

MILTON RÖNNAU

**TRANSPORTE DE VITELOGENINA NO OVÁRIO DE
HYMENOPTERA SOCIAIS**

**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*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

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

T

R773t Rönnau, Milton, 1971-
2013 Transporte de vitelogenina no ovário de hymenoptera
sociais / Milton Rönnau. – Viçosa, MG, 2013.
x, 42 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-42.

1. Ovários. 2. Vitelogenina. 3. Hymenoptera -
Reprodução. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 573.665

MILTON RÖNNAU

TRANSPORTE DE VITELOGENINA NO OVÁRIO DE
HYMENOPTERA SOCIAIS

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

APROVADA: 12 de DEZEMBRO de 2013

Lucio Antonio de Oliveira Campos

Maria do Carmo Queiroz Fialho

Conceição Aparecida dos Santos

Patrícia Dias Games

José Eduardo Serrão
(orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela grandeza de sua criação e pela oportunidade que me concedeu com o dom da vida.

A minha amada esposa Dária (minha Belinha), a quem amo e pelo seu incansável apoio para que eu viesse a estudar, só cheguei até aqui pelo seu incentivo. Ao meu filho Arthur, meu orgulho como pai, sua compreensão de mundo e da necessidade da busca de conhecimento me deixam apaixonado por ele.

Agradeço ao Professor José Eduardo Serrão, meu orientador, pela paciência, sua serenidade e sabedoria em tratar com meus anseios e pela oportunidade que me concedeu quando aceitou em me orientar, sendo mais que um orientador sendo conselheiro e amigo obrigado Serrão.

A Beth, secretária do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela simpatia e atenção que sempre me atendeu.

Aos amigos que fiz em Viçosa, Edson, Débora, Dihego, Dodora, Douglas, Glenda, Helen, Jamile, Kenner, Luiza, Madu, Maria, Mary, Marcelo, Poliana, Rúdo, Wagner, Waléria.

Ao Monteiro, Técnico do Laboratório pela sua amizade e pelo profissional que ele é, sua dedicação ao trabalho e profissionalismo.

Ao amigo Samir, funcionário da UFV, pela paciência em me ouvir quando tinha saudades de casa, quando achava que não daria certo e tinha o desejo de abandonar tudo e vir embora, vinha com sua sabedoria e usando uma expressão, “mas vai valer a pena, tem que acreditar nisso”, valeu Samir. Valeu a pena, torço por você.

Enfim a todos que de uma forma ou outra contribuíram para que este trabalho desse certo

BIOGRAFIA

Milton Rönna, filho de Egorn Rönna (*in memória*) e Anita Willrich Rönna, nasceu em 31 de janeiro de 1971, na cidade de Palotina – Paraná. Em 1998 ingressou na Universidade Paranaense (UNIPAR) em Toledo – Paraná e graduou-se em Licenciatura Plena em Biologia em dezembro de 2001. Entre 2005 e 2007, cursou o Mestrado em Entomologia sob a orientação do professor Dr. José Eduardo Serrão na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em julho de 2009 reingressou nesta mesma instituição onde iniciou o curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural sob a mesma orientação, concluindo o curso e defendendo a tese em 12 de dezembro de 2013.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
BIOGRAFIA.....	iv
SUMÁRIO	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
2.OBJETIVO.....	5
3.MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Obtenção dos ovários	6
3.2.SDS-PAGE	6
3.3.Western blotting.....	6
3.4. Imunofluorescência.....	7
3.5. Detecção de actina	8
3.6. Microscopia eletrônica de transmissão	8
3.7. Imunocitoquímica.....	9
4. RESULTADOS.....	10
4.1. SDS-PAGE e Western Blotting	10
4.2. <i>Apis mellifera</i>	12
4.2.1. Imunofluorescência.....	12
4.2.2. Ultraestrutura	14
4.2.3. Imunocitoquímica	154
4.3. <i>Melipona quadrifasciata</i>	17
4.3.1. Imunofluorescência.....	17
4.3.2. Ultraestrutura	17
4.3.3. Imunocitoquímica	20

4.4. <i>Mischocyttarus cassununga</i>	21
4.4.1. Imunolocalização	21
4.4.2. Ultraestrutura	22
4.4.3. Imunocitoquímica	24
4.5. <i>Pachycondyla curvinodis</i>	26
4.5.1. Imunofluorescência	26
4.5.2. Ultraestrutura	28
4.5.3. Imunocitoquímica	28
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

RÖNNAU, Milton, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013, **Transporte de Vitelogenina no Ovário de Himenóptera Sociais**. Orientador: José Eduardo Serrão.

Vitelogeninas são as principais proteínas do vitelo, sintetizadas no corpo gorduroso, liberadas na hemolinfa e captadas pelos ovócitos em desenvolvimento onde é convertida em vitelina para ser consumida durante a embriogênese. No caminho para o ovócito, a vitelogenina atravessa o epitélio folicular que envolve o ovócito. Entretanto, os mecanismos pelos quais essa proteína atravessa a camada de células foliculares ainda são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho foi comparar as rotas no transporte de vitelogenina para o interior do ovócito nos Hymenoptera sociais representados pelas abelhas *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata*, pela vespa *Mischocyttarus cassununga* e pela formiga *Pachycondila curvinodis*. A constituição proteica dos ovários foi similar entre as espécies. Algumas proteínas foram identificadas pelo anticorpo anti-vitelogenina da formiga *Ectatomma tuberculatum* nas espécies aqui estudadas, mostrando a conservação de domínios proteicos da vitelogenina nessas espécies. Nas câmaras ovocíticas dos folículos vitelogênicos das espécies analisadas foi detectada a presença de vitelogenina no interior das células foliculares do ovócito e no espaço perivitelínico, indicando uma rota transcelular até o do espaço perivitelínico. Os filamentos de actina sofrem reestruturação no arranjo em resposta ao transporte de vitelogenina nas células foliculares dos folículos vitelogênicos. Junções celulares septadas ocorrem próximas a região apical de contato entre as células foliculares da câmara ovocítica dos folículos vitelogênicos, constituindo uma barreira ao trânsito de substâncias pelo espaço intercelular. A vitelogenina no interior das células foliculares ocorre em um sistema reticular membranoso em ovócitos vitelogênicos. No ovário dos Hymenoptera sociais a vitelogenina é inicialmente transportada pelos espaços intercelulares, que se dilatam pelo

rearranjo dos filamentos de actina, até a porção mediano-apical seguindo, então, uma rota transcelular até o espaço perivitelínico.

ABSTRACT

RÖNNAU, Milton, D.Sc., Federal University of Viçosa, December 2013, Transport of vitellogenin in the Ovary of Social Hymenoptera. Advisor: José Eduardo Serrão.

Vitellogenins are the major proteins of the yolk, synthesized in the fat body, released into the haemolymph and absorbed by the developing oocytes, where they are converted into yolk to be consumed during embryogenesis. The circulating vitellogenin should cross the follicular epithelium barrier surrounding the oocyte. However, the mechanisms by which this protein cross the layer of follicle cells are still poorly understood. The objective of this study was to compare the routes for vitellogenin transport from the haemolymph to the oocyte in social Hymenoptera represented by bees *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata*, wasp *Mischocyttarus cassununga* and ant *Pachycondila curvinodis*. The protein contents of the ovaries were similar among species. Some proteins cross-react with antivitellogenin antibody against the ant *Ectatomma tuberculatum* showing that the species studied had conserved domains in the vitellogenin. In the oocyte chambers of vitellogenic follicles were detected vitellogenin into the follicular cell, oocyte in and the perivitelline space, indicating a transcellular route of the vitellogenin from haemolymph to the perivitelline space in all studied specie. Actin cytoskeleton undergoes restructuring arrangement in response to the transport of the vitellogenin in the follicular cells of vitellogenic follicles. Septate junctions occur in the apical region of follicular cell-cell contact of vitellogenic follicles, resulting in a barrier to the movement of substances in the intercellular space. The vitellogenin within the follicular cells occurs in a membranous reticular system in vitellogenic oocytes. In the ovary of social Himenóptera, vitellogenin is initially carried in the intercellular spaces, which enlarge due to the rearrangement of actin filaments until the median apical portion then, the yolk precursor followis a transcellular route to the previtelline space.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A eusocialidade é definida por três critérios, sendo eles: a sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole. Na sobreposição de geração membros relativamente estéreis (operárias), trabalham em benefício de membros especializados na reprodução (rainhas), ajudando a cuidar da prole, permanecendo no ninho para tratar de irmãs e irmãos mesmo depois de adultos como nos insetos Hymenoptera (formigas, abelhas e vespas) e Isoptera (cupins) eusociais (Wilson, 1971). Em insetos considerados verdadeiramente eusociais como as abelhas, rainhas e operárias diferenciam-se morfológicamente e possuem uma divisão de trabalho sofisticada, As colônias geralmente são grandes com um sistema de comunicação complexo e uma estrutura de ninho bem elaborada (Bourke, 1999). onde as operárias de abelhas sofrem uma progressão característica no desempenho de suas atividades, inicialmente trabalhando como nutridoras, e depois na coleta de néctar e pólen. Esta mudança de comportamento é acompanhada pelo aumento da taxa de hormônio juvenil e uma diminuição do nível da vitelogenina (Bloch et al, 2002; Amdam e Omholt., 2003).

Em abelhas sem ferrão, operárias podem participar na atividade de postura, mesmo com rainhas fisiogástricas no ninho,(Sakagami et al.,1963; Sakagami e Zucchi, 1963) Em *Scaptotrigona postica* operárias produzem ovos tróficos inférteis, que servem para alimentar a rainha bem como ovos férteis que darão origem a machos (Sakagami e Zuchi, 1963; Beig, 1972) Operárias de *Friesella schrottkyi* estabelecem uma proporção de ovos reprodutivos, mas não ovos tróficos (Imperatriz Fonseca e Kleinert, 1998). Em operárias de *Frieseomelita varia* os ovários entram em degeneração em um processo de morte celular programada antes de emergir o adulto (Boleli et al., 1999) de maneira que estas operárias não realizam postura, mas produzem vitelogenina durante toda sua vida, sugerindo participação da vitelogenina em processos fisiológicos não relacionados à reprodução (Dallacqua et al., 2007).

Em vespas primitivamente eusociais e em rainhas de formigas Ponerini, a agressão física (comportamento de dominância) é o mecanismo pelo qual as rainhas estabelecem e mantém o monopólio reprodutivo em

suas colônias, sendo que no caso de morte da rainha ela é substituída por uma de suas operárias (Pardi, 1948; Gamboa et al., 1990; Röseler, 1991; Liebig et al., 1999; 1999; Kardile e Gadagkar, 2002).

Em várias espécies de formigas, as operárias retêm a capacidade de ativação do ovário, produzindo ovos não fertilizados e morfologicamente diferentes dos ovos férteis denominados ovos tróficos, utilizados na alimentação das larvas e das castas reprodutivas (Hölldobler e Wilson, 1990; Fénéron e Billen, 1996; Gobin et al., 1998; Dietemann e Peeters, 2000).

O sistema reprodutor feminino dos insetos consiste em um par de ovários interligados por um par de ovidutos laterais a um oviduto comum (Snodgrass, 1935; Chapman, 1998). Os dois ovários se localizam látero-dorsalmente ao tubo digestivo, enquanto os ovidutos laterais e oviduto comum são ventrais (Snodgrass, 1935). O ovário nos insetos está dividido em unidades funcionais denominados ovaríolos, tendo variações quanto ao modo de vida e posição taxonômica dos insetos (Snodgrass, 1935; Chapman, 1998).

Os ovaríolos prolongam-se para a região ântero-dorsal, onde se prendem, conjuntamente, a um mesmo ponto do exoesqueleto, enquanto a base dos ovários e os ovidutos laterais dirigem-se para a região ventral, onde se ligam ao oviduto comum, ventral ao tubo digestivo (Snodgrass, 1935).

Nos insetos, os ovaríolos são classificados em dois tipos: panoístico quando não apresentam células nutridoras e meroístico, quando existem células nutridoras (Snodgrass, 1935; Buning, 1994). Esse último tipo pode ser subdividido em dois outros, conforme a disposição das células nutridoras nos ovaríolos: telotrófico, com as células nutridoras restritas ao ápice do ovaríolo formando o trofário e politrófico, com as células nutridoras acompanhando os ovócitos ao longo do ovaríolo (Chapman, 1998).

Ovaríolo meroístico politrófico está presente em Hymenoptera e em outros insetos holometábolos, exceto alguns Coleoptera e Siphonaptera que apresentam ovaríolos telotróficos (Snodgrass, 1935).

O ovaríolo meroístico politrófico pode ser dividido nas seguintes porções: filamento terminal, composto por tecido conectivo oriundo de cada porção distal dos ovaríolos; germário, porção onde se encontram as células

primordiais ou ovogônias; e vitelário, porção do ovaríolo relativamente extensa, que se caracteriza pela presença de folículos formados pela câmara trofocitária e câmara ovocítica recoberta por células foliculares (Snodgrass, 1935)

No vitelário ocorre o amadurecimento relativamente lento do ovócito pelo acúmulo de material citoplasmático produzido pelas células nutridoras denominado pré-vitelogênese, sendo seguido por um período de rápida deposição de vitelo, ou vitelogênese, que ocorre principalmente no ovócito terminal de cada ovaríolo e leva à produção de ovócitos completamente maduros (Gullan e Cranston, 2005).

A vitelogênese envolve a produção de lipoglicolipoproteínas específicas, vitelogeninas, sintetizadas em grande escala no corpo gorduroso, liberadas na hemolinfa e captadas pelos ovócitos, onde são armazenadas na forma de vitelinas que são as principais fontes de nutrientes para o embrião (Engelmann, 1979; Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2008).

As vitelogeninas também atuam como desencadeadores da cadeia de sinalizadores endócrinos, geralmente ativada por fatores ambientais específicos que, em última análise, regulam a biossíntese de proteínas (Yin et al., 1990).

Em Hymenoptera sociais, a regulação da fertilidade geralmente é considerada sob o paradigma do controle hormonal, onde o hormônio juvenil e ecdisteroides atuam como indutores da síntese e absorção de vitelogenina (Raikhel et al., 2005).

A vitelogenina tem sido usada como um parâmetro para avaliar a fertilidade das fêmeas de insetos. Na abelha *Apis mellifera* a vitelogenina é encontrada na hemolinfa de rainhas um pouco antes delas emergirem, permanecendo ao longo de sua vida, enquanto operárias nutridoras apresentam pequena quantidade de vitelogenina na hemolinfa (Engels et al., 1990; Barchuk et al., 2002). A vitelogenina pode também ser encontrada na hemolinfa de machos (Trenczek et al., 1989; Barchuk et al., 2002) e ser produzida em outros órgãos, tais como as glândulas hipofaríngeas em *A. mellifera* (Seehuus et al., 2007) e ovários em alguns Diptera (Raikhel e Dhadialla, 1992).

A absorção de vitelogenina pelo ovócito, durante a vitelogênese ocorre via endocitose mediada por receptores da membrana (VgRs) e por receptores de proteínas de baixa densidade (LDLR) (low-density lipoprotein receptor) (Raikhel e Dhadialla, 1992; Sappington e Raikhel, 1998; Van Antwerpen et al., 2005). As VgRs em insetos são membros da superfamília de genes de LDLR (Yamamoto et al., 1984), que é protótipo de uma classe inteira de receptores de proteínas transmembrana (Willnow, 1999).

No caminho para o ovócito, a vitelogenina passa pelo epitélio folicular que envolve o ovócito. Entretanto, os mecanismos pelos quais essa proteína atravessa a camada de células foliculares permanecem pouco conhecidos. Em alguns insetos aparecem espaços entre as células foliculares (patência) durante a vitelogênese, sugerindo a ocorrência de rota paracelular para o transporte de vitelogenina até a superfície do ovócito, (Anderson e Telfer, 1970; Huebner e Anderson, 1972; Bast e Telfer, 1976; Abu Hakima e Davery, 1977; Rubenstein, 1979; Telfer et al., 1982; Davery et al., 1993). Em *A. mellifera* há ocorrência de minúsculos canais entre as células foliculares, sugerindo um efetivo mecanismo de transporte de vitelogenina para o espaço perivitelínico, localizado entre as células foliculares e o ovócito (Engels, 1973). Acúmulo deste material no espaço perivitelínico parece ser uma peculiaridade das abelhas, que facilita a absorção mais rápida de grandes quantidades de vitelogenina pelo ovócito (Cruz-Landim et al., no prelo), não estando esclarecido se a vitelogenina é transportada até a superfície dos ovócitos apenas pelo espaço intercelular, ou se ocorre transporte transcelular, pois a vitelogenina foi encontrada em grânulos proteicos no citoplasma das células foliculares (Fleig, 1995). No entanto, ainda não está claro se as células foliculares sintetizam vitelogenina, como ocorre em *Drosophila melanogaster* (Brerman et al., 1982), ou se esta proteína é capturada da hemolinfa. Seehuus et al. (2007) reportaram o acúmulo de vitelogenina no espaço perivitelínico de *A. mellifera*, sugerindo que pode ocorrer o transporte por ambas as rotas trans e paracelular.

Embora haja alguns estudos sobre o transporte de vitelogenina para os ovócitos da abelha *A. mellifera* não há relatos sobre este evento fisiológico nas abelhas sem ferrão altamente eusociais, nas formigas Ponerinae e nas vespas Polistinae primitivamente eusociais.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo investigar se o transporte de vitelogenina no folículo ovariano até o espaço perivitelínico ocorre por mecanismos paracelular ou transcelular em Hymenoptera sociais, contribuindo para a compreensão da fisiologia reprodutiva destes insetos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos ovários

Fêmeas em ovoposição da vespa *Mischocyttarus cassununga* e, das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata*, foram obtidas no apiário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Rainhas da formiga *Pachycondyla curvinodis* foram obtidas de colônias mantidas no Departamento de Biologia Geral da UFV.

As rainhas foram crio-anestesiadas a 0 °C durante 5 min e os ovários dissecados sob estereomicroscópio em presença de NaCl 125 mM, mais inibidor de protease.

3.2. SDS-PAGE

Os ovários foram macerados em presença de NaCl 125 mM, centrifugados a 9300 *g* por 10 min, seguido de coleta do sobrenadante, sendo a quantidade de proteínas totais neste extrato determinado pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). As amostras contendo 30 µg de proteínas foram diluídas 1:2 (v/v) em tampão de amostra (5% p/v SDS; 0,126 M Tris HCl pH 6,8; 12,5% (v/v) glicerol; 0,004% (p/v) azul de bromofenol e 10% (v/v) β-mercaptoetanol), fervidas por quatro min e aplicadas no gel.

A separação das proteínas foi feita com voltagem constante de 180 V por 30 min. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie e a massa molecular das proteínas foi calculada com base no padrão de massa molecular (Promega).

3.3. Western blotting

Amostras de ovários macerados foram submetidas a SDS-PAGE conforme metodologia anterior, em seguida o gel foi incubado por 20 min em tampão de transferência (Tris-base 0,58% (p/v); glicina 0,28% (v/v);

SDS 0,037% (v/v) e metanol 20% (v/v), seguido da transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose em voltagem constante de 200V por 16 h à 4 °C. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com tampão TBS 0,1 M, pH 8,0, contendo Tween 20 a 0,1% (v/v) (TBST) mais 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 1 h em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens em TBST sob agitação e incubadas por 16 h com anticorpo primário anti-vitelogenina na diluição de 1:500. A membrana foi novamente lavada em TBST e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase 1:500 em TBST por 2 h em temperatura ambiente, seguida de nova lavagem em TBS e revelada com solução diaminobenzidina (DAB/H₂O₂), sendo a reação interrompida com água destilada e a membrana seca ao ar.

O anticorpo anti-vitelogenina foi obtido em coelhos contra vitelogenina da formiga *Ectatomma tuberculatum* (Azevedo et al., 2011).

3.4 . Imunofluorescência

Após a dissecação, os ovários tiveram a baina peritonal dos ovários removida com auxílio de pinças e foram transferidos para solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (PBS) por 3 h a 4 °C, seguindo-se 6 lavagens de 10 min cada com PBS contendo Triton X-100 a 0,3% (PBST). Em seguida, as amostras foram pré-incubadas em soro normal de coelho a 2% em PBST 0,3% por 2 h em temperatura ambiente, submetidas a 6 lavagens em PBST , sendo cada lavagem de 10 min seguindo-se incubação por 3 dias a 4 °C em anticorpo primário anti-vitelogenina 1:500 em PBST/BSA. Em seguida as amostras foram lavadas 6 vezes em PBST sendo 10 min cada lavagem. As amostras foram incubadas em anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:500 em PBST por 60 h no escuro, em seguida passaram novamente por 6 lavagens de 10 min cada em PBST, incubadas em RNase 1:50 em PBST por 40 min no escuro e sob agitação. As amostras foram em seguida transferidas para iodeto de propídio 5 µg/mL por 5 min e lavadas novamente em PBST por 2 h sob agitação trocando-se o PBST a cada 10 min. Os ovários foram montados com

sacarose 50% e visualizados em microscópio de fluorescência confocal a laser Zeiss 510 Meta no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

3.5. Detecção de actina

Após a dissecação, os ovários foram transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 30 min. Em seguida foram lavados 3 vezes em PBST sendo cada lavagem de 10 min. Em seguida os ovários foram incubados no escuro em faloidina conjugada com rodamina 1:100 em PBST por 30 min, lavadas novamente 3 vezes em PBST sendo cada lavagem de 10 min. As amostras foram montadas com sacarose 50% e visualizadas em microscópio de fluorescência confocal a laser Zeiss 510 Meta no NMM.

3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os ovários foram dissecados e em seguida fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 30 min. A seguir os ovariolos foram seccionados em suas porções pré-vitelogênicos caracterizada pela presença de câmara nutridora maior que a câmara ovocítica, e vitelogênica caracterizada por câmara ovocítica mais desenvolvida que a câmara nutridora. Então as amostras foram lavadas no mesmo tampão por duas vezes, sendo cada lavagem de 10 min, após as lavagens foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, lavadas novamente no tampão, desidratadas em etanol 70% e embebidas em resina LR White e etanol 70% (2:1) por 1 h e em resina pura por mais 1 h. Posteriormente os ovários foram embebidos em resina pura por 16 h em temperatura ambiente, seguindo polimerização em cápsulas de gelatina a 60 °C por 24 h.

Secções ultrafinas (60 a 90 nm de espessura) foram contrastadas em acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 1% e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no NMM.

3.7. Imunocitoquímica

Para localizar a vitelogenina em nível celular, os ovários foram dissecados e transferidos para glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 30 min e divididos em suas porções pré-vitelogênicas e vitelogênicas.

A seguir, os ovários foram lavados com tampão cacodilato de sódio e desidratados em etanol 70% duas vezes por 30 min cada. Em seguida, os ovários foram embebidos em solução de resina LR White e etanol 70% (2:1) por 1 h e em resina pura por mais 1 h. Posteriormente os ovários foram embebidos em resina pura por 16 h em temperatura ambiente, seguindo polimerização em cápsulas de gelatina a 60 °C por 24 h.

Secções ultrafinas dos ovários foram obtidas em ultramicrotomo com navalhas de diamante, e transferidas para grades de níquel. As amostras foram lavadas em água destiladas duas vezes, 5 min cada, em seguida foram lavadas com TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ (pH 7,2) por 5 min. A seguir as amostras foram transferidas para soro normal de coelho 1:30 em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ por 30 min a 4 °C. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-vitelogenina 1:500 em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ durante 16 h a 4 °C.

Após 16 h as secções foram lavadas em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ 4 vezes sob agitação sendo cada lavagem de 10 min, em seguida mais uma lavagem em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ (pH 8,2) por 30 min. Posteriormente as secções de ovários foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com ouro coloidal 15 nm 1:30 em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ (pH 8,2) 1 h sob agitação. Então as amostras foram lavadas em TBS + 1% BSA + 0,05% NaN₃ (pH 7,2) quatro vezes sob agitação por 10 min cada, lavadas em TBS + 0,1% de Tween 20 por 3 min sob agitação por quatro vezes, mais três lavagens em água ultrapura por 2 min cada e sob agitação.

Após a etapa anterior as amostras foram contrastadas por 10 min com acetato de uranila aquosa a 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 5 min e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no NMM.

4. RESULTADOS

4.1. SDS-PAGE e Western Blotting

Os extratos proteicos dos ovários de *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *M. cassununga* submetidos à eletroforese em SDS-PAGE apresentaram diferenças em seu padrão de bandas, enquanto em *P. curvinodis* ocorreram poucas bandas proteicas (Fig 1).

O Western blotting mostrou reação positiva para o anticorpo anti-vitelogenina de *E. tuberculatum* em todas as espécies analisadas. Dentre as espécies analisadas, a vitelogenina apresentou diferentes massas moleculares entre as espécies (Fig 2). Na formiga *P. curvinodis* foram encontradas sete bandas positivas para vitelogenina variando de 48 kDa a 129 kDa, sendo maior expressão da proteína 48 kDa que se apresenta ausente nos outros organismos estudados. Em *A. mellifera* as bandas positivas para vitelogenina variaram de 21 kDa a 125 kDa, em *M. quadrifasciata*, a variação foi de 37 kDa a 125 kDa, e na vespa *M. cassununga* a variação foi de 52 kDa a 123 kDa.

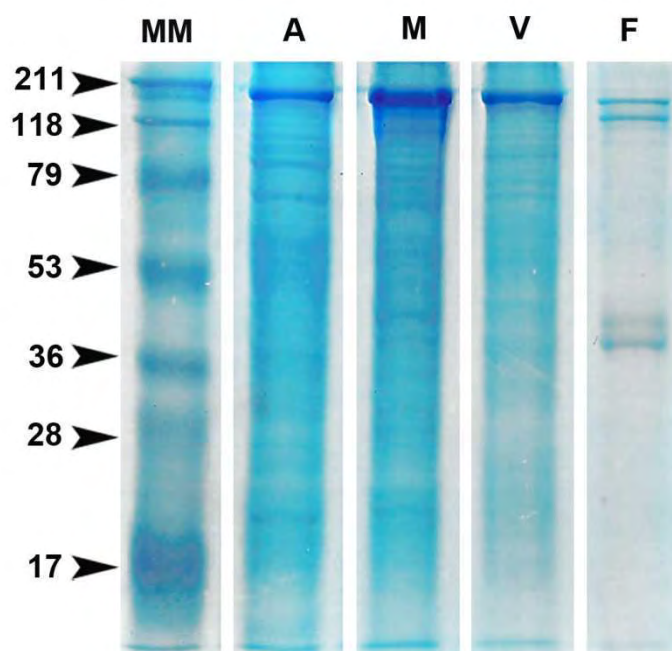


Figura 1. SDS-PAGE mostrando o perfil proteico dos ovários de *Apis mellifera* (A), *Melipona quadrifasciata* (M), *Mischocyttarus cassununga* (V), *Pachycondyla curvinodis* (F). Marcador de massa molecular (MM) em kDa.

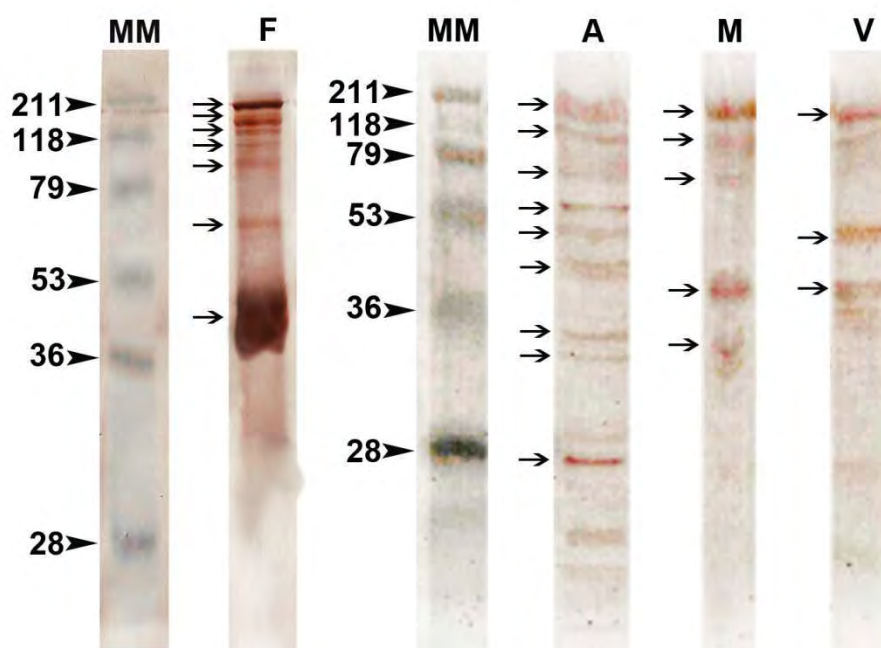


Figura 2. Western blotting evidenciando proteínas positivas para com anticorpo anti-vitelogenina em extratos de ovários (setas). *Pachycondyla curvinodis* (F). Abelhas *Apis mellifera* (A), *Melipona quadrifasciata* (M), *Mischocyttarus cassununga* (V), Marcador de massa molecular (MM) em kDa.

4.2. *Apis mellifera*

4.2.1. Imunofluorescência

A parede das câmaras ovocíticas vitelogênicas de *A. mellifera* é formada por uma camada única de células foliculares cubicas, com acúmulo de vitelogenina no interior destas células (Fig. 3A).

A organização dos filamentos de actina no folículo pré-vitelogênico de *A. mellifera* mostrou que a região basal das células foliculares apresentou arranjo irregular de actina, com ausência dos mesmos em alguns pontos, enquanto nas regiões laterais estes filamentos estão presentes ao longo de toda a extensão da célula, assim como na superfície apical (Fig. 3B).

Na região basal das células foliculares do folículo vitelogênico os filamentos de actina apresentaram o mesmo padrão de distribuição daquele encontrado no folículo pré-vitelogênico, enquanto nas regiões laterais ocorreram pontos de interrupção dos filamentos de actina (Fig. 3 C). Na região apical das células foliculares ocorreu um aumento na quantidade dos filamentos de actina com curtas projeções em direção ao ovócito (Fig. 3C).

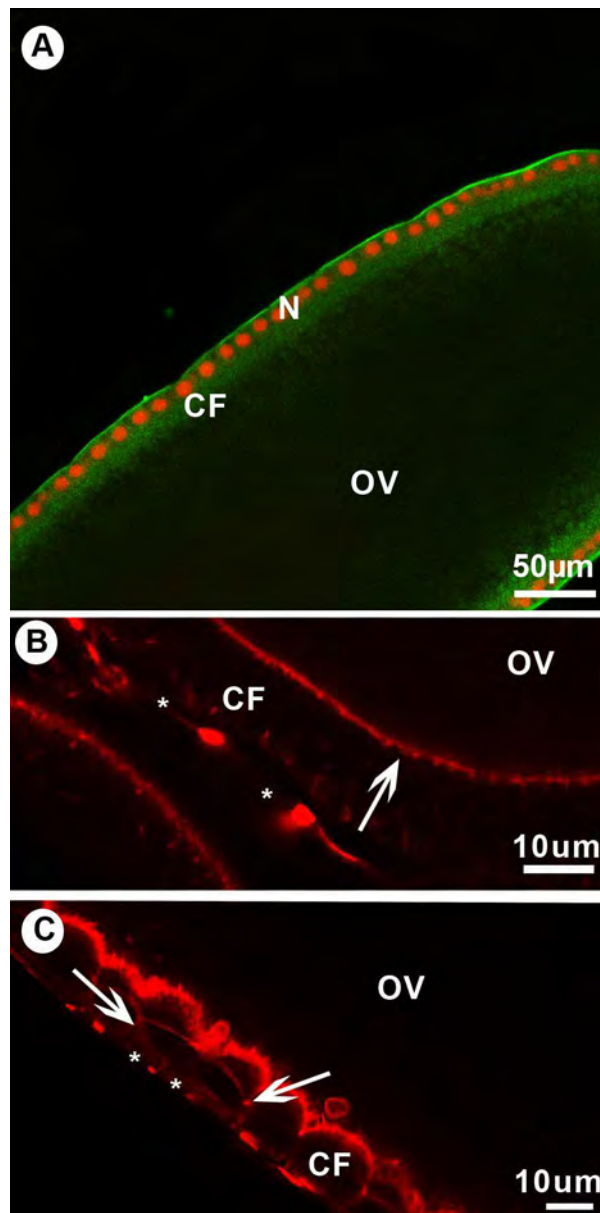


Figura 3. Microscopia confocal da câmara ovocítica do folículo ovariano de *Apis mellifera*. **A)** Folículo vitelogênico mostrando presença de vitelogenina nas células foliculares (CF) e no interior do ovócito (OV). N- Núcleo das células foliculares. **B)** - Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) de folículo pré-vitelogênico mostrando interrupção (asteriscos) na porção basal e distribuição contínua na região apical (seta). **C)** - Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) do folículo vitelogênico mostrando interrupções na região basal (asteriscos) e nas regiões laterais (setas). Notar alta ocorrência de filamentos de actina no ápice com projeções em direção ao ovócito (OV).

4.2.2. Ultraestrutura

Nos folículos vitelogênicos do ovário de *A. mellifera* as câmaras ovocíticas são formadas por uma camada única de células foliculares cubicas seguida de uma fina bainha peritonal envolvendo o ovócito (Fig. 4A, E).

Durante a vitelogênese as células foliculares em sua região apical apresentaram curtas projeções formando estreitos labirintos na região perivitelínica com acúmulo de material elétron-denso (Fig. 4A, B, C). A região basal destas células, apresentaram longas e estreitas invaginações da membrana basal (Fig. 4E, F), núcleo mediano rico em cromatina descondensada e com nucléolo evidente (Fig. 4A, B, E), com citoplasma perinuclear contendo mitocôndrias as quais estão também no citoplasma apical (Fig. 4B, D).

As células foliculares são mantidas unidas lateralmente por junções septadas (Fig. 4C, D) que se distribuíram da região apical a basal. No interior do ovócito ocorreram grânulos elétron-densos (Fig. 4A, B, C).

Em algumas regiões da câmara ovocítica ocorreram dobras basais do epitélio folicular aumentando o espaço entre a base do epitélio e a bainha peritonal, com acúmulo de material com aspecto floculento em seu interior (Fig. 4E, F)

4.2.3. Imunocitoquímica

A imunolocalização de vitelogenina mostrou a presença desta proteína na região apical das células foliculares no espaço perivitelínico e no interior do ovócito (Fig. 5A). No citoplasma apical das células foliculares a vitelogenina foi localizada no interior de um sistema reticular membranosos (Fig. 5B). Este sistema reticular contendo vitelogenina também estava presente nas regiões laterais de células adjacentes que apresentam patência (Fig. 5C), porém não foi evidenciada a presença desta proteína nos curtos e estreitos espaços intercelulares das células em patência, mantidos por junções septadas (Fig. 5C).

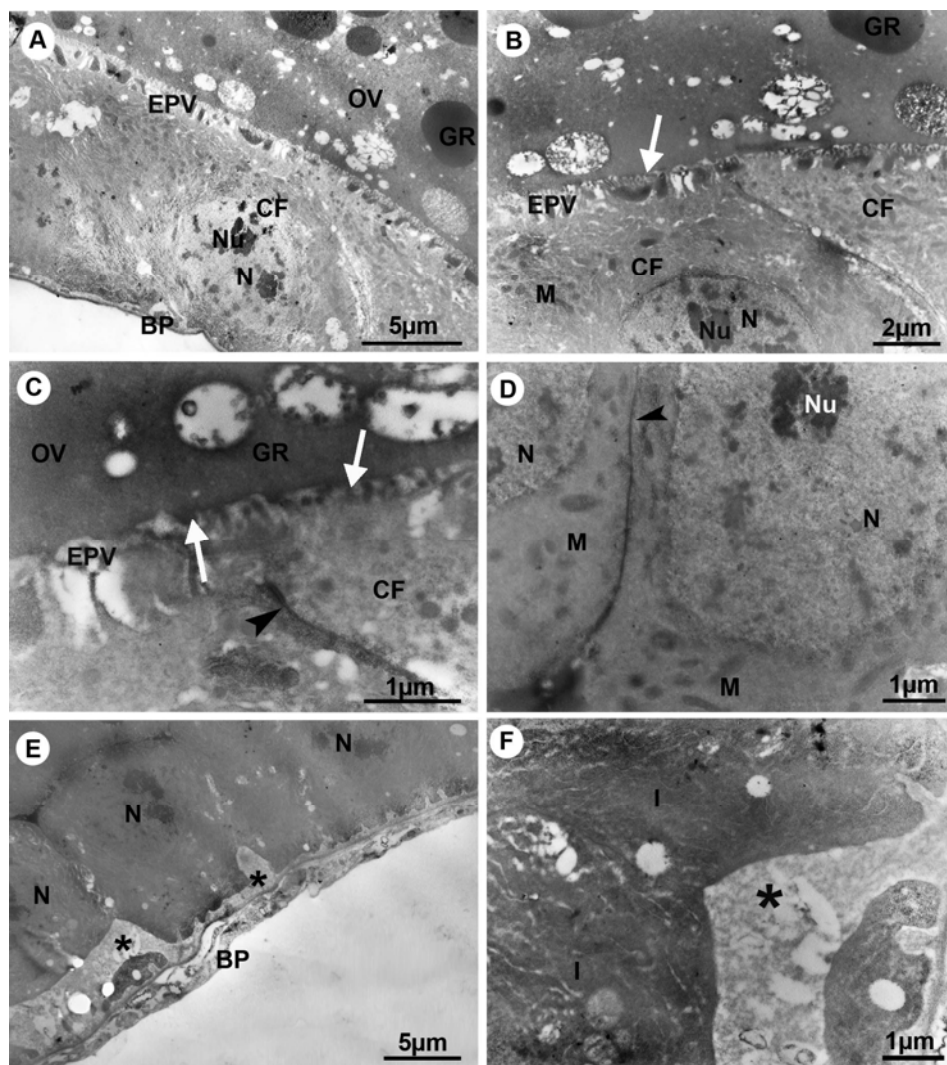


Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão da câmara ovocítica de folículo vitelogênico do ovário de *Apis mellifera*. **A)** Aspecto geral de célula folicular cúbica mostrando núcleo (N) mediano com cromatina descondensada e nucléolo (Nu) e espaço perivitelínico (EPV). Notar grânulo elétron-denso (GR) no ovócito (OV). **B)** Região apical das células foliculares mostrando a presença de mitocôndrias (M) e de projeções da membrana plasmática apical formando curtos labirintos (setas) no espaço perivitelínico (EPV). **C)** Região apical das células foliculares (CF) mostrando junções septadas (ponta de seta) próxima ao ápice com projeções da membrana plasmática formando labirintos (setas) no espaço perivitelínico (EPV). **D)** Contato entre as células foliculares mostrando espaço intercelular estreito entre as junções septadas (ponta de seta). **E)** Epitélio folicular mostrando regiões de dobras com aumento de espaço subepitelial preenchido por material floculento (asteriscos). **F)** Detalhe da região basal do epitélio folicular mostrando acumulo de material floculento no espaço subepitelial (asterisco) e a região basal da célula folicular com invaginações da membrana plasmática (I). Bainha peritonial (BP).

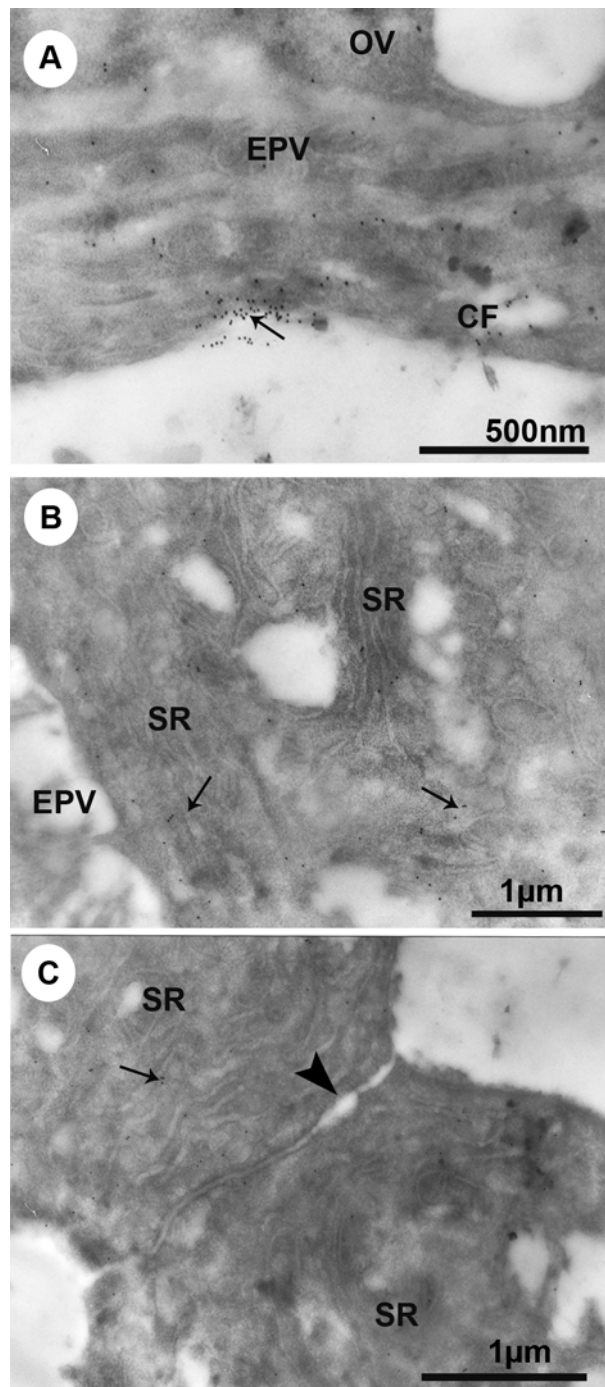


Figura 5: Imunolocalização de vitelogenina na câmara ovocítica em folículos vitelogênicos de *Apis mellifera*. **A)** Vitelogenina (seta) no citoplasma apical das células foliculares (CF), no espaço perivitelínico (EPV) e no ovócito (OV). **B)** Citoplasma apical da célula folicular mostrando o sistema reticular membranoso (SR) contendo vitelogenina (setas). **C)** Região lateral de duas células em patência mostrando o sistema reticular membranoso (SR) com vitelogenina (seta) e ausência desta proteína no espaço intercelular (ponta de seta).

4.3. *Melipona quadrifasciata*

4.3.1. Imunofluorescência

A parede das câmaras ovocíticas vitelogênicas de *M. quadrifasciata* é formada por uma camada única de células foliculares cúbicas que apresentaram presença de vitelogenina no seu interior (Fig. 6A).

O tratamento com faloidina evidenciou que nas células foliculares pré-vitelogênicas os filamentos de actina apresentam distribuição homogênea nas superfícies com poucos pontos de interrupção na superfície basal (Fig. 6B).

Nos folículos vitelogênicos ocorrem mais pontos de interrupção dos filamentos de actina na região basal das células foliculares e aqueles nas regiões laterais parecem desorganizados, com aumento na concentração destes filamentos na superfície apical. (Fig. 6C).

4.3.2. Ultraestrutura

Nos folículos vitelogênicos do ovário de *M. quadrifasciata* as células foliculares da câmara ovocítica possuem núcleo central com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Fig. 7 A). A região apical destas células apresentou citoplasma rico em mitocôndrias que se distribuíram até a região perinuclear (Fig. 7A, B) podendo ocorrer em folículos vitelogênicos algumas figuras mielínicas (Fig. 7C).

As regiões de contato celular possuem espaços intercelulares estreitos com junções septadas desde a região basal até a apical (Fig. 7B, C). Entre a superfície basal das células foliculares e a bainha peritonal ocorreu um espaço dilatado preenchido por material finamente granular (Fig. 7B). No ovócito foi encontrado acúmulo de grânulos eletrôn-densos (Fig. 7C). Uma espessa bainha peritonal envolve o folículo (Fig. 7A, B).

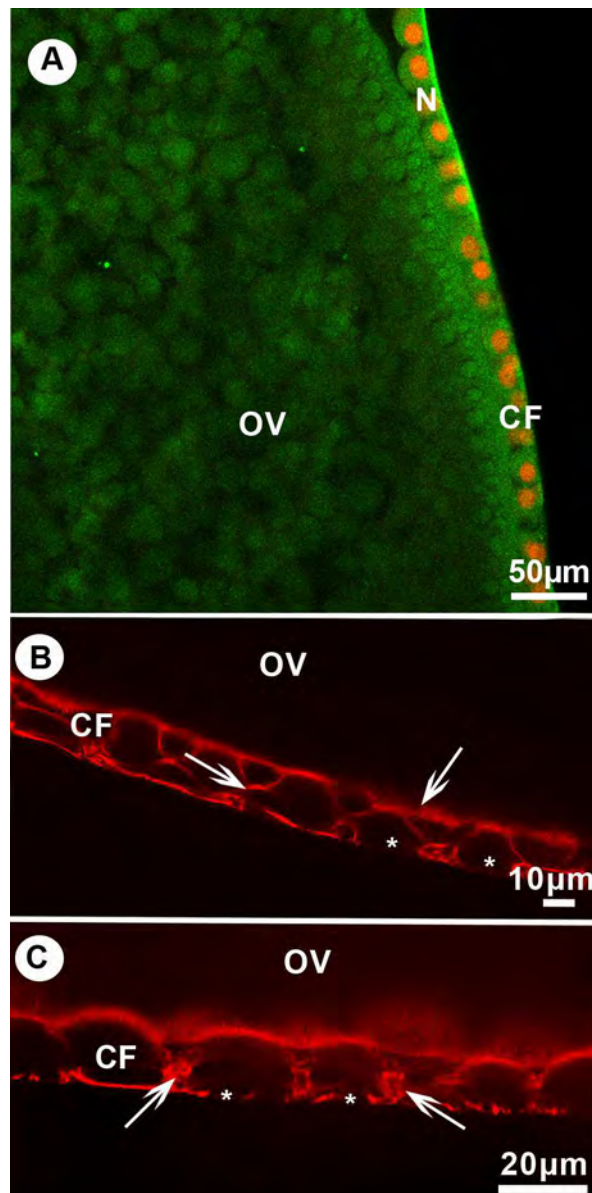


Figura 6. Microscopia confocal da câmara ovocítica de folículo ovariano de *Melipona quadrifasciata*. **A)** Folículo vitelogênico mostrando presença de vitelogenina nas células foliculares (FC) e no interior do ovócito (OV). N- Núcleo das células foliculares. **B)** Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) de folículo pré-vitelogênico mostrando interrupções (asteriscos) na porção basal e distribuição contínua nas regiões laterais e apical (setas). **C)** Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) de folículo vitelogênico mostrando interrupção na região basal (asteriscos) e aparente desorganização nas regiões laterais (setas). Notar acúmulo de filamentos de actina na superfície apical.

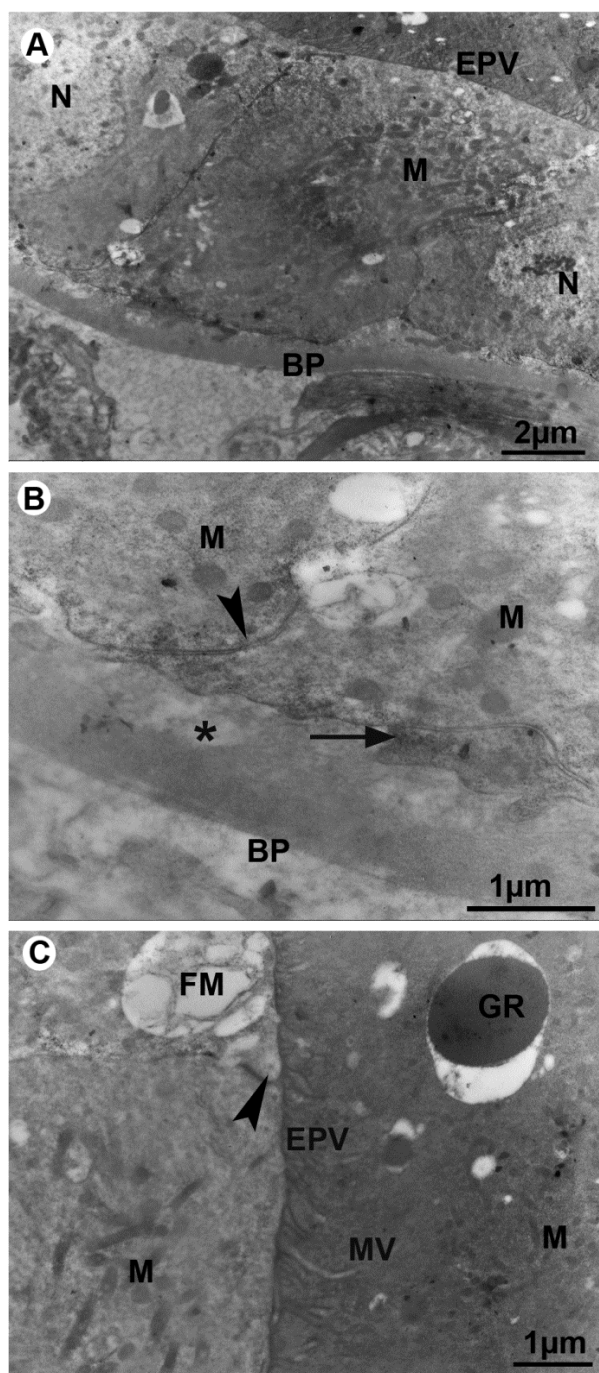


Figura 7. Micrografia eletrônica de transmissão da câmara ovocítica de folículo vitelogênico do ovário de *Melipona quadrifasciata* **A)** Célula folicular mostrando acúmulo de mitocôndrias (M) no citoplasma apical e perinuclear, espaço perivitelínico (EPV), núcleo com cromatina descondensada (N) e a bainha peritoneal (BP). **B)** Região basal da célula folicular mostrando junção septada (ponta de seta) com espaço intercelular estreito, algumas invaginações da membrana plasmática (seta) e acúmulo de material finamente granular (asteriscos) no espaço subepitelial e presença de mitocôndrias na região do citoplasma. **C)** Região apical da célula folicular mostrando junção septada (ponta de seta) com espaço intercelular estreito e microvilosidades (MV) no espaço perivitelínico (EPV). Bainha peritoneal (BP). Figura mielínica (FM). Granulo (GR).

4.3.3 Imunocitoquímica

A imunolocalização de vitelogenina mostrou a presença desta proteína no citoplasma das células foliculares, no espaço perivitelinico e no interior do ovócito (Fig. 8A). Nas regiões apicais e laterais das células foliculares, a vitelogenina foi localizada no interior de um sistema reticular membranoso (Fig. 8A, B).

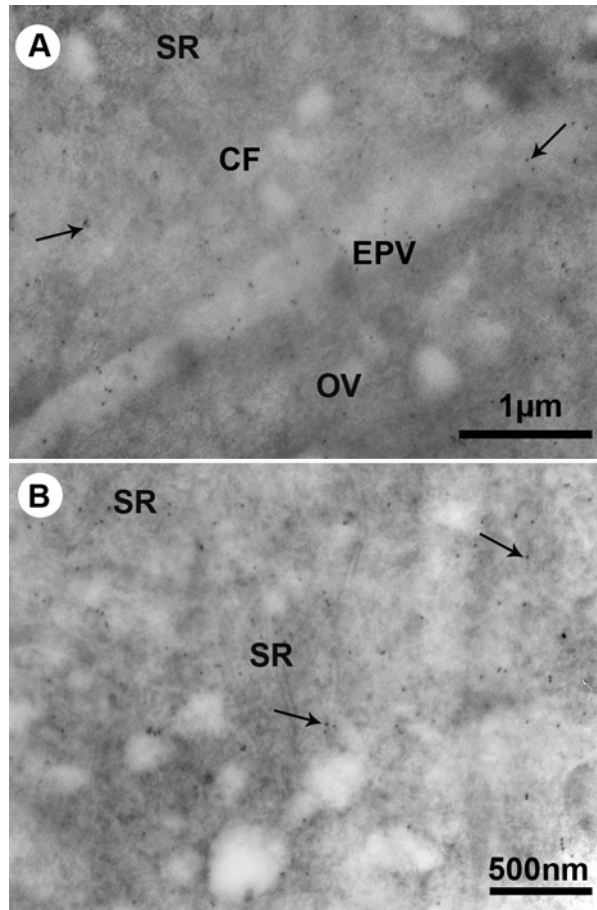


Figura 8. Imunolocalização de vitelogenina na câmara ovocítica em folículos vitelogênicos de *Melipona quadrifasciata*. **A)** Vitelogenina (setas) no interior das células foliculares (CF), no espaço perivitelinico (EPV) e no ovócito (OV), sistema reticular membranoso (SR). **B)** região lateral da célula folicular mostrando vitelogenina no citoplasma (setas) e no sistema reticular membranoso (SR).

4.4. *Mischocyttarus cassununga*

4.4.1. Imunofluorescência

Na câmara ovocítica dos folículos vitelogênicos do ovário de *M. cassununga* a vitelogenina foi localizada no interior das células foliculares e do ovócito com acúmulo no espaço periovocítico. (Fig 9A).

No folículo pré-vitelogênico de *M. cassununga* os filamentos de actina estão presentes nas superfícies basal, lateral e apical, com algumas interrupções na região basal e distribuição uniforme na superfície apical (Fig. 9B).

No folículo vitelogênico os filamentos de actina continuam apresentando regiões de interrupções sendo que aqueles das regiões laterais não são mais detectados (Fig. 9).

4.4.2 Ultraestrutura

Nos folículos vitelogênicos do ovário de *M. cassununga* as células foliculares da câmara ovocítica apresentaram núcleo central com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (Fig. 10A). Em algumas regiões da câmara ovocítica, células adjacentes mostraram afastamento entre elas nas porções apicais e basais, estando em contato lateral na região mediana (Fig. 10A). Como resultado desta separação há aumento dos espaços intercelulares basais e apicais, bem como no espaço perivitelínico, os quais estão preenchidos por material de aspecto granular (Fig. 10A).

As regiões de contato das células adjacentes apresentaram espaços intercelulares estreitos estando as células unidas por junções septadas espalhadas ao longo de toda a extensão do contato celular (Fig. 10B, C). No citoplasma das células foliculares é comum a presença de mitocôndrias e figuras mielínicas (Fig. 10B, C).

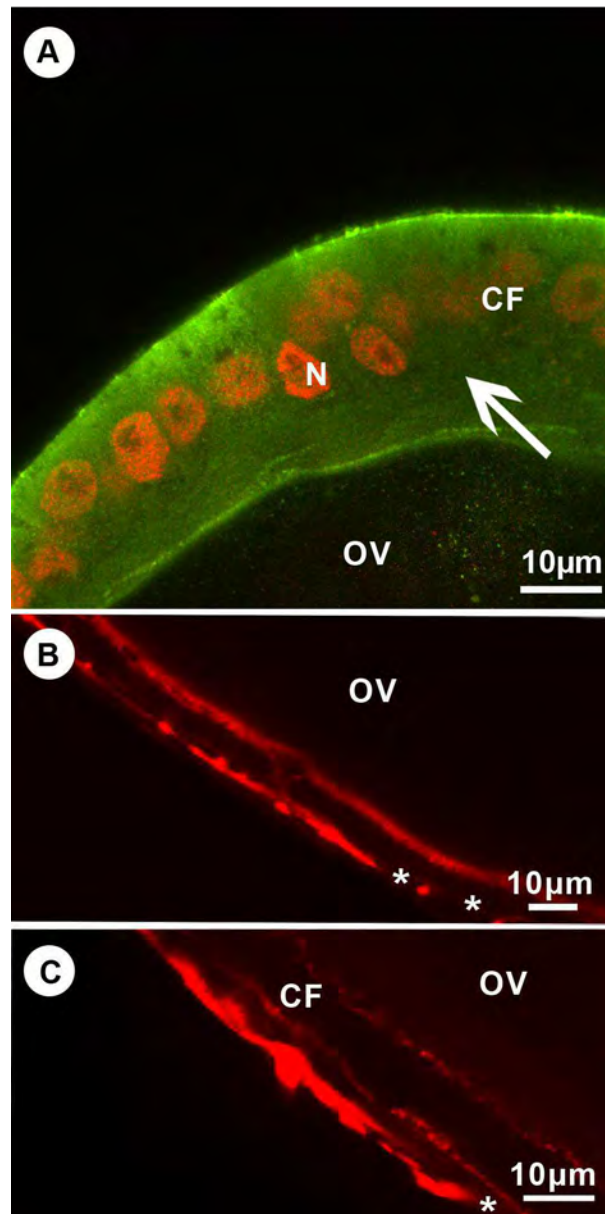


Figura 9. Microscopia confocal da câmara ovocítica de folículo ovariano de *M. cassununga*; **A)** Folículos vitelogênicos mostrando presença de vitelogenina nas células foliculares (CF) e no interior do ovócito (OV). N- Núcleo das células foliculares. **B)** Distribuição dos filamentos de actina nas células foliculares de câmara ovocítica pré-vitelogênica nas superfícies apical, lateral com regiões de interrupção na região basal (asteriscos). **C)** Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) de folículo vitelogênico mostrando interrupções na região basal (asteriscos) e ausência destes nas regiões laterais.

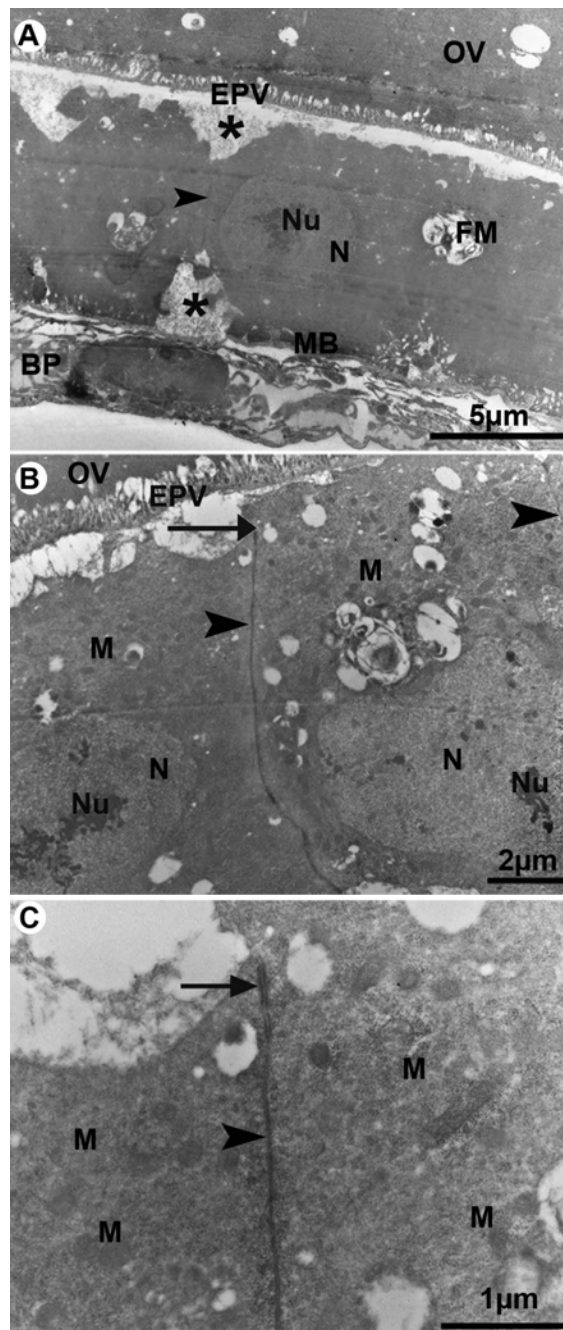


Figura 10. Micrografia eletrônica de transmissão da câmara ovocítica de folículo vitelogênico do ovário da vespa *Mischocyttarus cassununga*. **A)** Aspecto geral das células foliculares (CF) mostrando núcleo (N) com cromatina descondensada e nucléolo (Nu). Notar regiões de separação entre as células no ápice e na base do epitélio contendo material granular (asteriscos) que também está presente no espaço perivitelínico (EPV). **B)** Região mediana de contato celular mostrando espaço intercelular estreito (pontas de setas) com junções septadas (seta). **C)** Região apical de contato celular de duas células mostrando espaço intercelular estreito (ponta de seta) e junção septada no ápice (seta). Bainha peritonal (BP), Ovócito (OV), mitocôndrias (M), figuras mielínicas (FM).

4.4.3. Imunocitoquímica

A imunolocalização de vitelogenina mostrou a presença desta proteína no citoplasma das células foliculares, no espaço perivitelínio e no interior do ovócito (Fig. 11A), não havendo presença de vitelogenina nos espaços intercelulares, mesmo quando há dilatações destes na região de contato entre as células (Fig. 11B). Nas regiões apicais e basais o citoplasma apresenta um sistema reticular membranoso contendo marcação positiva para vitelogenina no interior destas (Fig. 11C).

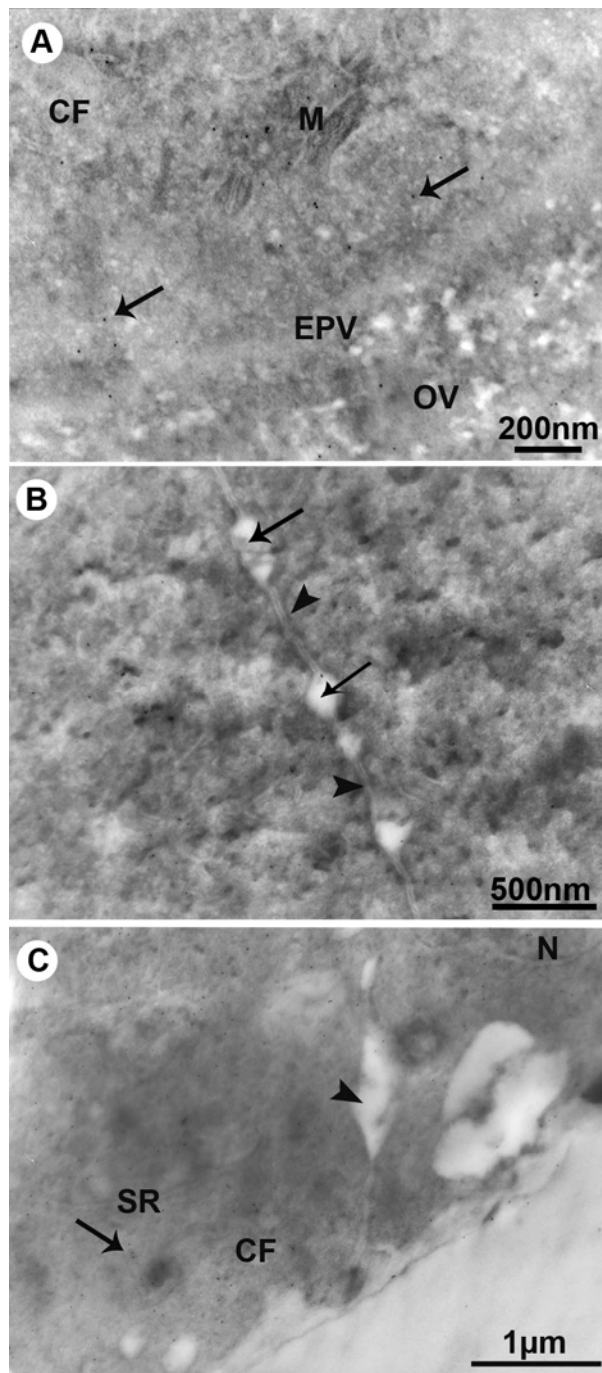


Figura 11. Imunolocalização de vitelogenina na câmara ovocítica em folículos vitelogênicos de *Mischocyttarus cassununga*. **A)** Vitelogenina (setas) no interior das células foliculares (CF), no espaço perivitelínico (EPV) e no ovócito (OV). **B)** Detalhe do espaço intercelular (ponta de seta) com algumas regiões dilatadas (setas) e ausência de vitelogenina. **C)** Região basal da célula folicular mostrando a presença de vitelogenina (setas) no interior do sistema reticular (SR). Notar espaço intercelular (ponta de seta) sem presença de vitelogenina.

4.5. *Pachycondyla curvinodis*

4.5.1. Imunofluorescência

A imunolocalização de vitelogenina mostrou presença desta proteína nas células foliculares e nos ovócitos (Fig. 12A).

O folículo pré-vitelogênico de *P. curvinodis* mostrou organização regular de filamentos de actina na superfície das regiões apical, lateral e a basal com poucos pontos de interrupções nesta última (Fig. 12B).

No folículo vitelogênico há aumento dos pontos de interrupção dos filamentos de actina na superfície basal e a desorganização destes nas superfícies laterais (Fig. 12C).

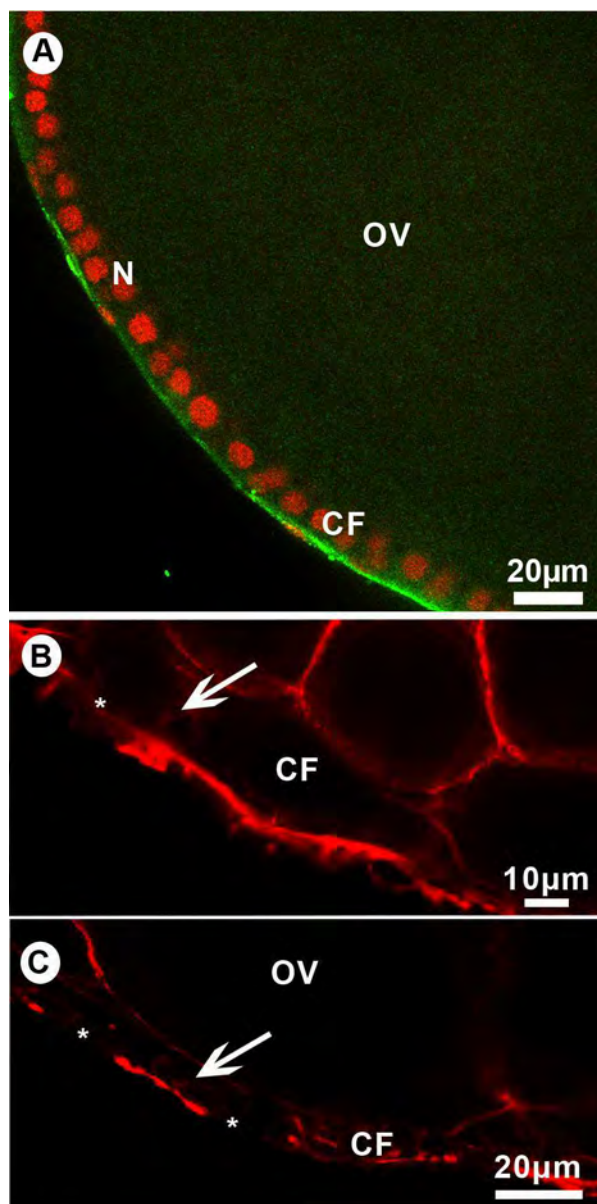


Figura 12. Microscopia confocal da câmara ovocítica de folículo ovariano de *Pachycondyla curvinodis*. **A)** Folículo vitelogênico mostrando presença de vitelogenina nas células foliculares (CF) e no interior do ovócito (OV). **B)** Distribuição regular dos filamentos de actina nas células foliculares de folículo pré-vitelogênico nas superfícies apical, lateral (seta) com pouca interrupção na região basal (asterisco). **C)** Distribuição de filamentos de actina nas células foliculares (CF) de folículo vitelogênico mostrando interrupções na região basal (asteriscos), ausência destes nas regiões laterais (seta).

4.5.2. Ultraestrutura

As células foliculares da câmara ovocítica de folículos vitelogênicos de *P. curvinodis* foram cúbicas com núcleo bem desenvolvido com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente. (Fig. 13A). A superfície apical apresentou microvilosidades curtas. Os espaços intercelulares mostram-se estreitos, mas em algumas regiões ocorrem dilatações pontuais dos mesmos (Fig. 13A). O citoplasma perinuclear é rico em mitocôndrias e alguns grânulos elétron-densos (Fig. 13B) e, no citoplasma da porção basal é comum a presença de vesículas elétron-lucidas (Fig. 13C).

4.5.3. Imunocitoquímica

A imunolocalização de vitelogenina mostrou a presença desta proteína no citoplasma das células foliculares, no espaço perivitelínico. No interior das células foliculares, a vitelogenina está localizada dispersa no citoplasma e no interior do sistema reticular membranoso (Fig. 14). Mesmo naquelas regiões onde há dilatações dos espaços intercelulares, não há imunolocalização de vitelogenina (Fig. 14).

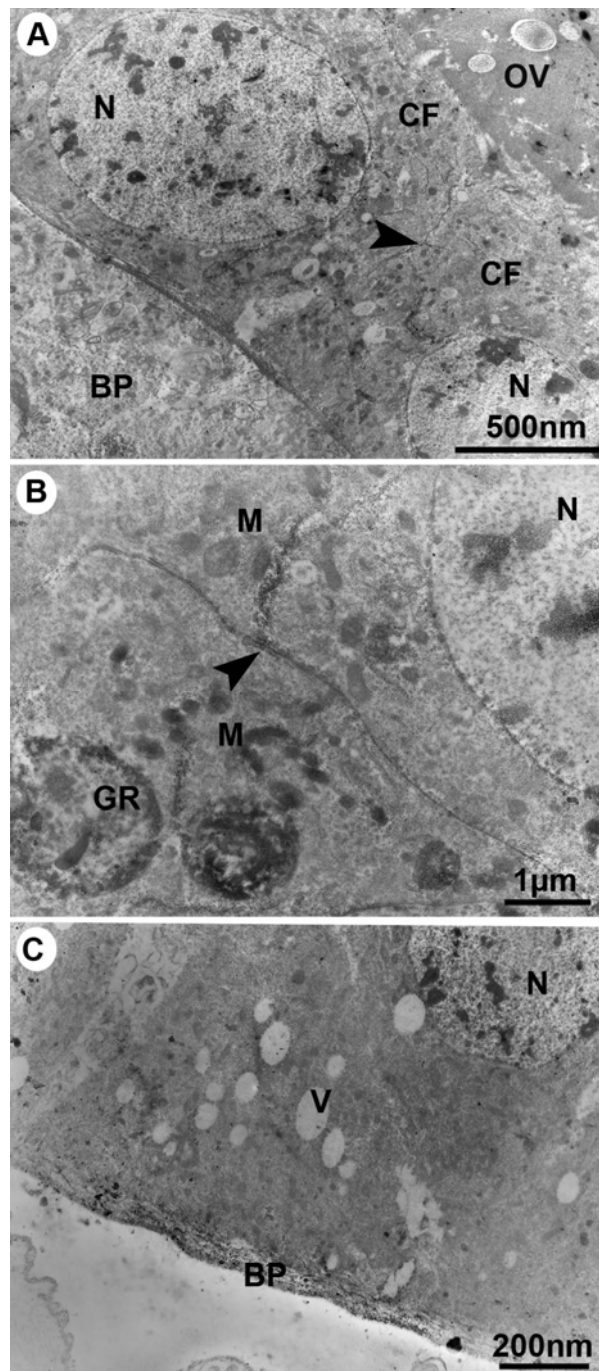


Figura 13. Micrografia eletrônica de transmissão da câmara ovocítica de folículo vitelogênico do ovário da formiga *Pachycondyla curvinodis* **A)** Aspecto geral das células foliculares (CF) mostrando núcleo (N) com cromatina descondensada. Notar células adjacentes com espaço intercelular estreito (ponta de seta). **B)** Citoplasma perinuclear mostrando acúmulo de mitocôndria (M) e grânulos elétron-densos (GR) próximos ao espaço intercelular (ponta de seta). **C)** Região basal da célula folicular mostrando a presença de vesículas elétron-lúcidas (V) no citoplasma.

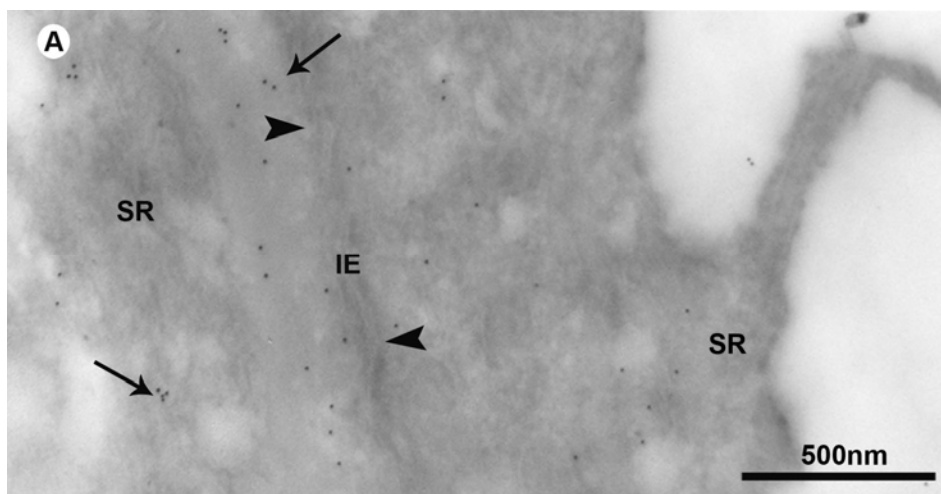


Figura 14. Imunolocalização de vitelogenina na câmara ovocítica em folículos vitelogênicos da formiga *Pachycondyla curvinodis*, mostrando região de contato entre duas células foliculares com a presença de vitelogenina (setas) no interior do citoplasma e no sistema reticular membranoso (SR). Notar a ausência de vitelogenina nos espaços intercelulares dilatados (IE) e estreito com a presença de junções septadas (ponta de seta).

5. DISCUSSÃO

A semelhança do perfil proteico total mostrado pela eletroforese dos extratos de ovários de *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *M. cassununga* sugerem constituição proteica similar entre as espécies, diferindo do perfil encontrado em *P. curvinodis*. As proteínas encontradas nos extratos de ovários são semelhantes em massa molecular a vitelogenina encontrada na formiga *Ectatomma tuberculatum* que é de 156 kDa (Azevedo et al., 2011) e, nas abelhas *Melipona quadrifasciata*, 180 kDa (Oliveira et al., 2012), e *Apis mellifera*, de 150 kDa (Seehuus et al., 2007).

A presença de diferentes bandas marcadas pelo anticorpo anti-vitelogenina de *E. tuberculatum* nas espécies aqui estudadas mostra a eficácia deste anticorpo e a conservação de domínios proteicos da vitelogenina entre as espécies a qual este anticorpo se liga. A vitelogenina é uma proteína que se mostra conservada nos insetos (Chen et al., 1997; Tufail e Takeda, 2008), embora o número de genes que a codificam varie em diferentes espécies, pois em barata *Blattella germanica* (Blattaria) há um gene (Comas et al. 2000) e em *Leucophaea maderae* (Blattaria) dois genes (Tufail e Takeda, 2007), enquanto nos holometábolos, foram identificados cinco genes em *Aedes aegypti* (Diptera) (Chen et al., 1994), um gene em *Bombyx mori* (Lepidoptera) (Yano et al., 1994) e em *Apis mellifera* (Apidae) (Piulachs et al., 2003) e três genes em *Solenopsis invicta* (Formicidae) (Tufail e Takeda, 2008).

O interessante é que há varias bandas identificadas pelo o anticorpo anti-vitelogenina em uma mesma espécie, o que sugere diferentes transformações pós-traducionais na proteína antes desta entrar nos ovários. Segundo Dhadialla e Rainkhel, (1990) vitelogeninas em insetos são moléculas grandes de aproximadamente 200 kDa, sintetizadas no corpo gorduroso em um processo que envolve mudanças estruturais significativas na proteína permitindo o transporte de carboidratos, lipídios e outros nutrientes pela hemolinfa até o ovário. A síntese de vitelogenina no corpo gorduroso ocorre na forma de polipeptídios simples ou múltiplos os quais passam por modificações como glicosilação, lipidificação, fosforilação, sulfatação e clivagem proteolítica antes de serem liberados na hemolinfa

como proteínas oligoméricas com massas moleculares que variam de 300 a 600 KDa (Wheeler et al., 1999; Tufail e Takeda, 2008). Esses agregados proteicos são posteriormente captados pelos ovócitos via endocitose mediada por receptores (Tufail e Takeda, 2009) e estocados na forma de grânulos, quando recebem o nome de vitelinas (Raikhel e Dhadialla, 1992; Giorgi et al., 1999). Assim considerando a organização da vitelogenina em proteínas oligoméricas na hemolinfa, é possível sugerir que a ocorrência de diferentes bandas reconhecidas pelo anticorpo, possa ser devido à clivagens deste complexo no interior do ovócito e/ou desorganização dos mesmos durante os procedimentos com agentes redutores e desnaturantes para a realização da eletroforese. Neste sentido, diferentes proteínas reagiram positivamente para os anticorpos anti-vitelogenina testada contra o antígeno homólogo na formiga *E. tuberculatum* (Azevedo et al., 2011) e na abelha *A. mellifera* (Oliveira et al., 2012)

As diferenças das bandas detectadas pelo anticorpo anti-vitelogenina entre as espécies estudadas sugere diferentes processos pós traducionais que a vitelogenina sofre nestes diferentes insetos. Estes resultados podem ser explicados pelas diferentes necessidades fisiológicas de ovoposição de cada inseto. Em *A. mellifera* o processo de vitelogênese pode ser um processo bastante rápido uma vez que rainhas desta abelha podem produzir até 2000 ovos por dia (Brünnich, 1922), sendo necessário um transporte relativamente rápido de vitelogenina para o interior do ovócito entre as células foliculares ou pelas células foliculares.

Em todas as câmaras ovocíticas dos folículos vitelogênicos das espécies analisadas por imunofluorescência foi observada a presença de vitelogenina no interior das célula foliculares, do ovócito e no espaço perivitelínico. Segundo Anderson et al (1970), a passagem da vitelogenina pelo epitélio folicular ocorre por canais entre os espaços das células foliculares durante a vitelogênese em *Cecropia* sp (Lepidoptera), sugerindo a ocorrência de rota paracelular. Rota paracelular também foi sugerida em *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) (Telfer, 1961), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Davery, 1981), *Locusta migratoria* (Orthoptera) (Lauverjat et al., 1984) e em mosquitos (Raikhel e Lea, 1991). Interessantemente nos Hymenoptera sociais aqui estudados foi identificada a presença de

vitelogenina no interior das células foliculares indicando uma rota transcelular para vitelogenina até o espaço perivitelínico.

Os diferentes arranjos dos filamentos de actina encontrados entre as células foliculares dos ovários pré-vitelogênicos e vitelogênicos de uma mesma espécie de Hymenoptera sociais aqui estudadas sugerem a reestruturação dos filamentos de actina em resposta ao transporte de vitelogenina. Em princípio durante a patência, o ovócito passa por mudanças em seu volume permitindo a abertura de canais entre as células foliculares para expor a hemolinfa à superfície do ovócito (Huebner e Injejan, 1980). A formação destes espaços está sob o controle do hormônio juvenil, requerendo um rearranjo do citoesqueleto e aumento no volume da célula após o depósito de vitelogenina em seu interior, onde a região basal age regulando a passagem de vitelogenina para o ovócito (Davery, 2007). Em todas as espécies de Hymenoptera sociais aqui estudadas os filamentos de citoesqueleto apresentaram interrupções na superfície basal e desorganização nas laterais das células foliculares da câmara ovocítica de folículos vitelogênicos o que pode ser devido à ocorrência de aberturas nos espaços intercelulares, embora estes não sejam característicos de patência como reportada para *R. prolixus* (King e Akai, 1982), pois as análises ultra-estruturais raramente mostram amplos espaços intercelulares nos insetos aqui estudados.

Projeções citoplasmáticas foram encontradas nas células foliculares em folículos vitelogênicos nos Hymenoptera aqui estudados. Em *A. mellifera* as projeções encontradas nas células foliculares formam estreitos labirintos, sugerindo que as células foliculares apresentam a capacidade de mudança em sua forma de modo a acompanhar o crescimento e a maturação do ovócito devido ao depósito de vitelogenina em seu interior. Em *M. quadrifasciata* e *M. cassununga* estas projeções são curtas sugerindo uma menor capacidade de extensão celular, podendo ser levado em consideração a sua baixa capacidade de ovoposição e pequeno tamanho da colônia em comparação com *A. mellifera*. A baixa quantidade de projeções citoplasmática em *P. curvinodis* sugere que a capacidade de extensão nesta espécie em relação as anteriores é menor. Durante a vitelogênese as células foliculares sofrem remodelação no citoesqueleto gerando espaços

intercelulares entre as células do folículo permitindo que a vitelogenina atravessasse as células e chegue ao interior do ovócito. (Hubner e Anderson, 1972; Hubner e Injeyan, 1981; Büning, 1994). Deste modo, estas células sofreriam expansões mecânicas durante a ovogênese, devido ao depósito de vitelogenina no ovócito (Medeiros et al, 2011).

Em *A. mellifera* e *M. cassununga* há presença de um material finamente granular entre a bainha peritonal e a base do epitélio folicular nos folículos vitelogênicos. Fleig (1995) descreve um acúmulo de substância de baixa elétrondensidade no espaço perivitelinico das células foliculares sugerindo que esta substância seja vitelogenina, e que isto seria uma peculiaridade em *A. mellifera*. O material acumulado no espaço subepitelial descrito acima nos folículos vitelogênicos em *A. mellifera* e *M. cassununga* tem aspecto semelhante àquele descrito por Fleig (1995). Como este material foi encontrado simultaneamente nos espaços subepitelial e perivitelinico, este pode ser um acúmulo de proteínas da hemolinfa para o ovócito.

Nas espécies de Hymenoptera sociais aqui estudadas ocorrem junções celulares septadas próximas as regiões basal e apical de contato entre as células foliculares da câmara ovocítica dos folículos vitelogênicos. Junções septadas são conhecidas como barreiras ao trânsito de substâncias, no qual o material da hemolinfa atravessará a célula podendo sofrer ou não modificações (Abdalla e Cruz-Landim, 2004). Segundo Hubner e Injeyan (1981), junções na região apical são essenciais para controlar a permeabilidade epitelial, suportando a hipótese do transporte transcelular de vitelogenina através das células foliculares até o ovócito. Embora, Cruz-Landim et al., (no prelo) descrevam que solução de lantânio possa atravessar os espaços intercelulares das células foliculares de *A. mellifera*, esta molécula é pequena em comparação com oligopeptídeos de vitelogenina que circulam na hemolinfa dos insetos (Wheeler et al., 1999, Tufail e Takeda, 2008).

Em *A. mellifera*, *M. cassununga*, *M. quadrifasciata* e *P. curvinodis* a imunolocalização mostrou a presença de vitelogenina no interior das células foliculares. Em *R. prolixus* tem sido reportado que as células foliculares podem participar da síntese de vitelogenina (Melo et al., 2000), porém este

não parece ser o caso no Hymenoptera sociais aqui estudados, pois as células foliculares não apresentaram características de células secretoras de grande quantidade de proteínas, como retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e grânulos de secreção (Alberts et al., 2010)

Nos insetos aqui estudados a imunolocalização de vitelogenina mostra que esta proteína é encontrada no interior de um sistema reticular membranoso nas células foliculares das câmaras ovocíticas em ovaríolos vitelogênicos. Assumindo que as células foliculares das abelhas, vespas e formigas não realizam a síntese de vitelogenina e que as junções septadas impedem o transporte paracelular desta proteína da hemolinfa até o espaço perivitelínico, pode ser sugerido que o sistema reticular presente nas células foliculares auxilie no transporte intracelular da vitelogenina. Secreção de compostos envolvendo componentes membranosos celulares tem sido frequentemente reportado nas glândulas salivares de mamíferos (Dix et al., 2013; Ikarashi et al., 2013).

Embora o modelo abaixo seja hipotético, pode ser sugerido que durante a vitelogênese ocorram mudanças nos filamentos de actina que resultem nas separações das células foliculares com a formação de espaços intercelulares amplos na porção mediana nas regiões basal a apical, porém com a manutenção de espaços intercelulares estreitos na porção mediana do epitélio, devido a junções septadas que são impermeáveis a vitelogenina. Assim, a vitelogenina seria transportada por uma rota paracelular da hemocele até a porção mediana do epitélio, a partir de onde seguiria uma rota transcelular até o espaço intercelular dilatado na região apical, como um atalho para o rápido transporte de grande quantidade de vitelogenina.

6. CONCLUSÃO

Os dados aqui obtidos permitem concluir que o transporte de vitelogenina no ovário dos Hymenoptera sociais ocorre inicialmente por uma rota paracelular até a porção mediano-apical do epitélio, seguindo então uma rota transcelular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla F.C., Cruz-Landim C., 2004.** A comparative cytochemical study of the Dufour gland in the eusocial bee *Apis mellifera* Linné, 1758 and *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836. *Acta Histochemica et Cytochemica* 37: 65-71.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2010.** *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science New York 1463p.
- Amdam G.V. Omholt S.W. 2003** The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* 223, 451–464.
- Anderson L.M., Telfer W.H., 1970.** Extracellular concentration of proteins in the *Cecropia* moth follicle. *Journal of Cell Physiology* 76: 37-54.
- Abu Hakima R., Davey K.G., 1977.** The action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: the importance of volume changes. *J. Exp. Biol* 69: 33-44.
- 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.
- Bast R.E., Telfer W.H., 1976.** Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the *Cecropia* moth oocyte. *Developmental Biology* 52: 83-97.
- Barchuk R.A, Bitondi M.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* 8 pp.
- Beig D. 1972.** The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *J. Apic. Res.* 11: 33–39.
- Bloch, G., Wheeler, D.E. Robinson, G.E. 2002** Endocrine influences on the organization of insect societies (Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Ettgen, A.M., Fahrbach, S.E. and Rubin, R.T., Eds.), *Hormones, Brain, and Behavior* 3: 195–237.

- Bourke A.F.G., 1999.** Colony size, social complexity, and reproductive conflict in social insects. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 245-257.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brerman M.D., Weiner A.J., Goralski T.J., Mahowald A.P., 1982.** The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 89: 225-236.
- Brünnich K., 1922.** Die Leistungen der Bienenvölker in bezug auf das Alter der Königinnen. *Archiv für Bienenkunde* 4: 152-156.
- Büning J., 1994.** The insect ovary: Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. Chapman & Hall, London 400p.
- Chapman R. F., 1998.** The insect structure and function. 4. ed. New York. Elsevier 918p.
- Chen J.S., Cho W.L., Raikhel A.S., 1994.** Analysis of mosquito vitellogenin cDNA. Similarity with vertebrate phosphovitins and arthropod serum proteins. *J. Mol. Biol* 237: 641-647.
- Chen J.S., Sappington T.W., Raikhel A.S., 1997.** Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J. Mol. Evol* 44: 440-451.
- Comas D., Piulachs M., Belles X., 2000.** Vitellogenin of *Blattella germanica* (L) (Dictyoptera, Blattellidae): nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein primary structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 45:1-11.
- Cruz-Landim C; Roat T.C., Berger B., no prelo.** Fat body, hemolymph and ovary for delivery of substances to ovary in *Melipona quadrifasciata anthidioides*: Differences among castes through the use of electron-opaque tracers. *Microscopy* doi: 10.1093/micro/dft018.
- Dallacqua R.P, Simões Z.L.P., Bitondi M.M.G, 2007.** Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Sociaux* 54, 70–76
- Davery K. G., 1981.** Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rhodnius prolixus*. *Stal. American Zoologist* 21: 701-705.

- Davery K. G., Sevala V. L.; Gordon D. R. B., 1993.** The action of juvenile hormone and antigonadotropin on the follicle cells of *Locusta migratoria*. Invertebrate Reproduction and Development 24: 39-46.
- Davery K. G., 2007.** The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. Journal of Insect Physiology 53: 208-215.
- Dhadialla T.S., Raikhel A.S., 1990.** Biosynthesis of mosquito vitellogenin. Biological Chemistry 265: 9924-9933.
- 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.
- Dix L., Stewart D.S., Stewart G.S., 2013.** Short communication: Urea transporter protein UT-B in the bovine parotid gland. Journal of Dairy Science 96: 1685-1690.
- Engels W., 1973.** Das zeitliche und räumliche Muster der Dottereinlagerung in der Oocyte von *Apis mellifera*. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 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: An 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.
- Fénéron R., Billen J., 1996.** Ovarian cycle in *Ectatomma tuberculatum* workers. Invertebrate Reproduction and Development 29: 79-75.
- 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 & Embryology 24: 427-433.
- Gamboa G.J., Wacket T.L., Scope J.A., Cornell T.J., Shellman-Reeve J.A., 1990.** The mechanism of queen regulation of foraging by workers in paper wasps (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera, Vespidae). Ethology 85: 335-343.
- Giorgi F., Bradley J.T., Nordin J.H., 1999.** Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. Micron 30: 579-596.

- 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.
- Gullan P.J., Cranston P.S., 2005.** *The Insect. An Outline of Entomology.* Blackwell Publishing 427p.
- Hölldobler B., Wilson E.O., 1990.** *The Ants.* Springer-Verlag, Berlin.
- Huebner E., E Anderson., 1972.** A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *Journal of Morphology* 136: 459-493.
- Huebner E., Injeyan H., 1980.** Patency of the follicular epithelium in *Rhodnius prolixus* a re-examination of the hormone response and technique refinement. *Canadian Journal of Zoology* 58:1617-1625.
- Huebner E., Injeyan H., 1981.** Follicular Modulation during Oocyte Development in an Insect: Formation and Modification of Septate and Gap Junctions. *Developmental Biology* 83:101-113.
- Imperatriz-Fonseca V.L. Kleinert A.D.P. 1998.** Worker reproduction in the stingless bee species *Friesella schroukyi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Entomol. Gen.* 23: 169–175.
- Ikarashi R., Shibasaki K., Yamaguchi A., 2013.** Immunohistochemical studies of organic anion transporters and urate transporter 1 expression in human salivary gland. *Acta Odontologica Scandinavica* 71:312-316.
- Kardile S.P., Gadagkar R., 2002.** Docile sitters and active fighters in paper wasps: a tale of two queens. *Naturwissenschaften* 89: 176-179.
- King R.C., Akai H., 1982.** *Insect Ultrastructure.* Plenum Press, New York.
- Laemmli U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lauverjat S., Szollosi A., Marcaillou C., 1984.** Permeability of the ovarian follicle during oogenesis in *Lacusta migratoria* L. (Insecta Orthoptera). *Journal of Ultrastructure Research* 87: 197-211.
- Liebig J., Peeters C., Hölldobler B., 1999.** Worker policing limits the number of reproductives in a ponerine ant. *Proceedings of Royal Society London B* 266: 1865-1870.
- Medeiros M.N., Ramos I. B., Oliveira D.M.P., Silva R.C.B., Gomes F.M., Medeiros L.N., Kurtenbach E., Chiarini R.B., Masuda H.,**

- Souza W., Machado E.A., 2011.** Microscopic and molecular characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* Stahl under challenge. *Journal of Insect Physiology* 57:945-953.
- Melo A.C.A., Valle C., Machado E. A., Salerno A.P., Paiva-Silva G. O., Cunha e Silva N. L., de Souza W., Masuda H., 2000.** Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 549-557.
- Oliveira V.T.P., Berger B., Cruz-Landim C., Paulino Z. L., 2012.** Vitellogenin content in fat body and ovary homogenates of workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* during vitellogenesis. *Insect Science* 19: 213-219
- Pardi L., 1948.** Dominance order in *Polistes* wasps. *Physiological Zoology* 21: 1-13.
- Piulachs M.D., Guidugli K.R., Barchuck A.R., Simoes Z.L., Belles, X., 2003.** The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol* 33: 459-465.
- Raikhel A.S., Dhadialla T.S., 1992.** Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology* 37: 217-251.
- Raikhel A.S., Brown M.R., Bellés X., 2005.** Hormonal control of reproductive processes (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S., Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science* 3: 433-491, Elsevier, Amsterdam.
- Raikhel A.S., Lea A.O., 1991.** Control of follicular epithelium development and vitteline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdiosone. *Tissue & Cell* 23: 577-591.
- Röseler P.F., 1991.** Reproductive competition during colony establishment. In: Ross K.G., Matthews R.W., (Eds.) *The Social Biology of Wasps*. Cornell University Press, 696 p.
- Rubenstein, E.C., 1979.** The role of an epithelial occlusion zone in the termination of vitellogenesis in *Hyalophora cecropia* ovarian follicles. *Developmental Biology* 71: 115-27.

- Sakagami S.E., Beig D., Zucchi R, Akahira Y. 1963.** Occurrence of ovary developed workers in queenright colonies of stingless bees. *Rev. Bras. Biol.* 23: 115–129.
- Sakagami S.E. Zucchi R. 1963.** Oviposition process in a stingless bee, *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera. *Studia Entomol.* 6: 497–510
- Sappington T.W., Raikhel A.S., 1998.** Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 8: 277-300.
- 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.
- Snodgrass R.F., 1935.** Principles of insect morphology. New York: McGraw-Hill Book 407p.
- Stefanini M., Demartino, C., Zamboni, L., 1967.** Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174.
- 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.
- Telfer W.H., Huebner E; Smith D. S., 1982.** The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. In R. C. King; H. Akai. *Insect Ultrastructure*, Vol. 1. Plenum Press, New York 118-149.
- 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., 2007.** Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophera maderae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 235-245.
- Tufail M., Takeda M., 2008.** Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* 54: 1447-1458.

- Tufail M., Takeda M., 2009.** Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology* 55: 88-104.
- Van Antwerpen, R., Pham D.Q.D., Ziegler R., 2005.** Accumulation of lipids in insect oocytes. In: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (Eds.), *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. XII, Part B. Science Publishers Inc., Enfield, USA/Plymouth, UK, pp 265-288.
- Wheeler D., Liebig J., Holldobler B., 1999.** Atypical vitellins in ponerine ants (Formicidae: Hymenoptera). *J. Insect Physiol* 45: 287-293.
- Willnow T.E., 1999.** The low density lipoprotein gene family: multiple roles in lipid metabolism. *Journal of Molecular Medicine* 77: 306-315.
- Wilson E. O., 1971.** *The insect societies*. Boston, MA: Harvard University Press 548p.
- Wojchowski D.M., Parsons P., Nordin J.H., Kunkel J.C., 1986.** Processing of provitellogenin in insect fat body: a role for hing-mannose oligosaccharide. *Developmental Biology* 116: 422-430.
- Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., 1984.** The human LDL receptor: a cysteine rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA *Cell* 39: 27-38.
- Yano K., Sakurai M.T., Watabe S., Izumi S., Tomino S., 1994.** Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 1-10.
- Yin C.M., Zou B.X., Yi S.X; Stoffolano Jr J.G., 1990.** Ecdysteroid activity during oogenesis in the black blowfly, *Phormia regina* (Meigen). *Journal of Insect Physiology* 36: 375-382.