

VIRGÍNIA TELES DOHANIK

**EXPRESSÃO E FUNÇÃO DO RECEPTOR DE VITELOGENINA NAS
GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadoras: Luanda Medeiros Santana
Carolina Gonçalves Santos

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

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

T

D655e
2020
Dohanik, Virgínia Teles, 1992-
Expressão e função do receptor de vitelogenina nas
glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera:
Apidae) / Virgínia Teles Dohanik. – Viçosa, MG, 2020.
87 f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.70-86.

1. Abelhas. 2. Expressão gênica. 3. Geleia real. 4. Abelhas
operárias. 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

VIRGÍNIA TELES DOHANIK

EXPRESSÃO E FUNÇÃO DO RECEPTOR DE VITELOGENINA NAS
GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

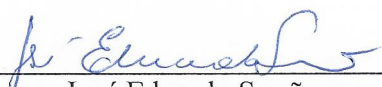
APROVADA: 28 de maio de 2020.

Assentimento:



Virgínia Teles Dohanik

Autora



José Eduardo Serrão

Orientador

“Esta pesquisa é dedicada a Deus, inteligência Suprema do Universo e causa primária de todas as coisas”.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade.

À Coodenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

À minha família, em especial à minha mãe, Angela e meus irmãos, Klênia, Klêcius e Paulo, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu marido, Luiz, por todo amor, carinho e companheirismo.

À minha sogra, Regina, por todo apoio e cuidado.

Às minhas grandes amigas Thainá, Daniela e Ana Laura, o apoio e ouvidos prestados simbolizam todo o amor da nossa amizade.

Ao meu orientador, Serrão, que além de ter um grande coração, é também uma fonte de inspiração.

Aos meus pais de coração, Edmilson e Luciane, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

À Profa. Luanda Medeiros Santana, por estar 100% ao meu lado me ajudando em todos os momentos. Muito obrigada, sem você seria tudo mais difícil. Conte sempre comigo.

À Profa. Carolina Gonçalves Santos, por toda ajuda técnica, amizade e paciência.

Aos laboratórios de Biologia Molecular de Insetos, de Immunovirologia e o Nucleo de Microscopia e Microanálise pela disponibilização dos equipamentos e pelo auxílio nas técnicas laboratoriais.

À Renata, por sua disponibilidade e atenção.

À Daniela pela ajuda crucial no cuidado com as abelhas.

Ao meu grande amigo Lulu, por toda ajuda nas coletas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural pelos dias de trabalho e convivência levados com tanto carinho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ao longo do Doutorado.

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einsten

BIOGRAFIA

Virgínia Teles Dohanik, natural de Arcos – Minas Gerais, filha de Paulo Roberto Dohanik e Angela Maria Dohanik, casada. Graduada em Ciências Biológicas com ênfase na Conservação do Meio Ambiente em fevereiro de 2014 pela Universidade Federal de Viçosa – campus Rio Paranaíba. Atuou como bolsista de Iniciação Científica, sob orientação do Prof. Dr. Edmilson de Souza Amaral, na área de Morfologia de Insetos. Mestre em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Serrão. Obteve título de mestre em fevereiro de 2016, intitulado: O transporte de vitelogenina é mediado por receptores de membrana nas células foliculares da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polistes simillimus*. Defende a tese para obter o título de *Doctor Scientiae*.

RESUMO

DOHANIK, Virgínia Teles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2020. **Expressão e função do receptor de vitelogenina nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadoras: Luanda Medeiros Santana e Carolina Gonçalves Santos.

O receptor de vitelogenina (VgR) pertence à superfamília de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) e é um componente essencial na captação e transporte da proteína precursora de vitelo, a vitelogenina, que é uma fosfoglicoproteína, sintetizada no corpo gorduroso e liberada na hemolinfa, na qual circula até ser absorvida por diversos órgãos, especialmente pelos ovários, via endocitose mediada por receptor. A importância da vitelogenina vai além das vias reprodutivas, pois está presente em abelhas operárias não reprodutoras, sendo sugerida como envolvida na produção da geleia real pelas glândulas hipofaríngeas como uma possível adaptação desta proteína na evolução das abelhas eussociais que pode ter permitido um cuidado com a cria mais eficiente. O objetivo foi verificar se o receptor de vitelogenina está presente nas glândulas hipofaríngeas de operárias da abelha *Apis mellifera*. Para tal, foi avaliada a expressão gênica de *AmVgR* (gene para receptor de vitelogenina em *A. mellifera*) em operárias com diferentes funções, na presença e ausência de rainhas no ninho, a presença desse receptor nas glândulas hipofaríngeas por imunohistoquímica, e a importância funcional para o desenvolvimento glandular com o silenciamento do gene por dsRNA-VgR. *AmVgR* é expresso nas glândulas hipofaríngeas de operárias, apresentando maior expressão nas operárias nutridoras do que nas recém-emergidas ou forrageiras. *AmVgR* apresenta maior expressão em operárias com 11 dias de idade em colônias que possuem rainha do que em colônias órfãs. Operárias nutridoras com glândulas hipofaríngeas desenvolvidas apresentam maior expressão de *AmVgR* do que aquelas com glândulas pouco desenvolvidas. A imunohistoquímica evidencia a colocalização da vitelogenina, do VgR e da clatrina nos ácinos glandulares das glândulas hipofaríngeas indicando endocitose mediada por receptor. Os ensaios com dsRNA mostram que não há mudança na expressão dos transcritos de *AmVgR* nas glândulas hipofaríngeas de operárias injetadas com dsRNA-VgR. Os resultados obtidos mostram que o VgR é responsável pelo transporte da vitelogenina da hemolinfa para as glândulas hipofaríngeas, contribuindo para a compreensão do desenvolvimento desta glândula e sua participação no contexto social das abelhas melíferas.

Palavras-chave: Abelhas. Expressão gênica. Geleia real. Operárias.

ABSTRACT

DOHANIK, Virgínia Teles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2020. **Expression and function of the vitellogenin receptor in the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: Luanda Medeiros Santana and Carolina Gonçalves Santos.

The vitellogenin receptor (VgR) belongs to the of low density lipoprotein receptors (LDLR) superfamily, essential for the uptake and transport of the yolk precursor, vitellogenin, that is a phosphoglycoprotein, synthesized in the fatty body and released in the hemolymph, following absorption in different organs, mainly in the ovaries, via receptor-mediated endocytosis. Besides, its importance for the reproductive pathway, the vitellogenin occurs in non-reproductive honeybee workers, suggesting a possible role in the production of royal jelly by the hypopharyngeal glands. The objective was to verify if the vitellogenin receptor occurs in the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* workers. Its occurrence in the hypopharyngeal glands was for this purpose, its presence in the hypopharyngeal glands was evaluated by the gene expression of *AmVgR* (VgR gene for *A. mellifera*) in workers with different functions, in the presence and absence of queens, immunohistochemistry, and the functional importance for glandular development with gene silencing by dsRNA-VgR. *AmVgR* is expressed in the hypopharyngeal glands of workers, showing higher expression in nurse than in newly-emerged and forager workers. *AmVgR* is more expressed in 11-day-old workers from queenright colonies than in queenless ones. Nurse workers with developed hypopharyngeal glands show higher *AmVgR* expression than those with poorly developed glands. The immunohistochemistry show the colocalization of vitellogenin, VgR, and clathrin in the acini of the hypopharyngeal glands, suggesting receptor-mediated endocytosis. The dsRNA analysis show that the transcript expression is not downregulated in the hypopharyngeal glands of workers injected with dsRNA-VgR. The results obtained show that the vitellogenin receptor is responsible for the transport of vitellogenin from the hemolymph to the hypopharyngeal glands, contributing to the comprehension of the role this gland in the social context of honeybees.

Keywords: Bees. Gene expression. Royal jelly. Workers.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	10
OBJETIVO	30
PARTE 1 – OCORRÊNCIA DO RECEPTOR PARA VITELOGENINA NAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE OPERÁRIAS DE <i>APIS MELLIFERA</i> (HYMENOPTERA: APIDAE)	31
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	48
PARTE 2 – RNA DUPLA FITA DO RECEPTOR DE VITELOGENINA EM GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE <i>APIS MELLIFERA</i>	53
MATERIAL E MÉTODOS	53
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO GERAL.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE	87

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Apis mellifera: considerações gerais

Os insetos eussociais incluem abelhas, formigas, vespas e todos os cupins. Existem três principais critérios que distinguem este grupo dos demais insetos: i) indivíduos da mesma espécie são responsáveis pelo cuidado com a prole, ii) existe uma divisão do trabalho reprodutivo e iii) há uma sobreposição de pelo menos, duas gerações em estágios de vida capazes de contribuir para o trabalho na colônia (Wilson 1971). A integração é complexa entre estes insetos envolvendo uma variedade de padrões comportamentais, feromônios e adaptações morfológicas e fisiológicas (Michener 1974).

Estas abelhas são classificadas como insetos holometábolos, por apresentarem metamorfose completa, com padrões de desenvolvimento corporais distintos (embrião, larva, pupa e adulto) (Winston e Fergusson 1985). Nestes insetos, poucas divisões celulares ocorrem após o fim da fase larval, ou seja, o fim da fase de crescimento do inseto, sendo a pupa ou fase de metamorfose, na qual o inseto não se alimenta, onde ocorrem os processos morfogenéticos que envolvem mais mudanças de forma e tamanho das células do que aumento de seu número (Cruz-Landim 2009). Após a emergência, os adultos desempenham funções específicas dentro da colônia, apresentando uma sociedade altamente organizada (Winston e Fergusson 1985).

Nos insetos sociais, indivíduos da mesma espécie e do mesmo sexo podem apresentar-se com morfologias corporais diversas e desempenhando funções específicas nas colônias (Cruz-Landim 2009). Em *A. mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apinae, Apini), é composta por três tipos de membros: a rainha, o zangão e as operárias, cada um dos membros possuindo tarefas especializadas dentro da colônia (Michener 1974). A determinação de sexo é haplodiploide, onde fêmeas originam-se de ovócitos fertilizados, portando diploides ($2n=32$), e os machos se originam de ovócitos não fertilizados, haploides ($n=16$) (Michener

1974). Nas fêmeas, há dois fenótipos distintos chamados de castas: uma única rainha e milhares de operárias (Winston 1987).

Em *A. mellifera*, a larva recém-eclodida tem potencial para ser uma operária ou uma rainha, o destino fenotípico das larvas diploides depende da qualidade e da quantidade do alimento recebido, a qual afeta a atividade dos *corpora allata* e das glândulas protorácicas, levando a perfis hormonais específicos das castas (Ribbands 1953; Rachinsky et al. 1990; Hartfelder e Rembold 1991). Esse fenômeno é chamado polifenismo, pois as variações morfológicas são determinadas pelas condições ambientais, nas quais o inseto se desenvolveu (Cruz-Landim 2009). A determinação de casta é iniciada pelo estímulo trofogenico que estimula respostas diferenciais do sistema endócrino, que secreta os principais hormônios morfogenéticos, à saber, hormônio juvenil e ecdisteroides (Page e Peng 2001; Page e Erber 2002; Page et al. 2002; Cruz-Landim 2009).

A dieta das larvas que originarão rainhas é constituída pela geleia real, rica em carboidratos, lipídios e proteínas, produzida a partir de secreções das glândulas hipofaríngeas e das glândulas mandibulares das operárias (Rembold and Dietz 1966; Cruz-Landim 2009, Kamakura et al. 2011), enquanto as larvas que originam operárias são alimentadas com geleia real até o segundo estágio larval, após este período sendo então alimentadas com uma mistura de geleia real, mel e pólen (Winston 1987).

Os títulos hormonais diferentes levam à mudanças no desenvolvimento dos órgãos internos, bem como de estruturas corporais externas, relacionadas com as funções específicas das castas na colônia (Michener 1974; Cruz-Landim 2000). Assim, são afetados os ovários que são maiores nas rainhas, o abdômen, o sistema glandular exócrino, a estrutura das mandíbulas, o aparelho do ferrão, o sistema de coleta de alimento, além de aspectos da fisiologia e comportamento (Snodgrass 1956; Winston 1987; Cruz-Landim 2009). Todas estas

diferenças estão associadas à especialização da rainha em produzir ovos, e das operárias para a manutenção da colônia e coleta de alimentos e dos machos que são responsáveis por fecundar a rainha (Snodgrass 1956; Michener 1974).

Os machos, chamados zangões, possuem uma única função significativa, o acasalamento. Ele não executa nenhum trabalho para a colônia e são alimentados pelas operárias, assim estruturas relacionadas ao trabalho são reduzidas ou ausentes (Snodgrass 1956). Por outro lado, as estruturas envolvidas na orientação, voo e acasalamento são altamente desenvolvidas (Snodgrass 1956). Seus olhos compostos são maiores que os das operárias, ocupando quase toda cabeça, o lóbulo óptico cerebral é maior e as antenas têm até 10 vezes mais estruturas olfativas que nas operárias, além de músculos de voo maiores e asas mais largas, características estas importantes na orientação para encontrar a rainha virgem durante o voo nupcial e com ela acasalar (Snodgrass 1956). Seu sistema reprodutivo é projetado para evertir o órgão genital dentro da rainha durante o acasalamento, desta forma o zangão acasala somente uma vez e morre em seguida, uma vez que o endofalo do pênis é arrancado, pois permanece preso na genitália da rainha após a cópula (Snodgrass 1956).

As rainhas são maiores que as operárias, possuem uma taxa metabólica mais alta que a permite produzir muitos ovos ao dia e apresentam maior longevidade (Free 1980). Entretanto, elas possuem repertório comportamental menos elaborado e um cérebro menor que as operárias, não possuindo estruturas para a coleta e manipulação de pólen, comportamento de forrageamento e de defesa contra inimigos, sendo incapazes de sobreviver por um longo período fora da colônia, não possuem glândulas de cera e glândulas hipofaríngeas, porém suas glândulas mandibulares são maiores (Snodgrass 1956; Michener 1974; Free 1980). As rainhas possuem anatomia especializada para reprodução, geralmente sendo a única fêmea fértil da colônia (Michener 1974). O status reprodutivo da rainha permite que ela armazene

espermatozoides em um órgão especializado, chamado espermateca, que serão utilizados durante toda a vida (Snodgrass 1956). Possuem um par de ovários bem desenvolvidos, com cerca de 180 ovariolos cada, dando a elas capacidade de ovopositar até 2000 ovos por dia (Page e Peng 2001; Page e Erber 2002; Page et al. 2002).

As operárias de abelha apresentam estruturas para coleta e manipulação de pólen, comportamento de forrageamento e de defesa na presença de inimigos (Michener 1974). Elas apresentam uma progressão característica no desempenho de suas atividades dentro da colônia, inicialmente como operárias nutridoras, depois de 2-3 semanas fazem a transição para o estágio de forrageadoras e por fim, em situações adversas, podem possuir um terceiro estágio, no qual as operárias podem sobreviver por longos períodos de tempo até que as condições ambientais melhorem, estas são referidas como abelhas de inverno nas regiões temperadas (Sekiguchi e Sakagami 1966; Omholt e Amdam 2004; Seehuus et al. 2007). Os ovários das operárias geralmente não estão ativados, possuindo cada um deles entre 2-10 ovariolos. As operárias de *A. mellifera* podem ativar seus ovários em colmeias órfãs ou quando a população da colônia está muito grande (Groot e Voogd 1954; Michener 1974).

É importante salientar que as operárias desempenham uma diversidade de tarefas dentro da colônia, geralmente em ordem cronológica, conhecido por polietismo etário (Deseyn e Billen 2005; Free 1980). Estas mudanças de tarefas são acompanhadas por mudanças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Free 1980). Em estudos em que abelhas operárias foram observadas realizando tarefas em diferentes idades, foi verificado que os indivíduos não se especializam em tarefas particulares, mas que cada indivíduo pode realizar uma variedade de tarefas, muitas vezes superpostas; observou-se também que, a tarefa preferida tende a mudar à medida que a abelha se torna mais velha (Free 1980). Em geral, com o aumento da idade, as abelhas empreendem quatro séries superpostas de tarefas, sendo elas: a) limpeza de células; b)

alimentação de larvas e construção de favos; c) construção de favos, recepção de néctar, acondicionamento de pólen, limpeza de células, remoção de entulhos e guarda; d) coleta de recursos fora do ninho (Free 1980).

Aquelas operárias alimentando as larvas são denominadas nutridoras, enquanto aquelas coletando recursos fora do ninho são as forrageiras. A transição de abelhas nutridoras para forrageiras é regulada pelo hormônio juvenil, onde aumentos nos títulos de hormônio juvenil reprimem a síntese de vitelogenina, proteína precursora do vitelo nos ovos, ativando a via de diferenciação através do hormônio juvenil (Amdam e Omholt 2003).

Durante o curso de vida das operárias, os níveis de vitelogenina no corpo gorduroso, onde ela sintetizada, e na hemolinfa caem, e essas concentrações reduzidas influenciam em vários aspectos do ciclo de vida das abelhas (Münch e Amdam 2010). Os níveis de vitelogenina no corpo gorduroso e na hemolinfa são mais altos em abelhas nutridoras e abelhas de inverno e baixos em forrageiras (Seehuus et al. 2006b), sendo que os sistemas glandulares da abelha, que estão associados à produção de alimento larval e de cera, se desenvolvem e regredem de acordo com as várias tarefas dentro do ninho (Free 1980).

Pelo fato de viverem em colônias numerosas e estocarem grande quantidade de alimento (mel e grãos de pólen) obtidos das plantas, as abelhas possuem grande valor em serviços ecossistêmicos, responsáveis pela manutenção de diferentes habitats e ganhos econômicos, relacionados a polinização de culturas, bem como uso dos produtos secundários produzidos, como mel e própolis. Elas fornecem um serviço de polinização altamente valorizado para uma gama de culturas agrícolas (Calderone 2012; Garibaldi et al. 2013).

Entretanto, dados preocupantes relatam um declínio na população de abelhas, devido à perda e degradação de seu habitat, ao uso exacerbado de pesticidas em grandes culturas agrícolas, como também presença de patógenos, parasitas, além das mudanças climáticas

(Winfree et al. 2009; Potts et al. 2010; Goulson et al. 2015; Hung et al. 2018). Assim, estudos que visam buscar informações sobre a biologia das abelhas bem como suas funções ecológicas são necessários para manutenção e conservação das espécies como também a manutenção da vida terrestre.

Glândulas hipofaríngeas

As operárias de *A. mellifera* alimentam as larvas com nutrientes proveniente principalmente das glândulas hipofaríngeas e glândulas mandibulares (Free 1980). As glândulas hipofaríngeas, também conhecidas como glândulas de geleia real, estão presentes em todos os himenópteros, apresentando variados graus de desenvolvimento e são consideradas como exclusivas dessa Ordem (Snodgrass 1956; Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009).

Essas glândulas fazem parte do sistema salivar, também conhecido como glândulas anexas ao tubo digestivo, por terem desembocadura na região oral (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). São formadas por estruturas pares que se originam da diferenciação do epitélio da região anterior ventral da faringe no estágio de pré-pupa (Cruz-Landim e Mello 1967; Cruz-Landim e Costa 1998; Cruz-Landim 2000; Cruz-Landim e Abdalla 2002).

As glândulas hipofaríngeas são formadas por células glandulares de classe III (Noirot e Quennedey 1974) que são caracterizadas segundo o grau de desenvolvimento e podem ser classificadas em quatro tipos principais (Cruz-Landim e Costa 1998). A abelha *A. mellifera* se enquadra como glândulas de classe III do tipo 4a, as quais se caracterizam por apresentarem cachos muito longos, podendo alcançar um centímetro de comprimento e enrolam-se sobre e sob o cérebro (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). Os cachos sendo muito

longos permitem a ligação de muitas células secretoras às quais podem se conectar agrupadas ao ducto axial (Figura 1.1) (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009).

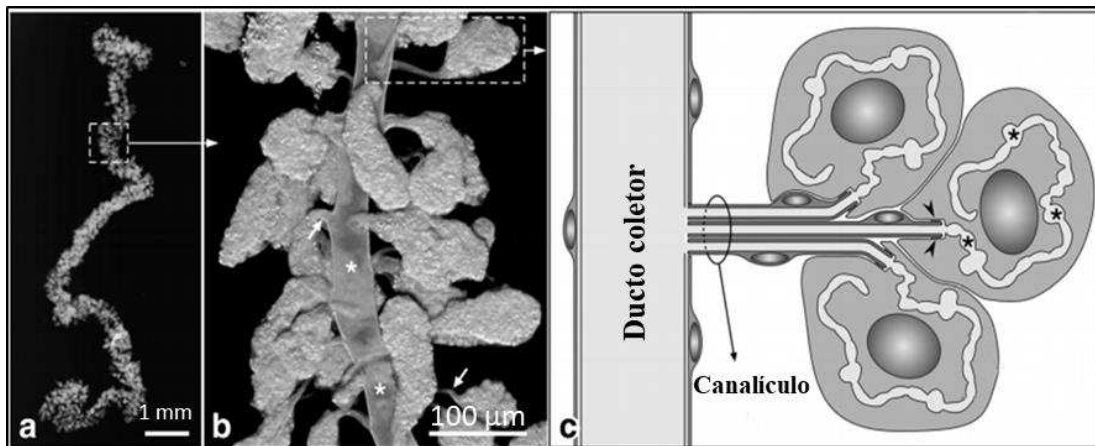


Figura 1: Glândula hipofaríngea de abelha operárias adulta. a e b: Imagens de microscopia de varredura das glândulas hipofaríngeas. A glândula consiste de ácinos pluricelulares dispostos em torno de um ducto coletor (asteriscos brancos) e ligados a este por meio de canaliculos dispostos em feixes (setas brancas).c: Apresentação esquemática dos ácinos. Cada ácino é composto por várias células secretoras que tem sua membrana apical invaginada formando um longo canaliculo (asteriscos pretos). Cada célula secretora é conectada através de um complexo juncional (pontas de seta) a uma célula do canal que forma um microcanal para a entrega de produtos secretores ao ducto coletor. Modificada de Klose et al. (2017).

As unidades secretoras possuem forma esférica, sendo chamados de ácinos ou alvéolos. Em *A. mellifera* estes ácinos são pluricelulares, sendo constituídos por uma média de cinco células secretoras globulares ricas em retículo endoplasmático rugoso, sendo mantidas juntas por uma membrana acelular, constituída de uma substância amorfa, semelhante a uma lâmina basal, ou seja, são independentes, e contém em seu interior um canaliculo intracelular ou coletor de secreção (formado por uma invaginação profunda da membrana plasmática da célula), um canaliculo extracelular ou canal excretor, que conduz a secreção para o local onde será secretada e, um canal excretor final ou canal axial, via de descarga da secreção na placa hipofaringeana (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). Os canaliculos dos ácinos

com mais de uma célula formam feixes e dirigem-se agrupados para o local de desembocadura, onde também terminam juntos. Tanto a glândula secretora como as células que produzem os canais secretores tem origem ectodérmica (Figuras 1 e 2) (Cruz-Landim e Hadek 1969; Cruz-Landim e Abdalla 2002; Deseyn e Billen 2005; Cruz-Landim 2009).

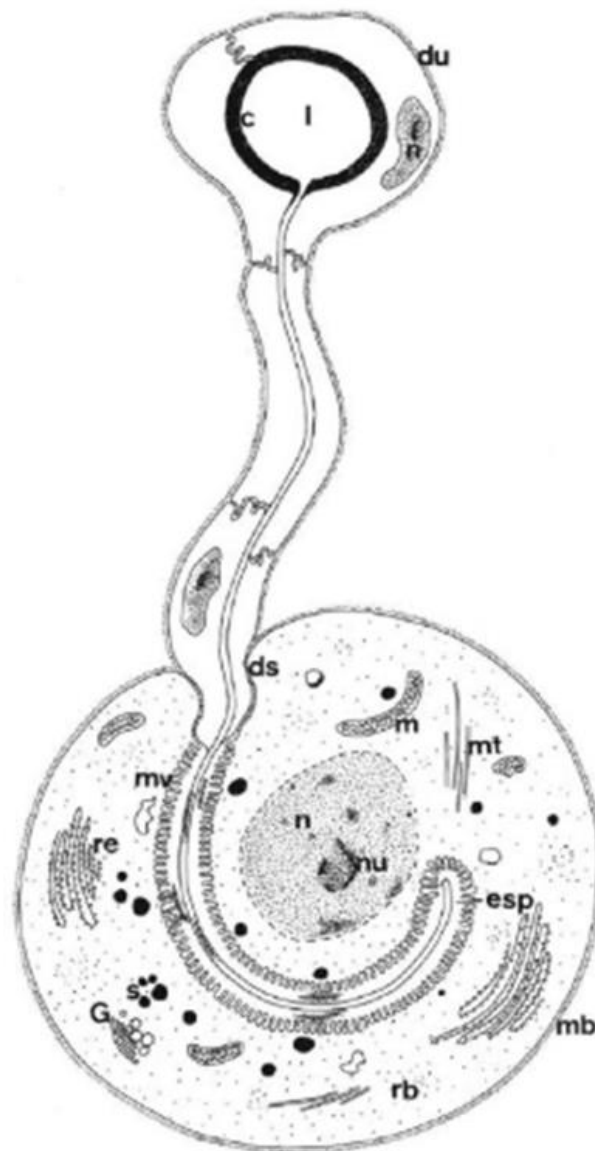


Figura 2: Representação esquemática da organização da glândula hipofaríngea. du= ducto axial cortado transversalmente; I= luz; c= cutícula; n= núcleo; nu= nucléolo; G= Golgi; s= secreção; esp= espaço secretor; mt= microtubúlos; m= mitocôndrias; rb= ribossomos; re= retículo endoplasmático granular; ds= desmossomos septados; mb= membrana basal; mv microvilosidades. Fonte: Cruz-Landim (2009).

Em cada célula a secreção acumula-se ao redor do canalículo intracelular (canal coletor), seja sob a forma de grânulos ou vacúolos, formando um espaço secretor entre a membrana plasmática da célula secretora e a cutícula do canalículo (reservatório de secreção intracelular) (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). A cutícula que reveste o canal coletor apresenta uma epicutícula com interrupções e uma pró-cutícula porosa. O canal excretor é formado por células achatadas com epicutícula fina e uma pró-cutícula espessa e elétron-densa, elas se ligam as células secretoras por junções septadas de tal forma que o canal coletor e o secretor se tornam contínuos (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). O canal excretor axial, que leva a secreção para ser eliminada através da placa hipofaríngea é formado por uma camada de células achatadas e apresenta uma cutícula diferenciada em exo e endocutícula (Cruz-Landim e Hadek 1969; Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009; Smodiš Škerl e Gregorc 2015).

As glândulas hipofaríngeas podem apresentar variação entre as espécies, sexos e castas entre os Hymenoptera, porém em *A. mellifera*, a glândula hipofaríngea está presente exclusivamente nas operárias, sendo ausente em machos e na rainha que se restringem a função reprodutiva, entretanto, nas operárias a glândula se apresenta muito desenvolvida (Cruz-Landim e Hadek 1969; Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009; Smodiš Škerl e Gregorc 2015).

Quando emergem, as abelhas não apresentam glândulas hipofaríngeas completamente desenvolvidas e não secretam ativamente (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). As células glandulares nesta fase apresentam núcleo grande com cromatina descondensada, retículo endoplasmático granular desenvolvido, mitocôndrias e Golgi, contendo vacúolos pequenos indicando absorção de material da hemolinfa (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009).

Nas operárias nutridoras a glândula hipofaríngea tem o seu auge de desenvolvimento, com citoplasma rico em grânulos e vacúolos com acúmulo de secreção de natureza proteica no espaço subcuticular ao redor do canal coletor (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). Quando a secreção é liberada, acumula-se primeiro no espaço entre a membrana plasmática e a cutícula, antes de passar para o lúmen, formando bolsões de secreção (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Deseyn e Billen 2005; Cruz-Landim 2009).

Passada essa fase em que as operárias estão mais envolvidas com a nutrição da cria, as abelhas mais velhas passam a forragear e o aspecto das células glandulares muda, aparentando sinais de degeneração celular (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). Ocorre um colapso das microvilosidades ao redor do canal coletor devido ao esvaziamento do espaço, o retículo endoplasmático apresenta-se vesicular e com mitocôndrias menores. Um novo tipo de secreção aparece em células nesta fase sob a forma de grânulos de conteúdo heterogêneos. Na transição da fase de nutridora para forrageira a glândula hipofaríngea é marcada por uma mudança de função, a qual pode ser morfológica e/ou bioquimicamente demonstrada (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Cruz-Landim 2009). As operárias campeiras jovens ainda apresentam suas glândulas hipofaríngeas funcionais, enquanto nas mais idosas a glândula apresenta sinais de degeneração (Cruz-Landim e Hadek 1969; Kubo et al. 1996; Cruz-Landim e Abdalla 2002; Deseyn e Billen 2005; Cruz-Landim 2009).

As glândulas hipofaríngeas em *A. mellifera* são consideradas glândulas produtoras de alimento, o qual é servido à cria jovem, às rainhas, aos machos e às operárias recém-emergidas (Michener 1974; Crailsheim et al. 1992). Assim, esta glândula apresenta duas fases funcionais: aquela que ocorre na operária nutridora, na qual há síntese da porção proteica que fará parte do alimento dado à larva e enzimas como a α -glicosidase e, a outra fase é marcada nas campeiras jovens, onde ocorrem mudanças nos aspectos morfológicos e altas produções

enzimáticas, sobretudo de glicosidases e amilases, auxiliando no processamento do néctar para conversão em mel (Cruz-Landim 2009). As secreções produzidas estão ligadas diretamente as necessidades da colônia, portanto, a glândula exibe uma atividade secretora flexível em relação às necessidades de alimentação da cria (Free 1980).

As proteínas secretadas com a geleia são principalmente derivadas do pólen, que é ingerido em grande quantidade pelas abelhas (Crailsheim et al. 1992). A geleia real tem uma composição complexa de água, açúcares, proteínas, colesterol, aminoácidos e vitaminas (Rembold e Dietz 1966), na qual 90% das proteínas pertencem ao mesmo grupo e contém cinco tipos de proteínas com uma quantidade relativamente alta de aminoácidos essenciais (Schmitzová et al. 1998). As glândulas hipofaríngeas também produzem α -glicosidase, glucosidase oxidase e outras enzimas como galactosidase, esterase, lipase e leucina arilamidase, incluindo também a royalactina que tem sido discutida como potencial proteína na diferenciação das rainhas (Knecht e Kaatz 1990; Ohashi et al. 1999; Kamakura 2011).

O ciclo funcional da glândula hipofaríngea nas operárias sugere maior atividade enquanto estão exercendo funções dentro do ninho até quando ocorre a transição para forrageiras (Crailsheim et al. 1992; Hrassnigg e Crailsheim 1998). O tamanho da glândula tende a aumentar de acordo com a idade, com maior desenvolvimento aos seis dias de idade, apresentando tamanho duplicado em comparação com as recém-emergidas. Nesta idade a glândula apresenta grande quantidade de secreção acumulada ao redor do aparato terminal, sendo que, aos nove dias apresentam uma fase secretora assíncrona, com algumas células apresentando retículo endoplasmático rugoso vesicular e outras lamelares, permanecem assim até 15 dias de idade, quando diminui a quantidade de secreção ao redor do aparato terminal. Aos 18 dias ocorre grande quantidade de secreção perto do aparato terminal e o retículo endoplasmático rugoso é completamente reticular e após 21 dias aparecem lisossomos que se

acumulam, organelas se desintegram e o citoplasma se torna menos denso (Cruz-Landim e Hadek 1969; Crailsheim et al. 1992; Hrasnigg e Crailsheim 1998) . Aos 27 dias de idade adulta, o retículo endoplasmático se torna elétron-denso e as demais organelas celulares são de difícil distinção, indicando regressão da glândula (Cruz-Landim e Hadek 1969; Crailsheim et al. 1992; Hrasnigg e Crailsheim 1998). Diferentes modos de morte celular foram relatados nas glândulas hipofaríngeas em regressão de abelhas operárias (Silva de Moraes e Bowen 2000).

Entretanto, no estudo da atividade glandular é importante observar as funções desempenhadas pelas abelhas que somente sua idade cronológica. Huang et al. (1994) relataram que há diferença endócrina na divisão de trabalho em abelhas operárias com a mesma idade de acordo com a tarefa executada. As abelhas jovens apresentam baixo título de hormônio juvenil e possuem glândulas hipofaríngeas maiores, enquanto que as mais velhas apresentam altas taxas de hormônio juvenil e menores tamanhos dessas glândulas. A presença da cria também influencia no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, pois 15-23 dias após retiradas sucessivas da cria, há alterações no tamanho destas glândulas (Hrasnigg e Crailsheim 1998). Smodiš Škerl e Gregorc (2015) demonstraram a capacidade das glândulas hipofaríngeas em prolongar sua atividade e aumentar seu tamanho quando a colônia tem necessidade de produzir novas crias ou novas rainhas, neste caso, as operárias ficam na colmeia por um longo período e alimentam as larvas, o que não depende da idade, além disso, observaram que as glândulas hipofaríngeas em forrageiras mais velhas poderiam ser reativadas quando necessário.

Outros fatores também podem influenciar o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas. O hormônio juvenil possui importante papel no desenvolvimento glandular, quando há um aumento nos títulos desse hormônio, a concentração de vitelogenina circulante diminui e as

operárias, conseqüentemente, começam a forragear (Robinson 1992; Amdam e Omholt 2003). Operárias jovens começam a forragear logo após serem tratadas topicamente com hormônio juvenil, indicando que este hormônio está relacionado com a regressão das glândulas hipofaríngeas e a troca de tarefas (Gracioli e Silva de Moraes 2002). O efeito da dieta também está diretamente relacionado ao desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas (Furquim et al. 2004). Outro ponto importante foi sugerido por Le Conte et al. (2001), que relatam que o feromônio reprodutivo é um regulador primário do desenvolvimento comportamental em operárias, assim a presença dos feromônios da rainha são importantes reguladores do desenvolvimento da glândula hipofaríngea.

A densidade populacional também influencia no desenvolvimento glandular. Quando uma colônia não consegue fornecer quantidade suficiente de abelhas nutridoras, operárias mais velhas tendem a mudar suas tarefas e passam a cuidar da cria (Robinson 1985). Em colônias fracas de *A. mellifera*, com poucas operárias, as glândulas hipofaríngeas amadurecem mais cedo, por volta do sétimo dia após a emergência e se estabilizam no patamar avançado até o 21° dia. Em colônias com população considerada normal, o pico de desenvolvimento glandular é alcançado no 14° dia e a partir daí permanece estável até o 21° dia (Cruz-Landim e Silva de Moraes 1994). Nas colônias muito populosas, fortes, as glândulas alcançam seu desenvolvimento máximo por volta do sétimo dia, mas sofrem um decréscimo até o 14°, para novamente crescerem até o 21° dia (Cruz-Landim e Silva de Moraes 1994). Além dessa variação no ritmo de desenvolvimento, foi observado que as glândulas das colônias fracas alcançam tamanho maior do que as colônias médias e fortes (Cruz-Landim e Silva de Moraes 1994).

Portanto, a função das glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* está bem caracterizada do ponto de vista morfofuncional, porém, são necessários mais estudos bioquímicos e do ponto de vista molecular de acordo com a idade e função.

Vitelogenina e seu Receptor Celular

Em insetos, as proteínas precursoras de vitelo são sintetizadas pelo corpo gorduroso, liberadas na hemolinfa e então importadas para os ovócitos em crescimento via endocitose mediada por receptor (Telfer 1965; Engelmann 1979; Giogi 1979; Dhadialla et al. 1992; Haunerland e Shirk 1995; Tufail e Takeda 2008). Entretanto, estudos recentes relatam a expressão do mRNA de vitelogenina nos ovários de abelhas (Cardoso-Júnior et al. 2018) e em hemócitos de *Laodephax striatellus* (Hemiptera) (Huo et al. 2018), revelando novos possíveis locais de síntese de vitelogenina.

Em termos de bioquímica, o gene codificador da vitelogenina é transcrito em 5440 nucleotídeos e a proteína corresponde a 1770 aminoácidos com peso molecular de 180 kDa (Wheeler and Kawooya 1990), covalentemente ligada a carboidratos (principalmente manose), fosfolípidos e diacilglicerol (Engels et al. 1990; Wheeler e Kawooya 1990) sendo descrita como uma fosfolipoglicoproteína monomérica (Wheeler and Kawooya 1990) geralmente clivada, *in vivo*, por endoproteases (Barr 1991; Rouillé et al. 1995).

A vitelogenina nos insetos diverge em sua localização específica de clivagem mas, em geral, a clivagem resulta em um fragmento N-terminal menor e em um fragmento C-terminal maior (Tufail e Takeda 2008). A vitelogenina das abelhas não possui a sequência de consenso RXXR nas proximidades da região de polisserina como os outros insetos, bem como a presença típica de produtos de clivagem na hemolinfa. No entanto, a proteína foi observada em duas formas: a proteína madura de 180 kDa na hemolinfa e no corpo gorduroso e um

fragmento mais leve de 150 kDa nos ovários das rainhas (Seehuus et al. 2007) e nas glândulas hipofaríngeas das operárias (Amdam et al. 2003a). A unidade de 150 kDa também ocorre durante a purificação da vitelogenina da hemolinfa em rainha e, portanto, pode ser um produto de clivagem (Wheeler e Kawooya 1990). Além desses, um fragmento de 40 kDa foi descrito, sendo possivelmente um produto da clivagem da proteína de 180 kDa (Havukainen et al. 2011).

Durante o curso da vida das operárias, os níveis de vitelogenina na hemolinfa e no corpo gorduroso influenciam em vários aspectos da história de vida da abelha (Münch e Amdam 2010). O início da transcrição da vitelogenina ocorre em rainhas e operárias a partir do estágio de pupa de olhos marrons e continua nos adultos (Barchuk et al. 2002; Piulachs et al. 2003). Em rainhas adultas, há um rápido aumento nos títulos de vitelogenina nos quatro primeiros dias, chegando a 70% do total de proteínas da hemolinfa, mantendo-se alto independentemente de haver acasalamento e postura de ovos (Engels 1974). Em operárias, a transcrição de vitelogenina aumenta progressivamente, com picos entre 5 a 10 dias de idade adulta, correspondendo a 30-40% das proteínas circulantes na hemolinfa, quando essas exercem a função de nutridoras, em recém-emergidas e em operárias com mais de 15 dias (exercendo a função de forrageiras), os títulos de vitelogenina são baixos, mas permanecendo presentes por até 30 dias (Engels 1974; Fluri et al. 1982; Engels et al. 1990). Em condições de orfandade, as operárias nutridoras ativam seus ovários e, quando começam a ovopositar, a concentração de vitelogenina na hemolinfa atinge níveis comparados ao de uma rainha em postura (Engels 1974).

A vitelogenina é um pré-requisito para o desenvolvimento do ovócito em abelhas (Lin et al. 1999), mas tem sido relatada como um importante componente de vias que não são diretamente ligadas à reprodução durante a evolução das abelhas eussociais (Amdam et al.

2003a, 2004b; Seehuus et al. 2006b, 2007; Huo et al. 2014, 2018, 2019). Embora a principal função da vitelogenina é prover nutrição para embriões, ela também transporta outros nutrientes para os ovários de rainhas (Amdam et al. 2004b), é encontrada em operárias não reprodutoras (Engels 1974; Engels et al. 1990) e em machos adultos (Trenczek and Engels 1986; Trenczek et al. 1989; Piulachs et al. 2003; Colonello-Frattini et al. 2010). A presença da vitelogenina foi relatada em outros órgãos que não o ovário, como na cabeça, nas células do corpo gorduroso associadas ao cérebro e nas glândulas hipofaríngeas (Amdam et al. 2003a).

A vitelogenina também influencia a sinalização hormonal, a transição comportamental, a resistência ao estresse e a longevidade em operárias das abelhas (Amdam et al. 2004b, a; Seehuus et al. 2006a; Nelson et al. 2007; Cardoso-Júnior et al. 2018). A transição de abelhas nutridoras para forrageiras é regulada pelo hormônio juvenil e vitelogenina. Durante o curso de vida das operárias, os níveis de vitelogenina no corpo gorduroso e na hemolinfa diminuem, e essas concentrações reduzidas influenciam a transição de operárias com funções dentro da colônia para o forrageio (Münch e Amdam 2010). Os níveis de vitelogenina no corpo gorduroso e na hemolinfa são mais altos nas abelhas de inverno de vida longa se comparados com as forrageiras de vida curta (Seehuus et al. 2006a). O knockdown mediado por interferência do mRNA do gene para vitelogenina mostra que, à medida que os níveis de vitelogenina diminuem, os títulos do hormônio juvenil aumentam e as operárias mostram senescência imune, suscetibilidade ao estresse oxidativo e redução da sobrevivência, além de uma maior probabilidade de abandonar as tarefas do ninho em favor da procura de néctar (Amdam et al. 2003a, 2004a; Guidugli et al. 2005; Seehuus et al. 2006a; Nelson et al. 2007). A supressão de vitelogenina também está relacionada com a resposta gustativa, que implica no desempenho da aprendizagem em operárias e conseqüentemente no comportamento e divisão do trabalho (Amdam et al. 2006).

A vitelogenina participa no transporte secundário de fosfato, vitaminas e hormônios (Chen et al. 1997; Sappington e Raikhel 1998), atua também como transportadora de zinco, que protege operárias e rainhas de estresse oxidativo e contribui na longevidade destas (Amdam et al. 2004b; Seehuus et al. 2006b; Corona et al. 2007; Havukainen et al. 2013).

Em abelhas, a vitelogenina possui, ainda, propriedades imunológicas sendo capaz de mediar a imunidade transgeracional, transportando moléculas derivadas de microrganismos para os ovócitos em desenvolvimento (Salmela et al. 2015; Harwood et al. 2019). Além disso, ela tem sido associada à transmissão vertical de vírus, interagindo com as proteínas do nucleocapsídeo nos ovários, transmitindo o vírus para a prole (Huo et al. 2014), sendo o receptor de vitelogenina responsável pela captação da proteína infectada para o germário ovariano (Huo et al. 2018; He et al. 2019), interagindo no reconhecimento e transmissão de vírus em hemócitos que expressam vitelogenina (Huo et al. 2018).

O receptor de vitelogenina (VgR) é responsável pela absorção de vitelogenina a partir da hemolinfa durante a formação dos ovos nos insetos (Raikhel e Dhadiallal 1992). Além disso, a presença deste receptor tem sido relatada em outros órgãos. Este fato não é surpreendente devido ao papel pleiotrópico da vitelogenina na vida social das abelhas (Tufail e Takeda 2009). Em *A. mellifera* VgR foi relatado na membrana plasmática de ovócitos, células foliculares que revestem os ovócitos em desenvolvimento, glândulas hipofaríngeas, corpo gorduroso abdominal e da cabeça, cabeça e intestino médio (Amdam et al. 2003a; Guidugli-Lazzarini et al. 2008; Dohanik et al. 2018).

Os VgRs são representantes da família de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) presentes em vertebrados e invertebrados (Raikhel e Dhadiallal 1992; Sappington e Raikhel 1998). A maioria da família LDLR está envolvida na endocitose mediada por receptores de lipoproteínas (Goldstein e Brown 1974) e a liberação de complexos de proteínas para o

citoplasma (Herz et al. 1992) bem como o carregamento de vitaminas. A família de receptores LDLR também tem importante função na transdução de sinais extracelulares e contribui para a migração neuronal, transmissão sináptica e desenvolvimento do embrião (Hiesberger et al. 1999).

A família de receptores LDLR está estruturalmente e funcionalmente definida por domínios modulares, que estão frequentemente codificados por éxons distintos no gene correspondente (Tufail e Takeda 2007). Esses domínios modulares são: i) repetição de ligação com seis resíduos de cisteína cada; ii) repetição de fator de crescimento epidérmico contendo seis resíduos de cisteína cada; iii) repetições contendo um motivo YWTD que foi proposto por formar um domínio α -hélice (Springer, 1998); iv) um único domínio transmembrana; e v) a região citoplasmática contendo pelo menos uma cópia da sequência do motivo NPXY (Tufail e Takeda 2005, 2007) para internalização do receptor através de vesículas revestidas por clatrina (Goldstein et al. 1985; Chen et al. 1990).

Em *Bombyx mori* (Lepidoptera), o mRNA de *BmVgR* é expresso ao longo de seu ciclo de vida, incluindo ovo, larva, pupa e adulto (Lin et al. 2013). Em *Aedes aegypti* (Diptera), o nível de expressão de *AaVgR* começa a subir no ovário um dia após a eclosão, e continua a aumentar durante os estágios pre-vitelogênicos e vitelogênicos (Cho e Raikhel 2001). Para dois VgRs de lepidópteros, *BmVgR* e *SlVgR*, seus transcritos aparecem no estágio de pupa até adultos (Shu et al. 2011; Lin et al. 2013). Em *Drosophila melanogaster* (Diptera), o *DmVgR* e as proteínas VgR são expressos no estágio pré-vitelogênico (Schonbaum et al. 2000). Em *Bactrocera dorsalis* (Diptera) a presença de *BdVgR* foi relatada nos ovários e corpo gorduroso, com maior expressão com seis dias após a eclosão, decaindo em seguida (Lin et al. 2015). O padrão de transcrição de três VgRs de baratas, *PaVgR*, *BgVgR* e *LmVgR* são similares durante o estágio adulto, os níveis de expressão de VgR são altos no estágio pré-

vitelogênico inicial, depois declinam e permanecem baixos, no entanto a expressão proteica dos três VgRs de baratas é baixa quando a expressão de transcrição é alta, e vice-versa (Tufail e Takeda 2005, 2007; Ciudad et al. 2006). Também os transcritos *BgVgR* e *PaVgR* são expressos no instar final ninfal e os níveis de expressão são maiores do que em adultos (Tufail and Takeda 2005, 2007; Ciudad et al. 2006).

A regulação da expressão de VgR é mais complicada em insetos sociais. Em *A. mellifera*, os transcritos *AmVgR* são encontrados em ovários, corpo gorduroso, intestino médio, cabeça e glândula hipofaríngea de operárias (Amdam et al. 2003a; Guidugli-Lazzarini et al. 2008). Em *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera) a expressão de *BlVgR* foi detectada em antenas, cabeça, torác, pernas, epiderme, intestino médio, corpo gorduroso, glândula de veneno e em maior quantidade em ovários (Du et al. 2019). Na formiga, *Solenopsis invicta*, o nível transcricional de *SiVgR* é maior em fêmeas virgens do que em rainhas acasaladas (Chen et al. 2004), mas o sinal proteico é menor em fêmeas virgens do que em rainhas acasaladas (Lu et al. 2009). A localização de proteínas *SiVgR* na membrana do ovócito para o uso de Vg é um marcador potencial para fêmeas virgens e maduras prontas para voar para o acasalamento (Lu et al. 2009).

A proteína VgR dos ovócitos de *Locusta migratoria* (Orthoptera) foi identificada e purificada pela primeira vez por Röhrkasten e Ferenz (1985), desde então, ele foi identificado em uma variedade de insetos com importância econômica (Amdam et al. 2003a; Lin et al. 2013; Wu et al. 2018) e pragas agrícolas (Kim et al. 1992; Tufail e Takeda 2005; Shu et al. 2011; Lu et al. 2015; Zhang et al. 2016, 2019). Em 2004, foi relatada a clonagem do primeiro cDNA de himenópteros VgR da formiga *S. invicta* (*SiVgR*), os títulos de VgR foram aumentados por meio de metoprene, um análogo do hormônio juvenil (Chen et al. 2004). A tecnologia RNAi foi usada pela primeira vez em 2006, para analisar a função VgR na barata

Blattella germanica (Ciudad et al. 2006). No entanto, o primeiro silenciamento de himenópteros VgR com RNAi foi alcançado em 2009 (Lu et al. 2009). As características de expressão de VgR da abelha *A. mellifera* na rainha e nas operárias também foram estudadas, e os resultados sugeriram que a VgR não é específica de casta ou tecido e a proteína foi detectada em todos os sexos e fora do ovário (Guidugli-Lazzarini et al. 2008).

Recentemente, foi demonstrado que a transmissão vertical do vírus do arroz (RSV) através de *Laodelphax striatellus* (Orthoptera) ocorre quando o RSV se liga a vitelogenina que entra no ovócito em desenvolvimento por endocitose mediada por VgR (He et al. 2018). Somente vitelogenina de hemócitos de *L. striatellus*, se ligou ao RSV, o que sugere uma diferença conformacional em que peptídeos de superfície viral específicos podem permitir que essas interações ocorram (Huo et al. 2019).

Assim, o desenvolvimento de estudos utilizando receptores de vitelogenina devem ser avaliados para compreender a maturação de ovócitos, a deposição de ovos, a transmissão de patógenos e as diversas funções relacionadas à vitelogenina, bem como seu papel na produção de geleia real em abelhas nutridoras de *A. mellifera*. Estes receptores são candidatos a estudos inovadores para controle e preservação de espécies, pois desempenham um papel crítico na fisiologia dos insetos. Os avanços biotecnológicos oferecem a oportunidade de explorar esses recursos para inovar tecnologias, dentre eles a interferência por RNA, mostra ser uma técnica vantajosa para analisar a função de VgR e suas finalidades.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar se a vitelogenina circulante na hemolinfa é internalizada nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera* a partir do receptor de vitelogenina.

Para tanto, esta tese está organizada em duas partes. A primeira parte avalia a ocorrência do VgR nas glândulas hipofaríngeas através da análise de expressão gênica de *AmVgR* e da localização, por imunohistoquímica, desse receptor nas glândulas de operárias exercendo diferentes funções no ninho, em operárias de ninhos com e sem rainha e em glândulas com graus diferentes de desenvolvimento. Na segunda parte foi avaliada a importância da vitelogenina para o desenvolvimento da glândula hipofaríngea com o silenciamento da expressão gênica do receptor por RNA de interferência.

**PARTE 1 – OCORRÊNCIA DO RECEPTOR PARA VITELOGENINA NAS
GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE OPERÁRIAS DE *Apis mellifera*
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas

As abelhas operárias de *A. mellifera* foram obtidas a partir de diferentes ninhos do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Operárias nutridoras foram coletadas dos quadros de cria quando introduziam a cabeça nas células de cria contendo larvas e ali permaneciam por alguns segundos. As operárias forrageiras foram coletadas retornando para o ninho com a corbícula carregada de grãos de pólen. Para obtenção de operárias recém-emergidas, os quadros de cria contendo pupas foram transferidos para estufa, condicionados a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 80 % UR e diariamente observou-se a emergência das operárias. As abelhas recém-emergidas foram marcadas no tórax com tinta atóxica de cores diferentes, conforme a data de nascimento, e colocadas em colônias de observação de dois tipos: com e sem a presença da rainha. Após 11 dias de idade estas operárias foram coletadas. Todas as abelhas foram crio-anestesiadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos e dissecadas em NaCl 125 mM para retirada das glândulas hipofaríngeas. As glândulas hipofaríngeas das operárias nutridoras foram classificadas em desenvolvidas ou pouco desenvolvidas de acordo com o tamanho dos ácinos glandulares (Figura 3).

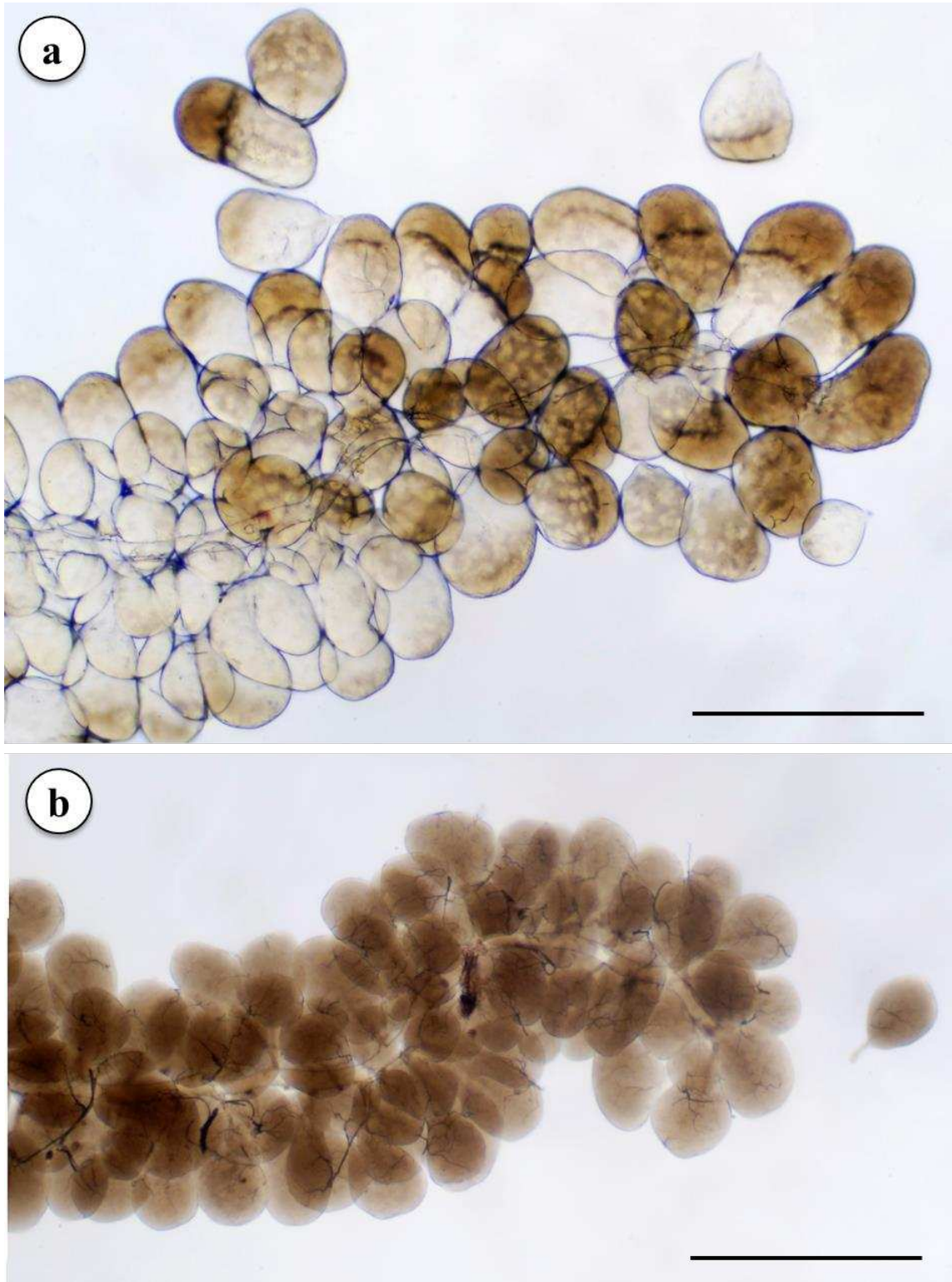


Figura 3: Glândulas hipofaríngeas de abelhas nutridoras de *Apis mellifera*. (a desenvolvida; b pouco desenvolvida). Contrastadas com acetato de uranila a 1 %. Barras = 45 μ m.

PCR quantitativo em tempo real

As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas para avaliar a expressão do gene para receptor de vitelogenina de *A. mellifera* (*AmVgR*) nas glândulas hipofaríngeas de operárias em três condições: a) quanto à atividade desenvolvida pela operária no ninho, b) quanto ao grau de desenvolvimento da glândula das operárias nutridoras e c) quanto a presença ou ausência da rainha.

Extração de RNA

Foram utilizadas de 5 pares de glândulas hipofaríngeas em cada amostra de operárias nutridoras, campeiras, com diferentes graus de desenvolvimento glandular, e provenientes de ninhos com ou sem rainha foram dissecadas sob estereomicroscópio (Zeiss), com pinças e vidros autoclavados e lavados com solução RNAase Away® (Sigma Aldrich), para assegurar que as amostras não fossem contaminadas com nucleases. Em seguida as glândulas hipofaríngeas das abelhas em cada condição foram colocadas em 250 µL de TRI Reagent® (Sigma Aldrich) e mantidas a -20 °C até a extração do RNA total.

O RNA total foi extraído com TRI Reagent® (Sigma Aldrich). As amostras foram maceradas com pistilos autoclavados, completando o volume final do TRI Reagent para 500 µL e centrifugadas (centrífuga 5418 R®, Eppendorf) a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para 100 µL de clorofórmio, agitados vigorosamente por 15 segundos e encubados a 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para 250 µL de isopropanol gelado por 10 minutos. Após este período as amostras foram mantidas a -20 °C *overnight*. Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado de RNA total foi lavado com 500 µL de etanol

75 % resfriado e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e a lavagem repetida mais uma vez. O precipitado foi colocado em banho tipo seco (F452A HB201/202® Bioer) a 55 °C por 10 minutos e ressuspensionado em 20 µL de água livre de nucleases (Promega). A quantidade de RNA em cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific) por absorvância em comprimento de onda de 260 nm.

Síntese de cDNA

Todas as amostras de RNA foram tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®), conforme as especificações do fabricante, antes da síntese do cDNA que foi feita usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase® (Promega). Em um tubo esterilizado foram adicionados 1 µg de RNA total extraído das glândulas hipofaríngeas, 1 µL de oligo dT primer (0,5 µg/ µL) e água livre de nucleases para completar 15 µL. As amostras foram aquecidas em banho tipo seco (F452A HB201/202® Bioer) durante 5 minutos a 70 °C e resfriadas em gelo. A cada amostra foi adicionado 5 µL de tampão da enzima, 1 µL de transcriptase reversa M-MLV e 6 µL de DNTP mix (2,5 mM) seguindo de incubação a 42 °C durante 60 minutos. O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite® (Thermo Scientific) a 260 nm.

qPCR

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando o kit de quantificação de fluorescência (SYBR® Green) GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) no sistema PCR Eco Real Time® (Illumina). A montagem das placas foi realizada utilizando, aproximadamente, 200 ng do cDNA e 0,1 µM de cada *primer* para *AmVgR* (XM_016912481.1) (Guidugli-

Lazzarini et al. 2008) e o *RpL32* (= *Rp49* XM_006564315.2) como controle endógeno previamente estabelecido (Lourenço et al. 2008) (Tabela 1). Os *primers* foram confeccionados pela Integrated DNA Technologies (IDT). Os níveis relativos de expressão de *AmVgR* nas glândulas hipofaríngeas foram comparados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001; Yuan et al. 2006).

Análise Estatística

Os dados de expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foram testados para normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson Normality e submetidos aos testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey para os dados de operárias desenvolvendo diferentes tarefas e t-Student para os demais, todos com 5 % de significância no programa GraphPad Prism 5.

Tabela 1 - *Primers* utilizados nos testes de qPCR

Gene	Número de acesso (NCBI)	Primer	Referência
<i>AmVgR</i>	XM_016912481.1	F: TGAACCTTACGACATTGCCCT R: TGTGATTTTCGGTCCAAGCCC	Guidugli- Lazzarini et al., 2008
<i>RpL32</i>	XM_006564315.2	F: CCCATAACGTTCTATCTGTGGCA R: CTCGTCATATGTTGCCAACTGG	Lourenço et al., 2008;

Western blotting

Foram utilizadas de 10 pares de glândulas hipofaríngeas em cada amostra de operárias (nutridoras e forrageiras) e ovários de rainhas (controle positivo) de *A. mellifera* foram

dissecadas e homogeneizadas com homogeneizador Motor Cordless® (Sigma-Aldrich) em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com 1mM de EDTA e 1 mM DTT com 10 % de *cocktail* de inibidor de proteases (Sigma Aldrich, P2714-1BTL), seguido de 10 ciclos de 2 min em banho de ultrassom. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga 5418 R®, Eppendorf) a 10000 x g por 15 min e o sobrenadante rico em proteínas solúveis foi coletado. O precipitado foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 a 1 % e 10 % de inibidor de protease (Sigma Aldrich, P2714-1BTL), homogeneizado e submetido a ultrassom de 10 ciclos de 2 min seguido de centrifugação a 10000 x g por 15 min para extração das proteínas de membrana. As amostras com proteínas solúveis e de membrana foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (Sigma-Aldrich) a 12 % (m/v) em condições desnaturantes (Laemmli 1970) em sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). O peso molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o marcador de proteína de referência BLUeye Prestained Protein Ladder® (Sigma). A transferência do gel para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad) foi realizada em tampão de transferência [0,58 % (p/v) de Tris-HCl, 0,28 % (v/v) de glicina, 20 % (v/v) de metanol e água ultra pura] com corrente de 190 A durante 2 horas a 4 °C (Mini Trans-Blot Cell®, Bio Rad). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução salina tamponada (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) com polissorbatos Tween 20® (Synth) a 1 % (TBST) e 3 % de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) durante 16 horas. Após isto, a membrana foi rapidamente lavada com TBST, seguida de três ciclos de lavagens com TBST de 15 min, e depois incubada a 4 °C com anticorpo anti-VgR produzido em camundongo (Dohanik et al. 2018) durante 16 horas. Após lavagem com TBST, a membrana foi incubada a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:100) (Sigma-Aldrich) durante 16 horas. Em seguida, as amostras foram reveladas com

solução de diaminobenzidina 0,1 % (p/v) em 50 mM de Tris-HCl e 20 μ L de H₂O₂ (30 %) por 3 minutos a temperatura ambiente.

Imunofluorescência

As glândulas hipofaríngeas foram transferidas para solução fixadora Microwave [0,5 pt Glutaraldeído (10 %), 20 pt formaldeído (10 %), 2,5 pt CaCl₂ (1 %), 50 pt tampão cacodilato (0,2 M pH 7,4), 27 pt água destilada] (Barbosa et al. 2015) por 2 horas, seguido por cinco lavagens de 10 minutos cada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS). As amostras foram então transferidas para PBS contendo 1 % de Tween-20 (PBST) durante 2 horas e incubadas com anticorpo contra o receptor de vitelogenina anti-VgR produzido em camundongo (Dohanik et al. 2018), vitelogenina anti-Vg produzido em coelho (Azevedo et al. 2011) ou clatrina anti-CI produzido em coelho (abcam®, ab59710) 1:50 em PBS por 16 horas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpos secundários anti-rabbit IgG conjugado com FITC (1:400) ou anti-camundongo IgG conjugada com TRITC (1:200) em PBS durante 2 horas no escuro, seguido por cinco lavagens de 10 minutos em PBS. As glândulas hipofaríngeas foram transferidas para 50 μ L de 4',6'-diamino-2-fenil-indol DAPI® (Thermo Fisher®) por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente para evidenciar o núcleo celular, em seguida lavadas em PBS por cinco vezes a 10 minutos cada lavagem. As glândulas hipofaríngeas das operárias foram montadas em lâminas com solução Mowiol® (Sigma-Aldrich) e analisados em microscópio de fluorescência confocal a laser (Zeiss 510 Meta) utilizando objetiva EC Plan-Naofluar (40x/1,30 Óleo DIC M 27). As imagens foram obtidas com a câmera AxioCam, software LSM 510 Meta (2006).

Controles negativos foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a omissão dos anticorpos primários.

RESULTADOS

A expressão de *AmVgR* foi diferente entre abelhas recém-emergida, nutridora e forrageira, sendo que em operárias nutridoras houve maior expressão em relação a recém-emergidas e forrageiras, porém entre recém-emergidas e forrageiras não houve diferenças na expressão desse gene (Figura 4).

Nas operárias nutridoras com diferentes graus de desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, a expressão de *AmVgR* foi maior nas glândulas hipofaríngeas desenvolvidas que nas pouco desenvolvidas (Figura 5).

Na comparação entre operárias com 11 dias de idade na presença ou ausência da rainha, expressão de *AmVgR* foi maior nas glândulas hipofaríngeas de operárias mantidas em colônias com rainhas que naquelas órfãs (Figura 6).

Extratos proteicos da membrana das glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras e forrageiras e do ovário de rainha de *A. mellifera* (controle positivo) analisados por Western blotting, comprovaram que o receptor de vitelogenina foi reconhecido pelo anticorpo anti-VgR em todas as amostras com a presença de proteína com peso molecular de aproximadamente 200 kDa (Figura 7).

A técnica de imunofluorescência mostrou a presença de VgR na glândula hipofaríngea de operárias nutridoras e forrageiras em pequenas quantidades e dispersas nos ácinos glandulares tanto na superfície quanto no citoplasma (Figura 8).

As análises mostraram colocalização do VgR com a vitelogenina (Vg) em operárias nutridoras (Figura 9) e forrageiras (Figura 10).

A internalização do complexo VgR-Vg ocorreu via endocitose mediada por clatrina, como evidenciado pela colocalização de VgR com a clatrina nas glândulas de operárias nutridoras (Figura 11) e forrageiras (Figura 12).

Todos os controles imunohistoquímicos negativos não apresentaram marcações inespecíficas para os anticorpos testados (Figura 13).

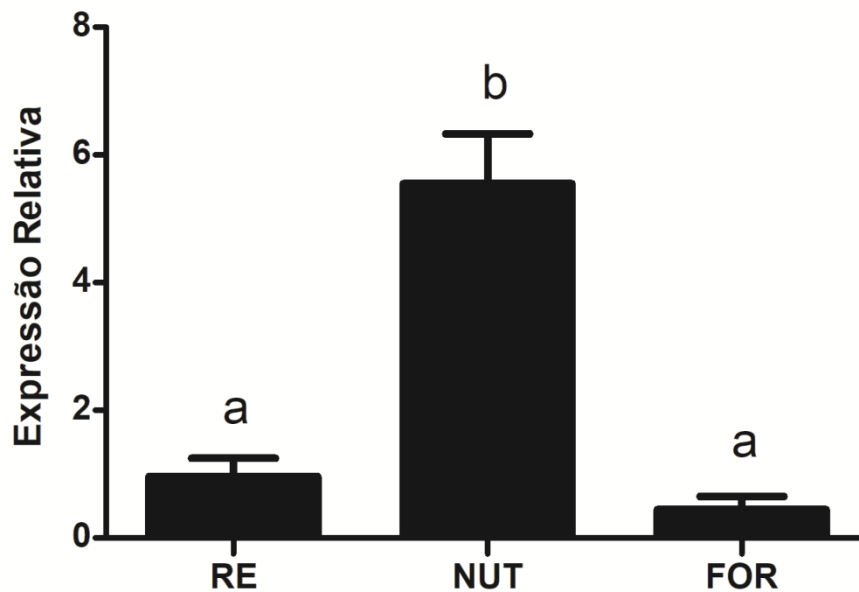


Figura 4: Expressão relativa (média ± erro padrão) de *AmVgR* em operárias recém-emergidas (RE), nutridoras (NUT) e forrageiras (FOR) de *Apis mellifera*. Letras diferentes sobre as colunas mostram diferença estatística entre tratamentos (ANOVA One Way, $\alpha < 0,05$).

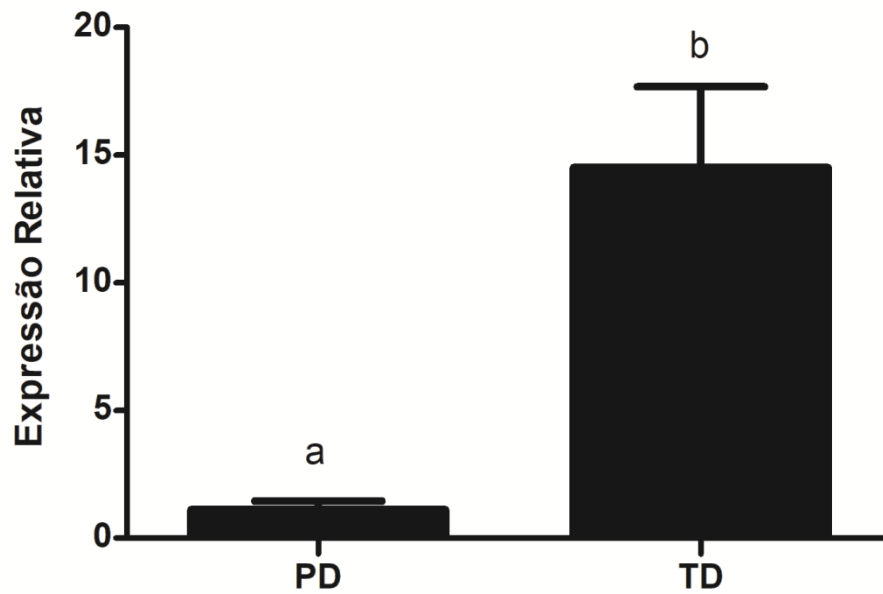


Figura 5: Expressão relativa (média \pm erro padrão) de *AmVgR* em operárias nutridoras de *Apis mellifera* com glândulas hipofaríngeas pouco desenvolvidas (PD) e desenvolvidas (TD). Letras diferentes sobre as colunas mostram diferença estatística (teste t, $p=0,0136$).

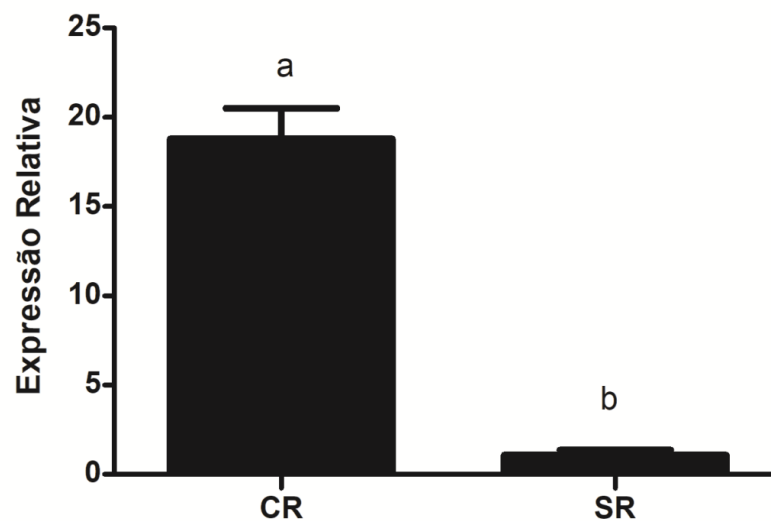


Figura 6: Expressão relativa (média \pm erro padrão) de *AmVgR* em glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras de *Apis mellifera* com 11 dias de idade mantidas em ninhos com rainha (CR) e sem rainha (SR). Letras diferentes sobre as colunas mostram diferença estatística (teste t., $p=0,0005$).

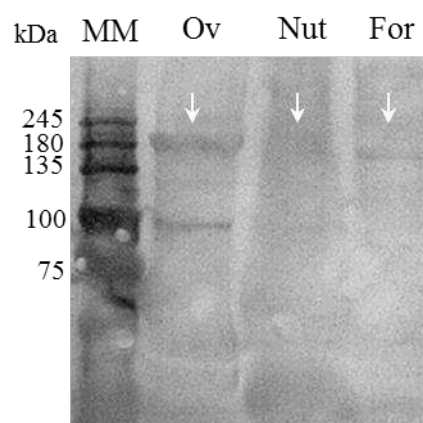


Figura 7: Western blotting dos extratos proteicos dos ovários (Ov) de rainhas e das glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras (Nut) e forrageiras (For) da abelha *Apis mellifera* indicando o receptor de vitelogenina (setas) marcada com anticorpo anti-VgR. MM- marcador de peso molecular.

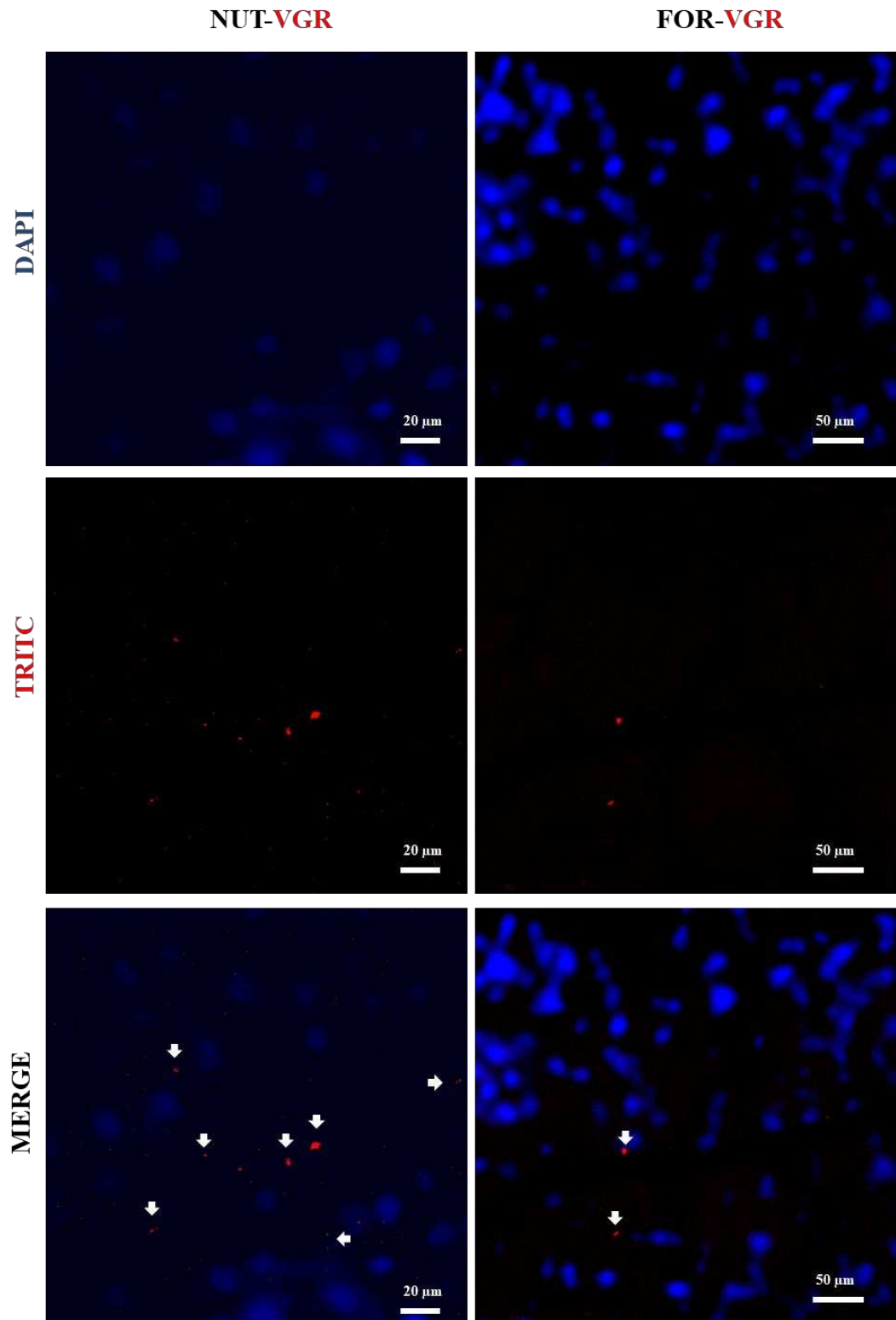


Figura 8: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (VgR) nos ácidos secretores da glândula hipofaríngea (setas) de operárias nutridoras (NUT) e forrageiras (FOR) de *Apis mellifera*. Núcleos celulares em azul.

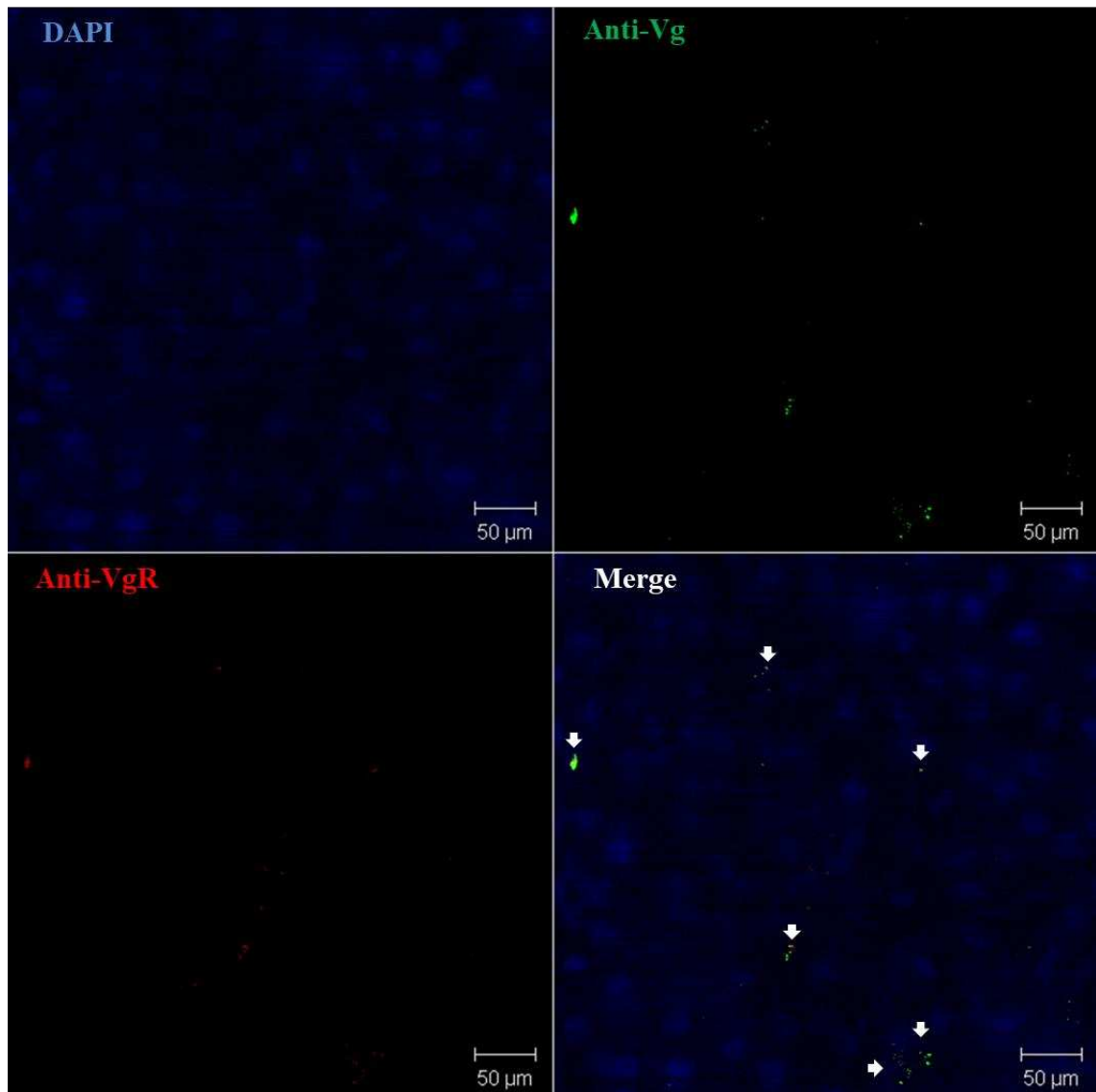


Figura 9: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (anti-VgR), de vitelogenina (anti-Vg) e a colocalização de ambas (setas) na glândula hipofaríngea de operárias nutridoras de *Apis mellifera*. Núcleos celulares em azul.

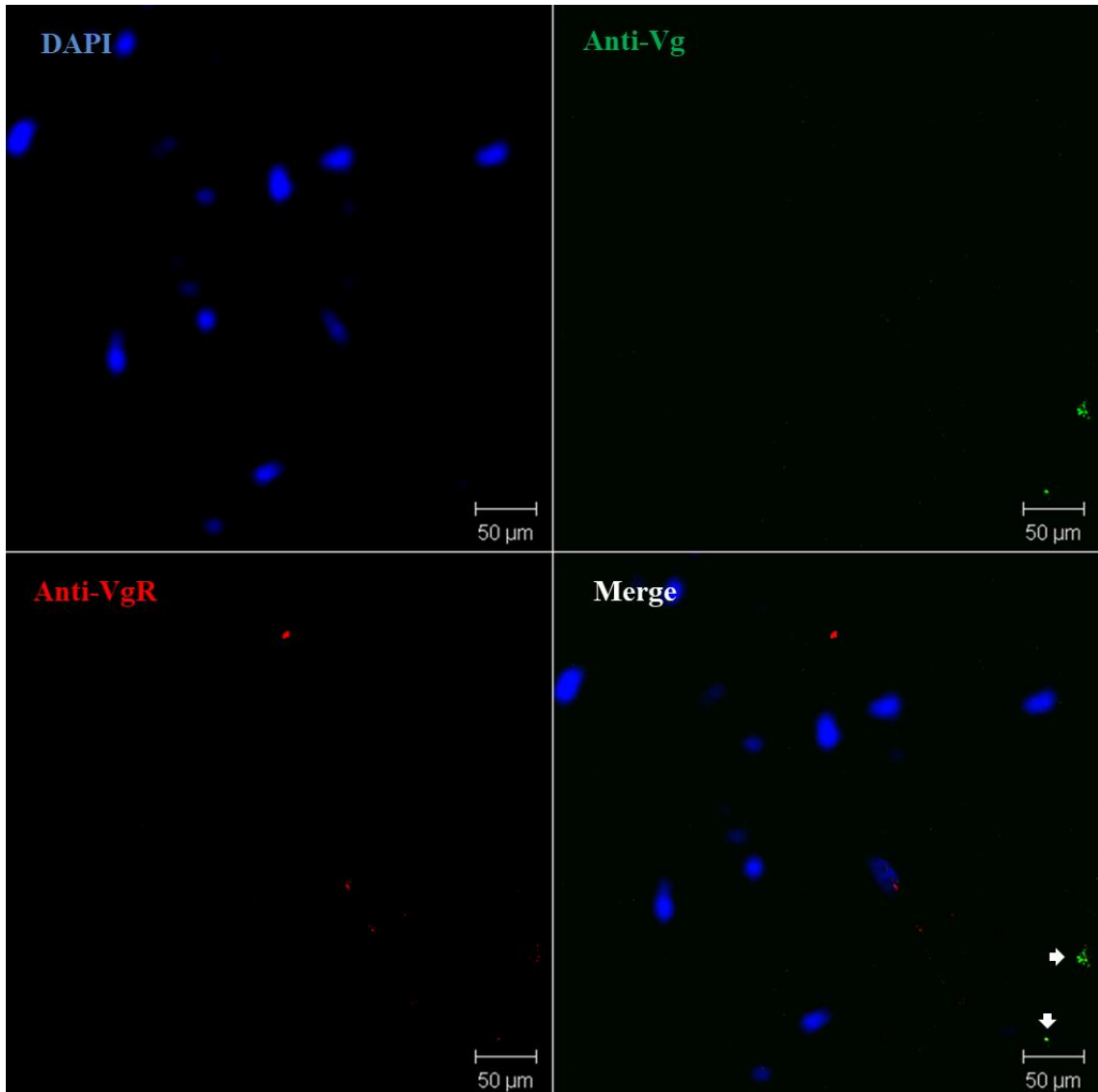


Figura 10: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (anti-VgR), vitelogenina (anti-Vg) e a colocalização de ambas (setas) na glândula hipofaríngea de operárias forrageiras de *Apis mellifera*. Núcleos celulares em azul.

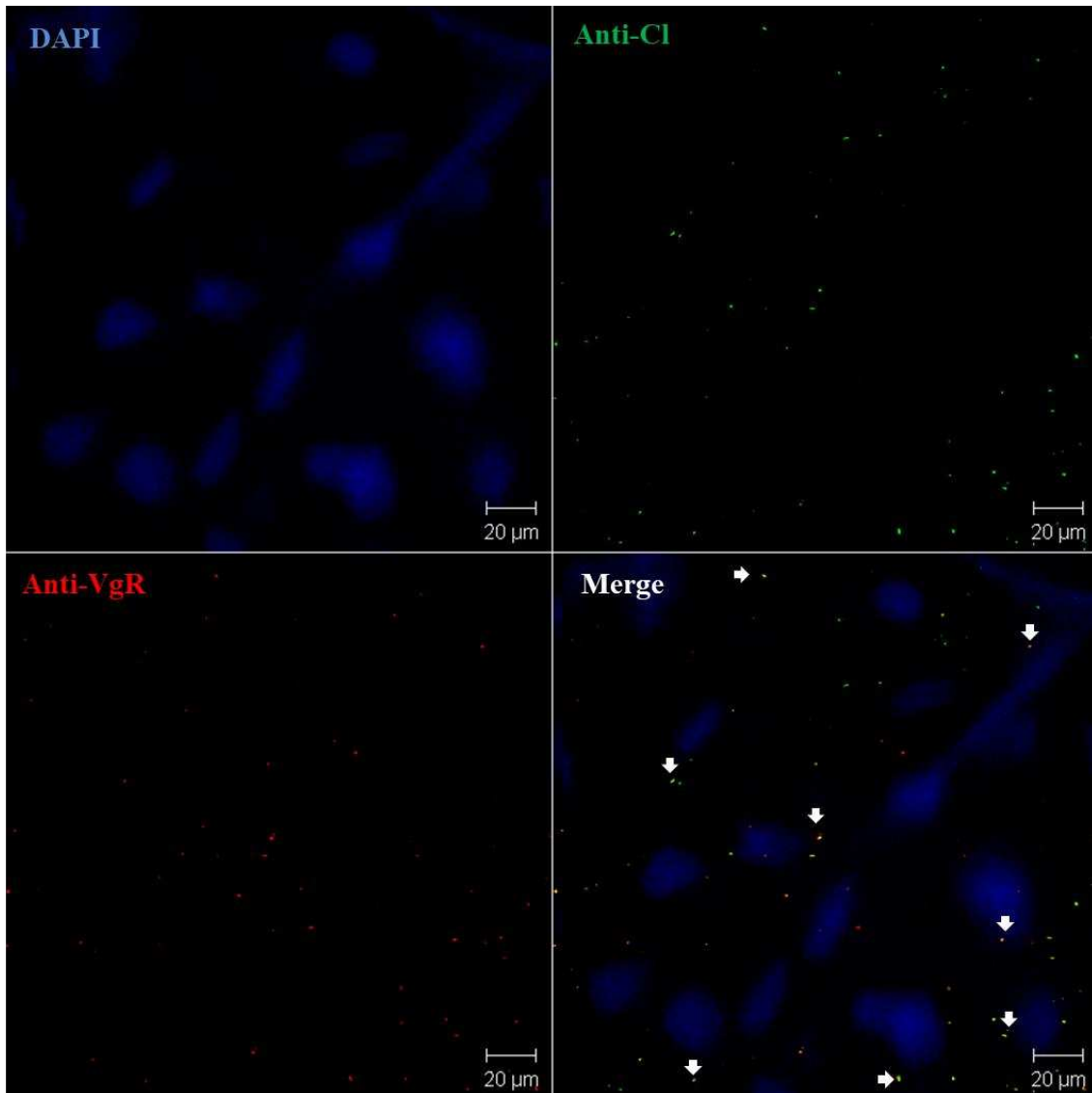


Figura 11: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (anti-VgR), clatrina (anti-Cl) e a colocalização de ambas (setas) na glândula hipofaríngea de operárias nutridoras de *Apis mellifera*. Núcleos celulares em azul.

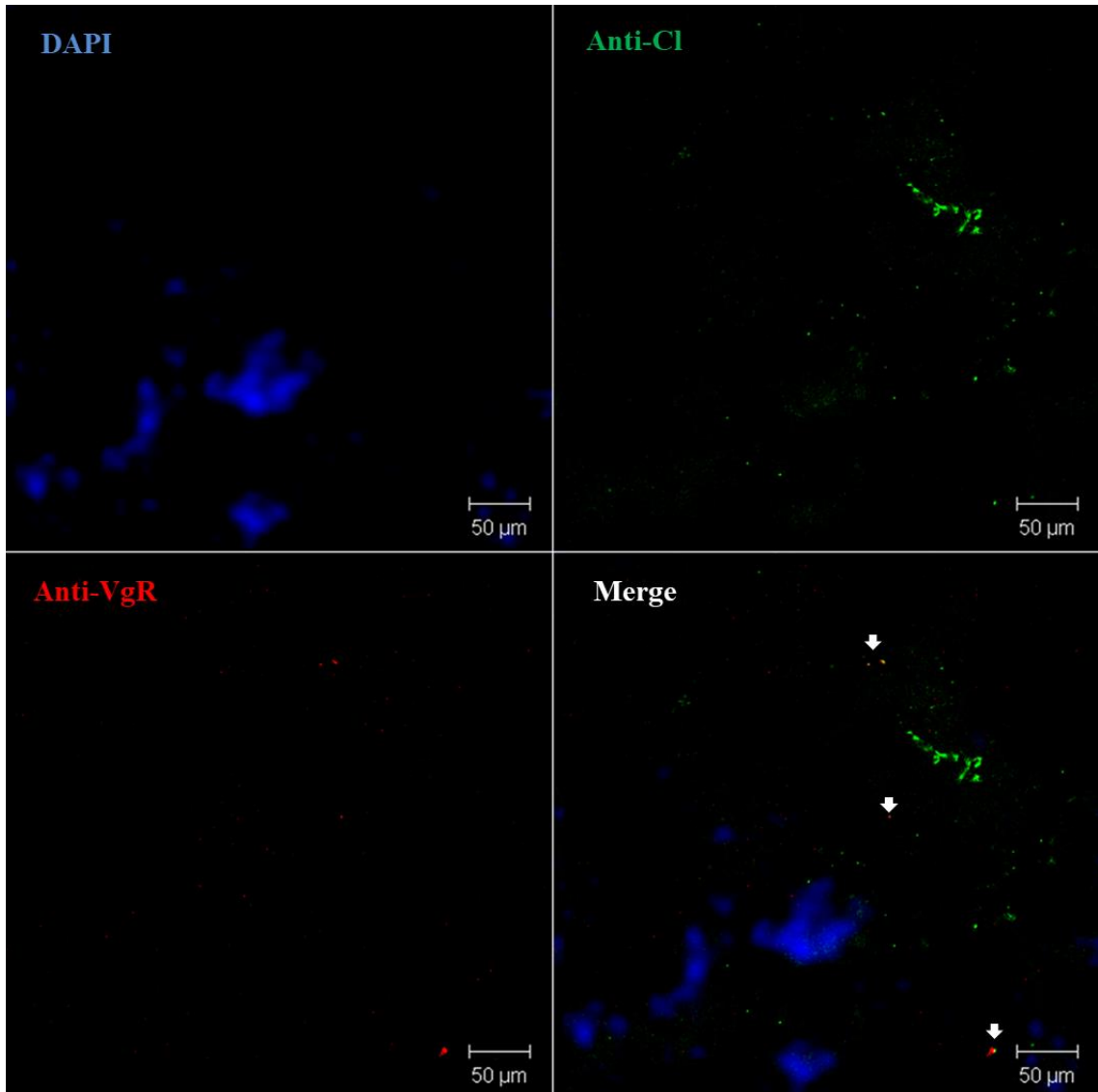


Figura 12: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (anti-VgR), clatrina (anti-Cl) e a colocalização de ambas (setas) na glândula hipofaríngea de operárias forrageiras de *Apis mellifera*. Núcleos celulares em azul.

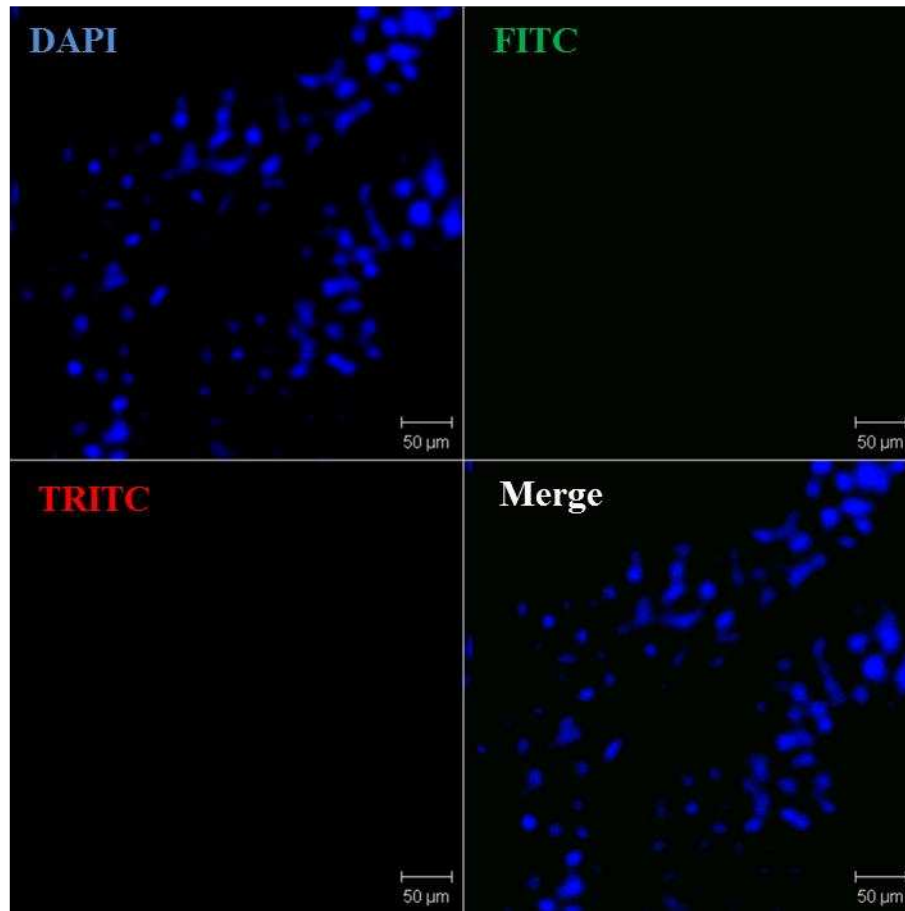


Figura 13: Controle negativo da técnica de imunofluorescência na glândula hipofaríngea de operárias de *Apis mellifera*. Note ausências de marcações com os anticorpos secundários conjugados com FITC e TRITC.

DISCUSSÃO

A ocorrência de mRNA para VgR nas glândulas hipofaríngeas *A. mellifera* foi previamente reportada (Guidugli-Lazzarini et al. 2008), mas este é o primeiro relato demonstrando a presença da proteína e sua ligação com vitelogenina na superfície das células dos ácinos glandulares das glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras. A ocorrência de VgR em tecidos não ovarianos pode estar relacionada a funções pleiotrópicas da vitelogenina na vida social das abelhas, pois ela participa de diversas funções biológicas além da reprodução, como regulação dos títulos de hormônio juvenil e das funções das operárias dentro do ninho (Amdam e Omholt 2002; Guidugli et al. 2005; Amdam et al. 2007; Nelson et al. 2007).

O *AmVgR* tem maior expressão nas glândulas hipofaríngeas de operárias nutridoras que nas recém-emergidas e forrageiras, provavelmente porque esta glândula possui seu maior grau de desenvolvimento nessas operárias e os resultados aqui obtidos mostram maior expressão desse gene em glândulas hipofaríngeas com maior grau de desenvolvimento. A glândula hipofaríngea em abelhas operárias tem origem no estágio de pré-pupa estando formadas em abelhas adultas recém-emergidas, porém não totalmente desenvolvidas neste estágio (Cruz-Landim 1967). Além disso, operárias com 1-3 dias de idade tem baixos títulos de vitelogenina na hemolinfa (Fluri et al. 1982; Amdam et al. 2004b). Assim, a baixa expressão de *AmVgR* em operárias recém-emergidas pode estar associada a baixa funcionalidade da glândula hipofaríngea nos primeiros dias de vida (Deseyn e Billen 2005), necessitando de importação de pequenas quantidades de vitelogenina da hemolinfa. Quando as operárias atingem aproximadamente seis dias idade começam os trabalhos de alimentação e cuidado com a cria, com o máximo desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas para produção de geleia real

para a qual a vitelogenina pode ser uma fonte de aminoácidos (Amdam et al. 2003a), enquanto que em operárias mais velhas, geralmente trabalhando como forrageiras, as glândulas hipofaríngeas estão reduzidas com sinais de degeneração (Cruz-Landim 1967, 2009; Cruz-Landim e Silva de Moraes 1977; Cruz-Landim e Abdalla 2002).

A transição da operária de nutridora para forrageira envolve mudanças alimentares e fisiológicas, associadas a uma queda nos níveis de vitelogenina na hemolinfa e aumento nos títulos de hormônio juvenil (Hartfelder e Engels 1998). Os dados aqui obtidos mostram queda na expressão de *AmVgR* em abelhas forrageiras coletando pólen, sugerindo que pode haver também uma menor captação de vitelogenina nas glândulas hipofaríngeas destas abelhas. Diminuições na quantidade de vitelogenina em forrageiras podem ser devido à necessidade de economia proteica da colônia, pois evitará o acúmulo de proteínas que serão perdidas quando a forrageira morrer no campo (Pinto et al. 2000; Amdam e Omholt 2002).

Durante a obtenção das glândulas hipofaríngeas aqui realizada, foram observadas diferenças no desenvolvimento dessas glândulas em operárias nutridoras e os testes mostram maior expressão de *AmVgR* nas glândulas desenvolvidas em relação àquelas pouco desenvolvidas. As glândulas hipofaríngeas em abelhas se desenvolvem ou regridem de acordo com as mudanças nas várias tarefas dentro do ninho, onde operárias da mesma idade podem executar diferentes atividades e exibir glândulas com diferentes graus de desenvolvimentos (Free 1980; Huang et al. 1994). As operárias não se especializam em tarefas particulares, mas cada uma realiza uma variedade de tarefas, sendo que a atividade tende a mudar à medida que ela se torna mais velha (Free 1980). Assim, os dados aqui obtidos sugerem que quanto maior o desenvolvimento da glândula hipofaríngea, maior é a expressão de *AmVgR* sugerindo que a importação de vitelogenina para as glândulas hipofaríngeas está associada com o desenvolvimento glandular.

Há maior expressão de *AmVgR* em glândulas hipofaríngeas de operárias em colônias com rainha do que em colônias órfãs. Em colônias com rainha há uma especialização de tarefas, onde operárias com glândulas hipofaríngeas desenvolvidas realizam função de nutridoras e não desenvolvem seus ovários, enquanto que, em ninhos órfãos pode ocorrer a coativação destes órgãos, em que as operárias combinam tarefas de forrageio e alimentação da cria com a reprodução, atuando como generalistas de tarefas (Naeger et al. 2013). As rainhas liberam feromônios mandibulares que sinalizam sua presença para as operárias suprimindo a ativação de seus ovários (Ronai et al. 2016) e regulando a expressão de genes reprodutivos como da vitelogenina (Amdam e Omholt 2002; Fischer e Grozinger 2008), sendo que, operárias na ausência de rainha tem alta expressão de *AmVgR* no ovário (Cardoso-Júnior et al. 2019). Assim, na ausência da rainha, operárias podem atuar como generalistas de tarefas, e a necessidade de captação de vitelogenina pela VgR poderia ser dividida, ocorrendo tanto pelas glândulas hipofaríngeas quanto pelos ovários, enquanto que, na presença da rainha, com a inativação dos ovários, *AmVgR* poderia ser mais expresso nas glândulas hipofaríngeas das operárias, suportando a maior expressão de *AmVgR* aqui encontrada em abelhas de colônias onde a rainha está presente.

É importante salientar que os VgRs, membros da família de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), são proteínas transmembrana de superfície celular e possuem a capacidade de se ligarem a diversos ligantes funcionalmente diferentes (Tufail e Takeda 2009), como ocorre com a proteína receptora de vitelogenina de *D. melanogaster* (YI), que pode reconhecer ligantes não relacionados (Schonbaum et al. 1995). Para verificar se o VgR aqui identificado capta vitelogenina para as glândulas hipofaríngeas foi realizada dupla marcação com anticorpos para vitelogenina e VgR, onde foi possível observar que o receptor e seu ligante estão colocalizados, sugerindo que o receptor está de fato relacionado com a

captação da vitelogenina circulante na hemolinfa. Estes resultados estão de acordo com o relatado para VgR de *B. mori*, que se liga e internaliza a vitelogenina, por ligação específica (Han et al. 2017). Sendo assim, a presença de vitelogenina nas glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* pode estar associada com a obtenção de aminoácidos na produção de geleia real, como foi sugerido por Amdam et al. (2003a) ou a outras funções nesta glândula, uma vez que, a presença desta proteína em vacúolos dentro dos ácinos, nos canais excretores e canal axial das glândulas hipofaríngeas foi relatada anteriormente (Seehuus et al. 2007).

As proteínas LDLRs se ligam a seus ligantes na superfície celular em pH neutro formando o complexo receptor-ligante, em seguida este complexo é internalizado através de vesículas revestidas com clatrina, onde o ligante é liberado no endossomo que contém pH mais baixo, então o receptor é reciclado à superfície (Tufail e Takeda 2009). O VgR possui uma região citoplasmática que contém pelo menos uma cópia da sequência do motivo NPXY (Sappington e Raikhel 1998; Tufail e Takeda 2007, 2009) que é necessária para internalização do receptor através de vesículas revestidas de clatrina (Goldstein et al. 1985; Chen et al. 1990). Os resultados aqui obtidos confirmam a endocitose mediada por VgR via poços revestidos por clatrina nas glândulas hipofaríngeas em operárias nutridoras e forrageiras de *A. mellifera*. A internalização de proteínas do vitelo via vesículas revestidas por clatrina foi originalmente descrito em ovócitos de mosquito (Roth e Porter 1964); mais tarde, também foi descrita em células foliculares que revestem os ovócitos de rainhas de *A. mellifera* e da vespa *Polistes simillimus* (Dohanik et al. 2018) e de fêmeas de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera) (Assis et al. 2019). Porém, este é o primeiro relato de internalização de VgR mediado por clatrina em glândulas hipofaríngeas de abelhas, demonstrando que esta internalização pode ocorrer de forma semelhante ao que ocorre nos ovócitos.

Apesar de a presença e expressão de *AmVgR* em glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* já ter sido relatada anteriormente (Guidugli-Lazzarini et al. 2008), este estudo mostra a presença do VgR nos ácinos secretores dessa glândula, a formação do complexo VgR- vitelogenina e a internalização via endocitose mediada por clatrina. Os resultados indicam ainda que há diferenças na expressão de *AmVgR* entre operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras, associada ao grau de desenvolvimento glandular e à presença da rainha. Esses dados fornecem novos conhecimentos para trabalhos futuros sobre a importância da vitelogenina não associada à reprodução para as abelhas.

PARTE 2 – RNA DUPLA FITA DO RECEPTOR DE VITELOGENINA EM GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE *Apis mellifera*

MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas

As abelhas recém-emergidas de *A. mellifera* foram obtidas a partir de diferentes quadros de cria em diferentes ninhos do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Para obtenção de operárias recém-emergidas, os quadros de cria contendo pupas foram transferidos para estufa a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 80 % UR, sendo diariamente observada a emergência das operárias. As abelhas recém-emergidas foram retiradas dos quadros e divididas em quatro coortes com os seguintes tratamentos: a) abelhas sem manipulação; b) abelhas injetadas com 1 μL de água livre de nucleases; c) abelhas injetadas com 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA-GFP e d) abelhas injetadas com 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA-VgR.

As injeções intra-abdominais foram feitas entre o 5° e o 6° esternitos abdominais com microinjetor. Cada coorte foi formada por 10 abelhas acondicionadas em gaiolas de plástico de 500 mL e mantidas a $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 80 % UR. As abelhas foram alimentadas *ad libitum* com mel e pólen obtidos das células de armazenamento de colônias e água. Após seis dias de idade estas operárias foram coletadas. Todas as abelhas foram crio-anestesiadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos e dissecadas em NaCl 125 mM autoclavado para retirada das glândulas hipofaríngeas e dos ovários que foram usados como controle positivo. Cada tratamento foi realizado em triplicata. Uma rainha fisogástrica foi dissecada para obtenção do ovário para produção do dsRNA.

Produção do dsRNA

Os *primers* para a produção do dsRNA VgR foram construídos (E-RNAi Webservice) a partir da sequência do mRNA do receptor de vitelogenina de *Apis mellifera* *AmVgR* (número de acesso no GenBank: XM_016912481.1). As sequências dos *primers* foram adicionadas a sequência do promotor T7 da RNA polimerase (Tabela 1).

Para controle endógeno ou inespecífico, foi utilizado dsRNA GFP (Green Fluorescent Protein, gene codificado pela água viva). As sequências dos *primers* foram adicionadas a sequência do promotor T7 (Tabela 1).

Ovários de rainha fecundada foram dissecadas sob estereomicroscópio (Zeiss), com pinças e vidros autoclavados e lavados com solução RNAase Away (Sigma Aldrich®), para assegurar que as amostras não fossem contaminadas com nucleases. Em seguida os ovários das rainhas de *A. mellifera* foram colocadas em 250 µL de TRI Reagent® (Sigma Aldrich®) e mantidas a -20 °C até a extração do RNA total.

O RNA total foi extraído com TRI Reagent (Sigma Aldrich®), as amostras foram maceradas com pistilos autoclavados, completando o volume final para 500 µL. Foram adicionados 100 µL de clorofórmio, agitados vigorosamente por 15 segundos e encubados a 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas (centrífuga 5418 R, Eppendorf®) a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para novo microtubo e adicionados 250 µL de isopropanol gelado. Após este período as amostras foram mantidas a -20 °C *overnight*. Na etapa seguinte as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado de RNA total foi lavado com 500 µL de etanol 75 % gelado e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi

cuidadosamente retirado e o precipitado foi colocado em banho tipo seco (F452A HB201/202 Bioer®) a 37 °C por 10 minutos e ressuspendido em 20 µL de água livre de nucleases (Promega®). A quantidade de RNA em cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific®) por absorvância em comprimento de onda de 260 nm.

As amostras de RNA de ovário de rainha fecundada de *A. mellifera* foram tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®), conforme as especificações do fabricante (1U/µg de RNA usado). A síntese do cDNA que foi feita usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) segundo orientações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit Platinum PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen) utilizando os primers quiméricos com promotor T7. Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Para GFP foi utilizado um plasmídeo contendo a sequência apresentada no Apêndice 1.

A confecção do RNA dupla fita foi feita utilizando a enzima T7 RNA Polimerase (Promega) (40U), tampão da enzima 5x, 2 µg de cDNA, DL- Dithiothreitol (DTT) (100 mM), Inibidor de RNase (100U) (CellCo), rNTPmix (2,5 mM) completando o volume final para 100 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Em seguida, foram tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®). Para purificação do dsRNA, as amostras foram ajustadas para um volume de 200 µL e adicionados 200 µL de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25/24/1), agitou-se delicadamente e em seguida as amostras foram centrifugadas a 15667 x g por 5 minutos. A fase aquosa da solução foi transferida para novos microtubos e adicionados 20 µL de Acetato de Sódio 3M (pH 5,2), agitou-se por inversão. Concomitantemente, foram adicionados 500 µL de etanol absoluto gelado e deixado a -20 °C *overnight*. As amostras foram centrifugadas a 15667 x g por 20 minutos a -4 °C. O sobrenadante foi eliminado e o pellet foi lavado com 500 µL de etanol (70%), seguido por

centrifugação a $15667 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o pellet seco a temperatura ambiente. Em seguida o pellet foi ressuscitado em 40 μL de água livre de nucleases. A quantidade de dsRNA em cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific®) por absorvância em comprimento de onda de 260 nm para DNA e sua concentração foi corrigida através do cálculo (dsRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = $A_{260} \times 45 \times$ fator de diluição).

PCR quantitativo em tempo real

As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas para avaliar a expressão do gene para receptor de vitelogenina de *A. mellifera* (*AmVgR*) nas glândulas hipofaríngeas de operárias das quatro coortes. Cada pool de amostra biológica continha cinco pares de glândulas hipofaríngeas e em outra cinco pares de ovários para cada triplicata biológica

Extração de RNA

Foram utilizadas de 5 pares de glândulas hipofaríngeas em cada amostra. As glândulas hipofaríngeas foram dissecadas sob estereomicroscópio (Zeiss), com pinças e vidros autoclavados e lavados com solução RNAase Away (Sigma Aldrich®), para assegurar que as amostras não fossem contaminadas com nucleases. Em seguida as glândulas hipofaríngeas das operárias de *A. mellifera* foram colocadas em 250 μL de TRI Reagent® (Sigma Aldrich®) e mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do RNA total.

O RNA total foi extraído com TRI Reagent (Sigma Aldrich®), as amostras foram maceradas com pistilos autoclavados, completando o volume final para 500 μL . Foram adicionados 100 μL de clorofórmio, agitados vigorosamente por 15 segundos e encubados a 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas (centrífuga 5418

R, Eppendorf®) a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para novo microtubo e adicionados 250 µL de isopropanol gelado. Após este período as amostras foram mantidas a -20 °C *overnight*. Na etapa seguinte as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado de RNA total foi lavado com 500 µL de etanol 75 % gelado e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o precipitado foi colocado em banho tipo seco (F452A HB201/202 Bioer®) a 37 °C por 10 minutos e ressuspenso em 20 µL de água livre de nucleases (Promega®). A quantidade de RNA em cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop lite (Thermo Scientific®) por absorvância em comprimento de onda de 260 nm.

Síntese de cDNA

Todas as amostras de RNA foram tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®), conforme as especificações do fabricante (1U/µg de RNA usado). A síntese do cDNA que foi feita usando a enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific®). Em um tubo esterilizado foram adicionados 1 µg de RNA total extraído das glândulas hipofaríngeas, 0,5 µL de oligo dT primer (1 µg/µL) e água livre de nucleases para completar 12,5 µL. A cada amostra foi adicionado 4 µL de tampão da enzima, 0,5 µL de Inibidor de RNase (20U) (Cellco®), dNTPmix 2 µL (1 mM), 1 µL enzima RevertAid Reverse Transcriptase, as amostras foram incubadas a 42 °C durante 60 minutos, seguida por incubação de 10 minutos a 70 °C . O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite® (Thermo Scientific) a 260 nm. Em seguida, a integridade do cDNA foi observada em gel de agarose a 2%, corrida a 80V.

qPCR

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando o kit de quantificação de fluorescência (SYBR Green) GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) no sistema real time PCR Rotor-Gene Q (Qiagen). A montagem das *strips Tubes* foi realizada utilizando, aproximadamente, 25 ng do cDNA e 0,1 μ M de cada primer para *AmVgR* (XM_016912481.1) (Guidugli-Lazzarini et al. 2008) e o *RpL32* (= *Rp49* XM_006564315.2) como controle endógeno previamente estabelecido (Lourenço et al. 2008) (Tabela 2). Os *primers* foram confeccionados pela Integrated DNA Technologies (IDT). Os níveis relativos de expressão de *AmVgR* nas glândulas hipofaríngeas foram comparados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen 2001; Yuan et al. 2006).

Análise Estatística

Os dados de expressão gênica pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram testados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk Normality e submetidos aos testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey, todos com 5% de significância no programa GraphPad Prism 5.

Tabela 2- *Primers* utilizados nos testes de qPCR e para produção de RNA dupla fita (promotor T7 sublinhado)

Gene	Número de acesso (NCBI)	<i>Primers</i>	Referência
<i>AmVgR</i>	XM_016912481.1	F: TGAACCTTACGACATTGCCCT R: TGTGATTTTCGGTCCAAGCCC	Guidugli-Lazzarini et al., 2008
<i>RpL32</i>	XM_006564315.2	F: CCCATAACGTTCTATCTGTGGCA R: CTCGTCATATGTTGCCAACTGG	Lourenço et al., 2008
dsRNA-VgR	XM_016912481.1	F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTGTTTTGGGAAACAATG</u> R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGTGGGTGCAATTCATTCTCT</u>	
dsRNA-GFP		F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGCATGGCCAACACTTGTC</u> R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGCGGCCATGATGTATACGTTG</u>	

Imunofluorescência

As glândulas hipofaríngeas foram transferidas para solução fixadora Microwave [0,5 pt Glutaraldeído (10%), 20 pt formaldeído (10%), 2,5 pt CaCl_2 (1%), 50 pt tampão cacodilato (0,2 M pH 7,4), 27 pt água destilada] (Barbosa et al. 2015) por 2 horas, seguido por cinco lavagens de 10 minutos cada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS). As amostras foram então transferidas para PBS contendo 1 % de Tween-20 (PBST) durante 2 horas e incubadas com anticorpo contra o receptor de vitelogenina anti-VgR produzido em camundongo (Dohanik et al. 2018) (1:50) em PBS por 16 horas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma-Aldrich) (1:200) em PBS durante 16 horas no escuro, seguido por cinco lavagens de 10 minutos em PBS. As glândulas hipofaríngeas das operárias foram montadas em lâminas com solução Mowiol® (Sigma-Aldrich) e analisados em microscópio de fluorescência confocal a laser (Zeiss 510 Meta) utilizando objetiva EC Plan-Neofluar (20x/0,50 e 40x/1,30 Óleo DIC M 27). As imagens foram obtidas com a câmera AxioCam, software LSM 510 Meta (2006).

Controles negativos foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a omissão do anticorpo primário.

Histologia

As operárias nos diferentes tratamentos tiveram suas glândulas hipofaríngeas dissecadas e transferidas para solução fixadora de Zamboni por 4 horas. A seguir, as glândulas foram desidratadas em série crescente de etanol e embebidas em historesina (Leica). As amostras foram seccionadas a 3µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas e fotografadas ao microscópio de luz Olympus BX220 60 com objetiva de 20x e 40x, acoplado

a um sistema de captura de imagens Q Color 3 Olympus. As imagens foram tratadas usando Photoshop cs6.

RESULTADOS

A expressão do gene *AmVgR* das glândulas hipofaríngeas de abelhas com seis dias de idade que foram injetadas com dsRNA-VgR e dsRNA-GFP foi semelhante entre si, mas ambas foram menores que no controle com água (Figura 14).

Para confirmar se o dsRNA-VgR na concentração injetada e pelo tempo de exposição não foi funcional, os ovários destas operárias foram analisados para a expressão de *AmVgR*, não havendo alteração significativa na expressão para este gene (Figura 15).

Para avaliar se houve mudança na expressão desta proteína após a injeção do dsRNA, a detecção do VgR por imunofluorescência não apresentou diferenças entre operárias injetadas com dsRNA-GFP (Figura 16) e dsRNA-VgR (Figura 17). O controle negativo não apresentou marcações inespecíficas para o anticorpo testado (Figura 18).

Por fim, para avaliar se VgR estava funcionalmente ligado ao desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera*, foi analisada a morfologia da glândula hipofaríngea após tratamento com dsRNA-VgR e dsRNA-GFP. A glândula hipofaríngea mostrou células com núcleo com cromatina descondensada e citoplasma rico em vacúolos em ambos os tratamentos, assim como no controle (Figura 19).

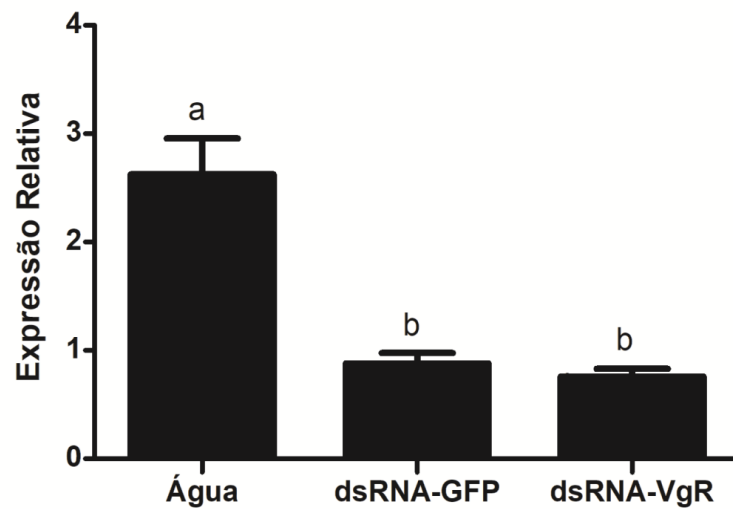


Figura 14 Expressão relativa de *AmVgR* em glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* com seis dias de idade tratadas com água, dsRNA-GFP e dsRNA-VgR. Letras diferentes sobre as colunas mostram diferenças estatísticas entre tratamentos (ANOVA One Way, $\alpha < 0,05$).

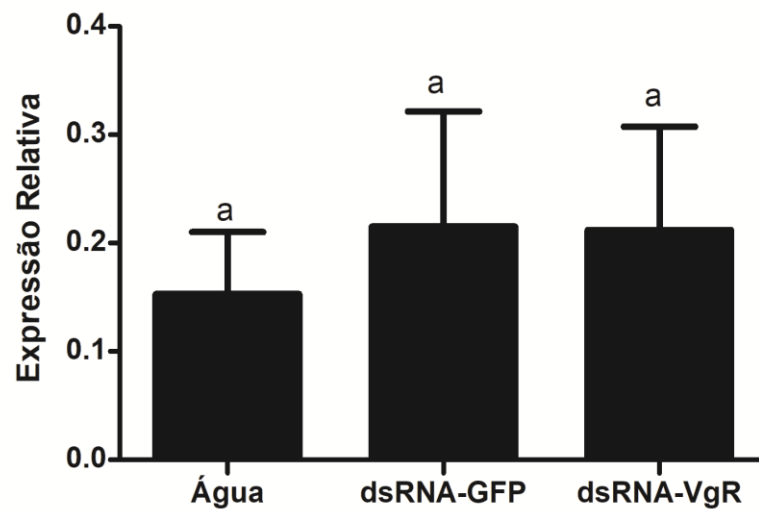


Figura 15: Expressão relativa de *AmVgR* em ovários de operárias de *Apis mellifera* com seis dias de idade tratadas com água, dsRNA-GFP e dsRNA-VgR. Letras diferentes sobre as colunas mostram diferenças estatísticas entre tratamentos (ANOVA One Way, $\alpha > 0,05$).

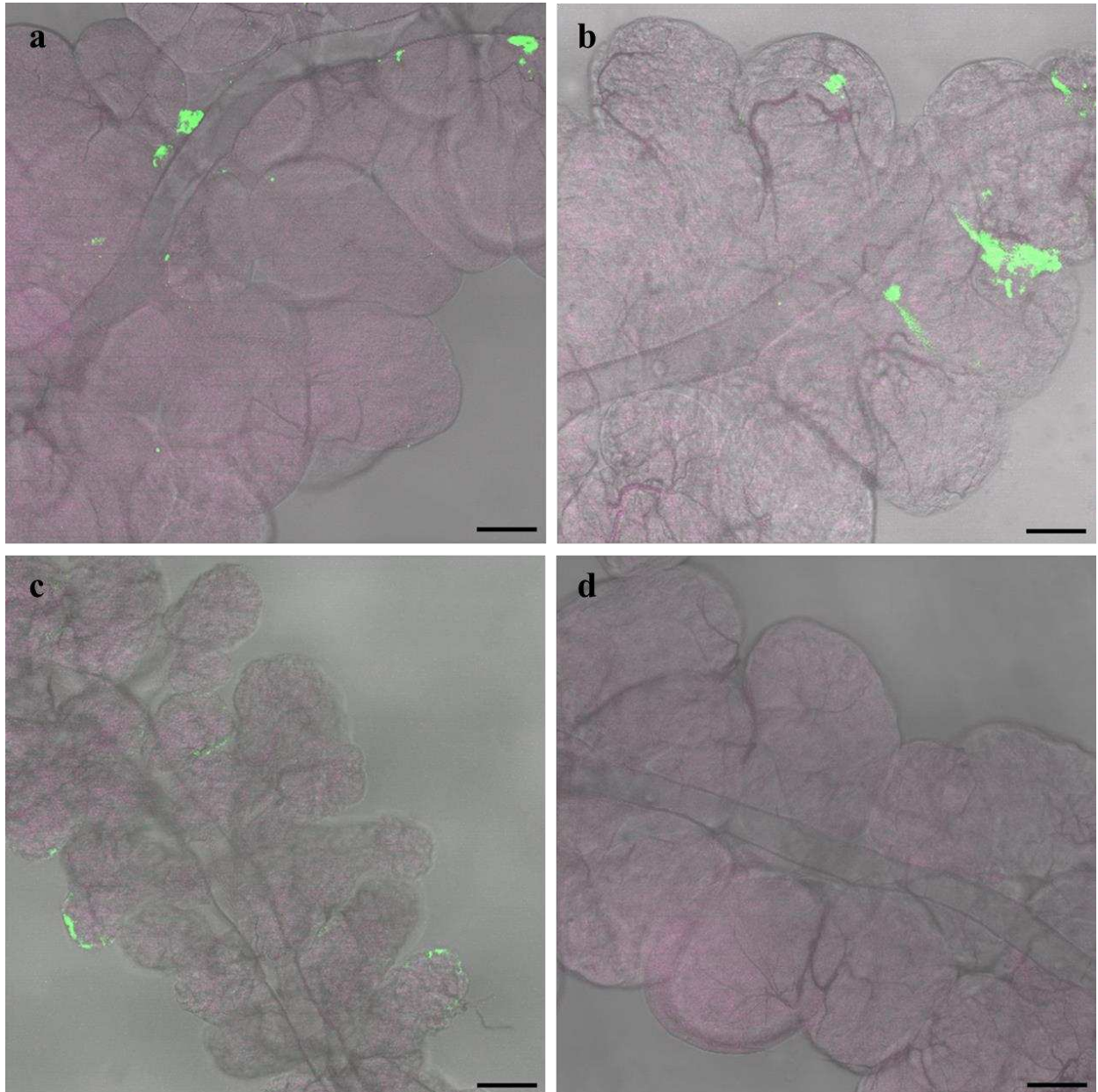


Figura 16: Imunofluorescência mostrando a presença do receptor de vitelogenina (em verde) em ácidos da glândula hipofaríngea de operárias de *Apis mellifera* com seis dias de idade submetidas ao tratamento de injeções com a) 1 µL de água livre de nucleases; b) 2 µg/µL de dsRNA-GFP; c) 2 µg/µL de dsRNA-VgR; d) Controle. Barras = 50 µm.

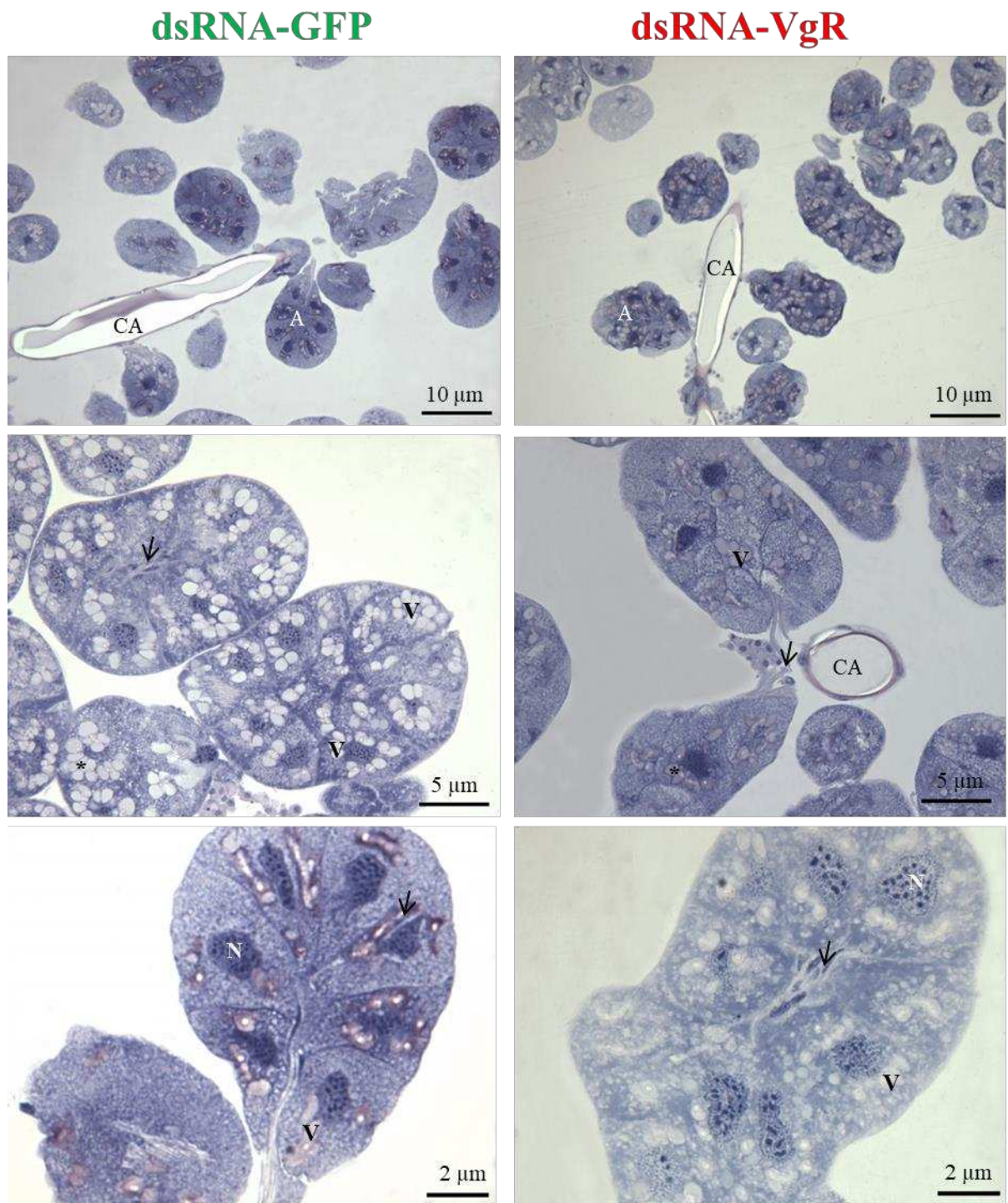


Figura 17: Micrografias de luz mostrando a glândula hipofaríngea de operárias de *Apis mellifera* com seis dias de idade submetidas ao tratamento de injeções com aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de dsRNA-GFP (esquerda) e dsRNA-VgR (direita). CA- Canal Axial; A- Ácinos; N- Núcleo; setas- canaliculos; V- vácuolos.

DISCUSSÃO

A expressão do gene *VgR* é conhecida nos ovários de insetos (Schonbaum et al. 2000; Sappington et al. 1998; Chen et al. 2004; Ciudad et al. 2006; Shu et al. 2011; Lin et al. 2015; Zhang et al. 2016; Du et al. 2019), entretanto também foi detectada em outros tecidos incluindo as glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* (Guidugli-Lazzarini et al. 2008). Os vários padrões de expressão dos genes *VgR* em diferentes tecidos podem estar relacionados ao seu ligante, a vitelogenina e sua influência em vários aspectos da fisiologia e reprodução, Amdam et al. (2003a) sugerem que a vitelogenina poderia ser doadora de aminoácidos para produção de geleia real nas glândulas hipofaríngeas de abelhas. Estes dados serviram de estímulo para o presente estudo sobre a expressão gênica do receptor de vitelogenina e sua importância para o desenvolvimento e função das glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera*. Para tanto foi utilizada a técnica de interferência por RNA que é uma ferramenta específica para determinar, com eficiência, as funções dos genes (Hannon 2002) e para controlar a expressão gênica no nível do mRNA (Fire et al. 1998).

Os resultados obtidos indicam que o dsRNA utilizado não teve efeito na inibição da expressão do *AmVgR* nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera*. Este estudo usou a injeção intra-abdominal com dsRNA para explorar as funções do *AmVgR in vivo* em abelhas recém-emergidas, metodologia que tem sido reportada como eficaz em abelhas adultas (Amdam et al. 2003b). A não eficácia observada nesse estudo pode ser devido à absorção do dsRNA-VgR pelo corpo gorduroso, impedindo que este circule na hemolinfa e seja entregue a outros órgãos ou tecidos da abelha adulta. Quando o dsRNA é injetado, o corpo gorduroso é exposto e este desempenha um papel imunológico que inclui a captação de macromoléculas potencialmente prejudiciais da hemolinfa (Bulet et al. 1999). Por outro lado,

dsRNA injetado pode ser processado em pequenos RNA de interferente (siRNA) ou outro sinal móvel que é exportado para a hemolinfa (Boutla et al. 2002). Nesse sentido, o corpo gorduroso agiria como um intermediário no silenciamento que provavelmente poderiam ser mais facilmente absorvidos por outros tecidos (Amdam et al. 2003b), porém a quantidade injetada pode ser um ponto chave. Nesse estudo, foi injetado 2 µg de dsRNA em cada abelha recém-emergida. Para o silenciamento do gene para vitelogenina em abelhas foram necessários 5 µg de dsRNA (Amdam et al. 2003b; Du et al. 2019) enquanto que em *Colaphellus bowringi* (Coleoptera) 1 µg de dsRNA reduz em 78% na expressão do gene (Liu et al. 2019) e em *Agasicles hygrophila* (Coleoptera) 0,1 µg de dsRNA-VgR inibe a ativação do ovário (Zhang et al. 2019). Assim, são necessários mais testes com diferentes concentrações de dsRNA-VgR ou até mesmo administrar mais de uma vez o dsRNA com intervalos entre as injeções para avaliar o possível efeito deste no silenciamento do gene nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera*.

Uma alternativa para exposição dsRNA seria ingestão oral dessa molécula. O dsRNA suprido pela alimentação é retirado do sistema digestivo e disseminado sistemicamente através da hemolinfa associada a um complexo proteico sendo detectado por até 14 dias após a última alimentação (Maori et al. 2019). Operárias alimentadas com dsRNA-GFP tem a transferência deste para geleia real fornecida para larvas (Maori et al. 2019), indicando que ele é absorvido pelas glândulas hipofaríngeas. As abelhas adultas trocam alimentos por trofolaxia, e todas as abelhas em uma colmeia são consideradas como tendo um "estômago compartilhado" (Winston 1987). Se em abelhas injetadas com dsRNA o efeito for semelhante, é possível que houvesse troca de dsRNA por trofolaxia entre as abelhas recém-emergidas que foram injetadas, uma vez que nesse estudo não havia favos de cria e presença da rainha na

coorte, gerando assim um efeito de transferência entre as abelhas, mesmo naquelas em que o dsRNA teria sido degradado antes de chegar no alvo.

Os efeitos do RNAi dependem do estágio da vida do organismo alvo, da concentração do gene alvo e do período de análise. De um modo geral, a análise do mRNA em intervalos de 24 a 96 horas após a transfecção do dsRNA com diminuição de 70 a 95% de expressão do mRNA alvo (Pereira 2013). Nesse estudo foi injetado o dsRNA em abelhas recém-emergidas, uma vez que neste estágio ocorre baixa expressão de *AmVgR* (ver parte 1), seguido de detecção de após 6 dias (144 horas), pois com essa idade as operárias estão exercendo a função de nutridoras e suas glândulas hipofaríngeas atingem grau máximo de desenvolvimento (Cruz-Landim e Abdalla 2002; Deseyn e Billen 2005). Assim, o longo período entre a transfecção do dsRNA e a análise pode ter acarretado a degradação da dupla fita de RNA. Por outro lado, Amdam et al. (2003b) reportam que o dsRNA injetado em abelhas adultas permanece por 15 dias. No besouro *A. hygrophila* a expressão de *VgR* diminui após o tratamento com dsVgR por cerca de 25 dias após a injeção (Zhang et al. 2019). A alta eficiência de silenciamento gênico do dsRNA também tem sido reportada em outras espécies, como na formiga *Solenopsis invicta* (Lu et al. 2009) e nos besouros *Tribolium castaneum* (Arakane et al. 2005), *Leptinotarsa decemlineata* (Shi et al. 2016) e *Diabrotica virgifera* (Camargo et al. 2018).

É importante salientar que uma redução nos níveis de mRNA pode não resultar em redução imediata nos níveis da proteína. O RNAi apenas impede indiretamente a síntese de novas proteínas codificadas pelo gene alvo, ou seja, as proteínas pré-existentes continuam a exercer suas funções biológicas até que sejam degradadas (Pereira 2013). Uma proteína de vida-média longa, como é o caso do receptor de vitelogenina, que é um membro da superfamília de LDLR e passa pelo processo de reciclagem de receptor (Brown e Goldstein 1985) requer uma

janela de tempo maior para ser efetivamente silenciada, de modo que uma diminuição ou depleção total dos níveis da proteína alvo possam ser alcançadas somente 96-120 horas após a transfecção. Entretanto, uma pequena redução nos níveis proteicos não implica em alterações fenotípicas (Pereira 2013). Nos resultados aqui obtidos não ocorrem alterações na detecção do receptor de vitelogenina por imunofluorescência e nem na morfologia da glândula, sugerindo que o dsRNA exógeno pode não estar efetivamente interrompendo a expressão de VgR nessa glândula de *A. mellifera*.

Além dos fatores citados acima, outro fator que influencia o sucesso, a aplicabilidade e a eficiência do RNAi é a escolha do gene, seu tamanho e a região da sequência do dsRNA utilizados, visando garantir a estabilidade da molécula até atingir o mRNA alvo de silenciamento no inseto (Yu et al. 2013; Rodrigues e Figueira 2016). Talvez seria interessante reavaliar a sequência escolhida do dsRNA-VgR neste estudo. Assim, a sensibilidade e a resposta ao tratamento de RNAi é variável para cada espécie de inseto, devido a características fisiológicas, habitats de vida, mecanismos de alimentação e digestão, ou vias metabólicas, sendo necessária a otimização da técnica para cada espécie alvo (Yang e Han 2014).

Durante a pesquisa, não foi possível identificar a razão da falha do silenciamento e conseqüentemente a função do gene-alvo no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas de abelhas. Este estudo examinou a função do VgR em abelhas operárias com seis dias de idade transfectadas com 2 µg de dsRNA-VgR, sendo que análises com diferentes períodos de tempo e concentrações de dsRNA podem resultar em maior eficácia no silenciamento de *AmVgR*.

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo mostra que o *AmVgR* é diferencialmente expresso nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *A. mellifera*, com maior expressão em operárias nutridoras, na presença da rainha e quando estão com as glândulas desenvolvidas. Além disso, foi demonstrado que a proteína VgR ocorre nos ácinos secretores dessa glândula, formando complexo com a vitelogenina, qual é internalizado via endocitose mediada por clatrina. Estes resultados contribuem para a compreensão de como ocorre a captação da vitelogenina presente na hemolinfa pelo do receptor de vitelogenina. Por fim, mostramos que uso de dsRNA-VgR para o silenciamento gênico precisa de estudos adicionais para definir o modo de transfecção, a concentração da dupla fita de RNA e o tempo de exposição para uma efetiva resposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amdam GV, Nilsen K-A, Norberg K, et al (2007) Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. *Am Nat* 170: 37–46.
- Amdam GV, Norberg K, Page RE, et al (2006) Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 169: 201–205.
- Amdam GV, Omholt SW (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. *J Theor Biol* 223: 451–464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8).
- Amdam GV, Omholt SW (2002) The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J Theor Biol* 216: 209–228. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.2545>.
- Amdam G V., Norberg K, Fondrk MK, Page RE (2004a) Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11350–11355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403073101>.
- Amdam G V., Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003a) Social exploitation of vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1799–1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>.
- Amdam G V., Simões ZLP, Guidugli KR, et al (2003b) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol* 3: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-1>.
- Amdam G V., Norberg K, Fondrk MK, Page RE (2004a) Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11350–11355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403073101>.

- Amdam G V., Simões ZLP, Hagen A, et al (2004b) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp Gerontol* 39: 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.02.010>.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer K, et al (2005) The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol Biol* 14: 453–463. [10.1111/j.1365-2583.2005.00576.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00576.x).
- Assis MQ, Dohanik VT, Oliveira LL De (2019) Evidence for a transcellular route for vitellogenin transport in the telotrophic ovary of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Sci Rep* 9: 16441. [10.1038/s41598-019-52789-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-52789-z).
- Azevedo DO, Zanuncio JC, Serrão JE (2011) Temporal variation of vitellogenin synthesis in *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae) workers. *J Ins Physiol* 57: 972–977. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.015>.
- Barbosa P, Berry D, Kary C (2015) *Insect histology: practical laboratory techniques*. First edition. Willey Blackwell p348.
- Barchuk AR, Bitondi MMG, Simões ZLP (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J Insect Sci* 2: 1–8. <https://doi.org/10.1673/031.002.0101>.
- Barr PJ (1991) Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* 66: 1–3. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90129-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90129-M).
- Boutla A, Kalandtidis K, Tavernarakis N, et al (2002) Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res* 30: 1688–1694. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1688>.
- Brown MS, Goldstein JL (1985) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47.

- Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23: 329–344.
- Calderone NW (2012) Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture : Trend analysis of aggregate data for the period 1992 – 2009. *PLoS One* 7: 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>.
- Camargo C, Wu K, Fishilevich E, et al (2018) Knockdown of RNA interference pathway genes in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, identifies no fitness costs associated with Argonaute 2 or Dicer-2. *Pestic Biochem Physiol* 148: 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.004>.
- Cardoso-Júnior CAM, Guidugli-Lazzarini KR, Hartfelder K (2018) DNA methylation affects the lifespan of honey bee (*Apis mellifera L.*) workers – Evidence for a regulatory module that involves vitellogenin expression but is independent of juvenile hormone function. *Ins Biochem Mol Biol* 92: 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.11.005>.
- Cardoso-Júnior CAM, Oldroyd BP, Ronai I (2019) Vitellogenin expression in the ovaries of adult honeybee workers provides insights into the evolution of reproductive and social traits. *BioRxiv*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101/547760>.
- Chen JS, Sappington TW, Raikhel AS (1997) Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J Mol Evol* 44: 440–451. <https://doi.org/10.1007/PL00006164>.
- Chen ME, Lewis DK, Keeley LL, Pietrantonio P V. (2004) cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Ins Mol Biol* 13: 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00477.x>.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic

tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265: 3116–3123.

Cho KH, Raikhel AS (2001) Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Ins Mol Biol* 10: 465–474. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00285.x>.

Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X (2006) Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. *FEBS J* 273: 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05066.x>.

Colonello-Frattini NA, Guidugli-Lazzarini KR, Simões ZLP, Hartfelder K (2010) Mars is close to venus - Female reproductive proteins are expressed in the fat body and reproductive tract of honey bee (*Apis mellifera* L.) drones. *J Ins Physiol* 56: 1638–1644. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.008>.

Corona M, Velarde R a, Remolina S, et al (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7128–7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>.

Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, et al (1992) Pollen Consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*) dependence on individual age and function. *J Ins Physiol* 38: 409–419. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V).

Cruz-Landim C (2009) *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. Editora Unesp, São Paulo.

Cruz-Landim C (2000) Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): The effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genet Mol Biol* 23: 83–88.

Cruz-Landim C (1967) Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hym., Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. *Arq Zool* 15: 177–290.

- Cruz-Landim C, Abdalla FC (2002) Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto, SP
- Cruz-Landim C, Costa RAC (1998) Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. *J Comp Biol* 3: 151–163.
- Cruz-Landim C, Hadek R (1969) Ultrastructure of *Apis mellifera* hypopharyngeal gland. In: VI Congresso IUSSI, Bern. Proc. Congresso IUSSI, pp 121–130.
- Cruz-Landim C, Mello MLS (1967) The Post-embryonic Changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym. Apoidea) II. Development of the salivary glands system. *J Morphol* 123: 481–502. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051230410>.
- Cruz-Landim C, Silva de Moraes RLM (1994) Ultrastructural localization of new exocrine glands in legs of social Apinae (Hymenoptera) workers. *J Adv Zool* 15: 60–67.
- Cruz-Landim C, Silva de Moraes RLM (1977) Estruturas degenerativas nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* (Apidae). *Rev Bras Biol* 37: 681–692.
- Deseyn J, Billen J (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36: 9–57. <https://doi.org/10.1051/apido:2004068>.
- Dhadialla TS, Hays AR, Raikhel AS (1992) Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Ins Biochem Mol Biol* 22: 803–816.
- Dohanik VT, Gonçalves WG, Oliveira LL, et al (2018) Vitellogenin transcytosis in follicular cells of the honeybee *Apis mellifera* and the wasp *Polistes simillimus*. *Protoplasma* 255 : 1703–1712. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1260-y>.
- Du L, Wang M, Li J, et al (2019) Characterization of a vitellogenin receptor in the bumblebee, *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera, Apidae). *Insects* 10: <https://doi.org/10.3390/insects10120445>.
- Engelmann F (1979) Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in

vitellogenesis. New York.

Engels W (1974) Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social hymenoptera. *Am Zool* 14: 1229–1237. <https://doi.org/10.1093/icb/14.4.1229>.

Engels W, Kaatz H, Zillikens A, et al (1990) Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. *Elsevier Sci Publ BV (Biomedical Div)* 5: 495–502

Fire A, Xu S, Montgomery M, et al (1998) Potent and specific genetic interference by RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>.

Fischer P, Grozinger CM (2008) Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 95: 723–729. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0378-8>.

Fluri P, Luscher M, Wille H, Gerig L (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J Ins Physiol* 28: 61–68.

Free JB (1980) *A Organização Social das Abelhas*. EPU- EDUSP, São Paulo.

Furquim K, Camargo-Mathias MI, de Moraes R (2004) Morphological modifications induced by an artificial diet on the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) during their degenerative process. *Sociobiology* 43: 279–293.

Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, et al (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339: 1608–1611. <https://doi.org/10.1126/science.1230200>.

Giogi F (1979) In vitro induced pinocytotic activity by a juvenile hormone analogue in oocytes of *Drosophyla melanogaster*. *Cell Tiss Res* 203: 241–247.

Goldstein JL, Brown MS (1974) Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 249: 5153–5162.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.09.003>.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, et al (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL Receptor System. *Annu Rev Cell Biol* 1: 1–39.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1–16. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

Gracioli LF, Silva de Moraes RLM (2002) Juvenile hormone promotes changes in the expression of hypopharyngeal gland proteins of worker *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 40: 443–448.

Groot AP, Voogd S (1954) No title on the ovary development in the queenless worker bees (*Apis mellifera* L.). *Experimentia* 10: 384–385.

Guidugli-Lazzarini KR, do Nascimento AM, Tanaka ÉD, et al (2008) Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *J Ins Physiol* 54: 1138–1147. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.021>.

Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam G V., et al (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* 579: 4961–4965. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.085>.

Han C, Chen E, Shen G, et al (2017) Vitellogenin receptor selectively endocytoses female-specific and highly-expressed hemolymph proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Cell Biol* 95: 510–516. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0255>.

Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 24–26.

Hartfelder K, Engels W (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol* 40: 45–77.

[https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60364-6).

- Hartfelder K, Rembold H (1991) Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J Comp Physiol B* 160: 617–620.
- Harwood G, Amdam GV, Freitak D (2019) The role of vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 112: 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.12.006>.
- Hauerland NH, Shirk PD (1995) Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu Rev Ent* 40: 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.40.1.121>.
- Havukainen H, Halskau Ø, Skjaerven L, et al (2011) Deconstructing honeybee vitellogenin: Novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *J Exp Biol* 214: 582–592. <https://doi.org/10.1242/jeb.048314>.
- Havukainen H, Münch D, Baumann A, et al (2013) Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *J Biol Chem* 288: 28369–28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>.
- He K, Guo J, Li F, et al (2018) Impact of the rice stripe virus (RSV) on the biological, physiological and biochemical characteristics of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Chin J Appl Ent* 55: 87–95.
- He K, Lin K, Ding S, et al (2019) The vitellogenin receptor has an essential role in vertical transmission of rice stripe virus during oogenesis in the small brown plant hopper. *Pest Manag Sci* 75: 1370–1382. <https://doi.org/10.1002/ps.5256>.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411–421. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90130-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90130-I).

- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell A, et al (1999) Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE Receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates Tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481–489.
- Hrassnigg N, Crailsheim K (1998) Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J Ins Physiol* 44: 929–939. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00058-4).
- Huang ZY, Robinson GE, Borst DW (1994) Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *J Comp Physiol A* 174: 731–739. <https://doi.org/10.1007/BF00192722>.
- Hung KJ, Kingston JM, Albrecht M, et al (2018) The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc R Soc B Biol Sci* 285: 20172140. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>.
- Huo Y, Liu W, Zhang F, et al (2014) Transovarial transmission of a plant virus is mediated by vitellogenin of its insect vector. *PLoS Pathog* 10: e1003949 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003949>.
- Huo Y, Yu Y, Chen L, et al (2018) Insect tissue-specific vitellogenin facilitates transmission of plant virus. *PLoS Pathog* 14: e1006909. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006909>.
- Huo Y, Yu Y, Liu Q, et al (2019) Rice stripe virus hitchhikes the vector insect vitellogenin ligand-receptor pathway for ovary entry. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 374: 20180312. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0312>.
- Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478–483. <https://doi.org/10.1038/nature10093>.
- Kim HP, Katagiri C, Negao E, Chino H (1992) Further purification and characterization of trehalases from the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp Biochem*

- Physiol Part B 103: 963–967. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90223-E](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90223-E).
- Klose SP, Rolke D, Baumann O (2017) Morphogenesis of honeybee hypopharyngeal gland during pupal development. *Front Zool* 14: 22. <https://doi.org/10.1186/s12983-017-0207-z>.
- Knecht D, Kaatz HH (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* 21: 457–468. <https://doi.org/10.1051/apido:19900507>.
- Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, et al (1996) Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J Biochem* 119: 291–295. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021237>.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 228: 726–734.
- Le Conte Y, Mohammedi A, Robinson GE (2001) Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc R Soc B Biol Sci* 268: 163–168. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1345>.
- Lin H, Winston ML, Haunerland NH, Slessor KN (1999) Influence of age and populations size on ovarian development, and trophallaxis on ovarian development and vitellogenin titres of queenless worker honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Can Ent* 131: 695–706.
- Lin WJ, Chien CY, Tsai CL, Chen ME (2015) A nonovary-specific vitellogenin receptor from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Arch Ins Biochem Physiol* 90: 169–180. <https://doi.org/10.1002/arch.21252>.
- Lin Y, Meng Y, Wang YX, et al (2013) Vitellogenin receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 288: 13345–13355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462556>.

- Liu W, Guo S, Sun D, et al (2019) Molecular characterization and juvenile hormone-regulated transcription of the vitellogenin receptor in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi*. *Comp Biochem Physiol A* 229: 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.12.004>.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino ADS, Simões ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372–385. <https://doi.org/10.1051/apido:2008015>.
- Lu HL, Vinson SB, Pietrantonio P V. (2009) Oocyte membrane localization of vitellogenin receptor coincides with queen flying age, and receptor silencing by RNAi disrupts egg formation in fire ant virgin queens. *FEBS J* 276: 3110–3123. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07029.x>.
- Lu K, Shu Y, Zhou J, et al (2015) Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stål). *J Ins Physiol* 73: 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.007>.
- Maori E, Garbian Y, Kunik V, et al (2019) A transmissible RNA pathway in honey bees. *Cell Rep* 27: 1949–1959. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.073>.
- Michener CD (1974) *The social behavior of the bees*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Münch D, Amdam G V. (2010) The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Lett* 584: 2496–2503.
- Naeger NL, Peso M, Even N, et al (2013) Altruistic behavior by egg-laying worker honeybees. *Curr Biol* 23: 1574–1578. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.045>.

- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, et al (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol* 5: 673–677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>.
- Noirot C, Quenedey A (1974) Fine structure of insect epidermal glands. *Annu Rev Ent* 19: 61–81.
- Ohashi K, Natori S, Kubo T (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem* 265: 127–133. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00696.x>.
- Omholt SW, Amdam GV (2004) Epigenetic regulation of aging in honeybee workers. *Sci Aging Knowl Environ* 2004: pe28. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.26.pe28>.
- Page RE, Erber J (2002) Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89: 91–106. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0299-x>.
- Page RE, Gadau J, Beye M (2002) The emergence of hymenopteran genetics. *Genet Soc Am* 160: 365–379.
- Page RE, Peng CYS (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol* 36: 695–711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9).
- Pereira TC (2013) Controles utilizados e confirmação do silenciamento. In: Introdução à técnica de interferência por RNAi. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, pp 81–93.
- Pinto LZ, Bitondi MMG, Simões ZLP (2000) Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J Ins Physiol* 46: 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00111-0).

- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, et al (2003) The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: Structural analysis of the cDNA and expression studies. *Ins Biochem Mol Biol* 33: 459–465. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3).
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, et al (2010) Global pollinator declines : trends , impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25: 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.
- Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K (1990) Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol* 79: 31–38. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90085-Z).
- Raikhel AS, Dhadiallal TS (1992) Accumation of yolk preteins in insect oocytes. *Annu Rev Ent* 37: 217–251.
- Rembold H, Dietz A (1966) Biologically active substances in royal jelly. *Vitam Horm* 23: 359–382. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60385-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60385-4).
- Ribbands C (1953) Food sharing. In: *The Behavior and Social Life of Honeybees*. Bee Research Association, Ltd., London, pp 191–194.
- Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Ent* 37: 637–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>.
- Robinson GE (1985) Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *J Ins Physiol* 31: 277–282. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(85\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90004-3).
- Rodrigues T, Figueira A (2016) Management of insect pest by RNAi: a new tool for crop protection. In: Abdurakhmonov I (ed) *RNA-interference*, 1st edn. InTech, Rijeka, Croatia, pp 371–390.
- Röhrkasten A, Ferenz HJ (1985) *In vitro* study of selective endocytosis of vitellogenin by locust oocytes. *Roux's Arch Dev Biol* 194: 411–416.

<https://doi.org/10.1007/BF00848554>.

Ronai I, Oldroyd BP, Barton DA, et al (2016) Anarchy is a molecular signature of worker sterility in the honey bee. *Mol Biol Evol* 33: 134–142.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msv202>.

Roth TF, Porter KR (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes Aegypti*.

L. J Cell Biol 20: 313–332. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.313>.

Rouillé Y, Stephen JD, Lund K, et al (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like protein convertases. *Front Neuroendocrinol* 16: 322–361. <https://doi.org/10.1006/frne.1995.1012>.

<https://doi.org/10.1006/frne.1995.1012>.

Salmela H, Amdam G V., Freitak D (2015) Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog* 11: e1005015

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>.

Sappington TW, Raikhel AS (1998) Mini-Review: Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Ins Biochem Mol Biol* 28: 277–300.

Schmitzová J, Klauđiny J, Albert S, et al (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* 54: 1020–1030.

<https://doi.org/10.1007/s000180050229>.

Schonbaum CP, Lee S, Mahowald AP (1995) The *Drosophila* yolkless gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1485–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1485>.

<https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1485>.

Schonbaum CP, Perrino JJ, Mahowald AP (2000) Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Mol Biol Cell* 11: 511–521.

<https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.511>.

Seehuus S-C, Norberg K, Krekling T, et al (2007) Immunogold localization of vitellogenin in

- the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *J Ins Sci* 7: 1–14. <https://doi.org/10.1673/031.007.5201>.
- Seehuus SC, Krekling T, Amdam G V. (2006a) Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Exp Gerontol* 41: 1117–1125. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.004>.
- Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, et al (2006b) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 962–967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>.
- Sekiguchi K, Sakagami SF (1966) Structure of foraging population and related problems in the honeybee, with consideration on the division of labour in bee colonies. *Hokkaido Agr Exp Stat Rep* 69: 1–65.
- Shi J, Mu L, Chen X, et al (2016) RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Int J Biol Sci* 12: 1319–1331. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14464>.
- Shu YH, Wang JW, Lu K, et al (2011) The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran insect: Molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. *Ins Mol Biol* 20: 61–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01054.x>.
- Silva de Moraes RLM, Bowen ID (2000) Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L). *Cell Biol Int* 24: 737–743. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0534>.
- Smodiš Škerl MI, Gregorc A (2015) Characteristics of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera carnica*) from a nurse colony. *Slov Vet Res* 52: 67–74.
- Snodgrass R (1956) *Anatomy of the honey bee*. Constock Publishing Associate, New York.
- Springer TA (1998) An extracellular β -propeller module predicted in lipoprotein and

- scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol* 283: 837–862. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2115>.
- Telfer WH (1965) The mechanism and control of yolk formation. *Annu Rev Ent* 10: 161–184
- Trenczek T, Engels W (1986) Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *Int J Invertebr Reprod Dev* 10: 307–311. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510254>.
- Trenczek T, Zillikens A, Engels W (1989) Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *J Ins Physiol* 35: 475–481. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90054-1).
- Tufail M, Takeda M (2005) Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Ins Mol Biol* 14: 389–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00570.x>.
- Tufail M, Takeda M (2007) Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Ins Biochem Mol Biol* 37: 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.11.007>.
- Tufail M, Takeda M (2009) Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J Ins Physiol* 55: 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.11.007>.
- Tufail M, Takeda M (2008) Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J Ins. Physiol* 54: 1447–1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>.
- Wheeler DE, Kawooya JK (1990) Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch Ins Biochem Physiol* 14: 253–267. <https://doi.org/10.1002/arch.940140405>.
- Winfree R, Aguilar R, Vázquez DP, et al (2009) A meta analysis of bees responses to

- anthropogenic disturbance. *Ecology* 90: 2068–2076. <https://doi.org/10.1890/08-1245.1>.
- Wilson EO (1971) *The insects societies*. Belknap Press of Harvard University Press.
- Winston ML (1987) *The biology of the honeybee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wu H, Jiang FZ, Guo JX, et al (2018) Molecular characterization and expression of vitellogenin and vitellogenin receptor of *Thitarodes pui* (Lepidoptera: Hepialidae), an insect on the Tibetan Plateau. *J Ins Sci* 18: 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey010>.
- Yang J, Han Z (2014) Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. *Austral Ent* 53: 83–88. <https://doi.org/10.1111/aen.12052>.
- Yu N, Christiaens O, Liu J, et al (2013) Delivery of dsRNA for RNAi in insects : an overview and future directions. *Ins Sci* 20: 4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x>.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>.
- Zhang H, Liu Y, Jin J, et al (2019) Identification and characterization of the vitellogenin receptor gene and its role in reproduction in the Alligatorweed Flea Beetle, *Agasicles hygrophila*. *Front Physiol* 10: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00969>.
- Zhang W, Ma L, Xiao H, et al (2016) Molecular characterization and function analysis of the vitellogenin receptor from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). *PLoS One* 11: e0155785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155785>.

APÊNDICE**Sequência utilizada para o plasmídeo de GFP**

ATGAAGACTAATCTTTTTCTCTTTCTCATCTTTTCACTTCTCCTATCATTATCCTCG
GCCGAATTCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCAATTCTTGTTG
AATTAGATGGTGATGTTAATGGGTACAAATTTTCTGTCTCAGTGGAGAGGGTGAAGG
TGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTA
CCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCA
AGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGG
GATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACTACAAGACAC
GTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGG
GAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCT
ACAACCTCCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAG
CCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATC
ATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCA
TTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCAC
ATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAAC
TATACAAACATGATGAGCTTTAA