

Padronização de protocolo para o isolamento das células do corpo gorduroso larval de *Apis mellifera* africanizada para avaliação da exposição *in vitro* a pesticidas

Raquel A. Rangel¹; Moema Hausen²; Rômulo T. D. de Oliveira³; Eliana A R Duek⁴; Elaine C. M. Silva-Zacarin⁵

1. Estudante de IC (CNPq-PIBIC), UFSCar, Sorocaba/SP; *raquelrangel.bio@hotmail.com

2. Pesquisador associado, Departamento de Biologia, UFSCar, Sorocaba/SP;

3. Pesquisador associado, Laboratório de Biomateriais - PUC/SP, Sorocaba/SP;

4. Professor titular, Laboratório de Biomateriais - PUC/SP, Sorocaba/SP;

5. Professor Adjunto, Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, UFSCar, Sorocaba/SP.

Palavras Chave: *Apis mellifera*, corpo gorduroso, cultura celular primária

Introdução

Os efeitos subletais de pesticidas em abelhas adultas já foram relatados, inclusive em órgãos de *Apis mellifera* africanizada. Porém, são necessários estudos sobre os efeitos da exposição de misturas de pesticidas em larvas, que são vulneráveis à contaminação durante a fase de alimentação, mais especificamente no corpo gorduroso, o qual é o órgão de reserva de nutrientes para posterior mobilização durante a metamorfose, bem como é onde ocorre a metabolização de substâncias químicas.

Testes controlados sob o efeito de xenobióticos nas abelhas fornece dados a nível sistêmico, e são influenciados por hormônios e pelo próprio metabolismo do animal. Assim, para avaliar o efeito isolado de xenobióticos nas células responsáveis pelo metabolismo de detoxicação, é fundamental a utilização de técnicas de cultura celular. Portanto, o estabelecimento do isolamento e a cultura células do corpo gorduroso de *Apis Mellifera* é um modelo fundamental para análises posteriores sobre a citotoxicidade de xenobióticos. O objetivo desse estudo é desenvolver um protocolo de isolamento das células do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* africanizada com base na mimetização dos componentes da hemolinfa, o qual envolve diversas adaptações nos meios já padronizados de cultura de insetos.

Resultados e Discussão

Maurizio (1965) relata que a concentração de açúcar e sais na hemolinfa dos insetos varia em função da idade, alimentação e fases da vida. Os principais meios de cultura para insetos, são os meios Grace, Schneider e o meio Leibovitz¹⁵, no qual são comercializados para células de insetos adultos. Os constituintes do meio Grace é um dos mais próximos a hemolinfa de abelhas adultas. No entanto, as células das larvas assim como sua hemolinfa apresentam constituição de açúcares e pH distintas das de um organismo adulto. Assim, os primeiros ensaios foram realizados com o meio Grace, no qual foi suplementado com 2% de glicose e 2% de frutose. Como não há descrição na literatura sobre o pH ideal para cultivo de células de larva de abelhas, foram realizados testes com diferentes pH (5,5; 6,0; 6,5 e 7,0). As larvas das abelhas foram imersas em etanol 70% por um minuto e realizada uma secção no dorso da larva. Após injeção de 10 µL de meio Grace (previamente suplementado e sob pH específico), o conteúdo abdominal foi extraído. Após ser gentilmente adicionado em mais 10 µL de meio Grace para dissociação dos constituintes celulares, foi realizada visualização e caracterização das células (Figura 1).

Os trofócitos do corpo gorduroso são ricos em grânulos e se organizam em cordões celulares delicados. O processo de isolamento leva a ruptura da membrana

plásmatica de algumas células, o que gera liberação do conteúdo celular, no entanto, este fator é minimizado conforme verificado nas figuras 1E e 1F quando o pH foi ajustado entre 5,5 e 6. Adicionalmente, a membrana plasmática das células se apresentou proporcionalmente mais íntegra no pH mais baixo analisado.

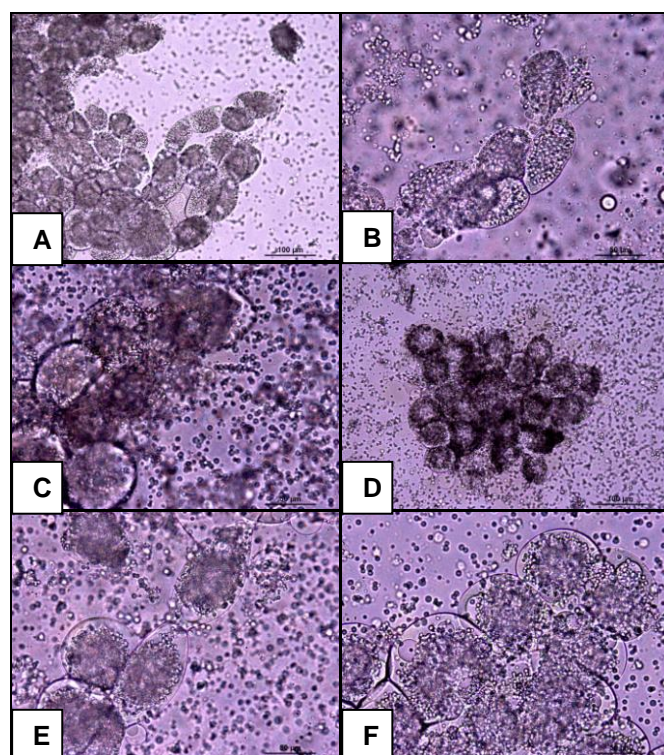


Figura 1. Fotomicrografias de campo claro de trofócitos isolados do corpo gorduroso. Isolamento realizado com a própria hemolinfa em (A) e em maior aumento em (B). Diferentes pH do meio Grace foram testados e demonstraram padrões distintos em cada grupo, (C) pH7,0; (D) pH6,5; (E) pH6,0 e (F) pH5,5.

Conclusões

Este trabalho encontra-se em franco processo de experimentação. Os resultados preliminares mostram que um pH mais ácido, variando entre 5,5 e 6,0, seria o ideal para a viabilidade do meio de cultura, pois o mesmo propiciou a manutenção e integridade das células do corpo gorduroso das larvas de *Apis mellifera*.

Agradecimentos

Ao prof. Fábio Abdalla e ao CNPq e CAPES pelo fomento.

MAURIZIO, A. Untersuchungen über das Zucjerbild Hamolymphe der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). I. Das Zuckerbild des Blutes Erwachsener Bienen. J. Insect. Physiol., v. 11, p. 745-763, 1965.