FITC-dextran mostrando moléculas de 4KDa no espaço ectoperitrófico (Ec), as de 40 KDa e 70KDa apenas no espaço endoperitrófico (En) em *M. quadrifasciata*. Em *A. mellifera* moléculas de 70KDa estão restritas bi espaço endoperitrófico (En) e as de 4KDa e 40KDa em ambos os espaços, endoperitrófico e ectoperitrófico. Núcleo evidenciado em azul (DAPI). FITC-dextran evidenciado em verde.

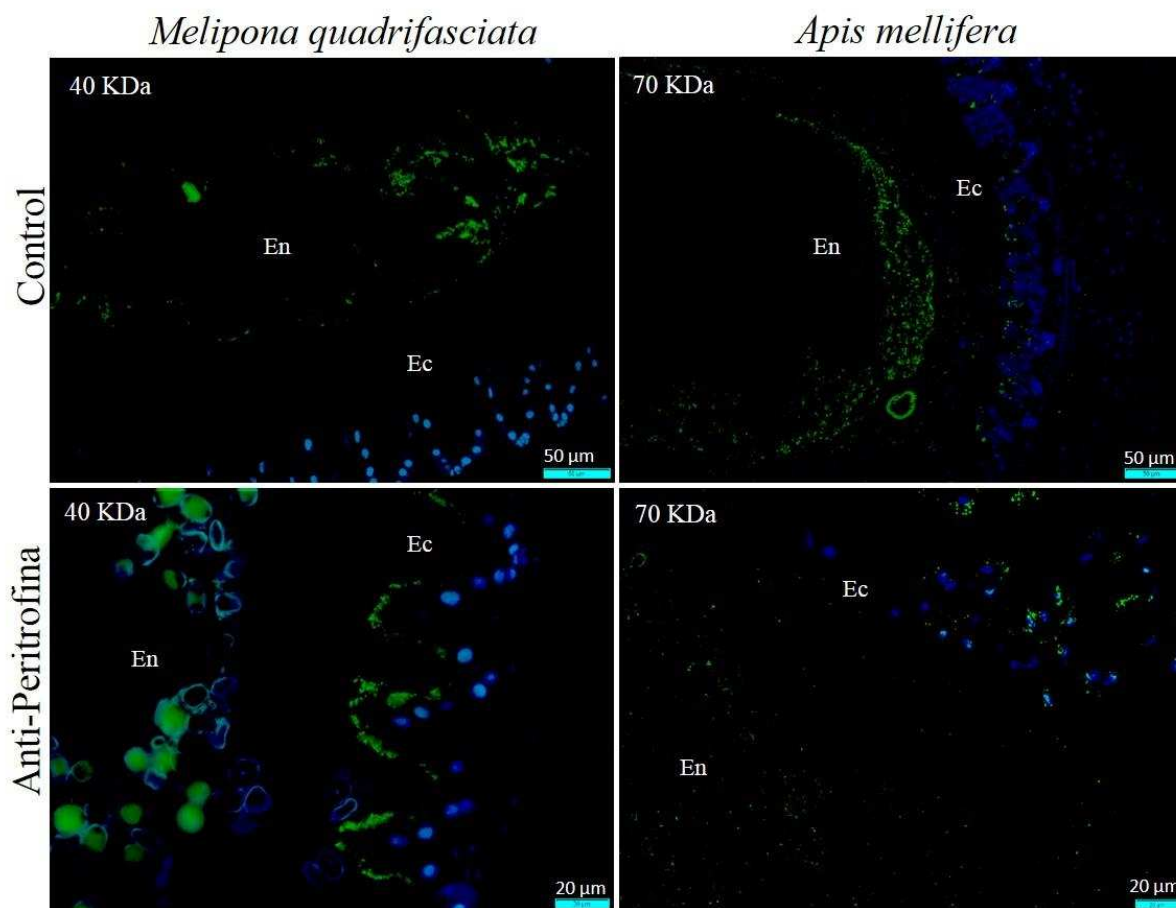


Figura 4: Secções de intestino médio de operárias de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* previamente alimentadas com anticorpo anti-peritrofina 55 seguida de alimentação com moléculas FITC-dextran, mostrando moléculas FITC-dextran com 40KDa limitadas ao espaço endoperitrófico (En) no tratamento controle, e nos espaços ectoperitrófico (Ec) e endoperitrófico em operárias de *M. quadrifasciata* alimentadas com anticorpo anti-peritrofina 55. Em *A. mellifera* moléculas com 70KDa ocorrem apenas no espaço endoperitrófico (En) no controle, enquanto aquelas com 70KDa estão nos espaços endoperitrófico (En) e ectoperitrofico (Ec) quando alimentadas com anticorpo-antiperitrofina. Núcleo evidenciado em azul (DAPI). FITC-dextran evidenciado em verde.

DISCUSSÃO

Operárias adultas de *A. mellifera* apresentaram diferenças na espessura da matriz quando comparada com operárias adultas de *M. quadrifasciata*, ainda que ambas espécies possuam matriz peritrófica do tipo I (Teixeira et al., 2015). Variações na espessura da matriz peritrófica tem sido reportada também em outros grupos de insetos (Harper & Hopkins, 1997; Lehane, 1997; Hopkins & Harper, 2001). A diferença na espessura da matriz peritrófica entre as regiões do intestino de abelhas operárias adultas mostra que a região posterior de ambas as espécies apresenta uma maior deposição da matriz, similar ao encontrado em Coleoptera (Agrawal, 2014). Caracterizado como tipo I, a matriz peritrofica de adultos de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* é sintetizada por todo o intestino médio, podendo ter apresentado uma maior espessura na região posterior devido ao acúmulo das camadas que vão sendo sintetizadas e movidas para aquela região. Diferenças morfológicas entre as espécies e entre regiões da MP entre operárias da mesma espécie implicam que possíveis diferenças funcionais também possam ser identificadas.

Os resultados sobre a permeabilidade da matriz peritrófica mostram que em *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* não há diferença na permeabilidade da matriz peritrófica quanto a região do intestino médio, diferente do encontrado em *Tribolium castaneum* (Coleoptera), onde a permeabilidade da matriz peritrófica se mostra menor a medida que se avança no intestino médio, variando de 2 MDa na região anterior até 4 KDa na região posterior (Agrawal, 2014), mas semelhante ao encontrado em, *S. frugiperda* (Lepidoptera), *Rhynchosciara americana* (Diptera) (Bolognesi et al., 2008) e *Anomala cuprea* (Coleoptera) (Kawakita et al., 2016). Porém, *A. mellifera* apresenta matriz peritrófica com permeabilidade maior do que encontrada em *M. quadrifasciata*. Diferença quanto ao tamanho dos poros presentes na matriz peritrófica em diferentes

espécies da mesma ordem ocorre também em Diptera e Lepidoptera (Zhuzhikov, 1964; Terra & Ferreira, 1983; Peters & Wiese, 1986; Santos et al., 1986; Ferreira et al., 1994).

O anticorpo antiperitrofina 55, altera a permeabilidade da matriz peritrófica em ambas as espécies de abelhas. Durante o desenvolvimento das células do intestino médio, estas sintetizam quitina e peritrofina, os quais adquirem a capacidade de ligarem-se entre si, permitindo a formação da matriz peritrófica (Terra, 2001). Com base na interação entre peritrofinas e quitina, o comprometimento da permeabilidade da matriz peritrófica pode ocorrer a partir do momento que o anticorpo liga-se a esse complexo causando um bloqueio direto, ou mudanças conformacionais que atrapalham essa interação. A forte interação da peritrofina 55 com a matriz peritrófica de *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* foi demonstrada em outros estudos (Marques-Silva, 2005; Teixeira et al., 2015). Da mesma forma, anticorpos antiperitrofinas alteraram a permeabilidade da matriz peritrófica em *Phlebotomus papatasi* (Diptera) (Malta et al., 2016), assim como a deleção da peritrofina em *T. castaneum* (Agrawal et al., 2014)

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a matriz peritrófica de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata* apresenta um padrão de permeabilidade por toda sua extensão, porém sua espessura é maior na região posterior. A alimentação com anticorpo anti-peritrofina 55 foi capaz de alterar a permeabilidade da matriz peritrófica de ambas as espécies, permitindo que moléculas de peso molecular superiores se tornem capazes de ultrapassar a matriz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, S.; Kelkenberg, M.; Begum, K.; Steinfeld, L.; Williams, C. E.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.; Park, Y.; Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H. (2014) Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect Biochem. Molec.* 49: 24-34.
- Alston, D. G.; Tepedino, V. J.; Bradley, B. A.; Toler, T. R.; Griswold, T. L.; Messinger, S. M. (2007) Effects of the insecticide phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environ. Entomol.* 36(4), 811-816.
- Ashman, T. L.; Knight, T. M.; Steets, J. A.; Amarasekare, P.; Burd, M., Campbell; D. R.; Morgan, M. T. (2004) Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85(9), 2408-2421.
- Barbehenn, R. V.; Martin, M. M. (1994) Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (lepidoptera) - roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. *J. Chem. Ecol.* 20: 1985-2001
- Barbehenn R. V. (1999) Non-absorption of ingested lipophilic and amphiphilic allelochemicals by generalist grasshoppers: the role of extractive ultrafiltration by the peritrophic envelope. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42:130–137.
- Barbehenn R. V. (2001) Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47:86–99
- Bolognesi, R.; Terra, W. R.; Ferreira, C. (2008). Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: theoretical and experimental models. *J. Insect Physiol.*, 54(10), 1413-1422.
- Brittain, C. A.; Vighi, M.; Bommarco, R.; Settele, J.; Potts, S. G. (2010). Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic Appl. Ecol.* 11(2), 106-115.

- Bromenshenk, J.J.; Carlson, S.R.; Simpson, J.C.; Thomas, J.M. (1985) Pollution monitoring of Puget Sound with honey bees. *Science* 227, 632-634.
- Calderone, N. W. (2012) Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PLoS ONE* 7(5): e37235. doi:10.1371/journal.pone.0037235
- Campos, L. A. O. (2003) A criação de abelhas indígenas sem ferrão. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 8 p. (Informe Técnico, 67).
- Celli, G.; Maccagnani, B. (2003) Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bull. Insectol.* 56, 137e139
- Chapman, R.F. (2013) *The insect: Structure and function*. Cambridge University Press, New York. 929p.
- Couto, R. H. N.; Couto, L. A. (2002) *Apicultura: manejo e produtos*. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 191 p.
- FAO. (2004) Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (eds.) *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil. p. 19-20
- Ferreira, C.; Capella, A.N.; Sitnik, R.; Terra, W.R. (1994) Digestive enzymes in midgut cells, endo-and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 299–313.
- Fiandra, I.; Casartelli, M.; Cermenati, G.; Burlini, N.; Giordana, B. (2009) The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. *J. Insect Physiol.* 55: 10-18.

- Gabriel, D; Tschardtke, T. (2007) Insect pollinated plants benefit from organic farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 118, 43–48
- Harper M. S.; Hopkins T. L. (1997) Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell* 29:463–475
- Hladun, K.R.; Parker, D.R.; Trumble, J.T.; (2015) Cadmium, copper, and lead accumulation and bioconcentration in the vegetative and reproductive organs of *Raphanus sativus*: implications for plant performance and pollination. *J. Chem. Ecol.* 41, 386-395.
- Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 285-302
- Holzschuh, A.; Steffan-Dewenter, I.; Tschardtke, T. (2008). Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos*, 117(3), 354-361.
- Hopkins, T. L.; Harper, M. S. (2001). Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Arch. Insect Biochem*, 47(2), 100-109.
- Jones, K.C. (1987) Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water Air Soil Pollut.* 33, 179-189.
- Kato, N.; Mueller, C. R.; Fuchs, J. F.; Wessely, V.; Lan, Q.; Christensen, B. M. (2006) Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 1-9.
- Kawakita, H.; Miyamoto, K.; Wada, S.; Mitsuhashi, W. (2016). Analysis of the ultrastructure and formation pattern of the peritrophic membrane in the cupreous

- chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 51(1), 133-142.
- Kearns C. A.; Inouye, D. W.; Waser, N. M. (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, v. 29, p. 83-112.
- Klein, A.M.; Vaissiere, B.E.; Cane, J.H.; Stefan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*, v. 274, p. 303-313.
- Kuraishi, T.; Binggeli, O.; Opota, O.; Buchon, N.; Lemaitre, B. (2011) Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15966 - 15971.
- Lehane, M. J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *A Rev Entomol* 42: 525-550.
- Malta, J.; Martins, G. F.; Weng, J. L.; Fernandes, K. M.; Munford, M. L.; Ramalho-Ortigão, M. (2016). Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Acta tropica*, 159, 161-169.
- Marques-Silva, S.; Serrão, J. E.; Mezêncio, J. M. S. (2005). Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. *Acta histochemica*, 107(1), 23-30.
- Martin, G. G.; Simcox, R.; Nguyen, A.; Chilingaryan, A. (2006) Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, formation, and permeability. *Biol. Bull.* 211: 275–285.

- Michener, C.D. (1974) The social behavior of the bees. Cambridge, Mass.: Belknap Press of Harvard Univ. Press
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biol*, 5(6), e168.
- Peters, W.; Heitmann, S.; D'Haese, J. (1979) Formation and fine structure of peritrophic membranes in the earwig, *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae). *Entomol. Gen.* 5:241–54
- Peters, W.; Wiese, B. (1986) Permeability of the peritrophic membranes of some Diptera to labelled dextrans. *J. Insect Physiol.* 32: 43-49.
- Peters, W. (1992) Peritrophic matrix. In: Bradshaw, D.; Burggren, W.; Heller, H.C.; Ishii, S.; Langer, H.; Neuweiler, G.; Randall, D.J. (Eds.), *Zoophysiology*. 1–238.
- Porrini, C.; Sabatini, A. G.; Girotti, S.; Fini, F.; Monaco, L.; Celli, G.; Bortolotti, L.; Ghini, S. (2003) The death of honeybees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicators. *Bull. Insectol.* 56: 147–152.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25(6), 345-353.
- Ratnieks, F.L.W.; Shackleton, K. (2015) Does the waggle dance help honey bees to forage at greater distances than expected for their body size? *Front. Ecol. Evol.* 3, 31.
- Roubik, D. W. (1995) *Pollination of cultivated plants in the tropics*. Rome: FAO. Agricultural Services Bulletin, p. 118
- Santos, C.D.; Ribeiro, A.F.; Terra, W.R. (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool.* 64, 490–500.

- Shao, L.; Devenport, M.; Jacobs-Lorena, M. (2001) The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 119-125.
- Silva, F. W. S.; Araujo, L. S.; Azevedo, D. O.; Serrão, J. E.; Elliot, S. L. (2016) Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiol. Entomol.*, 41, 121-126.
- Sudha, P. M.; Muthu, S. P. (1988) Damage to the midgut epithelium caused by food in the absence of peritrophic membrane. *Curr. Sci.* 57: 624-25
- Teixeira, A. d. D.; Marques-Araújo, S.; Zanuncio, J. C.; Serrão, J. E. (2015) Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. *Micron.* 68: 91–97.
- Tellam, R. L. (1996) The peritrophic matrix. In: Lehane, M. J.; Billingsley, P. F.; (Eds) *Biology of the insect midgut*. London: Chapman and Hall. 86–114.
- Terra, W. R. (2001) The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Arch. Insect Biochem.* 47:47-61
- Terra, W.R.; Ferreira, C., (1983) Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara americana* do not enter the endoperitrophic space. *Insect Biochem.* 13, 143–150.
- Terra, W. R; Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 1-62.
- Walski, T.; Damme, E. J. M. V.; Smagghe, G. (2014) Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. *J. Insect Physiol.* 70: 94–101
- Wang, L.; Li, F.; Wang, B.; Xiang, J. (2012) Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun.* 33: 1285-1291.

- Wang, P.; Granados, R. R. (2000) Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:135–143.
- Wigglesworth, V. B. (1972) *The principles of insect physiology*, 7th ed. London: Methuen.
- Zhuzhikov D. P. (1964) Function of the peritrophic membrane in *Musca domestica* L. and *Calliphora erythrocephala*. Meig. *J. Insect. Physiol.* 10:273–278.