

AMANDA MARTINS DA CRUZ SOUZA

**ENDOQUITINASE DO MICROSPORÍDEO *Nosema ceranae* PARTICIPA DA
INFECÇÃO NA ABELHA *Apis mellifera***

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

Coorientadores: Carolina Gonçalves Santos
Luanda Medeiros Santana

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

S729e
2022 Souza, Amanda Martins da Cruz, 1993-
Endoquitinase do microsporídeo *Nosema ceranae* participa da infecção da abelha *Apis mellifera* / Amanda Martins da Cruz Souza. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (40 f.): il.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: f. 32-40.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.034>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Infecções. 2. Intestinos - Parasitos.
3. Endoquitinase. 4. ARN interferente. 5. Proteínas. 6. Quitina.
I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.98


AMANDA MARTINS DA CRUZ SOUZA

**EDOQUITINASE DO MICROSPORÍDEO *Nosema caranae* PARTICIPA DA
INFECÇÃO NA ABELHA *Apis mellifera***


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: 23 de novembro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 AMANDA MARTINS DA CRUZ SOUZA
Data: 01/02/2023 15:20:05-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Amanda Martins da Cruz Souza
Autora

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO SERRAO
Data: 01/02/2023 15:40:15-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

José Eduardo Serrão
Orientador

Dedico este trabalho a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial à minha mãe, que muito me apoiou e não mediu forças para hoje ter uma filha Doutora

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

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

Agradeço ao meu orientador José Eduardo Serrão, pelos ensinamentos, pela paciência e por me receber em seu laboratório, com certeza é um grande mestre.

Agradeço às professoras Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Juliana Lopes Rangel Fietto por terem me orientado/coorientado no início da vida acadêmica e me acolhido no Laboratório de Infectologia Molecular Animal.

Agradeço aos professores Carolina Gonçalves Santos, Leandro Licursi de Oliveira e Tiago Antônio de Oliveira Mendes pela atenção, disponibilidade, pela pertinência de suas críticas e sugestões.

Agradeço aos médicos, enfermeiros, técnicos em enfermagem e fisioterapeutas que me auxiliaram durante um período difícil, já no Doutorado, graças aos cuidados deles pude estar aqui.

Aos servidores Sr. Valdir (in memoriam), Renata, Dayse e Elizabeth pela ajuda durante a minha jornada.

Agradeço também a todos os colegas e amigos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal e do Laboratório de Ultraestrutura Celular que sempre estiveram comigo e deixaram os dias de luta, como assim chamávamos, um pouco mais amenos. Agradeço a cada um que me recebia com palavras de alegria, conforto e amor. Vocês ficarão para sempre em minha memória como parte de um momento importante da minha vida.

E por fim, agradeço à minha família, que sempre me apoiou, às minhas avós, à minha mãe e ao meu marido por sempre estarem ao meu lado.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”.
(Beijamin Disraeli)

RESUMO

SOUZA, Amanda Martins da Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Endoquitinase do microsporídeo *Nosema ceranae* participa na infecção na abelha *Apis mellifera***. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Carolina Gonçalves Santos e Luanda Medeiros Santana.

As abelhas são os principais polinizadores em ecossistemas terrestres, responsáveis por 80% da polinização realizada por insetos e três quartos das culturas alimentares dependem deste serviço ecossistêmico. Dentre as abelhas, *Apis mellifera* é a mais utilizada na produção de mel e como agente polinizador. Assim como a maioria dos seres vivos, *A. mellifera* está sujeita a ação de patógenos, com destaque para o microsporídeo *Nosema ceranae* que tem sido associado com perdas de produtividade e de colônias desta abelha. Os esporos de *N. ceranae* ao chegarem no lúmen do intestino médio invadem o citoplasma das células epiteliais para completar o ciclo de vida. Entretanto o intestino médio apresenta em seu lúmen uma barreira contra patógenos, a matriz peritrófica, formada por quitina e proteínas. Os mecanismos pelos quais *N. ceranae* atravessa a matriz peritrófica para chegar ao epitélio do intestino médio são pouco compreendidos. O presente estudo teve como objetivo verificar se a endoquitinase predita para *N. ceranae* tem função de auxiliar o patógeno na infecção da abelha por esse microsporídeo. Para tanto, foi verificada a hipótese de que a inibição da expressão da endoquitinase de *N. ceranae* por RNA de interferência, um mecanismo de silenciamento gênico, afeta a infecção de *A. mellifera* pelo patógeno. Esporos de *N. ceranae* nas células do intestino médio de abelhas operárias foram encontrados oito dias após a infecção (d.p.i), sendo a endoquitinase do patógeno, detectada a partir de três d.p.i. Abelhas tratadas com dsRNA para endoquitinase, 12 e 24 horas após a inoculação de esporos, apresentam supressão na expressão do gene alvo e redução no número de esporos totais e viáveis no intestino médio. A inibição da expressão do gene alvo por RNAi afeta a infecção pelo microsporídeo, indicando que esta enzima é importante para a infecção da abelha.

Palavras-chave: Abelhas. Enzimas. Intestino médio. Matriz peritrófica. RNAi.

ABSTRACT

SOUZA, Amanda Martins da Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2022. **Endochitinase from the microsporidian *Nosema ceranae* participates in the infection of the bee *Apis mellifera*.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Carolina Gonçalves Santos and Luanda Medeiros Santana.

Bees are pollinators in terrestrial ecosystems, responsible for 80% of pollination carried out by insects and 75% crops depend on this ecosystem service. The honey bee, *Apis mellifera* is used in the production of honey and as pollinator in agriculture. *Apis mellifera* is subject to the action of pathogens, mainly the microsporid *Nosema ceranae*, which has been associated with yield decreases and colonies losses of this bee. The spores of *N. ceranae* enter the midgut lumen and invade the cytoplasm of the epithelial cells to complete their cycle. However, the midgut has a selective barrier, the peritrophic matrix formed by chitin and proteins that prevent infection of the epithelium. The mechanisms that the microsporid use to cross the peritrophic matrix barrier to reach the midgut cells are poorly understand. This study verified whether the endochitinase predicted for *N. ceranae* play some role on bee infection by this microsporid. Therefore, we verified the hypothesis that the inhibition of *N. ceranae* endochitinase expression by RNA interference, a gene silencing mechanism, affects the infection of *A. mellifera* by the pathogen. Bees treated with dsRNA for endochitinase 12 and 24 hours after spore inoculation showed suppression of target gene expression and reduction in the number of total and viable spores in the midgut. Inhibition of target gene expression by RNAi affects microsporidian infection, indicating that this enzyme is important for bee infection.

Keywords: Bees. Enzymes. Midgut. Peritrophic matrix. RNAi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais polinizadores em ecossistemas terrestres, tendo importante valor econômico na indústria e agricultura (Klein et al. 2007). De acordo com os preços de mercado, a polinização feita por animais melhora a produção agrícola global em US\$ 235–577 bilhões anuais adicionais (Potts et al. 2016). Além do mel, as abelhas produzem vários outros tipos de produtos, incluindo pólen, própolis, geléia real e cera, que são potencialmente benéficos à saúde humana (Kurec et al. 2020).

Dentre as abelhas, *Apis mellifera* é eussocial que divide o trabalho de forma altamente especializada dentro do ninho, formando uma sociedade complexa, de forma a beneficiar a colônia. Dentro de cada colônia há uma rainha que produz as operárias que desempenham várias funções durante o seu ciclo de vida de cerca de 40 dias. De acordo com a idade, as abelhas operárias desenvolvem várias atividades, sendo as jovens (7-14 dias de idade) nutridoras que cuidam e alimentam as larvas e a rainha, além de higienizar o ninho, enquanto as abelhas com idade superior a 21 dias são operárias forrageiras que executam tarefas fora da colônia, incluindo coletar água, néctar e pólen (Huang et al. 1994; Sakagami, 1953; Wagener-Hulme et al. 1999).

Apis mellifera é nativa da Europa, África e Oriente Médio, enquanto outras nove espécies são encontradas exclusivamente na Ásia, indicando que *A. mellifera* surgiu na Ásia e se expandiu para a Europa e África (Han et al. 2012). A linhagem de abelha africana *Apis mellifera scutellata* foi introduzida no Brasil em 1956 e um ano após, cerca de 26 enxames com suas respectivas rainhas, escaparam e cruzaram com as subespécies de abelhas melíferas europeias introduzidas no século XIX: a italiana *Apis mellifera ligustica*, a alemã *Apis mellifera mellifera* e a austríaca *Apis mellifera carnica*. Com isso houve a origem de populações poli-híbridas, com características de abelhas africanizadas, com grande capacidade de enxamear e rusticidade, originando *A. mellifera* africanizada (Kerr, 1967).

Embora *A. mellifera* apresente distribuição mundial, sendo um importante polinizador agrícola, tem sido reportada, a partir de 2006, a perda de colônias durante os meses de inverno nos Estados Unidos da América e em outros países do hemisfério norte, fenômeno conhecido como Síndrome do Colapso das Colônias (CCD - Colony Collapse Disorder) ou síndrome do desaparecimento de colônias (Ellis,

2007; USDA, 2019). A CCD é considerada o maior problema da apicultura mundial na atualidade e envolve vários fatores como deficiência e falta de diversidade alimentar, manejo inadequado, uso de produtos químicos na colmeia e na agricultura, parasitos e patógenos (van Engelsdorp et al., 2009; Pettis et al., 2013). Dentre os patógenos, o microsporídeo *Nosema ceranae* (Fries et al.1996) é um dos principais agentes envolvidos na CCD (Higes et al. 2006; Cox-Foster et al. 2007; Parvanov et al. 2014).

Microsporidia são eucariotos, parasitas intracelulares obrigatórios, infectando vertebrados e invertebrados, causando perdas importantes em espécies de animais (Sprague, 1977). Os representantes de microsporídeos podem formar esporos microscópicos que permitem a sobrevivência no ambiente externo por anos (Vávra, 1976). O esporo é formado por uma camada espessa envolvendo o núcleo e o citoplasma (esporoplasma) no qual ocorre o disco de ancoragem, que ancora o tubo polar à célula hospedeira durante a germinação, tubo polar, retículo endoplasmático, golgiossomo, poroplasto vesicular, poroplasto lamelar e vacúolo posterior que são específicos do filo e estão relacionados com o processo de infecção (Williams, 2009). As mitocôndrias são bioquímica e estruturalmente reduzidas a mitossomos (Hirt et al.1997; Katinka et al. 2001; Schottelius et al. 2000; Williams et al. 2002).

Na porção anterior do esporo, está o poroplasto, conjunto de cavidades delimitadas por membranas. O tubo polar está enrolado em torno do esporoplasma (periferia) e transfere o esporoplasma infeccioso para a célula hospedeira sob estímulos, incluindo alterações no pH e em concentrações iônicas (Liu et al. 2015; Williams,2009; Wittner e Weiss, 1999). Os esporos variam em tamanho de 1 a 12 µm revestidos por um exosporo proteico e um endosporo composto por quitina, proteínas e uma membrana interna ou plasmalema (Kudo, 1921; Vávra, 1976; Canning e Lom, 1986; Wittner e Weiss, 1999). O ciclo de vida de Microsporidia envolve uma fase ploriferativa, em que ocorre produção de esporos (esporogônia) e a fase de esporos maduros ou fase infecciosa (Wittner e Weiss, 1999).

Dentre os microporídeos, *Nosema* spp. infectam *A. mellifera* (Klee et al. 2007) sendo transmitidos principalmente através da via fecal-oral entre as abelhas adultas. Ao entrarem no lúmen intestinal, invadem o citoplasma das células epiteliais do intestino médio e se desenvolvem (Fries, 2013), causando danos ao epitélio desse importante órgão envolvido na digestão, absorção, imunidade e desintoxicação (Ferrandon, 2013).

Duas espécies de microsporídeos infectam abelhas: *Nosema apis*, relatado em 1909 (Zander, 1909) e *N. ceranae* que teve sua origem em *Apis cerana* reportada em 1996 (Fries et al. 1996). Esses patógenos afetam a digestão, levando à desnutrição, ao envelhecimento fisiológico e reduzindo o tempo de vida das abelhas (Fries et al. 1996; Hornitzky, 2008).

Atualmente, *N. ceranae* é o mais prevalente em *A. mellifera*, com distribuição mundial (Goulson et al. 2015). Durante o processo de infecção, *N. ceranae* induz múltiplas alterações fisiológicas em seu hospedeiro, dentre elas, mecanismos envolvidos na regulação de morte celular programada (Doublet et al. 2017; Higes et al. 2013a; Kurze et al. 2015; Martin-Hernandez et al. 2017) e metabolismo energético (Kurze et al. 2016b; Mayack and Naug, 2009; Vidau et al. 2014). *N. ceranae* tem maior patogenicidade causando maior mortalidade de abelhas que *N. apis* (Higes et al. 2007). Em determinadas regiões de clima quente há relatos de perda de colônias de abelhas causadas por esse patógeno (Bekele et al. 2015), incluindo países da América do Sul (Medici et al. 2012).

As altas incidências de nosemose estão relacionadas aos períodos de estresse, como por exemplo, em abelhas confinadas e quando há desequilíbrio nutricional (Webster, 1993). Há diferenças significativas entre os sintomas causados pela infecção por *N. apis* e *N. ceranae* sendo classificadas em tipo A para *N. apis* e tipo C para *N. ceranae* (Coloss 2019). A nosemose tipo A, apresenta sintomas como alterações no intestino médio, podendo a infecção atingir também outras partes do sistema digestório, impedindo o funcionamento das glândulas hipofaríngeas, fazendo com que a abelha deixe de produzir o alimento das larvas. A nosemose tipo C, apresenta sintomas variados e inespecíficos, como a supressão de uma fração do sistema imunológico, alteração do comportamento social e redução da população (Camargo et al. 2002; OIE, 2008; Lourenço et al., 2021).

Nas abelhas, como em muitos insetos, o intestino médio é o principal órgão de digestão e absorção de nutrientes, mas também é uma barreira de defesa primária para impedir que patógenos e xenobióticos atinjam a hemolinfa e sejam distribuídos para outros órgãos (Hegedus et al. 2009; Silva et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Dentre as barreiras do intestino médio, além do epitélio, há a matriz peritrófica, uma bainha acelular formada por fibrilas de quitina em associação glicoproteínas e proteoglicanas, que tem a função de revestir o epitélio do intestino médio (Hegedus et al. 2009; 2019; Lehane, 1997; Terra, 2001; Levy et al. 2007; Hegedus et al. 2009; Liu

et al. 2012; Jariyapan et al. 2013; Moussian, 2013). Usualmente a matriz peritrófica é classificada em dois tipos: I e II (Peters, 1992). O tipo I é encontrado em baratas (Dictyoptera), gafanhotos (Orthoptera), besouros (Coleoptera), abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), mariposas e borboletas (Lepidoptera), e em mosquitos adultos hematófagos (Diptera). O tipo II ocorre em larvas e adultos (exceto hematófagos), mosquitos e moscas (Diptera), e em alguns adultos Lepidoptera (Richards e Richards, 1977). Normalmente, após a alimentação produz-se o tipo I, embora ela também possa ser produzida de forma constitutiva (Baines, 1978; Ramos et al. 1994; Lehane, 1997). O tipo II de matriz peritrófica é produzido a partir de um órgão bastante especializado e de tamanho reduzido, a cárdia que fica na região anterior do intestino médio (Peters, 1992; Lehane, 1997).

A matriz peritrófica atua como barreira física que protege o epitélio de ligações não específicas, de materiais abrasivos, toxinas e patógenos (Terra, 2001; Hegedus et al. 2009; Erlandson et al., 2019). Como a matriz peritrófica pode ser uma barreira que impede a penetração por microrganismos, os mecanismos que eles utilizam para penetrar essa barreira podem ser alvos de agentes químicos e imunológicos que impeçam essa invasão.

A possível função da matriz peritrófica, como uma barreira física, foi evidenciada com a identificação da expressão de enzimas hidrolíticas por patógenos intestinais que comprometem sua integridade (Merzendorfer et al. 2016). *Plasmodium falciparum*, causador da malária sintetiza uma quitinase que interrompe a rede de quitina da matriz peritrófica permitindo o acesso ao epitélio do intestino médio do mosquito (Shahabuddin et al. 1993). Na filária *Brugia malayi*, uma quitinase com atividade temporal, coincide com a infecção microfilarial do mosquito e pode estar relacionada com a penetração através da matriz peritrófica (Fuhrman et al. 1992).

O papel que a matriz peritrófica desenvolve em insetos hematófagos, é de especial interesse, uma vez que ela limita a entrada de parasitas no espaço ectoperitrófico. Em mosquitos do gênero *Anopheles*, a matriz peritrófica previne o escape e o desenvolvimento do *Plasmodium* spp. (Shahabuddin et. al 1993). Em flebotomíneos, a matriz peritrófica também funciona como uma barreira, dificultando o estabelecimento da *Leishmania* spp. no intestino médio (Pimenta et. al, 1997; Coutinho Abreu et al. 2013). Patógenos que não ultrapassam a matriz peritrófica, não conseguem se fixar no epitélio intestinal e são eliminados com remanescentes do bolo fecal (Pimenta et. al, 1997; Coutinho Abreu et al. 2013).

Quitinases são enzimas produzidas por uma variedade de organismos, procariontes e eucariontes dentre os quais os fungos. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações β -(1,4) da quitina (Fleuri & Sato, 2005), que é um homopolímero linear e insolúvel de resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ligados por ligações glicosídicas β -(1,4), sendo o polímero mais abundante na Terra depois da celulose. Presente em todos os ecossistemas, exerce um papel estrutural importante nos fungos, onde está presente nas camadas internas da parede celular, associada a proteínas e outros carboidratos podendo equivaler a até 45% do peso seco do fungo (Hartl et al., 2012). Baseado no modo de ação, as quitinases são divididas em duas categorias: as endoquitinases, que clivam a cadeia de quitina de forma aleatória, gerando multímeros de GlcNAc solúveis de baixa massa molecular; e as exoquitinases, que catalisam a remoção sucessiva de monômeros de GlcNAc (β -N-acetil glicosaminidases) ou dímeros (quitobiosidases) da extremidade não redutora da cadeia de quitina ou a partir dos produtos oligoméricos das endoquitinases (Adrangi e Faramarzi, 2013). De acordo com a composição de aminoácidos dos seus domínios catalíticos ocorre a classificação das quitinases em diferentes famílias de glicosilhidrolases (GH): endoquitinases e quitobiosidases, incluindo as famílias GH18, 19, 23 e 48; a N-acetil glucosaminidases representadas pelas GH3, 18, 20 e 84 (Adrangi e Faramarzi, 2013; Henrissat, 1991).

A família GH18 abrange a maioria das quitinases dos fungos, tendo como única exceção a NbChiA de *Nosema bombycis*, que pertence à GH19 (Han et al. 2016). De acordo com as sequências do genoma de *N. apis* no Genbank ocorrem três quitinases: EQB60308.1 quitinase classe iv [*Nosema apis* BRL 01]; EQB60309.1 endoquitinase [*Nosema apis* BRL 01], EQB60383.1 endoquitinase [*Nosema apis* BRL 01] e uma quitinase em *N. ceranae* XP_024330643.1 endoquitinase.

Considerando o exposto, é possível verificar que o mecanismo pelo qual como esporos de *N. ceranae* conseguem ultrapassar a matriz peritrófica de abelhas é pouco conhecido.

2. OBJETIVO

O objetivo foi verificar se a endoquitinase predita para *N. ceranae* tem função de auxiliar o patógeno na infecção da abelha por esse microsporídeo e investigara hipótese de que a inibição da expressão do gene que codifica a endoquitinase de *N. ceranae* por RNA de interferência afeta a infecção de *A. mellifera* pelo patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de abelhas *Apis mellifera*

A coleta de abelhas *A. mellifera* africanizada foi realizada em cinco colônias no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Quadros de crias saudáveis foram mantidos em B.O.D. por 24 horas a 32,5 °C, umidade relativa de 60-70% e posteriormente, 200 abelhas recém-emergidas foram separadas em duas gaiolas plásticas com capacidade de 500 mL (100 abelhas em cada) e alimentadas por 24 horas com mel e pólen *ad libitum*.

3.2. Isolamento de esporos de *Nosema ceranae*

Os esporos de *N. ceranae* foram obtidos a partir de abelhas campeiras de colônias naturalmente infectadas. O isolamento foi feito a partir da maceração de 30 abelhas em água destilada, que foi filtrado em algodão estéril para remoção de impurezas. A solução contendo o macerado e água destilada foi centrifugada a 500 g por 5 minutos em temperatura ambiente por três vezes, com o descarte do sobrenadante e o precipitado diluído em 30 mL de água destilada. A contagem de esporos da solução e a concentração utilizada para inoculação foi realizada em câmara de Neubauer (Fries et al., 2013).

3.3. Inoculação de esporos

Cem abelhas mantidas em gaiolas de 500 mL foram alimentadas com 1 mL de solução de sacarose 50% p/v contendo 12500 esporos de *N. ceranae* por μL da solução por 24 horas *ad libitum* considerando o consumo de 10 μL por abelha a cada 24 h (Williams et al., 2013). O controle foi realizado apenas pela alimentação de 100 abelhas com 1 mL solução de sacarose 50% p/v. Depois de 24 horas de exposição à solução de esporos, as abelhas foram alimentadas com sacarose 50% p/v sem esporos durante 12 dias. Diariamente, quatro abelhas foram imobilizadas a -5°C por 5 minutos, dissecadas em NaCl a 125 mM e os intestinos médios processados para microscopia de luz para verificação da presença de esporos de *N. ceranae*.

3.4. Microscopia de luz

Os intestinos médios de abelhas operárias dissecadas foram transferidos para o fixador Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 h. A seguir, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e incluídos em historesina Leica®. Secções com 2 μm de espessura foram coradas com hematoxilina

(15 minutos), eosina (30 s) e analisadas quanto à presença de esporos de *N. ceranae* com microscópio Olympus BX60.

3.5. Extração de RNA total

A extração de RNA total de abelhas alimentadas com esporos de *N. ceranae* (item 3.3) foi obtida a partir de um grupo de quatro intestinos médios obtidos diariamente, durante os seis dias após inoculação e dissecados sob estereomicroscópio em tampão fosfato de sódio 0,15 M pH 7,2 (PBS) com auxílio de pinças e vidrarias estéreis. Os intestinos médios foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para 1 mL de TRI Reagent® (Sigma Aldrich). A seguir foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, com agitação vigorosa a cada 90 segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e a fase superior transferida para 500 µL de isopropanol por 5 minutos em temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% por 16 h a -20 °C. As seguir as amostras foram agitadas e centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi seco em temperatura ambiente por 1 hora. A eluição do RNA foi obtida com 20 µL de Água Nuclease Free (Promega) a 55 °C por 10 minutos e a quantificação e verificação da pureza do RNA foi obtida em NanoDrop™ 2000/2000c.

3.6. Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®), de acordo com recomendações do fabricante, antes da síntese do cDNA com SCRIPT Transcriptase Reversa (Cellcco®). A partir de 1 µg de RNA extraído das abelhas, foram adicionados 0,2 µL de Oligo (dT) e 0,2 µL de Random Primer a 100 µM, incubação a 70 °C por 5 minutos e resfriamento em gelo. Em seguida, 4 µL de tampão da enzima completo foram adicionados, juntamente com 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de dNTP MIX (10 mM cada), 1 µL de transcriptase reversa SCRIPT RT Enzyme (200 U/µL) e 1 µL inibidor de RNaseU/µL (Celcco) para 20 µL de volume final. A transcrição reversa foi realizada após a incubação a 42 °C por 10 minutos, a 55 °C por 60 minutos e a inativação da enzima ocorreu a 70 °C por 10 minutos.

3.7. Perfil de expressão do gene que codifica a endoquitinase de *N. ceranae* (PCR)

O cDNA obtido foi utilizado para amplificação por PCR. Um par de primer para a PCR do gene da endoquitinase e um para o gene de referência 23S-like de *N.*

ceranae foram desenhados com a ferramenta Primer-BLAST (NCBI), a partir da sequência parcial do RNAm da endoquitinase (*Genbank*:mRNA XM_024475474.1) e 23S-Like (XR_002966747.1) (Tabela 1). Cada reação teve um volume final de 20 µL com 10 µL de enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega), 6 µL de água livre de nuclease (Promega), 1 µL de cada primer (R e F, 10 µM) e 2,0 µL de cDNA. As configurações de reação foram desnaturação a 94 °C, por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 s; hibridização a 60 °C, por 1 minutos, seguida de extensão a 72 °C, por 10 minutos. Como controle positivo da reação foi utilizada um cDNA de abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* seis dias pós inoculação e como controle negativo, água. Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% visualizados com luz UV (Sambrook e Maniatis, 2000).

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação do gene da Endoquitinase e 23S-like na PCR:

Gene/Acesso GenBank	Primer (5'---3')	Fragmento (bp)
Endoquitinase/ XM_024475474.1	1: F1: TGGGCATTTGGGAAACGGAT	109
	1: R1: AGTAGCACCACCACCTTCAC	
23S-Like/ XR_002966747.1	2:	F2: 78
	AGGTAGCTGTGCAATTTGTTTGT	
	2: R2: CCTCCAAGATCGGCTCATTGT	

3.8. Síntese do RNA fita dupla (dsRNA)

O primer para a produção do dsRNA da endoquitinase de *N. ceranae* foi desenhado com a ferramenta Primer-BLAST (NCBI), a partir da sequência parcial do RNAm da endoquitinase (*Genbank*:mRNA XM_024475474.1). À sequência dos primers foram adicionadas as sequências do promotor SP6 da RNA polimerase (Tabela 2). Para controle endógeno ou inespecífico, foi utilizado ds GFP (*Green Fluorescent Protein*, codificado pela água viva), cujos primers foram desenhados a partir da sequência *Genbank*: JN654719.1 e a eles foram adicionadas as sequências do promotor T7 (Tabela 2).

Tabela 2: Primers utilizados para síntese de RNA dupla fita (promotor T7 sublinhado em dsGFP e promotor SP6 sublinhado em dsRNAendoquitinase).

Gene	Acesso (Gen-Bank)	Primer (5'---3')	Frag-mento (pb)
dsGFP	KY464890.1	F: <u>ATTTAGGTGACACTATAGAACCTGG-</u> TACAATTGGCGGA R: <u>ATTTAGGTGACAC-</u> <u>TATAGTAATGCTTCACCTGCTGCCT</u>	297
dsEndo	XM_024475474.1	F: <u>TAATACACTCACTATAGGG-</u> CATGGCCAACACTTGTCACT R: <u>TAATACGACTCAC-</u> <u>TATAGGGCGGCCATGATGTTACGTTG</u>	343

A partir do RNA extraído de abelhas com seis dias após inoculação com esporos de *N. ceranae*, foi realizada a síntese de cDNA, RT-PCR (item 3.7), utilizando os primers e os produtos das PCRs de dsGFP e dsEnd que foram purificados utilizando kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®) e posteriormente quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c. A confirmação da integridade dos produtos da PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% visualizados com luz UV (Sambrook e Maniatis, 2000). Para a síntese do dsGFP foi utilizado 2 µL da enzima T7 RNA Polimerase (40U; Promega®), 20 µL tampão da enzima 5X e 5 µg de purificados de PCR, 2 µL de 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. Para a síntese do dsEnd foi utilizado o RiboMAX™ *Large Scale RNA Production Systems*—SP6, com 20 µL do SP6 *Transcription 5x Buffer*, 20 µL rNTPs, 10 µg de cDNA e 10 µL X de *Enzyme Mix* (SP6), com o volume final de 100 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C por 4 horas e em seguida tratadas com RQ1-RNase-Free DNase (Promega®) conforme as recomendações do fabricante. Para purificação do dsRNA, as amostras foram ajustadas para um volume de 200 µL e adicionados igual volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizadas e centrifugadas a 13000 g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa da solução foi transferida para 20 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e homogeneizada por inversão. Em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol a -20 °C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 20 minutos a -4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 15667 g por 10 minutos. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e transferido

para 40 μ L de água livre de nuclease. Cada produto foi purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®) e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c.

3.9. Sequenciamento do purificado da PCR a partir da amplificação do primer do dsEnd

Os produtos da PCR foram sequenciados pela Exxtend Solução (Brasil) pelo método Sanger (DNA). A sequência foi processada pelo programa de computador Chromas e as semelhanças entre a sequência corrigida foi comparada com as disponíveis no NCBI, utilizando a ferramenta BLASTN no pacote BLAST (Altschul et al., 1990).

3.10. Inoculação de esporos para tratamento com dsRNA

Quarenta abelhas operárias recém-emergidas foram obtidas como descrito e submetidas ao tratamento de inoculação de esporos. Elas foram alimentadas com 400 μ L de solução de sacarose 50% p/v, contendo 12500 esporos de *N. ceranae* por μ L por 7 horas *ad libitum*. A seguir as abelhas foram divididas em duas gaiolas com capacidade de 250 mL contendo 20 abelhas cada e mantidas em jejum por 5 horas. Então, as abelhas foram alimentadas individualmente (Williams et al., 2013) com dsRNA, com o auxílio de uma micropipeta Monocanal (Labor Import). O grupo controle (C1) recebeu dsGFP e o tratamento (T1) dsEnd. Cada abelha recebeu 2 μ g de dsRNA diluídos em 4 μ L de solução de sacarose 50% p/v, 12 e 24 horas pós inoculação com esporos de *N. ceranae* (Figura 1). As abelhas foram mantidas a 32,5 °C e alimentadas com 600 μ L de sacarose a 50% p/v por 72 h. A seguir as abelhas foram coletadas e analisadas para expressão do gene da endoquitinase.

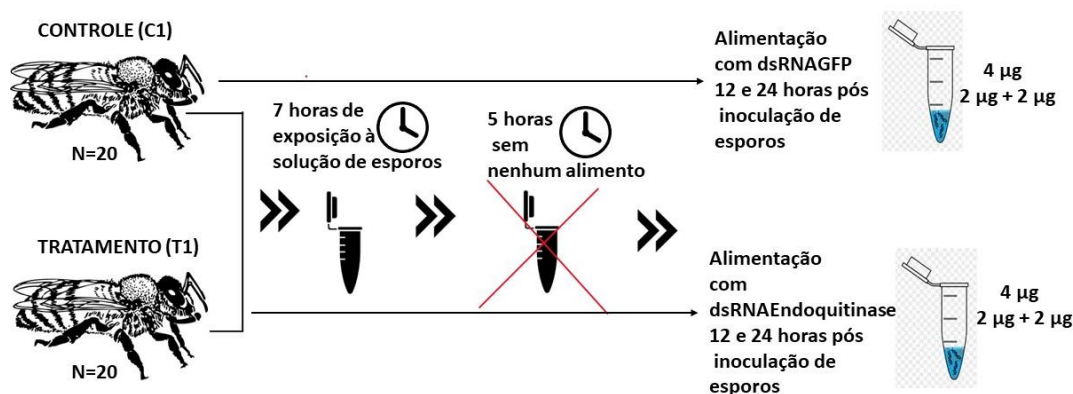


Figura 1: Organização da alimentação individual de abelhas operárias com dsRNA para avaliação da expressão da endoquitinase *Nosema ceranae* no 3º dia pós inoculação.

3.11. 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). Cada reação continha 2 µL do cDNA, 1 µL de cada primer a 10 µM (primers da Tabela 1), 5 µL de SYBR Green, 1 µL de água livre de nuclease. As configurações de reação foram desnaturação a 95 °C, por 1 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C, por 1 minutos; hibridização a 58 °C, por 30 s, e curva de melting 50-99 °C com 1 °C por segundo.

3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação e visualização dos produtos da qPCR foi realizada em gel de poliacrilamida a 12 % a partir dos seguintes volumes: 4,8 mL de acrilamida 30%, 4,8 mL de água, 2,4 mL de TBE 5X, 200 µL de persulfato de amônio (LGC) e 10 µL de TEMED (LGC), através de corrida de 45 minutos a 80V em uma cuba de eletroforese vertical modelo Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-RAD).

3.13. PCR semi-quantitativa

PCR semi-quantitativa foi realizada para a escolha de um ciclo de amplificação anterior ao platô para endoquitinase de *N. ceranae*. Um *pool* de cDNA obtido a partir do 3º, 4º, 5º e 6º dia pós inoculação das abelhas com esporos de *N. ceranae* foi utilizado para amplificação por PCR (Veriti™ Thermal Cycler®, Applied Biosystems). A reação teve volume final de 100 µL com 50 µL de enzima GoTaq® *Green Master*

Mix (Promega®), 36 µL de água livre de nuclease (Promega®), 5 µL de cada primer (R e F, 10 µM; Tabela 2) e 4 µL de cDNA. As configurações de reação foram desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos a 94°C por 30 s, 60 °C por 1 minutos, 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR a partir do 18º ciclo (8 µL) foi coletado a cada dois ciclos até o 38º ciclo, além da PCR completa (40º ciclo). Após amplificação, os produtos de PCR foram analisados com eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados com luz UV (Sambrook e Maniats, 2000). Outra PCR semi-quantitativa foi realizada para cálculo da densitometria das bandas da endoquitinase de *N. ceranae* em relação às bandas do 23S-like, a partir do ciclo anterior a fase platô. A reação teve um volume final de 20 µL, com 10 µL de enzima GoTaq® *Green Master Mix* (Promega), 6 µL de água nuclease free (Promega), 1 µL de cada primer (R e F, 10 µM) e 2µL de cDNA (pool das triplicatas do 3º ao 6º dia pós inoculação). As configurações de reação foram desnaturação a 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60 °C por 1 min, 72 °C por 10 min. Após amplificação, os produtos de PCR foram analisados com eletroforese em gel de agarose a 1,5% visualizado com luz UV .

As intensidades das bandas obtidas da eletroforese em gel de agarose a 1,5 % foram quantificadas e comparadas com os *softwares Image J* (Schneider et. al 2012) e *GraphPad Prism Windows* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com).

3.14. Teste de viabilidade dos esporos de *Nosema ceranae*

Para verificar a viabilidade dos esporos de *N. ceranae* nas abelhas tratadas com dsRNA, 40 abelhas recém-emergidas foram alimentadas com 400 µL de solução de sacarose 50% p/v contendo 12500 esporos de *N. ceranae* por µL por 7 horas *ad libitum*. A seguir, as abelhas foram separadas em 2 gaiolas com 20 abelhas cada e mantidas em jejum por 5 horas. A seguir foram alimentadas com dsRNA de forma individual conforme descrito anteriormente (Figura 2).

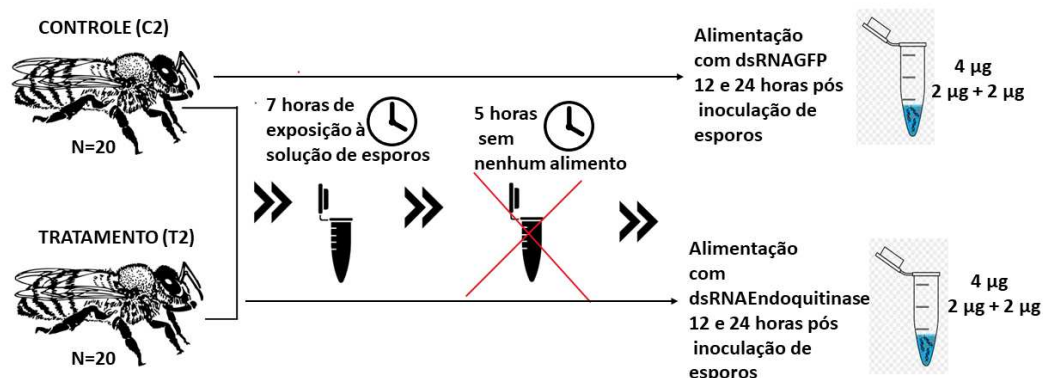


Figura 2: Organização da alimentação individual de abelhas operárias com dsRNA para teste de viabilidade de esporos de *Nosema ceranae*.

Após serem alimentadas individualmente com dsRNA as abelhas foram mantidas à 32,5 C° por 8 dias com sacarose 50% p/v *ad libitum*. Então, 10 abelhas alimentadas com dsEnd e 10 com dsGFP foram dissecadas e os intestinos médios macerados em água destilada. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos em temperatura ambiente por 3 vezes. O precipitado contendo os esporos de *N. ceranae* foi transferido para 20 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol a 2 mg/mL (DAPI) por 30 minutos para identificar esporos inviáveis (Saito et al.; 2004). As amostras foram novamente centrifugadas a 5000 g por 5 minutos em temperatura ambiente, o precipitado lavado com 1 mL de água destilada. Uma alíquota da solução foi removida para a contagem de esporos totais e viáveis em câmara de Neubauer em microscópio EVOS® FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). O número total de esporos viáveis (não corados pelo DAPI) foi submetido ao teste t-student usando o *software GraphPad Prism* versão 7 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com) com 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Tempo de infecção nas células do intestino médio de *N. ceranae*

As análises histológicas não evidenciaram a presença de esporos no intestino médio das operárias do controle (Figura 3A), enquanto naquelas operárias inoculadas com 12500 esporos por μL , foi encontrado esporos *N. ceranae* nas células do intestino médio no oitavo dia após a inoculação (Figura 3B).

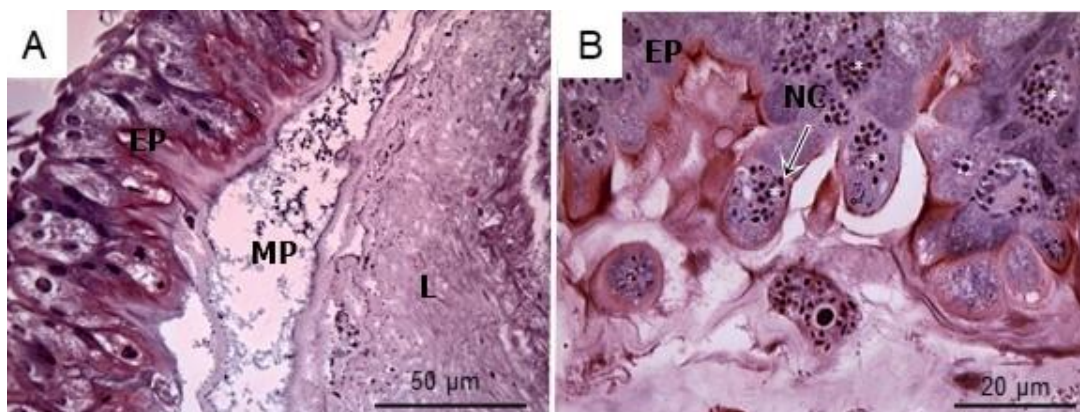


Figura 3. Seções histológicas de intestino médio de operárias de *Apis mellifera*. [A]: Abelha operária do grupo controle com ausência de esporos. [B] Abelha operária com oito dias pós inoculação com esporos de *Nosema ceranae*, mostrando células do epitélio (EP) com *N. ceranae* (NC). L-lúmen, MP - matriz peritrófica.

4.2. Perfil de expressão do gene que codifica a endoquitinase de *N. ceranae* (PCR)

Embora o microsporídeo tenha sido detectado apenas após oito dias da inoculação, a expressão da endoquitinase de *N. ceranae* foi verificada a partir do terceiro dia após a inoculação dos esporos (109 bp; Figura 4). A verificação da amplificação do gene da endoquitinase foi utilizada para definir o dia do tratamento com dsRNA.

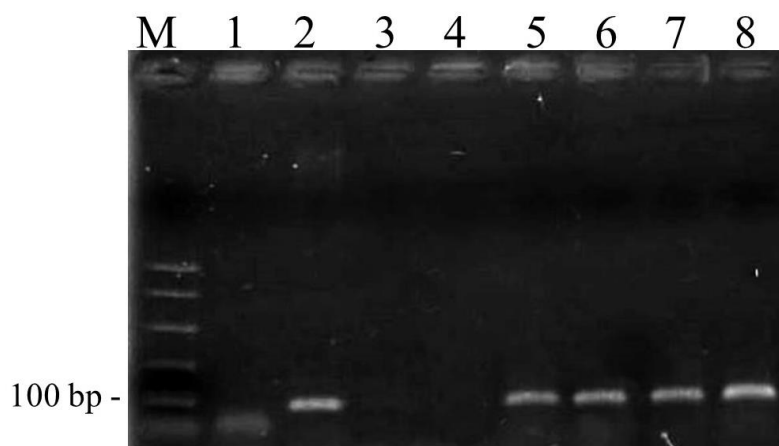


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR identificando a presença do gene que codifica a endoquitinase de *Nosema ceranae* (109 bp) a partir do 3º dia após inoculação [d.p.i. (faixa 5)]. (M) Marcador molecular (50 bp DNA Ladder Celcco); (1) controle negativo; (2) controle positivo; (3) 1 d.p.i.; (4) 2 d.p.i.; (5) 3 d.p.i.; (6) 4 d.p.i.; (7) 5 d.p.i.; (8) 6 d.p.i.

4.3. Síntese do RNA fita dupla (dsRNA)

As análises dos produtos PCR em gel de agarose a 1,5% mostraram a formação de amplicons pós-purificação da PCR para síntese de dsEnd (347 bp) e dsGFP (297 bp) (Figura 5). A verificação da integridade dos produtos da PCR, pós-purificação, foi necessária para que se confirmada, ocorressem as próximas etapas de síntese do dsRNA. O sequenciamento da banda resultante da amplificação do primer dsEnd (347 bp) (Tabela 3) revelou 96,5% de identidade com a sequência alvo parcial do mRNA (*Genbank XM_024475474.1*) da endoquitinase de *N. ceranae*. publicadas de acordo com o BLASTN (Altschul et al., 1990).

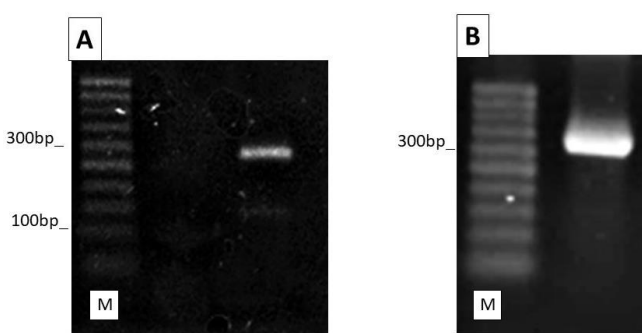


Figura 5. Gel de agarose a 1,5% com os produtos de PCR identificando os amplicons depois da purificação para síntese do dsRNA. (M) Marcador molecular (50 bp DNA Ladder Celcco); (A) dsEnd de *Nosema ceranae* de 347bp e (B) dsGFP de 297bp.

Tabela 3: Resultado do sequenciamento do purificado da PCR para síntese do dsEnd:

Nome	Sequência
Primer Reverso Endoquitinase	GGCGTAACTGGGCTAAAACATGGCTGCCATA TTAAGATCATCAAATCCTTCATTTGTAACGTT TACCAGCATCGACATATTCCTGTTTGGGGTTA AAATTTTGTAGACATGGCTTCAAAAACCTG TTCAGATGTAACATTAACCTTCACCATTCTCC GTCTTGTCTATAGTGTACCTAATAA

4.4. Ciclo de amplificação da endoquitinase de *N. ceranae*

A PCR semi-quantitativa mostrou a amplificação endoquitinase de *N. ceranae* com 109 pb a partir do 36º ciclo de amplificação com ocorrência do platô no 40º ciclo

(Figura 6). Como, o objetivo foi a escolha de um ciclo anterior a fase de platô, o 38º ciclo foi utilizado como ciclo de referência para PCR semi-quantitativa na comparação da expressão do gene da endoquitinase em relação ao 23S-like em abelhas do 3º ao 6º dias pós- inoculação com esporos de *N. ceranae* e tratadas com dsRNA.

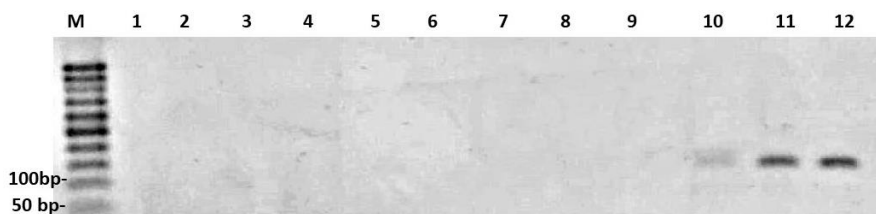


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR identificando a presença da endoquitinase de *Nosema ceranae* de 109bp a partir do 36º ciclo (faixa 10). (M) Marcador de 50 bp DNA Ladder (Celcco); (1) 18º ciclo; (2) 20º ciclo; (3) 22º ciclo; (4) 24º ciclo; (5) 26º ciclo; (6) 28º ciclo; (7) 30º ciclo; (8) 32º ciclo; (9) 34º ciclo; (10) 36º ciclo; (11) 38º ciclo; (12) 40º ciclo.

4.5 Expressão de endoquitinase pós inoculação com esporos *N. ceranae*.

De acordo com a densitometria das bandas resultantes da PCR semi-quantitativa do 38º ciclo de amplificação da endoquitinase de *N. ceranae* dos intestinos médios das operárias de *A. mellifera* com os 3º, 4º, 5º e 6º dias pós-inoculação em relação ao gene de referência 23S-like ocorreu aumento da porcentagem de amplificação da endoquitinase, com maior valor (88,4%) no 6º dia pós- inoculação (Figuras 7, 8).

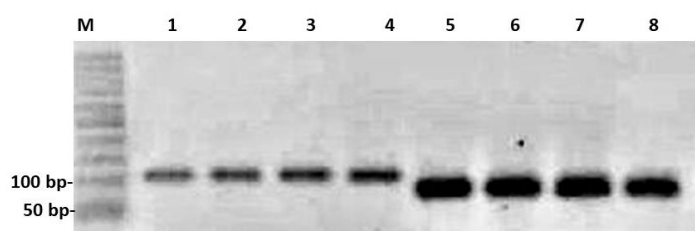


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR identificando a presença da endoquitinase (109 bp; faixas 1-4) e 23S-like (78bp; faixas 5-8) de *Nosema ceranae* no 38º ciclo de amplificação. (M) Marcador de 50 bp DNA Ladder (Celcco); (1) Endoquitinase 3º dia pós-inoculação (d.p.i); (2) Endoquitinase 4º d.p.i; (3) Endoquitinase 5º d.p.i; (4) Endoquitinase 6º d.p.i; (5) 23S-like 3º d.p.i; (6) 23S-like 4º d.p.i; (7) 23S-like 5º d.p.i; (8) 23S-like 6º d.p.i.

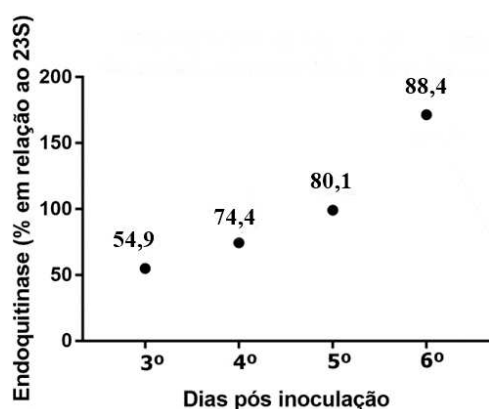


Figura 8. Porcentagem de variação da densitometria das bandas da endoquitinase de *Nosema ceranae* em relação ao gene referência 23S-like, nos 3º, 4º, 5º e 6º dias pós inoculação. Dados obtidos a partir da densitometria de bandas de endoquitinase e 23S-like de *N. ceranae* com o programa de computador Image J.

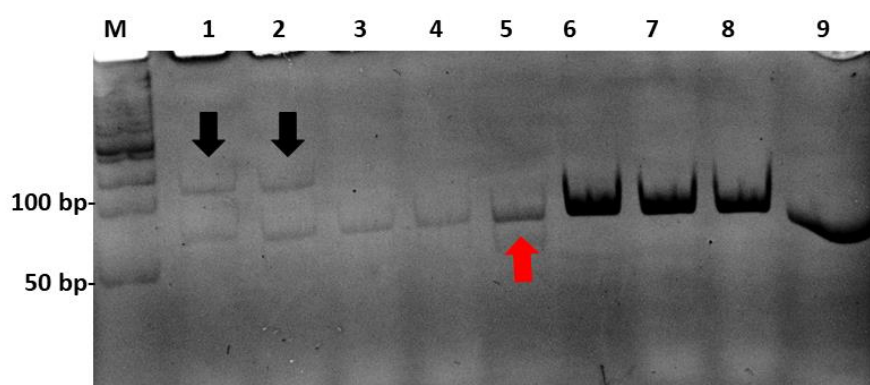


Figura 9. Gel de poliacrilamida a 12% para visualização dos produtos da qPCR mostrando a expressão do gene da endoquitinase (setas pretas) e 23S-like (faixas 6 e 7) nas abelhas tratadas com dsGFP. Notar a ausência da endoquitinase nas abelhas tratadas com dsEnd (faixas 3 e 4). A seta vermelha indica a banda inespecífica > 50 bp no controle negativo que ocorre em todos os demais testes (faixas 1-6). A faixa 8 mostra a expressão do gene 23S-like em abelhas tratadas com dsEnd e a faixa 9 o controle negativo do 23S-like.

4.7. Viabilidade de esporos em abelhas tratadas com dsRNA

O teste de viabilidade dos esporos das abelhas tratadas com dsEnd mostrou que houve redução na quantidade de esporos totais em comparação com o controle. A redução na média da quantidade de esporos totais foi de $4,61 \times 10^6$ para $1,17 \times 10^6$ esporos/abelha, indicando redução de mais de 4X na média total de esporos infectando as abelhas ($t = 6,479$, $p = 0,0071$; Figura 10).

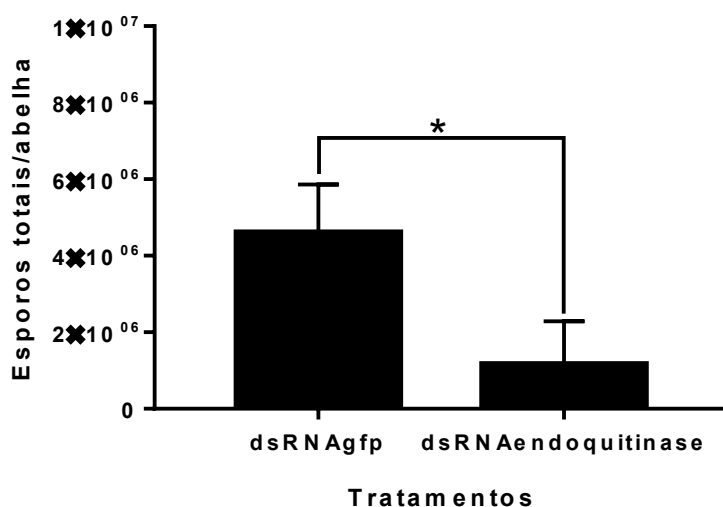


Figura 10. Número de esporos totais de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* oito dias pós-inoculação e tratadas com deGFP (controle) e dsEnd. *diferença significativa pelo teste t, $p < 0,05$).

O teste de viabilidade dos esporos das abelhas tratadas com dsEnd mostrou que houve redução na quantidade de esporos viáveis de 60,6% no controle para 33,3% nas abelhas tratadas com dsEnd (teste t, $t = 3,038$, $p = 0,0071$; Figura 11).

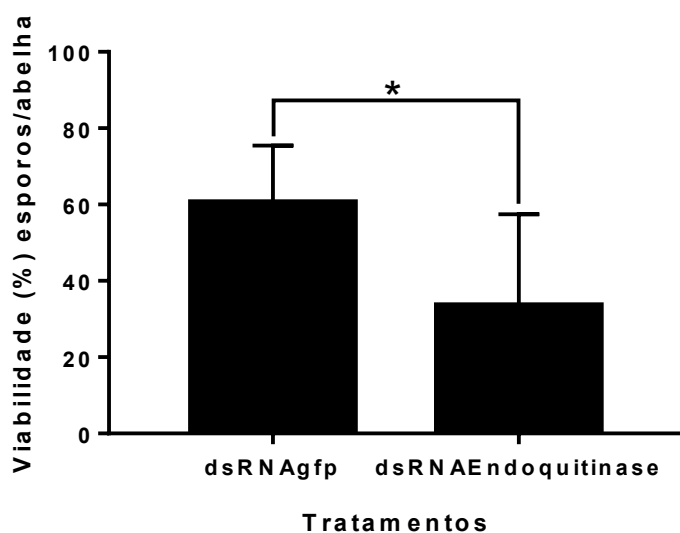


Figura 11. Número de esporos viáveis de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* oito dias pós-inoculação e tratadas com dsGFP (controle) e dsEnd (tratamento). *diferença significativa pelo teste t, $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

A presença de esporos de *N. ceranae* no oitavo dia pós-inoculação, difere do resultado obtido por Forsgren & Fries (2010), que verificou em abelhas a presença de esporos entre 10 e 12 dias pós-inoculação. Segundo Huang et al. 2015 a diversidade genética das abelhas pode influenciar na patogenia (curso e desenvolvimento) da infecção por *N. Ceranae*. Eiri (2015) atribuiu a diferença no tempo de infecção à quantidade de esporos disponibilizados no momento da infecção. Essa diferença é devido ao fato de que em ensaios realizados em laboratório, os resultados são influenciados pelas condições específicas utilizadas, incluindo a duração do experimento, temperatura, método de infecção, umidade, fonte de alimento, tipo de gaiolas, número de abelhas nas gaiolas, etc (Martin-Hernandez et al. 2017). Diferenças genéticas, condições do ensaio de quantidade de esporos disponibilizados, suportam a variação de dias pós inoculação de infecção obtida entre nosso trabalho e os demais presentes na literatura.

A expressão do gene que codifica a endoquitinase em *N. ceranae* no intestino médio de *A. mellifera* é detectada apenas partir do terceiro dia após a inoculação com aumento de expressão ao longo dos dias. Entretanto, é possível que a expressão da endoquitinase tenha início antes do terceiro dia após a infecção, porque o tempo de esvaziamento do alimento no intestino médio das abelhas é entre 12 e 24 h (Wang et al. 2020c), sendo produzida durante o processo de infecção.

Quanto à síntese dsRNA, o sequenciamento da banda resultante da amplificação do primer dsEnd (347 bp) revelou 96,25 % de identidade com a sequência alvo parcial do mRNA (Genbank XM_024475474.1) da endoquitinase de *N. ceranae*. publicadas de acordo com o BLASTN (Altschul et al. 1990). Em geral dsRNAs com >80% de identidade de sequência com genes alvos são eficientes para inibir a síntese da proteína codificada (Chen et al. 2021). Assim, o dsEnd para *N. ceranae* pode ser eficiente para suprimir os transcritos do gene alvo durante a infecção da abelha.

Confirmada a identidade do dsRNA para o gene alvo, juntamente com a o início da sua expressão a partir do 3º dia pós inoculação, foi necessária a definição do dia de tratamento das abelhas com o dsRNA, pois o mecanismo de ação do RNAi é pós-transcricional (Hannon, 2002). Assim, o tratamento das abelhas foi realizado em

um momento anterior ao período que era possível a detecção da expressão do gene que codifica a enzima no terceiro dia pós-inoculação.

Considerando que o par de primers utilizado para amplificação de parte do mRNA da endoquitinase produziu um fragmento compatível com o tamanho esperado na PCR convencional, mas que posteriormente, apresentou uma banda inespecífica de aproximadamente 50 bp no produto de qPCR, impedindo a utilização da técnica, como quantificadora da expressão do gene da endoquitinase, foram realizadas PCR semi-quantitativas para definição do ciclo de amplificação e para quantificação densitométrica em eletroforese em gel de poliacrilamida do gene para endoquitinase de *N. ceranae*.

Para a definição de um ciclo de amplificação anterior ao platô da PCR que é definido como o período em que ocorre a atenuação na taxa de acumulação exponencial do produto, observada em ciclos posteriores de PCR (Kainz, 2000) do gene da endoquitinase foi verificada a presença do gene que codifica a enzima a partir do 36º ciclo de reação. Este resultado sugere obtenção de baixa quantidade de RNAm do gene para endoquitinase no produto extraído das abelhas infectadas com *N. ceranae* e conseqüentemente no cDNA produzido. Quantidades pequenas RNAm de um gene alvo no material extraído, limitam a amplificação por PCR e qPCR (Noutsias et al. 2008). Assim como genes em pouca abundância apresentam limite de ciclo (CT) alto na qPCR (Noutsias et al. 2008), na PCR apresentam amplificação em ciclos tardios. Entretanto como o objetivo da PCR aqui realizada foi definir um ciclo anterior à fase de platô, foi possível estabelecer o ciclo ideal para a análise de amplificação por PCR para o gene da endoquitinase seria o 38º.

A quantificação densitométrica do produto do 38º ciclo de amplificação do gene que codifica a endoquitinase em relação ao gene referência 23S-like de *N. ceranae* nos 3º, 4º, 5º e 6º dias pós-inoculação dos esporos revela que a expressão do gene aumenta ao longo dos dias pós-inoculação de esporos, o que pode estar associado com função da endoquitinase no processo de infecção, permitindo a passagem do esporo através da matriz peritórica. Neste caso, a endoquitinase poderia desorganizar a rede de quitina que forma a matriz peritrófica, a qual é importante para assegurar a permeabilidade (Liu et al. 2019; Oliveira et al. 2019) e a barreira seletiva (Fang et al. 2009; Garcia-Gonzalez et al. 2014) dessa matriz.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% mostra que nas abelhas tratadas com dsEnd 12 e 24 horas após a inoculação dos esporos, não há o amplicom

de 109 bp referente ao gene que codifica essa enzima, mas tem o amplicon do gene referência 23S-ke que, confirma que estavam infectadas com esporos de *N. ceranae*, mas esses não expressam a enzima ou expressam em níveis não detectáveis. Este resultado indica que o dsEnd produzido é adequado como ferramenta de RNAi para suprimir a expressão do gene alvo. A regulação gênica em *N. ceranae* com RNAi tem sido relatada para os genes transportadores de ATP/ADP (Paldi et al. 2010), ao gene que codifica a Dicer (Huang et al. 2019) e a genes relacionados ao mitossomo (Kim et al. 2020), os quais reduziram a proliferação de esporos em *A. mellifera*, indicando que a técnica é eficaz na redução da infecção pelo microsporídeo.

A redução na média de 4x na quantidade de esporos totais e a viabilidade destes de 60,6% para 33,3% no intestino médio de *A. mellifera* oito dias pós inoculação naquelas tratadas com dsEnd em relação ao controle, evidencia efeito do tratamento com RNAi na infecção por *N. ceranae*. A função de regulação do processo de infecção por patógenos, que matriz peritrófica exerce (Kuraishi et al. 2011), corrobora que a endoquitinase possa estar envolvida com a quebra dessa barreira mecânica de quitina e que consequentemente auxilie na infecção. Em seu trabalho, Li et al. 2016 silenciou em até 70% a expressão do gene “nkd”, que regula negativamente a resposta imune de abelhas e reduziu a carga de esporos de *N. ceranae* infectando o hospedeiro. Foi mais um trabalho mostrando que mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, é uma estratégia potente e específica para o controle de infecções de parasitas e patógenos em abelhas. Apresentamos evidências de que a ingestão de dsRNA por abelhas, inibe a taxa de infecção por um parasita intracelular e que a supressão da expressão do gene que codifica a endoquitinase é um mecanismo que eficiente para reduzir a carga parasitária.

6. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram a supressão da expressão do gene que codifica a endoquitinase por RNAi e que o uso de dsEnd reduz a quantidade de esporos totais e viáveis no intestino médio de *A. mellifera*, indicando que a endoquitinase tem função importante no processo de infecção dessa abelha por *N. ceranae*.

REFERÊNCIAS

- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1786–1795, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; & LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, p.403-410, 1990.
- BAINES, D. M. Observations on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria migratoroides* (R. and F.) nymphs. *Acrida*, v. 7, p. 11–21, 1978.
- BEKELE, A. Z.; MOR, S. K; PHELPS, N. B. D.; GOYAL, S. M.; ARMIÉN A. G. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Veterinary Quarterly*, v. 35, n. 1, p. 48–50, 2015.
- CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. Produção de mel. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, p.138, 2002.
- CANNING, E. U.; LOM, J. The Microsporidia of Vertebrates. London: Academic Press, v. 3, p. 289, 1986.
- CHEN J.; PENG Y.; ZHANG H.; WANG K, ZHAO C.; ZHU G.; REDDY PALLI S.; HAN Z. Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA. *RNA Biol*, v.18, n.11, p. 747-1759, 2021.
- COLOSS. Nosema disease: lack of knowledge and work standardization. Disponível em: <<http://www.coloss.org/news/nosemaworkshop-proceedingsonline>>. Acesso em: 05/ 06/2019.
- COUTINHO-ABREU, I.V.; SHARMA, N. K.; ROBLES-MURGUIA, M.; RAMALHO-ORTIGAO, M. Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2013.
- COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, v. 318, n. 5848, p. 283–287, 2007.
- DOUBLET, V.; POESCHL, Y.; GOGOL-DÖRING, A.; ALAUX, C.; ANNOSCIA, D. et al. Unity in defence: Honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2017.
- ELLIS, J. Colony collapse disorder (CCD) in honey bees. *Edis*, n. ENY-150, p. 1–4, 2007.

- EIRI, D. M.; SUWANNAPONG, G.; ENDLER, M., NIEH, J. C. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*, v.10, n.5, 2015.
- FANG, S.; WANG, L.; GUO, W.; ZHANG, X.; PENG, D.; LUO, C.; YU, Z. & SUN, M. *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, p.5237-5243, 2019.
- FERRANDON, D. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Current Opinion in Immunology*, v. 25, n. 1, p. 59–70, 2013.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas liticas. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 871–879, 2005.
- FORSGREN, E.; FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, v. 170, n. 3–4, p. 212–217, 2010.
- FRIES, I.; FENG, F.; DA SILVA, A.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, v. 32, n. 3, p. 356–365, 1996.
- FRIES, I; CHAUZAT, M-P; CHEN, Y-P; DOUBLET, V; GENERSCH, E. et al. Standard methods for *Nosema* research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research*, v. 51, n. 5, p. 28, 2013.
- FUHRMAN, J. A.; LANE, W. S. SMITH, R. F.; PIESENS, W. F.; PERLER, F. B. Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, p. 1548–1552, 1992.
- GARCIA-GONZALEZ, E.; POPPINGA, L.; FÜNFHAUS, A.; HERTLEIN, G.; HEDTKE, K.; JAKUBOWSKA, A. & GENERSCH, E. (2014) *Paenibacillus* larvae chitin-degrading protein PI CBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathogens*, 10, e1004284.

- GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, v.347, n. 6229, 2015.
- HAN, F.; WALLBERG, A.; WEBSTER, M. T. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and Evolution*, v. 2, n. 8, p. 1949–1957, 2012.
- HAN, B.; ZHOU, K.; LI, Z.; SUN, B.; NI, Q.; MENG, X.; ... & ZHOU, C. Characterization of the first fungal glycosyl hydrolase family 19 chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb). *J Eukaryot Microbiol*, v. 63, n.1, p.37–45, 2016.
- HANNON, G. J. RNA interference. *Nature*, v. 418, p. 244–251, 2002.
- HARTL, L.; ZACH, S, SEIDL-SEIBOTH V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 93, n.2, p.533–543, 2012.
- HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. 1, p. 285–302, 2009.
- HEGEDUS D.; TOPRAK U.; ERLANDSON M. Peritrophic matrix formation. *J Insect Physiol*, v.117, 2019.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, v. 280, p. 309–316, 1991.
- HIGES, M.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARTIN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 94, n. 3, p. 211–217, 2007.
- HIGES, M.; JUARRANZ, A.; DIAS-ALMEIDA, J.; LUCENA, S.; BOTIAS, C. et al. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, n. 4, p. 530–536, 2013.
- HIGES, M.; MARTÍN, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 92, p. 93–95, 2006.
- HIRT, R. P.; HEALY, B.; VOSSBRINCK, C. R.; CANNING, E. U.; EMBLEY, T. M. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Current Biology*, v. 7, n. 12, p. 995–998, 1997.

- HORNITZKY, M. Nosema disease: literature review and three year survey of beekeepers part 2. Canberra: Rural Industry Research and Development Corporation, 2008.
- HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E.; BORST, D. W. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 174, n. 6, p. 731–739, 1994.
- HUANG, W. F.; SOLTER, L.; ARONSTEIN, K.; HUANG, Z. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of invertebrate Pathology*, v.124, p. 107-113, 2015.
- HUANG, Q.; LI, W.; CHEN, Y.; RETSCHNIG-TANNER, G.; YANEZ, O.; NEUMANN, P.; & EVANS, J. D. Dicer regulates *Nosema ceranae* proliferation in honeybees. *Insect Molecular Biology*, v.28, n.1, p.74–85, 2019.
- JARIYAPAN, N.; SAEUNG, A.; INTAKHAN, N.; CHANMOL, W.; SOR-SUWAN, S. et al. Peritrophic matrix formation and *Brugia malayi* microfilaria invasion of the midgut of a susceptible vector, *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, v. 112, n. 7, p. 2431–2440, 2013.
- KAINZ, P. The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, v. 1494, n. (1-2), p.23–27, 2000.
- KATINKA, M. D.; DUPRAT, S.; CORNILLOT, E.; MÉTÉNLER, G.; THOMARAT, F. et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, v. 414, p. 450–453, 2001.
- KERR, W. E. The history of introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*, v. 39, n. 2, p. 3–5, 1967.
- KIM, I.; KIM, D.; GWAK, W.; WOO, S. Increased Survival of the Honey Bee *Apis mellifera* Infected with the Microsporidian *N. ceranae* by Effective Gene Silencing. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*v. 105, p.e21734, 2020.
- KLEE, J.; BESANA, A.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A. et al. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, n. 96, p. 1–10, 2007.
- KLEIN, A. M.; VASSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for

- world crops. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 2007.
- KUDO, R. On the nature of structures characteristic of Cnidosporidian spores. Transactions of the American Microscopical Society, v. 40, n. 2, p. 59–74, 1921.
- KURAIISHI, T.; O. BINGGELI, O; OPOTA, N. BUCHON, AND B. LEMAITRE. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, v. 108, p. 15966–15971, 2011.
- KUREK-GÓRECKA A.; GÓRECKI M.; RZEPECKA-STOJKO A.; BALWIERZ R.; STOJKO J. Bee Products in Dermatology and Skin Care. Molecules, v.25, n.3 p.556, 2020.
- KURZE, C.; LE CONTE, Y; DUSSAUBAT, C.; ERLER, S.; KRYGER, P. et al. *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. PLoS ONE, v. 10, n. 10, p. 4–11, 2015.
- KURZE, C.; MAYACK, C.; HIRCHE, F.; STANGL, G. I.; LE CONTE, Y. et al. *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. Parasitology Research, v. 115, n. 6, p. 2381–2388, 2016.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. Annual Review of Entomology, v. 42, p. 525–550, 1997.
- LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E. A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): structural study of the peritrophic membrane. Journal of Invertebrate Pathology, v. 96, p. 183–186, 2007.
- LI W.; EVANS J. D.; HUANG Q.; RODRÍGUEZ-GARCÍA.; LIU J, HAMILTON M.; GROZINGER C, M.; WEBSTER T, C.; S, U, S.; CHEN Y, P. Silencing the Honey Bee (*Apis mellifera*) Naked Cuticle Gene (*nkd*) Improves Host Immune Function and Reduces *Nosema ceranae* Infections. Appl Environ Microbiol, v.82, n.22, p.6779-6787, 2016.
- LIU, X., COOPER, A.W., ZHANG, J. AND ZHU, K, Y. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix. Journal of Insect Physiology, v. 114, p. 109-115, 2019.
- LIU, H.; LI, M.; HE, X; CAI, S.; HE, X. et al. Transcriptome sequencing and characterization of ungerminated and germinated spores of *Nosema bombycis*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, v. 48, n. 3, p. 246–256, 2015.

- LIU, X.; ZHANG, H.; LI, S.; ZHU, K, Y.; MA, E. et al. Characterization of a midgut-specific chitin synthase gene (LmCHS2) responsible for biosynthesis of chitin of peritrophic matrix in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 12, p. 902–910, 2012.
- LOURENÇO, A.P.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K.R.; FREITAS, N.H.A.; MESSAGE, D.; BITONDI, M.G.; SIMÕES, Z.L.P. AND TEIXEIRA; E.W. Immunity and physiological changes in adult honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*: The natural colony environment. *Journal of Insect Physiology*, v.132, 202
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M.; SAGASTUME, S.; JUARRANZ, A.; DIAS-ALMEIDA, J. et al. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE*, v. 12, n. 2, p. 1–17, 2017.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R.; BARTOLOMÉ C.; CHEJANOVSKY N.; LE CONTE Y.; DALMON A.; DUSSAUBAT C.; GARCÍA-PALENCIA P.; MEANA A.; PINTO M.A.; SOROKER V.; et. al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: A 12 years post-detection perspective. *Environ. Microbiol*, v.20, p.1302–1329, 2018.
- MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 100, p. 185–188, 2009.
- MEDICI, S.K.; SARLO, E. G.; PORRINI, M. P.; BRAUNSTEIN, M.; EGUARAS, M. J. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research*, v. 110, n. 2, p. 859–864, 2012.
- MERZENDORFER, H.; KELKENBERG, M.; MUTHUKRISHNAN, S. PERITROPHIC MATRICES. In: Cohen, E., Moussian, B. (eds) *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer, Cham, 2016.
- MOUSSIAN, B. The apical plasma membrane of chitin-synthesizing epithelia. *Insect Science*, v. 20, n. 2, p. 139–146, 2013.
- NOUTSIAS M.; ROHDE M.; BLOCK A.; KLIPPERT K.; LETTAU O.; BLUNERT K.; HUMMEL M.; KÜHL U.; LEHMKUHL H.; HETZER R.; RAUCH U.; POLLER W.; PAUSCHINGER M.; SCHULTHEISS HP.; VOLK HD.; KOTSCH K. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies, *BMC Mol Biol*, v.9, n.3, 2008.
- OIE Office international des epizooties. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/>>. Acesso em: 06/05/2019, 2019.

- OLIVEIRA, A.H.; FERNANDES, K.M.; GONÇALVES, W. G.; ZANUNCIO, J.C. AND SERRÃO, J.E. A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. *Arthropod Structure & Development*, v.53, 2019.
- PALDI, N.; GLICK, E.; OLIVA, M.; ZILBERBERG, Y.; AUBIN, L.; PETTIS, J.; EVANS, J. D. Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.17, p.5960–5964, 2010.
- PARVANOV, P.; RUSENOVA, N. Etiology and clinic epidemiological profile of apiaries with colony collapse disorder-like symptoms in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, v. 17, n. 3, p. 199–206, 2014.
- PERTSEMLIDIS, A.; FONDON, J.W. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome biology*, v.2, n. reviews2002, 2002.
- PETERS, W. Formation and structure. In: BRADSHAW, S. D. et al. (Eds.). *Peritrophic Membranes*. Berlin: Springer-Verlag, p. 248, 1992.
- PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.
- PIMENTA, P. F.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, v. 115, n. 4, p. 359-369, 1997.
- PORRINI, L. P.; PORRINI, M. P.; GARRIDO, M. P.; MÜLLER, F.; ARRASCAETA, L.; FERNÁNDEZ IRIARTE, P. J.; & EGURAS, M. J. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates obtained from various *Apis mellifera* morphotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.168, n.4, p.286–294, 2020.
- POTTS, S.G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T.; AIZEN, M.A.; BIESMEIJER, J.C.; BREEZE, T.D.; DICKS, L.V.; GARIBALDI, L.A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN [J. A.](#) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, v.540, p. 220–229, 2016.
- RAMOS, A.; MAHOWALD, A.; JACOBS-LORENA, M. Peritrophic matrix of the black fly *Simulium vittatum*: formation, structure, and analysis of its protein components. *Journal of Experimental Zoology*, v. 268, p. 269–281, 1994.

- RICHARDS, A. G.; RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. *Annual Review of Entomology*, v. 22, p. 219–240, 1977.
- SAITO, M.; KOBAYASHI, M.; IWABUCHI, S., MORITA, Y., TAKAMURA, Y., TAMIYA, E. DNA Condensation Monitoring after Interaction with Hoechst by Atomic Force Microscopy and Fluorescence Spectroscopy *Journal of Biochemistry*, v.136, p.81–823, 2004.
- SAKAGAMI, S. Untersuchungen über die Arbeitsteilung in einen Zwergvolk der Honigbienen. *Beitrage zur Biologie des Bienenvolkes, Apis mellifera L., I.* *Japanese Journal of Zoology*, v. 11, p. 117–185, 1953.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D, W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, therd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2000.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; & ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v.9, n.7, p. 671–675, 2012.
- SCHOTTELIUS, J.; SCHMETZ, C.; KOCK, N. P.; SCHÜLER, T.; SOBOTTKA, I. et al. Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1401–1406, 2000.
- SHAHABUDDIN, M.; TOYOSHIMA, T.; AIKAWA, M.; KASLOW, D. C. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 9, p. 4266–4270, 1993.
- SILVA, F.W.S.; ARAUJO, L.S.; AZEVEDO, D.O.; SERRÃO, J.E. AND ELLIOT, S.L. Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiological Entomology*, v. 41, p.121-126, 2016.
- SPRAGUE, V. Classification and phylogeny of the microsporidia. In: Bulla L.A., Cheng T.C. (Eds) *Comparative Pathobiology*. Boston: Springer, 1977.
- STEFANINI, M.; DEMARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, v. 216, p.173–174, 1967.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 47, n. 2, p. 47–61, 2001.
- USDA. Agricultural Research Service. Honey Bees and Colony Collapse Disorder. Disponível em <<http://ars.usda.gov/news/docs.htm?docid=15572>>. Acesso em: 24/06/2019.

- VAN ENGELSDORP, D.; EVANS, J. D., SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. PLoS ONE, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.
- VÁVRA, J. Structure of the Microsporidia. In: Bulla, L. A.; Cheng, T. C. (Eds.). Biology of the Microsporidia. Boston, MA: Springer US, p. 1–84, 1976.
- VIDAU, C.; PANEK, J.; TEXIER, C.; BIRO, D. G.; BELZUNCES, L. P. et al. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae* - infected honeybees reveals manipulation of key host functions. Journal of invertebrate pathology, v. 121, p. 89–96, 2014.
- WAGENER-HULME, C.; KUEHN, J. C.; SCHULZ, D. J.; ROBINSON, G. E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. Journal of comparative physiology, v. 184, n. 5, p. 471–479, 1999.
- WANG, Y.; MA, L. T.; LIU, Z. G.; WANG, H. F.; and XU, B. H. Processing time of three kinds of bee pollen in the digestive tract of *Apis mellifera* L. Chinese Journal of Applied Entomology, v. 57, p.1111–1119, 2020c.
- WEBSTER, T. C. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. American Bee Journal, v. 133, p. 869–870, 1993.
- WILLIAMS, B. A. P. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. Cellular Microbiology, v. 11, n. 11, p. 1551–1560, 2009.
- WILLIAMS, B. A. P.; HIRT, R. P.; LUCOCQ, J. M.; EMBLEY, T. M. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. Nature, v. 418, p. 865–869, 2002.
- WILLIAMS, G.R.; ALAUX, C.; COSTA, C.; CSAKI, T.; DOUBLET, V.; EISENHARDT, D.; FRIES, I.; KUHN, R.; MCMAHON, D.P.; MEDRZYCKI, P.; MURRAY, T.E.; NATSOPOULOU, M.E.; NEUMANN, P.; OLIVER, R.; PAXTON, R.J.; PERNAL, S.F.; SHUTLER, D.; TANNER, G.; VAN DER STEEN.; J.J.M. AND BRODSCHNEIDER, R. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. Journal of Apicultural Research, v.52, n.1, p.1–36, 2013.
- WITTNER, M.; WEISS, L. M. (Eds.). The Microsporidia and Microsporidiosis. [s.l.] American Society of Microbiology, 1999.
- ZANDER, E. Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. Münchener Bienenzeitung, v. 31, p. 196–204, 1909.