

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



Dissertação

**Avaliação de diferentes protocolos visando o estabelecimento de uma  
linhagem celular a partir de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera*  
africanizadas**

**Matheus Iuri Frühauf**

Pelotas, 2021

**Matheus Iuri FröhauF**

**Avaliação de diferentes protocolos visando o estabelecimento de uma  
linhagem celular a partir de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera*  
africanizadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador Professor Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F798a Frühauf, Matheus Iuri

Avaliação de diferentes protocolos visando o estabelecimento de uma linhagem celular a partir de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas / Matheus Iuri Frühauf ; Geferson Fischer, orientador. — Pelotas, 2021.

81 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Células. 2. Abelhas. 3. Imortalização. 4. Criopreservação. 5. Linhagem. I. Fischer, Geferson, orient. II. Título.

CDD : 638.1

Matheus Iuri Frühauf

Avaliação de diferentes protocolos visando o estabelecimento de uma linhagem celular a partir de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas

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

Data da Defesa: 26/02/2021

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo  
Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof<sup>a</sup>. Dr. Silvia de Oliveira Hübner  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Dedicatória**

**Aos meus pais Mircon Frühauf e Terezinha Pratti Frühauf,  
e a minha irmã Inara Regina Frühauf**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Mircon Frühauf, Terezinha Pratti Frühauf e minha irmã Inara Regina Frühauf, por sempre estarem ao meu lado. Por todo o amor e apoio que me deram até hoje. Caso não fossem eles, não chegaria até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Geferson Fischer, por ter aceitado me orientar. Por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Além de ter se tornado um dos melhores amigos que conheci, agradeço todos os conselhos, mates e conversas.

Aos Professores Dr. Marcelo de Lima e Dr<sup>a</sup> Silvia de Oliveira Hübner, por todos os conhecimentos, esclarecimentos, e ajuda que forneceram a mim e ao nosso projeto desde o início.

Ao amigo Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, por todos os ensinamentos em laboratório, risadas, e companhia em barzinhos. E que até hoje insiste em desafiar minha resiliência.

Ao grande Zeca, pelos ensinamentos em laboratório, auxílio no desenvolvimento de todas as etapas do projeto, e pelo clássico “TCHÊ, não vai dar certo isso aí!”.

À minha grande amiga Lariane Barcelos, por toda ajuda nos trabalhos de laboratório, pelas noites em claro auxiliando a revisão de artigos, pelas longas conversas, cervejas, e por estar sempre presente.

A todos meus amigos do laboratório que nunca mediram esforços para ajudar, tanto dentro como fora do laboratório: Leonardo Clasen Ribeiro, Nadalin Botton, Cristina Mendes Peter, Renata Ribeiro, Renata Gressler e aos demais.

Aos meus compadres Mateus Biegalski e Daniela Albring Biegalski e sua família que, apesar de estarem longe em distância, estiveram sempre presentes comigo no decorrer dos últimos sete anos.

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

À CAPES pela bolsa de estudos.

***“For long you live and high you fly  
But only if you ride the tide  
And balanced on the biggest wave”  
(Richard Wright, David Gilmour)***

## Resumo

FRÜHAUF, Matheus Iuri. **Avaliação de diferentes protocolos visando o estabelecimento de uma linhagem celular a partir de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas**. 2021. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

As abelhas são muito importantes para o ser humano e para o meio ambiente, em função do papel fundamental que desempenham, através da polinização. Entretanto, vem sendo relatada, em todo o mundo, uma diminuição significativa de colônias da espécie *Apis mellifera*, causada por diversos fatores, entre eles, infecções virais. Para estudo e diagnóstico de enfermidades causadas por vírus utiliza-se o cultivo celular *in vitro*. Atualmente, existem apenas duas linhagens celulares de *Apis mellifera*, entretanto, essas linhagens não estão disponíveis comercialmente, além de serem permanentemente infectadas pelo vírus deformador de asas, o que impossibilita seu uso, especialmente em pesquisas relacionadas às interações célula-patógeno ou entre patógenos. O objetivo desta dissertação foi padronizar técnicas para o desenvolvimento de cultivos primários, de fácil e prática utilização, com o intuito de posterior imortalização celular, visando o desenvolvimento de uma ou mais linhagens celulares da espécie *Apis mellifera*. Para a obtenção de uma linhagem contínua a partir de cultivos primários, descrevemos cinco agentes de imortalização celular. Atualmente, as técnicas de imortalização celular utilizadas em cultivos celulares de insetos são adaptadas daquelas utilizadas em células de mamíferos. Cada técnica apresenta vantagens, limitações, praticidades e implicações genotípicas e fenotípicas. A escolha da técnica de imortalização é uma etapa fundamental e desafiadora no desenvolvimento de uma linhagem celular, visto que ela deve, idealmente, possibilitar longos períodos de viabilidade celular, com elevado número de passagens, além de manter o genótipo e fenótipo das células semelhante ou idêntico ao tecido original. Para a elaboração dos cultivos primários, foram avaliados os meios Grace, Leibovitz e Schneider, suplementados com soro fetal bovino e antibióticos. Foram, também, avaliadas técnicas para manutenção e criopreservação de cultivos celulares originados de ovos e larvas de abelhas *Apis mellifera*. Para manutenção, foram avaliadas técnicas de tripsinização, uso de espalhador celular e também de centrifugação do conteúdo celular. Com relação à criopreservação, foram avaliadas duas diferentes soluções de congelamento. Através das técnicas descritas, foram desenvolvidos 79 cultivos celulares, com até 19 passagens utilizando o meio Grace, e com viabilidade celular de até 140 dias com o meio Schneider. A utilização de larvas nos cultivos primários, demonstrou maior taxa de proliferação, e longevidade celular, quando comparado com a utilização de ovos. Dentre os meios avaliados, a utilização do meio Grace na elaboração de cultivos primários apresentou maiores taxas de proliferação celular e replicabilidade, demonstrando ser uma ótima opção para a aplicação das técnicas de imortalização celular. A utilização de tripsina, durante a

manutenção dos cultivos, demonstrou elevada morte celular, sendo substituída por espalhadores celulares. A solução de criopreservação utilizando 10% de DMSO e 90% de soro fetal bovino, propiciou a criopreservação de cultivos celulares por oito meses.

**Palavras-chave:** células; abelhas; imortalização; criopreservação; linhagem.

## Abstract

FRÜHAUF, Matheus Iuri. **Evaluation of different protocols for the establishment of a cell line from eggs and larvae of the species *Apis mellifera***. 2021. 81f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Honeybees are particularly important for humans and the environment, due to the fundamental role they play, through pollination. However, a significant decrease in colonies of the species *Apis mellifera* has been reported worldwide, caused by several factors, including viral infections. For the study and diagnosis of diseases caused by viruses, in vitro cell culture is used. Currently, there are only two cell lines of *Apis mellifera*, however, these lines are not commercially available, in addition these are permanently infected by the wing-deforming virus, which makes their use difficult, especially in research related to cell-pathogen interactions or between pathogens. The objective of this dissertation was to standardize techniques for the development of primary culture, easy and practical to use, with the aim of subsequent cell immortalization, aiming at the development of one or more cell lines of the species *Apis mellifera*. To obtain a continuous lineage from primary cultures, we describe five agents of cell immortalization. Currently, the cell immortalization techniques used in insect cell cultures are adapted to those use in mammalian cells. Each technique has advantages, limitations, practicalities, and genotypic and phenotypic implications. The choice of the immortalization technique is a fundamental and challenging step in the development of a cell line, since it should, allow long periods of cell viability, with a high number of passages, in addition to keeping the genotype and phenotype of the cells similar or identical to the original tissue. For the preparation of primary crops, Grace, Leibovitz and Schneider media were evaluated, with fetal bovine serum and antibiotics. Techniques for the maintenance and cryopreservation of cell cultures originating from eggs and bee larvae of *Apis mellifera* were also evaluated. For maintenance, trypsinization techniques, use of cell spreader and centrifugation of cell content were evaluated. Regarding cryopreservation, two different freezing solutions were evaluated. Through the described techniques, 79 cell cultures were developed, with up to 19 passages using the Grace medium, and with cell viability of up to 140 days with the Schneider medium. The use of larvae in primary culture, showed a higher proliferation rate, and cell longevity, when compared to the use of eggs. Among the evaluated media, the use of Grace medium in the elaboration of primary cultures presented higher rates of cell proliferation and replicability, proving to be a great option for the application of cell immortalization techniques. The use of trypsin during the maintenance of the cultures, demonstrated high cell death, being replaced by cell spreaders. The cryopreservation solution using 10% DMSO and 90% fetal bovine serum, provided the cryopreservation of cell cultures for eight months.

**Keywords:** cells; honeybees; immortalization; cryopreservation; lineage.

## 1 Introdução

Muitos animais são descritos como polinizadores, entretanto, a abelha *Apis mellifera* é considerada um dos principais responsáveis pela polinização de diversas culturas agrícolas, fundamentais para a vida humana (BREEZE et al., 2011). Estima-se que um terço das culturas agrícolas no mundo dependam da polinização exercida pelas abelhas (GALLAI et al., 2009). No entanto, há alguns anos as preocupações sobre a saúde das abelhas vem aumentando e, conseqüentemente, sobre o impacto global de seu desaparecimento (TANTILLO et al., 2015). Uma combinação de fatores como estresse ambiental, parasitoses e patógenos, incluindo uma grande variedade de vírus, está causando o desaparecimento mundial da população de abelhas (PIRES et al., 2016; GALLAI et al., 2009). Doenças causadas por vírus são significantes ameaças à apicultura (GISDER et al., 2017; MIRANDA et al., 2015), já que os vírus persistem naturalmente nas colônias utilizando uma variedade de vias de transmissão e replicação e, em níveis baixos, não provocam sintomas visíveis. Porém, o acúmulo de fatores ambientais, ou algum fator predisponente ainda desconhecido, pode eventualmente desencadear a morte de toda a colônia (VANENGELSDORP et al. 2009)

Diferente de outros organismos, os vírus são estruturas intracelulares obrigatórias, que não se replicam individualmente (SANTOS et al., 2015). Uma abordagem para estudos virais é a utilização de sistemas de cultivo celular, permitindo que quantidades mínimas de partículas virais viáveis sejam replicadas, detectadas, amplificadas e posteriormente caracterizadas (FLORES, 2007; MORAES et al., 2008). Linhagens celulares de insetos fornecem valiosas ferramentas para o estudo de viroses que acometem essas espécies. Sob condições controladas e graças a sua uniformidade genética, fornecem resultados consistentes a respeito das viroses que acometem estas espécies (GUO et al., 2020), além de serem ótimas ferramentas na avaliação dos efeitos de inseticidas em espécies não alvos, como as abelhas (WALKER et al., 2014; GUO et al., 2020).

Atualmente são registradas mais de 1100 linhagens celulares de insetos na base de dados Cellosaurus®, das quais a maioria pertencente às ordens díptera e lepidoptera (Cellosaurus® - ExPASy - Swiss Institute of Bioinformatics -SIB, 2021). O desenvolvimento de linhagens celulares da espécie *Apis mellifera* apresenta ser um grande desafio, visto que atualmente são registradas somente duas linhagens celulares desta espécie: a *AmE-711* e *M9NY* (KITAGISHI et al., 2011; GOBLIRSH et al., 2013). No entanto, somente a *M9NY* passou por processo de imortalização pela inserção de gene *c-myc* humano, apresentou alta taxa de proliferação celular e permaneceu viável durante oito meses. Infelizmente o projeto foi encerrado e essa linhagem não está disponível à comunidade científica (KITAGISHI et al., 2011). A linhagem *AmE-711* apresenta manutenção laboriosa, dificuldade de replicação, células viáveis por tempo limitado, visto que, é uma linhagem finita que não foi submetida a processos de imortalização celular. Além disso, não está disponível comercialmente (GOBLIRSH et al., 2013; CARRILO-TRIP et al., 2016). Contudo, ambas as linhagens celulares estão permanentemente infectadas pelo vírus deformador de asas (DWV), o que dificulta estudos de triagem viral, toxicidade de agrotóxicos e interações entre vírus e hospedeiro (GUO et al., 2020).

A falta de culturas imortalizadas de abelhas continua sendo um limitante na pesquisa da fisiologia e patologias dessa espécie. Para contornar essa situação, estudos realizados com células de abelhas, atualmente, utilizam cultivos primários ou subcultivos a partir de diferentes tecidos e fases de desenvolvimento (GENERSH et al., 2013; CARRILLO-TRIP et al., 2016). O primeiro cultivo celular de *Apis mellifera* foi realizado a partir de explante de tecido do lobo antenal, para avaliação e estudo da morfologia e estrutura do tecido nervoso das abelhas (GASCUEL et al., 1991). O primeiro cultivo celular de longa duração foi originado a partir de ovos de abelhas, e permaneceu viável por mais de três meses, cultivado em placas com meio Grace adicionado de 15% de soro fetal bovino (BERGEM et al., 2006). Desde então, diversos centros de pesquisa elaboraram cultivos primários de curta e longa duração de *Apis mellifera*, que permaneceram viáveis de 72 horas a 135 dias, desenvolvidos a partir de tecidos nervoso, ovos, larvas, pupas e intestinos (HUNTER, 2010; POPPINGA et al., 2012; JU & E GHIL, 2015; AZEVEDO et al., 2018; GUO et al., 2020).

O desenvolvimento de cultivos primários é realizado por meio de explantes de órgãos ou tecidos, separados mecanicamente ou através de enzimas. As células que se adaptarem a crescer nesse novo ambiente formarão o que se descreve como

cultivo primário (VAN OERS & LYNN, 2010). Após o primeiro subcultivo, passagem ou diluição de um cultivo primário, essa passa a ser considerada uma subcultura ou cultura em série (LEDA et al., 2008). A partir de culturas em séries, pode ser selecionado um tipo específico de célula, para dar origem a uma linhagem celular finita ou contínua.

O tecido original não neoplásico normalmente dá origem a linhagens celulares finitas, com baixa taxa de replicação e poucas passagens (MORAES et al., 2008). Porém, essas culturas primárias são produzidas dentro do laboratório de origem e não são disponibilizadas para uso de outros pesquisadores, além de apresentarem problemas com baixa taxa de proliferação, necessidade constante de tecidos, limitação de poucas passagens e reprodutibilidade (HONEGGER, 2001; GENERSH et al., 2013).

Tecidos diferenciados ou neoplásicos, por sua vez, geralmente dão origem a linhagens contínuas, com alta taxa de replicação e alto ou ilimitado número de passagens, o que possibilita fácil e prática utilização em laboratório (MORAES, 2008; MAQSOOD et al., 2013). A indução do aumento de expressão ou inserção de genes como o *hTert* da telomerase, oncogenes como *Ras* e *myc* (SHAY & WRIGHT, 2005; SIMCOX et al., 2009; KITAGISHI et al., 2011), a inibição de genes supressores de tumores como *p53*, *pRB* e *p16* através de agentes químicos imortalizantes, e ferramentas de edição gênica como *CRISPR/Cas9*, são alternativas poderosas para alcançar a transformação e imortalização celular, o que possibilita a obtenção de uma linhagem celular contínua, a partir de cultivos celulares que não são originados de tumores neoplásicos ou sofreram imortalização celular espontânea (MAQSOOD et al., 2013).

De uma forma geral a imortalização celular ocorre quando a célula perde as vias de verificação do ciclo celular, responsáveis pela senescência e imortalização celular (MAQSOOD et al., 2013; WRIGHT & SHAY, 1992). A técnica de imortalização celular, por si só, possibilita o estudo de genes e fatores envolvidos na patologia dos tumores (DIPAULO et al., 1978; SANTELLA, 1987; WANG et al., 2006). Contribui, ainda, com estudos sobre os mecanismos e capacidade da proliferação celular (LIANG et al., 2018). Porém, a imortalização celular ainda é um desafio para as comunidades científicas (MAQSOOD et al., 2013).

O desenvolvimento de uma linhagem celular de *Apis mellifera* livre de vírus, possibilitará o estudo aprofundado de interações moleculares entre vírus e hospedeiro o que, por sua vez, permitirá o isolamento de vírus que acometem essa espécie, padronização de novos diagnósticos, além do estudo dos mecanismos virais de ligação, adsorção, penetração, replicação, encapsidação, evasão celular, junto à resposta celular contra o vírus (GUO et al., 2020). O objetivo desta dissertação foi padronizar técnicas para os desenvolvimentos de cultivos primários, para fácil e prática utilização, com o intuito de posterior immortalização celular, visando o desenvolvimento de uma ou mais linhagens celulares da espécie *Apis mellifera*.

### 3 Considerações Finais

A partir do presente estudo foi possível notar que a obtenção de uma linhagem celular a partir da espécie *Apis mellifera* demonstra-se desafiadora em diversos aspectos. As técnicas de imortalização celular utilizadas em cultivos celulares de insetos, atualmente, são adaptações das utilizadas em células de mamíferos. Inicialmente, através da revisão bibliográfica, foi possível avaliar e comparar cinco técnicas que podem ser aplicadas em cultivos celulares desenvolvidos a partir de ovos e larvas de abelhas. Cada técnica apresenta suas limitações, vantagens com relação à praticidade de uso, além de implicações genótípicas e fenotípicas. A técnica escolhida, além de propiciar viabilidade celular com elevado número de passagens, deve manter o genótipo e fenótipo das células semelhante ou idêntico ao tecido original. Os agentes de imortalização MNNG, CRISPR/Cas9 e Rasv12 apresentam-se promissores para utilização em cultivos celulares desenvolvidos a partir de ovos e larvas de abelhas, e assim a obtenção de uma linhagem celular.

Atualmente, as duas linhagens descritas pela literatura estão permanentemente infectadas com Vírus Deformador de Asas (DWV), implicando diretamente em estudos como a avaliação da resposta celular contra vírus específicos, e interações entre um ou mais patógenos. Ressalta-se, assim, a necessidade do desenvolvimento de uma linhagem celular livre de vírus, além de fácil manutenção e alta taxa de proliferação celular.

Previamente à utilização de agentes de imortalização celular, devem ser padronizadas as técnicas para obtenção de cultivos primários, avaliando os melhores meios e tecidos. No presente trabalho, foram apresentadas algumas técnicas para obtenção de um cultivo celular com alta taxa de proliferação e replicação. Entretanto, alguns obstáculos ainda não foram superados, como por exemplo, a padronização de antibióticos nos meios de cultivo. Novos estudos devem ser realizados para a escolha de concentrações de antibióticos que não interfiram na proliferação celular e propiciem baixos níveis de contaminação.

A eficiência da técnica de criopreservação apresentada, utilizando-se uma solução de 90% de soro fetal bovino de 10% de DMSO, possibilitou o trabalho contínuo com células de abelhas em nosso laboratório, além de propiciar, futuramente, o compartilhamento de cultivos celulares a outros pesquisadores. Oferecendo assim, uma alternativa para contornar a escassez de linhagens celulares de abelhas no Brasil.

Apesar de algumas avaliações nos cultivos celulares não terem sido realizadas, devido à pandemia que se estendeu ao longo do ano de 2020, os resultados obtidos (como a alta taxa de proliferação celular em cultivos celulares mantidos com meio Grace, cultivos primários de longa duração mantidos com o meio Schneider), junto às técnicas descritas de imortalização celular, mostram-se muito promissoras. Atrelado a isso, os trabalhos terão continuidade, para assim alcançar o desenvolvimento de uma linhagem celular contínua de *Apis mellifera*, que propicie estudos de diversos patógenos e enfermidades, e seja disponível a outros pesquisadores.

## Referências

AZEVEDO, P. **Padronização do cultivo *in vitro* do tecido nervoso de abelha *Apis Mellifera* africanizada**. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2018.

BAILEY, L.; BALL, B. V. **Honeybee pathology**. London, United Kingdom: Academic Press Books, 1991.

BARNES, P. J.; BAKER, J.; DONNELLY, L. E. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.200, n.5, p.556-564, 2019.

BATISTA, F. R. X. **Desenvolvimento de meio de cultura para células de inseto e avaliação do potencial de replicação do baculovírus**. 2003. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento de processos biotecnológicos) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BEAUREPAIRE, A.; PIOT, N.; V DOUBLET; ANTUNEZ K.; CAMPBELL, E.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHEJANOVSKY N.; GAJDA, A.; HEERMAN, M.; PANZIERA, D.; SMAGGHE, G.; YAÑEZ, O.; MIRANDA J. R.; DALMON, A. Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, v.11, n.4, p.1-25, 2020. BERGEM, M.; NORBERG, K.; AAMODT, R.M. Long-term maintenance of *in vitro* cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. **BioMed Central Developmental Biology**, v.6, n.1, p.1-10, 2006.

BREEZE, T. D.; BAILEY, A. P.; BAELCOMBE, K. G.; POTTS, G. Pollination services in the UK: how important are honeybees? **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.142, n.3-4, p.137-143, 2011

BRUMBY, A. M.; RICHARDSON, H. E. Scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *The European Molecular Biology Organization journal*, v.22, n.21, p.5769-5779, 2003.

CARRILLO-TRIPP, J.; DOLEZAL, A. G.; GOBLIRSCH, M. J.; MILLER, W. A.; TOTH, A. L.; BONNING, B. C. *In vivo* and *in vitro* infection dynamics of honey bee viroses. **Scientific Reports**, v.6, n.22265, p.1-12, 2016.

CASTILHO, L.; MORAES, A.; AUGUSTO, E.; BUTLER, M. **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy. 1.ed. Taylor & Francis, 2008. 506p.

CHAGAS, D. B.; MONTEIRO, F. L.; BARCELOS, L. S.; FRÜHAUF, M. I.; RIBEIRO, L. C.; LIMA, M. D.; HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. Black Queen Cell virus and

Nosema ceranae coinfection in Africanized honey bees from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.40, n.11, p.892-897, 2020.

CHENG, Y. B.; FANG, D. C.; YAO, P.; GUO, L. P.; NING, X. Y.; WANG, L. Demethylation of the hTERT promoter in normal human gastric mucosal epithelial cells following N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine exposure. **Biomedical Reports**, v.3, n.2, p.176-178, 2015.

DANG, C. V.; O'DONNELL, K. A.; ZELLER K. I.; NGUYEN T.; OSTHUS R. C.; LI F. The c-Myc target gene network. **Seminars in Cancer Biology**, v.16, n.4, p. 253-264, 2006.

DE MIRANDA, J. R.; BAILEY, L.; BALL, B. V.; BLANCHARD, P.; BUDGE, G. E.; CHEJANOVSKY, N.; CHEN, Y.; GAUTHIER, L.; GENERSCHH, E.; DE GRAAF, D. C.; RIBIÈRE, M.; RYABOVJ, E.; SMETI, L.; VAN DER STEEN, J. J. M. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v.52, n.4, p.1-56. 2015.

DEQUÉANT, M. L.; FAGEGALTIER, D.; HU, Y.; SPIROHN, K.; SIMCOX, A.; HANNON, G. J.; PERRIMON, N. Discovery of progenitor cell signatures by time-series synexpression analysis during Drosophila embryonic cell immortalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.42, p.12974-12979, 2015.

DIPAULO, J. A.; NELSON, R. L.; CASTO, B. C. *In vitro* neoplastic transformation of Syrian hamster cells by lead acetate and its relevance to environmental carcinogenesis. **British Journal of Cancer**, v.38, n.3, p.452–455, 1978.

EILERS, M.; EISENMAN, R. N. Myc's broad reach. **Genes & Development**, v.22, p.2755-2766, 2008.

ELSIK, C. G.; WORLEY, K. C.; BENNETT, A. K.; BEYE, M.; CAMARA, F.; CHILDERS, C. P.; GIBBS, R. A. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. **BMC Genomics**, v.15, n.1, p.86, 2014.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: UFSM, 2017. 1136p.

FORSYTH, N. R.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on and turn it off again. **Differentiation**, v.69, p.188-197, 2002.

GALLAI, N.; SALLES, J. M.; SETTELE, J.; VAISSIERE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v.68, n.3, p.810-821, 2009.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, M. D.; LEÓN, J. MYC oncogene contributions to release of cell cycle brakes. **Genes**, v.10, n.3, p.244, 2019.

- GASCUEL, J.; MASSON, C.; BEADLE, D.J. The morphology and ultrastructure of antennal lobe cells from pupal honeybees (*Apis mellifera*) growing in culture. **Tissue and Cell**, v.23, p.547-559, 1991.
- GENERSCH, E.; GISDER, S.; HEDTKE, K.; HUNTER, W. B.; MÖCKEL, N.; MÜLLER, U. Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, v.52, n.1, p.1-8, 2013.
- GICHNER, T.; VELEMÍNSKÝ, J. Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.99, n.2, p.129-242, 1982.
- GISDER, S.; GENERSCH, E. Viruses of commercialized insect pollinators. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, n.147, p.51-59, 2017.
- GOBLIRSCH, M. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. **PLoS One**, v.8, n.7, 2013.
- GORI, G. B. Trypsinization of animal tissues for cell culture: theoretical considerations and automatic apparatus. **Journal of Applied Microbiology**, v.12, n.2, p.115-21, 1964.
- GRACE, T.D. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. **Nature**, v.195, p.788–789, 1962.
- GUO, Y.; GOODMAN, C. L.; STANLEY, D. W.; BONNING, B. C. Cell Lines for Honey Bee Virus Research. **Viruses**, v.12, n.2, p.1-17, 2020.
- HONEGGER, P. Overview of Cell and Tissue Culture Techniques. **Current Protocols in Pharmacology**, v.4, p.1-12, 2001.
- HOLDERFIELD, M. Efforts to develop KRAS inhibitors. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v.8, n.7, 2018.
- HU, X. F.; ZHANG, B.; LIAO, C. H.; ZENG, Z. J. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.9, n.5, p.1759-1766, 2019.
- HUANG, H-L.; HSING, H-W.; LAI, T-C.; CHEN, Y-W.; LEE, T-R.; CHAN, H. T.; LYU, P. C.; WU, C. L.; LU, Y. C.; LIN, S. T.; LIN, C. W.; LAI, C. H.; CHANG, H. T.; CHOU, H. C.; CHAN, H. L. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. **Journal of Biomedical Science**, v.17, p.1–10, 2010.
- HUNTER, W. B. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: *Hymenoptera: Apidae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, n.46, p.83-86, 2010.
- JANSEN, R.; EMBDEN, J. D. V.; GAASTRA, W.; SCHOULS, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, v.43, n.6, p.1565-1575, 2002.

JU, H.; GHIL, S. Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.51, p.890-893, 2015.

KABILOVA, T. O.; CHERNOLOVSKAYA, E. L.; VLADIMIROVA, A. V.; VLASSOV, V. Inhibition of human carcinoma and neuroblastoma cell proliferation by anti-c-myc siRNA. **Oligonucleotides**, v.16, n.1, p.15-25, 2006.

KADRI, S. M.; HARPUR, B. A.; ORSI, R. O.; ZAYED, A. A variant reference data set for the Africanized honeybee, *Apis mellifera*. **Scientific data**, v.3, n.1, p.1-6, 2016.

KANEKO, M.; MORIMURA, K.; NISHIKAWA, T.; WANIBUCHI, H. TAKADA, N.; OSUGI, H.; KINOSHITA, H.; FUKUSHIMA, S. Different genetic alterations in rat forestomach tumors induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. **Carcinogenesis**, v.23, n.10, p.1729-1735, 2002.

KARIM, F. D.; RUBIN, G. M. Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. **Development**, v.125, n.1, p.1-9, 1998.

KITAGISHI, Y.; OKUMURA, N.; YOSHIDA, H.; NISHIMURA, Y.; TAKAHASHI, J. I.; MATSUDA, S. Long-term cultivation of *in vitro* *Apis mellifera* cells by gene transfer of human c-myc proto-oncogene. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.47, n.7, p.451-453, 2011.

KIYOUNG, E.; MIN, G. P.; YEON, W. J.; YEON, I. J.; SANG-HWAN, H.; WOO, S. H.; SUNG-HAK, K.; HYUNG GEE, K. Establishment of TP53-knockout canine cells using optimized CRISPR/Cas9 vector system for canine cancer research. **BioMed Central Biotechnology**, v.19, n.1, p.1, 2019.

KOHNO, H.; SUENAMI, S.; TAKEUCHI, H.; SASAKI, T.; KUBO, T. Production of Knockout Mutants by CRISPR/Cas9 in the European Honeybee, *Apis mellifera* L. **Zoological Science**, v.33, n.5, p.505-512, 2016.

LEA HARRINGTON, L.; ZHOU, W.; MCPHAIL, T.; OULTON, R.; YEUNG, D. S. K.; MAR, V.; BASS, M. B.; ROBINSON, M. O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. **Genes & Development**, v.11, n.23, p.3109-3115, 1997.

LEE, S. H.; LEE, S. J.; KIM, J. H.; PARK, B. J. Chemical Carcinogen, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, is specific activator of Oncogenic Ras. **Cell Cycle**, v.6, n.10, p.1257-1264, 2007.

LI, X.; QIN, Q.; ZHANG, N.; ZHU, W.; ZHANG, J.; WANG, H.; ZHANG, H. A new insect cell line from pupal ovary of *Spodoptera exigua* established by stimulation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.48, n.5, p.271-275, 2012.

LIANG, T.; YE, X.; LIU, Y.; QUI, X.; LI, Z.; TIAN, B.; YAN, D. FAM46B inhibits cell proliferation and cell cycle progression in prostate cancer through ubiquitination of  $\beta$ -catenin. **Experimental & Molecular Medicine**, v.50, n.12, p.1-12, 2018.

LINO, C. A.; HARPER, J. C.; CARNEY, J. P.; TIMLIN, J. A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Drug delivery**, v.25, n.1, p.1234-1257, 2018.

LYNN, D. E. Novel techniques to establish new insect cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.37, n.6, p.319-321, 2001.

LYNN, D. E. Methods for maintaining insect cell cultures. **Journal of Insect Science**, v.2, n.1, 2002.

MAO, R.; SUN, D.; YANG, F.; TIAN, H.; ZHU, Z.; ZHENG, H.; LIU, X. Establishment and Evaluation of a Stable Bovine Thyroid Cell Line for Investigating Foot-and-Mouth Disease Virus. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.2149, 2018.

MAQSOOD, M. I.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R.; GHASROLDASHT, M. M. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. **Cell Biology International**, v.37, n.10, p.1038–1045, 2013.

MASON, M.; SCHULLER, A.; SKORDALAKES, E. Telomerase structure function. **Current Opinion in Structural Biology**, v.21, n.1, p.92-100, 2011.

MCKINLEY, K. L.; CHEESEMAN, I. M. Large-scale analysis of CRISPR/Cas9 cell-cycle knockouts reveals the diversity of p53-dependent responses to cell-cycle defects. **Developmental Cell**, v.40, n.4, p.405-420, 2017.

MOLINERI, A.; GIACOBINO, A.; PACINI, A.; CAGNOLO, N. B.; FONDEVILA, N.; FERRUFINO, C.; MERKE, J.; ORELLANO, E.; BERTOZZI, E.; MASCIÁNGELO, G.; PIETRONAVE, H.; SIGNORINI, M. Risk factors for the presence of Deformed Wing Virus and Acute Paralysis Virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. **Preventive Veterinary Medicine**, v.140, p.106-115, 2017.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. 528p.

NARESSE, L. E.; KOBAYASI, S.; RODRIGUES, M. A. M. Carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract induced by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine and reflux of duodenal contents in the rat. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.24, n.2, p.112-117, 2009.

OGURA, H.; FUJIWARA, T. Establishment and characterization of a virus-free chick cell line. **Acta Medica Okayama**, v.41, n.3, p.141-143, 1987.

PEGORARO, A.; NUNES, F. L.; PEREIRA, F. F.; TEIXEIRA, R. A.; KRUGER, E.; SERMANN, K. C. Perdas de colônias de *Apis mellifera* L. no inverno suplementadas com alimentação artificial com pólen e favos de mel. **Agrarian**, v.6, n.19, p.67-74, 2013.

- PINTO, L. C.; PANTOJA, F.; MESQUITA, F. P.; SOARES, B. M.; SILVA, E. L.; PUTY, B.; OLIVEIRA, E. H. C.; BURBANO, R. R.; MONTENEGRO, R. C. Mebendazole induces apoptosis via C-MYC inactivation in malignant ascites cell line (AGP01). **Toxicology in Vitro**, v.60, p.305-312, 2019.
- PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. ME.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.
- POHORECKA, K.; BOBER, A.; SKUBIDA, M.; ZDAŃSKA, D. The spring assessment of *Nosema* spp. Infection in Honey Bee Colonies (*Apis mellifera* L.) - Sampling as an Important Aspect of a Reliable Diagnosis. **Journal of Apicultural Research**, v.62, n.1, p.61-66, 2018.
- POPPINGA, L.; JANESCH, B.; FUNFHAUS, A.; SEKOT, G.; GARCIA-GONZALEZ, E.; HERTLEIN, G.; HEDTKE, K.; SCHÄFFER, C.; GENERSCH, E. Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. **Plos Pathogens**, v.8, n.5, p.1-14, 2012.
- PRIOR, I. A.; HOOD, F. E.; HARTLEY, J. L. The frequency of Ras mutations in cancer. **Cancer Research**, v.80, n.14, 2020.
- PRIOR, I. A.; LEWIS, P. D.; MATTOS, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. **Cancer research**, v.72, n.10, p.2457-2467, 2012.
- SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature biotechnology**, v.32, n.4, p.347-355, 2014.
- SANTAMARIA, J.; VILLALOBOS, E. M.; BRETTELL, L. E.; NIKAIDO, S.; GRAHAM, J. R.; MARTIN, S. Evidence of *Varroa*-mediated Deformed Wing Virus spillover in Hawaii. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.151, p.126–130, 2018.
- SANTELLA, R. M. In vitro testing for carcinogens and mutagens. **Occupational Medicine**, v.2, n.1, p.39–46, 1987.
- SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. 3.ed. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2015. 624p.
- SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v.1, n.1, p.72-76, 2000.
- SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. **Carcinogenesis**, v.26, n.5, p.867-874, 2005.
- SIMCOX, A.; MITRA, S.; TRUESDELL, S.; PAUL, L.; CHEN, T.; BUTCHAR, J. P.; JUSTINIANO, S. Efficient genetic method for establishing *Drosophila* cell lines unlocks the potential to create lines of specific genotypes. **PLoS Genetics**, v.4, n.8, p.1-12, 2008.

SIMANSHU, D. K.; NISSLEY, D. V.; MCCORMICK, F. RAS proteins and their regulators in human disease. **Cell**, v.170, n.1, p.17-33, 2017.

STACEY, G. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-5, 2019.

SU, F.; LIU, X.; LIU, G.; YU, Y.; WANG, Y.; JIN, Y.; HU, G.; HUA, S.; ZHANG Y. Establishment and evaluation of a stable cattle type II alveolar epithelial cell line. **PloS one**, v.8, n.9, 2013.

TANTILLO, G.; BOTTARO, M.; DI PINTO, A.; MARTELLA, V.; DI PINTO, P.; TERIO, V. Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. **Italian Journal of Food Safety**, v.4, n.3, p.157-168, 2015.

VAFA, O.; WADE, M.; KERN, S.; BEECHE, M.; PANDITA, T. K.; HAMPTON, G. M.; WAHL, G. M. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function. A mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Molecular Cell**, v.9, n.5, p.1031-1044, 2002.

VAN OERS, M. M.; LYNN, D. E. Insect cell culture. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-5, 2010.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PloS ONE**, v.4, n.8, p.1-17, 2009.

VANENGELSDORP, D.; TRAYNOR, K. S.; ANDREE, M.; LICHTENBERG, E. M.; CHEN, Y.; SAEGERMAN, C.; COX-FOSTER, D. L. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. **PLoS One**, v.12, n.7, e0179535, 2017.

VAN OERS, M. M.; LYNN, D. E. Insect Cell Culture. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-5, 2010.

VIRGIN, H. W.; VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Redefining chronic viral infection. **Cell**, v.138, n.1, p.30-50, 2009.

WALKER, T.; JEFFRIES, C. L.; MANSFIELD, K. L.; JOHNSON, N. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites & vectors**, v.7, n.1, p.1-9, 2014.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of cell science**, v.118, n.5, p.843-846, 2005.

WHITE, M. A.; NICOLETTE, C.; MINDEN, A.; POLVERINO, A.; VAN AELST, L.; KARIN, M.; WIGLER, M. H. Multiple ras functions can contribute to mammalian cell transformation. **Cell**, v.80, n.4, p.533-541, 1995.

- WOLPAW, A. J.; DANG, C. V. MYC-induced metabolic stress and tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Cancer**, v.1870, n.1, p.43-50, 2018.
- WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. **Experimental Gerontology**, v.27, p.383-389, 1992.
- WYSS, C.; BACHMANN, G. Influence of amino acids, mammalian serum, and osmotic pressure on the proliferation of *Drosophila* cell lines. **Journal of Insect Physiology**, v.22, n.12, p.1581–1586, 1976.
- YUE, C.; SCHRÖDER, M.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Vertical-transmission routes for Deformed Wing Virus of honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of General Virology**, v.88, p.2329–2336, 2007.
- ZHANG, X.; FENG, Y.; DING, W. F.; LI, X.; XIE, S. C. Establishment of an embryonic cell line from the American cockroach *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) and a preliminary study of telomerase activity changes during the culturing process. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.54, n.2, p.129-135, 2018.
- ZHAO, Z.; FOWLE, H.; VALENTINE, H.; LIU, Z.; TAN, Y.; PEI, J.; BADAL, S.; TESTA, J. R.; GRAÑA, X. Immortalization of human primary prostate epithelial cells via CRISPR inactivation of the CDKN2A locus and expression of telomerase. **Prostate cancer and prostatic diseases**, p.1-11, 2020.
- ZHANG, N.; QIN, Q.; GONG, H.; MENG, Q.; ZHU, W.; WANG, M.; ZHANG, J.; ZHOU, G.; LI, X.; ZHANG, H. A new insect cell line from the pupal ovary of the Asian corn borer moth *Ostrinia furnacalis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.50, n.3, p.171-173, 2014.
- ZHANG, B.; WANG, X.; WANG, Y. Altered gene expression and miRNA expression associated with cancerous IEC-6 cell transformed by MNNG. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.28, n.1, p.1-10, 2009.
- ZVEREVA, M. I.; SHCHERBAKOVA, D. M.; DONTSOVA, O. A. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. **Biochemistry (Moscow)**, v.75, n.13, p.1563-1583, 2010.