

VIRGÍNIA TELES DOHANIK

**O TRANSPORTE DE VITELOGENINA É MEDIADO POR
RECEPTORES DE MEMBRANA NAS CÉLULAS FOLICULARES DA
ABELHA *Apis mellifera* E DA VESPA *Polistes simillimus***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

D655t
2016

Dohanik, Virgínia Teles, 1992-
O transporte de vitelogenina é mediado por receptores de membrana nas células foliculares da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polistes simillimus* / Virgínia Teles Dohanik. – Viçosa, MG, 2016.
vi, 40f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.31-40.

1. Inseto - Reprodução. 2. *Apis mellifera*. 3. *Polistes simillimus*. 4. Proteínas. 5. Vitelogenina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.7

VIRGÍNIA TELES DOHANIK

**O TRANSPORTE DE VITELOGENINA É MEDIADO POR
RECEPTORES DE MEMBRANA NAS CÉLULAS FOLICULARES DA
ABELHA *Apis mellifera* E DA VESPA *Polistes simillimus***

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

APROVADA: 18 de fevereiro de 2016.

Lucio Antônio de Oliveira Campos

Luis Carlos Martinez Castrillon

José Eduardo Serrão
(Orientador)

DEDICATÓRIA

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isto é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade”.

(Santo Agostinho)

Dedico

*Á minha mãe, Angela,
e aos meus orientadores Edmilson e Serrão,
Pelo apoio, confiança, dedicação,
e companheirismo.
Muito obrigada!*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente á Deus, pela força de cada dia.
 - À Universidade Federal de Viçosa pelo ensino de qualidade.
 - Ao Serrão e Leandro pelo incentivo, companheirismo, paciência, excelente orientação e pelo aprendizado adquirido ao trabalhar com vocês! Muito Obrigada!
 - À toda equipe do Núcleo de Microscopia pelo carinho, aprendizado e oportunidade de realização dos meus trabalhos.
 - À CAPES pelo auxílio financeiro.
 - Aos meus pais/orientadores Edmilson e Luciane por todo carinho e compreensão, sempre acreditando em mim e me instruindo para seguir o melhor caminho.
 - À minha amada mãe Angela pelo amor incondicional, apoio e confiança. Sei que não mediu esforços e sempre estive ao meu lado acompanhando cada passo durante esse percurso. Obrigada por me ajudar a tornar esse sonho realidade! Amo você!
 - À minha querida amiga Thainá, que contribuiu muito para meu crescimento! Independente da distância, sempre presente em minha vida, durante essa jornada me acompanhou e vibrou comigo nas vitórias e me ajudou nos momentos difíceis.
 - À Alessandra, Gabriela, Vanessa, Fernanda, Daniela, Jones e João Paulo pelo companheirismo, amizade, carinho e principalmente paciência. Já compartilhamos aflições e vitórias ao longo de nossa caminhada e muito sucesso ainda está por vir para todos nós.
 - À Pollyana, Patrícia, Dodora, Luanda, Wagner, Marcelo, Helen, Glenda e Déia por tornarem mais leve essa caminhada, por me permitir fazer parte de um time vencedor. Muito obrigada pelo aprendizado, preocupação e momentos de alegria.
- Obrigada a todos vocês por contribuírem para essa realização, assim sigo meu caminho na certeza de que nunca caminharei sozinha!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
3. Objetivo	13
4. Material e Métodos	14
4.1. Abelhas	14
4.2. Obtenção do receptor para vitelogenina	14
4.3. Formação de células competentes e transformação das bactérias	14
4.4. Expressão e purificação da proteína receptor de vitelogenina (VgR)	15
4.5. SDS-PAGE	16
4.6. Produção de anticorpos policlonais anti-VgR recombinante	16
4.7. Western blotting	16
4.8. Imunofluorescência	17
4.9. Imunocitoquímica	18
5. Resultados	20
6. Discussão	27
7. Referências Bibliográficas	31

RESUMO

DOHANIK, Virgínia Teles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **O transporte de vitelogenina é mediado por receptores de membrana nas células foliculares da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polistes simillimus*.** Orientador: José Eduardo Serrão.

A vitelogenina é uma lipoglicoproteína sintetizada no corpo gorduroso, liberada na hemolinfa e captada pelos ovócitos durante a vitelogênese. O receptor de vitelogenina (VgR) é responsável pela absorção da vitelogenina durante a formação dos ovos nos insetos. O ovócito em desenvolvimento é circundado pelo epitélio folicular e quando este começa a acumular vitelogenina são formados espaços intercelulares entre as células foliculares, fenômeno denominado como patência. Em algumas espécies de Hymenoptera, os folículos vitelogênicos possuem vitelogenina no citoplasma das células foliculares, indicando uma rota transcelular para o transporte de vitelogenina. Desta forma, este estudo verificou se há presença de VgR nas células foliculares dos ovários da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polistes simillimus* para testar se a vitelogenina é transportada pela rota transcelular nestes insetos. Um anticorpo anti-VgR específico foi produzido a partir de uma sequência altamente conservada desse receptor, esta foi expressa em *E. coli* transformadas (pET BL21), representada por um fragmento recombinante correspondente a segunda região repetitiva YWTD. As análises de Western Blotting confirma que o anticorpo produzido foi específico para VgR e que esta proteína esteve presente nos extratos de proteínas de membrana dos ovários de ambas espécies. As análises de imunofluorescência associadas á imunocitoquímica, evidenciaram a presença de VgR na membrana plasmática apical e basal das células foliculares em regiões vitelogênicas dos ovaríolos de *A. mellifera* e *P. simillimus*, indicando que a proteína VgR pode ter sido transportada de um domínio basal para o apical da célula com consequente liberação no espaço perivitelínico, evidenciado pela presença de figuras mielínicas contendo VgR nesta região. Estes dados suportaram a hipótese de que a vitelogenina foi transportada via receptor pela rota transcelular nas células foliculares de abelhas e vespas.

ABSTRACT

DOHANIK, Virgínia Teles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2016. **Vitellogenin transport is mediated by membrane receptors on bees *Apis mellifera* and wasp *Polistes simillimus* follicular cells.** Adviser: José Eduardo Serrão.

The vitellogenin is a lipoglycoprotein synthesized in the fat body, released to the hemolymph and absorbed by oocytes during vitellogenesis. The vitellogenin receptor (VgR) is responsible for the absorption of vitellogenin during egg formation in insects. The developing oocyte is surrounded by a follicular epithelium and during vitellogenin uptake are formed intercellular spaces between the follicular cells, a phenomenon termed as patency. In some Hymenoptera, vitellogenic follicles show vitellogenin in the cytoplasm of follicular cells suggesting a transcellular route of vitellogenin until oocyte surface. Thus, this study examined the possible presence of VgR in the follicular cells of honey bee *Apis mellifera* and wasp *Polistes simillimus* ovaries to verify whether vitellogenin is transported by the transcellular route in these insects. A specific anti-VgR antibody was produced from a highly conserved sequence of this receptor (fragment of the second repeat region YWTD), expressed in transformed *E. coli* (pET BL21). The Western blotting analysis confirmed that the antibody was specific for VgR and that this protein was present in membrane protein extracts from ovaries of both species. Immunofluorescence analyzes associated with immunocytochemistry showed VgR in the apical and basal plasma membrane of follicular cells of vitellogenic follicles of *A. mellifera* and *P. simillimus*. This study suggest that the protein may have been transported from basal to apical cell membrane domain with subsequent release in the perivitelline space, evidenced by the presence of myelin figures with VgR in this region. These data support the hypothesis that the vitellogenin was transported via receptor by the transcellular route in the follicular cells of bees and wasps.

1. Introdução

A vitelogenese é um processo chave que controla a reprodução dos insetos, assim a produção e acumulação da proteína de vitelo, a vitelogenina, tem papel fundamental para o desenvolvimento de ovócitos (Dhadialla et al., 1992).

A vitelogenina é uma lipoglicoproteína sintetizada no corpo gorduroso, liberada na hemolinfa e captada pelos ovócitos, onde são armazenadas na forma de vitelinas (Engelmann, 1979; Raikhel & Dhadialla, 1992; Tufail & Takeda, 2008). Sua síntese é desencadeada pelo hormônio juvenil atuando direta ou indiretamente sobre o corpo gorduroso, fazendo com que este órgão e os ovários em repouso respondam a outros sinais (Glinka & Wyatt, 1996; Wyatt et al., 1996; Azevedo et al., 2016).

A internalização de vitelogenina para o ovócito é alcançada por endocitose mediada por receptor (Sappington & Raikhel, 1998; Swevers et al., 2005). Os receptores de vitelogenina (VgRs) são representantes da família de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), que esta estruturalmente e funcionalmente definida por domínios modulares, que estão frequentemente codificados por exóons distintos no gene correspondente (Raikhel & Dhadialla, 1992; Sappington & Raikhel, 1998; Tufail & Takeda, 2007).

O epitélio folicular que reveste o ovócito em desenvolvimento pode formar espaços intercelulares, embora as células permaneçam juntas por junções celulares, esses espaços permitem o acesso direto da hemolinfa a superfície do ovócito, esse fenômeno é conhecido como patência (Anderson & Telfer, 1970).

A patência tem sido relatada em alguns insetos como *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) (Telfer, 1961), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Davey, 1981),

Locusta migratoria (Orthoptera) (Lauverjat et al., 1984) e em mosquitos (Raikhel & Lea, 1991), sugerindo uma rota paracelular para o transporte de vitelogenina até a superfície celular.

Em *Apis mellifera* (Hymenoptera) foi relatada a presença de canais no contato entre três células foliculares, o qual conecta o espaço intercelular com o espaço perivitelínico apresentando grânulos elétron densos, os quais também estavam presentes no citoplasma de células foliculares, sugerindo uma rota transcelular para a absorção de vitelogenina (Fleig, 1995). Desta forma, a vitelogenina em *A. mellifera* poderia ser transportada por ambas as rotas, paracelular ou transcelular através das células foliculares.

Em espécies de Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas), foi evidenciada a presença de vitelogenina no citoplasma de células foliculares, no espaço perivitelínico e na superfície do ovócito (Ronnau et al., 2015).

Embora haja relatos da presença de vitelogenina no citoplasma de células foliculares de Hymenoptera sociais e sua possível rota transcelular, isso só seria possível com a presença de VgRs na membrana plasmática das células foliculares. Desta forma, este estudo verificou se há um receptor para vitelogenina na membrana das células foliculares que permita a internalização da mesma, seguida de liberação no espaço perivitelínico a partir de onde a vitelogenina é endocitada pelo ovócito.

2. Revisão da Literatura

Os insetos eussociais incluem abelhas, formigas e 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 em que são capazes de contribuir para o trabalho na colônia (Wilson, 1971).

Nas colônias de insetos altamente eussociais, a integração é complexa e envolve uma variedade de padrões comportamentais, feromônios e adaptações fisiológicas, assim as colônias sobrevivem por muito tempo com o armazenamento de alimento no ninho (Michener, 1974).

As fêmeas dos himenópteros (abelhas, formigas e vespas) podem se reproduzir mesmo que não estejam fecundadas, geralmente formando machos devido ao sistema haplodiploide de determinação dos sexos (Holldobler & Wilson, 1990; Gobin et al., 1998). Nesses insetos, a rainha geralmente monopoliza a reprodução diploide e as operárias não acasalam, porém, em várias espécies elas mantêm a capacidade de produzir ovos não fertilizados. A ativação da atividade ovariana em operárias pode estar ligada a ausência de uma rainha (Gobin et al., 1998; Dietemann & Peeters, 2000; Naeger et al., 2013; Ronai, 2015; Tan et al., 2015).

Em colônias de vespas cujas colônias são fundadas por uma fêmea, não existe sociedade até o nascimento da primeira progênie, mas em colônias com múltiplas fundadoras a organização social e divisão do trabalho são questões

cruciais, tanto na fase pré-emergente quanto na pós-emergente (Ross & Matthews, 1991). As fêmeas de espécies de vespas *Polistes* podem variar no tamanho, mas quando emergem, todos os adultos são capazes de acasalar e colocar ovos haploides (machos) ou diploides (fêmeas). Entretanto, fêmeas podem permanecer como operárias ou subordinadas por toda sua vida ou podem também se tornar rainhas se uma rainha existente morre ou se ela funda uma nova colônia (West-Eberhard, 1969; Hughes et al., 1987; Peters et al., 1995). Indivíduos da colônia competem por seu pela reprodução, formando uma hierarquia de dominância social, onde fêmeas recém-emergidas são classificadas como de baixo potencial, as operárias são classificadas como intermediárias e rainhas são classificadas como superiores (West-Eberhard, 1969; Giray et al., 2005). A hierarquia social é mantida através de agressão física por indivíduos de classe superior (Hughes et al., 1987), por idade ou ordem de chegada no ninho (Hughes & Strassman, 1988).

As castas das abelhas altamente eussociais são diferentes umas das outras no comportamento, na fisiologia, no tamanho do corpo e também em estruturas externas (Michener, 1974; Cruz-Landim, 2000). As abelhas eussociais possuem um alto nível organizacional, geralmente apresentando uma rainha com função reprodutiva, operárias realizando a manutenção da colônia e machos que são responsáveis por fecundar a rainha (Snodgrass, 1956; Michener, 1974). As abelhas altamente eussociais estão divididas em dois grupos dentro da família Apidae: as abelhas sem ferrão (Meliponini) e as abelhas melíferas (Apini) (Michener, 2000).

Nas abelhas altamente sociais, as rainhas não possuem estruturas para a coleta, manipulação de pólen e comportamento de forrageamento, sendo incapazes de sobreviver por um longo período fora da colônia, não apresenta

comportamento de defesa contra inimigos e possuem ovários desenvolvidos (Michener, 1974).

As operárias de abelhas 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, sendo o primeiro fenótipo caracterizado pelas 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 melhorem, estas são referidas como abelhas de inverno (Sekiguchi & Sakagami, 1966; Omholt & Amdam, 2004; Seehuus et. al, 2007). Em algumas espécies, os ovários das operárias geralmente não se desenvolvem, mas quando são ativados produzem ovos tróficos que irão alimentar a rainha ou ovos que originam machos. As operárias de *Apis mellifera* podem desenvolver seus ovários em colmeia órfã ou quando a população está muito grande (Groot & Voogd, 1954; Michener, 1974).

O sistema reprodutor feminino dos insetos consiste basicamente em um par de ovários que se abrem em um par de ovidutos laterais que se conectam a um oviduto comum que termina na vagina onde se abre o ducto da espermateca a qual pode estar associado a um par de glândulas acessórias (Snodgrass, 1935; Chapman, 2013).

O ovário esta presente no abdômen dos insetos, localizado na região látero-dorsal ao intestino, enquanto os ovidutos laterais e o oviduto comum são ventrais a este órgão (Snodgrass, 1935). Cada ovário consiste de unidades

funcionais denominadas ovaríolos, no interior dos quais os ovócitos se desenvolvem (Chapman, 2013).

Os ovaríolos podem ser classificados em dois tipos: panoísticos, no qual não existem células nutridoras associadas aos ovócitos e todas as células germinativas se diferenciam em ovócitos que serão subseqüente envolvido por células foliculares; e meroísticos, no qual as células nutridoras estão presentes (Snodgrass, 1935; Rockstein, 1973; Chapman, 2013). Entretanto, existem dois tipos de ovaríolos meroísticos: telotrófico, no qual as células nutridoras permanecem no trofário e o politrófico, no qual as células nutridoras permanecem associadas a cada ovócito e estão confinadas dentro do folículo (Chapman, 2013).

Os ovaríolos meroísticos politróficos estão presentes em Hymenoptera e em outros insetos holometábolos, exceto alguns Coleoptera e Siphonoptera que apresentam ovaríolos telotróficos (Snodgrass, 1935; Chapman, 2013).

Os ovaríolos politróficos podem ser divididos em quatro regiões: filamento terminal composto por tecido conectivo oriundo de cada porção distal dos ovaríolos; germário que consiste de uma massa de células germinativas primordiais ou ovogônias que formarão células nutridoras, ovócitos e células pré-foliculares que originam as células foliculares (Snodgrass, 1935). Abaixo o germário ocorre o vitelário, onde há o amadurecimento e a deposição de vitelo no ovócito seguido do pedicelo que é um tubo curto na base do ovaríolo que o conecta ao oviduto lateral (Snodgrass, 1935; Lisboa et al., 2005; Gullan & Cranston, 2010; Chapman, 2013).

Durante as fases iniciais do crescimento de ovócitos, mRNAs e ribonucleoproteínas são produzidas pelas células nutridoras e transportadas para os

ovócitos, posteriormente os ribossomos e outros componentes principais do euplasma são transferidos, em *Drosophila* esse movimento faz com que o ovócito quase dobre o seu volume (Chapman, 2013). Porém, o euplasma geralmente constitui menos de 10% do conteúdo total do ovócito, os 90% restantes são constituídos pelo vitelo que consiste em grande parte de lipídeos e proteínas. Os lipídeos compreendem 40% do peso seco do ovócito e a maior parte é armazenado na forma de triacilglicerol, enquanto que 60-90% das proteínas do vitelo é derivada da vitelogenina (Chapman, 2013).

A proteína precursora de vitelo é uma lipoglicoproteína sintetizada no corpo gorduroso, liberada na hemolinfa e captada pelos ovócitos, onde são armazenadas na forma de vitelinas, que serão a principal fonte de nutriente para o embrião (Engelmann, 1979; Raikhel & Dhadialla, 1992; Tufail & Takeda, 2008).

Em abelhas a vitelogenina é um polipeptídeo monomérico de cerca de 180 kDa (Wheeler & Kawooya, 1990) e representa mais de 50% das proteínas presentes na hemolinfa em rainhas fisogástricas (Hartfelder & Engels, 1998). Porém foi encontrada uma grande quantidade desta proteína na hemolinfa de insetos que não produzem ovos, indicando outras possíveis funções para a vitelogenina que não estão correlacionadas a nutrição do embrião (Adams et al., 2002; Piulachs et al., 2003; Guidugli et al., 2005, Corona et al., 2007; Seehuus et al., 2007; Azevedo et al., 2011; 2016; Libbrecht et al., 2013).

A vitelogenina tem sido usada como um parâmetro para avaliar a fertilidade da fêmea de insetos. Em *A. mellifera*, a vitelogenina é encontrada na hemolinfa de rainhas um pouco antes delas emergirem, permanecendo ao longo de suas vidas, enquanto operárias apresentam baixa quantidade de vitelogenina em sua hemolinfa (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Barchuk et al., 2002). A

vitelogenina também pode ser encontrada na hemolinfa de machos (Trenczek et al., 1989; Barchuk et al., 2002) e ser produzida em outros órgãos tais como glândulas hipofaríngeas (Seehuus et al., 2007) e ovários de alguns dípteras (Raikhel & Dhadialla, 1992).

Alguns estudos com abelhas têm relacionado à vitelogenina a funções na integração da fisiologia individual com o ambiente social, atuando como principal regulador da vida individual de abelhas operárias, através de propriedades anti-imunosenesescência como transporte de zinco e antioxidantes (Amdam et al., 2005; 2006). Em outros insetos foi relatada uma ligação com o transporte de carboidratos, lipídeos, fosfatos, vitaminas e hormônios (Sappington & Raikhel, 1998).

O processo de acumulação de vitelo no ovócito é denominado de vitelogênese. A rápida acumulação de vitelo ocorre no ovócito terminal de cada ovariolo, no vitelário, e resulta no aumento do tamanho do ovócito e seu completo desenvolvimento (Gullan & Cranston, 2010; Chapman, 2013). Porém, o termo vitelogênese também é usado para descrever a síntese de vitelogenina (Vg) a partir do corpo gorduroso e sua completa absorção pelo ovócito via endocitose mediada por receptor sendo que, todo o processo está sob o controle do hormônio juvenil e/ou ecdisona (Engelmann, 1979; Raikhel & Dhadialla et al., 1992; Fleig, 1995; Sappington & Raikhel, 1998; Swevers et al., 2005; Tufail & Takeda, 2008).

A síntese de vitelogenina é desencadeada pelo hormônio juvenil atuando diretamente ou indiretamente sobre o corpo gorduroso, fazendo com que este órgão e os ovários em repouso respondam a outros sinais (Glinka & Wyatt, 1996; Wyatt et al., 1996; Azevedo et al., 2016).

Em rainhas de abelhas, o hormônio juvenil e a ecdisona podem ter perdido suas funções gonadotróficas no adulto e o hormônio juvenil é sugerido para regulação da divisão de trabalho, comportamento social e funcionamento adequado da colônia (Robinson & Vargo, 1997; Guidugli et al., 2005; Lu et al., 2009)

A vitelogenina tem papel fisiológico fundamental em insetos altamente eussociais, porém como essa proteína regula tais funções permanece em discussão. Uma possível resposta para esta questão seria a presença de receptores de vitelogenina em diferentes células do corpo dos insetos (Hartfelder et al., 2006). O Receptor de Vitelogenina (VgR) é responsável pela absorção da vitelogenina durante a formação dos ovos nos insetos (Lu et al., 2009).

Em *Solenopsis invicta* (Formicidae), o receptor de vitelogenina possui uma massa molecular de aproximadamente 202 KDa, outros insetos analisados por western blotting com anticorpo específico, também apresentaram massa molecular semelhante para o VgR (Dhadialla et al., 1992; Lu et al., 2009).

As sequências de cDNA de VgRs foram identificadas em *Drosophila melanogaster* (Schonbaum et al., 1995), *Aedes aegypti* (Sappington et al., 1996), *Solenopsis invicta* (Chen et al., 2004), *Bombyx mori* (Lin et al., 2005), *Periplaneta americana* (Tufail & Takeda, 2005), *Blattella germanica* (Ciudad et al., 2006), *Leucophaea maderae* (Tufail & Takeda, 2007), *Spodoptera litura* (Krishnan et al., 2008).

Em *Nilaparvata lugens* (GU 723297), *Anopheles gambiae* (EAA 06264), *Nasonia vitripennis* (XM_001602904), *Apis mellifera* (XM_001121707), *Tribolium castaneum* (XM_963810) e *Acyrtosiphon pisum* (XM_001944117)

são conhecidas às sequências genômicas completas para os receptores de vitelogenina (dados coletados em GenBank database).

Os VgRs são representantes da família de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) presentes em vertebrados e invertebrados (Raikhel & Dhadialla, 1992; Sappington & Raikhel, 1998).

A família de receptores LDLR está estruturalmente e funcionalmente definida por domínios modulares, que estão frequentemente codificados por éxons distintos no gene correspondente (Tufail & Takeda, 2007). Esses domínios modulares são: i) repetição de ligação com seis resíduos de cisteína cada; ii) repetição de fator de crescimento epidérmico, também 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 & Takeda, 2005; 2007) para internalização do receptor através de vesículas revestidas por clatrina (Goldstain et al., 1985; Chen et al., 1990).

A maioria da família LDLR está envolvida na endocitose mediada por receptores de lipoproteínas (Goldstain & 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 papel na transdução de sinais extracelulares e contribui para a migração neuronal, transmissão sináptica e desenvolvimento do embrião (Hiesberguer et al., 1999).

No ovariolo, o ovócito em desenvolvimento é circundado pelo epitélio folicular, mas quando o ovócito começa a acumular vitelogenina, extensos

espaços intercelulares ocorrem entre as células foliculares, embora as células permaneçam em contato umas com as outras por junções celulares, fenômeno conhecido como patência (Anderson & Telfer, 1970). Esses espaços permitem o acesso direto da hemolinfa a superfície do ovócito. Assim a vitelogenina é endocitada seletivamente a partir da hemolinfa, com a participação de receptores específicos na membrana plasmática do ovócito que podem ser reciclados para a superfície da membrana (Chapman, 2013). A patência tem sido relatada em alguns insetos, como na mariposa *Cecropia* sp. (Lepidoptera) (Anderson & Telfer, 1970), *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) (Telfer, 1961), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Davey, 1981), *Locusta migratoria* (Orthoptera) (Lauverjat et al., 1984) e em mosquitos (Raikhel & Lea, 1991), sugerindo uma rota paracelular para o transporte de vitelogenina até a superfície do ovócito.

Em *A. mellifera* foi relatada a presença de canais entre as células foliculares, sugerindo um mecanismo de transporte para a vitelogenina até o espaço perivitelínico (Engels, 1973 apud Fleig, 1995). No contato entre três células foliculares uma com as outras, há um pequeno canal, o qual conecta o espaço intercelular com o espaço perivitelínico apresentando uma substância eletrodensa amorfa, entretanto as células foliculares continuam apresentando grandes grânulos elétron densos em sua parte central e pequenos grânulos na parte apical, e o conteúdo destes grânulos é exocitado no espaço perivitelínico e são observadas muitas vesículas endocíticas no ovócito, sugerindo uma rota transcelular para a vitelogenina (Fleig, 1995). Desta forma, a vitelogenina em *A. mellifera* poderia ser transportada por ambas as rotas através das células foliculares, intercelular ou transcelular (Seehuus et al., 2007).

Em algumas espécies de abelhas, formigas e vespas, os folículos vitelogênicos possuem vitelogenina no citoplasma das células foliculares, no espaço perivitelínico e no ovoplasma, indicando uma rota transcelular para o transporte de vitelogenina (Ronnau et al., 2015).

3. Objetivo

Considerando a importância da vitelogenina na reprodução de insetos e a função dos receptores dessa proteína para sua absorção no ovócito, este estudo se o transporte de vitelogenina ocorre pela rota transcelular nas células foliculares na abelha *Apis mellifera* e na vespa *Polistes simillimus*.

4. Material e Métodos

4.1. Insetos

Rainhas de *A. mellifera* foram obtidas do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa e rainhas de *P. simillimus* foram coletadas com rede entomológica em ninhos na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

4.2. Obtenção do receptor para vitelogenina

Considerando que todos os receptores de vitelogenina são membros da superfamília LDLR, foi selecionada uma sequência altamente específica desse receptor para ser expressa como antígeno na produção de anticorpo, domínios estruturais de Hymenoptera foram comparados (VgR de formiga AAP92450, VgR de vespa XP_001602954 e VgR de abelhas XP_001121707 ou seu similar CG1372-PA). Um fragmento correspondente à segunda região repetitiva YWTD no primeiro domínio homólogo ao precursor do fator de crescimento epidérmico (350 aminoácidos) foi utilizado (Lu et al. 2009). O fragmento VgR foi amplificado em plasmídeo pET BL21 Novagen®, pela empresa GenScript (Piscataway, USA).

4.3. Formação de células competentes e transformação das bactérias.

A expressão da proteína foi realizada na cepa C41 de *Escherichia coli*. Estas foram cultivadas em meio LB-Ágar e incubadas à 37 °C por 16 h. A seguir, uma colônia foi transferida para 10 mL de meio LB líquido permanecendo por 16 h à 37 °C. Em seguida, 1 mL foi transferido para 10 mL de meio LB líquido até atingir uma densidade óptica de 600 nm por cerca de 3 h. Deste meio de cultura, 1,2 mL foram centrifugados a 1.200 x g à 4 °C por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes em 1,2 mL de

CaCl₂ 0,1M em glicerol gelado por 10 minutos à 1.200 x g e ressuspenso em 100 µL desta solução. Nesta solução foi adicionado 5 µL do plasmídeo (1:10) em gelo por 15 minutos seguido de choque térmico à 42 °C por 90 segundos e transferidos para gelo por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 700 µL de meio LB líquido seguido de incubação à 37 °C por 1 h sob agitação. Estas bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB-Ágar com ampicilina e incubadas por 16 h à 37 °C.

4.4. Expressão e Purificação da proteína receptor de vitelogenina (VgR)

A colônia transformada foi colocada em 100 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e permaneceu sob agitação até atingir densidade óptica à 600 nm. Neste momento, foi induzida a expressão da proteína com 0,4 M de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) sob agitação por 4 h. As células foram coletadas por centrifugação à 7.000 x g por 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 30 mL de tampão de Tris (500 mM) com 1% de Triton X-100 por 10 minutos e, então, as células foram sonicadas seis vezes por 30 segundos, com intervalos de 1 minuto, permanecendo em gelo por todo o processo. Em seguida, o extrato de células foi centrifugado à 7.000 x g por 15 minutos à 4 °C e novamente ressuspenso em tampão Tris (500 mM) com 8M de ureia, sonificado três vezes e centrifugado à 7.000 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para a purificação da proteína. A purificação da proteína recombinante foi realizada em cromatografia de afinidade a metal, sendo o sobrenadante obtido aplicado em resina de níquel (GE Healthcare). A seguir, a coluna foi lavada com Imidazol (0,4 M), sendo as

alíquotas recuperadas em volume de 1 mL e analisadas em densidade óptica de 280 nm.

4.5. SDS-PAGE

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida à 12% (m/v) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As amostras da proteína recombinante foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,8, contendo SDS à 2,5% (m/v), 2-mercaptoetanol à 2,5% e glicerol à 10% (v/v)], fervidas em 100 °C, por 4 minutos e aplicadas no gel. Após eletroforese a 80-120 mA e 190 V, os géis foram corados com azul de Coomassie. A massa molecular da proteína foi calculada a partir de padrão de massa molecular BenchMark Protein.

4.6. Produção de anticorpos policlonais anti- VgR recombinante

Para a produção de anticorpos foram utilizados cinco camundongos Balb/C, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (CEUA- UFV 45/2013). As bandas marcadas com a proteína receptora de vitelogenina foram recortadas dos géis SDS-PAGE e homogeneizadas em solução fisiológica (0,9% NaCl, pH 7,5). Em seguida, foram realizadas duas imunizações intradérmicas, com 20µg/100µL da proteína receptor de vitelogenina recombinante, com intervalo de 15 dias entre as imunizações. Depois de decorridos 15 dias da segunda imunização, os camundongos foram sangrados e o soro foi obtido através da centrifugação à 10000 x g do sangue coagulado e o antissoro foi armazenado à -20 °C.

4.7. Western blotting

As rainhas de *A. mellifera* e *P. simillimus* foram dissecadas e os ovários foram homogeneizados (Motor Cordless) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5)

com coquetel de inibidor de protease à 10% (Sigma Aldrich, P2714-1BTL) seguido por 10 ciclos de 2 minutos em ultrassom com três repetições. Em seguida, o material foi centrifugado à 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) + 1% de Triton X-100 + 10% de inibidor de protease, homogeneizado e submetido a ultrassom para extração de proteínas insolúveis, seguido de centrifugação à 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido a análises eletroforéticas em gel SDS-PAGE. O gel foi incubado em tampão de transferência [Tris-HCl 0,58% (p/v); glicina 0,28% (v/v); metanol 20% (v/v); água MiliQ], para a membrana de nitrocelulose em amperagem constante de 190 A por 3 h à 4 °C (Mini Trans-Blot Cell[®], Bio Rad). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada em solução salina tamponada com Tris (TBS) (25 mM de Tris + 150mM de NaCl, pH 7,5) + 1% Tween 20 (TBST) + 5% de leite em pó desnatado por 16 h sob agitação. A membrana de nitrocelulose foi lavada com TBST rapidamente, seguida de mais duas lavagens de 15 minutos e então incubada no anticorpo primário anti-VgR (1:50) por 2 h sob agitação. Após lavagens com TBST a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:100) por 2 h, sob agitação. Em seguida, as amostras foram reveladas com solução diaminobenzidina [0,1 % DAB (p/v) + Tris-HCl 50mM + H₂O₂].

4.8. Imunofluorescência

Após a dissecação, ovários de *A. mellifera* e *P. simillimus* tiveram a bainha peritonal dos ovários removida com auxílio de pinças e estes foram transferidos para solução fixadora de Zamboni [paraformaldeído à 4%, ácido pícrico 0,4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2] por 2 h, seguindo-se cinco lavagens

de 10 minutos cada com PBS. Em seguida as amostras foram mantidas em PBS contendo Triton X-100 à 1% (PBST) por 2 h para permeabilização. As amostras foram incubadas em anticorpo primário anti-VgR (1:50) em PBST por 16 h. Em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:400 em PBST por 2 h no escuro, seguida por cinco lavagens de 10 minutos cada em PBS. As amostras foram transferidas para 50 µL de TO-PRO[®]-3 iodeto (Thermo Fisher Scientific) (1:1000) em PBS por 30 minutos no escuro e lavadas novamente em PBS cinco vezes a cada 10 minutos. Os ovariolos foram montados com sacarose 50% e analisados em microscópio de fluorescência confocal a laser Zeiss 510 Meta no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Os controles negativos foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a omissão de incubação com o anticorpo anti-VgR.

4.9. Imunocitoquímica

Os ovários de *A. mellifera* e *P. simillimus* foram dissecados e transferidos para glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 30 minutos separando o segmento vitelogênico que é caracterizado por câmaras ovocíticas maiores que as nutridoras isoladas do ovariolo.

A seguir, as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio por 10 minutos, desidratados em etanol 70% duas vezes por 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram embebidas em solução de resina LR White e etanol 70% (2:1) por 1 h e em resina pura por mais 1 h. Posteriormente foram embebidas em resina pura por 16 h em temperatura ambiente, seguindo polimerização à 60 °C por 24 h.

Secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrotomo e transferidas para grades de níquel. As amostras foram lavadas em água destiladas duas vezes, 5 minutos cada, lavadas com TBS 0,1M + 1% BSA + 0,15M NaCl pH 7,2 por 10 minutos. A seguir as amostras foram transferidas para solução de TBS + 1% de gelatina por 10 minutos, e então transferida para solução de TBS + 0,2 M de glicina por 3 minutos. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-VgR (1:50) em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ durante 16 h à 4 °C. Então as amostras foram lavadas em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ quatro vezes por 10 minutos, sob agitação, seguida de lavagem em TBS + 1% BSA pH 7,2 por 2 h. Posteriormente as secções de ovários foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal 10 nm (1:100) em TBS + 1% BSA pH 7,2 por 1 h sob agitação. Então as amostras foram lavadas em TBS e transferidas para de glutaraldeído à 1% em TBS por 3 minutos. Após esta etapa as amostras foram contrastadas com acetato de uranila aquosa à 1% por 15 minutos e citrato de chumbo por 3 minutos e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no NMM.

Os controles negativos foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a omissão de incubação com o anticorpo anti-VgR.

5. Resultados

A proteína VgR foi expressa em grandes quantidades nas cepas de *E. coli* transformadas (pET BL21) com a formação de corpos de inclusão. A solubilização da proteína dos corpos de inclusão foi realizada com a adição de ureia á solução. Essa proteína presente nos corpos de inclusão mostrou massa molecular de aproximadamente 39 kDa (Figura 1). O anticorpo produzido em camundongos com esta proteína de 39 kDa, mostrou reação positiva para a mesma em Western blotting (Figura 1).

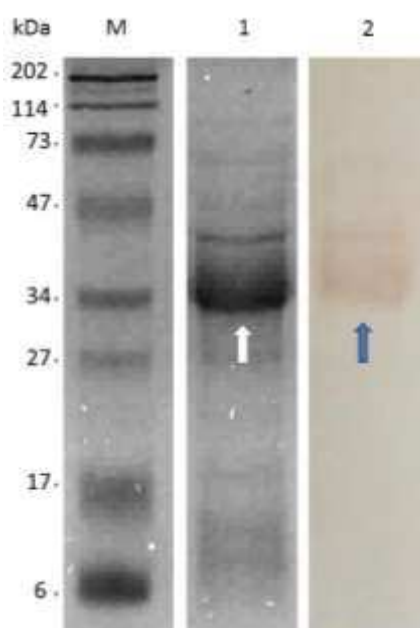


Figura 1- 1) Proteína VgR purificada em coluna de níquel de aproximadamente 39 kDa (seta branca) em gel SDS-Page. 2) Seta azul indicando a proteína em marcação de Western Blotting, confirmando reação positiva com o anticorpo. M- marcador molecular.

Para verificar a expressão do VgR, extratos proteicos dos ovários de *A. mellifera* e *P. simillimus* foram solubilizados e a proteína VgR foi reconhecida pelo anticorpo anti-VgR em ambas as espécies (Figura 2).

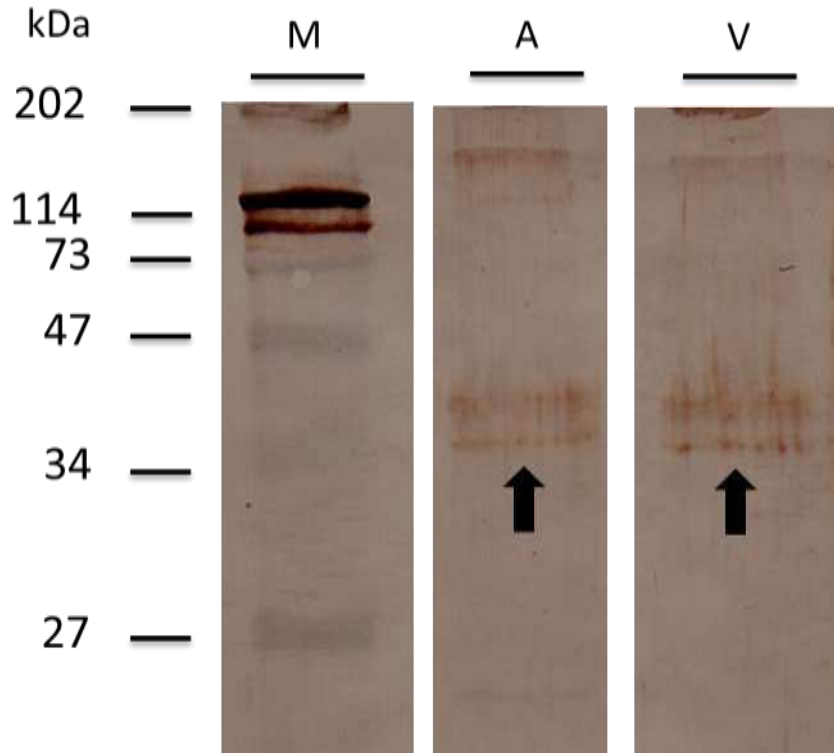


Figura 2- Western Blotting dos extratos proteicos dos ovários da abelha *Apis mellifera* (A) e da vespa *Polistes simillimus* (V) indicando a proteína VgR (setas) marcada com anticorpo anti-VgR. M- marcador molecular.

Para verificar a localização de VgR nas células foliculares e no ovócito de *A. mellifera* e *P. simillimus*, ovariolos com a bainha peritoneal removida foram submetidos a imunofluorescência associada com microscopia confocal a Laser, mostrando que este receptor estava presente na membrana plasmática das células foliculares, com maior intensidade na superfície apical bem como na superfície dos ovócitos em ambas as espécies estudadas (Figura 3).

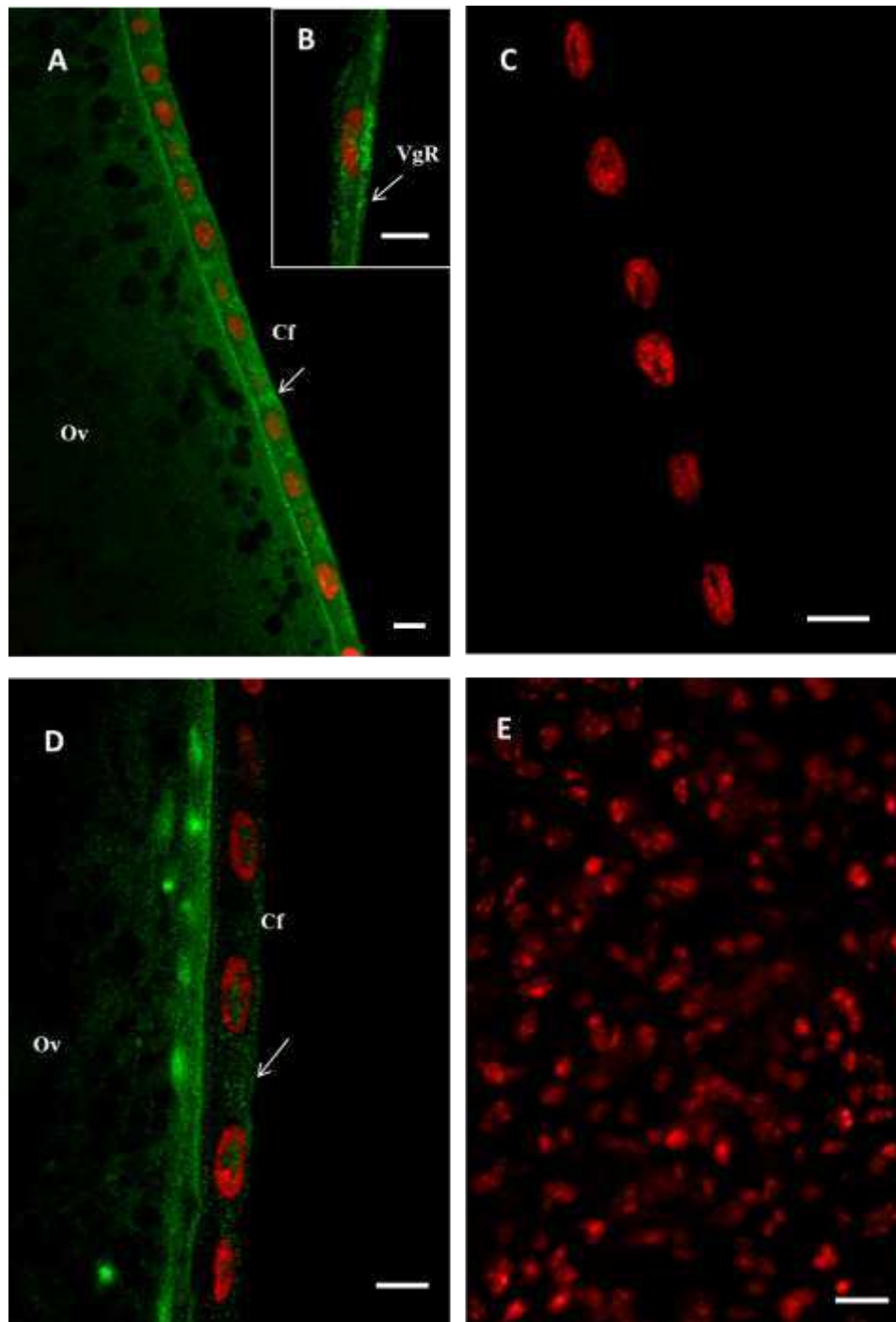


Figura 3- Imunofluorescência de segmentos vitelogênicos dos ovaríolos em *Apis mellifera* e *Polistes simillimus*. A- Presença de VgR, em verde, nas células foliculares (Cf) e ovócito (Ov) de *A. mellifera*. B- detalhe das células foliculares mostrando forte marcação de VgR na superfície apical (seta) das células foliculares. C- Controle negativo. D- Presença de VgR, em verde, nas células foliculares (Cf) e ovócito (Ov) de *P. simillimus*. E- Controle negativo. Barras 10 μ m.

A imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão da proteína VgR mostrou que esta estava presente na membrana plasmática basal (Figura 4) e apical (Figura 5) das células foliculares das porções vitelogênicas de ambas as espécies. Na região basal ocorreu a formação de vesículas endocíticas contendo VgR (Figura 4), enquanto que na região apical da célula folicular ocorreu a formação de figuras mielínicas que foram liberadas para o espaço perivitelínico (Figura 5b) onde esta proteína também estava presente, assim como na superfície do ovócito (Figura 5a).

A proteína VgR estava presente no citoplasma das células foliculares de ambas as espécies, associada à membranas intracelulares similares ao retículo endoplasmático e vesículas ao longo da célula (Figura 6).

Não foram detectadas marcações de VgR nos controles negativos de *A. mellifera* (Figura 6c) e de *P. simillimus* (Figura 5c).

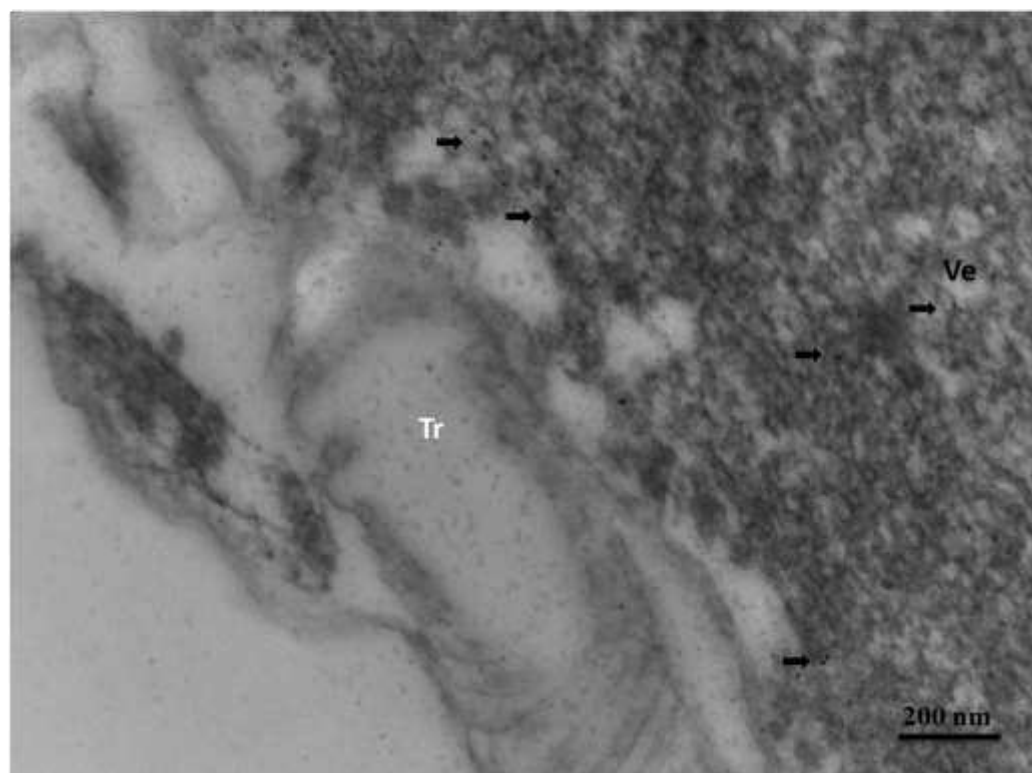
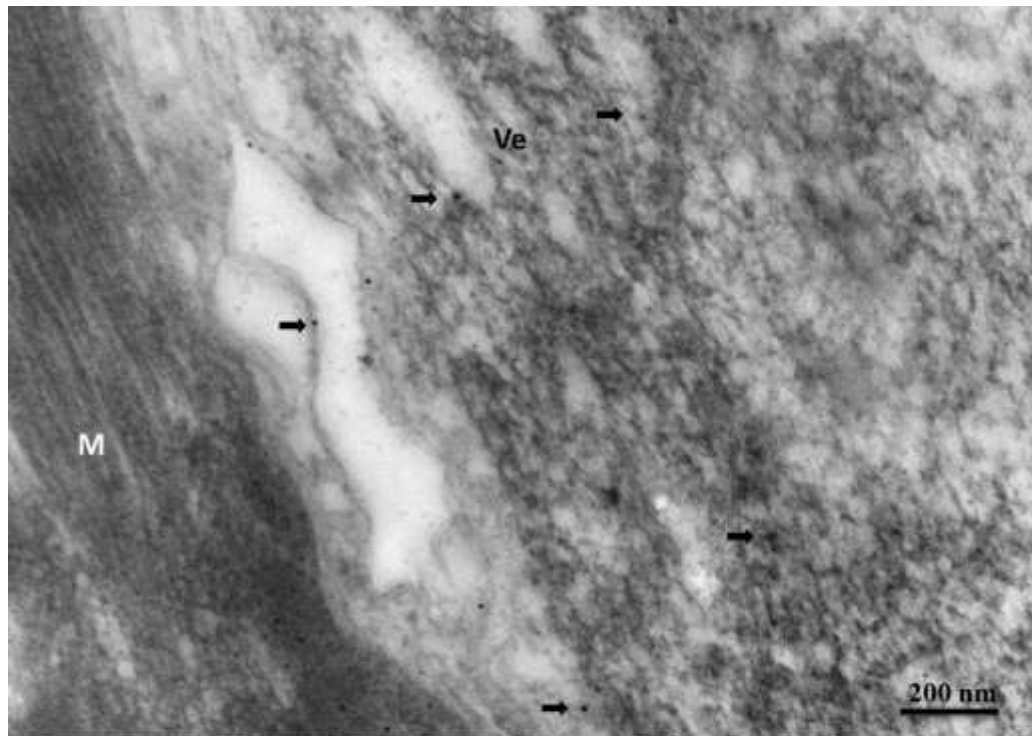


Figura 4- Imunolocalização de VgR nas células foliculares de ovários vitelogênicos mostrando a presença de VgR (setas) na membrana plasmática e vesículas endocíticas (Ve). A- *Apis mellifera*; B- *Polistes simillimus*. M- músculo; Tr- traqueiolas.

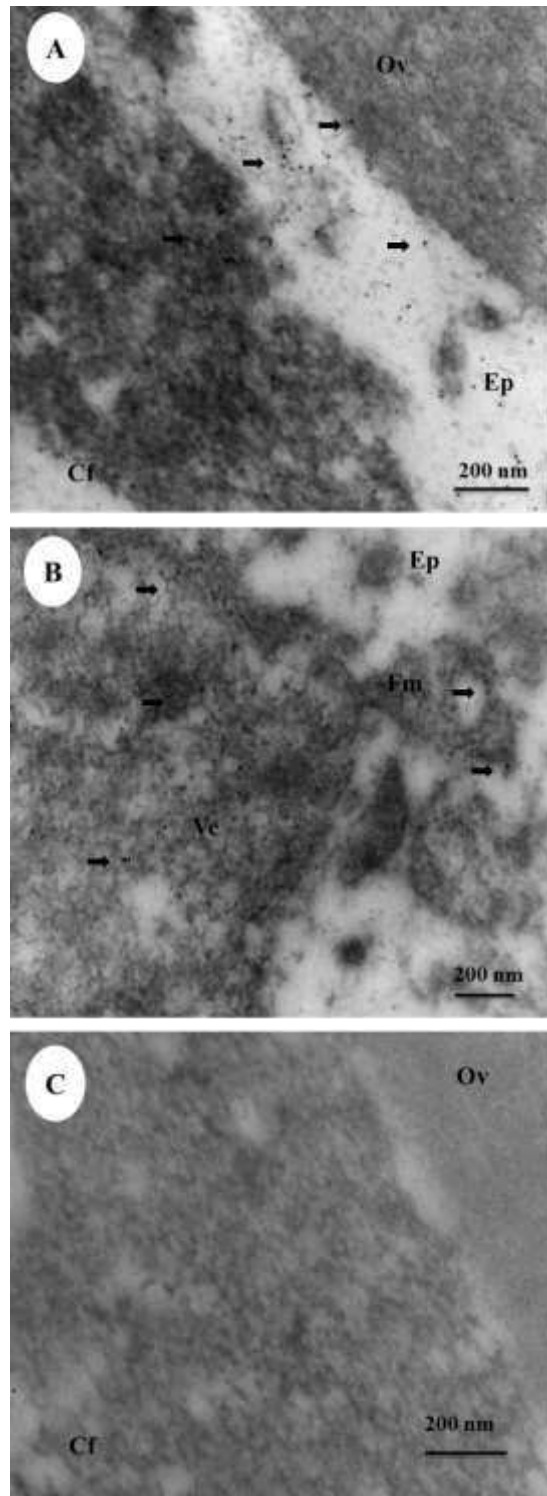


Figura 5- Imunolocalização de VgR das células foliculares de ovários vitelogênicos de *Polistes simillimus*. A/B- Região apical das células foliculares evidenciando a presença da proteína (setas) em vesículas (Ve) e associadas a figuras mielínicas (Fm) no espaço perivitelínico (Ep) e na superfície do ovócito (Ov); C- Controle negativo. Cf- células foliculares.

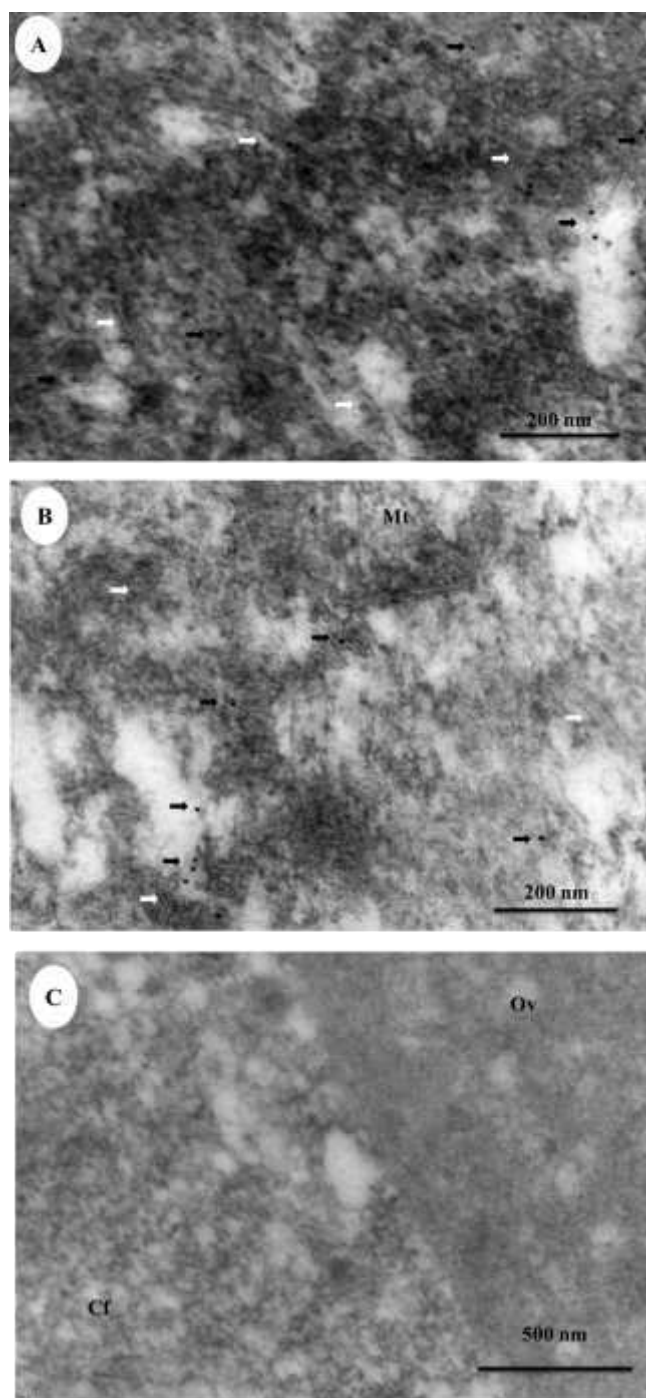


Figura 6- Imunolocalização de VgR das células foliculares de ovariolos vitelogênicos de *Apis mellifera*. A- Presença do VgR (setas) em membranas intracelulares similares ao retículo endoplasmático (setas brancas); B- presença de VgR em membranas intracelulares (setas brancas) e presença de mitocôndria (Mt); C- Controle negativo.

6. Discussão

O desenvolvimento de anticorpo anti-VgR específico foi necessário para análises imunorreativas, assim foi possível comprovar a presença de VgR em células foliculares de folículos vitelogênicos de rainhas de *A. mellifera* e *P. simillimus*. Os VgRs em outros insetos mostram que esta proteína tem uma massa molecular de aproximadamente 202 KDa (Dhadialla et al., 1992; Schonbaum et al., 1995; Tufail & Takeda, 2005; 2007; Ciudad et al., 2006; Lu et al., 2009). Neste estudo foi selecionado uma sequência altamente conservada desse receptor para ser expressa como antígeno na produção de anticorpos, representada por um fragmento recombinante correspondente a segunda região repetitiva YWTD no primeiro domínio homólogo ao precursor do fator de crescimento epidérmico, possuindo uma massa molecular de 39 kDa, de acordo com a sequência de aminoácidos selecionados similar a proteína recombinante expressa nos corpos de inclusão de *E. coli* transformadas (pET BL21). As análises de Western Blotting confirmam que o anticorpo produzido reconhece o VgR expresso em bactérias e que esta proteína está presente nos extratos de proteínas de membrana dos ovários de rainhas de *A. mellifera* e *P. simillimus*.

A imunofluorescência mostra que o VgR está presente no citoplasma e na superfície das células foliculares e também nos ovócitos nos folículos vitelogênicos de rainhas de *A. mellifera* e *P. simillimus*. Em rainhas da formiga *Solenopsis invicta* a proteína VgR está distribuída uniformemente no citoplasma do ovócito em ovócitos pré-vitelogênicos e torna-se progressivamente mais concentrada na membrana do ovócito no estágio vitelogênico (Lu et al., 2009). A proteína VgR foi detectada principalmente no córtex adjacente ao epitélio folicular em pools no citoplasma de folículos vitelogênicos de mosquitos

(Sappington et al., 1995). Em *A. mellifera*, VgR e vitelogenina ocorrem em outros órgãos além do ovário, como nas glândulas hipofaríngeas e no corpo gorduroso da cabeça em operárias (Amdam et al., 2003; Seehuus et al., 2007).

As análises de imunofluorescência associadas à imunocitoquímica, evidenciam a presença de VgR na membrana plasmática basal, em membranas intracelulares e na membrana plasmática apical das células foliculares em regiões vitelogênicas dos ovários de *A. mellifera* e *P. simillimus*, indicando que esse receptor é produzido por estas células e transportado para a superfície celular. A absorção de vitelogenina durante a vitelogênese por VgR em *A. mellifera* e *P. simillimus* sugere envolvimento de maquinaria endocítica. Este complexo endocítico foi observado em ovários de mosquitos, no qual foram originalmente descritos a presença de vesículas revestidas de clatrina (Roth & Porter, 1964), sendo consistente com o perfil de acumulação de poços e vesículas revestidas e o crescimento do folículo ovariano, indicando que a produção de VgR é parte do processo geral de formação do complexo endocítico e desenvolvimento da competência do ovócito para acumulação de proteína (Sappington et al., 1995).

A presença de VgR na membrana plasmática basal e em figuras mielínicas na região apical das células foliculares de *A. mellifera* e *P. simillimus*, indicam que a proteína pode ter sido transportada de um domínio basal para um apical da célula com consequente liberação no espaço perivitelínico, evidenciado pela presença de figuras mielínicas contendo VgR nesta região. Estes dados suportam nossa hipótese de que a vitelogenina é transportada via receptor de vitelogenina através de uma rota transcelular nas células foliculares de abelhas e vespas pelo mecanismo de transcitose caracterizado pelo movimento do receptor de membrana

e seu ligante de um domínio para outro da membrana plasmática (Alberts et al., 2014).

A presença de VgR em membranas intracelulares das células foliculares em ambas as espécies estudadas está de acordo com a presença de vitelogenina dentro destas células de espécies de Hymenoptera (Ronnau et al., 2015). Em *A. mellifera* foi descrita a presença de pequenos canais entre as células foliculares (Engels, 1973 apud Fleig, 1995). Entretanto, estes estudos também observaram a presença de grânulos elétrons densos na parte central das células foliculares que são excitados no espaço perivitelínico, apontando a presença de vitelogenina no citosol de células foliculares (Fleig, 1995). Em outros insetos há formação de espaços intercelulares entre as células foliculares, sugerindo uma rota paracelular, como descrito em *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) (Telfer, 1961), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Davey, 1981), *Locusta migratoria* (Orthoptera) (Lauverjat et al., 1984) e mosquitos (Raikhel & Lea, 1991).

A presença de VgR em regiões membranas intracelulares sugere a síntese desta proteína nas células foliculares. A transcrição do gene para expressão de VgR não foi detectado em operárias de *S. invicta*, ou em órgãos de rainhas que não fosse o ovário (Lu et al., 2009), enquanto em abelhas o nível de transcrição de VgR é maior em rainhas que fazem postura de ovos dentro de colônias maduras do que em rainhas virgens (Guidugli et al., 2008).

A presença de VgR na superfície apical das células foliculares de *A. mellifera* e *P. simillimus*, sugere que possa ocorrer exocitose de vitelogenina para o espaço perivitelínico evidenciado pela presença de figuras mielínicas e sua consequente absorção no ovócito que também apresenta esse receptor. Durante a vitelogênese em Hymenoptera, as células foliculares sofrem remodelação no

citoesqueleto de actina, sugerindo um rearranjo dos filamentos de actina em resposta ao transporte de vitelogenina, exibindo figuras mielínicas ocasionais na região apical (Ronnau et al., 2015).

A vitelogênese é um processo complexo que controla a reprodução dos insetos através da síntese de vitelogenina e sua devida absorção por endocitose via VgR para o correto desenvolvimento do ovócito (Sappington & Raikhel, 1998; Swevers et al., 2005). Este estudo é o primeiro que mostra a presença do VgR em células foliculares de folículos vitelogênicos em rainhas de *A. mellifera* e *P. simillimus* indicando uma rota transcelular para a absorção de vitelogenina, melhorando o entendimento de como ocorre a vitelogênese e o consequente desenvolvimento ovariano nestes insetos.

Em conclusão, VgR esta presente na membrana celular de células foliculares de rainhas *A. mellifera* e *P. simillimus*, sendo que a vitelogenina atravessa esta barreira através de uma rota transcelular para atingir o ovócito para que este realize seu completo desenvolvimento. Isso é confirmado pela presença de VgR em diferentes domínios de membrana plasmática e em membranas intracelulares de células foliculares.

7. Referências Bibliográficas

- Adams, T. S., Filipi, P. A., Yi, S. 2002. Effect of age, diet, diapause and juvenile hormone on oogenesis and the amount of vitellogenin and vitellin in the twospotted stink bug, *Perillus bioculatus* (Heteroptera: pentatomidae). *Journal of Insect Physiology*. 48: 477-486.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2014. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Amdam, G. V. & Omholt, S. W. 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal Theoretical Biology*. 233: 451-464.
- Amdam, G. V., Aase, A. L., Seehuus, S. C., Fondrk, M. K., Norberg, K., Hartfelder, K. 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee works. *Experimental Gerontology*. 40: 939-947.
- Amdam, G. V., Csondes, A., Fondrk, M. K., Page, R. E. 2006. Complex social behavior derived from maternal reproductive traits. *Nature*. 439: 76-78.
- Anderson, L. M. & Telfer, W. H. 1970. Extracellular concentration of proteins in the *Cecropia* moth follicle. *Journal of Cell Physiology*. 76: 37-54.
- Azevedo, D. O., Zanuncio, J. C., Delabie, J. H. C., Serrão, J. E. 2011. Temporal variation of vitellogenin synthesis in *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae) workers. *Journal of Insect Physiology*. 57: 972-977.
- Azevedo, D. O., De Paula, S. O., Zanuncio, J. C., Martinez, L. C., Serrão, J. E. 2016. Juvenile hormone downregulates vitellogenin production in *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) sterile workers. *Journal of Experimental Biology*. 219: 103-108.

- Barchuk, R. A., Bitondi, M. G., Simões, L. P. 2002. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*. 2: 1-8.
- Chapman, R. F. 2013. *The insect: Structure and function*. American Elsevier. Publishing by Cambridge University Press 5th edition, New York. 770p.
- Chen, J. S., Goldstein, J. L., Brown, M. S. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biology Chemistry*. 265: 3116-3123.
- Chen, M. E., Lewis, D. K., Keeley, L. L., Pietrantonio, P. V. 2004. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Molecular Biology*. 13: 195-204.
- Ciudad, L., Piulachs, M. D., Bellés, X. 2006. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that *Drosophila* *yolkless* mutant. *FEBS Journal*. 273: 325-335.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., Robinson, G. E. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Science*. 104: 7128-7133.
- Cruz-Landim, C. 2000. Ovarian development in Meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development in egg production. *Genetics and Molecular Biology*. 23(1): 83-88.
- Davey, K. G. 1981. Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rhodnius prolixus* Stal. *American Zoologist*. 21: 701-705.

- Dietemann, V., Peeters, C. 2000. Queen influence on the shift from trophic to reproductive eggs laid by workers of the ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *Insectes Sociaux*. 47: 223-228.
- Dhadialla, T. S., Hays, A. R., Raikhel, A. S. 1992. Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 22: 803-816.
- Engels, W. 1973. Das zeitliche und räumliche Muster der Dottereinlagerung in the oocyte von *Apis mellifica*. *Zeitschr Zellforsch Mikrok Anat*. 142: 409-430.
- Engels, W. & Imperatriz-Fonseca, V. L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees in social insects: in evolutionary approach to castes and reproduction (Engels W., Ed), Springer-Verlag, Berlin. Pp 158-230.
- Engelmann, F. 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Advances in Insect Physiology*. 14: 49-108.
- Fleig, R. 1995. Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 24: 427-433.
- GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).
- Giray, T., Giovanetti, M., West-Eberhard, M. J. 2005. Juvenile hormone reproduction and worker behaviour in the neotropical wasp *Polistes canadensis*. *Proceedings National Academy Sciences USA*. 102: 3330-3335.
- Glinka, A. V. & Wyatt, G. R. 1996. Juvenile hormone activation of gene transcription in locust fat body. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 26: 13-18.

- Gobin, B., Peeters, C., Billen, J. 1998. Production of trophic eggs by virgin workers in the ponerine ant *Gnamptogenys menadensis*. *Physiological Entomology*. 23: 329-336.
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 5153-5162.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russel, D. W., Scheneider, W. J. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from de LDL receptor system. *Annual Review of Cell Biology*. 1: 1-39.
- Groot, A. P. & Voogd, S. 1954. On the ovary development in the queenless worker bees (*Apis mellifera* L.). *Experimentia*. 10: 384-385.
- Guidugli, K. R., Piulachs, M. D., Bellés, X., Lourenço, A. P., Simões, Z. L. P. 2005. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry Physiology*. 59: 211-218.
- Guidugli, K. R., Nascimento, Tanaka, E. D., Piulachs, M. D., Hartfelder, K., Bitondi, M. G., Simões, Z. L. P. 2008. Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *Journal of Insect Physiology*. 54: 1138-1147.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. 2010. *The Insects. An outline of entomology*, 4th edition. Blackwell Publishing 427p.
- Hartfelder, K. & Engels, W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development of reproduction in the honey bee. *Current Topics in Developmental Biology*. 40: 45-77.

- Hartfelder, K., Market, G. R.; Judice, C. C., Pereira, G. A. G., Santana, W. C., Dallacqua, R., Bitondi, M. M. G. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*. 37: 144-163.
- Heisberguer, T., Trommsdorff, M.; Howell, B. W.; Goffinet, A.; Mumby, M. C.; Cooper, J. A.; Herz, J. 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.
- Herz, J., Clouthier, D. E., Hammer, R. E. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-Pal-1 complexes and is essential embryo implantation. *Cell*. 71: 411-421.
- Hughes, C. R., Beck, M. O., Strassmann, J. E. 1987. Queen succession in the social wasps *Polistes annularis*. *Ethology*. 76: 124-132.
- Hughes, C.R. & Strassmann, J. E. 1988. Age is more important than size in determining dominance among workers in the primitively eusocial wasp *Polistes instabilis*. *Behaviour*. 107: 1-15.
- Holldobler, B., Wilson, E. O. 1990. *The ants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Krishnan, M., Muthumeenakshi, P., Bharathiraja, C., Warriar, S., Subramoniam, T. 2008. A comparative study on vitellogenin receptor of a lepidopteran insect (*Spodoptera litura*) and a decapod crustacean (*Scylla serrata*): phylogenetic implication and co-evolution with vitellogenins. *Journal of Endocrinology and Reproduction*. 1: 13-23.
- Lauverjat, S., Szollosi, A., Marcaillou, C. 1984. Permeability of the ovarian follicle during oogenesis in *Locusta migratoria* L. (Insecta: Orthoptera). *Journal of Ultrastructure Research*. 87: 197-211.

- Libbrecht, R., Corona, M., Wende, F., Azevedo, D. O., Serrão, J. E., Keller, L. 2013. Interplay between insulin signaling, juvenile hormone, and vitellogenin regulates maternal effects on polyphenism in ants. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 110: 11050-11055.
- Lisboa, L. C. O., Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., Campos, L. A. O. 2005. Effect of larval food amount on ovariole development in queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apinae). *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 34: 179-184.
- Lin, Y., Zhao, P., Hou, Y., Li, J., Gong, D. P., Su, Q., Xia, Q. Y., Xiang, Z. H. 2005. Vitellogenin and vitellogenin receptor gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Zoologica Sinica*. 51: 117-125.
- Lu, A. L., Vinson, S. B., 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 Journal*. 276, 3110-3123.
- Michener, C. D. 1974. *The social behavior of the bees*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. 404p.
- Michener, C. D. 2000. *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press. 913p.
- Naeger, N. L., Peso, M., Even, N., Barron, A. B., Robinson, G. E. 2013. Altruistic behavior by egg-laying worker honeybees. *Current Biology*. 23: 1574-1578.
- Omholt, S. W., Amdam, G. V. 2004. Epigenetic Regulation of aging in honeybee workers. *Science of Aging Knowledge Environment*. 10: 1126.
- Peters, J. M., Queller, D. C., Strassmann, J. E., Solis, C. R. 1995. Maternity assignment and queen replacement in a social wasp. *Proceedings Royal Society B*. 260: 7-12.

- Piulachs, M. D., Guidugli, K. R., Barchuk, A. R., Cruz, J., Simões, Z. L. P.; Belléz, X. 2003. The vitellogenin cDNA of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analyzes and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular biology*. 33: 459-465.
- Raikhel, A. S. & Lea, A. O. 1991. Control of follicular epithelium developmental and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Tissue & Cell*. 23: 577-591.
- Raikhel, A. S. & Dhadialla, T. S. 1992. Accumulation of yolk proteins in insects oocytes. *Annual Review of Entomology*. 37: 217-251.
- Robinson, G. E. & Vargo, E.L. 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives Insect Biochemistry Physiology*. 35: 559-583.
- Rockstein, M. 1973. *The physiology of insect*. Second edition. Academic Press. 512p.
- Ronai, I., Barton, D. A., Oldroyd, B. P., Vergoz, V. 2015. Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death. *Journal of Insect Physiology*. 81: 36-42.
- Ronnau, M., Azevedo, D. O., Fialho, M. C. Q., Gonçalves, W. G., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. 2015. Changes in follicular cells architecture during vitellogenin transport in ovary of social Hymenoptera. *Protoplasma*. pp 1-6.
- Ross, K. G. & Matthews R. W. 1991. *The social biology of wasps*. Cornell University Press, Ithaca, New York. 678:179-190.
- Roth, T. F. & Porter, K. R. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *Journal Cell Biology*. 20: 313-332.

- Sappington, T. W., Hays, A. R., Raikhel, A. S. 1995. Mosquito vitellogenin: purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 25: 807-817.
- Sappington, T. W., Kokoza, V. A., Cho, W. I., Raikhel, A. S. 1996. Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 93: 8934-8939.
- Sappington, T. W. & Raikhel, A. S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular biology*. 28: 277-300.
- Schonbaum, C. P., Lee, S., Mahowald, A. P. 1995. The *Drosophila* yolkless gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 92: 1485-1489.
- Seehuus, S. C., Norberg, K., Krekling, T., Fondrk, K., Amdam, G.V. 2007. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*. 52: 1-14.
- Sekiguchi, K., Sakagami, S. F. 1966. Structure of foraging population and related problems in the honey bee, with considerations on division of labour in bee colonies. *Hakkaido National Agricultural and Experimental Station, Report*. 691- 58.
- Springer, T. A. 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth

- factor precursor and extracellular matrix components. *Journal of Molecular Biology*. 283: 837-862.
- Snodgrass, R. E. 1935. *Principles of insect morphology*. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
- Snodgrass, R. E. 1956. *Anatomy of the honey bee*. Constock Publishing Associate New York. 332p.
- Swevers, L., Raikhel, A. S., Sappington, T. W., Shirk, P., Iatrou, K. 2005. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol 3 (Gilbert, L. I., Iatrou, K. & Gill, S. S. eds), pp 87-115. Elsevier, Amsterdã.
- Tan, K., Wang, Y., Dong, S., Liu, X., Zhuang, D., Chen, W. 2015. Associations between reproduction and work in workers of the Asian hive bee *Apis cerana*. *Journal of Insect Physiology*. 82: 33-37.
- Telfer, W. H. 1961. The route of entry and localization of blood protein in the oocytes of saturniid moths. *Journal of Biophysics Biochemistry and Cytology*. 9: 747-753.
- Trenczek, T., Zillikens, A., Engels, W. 1989. Developmental patterns of vitellogenin hemolymph titer and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*. 35: 475- 481.
- Tufail, M. & Takeda, M. 2005. Molecular cloning characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Molecular Biology*. 14: 389-401.
- Tufail, M. & Takeda, M. 2007. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 235-245.

- Tufail, M. & Takeda, M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*. 35: 1447-1458.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, London. 548pp.
- West-Eberhard, M. J. 1969. The social biology of *Polistes canadensis* (L), a tropical social wasp. *Miscellaneous Publication Museum of Zoology University Michigan*. 140: 1-101.
- Wheeler, D. E. & Kawooya, J. K. 1990. Purification of honey bee vitellogenin. *Archives Insect Biochemistry Physiology*. 14: 253-267.
- Wyatt, G. R., Braun, R. P., Zhang, J. 1996. Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Archives Insect Biochemistry Physiology*. 32: 633-640.