

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Desenvolvimento e aplicações de linhagem celular de *Apis mellifera* e técnicas moleculares na sanidade apícola e produção de proteínas recombinantes

Matheus Iuri Frühauf

Pelotas, 2025

Matheus Iuri FröhauF

Desenvolvimento e aplicações de linhagem celular de *Apis mellifera* e técnicas moleculares na sanidade apícola e produção de proteínas recombinantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências: Saúde Única.

Orientador Professor Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

F945d Fruhauf, Matheus Iuri

Desenvolvimento e aplicações de linhagem celular de *Apis mellifera* e técnicas moleculares na sanidade apícola e produção de proteínas recombinantes [recurso eletrônico] / Matheus Iuri Fruhauf ; Geferson Fischer, orientador ; Mayara Fernanda Maggioli, coorientadora. — Pelotas, 2025.
102 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Coinfecção. 2. Patógenos. 3. PCR. 4. Linhagem. 5. Transfecção. I. Fischer, Geferson, orient. II. Maggioli, Mayara Fernanda, coorient. III. Título.

CDD 638.15

Matheus Iuri Frúhauf

Desenvolvimento e aplicações de linhagem celular de *Apis mellifera* e técnicas moleculares na sanidade apícola e produção de proteínas recombinantes

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/03/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Aroni Sattler
Doutor em Notório Saber em Apicultura - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rodrigo Zaluski
Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr. Silvia de Oliveira Hübner
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedicatória

Aos meus pais Mircon Frühauf e Terezinha Pratti Frühauf

Agradecimentos

Aos meus pais, Mircon Frühauf e Terezinha Pratti Frühauf, e à minha irmã, Inara Regina Frühauf, minha eterna gratidão por estarem sempre ao meu lado. Pelo amor incondicional, pelo apoio inestimável e por acreditarem em mim em cada passo dessa jornada. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Professor Dr. Geferson Fischer, minha mais profunda gratidão. Desde o início, quando aceitou me orientar, demonstrou não apenas conhecimento e dedicação, mas também uma paciência e um compromisso que foram fundamentais para minha trajetória. Foi ele quem abriu portas que eu jamais imaginei serem possíveis. Vindo do interior, nunca sonhei em ter a oportunidade de fazer um mestrado, mas ele tornou isso realidade. Depois, quando o doutorado parecia algo distante, ele novamente me deu essa chance. Estudar no exterior era um sonho que eu sequer ousava ter, e mais uma vez, ele possibilitou essa conquista. Hoje, ao apresentar minha tese de doutorado, sei que nada disso teria sido possível sem seu apoio. Além de um orientador excepcional, tornou-se um grande amigo, com quem compartilhei não apenas desafios acadêmicos, mas também conversas, conselhos e incontáveis mates. Obrigado por acreditar em mim e por ser uma inspiração dentro e fora da ciência.

À Professora Dr^a Mayara Maggioli, minha sincera gratidão pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche e por todo o apoio ao longo dessa jornada. Desde minha chegada, sempre esteve presente e disposta a ajudar em diversas situações, contribuindo de maneira essencial para meu crescimento acadêmico e pessoal. Seu apoio foi além do laboratório, tornando-se parte importante da minha trajetória, a ponto de até meu casamento acontecer em sua casa – um gesto que simboliza o quanto sou grato por sua generosidade e acolhimento. Minha eterna gratidão por toda a ajuda até aqui.

Na minha defesa de mestrado, escrevi como agradecimento: "À minha grande amiga Lariane Barcelos, por toda ajuda nos trabalhos de laboratório, pelas noites em

claro auxiliando na revisão de artigos, pelas longas conversas, cervejas e por estar sempre presente." O que eu não sabia naquela época era que essa amizade se tornaria algo ainda mais especial. Nos conhecemos no LabVir, onde começamos a compartilhar não apenas a rotina de pesquisa, mas também sonhos e desafios. Com o tempo, Lariane se tornou minha companheira, minha namorada e, hoje, minha esposa. Seguimos juntos, trilhando o mesmo caminho e compartilhando o mesmo objetivo, tanto na ciência quanto na vida.

À UFPEL e ao PPGV, pela oportunidade de pós-graduação.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Resumo

FRÜHAUF, Matheus Iuri. **Desenvolvimento e aplicações de linhagem celular de *Apis mellifera* e técnicas moleculares na sanidade apícola e produção de proteínas recombinantes**. 2025. 102f. Tese (Doutorado em Saúde Única) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

As abelhas *Apis mellifera* desempenham um papel essencial na polinização e na produção agrícola, porém diversos fatores, como patógenos e situações de estresse, ameaçam sua saúde. Para compreender melhor esses impactos, esta tese investigou a ocorrência de patógenos em abelhas e desenvolveu uma ferramenta biotecnológica voltada para a sanidade apícola. O primeiro estudo analisou a ocorrência de infecções virais em abelhas migratórias no Rio Grande do Sul, visando relatar as múltiplas viroses identificadas em apiários migratórios no sul do Brasil. Foram coletadas amostras de 135 colônias utilizadas na polinização de diversas culturas e submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrito Reverso (RT-PCR) multiplex para detecção dos vírus *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV), *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV), *Deformed Wing Virus* (DWV), *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV) e *Sacbrood Virus* (SBV). Os resultados indicaram uma alta taxa de coinfeções, com 8,9% das colmeias positivas para ABPV, 2,2% para IAPV, 91,8% para BQCV, 91,1% para DWV, 71,1% para SBV e 63% para CBPV, sendo que apenas duas colônias estavam livres de infecção. Esses achados sugerem que a apicultura migratória facilita a disseminação viral, aumentando os riscos sanitários para as abelhas. O segundo estudo realizou uma análise retrospectiva da presença de *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Nosema ceranae* e *Nosema apis* em amostras históricas de mel oriundas de diversas regiões do Rio Grande do Sul. Foram analisadas 125 amostras coletadas entre 2011 e 2022, com extração específica de material genético para bactérias e esporos para posterior PCR dos patógenos. Os resultados mostraram que *M. plutonius* estava presente em 97,3% das amostras, *N. ceranae* em 53,6%, enquanto *P. larvae* foi detectado em 4,8% e *N. apis* não foi encontrado, sugerindo que o agente *M. plutonius* persiste por longos períodos, além da substituição de *N. apis* por *N. ceranae* na região. Essa tese também apresenta a patente de uma linhagem celular contínua de *Apis mellifera* africanizada, denominada FFAM-15, livre dos principais vírus e microsporídios. O estabelecimento dessa linhagem envolveu o cultivo de células a partir de larvas mantidas em diferentes meios de cultura de insetos. Para validar seu potencial, o doutorado sanduíche realizado na Oklahoma State University focou no estudo e desenvolvimento de protocolos laboratoriais para avaliação da expressão gênica e transfeccção de proteínas recombinantes com intuito de futura aplicação em células FFAM-15. Assim, esta tese aborda aspectos fundamentais da saúde das abelhas, desde a detecção de patógenos em colônias e em produtos apícolas até o desenvolvimento de um modelo celular inovador. Os avanços apresentados contribuem para o monitoramento

sanitário das abelhas e oferecem novas perspectivas para estudos biotecnológicos na área.

Palavras-chave: coinfeção; patógenos; PCR; linhagem; transfeção.

Abstract

FRÜHAUF, Matheus Iuri. **Development and applications of *Apis mellifera* cell line and molecular techniques in bee health and recombinant protein production.** 2025. 102p. Thesis (Doctor in One Health) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Apis mellifera bees play an essential role in pollination and agricultural production; however, various factors, such as pathogens and stress conditions, threaten their health. To better understand these impacts, this thesis investigated the occurrence of pathogens in bees and developed a biotechnological tool aimed to improve bee health. The first study analyzed the occurrence of viral infections in migratory bees in Rio Grande do Sul, aiming to report the multiple viruses identified in migratory apiaries in Southern Brazil. Samples were collected from 135 colonies used for pollinating various crops and subjected to multiplex Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to detect *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV), *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV), *Deformed Wing Virus* (DWV), *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV), and *Sacbrood Virus* (SBV). The results indicated a high rate of co-infections, with 8,9% of the colonies testing positive for ABPV, 2.2% for IAPV, 91.8% for BQCV, 91.1% for DWV, 71.1% for SBV, and 63% for CBPV, with only two colonies free from infection. These findings suggest that migratory beekeeping facilitates viral dissemination, increasing health risks for bees. The second study conducted a retrospective analysis of the presence of *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Nosema ceranae*, and *Nosema apis* in historical honey samples from various regions of Rio Grande do Sul. A total of 125 samples collected between 2011 and 2022 were analyzed, with specific extraction of genetic material for bacteria and spores for subsequent PCR detection of pathogens. The results showed that *M. plutonius* was present in 97.3% of the samples, *N. ceranae* in 53.6%, while *P. larvae* was detected in 4.8%, and *N. apis* was not found, suggesting that *M. plutonius* persists for long periods and that *N. apis* has been replaced by *N. ceranae* in the region. This thesis also presents the patent of a continuous cell line of *Apis mellifera* africanized, named FFAM-15, free from major viruses and microsporidia. The establishment of this cell line involved cultivating cells derived from larvae maintained in different insect cell culture media. To validate its potential, the sandwich PhD conducted at Oklahoma State University focused on studying and developing laboratory protocols for gene expression evaluation and recombinant protein transfection, aiming at future applications in FFAM-15 cells. Thus, this thesis addresses fundamental aspects of bee health, from detecting pathogens in colonies and apicultural products to developing an innovative cellular model. The presented advances contribute to bee health monitoring and offer new perspectives for biotechnological studies in this field.

Keywords: Coinfection; pathogens; PCR; cell line; transfection.