



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DIFERENCIAÇÃO DO CÉREBRO DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE) DURANTE A METAMORFOSE: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CASTAS E SEXOS

THAISA CRISTINA ROAT

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DIFERENCIAÇÃO DO CÉREBRO DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE) DURANTE A METAMORFOSE: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CASTAS E SEXOS

THAISA CRISTINA ROAT

Orientador (a): Prof^a Dr^a Carminda da Cruz-Landim

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2008

595.799 Roat, Thaisa Cristina

R628d Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera*
(Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose : estudo
comparativo entre castas e sexos / Thaisa Cristina Roat. – Rio
Claro : [s.n.], 2008
184 f. : il., figs., tabs, gráfs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carminda da Cruz Landim

1. Abelha. 2. Corpos pedunculados. 3. Lobos ópticos. 4.
Lobos antenais. 5. Morte celular. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*Aos meus pais, Elói e Márcia,
por serem TUDO para mim...*

Dedico esta tese.

*Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas
palavras e do teu silêncio.
Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória
que surge da paz e não do ressentimento.
É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver
sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.
Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti, é inútil buscá-lo acima das
nuvens e ao lado das estrelas. Por mais que tenhas errado e erres, para ti haverá sempre
esperança, enquanto te envergonhares de teus erros.
Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição.
A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios
precisa da água que rola e o coração necessita de afeto.
Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca
mais.
Teus passos ficaram!
Olhes para trás... mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para
poderem seguir-te.*

(Charles Chaplin)

Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.

Max Planck

Agradeço de modo muito especial

À DEUS, pela minha vida, por tudo que me deu e por me cercar de pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, não tenho palavras para agradecer por tudo que sempre fizeram por mim. Qualquer coisa que eu disser vai ser pouco frente à importância que vocês têm em minha vida. Obrigada pelo exemplo de vida e por tudo o que sempre fizeram por mim!

Ao Evaldo, pela pessoa maravilhosa que és, que se tornou muito importante para mim. Obrigada pela compreensão, paciência, incentivo, companheirismo e apoio nos momentos difíceis. Você me faz muito feliz!


Ao Giovani, por tornar a minha vida mais linda e me mostrar o valor do sorriso de uma criança. Você foi um presente de DEUS para todos nós!

À Edivânia, pessoa que pude escolher para ser a minha irmã. Obrigada por estar comigo em todos os momentos de minha vida. Sua amizade, companheirismo e alegria são essenciais para mim. Você é muito especial!

Ao Luciano e ao Lucas, meus irmãos, por estarem sempre presentes em minha vida.

À minha avó, Nadir, e minha tia, Zanza, por sempre torcerem por mim. Muito obrigada pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo nº 04/03336-0).

À Profa. Dra. Carminda da Cruz Landim, pela orientação, amizade, apoio e principalmente pelo exemplo de como se faz pesquisa com amor e ética. Meu agradecimento muito especial à senhora, por todos os ensinamentos durante estes anos de orientação.

Ao prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, à Luciana Karen Calábria e à Cláudia Tavares, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo auxílio na dosagem protéica e eletroforese unidimensional e por serem tão atenciosos comigo.

Ao prof. Dr. Klaus Hartfelder, do laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela sugestão da técnica de imuno-marcação da histona H3 fosforilada, bem como pela disponibilização do laboratório para realização da técnica e atenção dispensada. Ao David Santos Marco Antonio pelo auxílio durante a execução da técnica.

Ao prof. Dr. Mário Sérgio Palma, à Lucilene Delazari dos Santos e à Keity Souza Santos, do laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro, pela realização dos experimentos de análise proteômica e também pela amizade.

À todos os docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas.

Aos técnicos de laboratório Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte pelos serviços técnicos prestados, pela cooperação e amizade.

Ao Antonio Sérgio Pascon, pela coleta das abelhas e principalmente pela sua amizade.

À secretária Lucila de Lourdes Segalla Franco pela atenção e ajuda dispensada

À todos os funcionários do Departamento de Biologia, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca pela ajuda concedida.

Aos colegas de pós-graduação, pelo companheirismo, ajuda e troca de experiências. Em especial, à Karim, Giovana, Débora, Gabriela, Gislaine, Sandra, Giselly, Rogilene e Marielle.

À Roberta Ferreira Nocelli pelas discussões científicas, viagens inesquecíveis e pela amizade dispensada em todos estes anos.

Às queridas, Bia, Carly e Paulinha (e Flavinha) que mesmo distantes sempre estiveram presentes. Muito obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntas! Vocês são realmente queridas!!!!

Aos meus companheiros de orientação em especial ao Bruno e à Silvana, por tornar o meu trabalho muito mais divertido. Obrigada pela ajuda e amizade durante estes anos!

ÍNDICE

RESUMO E ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material.....	19
3.2 Métodos.....	19
3.2.1 Obtenção dos espécimes.....	19
3.2.1.1 Operárias.....	19
3.2.1.2 Rainhas.....	19
3.2.1.3 Zangões.....	20
3.2.2 Diferenciação do cérebro.....	20
3.2.2.1 Técnica da Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa.....	20
3.2.2.2 Análise Morfométrica.....	20
3.2.3 Morte celulares durante a diferenciação do cérebro.....	21
3.2.3.1 Análise citoquímica – Cloração com azul de toluidina: Variante da Concentração Eletrolítica Crítica.....	21
3.2.3.2 Processamento do material para inclusão em histosec (Merck)....	22
3.2.3.3 Evidenciação diferencial de DNA e RNA através do corante fluorescente acridine-orange.....	22
3.2.3.4 Técnica Imunocitoquímica: TUNEL	22
3.2.3.5 Análise Ultra-estrutural: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	24
3.2.4 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro	24
3.2.4.1. Imuno-marcação da histona H3-fosforilada.....	24
3.2.5 Expressão protéica durante a diferenciação do cérebro.....	25
3.2.5.1 Dosagem de Proteínas Totais.....	25
3.2.5.2 Eletroforese Unidimensional.....	26
3.2.5.3 Eletroforese Bidimensional.....	27
3.2.5.4 Identificação de Proteínas.....	27
3.2.5.5 Digestão “in gel” para “spots” excisados do gel 2D	27
3.2.5.6 Identificação das proteínas por nano LC-MS/MS.....	29

4. RESULTADOS	30
4.1 Diferenciação do cérebro.....	30
4.1.1 Protocérebro.....	30
4.1.1.1 Corpos pedunculados.....	31
4.1.1.1.1 Ultra-estrutura das células de Kenyon.....	33
4.1.1.1.2 “Pars intercerebralis”.....	34
4.1.1.1.3 Lobos ópticos.....	35
4.1.2 Deuterocérebro.....	36
4.1.2.1 Lobos antenais.....	36
4.1.3 Morfometria das estruturas cerebrais.....	37
4.2 Morte celular durante a diferenciação do cérebro	40
4.2.1 Coloração com Azul de Toluidina - Variante da CEC.....	40
4.2.2 Coloração por Acridine-orange.....	44
4.2.3 Reação TUNEL.....	46
4.2.4 Características ultra-estruturais das células em processo de morte nos corpos pedunculados.....	48
4.3 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro.....	50
4.4 Expressão proteica durante a diferenciação do cérebro.....	52
4.4.1 Dosagem de Proteínas.....	52
4.4.2 Eletroforese Unidimensional.....	53
4.4.3 Eletroforese Bidimensional e identificação das proteínas.....	55
5. FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	58
6. DISCUSSÃO	123
6.1 Diferenciação do cérebro.....	123
6.1.1 Protocérebro.....	124
6.1.1.1 Corpos pedunculados.....	124
6.1.1.2 “Pars intererebralis”.....	129
6.1.1.3 Lobos ópticos.....	130
6.1.2 Deuterocérebro	131
6.1.2.1 Lobos antenais.....	131
6.2 Morte celular durante a diferenciação do cérebro.....	134
6.3 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro.....	141

6.4 Expressão protéica durante a diferenciação do cérebro.....	145
6.4.1 Proteínas de reserva – Glx e hexamerina 70a.....	146
6.4.2 Calreticulina	149
6.2.3 Proteínas de choque térmico.....	151
6.2.4 Arginina-quinase	153
6.2.5 Glutathiona S-tranferase S1 e Proteína similar a antdh CG1386-PA.....	154
6.2.6 Isoforma 1 da proteína 14-3-3 CG31196-PC, similar a isoforma C.....	156
6.2.7 Proteína transportadora de ácidos graxos.....	156
6.2.8 Similar a isoforma A da estubarista CG14792.....	158
6.2.9 Actina 5.....	158
6.2.10 Proteína Ccp84Ad CG2341-PA.....	159
6.2.11 Proteína similar a Adenilato-quinase-2 CG3140-PA.....	159
6.2.12 Proteína similar a enzima E-1.....	159
7. CONCLUSÕES.....	162
8. REFERÊNCIAS.....	164

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Apis mellifera é um organismo de grande interesse para estudos neurobiológicos, pois além de apresentar um cérebro estruturalmente simples, se comparado ao dos vertebrados, apresenta características próprias relacionadas ao comportamento social, com capacidade de memória e aprendizagem. As colônias destas abelhas são constituídas por machos e fêmeas, as fêmeas dividindo-se em duas castas, operárias e rainhas. Sabendo-se que as castas e os machos de *A. mellifera* apresentam morfologia, fisiologia e padrões comportamentais bastante distintos que, por sua vez, estão, em boa parte representados no polimorfismo cerebral, o presente trabalho visou desvendar como essas diferenças se estabelecem a partir do cérebro larval, basicamente igual para todos. Sendo *A. mellifera* uma espécie holometábola a transformação das estruturas larvais para as dos adultos ocorre durante a metamorfose, ou seja, durante a pupação. Para melhor compreensão, o estudo iniciou-se com a caracterização das diferenças morfológicas entre os cérebros de operárias, rainhas e machos recém emergidos. A partir da verificação de quais eram as estruturas que mais se diferenciavam entre as classes de indivíduos que compõem a colônia, foram escolhidas para ter sua diferenciação acompanhada os corpos pedunculados, os lobos ópticos e a "pars intercerebralis" no protocérebro e os lobos antenais no deutocérebro. Dessas estruturas foi feito um estudo comparativo entre operárias, rainhas e zangões usando preparações para microscopia de luz, mensurações da área ocupada por alguns de seus componentes, estudos estruturais de outros, bem como uma estimativa das taxas de multiplicação, e mortes celulares com técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas. Esses estudos foram iniciados com larvas no último estágio larval e prosseguiram com cérebros de pré-pupas, pupas de olhos brancos, rosa, marrons, pretos e pupas com o corpo já em processo de escurecimento. Além disso, foi feita também uma comparação entre a expressão protéica nos cérebros totais das três classes de indivíduos através de eletroforese uni e bidimensional, sendo que as proteínas com maior diferença de expressão foram identificadas e sua possível função no cérebro discutida. As análises morfológicas mostraram que os cérebros de operárias, rainhas e zangões recém emergidos apresentam a mesma organização anatômica, mas apresentam diferenças quanto ao grau de desenvolvimento das partes, correlacionáveis aos seus papéis

específicos. Essas diferenças vão se estabelecendo ao longo da metamorfose quando operárias, rainhas e zangões exibem diferenças temporais e de tamanho no desenvolvimento das estruturas cerebrais. Os corpos pedunculados têm desenvolvimento mais lento nas rainhas e os lobos antenais mais rápido nos machos. A citoquímica, imunocitoquímica e a coloração com corantes fluorescentes mostraram que mortes celulares estão presentes desde larvas de último instar e continuam até a fase de pupas de olhos pretos, mostrando diferenças no local e fase de ocorrência e entre as castas e sexos. Nos lobos ópticos, as mortes ocorrem preferencialmente, em operárias e rainhas, nas fases de larva de 5º instar a pupa de olhos rosa, enquanto que nos corpos pedunculados, as mortes celulares estão presentes principalmente em pupa de olhos pretos de operárias e rainhas. Estes resultados sugerem uma especificidade de regulação da diferenciação que resulta na modelagem do cérebro das castas que por sua vez os adapta para suas funções. Divisões celulares também ocorrem nos lobos ópticos e nos corpos pedunculados, estando presentes nas fases iniciais da metamorfose e exibindo diferenças temporais entre operárias, rainhas e zangões. O estudo da expressão protéica enfocou a transição entre fases de vida: a fase de pré-pupa, ou o início da metamorfose, onde as características peculiares de cada indivíduo começam a se expressar, e a fase de pupa de olhos pretos, fim da metamorfose, onde quase todas as diferenças entre as castas e sexos já estão estabelecidas. Os resultados obtidos possibilitaram uma visão geral do perfil protéico do cérebro de cada indivíduo nessas fases, mostrando semelhanças e diferenças entre eles. Diferenças na expressão de algumas das proteínas identificadas entre os indivíduos em determinadas fases corroboraram os resultados dos estudos morfológicos, como é o caso da super expressão de proteínas relacionadas a apoptose nas fases onde foram observadas mortes celulares.

Palavras chave: Corpos pedunculados, lobos ópticos, lobos antenais, morte celular, proliferação celular, expressão protéica, castas, sexos.

ABSTRACT

Apis mellifera is an interesting model to neurobiological studies due to the simplicity of its brain commanding the complex behaviors demanded by the eusocial relationships and its capacity of learning and memorizing. The colonies of this bee consist of males and females. The females are differentiated in two castes: workers and queens. The castes and males from *A. mellifera* have distinct morphology, physiology and behavior correlated with their functions in the society and represented by some brain polymorphism. In this context the aim of the present study was clear up how the adult brain differences are established parting from the larval brain basically equal to all kinds of individuals. *A. mellifera* is a holometabolous insect and therefore, the change of the larval structures to the adult ones occurs during pupation or metamorphosis. In order to have a better vision of the differences found among the adult brains, was done a comparative morphological study of the brain from newly emerged workers, queens and males. The results showed that the brain structures more distinct among the individual classes were the mushroom bodies, optic lobes and "pars intercerebralis" from the protocerebrum and the antennal lobes from the deutocerebrum. Those were chosen for have their differentiation accompanied during metamorphosis. Comparative studies of the structures among workers, queens and males were done using light and electronic microscopy, measuring the areas occupied from some of their components and estimative of the rates of mitosis and cell death using cytochemical and immunohistochemical techniques. These studies started in the last larval instar and continued in pre-pupae, white, pink, brown, and black eyed pupae until black body pupae. Besides a search for differential protein expression among the individual classes whole brain was done with uni and bidimensional electroforesis. The proteins with greater expression were identified and their function in the brain tentatively discussed. The morphological data showed that the studied brain structures of newly emerged individuals present the same anatomic organization, but there are developmental degree differences that can be related to the class behavioral specificities. The differences are acquired during metamorphosis. Workers, queens and drones exhibit temporal and size differences in the studied brain structures during their metamorphic differentiation. The mushroom bodies develop slowly in queens and the optic lobes faster in drones. The cytochemistry and staining with fluorescent stains showed that cell death are present since the last larval instar and continue until the black eyed pupae with differences about the place and phase in which they occur among the castes and sexes. In worker

and queen optic lobes the deaths preferentially occur in the last larval instar and pink eyed pupae while in the mushroom bodies were observed mainly in black eyed pupae. The results suggest a differentiation regulation that leads the modeling of the brain to attend the specific functions of each one. Cell divisions occurs in the optic lobes and mushroom bodies mainly in the beginning phases of metamorphosis exhibiting temporal differences among workers, queens and males. The studies on the protein expression were done in the transitional phases: the pre-pupae or metamorphosis begins, where the individual peculiarities start to be expressed and in black eyed pupae or ending of metamorphosis, where most of the differences between caste and sexes are already established. The results of this part of the work give a general view from the brain protein profile showing differences and similarities among the individual classes that compose the species colony. Expression differences in the identified proteins among the classes in some phases corroborate to the morphological results, as is the case of the over-expression of proteins related to apoptosis just in the phases in which the cell deaths were observed.

Key words: Mushroom bodies, optic lobes, antennal lobes, cell death, cell proliferation, protein expression, castes, sexes.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central dos insetos é constituído pelo cérebro, localizado dorsalmente ao tubo digestivo e uma cadeia nervosa ventral, composta por uma série de gânglios, interligados por conectivos, entre si e ao cérebro.

O cérebro é o principal centro de associação do inseto. Recebe os impulsos sensoriais vindos dos órgãos dos sentidos da cabeça e dos gânglios da cadeia nervosa ventral, através de interneurônios ascendentes. Do cérebro emanam ordens motoras para os músculos das antenas e para as partes posteriores do corpo, passando através das vias descendentes, pré-motoras, que vão aos gânglios da cadeia nervosa ventral. Portanto, a maioria dos corpos celulares presentes no cérebro é de interneurônios e grande parte de sua massa é constituída por seus prolongamentos. O cérebro é, por isso, a sede da integração das atividades, que produzem os padrões organizados do comportamento de longa duração, governando suas modificações pela aprendizagem (SNODGRASS, 1935; 1956; CHAPMAN, 1998).

O cérebro dos insetos está dividido em três regiões: protocérebro, deutero cérebro e tritocérebro. O protocérebro constitui a maior parte da massa cerebral, inclui os lobos ópticos, um par latero-dorsal de corpos pedunculados, a ponte cerebral e o corpo central; o deutero cérebro é a parte do cérebro que contém os centros olfatórios antenais, e os corpos celulares dos nervos motores dos músculos das antenas e geralmente forma um par de lobos laterais distintos. O tritocérebro é muito pequeno nos insetos, constituindo-se de dois pequenos lobos posteriores ao deutero cérebro ligados pelas comissuras circum-esofageanas ao gânglio subesofageano. Anteriormente, esta região

conecta-se, através de nervos, com a região oral e com gânglios do sistema nervoso estomogástrico.

No protocérebro, as estruturas que mais chamam atenção de ponto de vista morfológico e funcional, são os lobos ópticos e os corpos pedunculados.

Os lobos ópticos constituem uma massa de fibras e células nervosas que formam três camadas internas conhecidas como lâmina, medula e lóbulo, onde existem receptores específicos para os estímulos enviados pelos fotorreceptores da camada externa, a retina. A retina é formada por lentes ópticas, células pigmentadas e fotorreceptoras, arranjados em unidades oculares, chamadas omatídeos (CRUZ-LANDIM et al., 1979).

Os corpos pedunculados são compostos por dois pares de cálices, de onde partem pedúnculos em direção ao lobo alfa. Estas estruturas também contêm neurônios intrínsecos, chamados células de Kenyon, em número de aproximadamente 170.000 por hemisfério do cérebro. Estas células podem ser subdivididas em três subtipos: compactas internas e externas e não compactas (RYBAK E MENZEL 1993; FARRIS et al. 1999). Há evidências de que os corpos pedunculados do cérebro dos insetos sejam equivalentes ao hipocampo dos vertebrados no que diz respeito à aprendizagem temporal (CAPALDI et al.1999). Os lobos alfa representam a região do cérebro que processa toda a informação proveniente das outras regiões do cérebro (MOBBS 1982).

O deutocérebro consiste essencialmente dos lobos antenais formados por prolongamentos dos neurônios receptores dos estímulos olfatórios captados pela antena. Estes prolongamentos se organizam em aproximadamente 150 glomérulos envolvidos por corpos celulares dos neurônios motores que controlam os movimentos das antenas (KLOPPENBURG 1995). Esta estrutura corresponde ao bulbo olfatório dos vertebrados (LANCET 1986).

Apis mellifera é uma abelha eussocial, dotada de um complexo sistema de comunicação e de uma divisão do trabalho colonial extremamente organizada. Existe nestas abelhas, uma divisão de castas no sexo feminino bem definida: as rainhas são os indivíduos reprodutores por excelência, as operárias executam todas as demais tarefas necessárias á manutenção da colônia, tais como alimentar a cria, coletar pólen e néctar, proteger o ninho, construir alvéolos e outras. Os machos são indivíduos essencialmente fecundadores da rainha.

A história de vida das rainhas é consideravelmente diferente da história de vida das operárias. Os imaturos das rainhas desenvolvem-se mais rapidamente e são maiores. Os adultos vivem mais e o comportamento reprodutivo é sua quase única função (JAY, 1963; REMBOLD e HANSER, 1964; WINSTON, 1987). As rainhas se desenvolvem a partir de ovos fertilizados que não são geneticamente diferentes de ovos que darão origem às operárias. A determinação das castas femininas é causada por fatores nutricionais, via alimentação larval (HAYDAK, 1943; WEAVER, 1957) que acarretam em expressão gênica e mecanismos endócrinos diferenciais (REMBOLD 1987).

O comportamento das operárias varia conforme sua idade, sendo que abelhas mais jovens desenvolvem tarefas intra-nidais e as mais velhas, saem do ninho para coleta. Em contraste a este comportamento exibido pelas operárias, a alteração comportamental na vida das rainhas acontece em razão do acasalamento, na transição de rainhas virgens para fecundadas. Após o acasalamento, as rainhas podem permanecer dentro da colônia por mais de três anos (SEELEY, 1978), ou sair com um enxame de operárias para fundar novas colônias.

Tanto as castas femininas quanto os machos, apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais correspondentes ao desempenho de suas respectivas funções dentro da colônia. Estas características particulares das castas e sexo são adquiridas durante o desenvolvimento pós-embrionário, principalmente durante a metamorfose.

Durante a evolução duas formas de desenvolvimento surgiram entre os animais: uma direta e outra indireta. Na maioria das espécies, as características do adulto são adquiridas gradualmente durante a maturação. No entanto, várias espécies de diversos filos desenvolvem-se passando por duas formas de vida, larval e adulta, que são unidas por uma fase de transformações drásticas, a metamorfose. Larva e adulto de espécies metamórficas diferem profundamente em sua morfologia, como consequência de seus diferentes habitats e modos de vida.

Em insetos holometábolos, do ovo eclode uma larva, à qual se sucede uma pupa e finalmente uma imago ou adulto. O desenvolvimento que se processa após a eclosão, até que a condição adulta ou matura seja alcançada, é conhecida como desenvolvimento pós-embrionário. O crescimento pós-embrionário nos insetos ocorre de maneira descontínua devido à presença de uma cutícula externa rígida que impede a distensão do

corpo. Assim o desenvolvimento pós-embrionário é dividido em uma série de estágios separados entre si por mudas ou trocas da cutícula.

A forma que o inseto assume entre as mudas é denominada instar. O período da inter-muda é denominado estágio, apesar de o termo instar ser comumente usado para referir-se a esse período, tanto quanto à forma assumida pelo inseto (CHAPMAN, 1998).

Em geral durante o desenvolvimento larval não ocorrem mudanças marcantes na forma do corpo do inseto, mas estas podem ser muito acentuadas entre a última muda larval e o adulto. A mudança drástica que ocorre nesta passagem em alguns insetos é chamada metamorfose.

Como todos os insetos holometábolos, que apresentam duas fases distintas de vida ativa, *A. mellifera*, tem uma fase larval com características morfológicas e fisiológicas muito distintas da fase adulta e entre estas uma fase de metamorfose.

Após o período de incubação do ovo, que é de cerca de três dias, tanto para os fecundados como para os não fecundados, ocorre a eclosão da larva, durante a qual o cório (casca) do ovo sofre uma dissolução gradual, característica esta, única para as abelhas (WINSTON, 1987). Inicia-se então, o período larval, o qual varia entre as castas, sexo e raças de abelhas. De acordo com Winston (1987), o tempo de desenvolvimento da larva é geralmente considerado como o que decorre entre a eclosão da larva e a operculação do alvéolo. Após a operculação, inicia-se o período de pupa.

O avanço no desenvolvimento das pupas nas abelhas é geralmente acompanhado por transformações no exterior do corpo, principalmente pelo avanço da pigmentação dos olhos compostos e esclerotização, ou escurecimento da cutícula de maneira que a partir destas podem ser definidas fases do desenvolvimento pupal. Os autores diferem quanto a essas avaliações, mas estas etapas parecem ser mais efetivas que aquelas baseadas na cronologia porque são indicadores dos avanços fisiológicos que estão se processando nos indivíduos (CRUZ-LANDIM, n.p.). Assim, de maneira geral, durante a pupação, a abelha passa por 5 estágios, que podem ser identificados através da cor dos olhos. Iniciam-se com a pupa de olhos brancos e prossegue como pupa de olhos rosa, pupa de olhos marrom e finalmente pupa de olhos pretos. A partir daí, inicia-se o escurecimento da cutícula e, quando esta se completa o adulto ou imago emerge. O período de desenvolvimento do ovo à emergência do adulto difere entre machos e

fêmeas, e também entre as castas femininas. Para abelhas melíferas, geralmente é de 16, 21 e 24 dias para rainhas, operárias e zangões, respectivamente, conforme ilustrado na tabela 1. Alguma variabilidade nestes tempos pode ser atribuída a fatores ambientais, particularmente, temperatura e nutrição (WINSTON, 1987).

TABELA 1: Ciclo de vida das castas e dos macho de *Apis mellifera* (WINSTON, 1987)

Tempo (dias)	Operária	Rainha	Zangão
1° - 3°	Ovo	Ovo	Ovo
3°	Eclosão da larva	Eclosão da larva	Eclosão da larva
3° - 8°	Larva	Larva	Larva
8°	Larva	Célula Operculada	Larva
8° - 9°	Célula operculada. Larva tece o casulo	Larva tece o casulo	Larva
10° - 10 ^½	Pré-pupa	Pré-pupa	Célula operculada
10 ^½	Pré-pupa	Pupa	Larva tece o casulo
11°	Pré-pupa	Pupa	Pré-pupa
12°	Pupa	Pupa	Pré-pupa
14°	Pupa	Pupa	Pré-pupa
16°	Pupa	Imago (emergência)	Pupa
17°	Pupa	Rainha virgem	Pupa
21°	Imago (emergência)	Vôo nupcial	Pupa
22 - 23°	Incubação, limpeza das células de cria	Alimentação pelas operárias	Pupa
24°	Alimentação das crias	Ovários desenvolvem	Imago (emergência)
25 - 27°	Forageia	Início das posturas	Início da alimentação

A metamorfose de insetos holometábolos implica em drásticas mudanças na organização larval, incluindo a substituição do tegumento e vários outros tecidos e a histólise de diversos músculos. Não surpreende, portanto, que o sistema nervoso seja profundamente reorganizado (TRUMAN, 1983; 1990; 1996; LEVINE e TRUMAN, 1985). No decorrer desse processo há mudanças morfológicas e fisiológicas, que por se estenderem além do estágio embrionário, constituem excelentes modelos para o estudo da expressão do programa genético em organismos superiores (AKAMATSU et al., 1975).

Neste contexto, a metamorfose dos insetos possibilita uma oportunidade única para investigar os mecanismos básicos através dos quais o sistema nervoso funcional das larvas é modificado para acomodar as mudanças fisiológicas e comportamentais da vida adulta. Quando os insetos holometábolos, como as abelhas, se transformam de larvas para adultos, os circuitos neurais larvais, que possibilitavam somente atividades

como alimentação e atividades locomotoras simples são convertidos para sistemas que controlam o vôo, diversas atividades intra e extra-nidais e o comportamento reprodutivo. Como o sistema nervoso de um inseto holometábolo adulto não é formado “de novo” durante a metamorfose, mas é transformado a partir de um sistema nervoso pré-existente, constituído de neurônios sensoriais, neurônios motores e interneurônios larvais, novos "inputs" sensoriais e novas interações com músculos e glândulas devem ser acomodadas dentro desse sistema nervoso já em funcionamento. Portanto, o desenvolvimento das estruturas apropriadas para o adulto requer uma precisa coordenação de três processos principais: morte, proliferação e diferenciação celulares programadas. É de conhecimento geral que a proliferação e a morte celular programada ocorrem simultaneamente em diversos órgãos em diferenciação.

Morte de neurônios ocorre em diversos contextos durante a vida de um animal. Segundo Truman (1984) a morte ocorre para regular o tamanho da população de neurônios e, além disso, é um mecanismo através do qual o sistema nervoso central elimina células cujas funções não são mais necessárias. Segundo este autor, a degeneração neural também pode ocorrer em consequência da necessidade de produzir células com um fenótipo particular.

A morte celular para regular o tamanho de populações de neurônios é um processo que ocorre durante o desenvolvimento da maioria dos invertebrados. Um exemplo que foi extensivamente estudado envolve a interação entre neurônios motores e músculos.

Os neurônios motores presentes no abdome da larva podem ter diversos destinos. Durante a transformação larva-pupa ocorre a degeneração de alguns músculos abdominais larvais, neste caso, enquanto alguns dos neurônios motores persistem e passam a inervar uma nova geração de músculos do adulto, outros morrem durante esta fase e, outros inervam o mesmo músculo alvo até a vida adulta. (LEVINE e TRUMAN, 1985; WEEKS e TRUMAN, 1986).

Segundo Truman (1983), *Manduca sexta* apresenta morte de aproximadamente 50% dos neurônios motores abdominais durante as duas primeiras semanas de vida adulta. As células que são eliminadas são justamente aquelas que controlaram o comportamento do animal durante a metamorfose, sendo que depois da emergência este circuito não é mais necessário e, conseqüentemente degenera. A morte dessas células

ocorre de acordo com um preciso programa temporal, em que cada célula tem seu tempo característico para morrer, relativo ao tempo de emergência do animal.

A morte celular de gerações de células com características específicas ocorre, por exemplo, em certos tipos celulares que não serão necessários posteriormente e conseqüentemente morrem. Um exemplo é o desenvolvimento do sistema nervoso ventral dos insetos (GOODMAN e BATE, 1981). Em *Locusta* cada glânglio abdominal e torácico origina-se de 61 neuroblastos idênticos e 7 células precursoras (BATE, 1976). Quando o desenvolvimento embrionário se completa, cada glânglio torácico contém aproximadamente 3000 neurônios, enquanto que cada glânglio abdominal apresenta apenas 500 neurônios. A diferença no número de células entre os glânglios torácicos e abdominais reflete principalmente diferenças na extensão das mortes celulares que neles ocorre (GOODMAN e BATE, 1981).

Para Buss e Oppenheim (2004) as dramáticas alterações corporais que ocorrem durante a metamorfose de vertebrados e invertebrados culminam em morte celular para eliminar estruturas larvais, incluindo os muitos neurônios que controlam essas estruturas. Segundos estes autores, a morte celular programada no sistema nervoso tem diversas funções, entre elas:

- remoção de células que parecem não ter função, como ocorre na morte de neurônios em machos e fêmeas para originar as estruturas responsáveis pelo dimorfismo sexual;
- remoção de células com fenótipo inapropriado, como ocorre na morte de precursores neurais localizados em regiões do cordão espinal;
- sistemas combinantes, como a criação de níveis ótimos de inervação entre grupos interconectados de neurônios e entre neurônios e seus alvos neurais;
- conexões erradas: morte de neurônios com conexões sinápticas inapropriadas ou com projeções nervosas aberrantes;
- orientação: perda de neurônios ou células de glia que orientam a migração durante o crescimento neural e axonal em estágios específicos do desenvolvimento;
- funções transitórias: morte de neurônios que desempenham funções fisiológicas e comportamentais transitórias durante o desenvolvimento;
- remoção de células nocivas: morte de células com DNA defeituoso ou infectadas por vírus.

Segundo Truman (1984) a principal função da morte celular no sistema nervoso de *Drosophila melanogaster*, e em outros insetos, é remover os neurônios que não serão necessários após as mudanças no plano corporal impostas pela metamorfose. Assim, um grande número de mortes é observado no sistema nervoso de *Drosophila* durante o estágio 16 de seu desenvolvimento, quando o sistema neuromuscular produz os primeiros movimentos (ABRAMS et al., 1993). Abrams et. al. (1993) estimaram que, ao menos 4% da população de neurônios do cordão nervoso ventral sofra morte neste período. Um segundo período distinto de morte neuronal ocorre durante a transição larva-pupa-adulto (TRUMAN et al., 1992; JIANG et al., 1997; YIN e THUMMEL, 2004). Após este período muitos neurônios abdominais da pupa e músculos usados durante a ecdise morrem durante a metamorfose para a fase adulta (KIMURA e TRUMAN, 1990).

Várias técnicas têm sido utilizadas para estudar a morte celular programada. Aspectos morfológicos deste processo podem ser visualizados tanto por microscopia de luz quanto por microscopia eletrônica, já que as manifestações de morte celular incluem mudanças no aspecto do núcleo e na morfologia celular como: redução do volume nuclear e condensação da cromatina (picnose), mudança no volume celular, perda de regiões especializadas da membrana plasmática, tais como microvilosidades e complexos juncionais provocando mudanças de forma, com tendência para a esfericidade. No caso da morte apoptótica, as organelas citoplasmáticas são conservadas, há uma progressiva condensação da cromatina do núcleo, em posição perinuclear, fragmentação nuclear e celular e liberação de sinais que causam a ingestão e digestão dos fragmentos por fagócitos ou células adjacentes, sem causar inflamação (KERR, 1971; WYLLIE et al., 1984 a,b; ARENDS e WYLLIE, 1991).

Desde as pesquisas iniciais sobre apoptose, aspectos da morfologia do núcleo têm sido utilizados na sua caracterização. Assim, a coloração com corantes nucleares como Feulgen, azul de toluidina, DAPI, Hoescht e iodeto de propídio são empregados para estudo da condição da cromatina nuclear. Como a característica que tem sido considerada mais marcante nas modificações do material nuclear durante a apoptose é a fragmentação do DNA, que ocorre em consequência da ativação de endonucleases (WYLLIE, 1980), técnicas que a detectam têm também sido usadas.

As endonucleases cortam a cadeia dupla de DNA em regiões inter-nucleossômicas, dando origem a nucleotídeos com número de pares de base múltiplos de 180. Bioquimicamente, os fragmentos podem ser detectados através de eletroforese, usando gel de agarose, dando um perfil característico em escada (BURSCH et al., 1990). Quebras na cadeia dupla do DNA também podem ser detectadas por técnicas imunocitoquímicas, como a técnica de TUNEL, que marca as novas extremidades 3'-OH geradas pela fragmentação.

Com poucas exceções, os neurônios larvais que degeneram, são substituídos por outros que se desenvolvem de histoblastos (neuroblastos) no interior do sistema nervoso larval. Além da substituição de neurônios já existentes, a maioria dos interneurônios do adulto é formada durante a metamorfose, embora outros existentes nas larvas sejam remodelados para atuar durante a fase adulta (TISSOT e STOCKER, 2000).

Insetos holometábolos, como as abelhas e a *Drosophila*, possuem duas fases distintas de neurogênese: a primeira fase durante o desenvolvimento embrionário e a segunda durante a vida larval e a metamorfose. Na fase embrionária originam-se os neurônios larvais. Em *Drosophila* a neurogênese inicia-se no 9º dos 17 estágios embrionários pelos quais passa o embrião, pela separação da ectoderme do embrião das células que irão formar o tronco neural, chamadas neuroblastos (DOE 1992; CAMPOS-ORTEGA, 1993; 1995; GOODMAN e DOE, 1993). Imediatamente após sua segregação, os neuroblastos começam a se dividir e produzem uma série de células tronco ganglionares, que, por sua vez, dividem-se apenas uma vez cada uma. No 13º estágio, sua progênie começa a se diferenciar em neurônios e células gliais. Até o estágio 17, todos os neuroblastos, exceto 5 pares de neuroblastos específicos, já cessaram as divisões mitóticas (PROKOP e TECHNAU, 1991).

A segunda fase da neurogênese origina os neurônios específicos do adulto. No entanto, um grande número de neurônios dos adultos é constituído por neurônios larvais, que sofrem reestruturação, sendo que os que não passam por esta modificação estão destinados a morrer durante a metamorfose. Assim, o sistema nervoso central larval tem uma dupla tarefa: além de conter neurônios específicos larvais, contém células tronco que originarão novos neurônios e neurônios que sofrem transformações para suprir o comportamento do inseto adulto (TISSOT e STOCKER, 2000).

O sistema nervoso da abelha adulta deriva diretamente do sistema nervoso larval e a estrutura geral dos dois é essencialmente a mesma, contudo várias modificações têm lugar durante a pupação. Durante a fase de pré-pupa, os conectivos circum-esofageanos que ligam o tritocérebro o gânglio subesofageano se encurtam e o cérebro, juntamente com toda cabeça, inicia a rotação que o colocará perpendicularmente à cadeia nervosa ventral. O tritocérebro aumenta de tamanho, as comissuras livres do tritocérebro desaparecem no interior do gânglio subesofageano e os lobos ópticos se diferenciam (CRUZ-LANDIM e HÖFLING, 1972).

Em *A. mellifera*, dois tipos de neuroblastos com distintos padrões de divisões são reconhecidos (NORDLANDER e EDWARDS, 1969; WHITE e KANKEL, 1978). O primeiro tipo ocorre principalmente nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos e produz outros neuroblastos através de repetidas divisões simétricas. Consecutivamente, por divisões assimétricas cada neuroblasto eventualmente origina outro neuroblasto e uma célula mãe ganglionar. Esta última subsequente se divide para originar dois neurônios. O segundo tipo de neuroblastos é muito mais abundante, estando espalhado por todo córtex. Estes sempre se dividem simetricamente em um neuroblasto e uma célula mãe ganglionar, que, em seguida origina dois neurônios.

Hormônios ecdisteróides controlam a atividade mitótica das células de Kenyon durante a neurogênese, nos primeiros estágios do desenvolvimento nas abelhas, como nos estágios pupais, fase em que a neurogênese é abundante. Cada corpo pedunculado apresenta seu próprio centro de proliferação (PANOV, 1957; MALUN, 1998; FARRIS et al., 1999). A neurogênese das células de Kenyon em *A. mellifera* inicia-se no primeiro estágio larval (PANOV, 1957; MALUN, 1998), e continua até o estágio pupal 4, cessando abruptamente dentro de um único estágio (GANESHINA et al., 2000).

Uma importante causa da reorganização neural durante a metamorfose são as diferenças entre as castas existentes em *A. mellifera*. Neurônios presentes nas larvas, comuns a ambos os sexos e castas, devem sofrer morte ou redirecionamento somente em um dos sexos ou em uma das castas em razão das funções específicas dessas classes de indivíduos na colônia, às quais estão subjacentes adaptações morfo-fisiológicas (GIEBULTOWICZ e TRUMAN, 1984; THORN e TRUMAN, 1989).

As estruturas cerebrais têm desenvolvimentos diferentes nas operárias, rainhas e machos, em razão das funções específicas dessas classes de indivíduos na colônia. Em

Apis e formigas (*Acromyrmex multcinodes*) Pandazis (1930) e Jawlowski (1957), verificaram diferenças no tamanho do cérebro entre as castas, de maneira que as operárias apresentam cérebros maiores e os zangões, um aumento evidente dos lobos ópticos, sendo a região central do protocérebro mais reduzida. Saez (1986) verificou que as operárias de *A. mellifera* apresentam corpos pedunculados maiores que as rainhas e Zaniboni e Cruz-Landim (1987) mostraram que o tamanho relativo de várias estruturas cerebrais é diferente conforme o grau de sociabilidade da espécie, fato esse corroborado por Abdalla e Cruz-Landim (1996).

Essas variações estão, muitas vezes, relacionadas ao desenvolvimento dos órgãos dos sentidos. Em *A. mellifera*, as rainhas apresentam em ambas as antenas 2.000 a 3.000 discos olfativos, enquanto que os machos apresentam 30.000 em ambas as antenas (SNODGRASS, 1935) e, as operárias apresentam de 3.600 a 6.000 discos olfativos por antena (SNODGRASS, 1956). O desenvolvimento diferencial dos órgãos dos sentidos está, por outro lado, relacionado a diferenças comportamentais entre as castas e sexos, já que as operárias desenvolvem atividades mais complexas que a rainha e nas sociedades matrilineais os machos tem participação quase nula na organização social da espécie, mas necessitam de visão acurada para o acasalamento e sua própria sobrevivência.

Como exposto, o sistema nervoso de *A. mellifera* sofre transformações durante a metamorfose que culminam na organização deste órgão como está presente no adulto. Durante este processo, operárias, rainhas e zangões adquirem a base de todos os sistemas neurais necessários para desempenhar as diferentes tarefas pelas quais são responsáveis na colônia. Esta remodelação cerebral envolve a morte de neurônios, a produção de novos e, principalmente a expressão de proteínas que permitem que este processo ocorra e que caracterizam cada casta e sexo.

Os estudos das mudanças bioquímicas que ocorrem durante a vida dos organismos fornecem dados para o esclarecimento das propriedades dinâmicas dos sistemas biológicos, incluindo alterações metabólicas que podem ocorrer em resposta a determinado estímulo ou devido ao seu programa genético. A história de vida dos organismos sociais como, por exemplo, as abelhas, fornece bons modelos para este tipo de estudos.

A capacidade de variação do programa de desenvolvimento, certamente baseado em diferenças de expressão gênica e conseqüentemente no repertório de síntese de proteínas de acordo com idade, casta e sexo, torna *A. mellifera* um modelo biológico interessante para o estudo da expressão diferencial de proteínas relacionadas com o comportamento e com sua função social na colônia (KUBO et al., 1996).

Assim, a análise das proteínas que se expressam no cérebro durante a metamorfose, pode fornecer informações que contribuam para a compreensão dos diferentes processos biológicos relacionados à divisão de indivíduos em castas e sexos e, portanto, a divisão de trabalho entre estes indivíduos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Sabendo-se que as castas de *A. mellifera* apresentam morfologia, fisiologia e padrões comportamentais bastante distintos, que, por sua vez, estão em boa parte representados no polimorfismo cerebral e, que o sistema nervoso é remodelado durante a metamorfose, fase em que muitas das características peculiares das castas se expressam morfolologicamente e bioquimicamente, o presente trabalho teve por objetivo:

- caracterizar a diferenciação das estruturas cerebrais durante a metamorfose entre as castas e sexos de *A. mellifera* através de análises morfológicas com microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.
- caracterizar o tipo de morte celular que ocorre durante a remodelação das estruturas cerebrais na metamorfose e as variações de sua intensidade, através de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e técnicas imunocitoquímicas.
- verificar a ocorrência de mitoses e suas variações qualitativas entre as castas e sexos de *A. mellifera*, durante a diferenciação do cérebro, através da imuno-marcação dos núcleos dos neuroblastos com histona H3-fosforilada.
- analisar a expressão de proteínas durante a metamorfose de operárias, rainhas e zangões, nas etapas de transição entre larva e pupa (pré-pupa) e pupa de adulto (pupa de olhos pretos) a fim de verificar se há expressão diferencial nestas fases para cada casta, sexo e entre estas classes de indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram estudados os cérebros de larvas de 5º estágio, pupas e adultos recém-emergidos de operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* coletadas no apiário do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos espécimes

3.2.1.1 Operárias

Para obtenção de larvas, pupas e adultos de operárias, um favo limpo foi introduzido em uma colméia para a postura da rainha. Após 24 horas, o favo com os ovos foi transferido para a área de recria e monitorado. Quando as operárias atingiram o 5º instar (LV), imediatamente antes da operculação, o favo foi retirado da colméia e foi feita a primeira coleta. Coletas também foram feitas quando as operárias atingiram os estágios de pupa de olhos brancos (POB), rosa (POR), marrom (POM), pretos (POP), com o corpo escurecido (PCE) e adultos recém emergidos (RE).

3.2.1.2 Rainhas

Foram transferidas larvas, com menos de 32 horas de vida, de seus alvéolos para cúpulas artificiais para criação de rainhas, com uma gota de geléia real, conforme

método descrito por Doolittle (1899). Estas cúpulas foram devolvidas à colméia, onde continuaram sendo alimentadas pelas operárias e monitoradas para obtenção e coleta de larvas de 5º instar (LV), pupa de olhos brancos (POB), rosa (POR), marrom (POM), pretos (POP) e com o corpo escurecido (PCE) e rainhas recém-emergidas (RE).

3.2.1.3 Zangões

Foram coletadas, diretamente da colônia, larvas (LV), pupas de olhos brancos (POB), rosa (POR), marrom (POM), pretos (POP) e com o corpo escurecido (PCE) de células próprias de machos. Foram também coletados machos recém-emergidos (RE).

3.2.2 Diferenciação do cérebro

3.2.2.1. Técnica da Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa

Para caracterização do cérebro de *A. mellifera* foram coletados pelo menos 5 indivíduos de cada classe de indivíduo e os cérebros dissecados em solução salina para insetos tamponada (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L) e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Em seguida foi feita uma lavagem com o mesmo tampão e o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), cada banho durando 30 minutos. O material foi, então, colocado em resina de embebição por 3 dias e incluído em historesina Leica, para posteriormente ser cortado com espessura de 5µm. Os cortes foram montados em lâminas histológicas, corados com hematoxilina e eosina e montados em bálsamo do Canadá, seguindo os procedimentos usuais.

3.2.2.2. Análise Morfométrica

A morfometria das estruturas cerebrais foi feita utilizando as lâminas histológicas já preparadas para as análises morfológicas e coradas com hematoxilina-eosina, obtidas de 05 indivíduos de cada classe. Foram feitas 05 medidas de secções frontais, respeitando um intervalo de 05 secções entre uma medição e outra, totalizando 20 medidas das seguintes estruturas cerebrais: área total ocupada pelo cálice (incluindo borda, colar e lábio), área total ocupada pelos neuroblastos, área total ocupada pelas células de Kenyon (independente do subtipo), área ocupada por células em processo de

morte celular, largura do pedúnculo dos corpos pedunculados e área ocupada pelas neurópilas dos lobos antenais. As áreas foram medidas em μm^2 e a largura em μm . Estas medidas foram feitas usando um sistema de tratamento e captura de imagem (Leica Qwin 550 Servers – Image and Peripheral Server Software). As medidas foram feitas em cortes que mostravam os corpos pedunculados em secção mediana frontal.

O teste estatístico não paramétrico aplicado foi análise de variância - ANOVA (SIEGEL e CASTELLAN, 1988), com o qual se avaliou a ocorrência de diferenças significativas ($p \leq 0.05$), ou não, entre os grupos. Nos casos em que houve diferença significativa, aplicou-se o teste Tukey para verificar entre quais grupos tal diferença ocorria.

3.2.3. Mortes celulares durante a diferenciação do cérebro

3.2.3.1. Análise citoquímica – Coloração com Azul de Toluidina: Variante da Concentração Eletrolítica Crítica – CEC (VIDAL et al., 1996)

Foram coletados pelo menos 05 indivíduos de cada grupo. Larvas de 5º instar, pré-pupa, pupa de olhos brancos e rosa tiveram a cápsula cefálica retirada e pupas de olhos pretos e de corpo escurecido tiveram os cérebros dissecados em solução salina para insetos tamponada (NaCl 7,5g/L, Na_2HPO_4 2,38g/L e KH_2PO_4 2,72g/L) e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Em seguida foi feita uma lavagem com o mesmo tampão e o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), cada banho durando 30 minutos. O material foi, então, colocado em resina de embebição por 03 dias e incluído em historesina Leica, para posteriormente ser cortado com espessura de 5 μm .

As lâminas contendo as secções histológicas foram colocadas em um recipiente com água por aproximadamente 10 minutos e coradas com azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvane (pH=4.0) por 20 minutos à temperatura ambiente. O material foi, então, imerso em solução aquosa de MgCl_2 (0,05M), por diferentes tempos (5, 7 e 10 minutos) e as lâminas lavadas em água destilada, secas, montadas em bálsamo do Canadá e foto-documentadas em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.3.2. Processamento do material para inclusão em histosec (Merck)

Larvas, pré-pupas e pupas de olhos brancos e rosa de todas as castas e sexos foram dissecadas em solução salina para insetos (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L) para retirada da cápsula cefálica, enquanto pupa de olhos pretos e de corpo escurecido foram dissecadas e os cérebros isolados foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 por 24h à 4°C. Em seguida os cérebros foram desidratados em série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, dois banhos em 100%), cada banho com duração de 30 minutos e, posteriormente transferidos para o xilol (2 banhos de 30 minutos). A embebição do material para inclusão ocorreu em histosec líquida em estufa à 58°C, durante a noite, seguida de uma troca de uma 1 hora e posterior inclusão.

As secções histológicas foram feitas com 08 µm, estendidas sobre lâminas histológicas previamente albuminizadas, e secas em estufa, à temperatura de 37°C. A remoção do histosec foi realizada, utilizando 02 trocas de xilol de puro (30 minutos cada), seguida de 01 troca de xilol + álcool (2:1), 01 troca de xilol + álcool (1:2) e 03 trocas de álcool absoluto, de 5 minutos cada.

3.2.3.3 Evidenciação diferencial de DNA e RNA através do corante fluorescente acridine-orange (MACGAHON et al, 1995)

Os cortes preparados conforme processamento descrito no item anterior, foram cobertos com algumas gotas do corante fluorescente acridine-orange (100 µg/mL de tampão fosfato de sódio - 0,1M e pH 7,4), recobertos com lamínula e examinados com microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 488nm, para posterior fotodocumentação.

3.2.3.4. Técnica Imunocitoquímica: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated biotinylated UTP nick end labeling)

Os cortes obtidos através do processamento e inclusão para histosec, foram submetidos por 30 minutos à peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para bloquear a peroxidase endógena, e recobertas com solução de proteinase K (20µg/mL em Tris-HCl, pH 7,5), por 15 minutos, à 37°C em câmara úmida. Após esta permeabilização, as lâminas, contendo as secções histológicas, foram lavadas em 04 banhos de água

destilada de 2 minutos cada, 02 banhos em PBS (10mM, pH=7.5), de 5 minutos cada e processadas segundo o protocolo descrito pelo fabricante (Roche Molecular Biochemicals), para detecção imunocitoquímica de quebras no DNA, utilizando o Kit ISCDDK (*in situ* Cell Death Detectetion Kit).

Foram feitos controles negativos e positivos para a reação TUNEL. As secções de controles negativos receberam 50µL da solução sem a enzima. Para os controles positivos, as secções, após a incubação em peróxido de hidrogênio e a permeabilização com proteinase K, foram incubadas em 50µL de solução de DNase I (200U/mL de DNase I em 50mM Tris-HCl, pH=7.5, 10mM MgCl₂ e 1mg/mL de BSA), por 10 minutos e em solução STOP por mais 10 minutos, sendo, a seguir lavadas em PBS (10mM, pH=7.5) e incubadas na solução TUNEL.

O exame do resultado da reação TUNEL foi feita da seguinte maneira: 50µL da solução de TUNEL (enzima e nucleotídeos marcados), recém preparada, foram colocados sobre as secções histológicas. As secções foram incubadas por 60 minutos em câmara úmida, à 37°C. Nesta etapa, às quebras na fita de DNA das células fixadas são adicionadas “caudas nucleotídicas”, a partir das extremidades 3'-OH livre, marcadas com fluoresceína.

Após a incubação, as lâminas foram recobertas com uma gota de PBS (10mM, pH=7.5) e lamínula para serem analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência LEICA, utilizando comprimento de onda de 450-500nm.

Após a análise sob fluorescência, o material foi submetido à conversão de sinal para microscopia de luz branca. Para tanto, as secções foram lavadas 3 vezes em PBS (10mM, pH=7.5) sendo 2 minutos cada troca e incubadas com 20µL do Conversor –AP (anticorpos anti-fluoresceína), por 30 minutos, em câmara úmida, à 37°C.

Em seguida, as secções foram, novamente, lavadas 3 vezes em PBS (10mM, pH=7.5) (1 minuto cada troca) e 50µL da solução de DAB (diaminobenzidina) foram colocados sobre cada secção histológica, procedendo-se a incubação por 3 minutos, à temperatura ambiente para marcação das extremidades livres com peroxidase, visível como um depósito de cor castanha com microscopia de luz comum.

Após a incubação, as secções histológicas foram lavadas 3 vezes em PBS (10mM, pH=7.5) (1 minuto cada troca) e 4 vezes em água destilada (1 minuto cada troca) e deixadas secar.

Foi feita uma contra-coloração com eosina, sendo que as lâminas, contendo os cortes já submetidos ao DAB, foram colocadas no corante por 10 segundos e lavadas em água destilada. Após estarem secas, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e, em seguida analisadas e foto-documentadas ao microscópio de luz.

3.2.3.5. Análise Ultra-estrutural: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Foram retirados os cérebros de pelo menos 03 indivíduos de cada classe, e fixados, por 2 horas, em Karnovsky modificado (paraformaldeído a 4% em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH=7,2) a 4°C. A seguir, os cérebros foram lavados por 30 minutos no tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão, durante 2 horas, à temperatura ambiente, lavados novamente no mesmo tampão do fixador por mais 30 minutos, sofrendo posterior desidratação em série de concentração crescente de acetona. No início da desidratação os cérebros foram deixados de 2 a 6 horas em acetato de uranila a 2% em acetona a 10%. A inclusão foi feita em Epon-Araldite e os cortes finos obtidos em ultramicrotomo foram contrastados em acetato de uranila por 45 minutos e citrato de chumbo durante 15 minutos e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS.

Esta técnica foi utilizada para verificação das alterações ultra-estruturais que ocorrem nos neuroblastos durante o processo de morte celular e também para a análise ultra-estrutural das características das células pertencentes às diferentes sub-populações das células de Kenyon.

3.2.4 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro

3.2.4.1. Imuno-marcação da histona H3-fosforilada

Foram retirados os cérebros de pelo menos 05 indivíduos de cada grupo, armazenados em tubos tipo Eppendorf e fixados por 3 dias em paraformaldeído 4% em PBS (10mM, pH=7.5). Os cérebros foram lavados no mesmo tampão para retirada do excesso de fixador, sendo três lavagens de 10 minutos cada, para subsequente permeabilização em PBST (0,1% Triton-100 em PBS 10mM, pH=7,5) por 1 hora à temperatura ambiente e lavagem em tampão (3 vezes de 5 minutos). A seguir, os cérebros foram incubados por 1 hora, em solução de BSA (bovine serum albumin) a 1%

(preparada no mesmo tampão) e por mais uma hora, em temperatura ambiente, em 20µL em solução contendo o anticorpo para marcação de mitose (anticorpo policlonal IgG anti-fosfo-histona H3, produzido em coelho na diluição de 1:100 em 1% BSA preparado em PBS 10mM, pH=7,5). Após esta etapa, os cérebros foram lavados, por 03 vezes de 5 minutos em tampão, incubados durante a noite, a 4°C, em 20µL da solução contendo o anticorpo secundário IgG conjugado com fluoresceína, produzido em cabra (CY3 – Sigma C-2306) na diluição de 1:100 (em 1% BSA preparado em PBS 10mM, pH=7,5) e lavados por 3 vezes de 15 minutos.

Foram feitas montagens totais em meio contendo 90% Glicerol, 0,1% de azida sódica e 3% n-propilgalato, em PBS 10mM, pH=7,5 e as análises foram feitas em microscópio de fluorescência LEICA, utilizando comprimento de onda de 450-500nm.

O processamento do material para esta técnica foi feito no laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob orientação do prof. Dr. Klaus Hartfelder.

3.2.5 Expressão protéica durante a diferenciação do cérebro

3.2.5.1 Dosagem de Proteínas Totais

Os cérebros de 15 abelhas de cada fase e casta/sexo foram dissecados em solução salina para insetos tamponada (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L). Imediatamente após a dissecação, o material foi armazenado em tubos Eppendorf em freezer à -80°C.

Os Eppendorfs contendo os cérebros dos indivíduos foram retirados do freezer e homogeneizados em gelo, em tampão de extração contendo 0.1 mM PMSF, (fenilmetilsulfonil fluoride) que é uma protease inibidora de serina.

Para as amostras utilizadas no perfil protéico acrescentou-se um volume de 500µL de tampão de homogeneização à cada *Eppendorf* e homogeneizou-se por dois minutos, sendo duas séries de um minuto no gelo.

A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada utilizando-se como padrão a concentração protéica de albumina bovina (BSA) (BRADFORD, 1976).

As determinações foram feitas em duplicatas ou triplicatas e a absorbância medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

Fez-se uma curva padrão de BSA em concentrações crescentes variando de 2 a 20 µg, A concentração final de proteína total em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão obtida, utilizando-se o programa EXCEL (Microsoft Office 97).

Pontos da Curva	Água (µL)	BSA 0.1 mg/mL (µL)	Amostra (µL)	Bradford (mL)
Branco	195	0	0	3
2	175	20	0	3
4	155	40	0	3
8	115	80	0	3
12	75	120	0	3
16	35	160	0	3
20	0	195	0	3
Amostra	195	0	5	3

3.2.5.2 Eletroforese Unidimensional

Utilizaram-se géis com gradiente de acrilamida de 5 a 22% no gel de separação e gel de empilhamento a 3%. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0.7%, tampão 360 mM de separação pH 8.8 (Tris-base 45.38%, 6N HCl 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6.8 (Tris-base 15.32% e HCl 12N 10%), SDS 0.12%, acrilamida/bisacrilamida (30:1.6) a 3%, TEMED 0.006 e PSA 0.150%.

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100mM Tris, 7.8mM EDTA, 770mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 45mA. Após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Croomasie Brilliant Blue R 0.125%, metanol 50% e ácido acético 9%) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Os géis foram armazenados em água destilada.

A dosagem de proteínas e a eletroforese unidimensional foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.2.5.3 Eletroforese Bidimensional

Para a eletroforese bidimensional foram usados 15 cérebros de pré-pupas e pupas de olhos pretos de operárias, rainhas e zangões. Após a dosagem protéica, realizada conforme descrito acima foram aliqüotadas amostras de 200 µg de proteínas, que foram utilizadas para a eletroforese bidimensional.

Primeira dimensão – Focalização isoeétrica (IEF): Para realização da IEF as proteínas foram solubilizadas em uma solução de re-hidratação (DeStreak) acrescida de 0,5% de tampão IPG (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) e azul de bromofenol. Fitas para imobilização de proteínas (Immobiline Dry Strips - IPG), pH 3-10, foram re-hidratadas nesta solução de proteínas por 15H e submetidas ao IEF em um sistema IPGphor (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) a 500Vh, 1000Vh e 8000Vh.

Segunda dimensão – SDS-PAGE: Após a primeira dimensão as fitas de IPG foram incubadas em tampão de equilíbrio 1 (75mM Tris-HCl, pH 8.8; uréia 6M; 30% de glicerol; 10mg/mL DTT; 2% SDS; iodoacetamida e azul de bromofenol), durante 15 minutos para a redução das pontes dissulfeto e por mais 15 minutos em tampão de equilíbrio 2 (mesma solução, entretanto substituindo-se DTT por 25mg/mL de iodoacetamida) para alquilação destas pontes. As fitas foram então transferidas para os géis de 12,5% de poliacrilamida contendo SDS. A corrida dos géis teve duração de aproximadamente 4 horas; os géis foram então corados com Commassie R-250 (compatível com a espectrometria de massas). As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o ImageScanner (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) e analisadas utilizando-se o ImageMaster 2-D Platinum software v. 6.0 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia). Os *spots* selecionados foram então recortados manualmente e submetidos à digestão e extração dos fragmentos trípticos gerados.

3.2.5.4 Identificação de Proteínas

3.2.5.5 Digestão “in gel” para “spots” excisados do gel 2D

A enzima utilizada foi a Tripsina modificada da Promega (Madison, WI, EUA). Todos os demais reagentes, incluindo bicarbonato de amônio e acetronitrila foram da Aldrich (Milkauke, WI, EUA).

Após a visualização dos géis 2D os spots foram excisados manualmente em capela de fluxo laminar vertical e colocados em microtubos siliconizados de 1,5mL para subsequente digestão *in gel* e extração dos fragmentos trípticos. A digestão *in gel* e a extração dos fragmentos trípticos foram realizados segundo protocolo modificado de Schevchenko et al. (1996). Os pedaços excisados de gel foram descoloridos com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM pH 7.8, contendo acetonitrila 50% (v/v), repetindo-se o processo até a descoloração total dos géis. Não foram feitos os passos de redução e alquilação, uma vez que as amostras eram provenientes de géis bidimensionais e, portanto, estas etapas já haviam sido realizadas durante a preparação das mesmas para os procedimentos de eletroforese bidimensional, antes da realização da segunda dimensão (gel SDS-PAGE). Os pedaços de gel recortados e excisados foram então liofilizados e rehidratados com 15 μ L de uma solução de tripsina 10ng/ μ L em bicarbonato de amônio 40 mM pH 7.8. As amostras foram então incubadas a 37°C, durante 16 horas, sempre em tubos siliconizados.

O sobrenadante contendo os fragmentos trípticos gerados foi removido após centrifugação por 2 minutos a 4000 x g, e os peptídeos remanescentes foram então extraídos do gel seguindo-se uma série de etapas de extração. Primeiramente adicionou-se 20 μ L de uma solução acetonitrila 50% (v/v), contendo ácido fórmico 5% (v/v) e incubou-se por 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de sonicação por 10 minutos e breve centrifugação. Esta etapa foi repetida mais uma vez a partir do sedimento remanescente da primeira centrifugação e coletado novamente o sobrenadante. Ao sedimento da segunda centrifugação adicionou-se 20 μ L de uma solução acetonitrila 90% (v/v), contendo ácido fórmico 5% (v/v), coletando-se o sobrenadante após 5 minutos e breve centrifugação. Os sobrenadantes das 3 etapas foram coletados em um único tubo siliconizado de 1,5 mL e as amostras foram liofilizadas até o volume ser reduzido a aproximadamente 0,5 μ L em Speedvac SC110 (Thermo Savant, Milford, MA, EUA).

A extração de proteínas do cérebro, dosagem protéica, eletroforese bidimensional e a digestão *in gel* foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do IBRC- UNESP de Rio Claro.

3.2.5.6 Identificação das proteínas por nano LC-MS/MS

Todas as análises de espectrometria de massa foram realizadas na Facility de Espectrometria de Massas da Universidade de Cornell (Ithaca, NY).

As amostras foram reconstituídas em 10 μ L de acetonitrila 2% (v/v), contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) para análise em LC-ESI-MS/MS. NanoLC foi realizada em um cromatógrafo Packings Ultimate integrado a um sistema HPLC capilar, com uma unidade de válvula Switchos (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA). Os peptídeos extraídos do gel (6,4 μ L) foram injetados utilizando-se um amostrador automático Famous em uma coluna C18 PepMap (5 μ m, 300 μ m \times 5 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) para dessalinização on-line e posterior separação em uma nano-coluna de fase reversa C-18 PepMap, eluída em um gradiente de acetonitrila entre 5 e 45% (v/v), contendo ácido fórmico 0,1%(v/v), em 30 minutos a um fluxo de 250nL/min. O nanoLC foi conectado *on-line* a um espectrômetro de massa íon trap triplo quadrupolo híbrido linear, modelo 4000 Q Trap ABI/MDS Sciex (Framingham, MA, EUA), equipado com uma micro fonte íon spray.

A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems) no modo íon positivo, para análise da aquisição dependente de informações (IDA). A voltagem utilizada do nanospray foi 2.0 kV para todos os experimentos no modo positivo. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste (valor 10) e o gás de colisão ajustado para “alto”, com a interface aquecida ligada. O potencial de declusterização foi fixado em 50eV e a pressão de Gas1 ajustada para 15psi. Na análise IDA, após cada varredura na faixa de m/z entre 400 e 1550, e após uma varredura para aumentar a resolução (*enhanced resolution scan*), os três íons mais intensos com estados de carga múltiplos foram selecionados para MS/MS com energia de colisão aplicada para detecção de íons com base em diferentes estados de carga e valores de m/z.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Diferenciação do cérebro

Sendo as abelhas insetos holometábolos, as larvas não têm diferenciadas as partes do cérebro correspondentes as estruturas corporais que só estão presentes nos adultos, as quais diferenciam-se durante o estágio de pupa, ou seja, durante a metamorfose.

No presente estudo foi acompanhada a diferenciação de estruturas do protocérebro e deutero cérebro, por serem as partes mais diretamente relacionadas às atividades comportamentais dos adultos.

Anatomicamente, o cérebro dos adultos difere não muito quanto à forma e ao tamanho entre os sexos e as castas de *A. mellifera* (FIG. 1), apenas no macho se apresenta diferente devido ao grande desenvolvimento dos lobos ópticos e deslocamento dos ocelos para uma posição mais inferior, fazendo com que ocorra diferença no grau de desenvolvimento das diferentes partes que compõe o cérebro. Assim, o protocérebro do macho é maior que o de operárias e rainhas.

4.1.1 Protocérebro

O protocérebro é constituído por dois lobos ou hemisférios, conectados entre si por conectivos medianos e, no adulto inclui os lobos ópticos. Os corpos celulares, ou soma, dos neurônios que compõe o cérebro, ocupam a região periférica, enquanto a região central é ocupada por seus prolongamentos, formando neurópilas com morfologia distinta. Os lobos ópticos são crescimento laterais do protocérebro,

diferenciados durante a pupação, que abrigam o soma e as neurópilas dos neurônios responsáveis pela visão captada pelos olhos compostos. No corpo do protocérebro dos adultos fica localizado um par latero-dorsal de corpos pedunculados e a *pars intracerebralis*, localizada anterodorsalmente. (FIG. 1).

4.1.1.1 Corpos pedunculados

Cada corpo pedunculado é formado por um par de cálices constituídos de neurópila e ligados entre si por pedúnculos. Os corpos pedunculados ficam simetricamente localizados, um par em cada lobo do protocérebro e contém no interior dos cálices os corpos celulares, ou soma, de neurônios, denominados neurônios de Kenyon. O cálice é dividido em três regiões, conhecidas como borda, colar e base (FIG. 2).

Os precursores dos corpos pedunculados já podem ser identificados em larvas de 5º instar de operárias, rainhas e zangões (FIG. 3). Nesta fase, aparecem com dois pares de massas globulares de células indiferenciadas, os neuroblastos, rodeados por numerosas células pequenas, que correspondem ao primeiro grupo de células de Kenyon a se diferenciar, das quais, algumas colocadas no pólo inferior apresentam núcleos fortemente corados (FIG. 3). Os prolongamentos que formarão a neurópila dos pedúnculos já estão em formação e parecem provir das células de Kenyon periféricas, pequenas, que formam uma espécie de envoltório para os neuroblastos, que estão localizados centralmente nesta estrutura (FIGS. 3A – F). Em larvas de operárias (FIGS. 3A, B), rainhas (FIGS. 3C, D) e zangões (FIGS. 3E, F) é possível notar neuroblastos em divisão.

Neste estágio, é possível observar a presença do pedúnculo em operárias, rainhas e zangões, mostrando que o pedúnculo se forma antes que o cálice, provavelmente por axônios provenientes das células de Kenyon já diferenciadas, enquanto que o cálice é formado pelos dendritos destas células. Os resultados indicam, portanto que os axônios são produzidos antes dos dendritos.

A diferenciação continua com o prosseguimento da diferenciação das células de Kenyon e aumento de seu número a partir dos neuroblastos.

Em pupas de olho branco a diferenciação do cálice está se iniciando, o que indica a produção de dendritos pelas células de Kenyon já presentes (FIG. 4). Nesta

fase, distingue-se a presença de três subpopulações de células no interior do cálice. A massa central formada por células maiores e esféricas consiste de neuroblastos e está ladeada por dois grupos de neurônios já diferenciados em células de Kenyon. Um grupo, chamado de células não compactas, por apresentar núcleo pouco corado, está localizado lateralmente à massa central de neuroblastos. O outro grupo de células de Kenyon, chamado de células compactas externas, cora-se mais intensamente devido a condensação da cromatina no núcleo e possui localização látero-basal (FIGS. 4A, B).

A diferenciação de neuroblastos em neurônios ocorre da mesma maneira nas três classes de indivíduos estudadas. Algumas divisões celulares são vistas em operárias e rainhas, mas parecem ser menos numerosas que na fase anterior (FIGS. 5A, B) e não foram observadas no macho (FIG. 5C). Divisões celulares foram também observadas entre as células de Kenyon não compactas de operárias (FIG 5A), mostrando a presença de células ainda indiferenciadas entre elas.

Em pupa de olhos rosa (FIGS. 6A - C) os neuroblastos continuam presentes e agora é possível observar a presença de três sub-populações de células de Kenyon: compactas internas (que foram a últimas a se diferenciarem), não compactas e compactas externas, aparecendo ainda a neurópila dos corpos pedunculados mais estruturada. Em operárias (FIG. 6A) e zangões (FIG. 6C) verifica-se o início da diferenciação da base e do colar do cálice, mas em rainhas a neurópila dos corpos pedunculados continua com a mesma morfologia encontrada na fase anterior (FIG. 6B). Portanto, a partir desta fase começam a aparecer diferenças entre as classes de indivíduos em estudo.

Em pupas de olhos marrom, a neurópila dos corpos pedunculados está completamente formada nas três classes de indivíduos, com presença da borda, do colar e da base do cálice (FIG 7A - C). Os neuroblastos, ainda presentes, ocupam maior área no interior do cálice em operárias (FIG. 7A) seguido das rainhas (FIG. 7B) e em zangões estão praticamente ausentes (FIG. 7C), indicando maior avanço na diferenciação das células de Kenyon.

Os corpos pedunculados atingem a morfologia presente no adulto em pupas de olhos pretos (FIGS. 8A - E). Nesta fase, a área ocupada por neuroblastos encontra-se muito reduzida e em seu ápice aparecem muitas células picnóticas, provavelmente em

fase de morte (FIG 8B - E). Células com esta morfologia são observadas em operárias, rainhas e zangões, mas são predominantes em rainhas.

A morfologia dos corpos pedunculados de pupas de corpo escurecido (FIGS. 9A - C) e de adultos recém-emergidos (FIGS. 2A - C) é muito semelhante, mas os corpos pedunculados das operárias recém-emergidas têm cálices mais profundos que as rainhas e os machos desta idade. Nos machos, a diferença é bem nítida, ficando os cálices rasos e alargados (FIGS. 2A - C).

Nos adultos, os neuroblastos estão ausentes e as três sub-populações de células de Kenyon podem ser facilmente identificadas. As células que ocupam a região central do cálice são as últimas a se diferenciarem, sendo, portanto, as células de Kenyon mais jovens e designadas como células compactas internas. As células periféricas, inicialmente poucas, mas que se tornaram abundantes na transição de larva para pupa, diferenciaram-se nas pupas de olhos pretos em dois grupos: um mais interno, com células chamadas de não compactas, que constitui o segundo grupo de células de Kenyon a se diferenciar, e as células chamadas de células compactas externas, que foram as primeiras células de Kenyon a se diferenciar.

4.1.1.1.1 Ultra-estrutura das células de Kenyon

As observações da região dos corpos pedunculados com microscopia eletrônica de transmissão tiveram por objetivo verificar se as sub-populações de células de Kenyon presentes nos corpos pedunculados apresentavam diferenças morfológicas ultra-estruturais (FIGURA 10).

Terminada a diferenciação das células de Kenyon a partir dos neuroblastos, a primeira sub-população destas células do centro para a periferia, está presente no interior do cálice, rodeando a região central dos neuroblastos restantes e é constituída pelas últimas células a se diferenciarem, ou seja, por neurônios mais jovens, as chamadas células compactas internas. A sub-população seguinte é composta por neurônios localizados junto às paredes do cálice, os quais se diferenciaram antes do grupo anterior e, portanto estão mais afastadas dos neuroblastos que ocupam a região central do cálice, sendo conhecidas como células não compactas. O último grupo de células de Kenyon é composto pelas primeiras células a se diferenciarem, que se localizam agora por fora dos cálices, como se tivessem transbordado de suas bordas,

conhecidas como células compactas externas. A designação compactas e não compactas é dada devido ao aspecto morfológico que apresentam, sendo as não compactas com núcleos mais claros.

As análises ultra-estruturais mostraram que, as células de Kenyon mais jovens, compactas internas, apresentam núcleo menor em relação às demais sub-populações, com cromatina descondensada e nucléolo evidente. O citoplasma é delgado, com presença de diversas mitocôndrias, aparelho de Golgi e poucos perfis de retículo endoplasmático granular (FIGURA 10A, B). A segunda sub-população a se diferenciar, as células não compactas, apresenta células com núcleo grande (comparado aos demais sub-tipos) e maior quantidade de citoplasma, com presença das mesmas organelas descritas para o sub-tipo anterior (FIGURA 10C, D). As células que ocupam a região externa dos cálices, apesar de serem descritas como compactas externas apresentam núcleo e citoplasma maiores que os da primeira população, mas menores que as não compactas. No entanto, apesar das características morfológicas, com relação às organelas presentes no citoplasma serem bastante parecidas, apresentam aparelho de Golgi mais desenvolvido com numerosas vesículas ao redor e maior quantidade de perfis de retículo endoplasmático granular (FIGURA 10E, F).

A distinção entre as sub-populações das células de Kenyon está baseada na morfologia que apresentam ao exame com microscopia de luz e baseiam-se na coloração mais forte ou mais fraca que apresentam devido aos graus de condensação da cromatina nuclear e da quantidade de citoplasma. A ultra-estrutura, no entanto, mostrou diferenças mínimas entre elas, não permitindo sugestões a respeito da função que desempenham. A diferença mais marcante foi a presença de retículo endoplasmático granular e de Golgi mais desenvolvido na última sub-população, denotando inclusive atividade secretora. Contudo, esta diferença pode ser atribuída a um estado mais avançado de diferenciação, visto terem sido as primeiras a se diferenciarem a partir dos neuroblastos.

4.1.1.2 “Pars intercerebralis”

Outra região do protocérebro que mereceu atenção foi a *pars intercerebralis*, onde se localizam as células neurosecretoras que produzem o hormônio proto-toracicotrópico.

Na larva, esta região é ocupada por células grandes rodeadas por uma bainha de células pequenas (FIGS. 11A - C). Seus prolongamentos dirigem-se para a região central do protocérebro, entre os lobos, sem formar feixes. Esta região parece ter mais células nas rainhas (FIG. 11B), mas estas são maiores nas operárias (FIG. 11A) e nos machos são praticamente inexistentes (FIG. 11C).

Nas pupas de olhos brancos (FIGS. 11D - F) as células são maiores e mais definidas nos machos (FIG. 11F). Contudo, células bem coradas, talvez indicando presença de secreção, foram vistas somente em pupas de olhos rosa de operárias e rainhas (FIGS. 12A, B), em pupas de olhos pretos de operárias (FIG. 13A) e em machos recém-emergidos (FIG. 14C).

Nos adultos recém-emergidos a região apresenta-se completamente diferenciada e funcional (FIG. 14A - C), apresentando células de maior tamanho nas rainhas (FIG. 14B), mas mais coradas e, provavelmente mais ativas nas operárias (FIG. 14C). As células pequenas, mais coradas, vistas nas operárias recém-emergidas parecem ser células de glia (FIG. 14A).

As diferenças verificadas na diferenciação dessas células entre as classes de indivíduos estudadas parecem mostrar um retardo no seu aparecimento no macho e que parecem ser mais funcionais nas operárias recém-emergidas.

4.1.1.3 Lobos ópticos

As larvas não possuem olhos compostos, mas os discos imaginários destes correspondentes à parte epidérmica, desenvolvem-se durante esta fase bem com os primórdios dos lobos ópticos. Nas larvas de 5º instar, os primórdios dos lobos ópticos são constituídos principalmente por células, ou seja, neuroblastos, sendo a parte de neurópila reduzida. Assim nem todas as camadas estão presentes vendo-se apenas o lóbulo, a medula e o quiasma interno, formado pelos prolongamentos de neurônios presentes nestas camadas. Os lobos ópticos encontram-se no mesmo estágio de diferenciação em operárias (FIG. 15A), rainhas (FIG. 15B) e zangões (FIG. 15C) e foram observados alguns neuroblastos em divisão em todas estas classes de indivíduos, localizadas preferencialmente na medula. Depois desta fase não foram mais observadas células em divisão, nas preparações coradas com H-E.

Em pupas de olhos brancos a extensão de neurópila aumentou, ou seja, a produção de prolongamentos celulares cresceu, ou em outras palavras, neurônios se diferenciaram de maneira que já se distinguem todas as camadas presentes nos adultos e os dois quiasmas, interno e externo. Concomitantemente no soma são observadas células com núcleos picnóticos, indicando morte celular (FIGS. 16 – F).

Nas pupas de olhos rosa de operárias (FIGS. 17A e B), rainhas (FIGS. 17C e D) e zangões (FIGS. 17E e F) a diferenciação das camadas está ainda mais visível e projeções da lâmina em direção a parte epidérmica dos olhos compostos estão se formando. No início da diferenciação da camada ganglionar os neuroblastos apresentam-se em colunas colocadas perpendicularmente à epiderme (FIGS. 16 e 17) sugerindo número alto de células e ausência de prolongamentos. Estes começam a aparecer na face interna da camada dando origem à lâmina interna. Os prolongamentos que nesta fase dirigem-se em direção à epiderme, correspondem a camada retinular em diferenciação (FIG. 17).

Células em processo de morte, com a mesma localização da fase anterior, também aparecem em todas as classes de indivíduos. No entanto, é nítido que os machos apresentam menor incidência e as rainhas maior de células com esta morfologia.

Em pupas de olhos preto de operárias, rainhas e zangões (FIGS. 18A – C) e pupas de corpo escurecido (FIGS. 18D – F), os lobos ópticos e os olhos compostos já estão completamente diferenciados.

4.1.2 Deuterocérebro

4.1.2.1 Lobos antenais

O deuterocérebro contém os centros motores e mecanosensoriais da antena constituindo os assim chamados lobos antenais. Em larvas de 5º instar já é possível observar o início da formação dos lobos antenais, como uma área de neurópila rodeada por somata de neurônios em arranjo frouxo em operárias (FIG. 19A) e rainhas (FIG. 19B), mas em zangões (FIG. 19C) está melhor estruturada, com a neurópila rodeada por grande quantidade de neurônios, o que pode significar a existência de maior número de células diferenciadas, produzindo prolongamentos.

Em pupas de olhos brancos (FIG. 20), os lobos antenais apresentam células neurogliais delimitando a neurópila, rodeada por neurônios que em operárias (FIG. 20A) e rainhas (FIG. 20B) continua com arranjo frouxo, mas nos zangões (FIG. 20C) apresenta-se agora com arranjo denso. A mesma morfologia continua a ser observada em pupas de olhos rosa de operárias (FIG. 21A) e rainhas (FIG. 21B). No entanto, neurônios de vários tamanhos localizados esparsamente por fora da neurópila enviam prolongamentos para o seu interior (FIG. 21A - C).

Em machos, nesta fase, é possível observar na periferia da neurópila, a presença de regiões globulares mais densas (FIG. 21C). Estas estruturas são chamadas de pré-glomérulos. Na pupa de olhos marrom, os somata dos neurônios periféricos acham-se mais agrupados (FIGS. 22A - C). Os pré-glomérulos aparecem em pupas de olho marrom de rainhas (FIG. 22B), mas em operárias embora nesta fase a camada de glia mostre algumas invaginações para o interior da neurópila (FIG. 22A), somente em pupas de olhos pretos verifica-se o início da formação dos pré-glomérulos (FIG. 23A), sendo que, nesta fase, rainhas e machos já apresentam os lobos antenais completamente estruturados, com a presença de glomérulos (FIGS. 23B, C).

Os resultados mostram, portanto, desde o início, precocidade na diferenciação dos lobos antenais dos zangões em relação às operárias e rainhas. A partir da pupa de olhos marrom, a rainha passa também a apresentar diferenciação mais avançada que a operária.

4.1.3 Morfometria das estruturas cerebrais

As estruturas cerebrais medidas foram partes dos corpos pedunculados e lobos antenais. Nos corpos pedunculados restringiram-se à área ocupada pelas células de Kenyon, independentemente da sub-população a que pertenciam, pelos neuroblastos, pelos prolongamentos que formam o cálice e o pedúnculo destes. A figura 24 mostra como estas medidas foram feitas.

A medida das áreas ocupadas por essas estruturas cerebrais e subsequente análise estatística dos resultados mostra a ocorrência de diferenças no desenvolvimento do sistema nervoso de operárias, rainhas e machos de *A. mellifera* durante todas as fases da metamorfose, evidenciando que estas classes de indivíduos apresentam diferenciação assincrônica e desigual.

Operárias, rainhas e zangões apresentam diferenças significativas na área ocupada por neuroblastos durante todas as fases do desenvolvimento (FIG. 25). Assim, rainhas apresentam a maior área de neuroblastos desde a fase de larva até pupa de olhos marrom (POM) enquanto, as operárias apresentam menor área deste tipo celular até esta fase, sendo que em pupas de olhos marrom (POM), as operárias passam a apresentar área significativamente maior que rainhas e zangões.

Quanto à área ocupada por células de Kenyon (FIG. 26), existem diferenças estatísticas entre os grupos de indivíduos até a fase de pupa de olhos marrom. Em larvas, devido à pequena quantidade deste tipo de células, não foram feitas medidas. Em pupas de olhos brancos (POB) e pupas de olhos marrom (POM), as operárias apresentam a área de células de Kenyon significativamente menor que rainhas e zangões e na fase de pupas de olhos rosa (POR), os zangões apresentam maior área de células de Kenyon. No entanto, a partir da fase de pupas de olhos pretos (POP) não há mais diferenças significativas na área ocupada por estas células entre operárias, rainhas e zangões.

Os valores obtidos para a média da largura dos pedúnculos e para a média da área do cálice estão representados, respectivamente nas figuras 27 e 28. Pode-se observar que as operárias apresentam média da largura dos pedúnculos maior em todas as fases estudadas, sendo que esta diferença apenas não é significativa nas fases de pupa de olhos brancos (POB) e pupa de olhos pretos (POP) (FIG. 27). As rainhas apresentam menor média da largura dos pedúnculos em todas as fases estudadas, sem serem as diferenças significantes, em relação aos outros grupos nas fases de pupas de olhos brancos (POB) e pupas de olhos pretos (POP). Na fase de pupa de olhos pretos (POP), rainhas apresentam uma diminuição significativa na média da largura do pedúnculo.

Quanto à área do cálice, apesar das operárias apresentarem durante quase todas as fases do desenvolvimento (exceção para pupas de olhos rosa - POR) áreas médias significativamente menores que rainhas e zangões, em indivíduos recém-emergidos passam a apresentar a maior média de área do cálice, com diferenças significativas para com a rainha e o macho (FIG. 28).

Foram feitas também medidas da área ocupada por células em processo de morte celular nos corpos pedunculados (FIG. 29). As rainhas apresentaram média da área de morte celular significativamente maior que operárias e zangões. Operárias e zangões

não apresentaram diferenças significativas na média da área de células em processo de morte.

Com relação à morte celular que ocorre nos lobos ópticos em pupas de olhos brancos e pupas de olhos rosa (FIG. 30), os resultados estatísticos mostraram que células com esta morfologia ocupam área significativamente maior em rainhas, seguido por operárias, em ambas as fases em que este evento ocorre. Portanto, nos machos ocorre menos mortes celulares que nas fêmeas.

Os resultados das áreas ocupadas pelos lobos antenais de operárias, rainhas e zangões de *A mellifera* durante a metamorfose estão representados na figura 31. Um aumento gradual da área de neurópila pode ser observado até a fase de pupas de olhos marrom nas três classes de indivíduos. Nesta fase, a área de neurópila dos machos é significativamente maior que em operárias e rainhas. Em pupas de olhos marrom, ocorre um aumento significativo da área de neurópila nas três classes de indivíduos estudados, sendo este aumento mais marcante em rainhas e zangões. Não ocorre aumento significativo na área de neurópila em zangões de pupas de olhos pretos, mas em rainhas e operárias há aumento significativo desta estrutura. Em adultos recém-emergidos a área ocupada pela neurópila dos lobos antenais de operárias ultrapassa a área desta estrutura em rainhas e zangões, embora esta diferença não seja significativa.

4.2 Morte celular durante a diferenciação do cérebro

A diferenciação do cérebro adulto a partir do larval já foi descrita e pode ser vista nas figuras de 1 a 23 e novamente na figura 32. Esta diferenciação compreende não só o amadurecimento de células já existentes, como também a produção de novas células e morte de outras. Tanto a morte como a divisão celular são eventos característicos e essenciais da diferenciação dos órgãos.

Conforme descrito atrás, as estruturas mais distintas do cérebro de operárias, rainhas e machos de *A. mellifera* estão localizadas no protocérebro e são os corpos pedunculados e os lobos ópticos e, no deutocérebro, os lobos antenais. No entanto, como os lobos antenais são constituídos principalmente por neurópila, os estudos sobre morte celular visaram os corpos pedunculados e os lobos ópticos apenas.

Tendo em vista a necessidade de identificar as mortes celulares nestas estruturas à medida que sua diferenciação progredia, várias técnicas foram utilizadas com este propósito. A seguir serão descritos os resultados obtidos com cada uma das técnicas empregadas.

Para a verificação das características ultra-estruturais das células em processo de morte, foram escolhidos os corpos pedunculados de pupas de olhos preto de rainhas (FIG. 32E), por apresentarem uma extensa área com células morrendo.

4.2.1 Coloração com Azul de Toluidina - Variante da CEC

Um dos mais usados e versáteis corantes da histologia é o azul de toluidina, este corante catiônico possui uma propriedade chamada metacromasia. O mesmo corante é capaz de mudar de cor devido às estruturas que ele cora. O azul de toluidina neutro é um corante básico que forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos presentes nos tecidos (RNA e DNA). É constituído de molecular planares, que funciona como espelhos ou prismas, conferindo coloração azul ou violeta. Estas colorações são produzidas pela proximidade e empilhamento ordenado diferenciais da molécula do corante, que se ligam a grupos aniônicos (PO_4^-) do DNA, RNA e outras macromoléculas. A cor violeta representa um maior número de moléculas do corante ligadas aos componentes celulares que na cor azul.

Em pH ácido, como utilizado neste estudo, o azul de toluidina caracteriza a presença de ácidos nucleicos, formando um complexo metacromático de cor violeta.

Assim, em pH 3,5 a 4,0, o azul de toluidina liga-se aos grupamentos fosfatos do DNA, essa propriedade associada à adição de $MgCl_2$, propicia uma competição pelo sítio ativo de ligação (grupo fosfato do DNA) dos ácidos nucléicos. Com o crescente aumento do cátion, Mg^{+2} , a coloração dos ácidos nucléicos deixa de ser metacromática e torna-se ortocromática. Diz-se que um núcleo chegou ao ponto da CEC, quando torna-se verde, isto é, quase todos os sítios ativos do DNA foram ocupados pelos cátions, tornando-se ortocromáticos, ou seja, perdeu a metacromasia característica. Quanto mais eucromatina o núcleo tiver, mais rápido ele atinge o ponto de CEC, com relação a um núcleo com cromatina mais condensada ou heterocromática.

Baseado no fato de que o ponto de CEC, onde ocorre abolição da metacromasia, é sempre maior no RNA do que no DNA, uma variante do método de CEC foi proposta, onde o tratamento com Mg^{+2} não é simultâneo, mas posterior à coloração com azul de toluidina. Desta maneira, o cátion Mg^{+2} , extrai o azul de toluidina dos sítios de ligação do DNA. Sob estas condições, enquanto ocorre abolição da metacromasia do DNA, que se cora em verde, o RNA permanece metacromático, permitindo a discriminação diferencial do RNAr, nos nucléolos, e do RNA citoplasmático. Além disso, o método da variante da CEC tem sido proposto como um método simples de identificação da presença de RNA nos corpos apoptóticos, que são identificados pela cor violeta. (VIDAL et al., 1996).

Os resultados obtidos com o teste CEC, no presente estudo, mostraram que o ponto da CEC do DNA é alcançado no primeiro intervalo de tempo do tratamento com $MgCl_2$, ou seja, cinco minutos. Assim, após esse tempo de tratamento com cloreto de magnésio, os núcleos perderam a metacromasia no DNA, independentemente da casta e do sexo estudado. Mesmo usando o menor tempo do tratamento, houve a abolição total da metacromasia, visto que a cromatina ficou sem qualquer coloração. Este fato pode ter ocorrido, devido à grande descondensação da cromatina, que espalha as moléculas do corante, permitindo em pouco tempo a sua total extração. O citoplasma manteve-se metacromático, indicando a presença de grande quantidade de RNA nos neurônios.

Além dos núcleos, que perderam a coloração, este fenômeno foi também observado nos dendritos e axônios, sendo que todas as áreas do cérebro que são formadas por estes prolongamentos (neurópilas) ficaram sem o corante. Os prolongamentos nervosos apresentam pouco ou nenhum retículo endoplasmático

granular e, portanto, poucas moléculas de RNA para o corante se ligar. Este fato explica a falta de coloração encontrada após o tratamento com cloreto de magnésio, pois a coloração inicial devia ser a de outras substâncias ácidas.

No caso da condensação da cromatina que ocorre em consequência à morte celular, a metacromasia não é eliminada pelo tratamento com cloreto de magnésio e assim as células apoptóticas podem ser distinguidas das demais.

Cérebros de larvas de 5º instar de operárias submetidos à CEC apresentam, os corpos pedunculados formados por massas aproximadamente esféricas de neuroblastos, com núcleos que perderam a metacromasia após tratamento com cloreto de magnésio. A presença de núcleos com cromatina condensada não é comum (FIG 33A). No entanto, nos lobos ópticos, alguns pontos metacromáticos foram encontrados, devido à presença de núcleos com cromatina condensada, ou picnóticos, sugerindo a presença de células em morte (FIG 33D).

Em rainhas, os corpos pedunculados (FIG 33B) apresentam neuroblastos com diversas características morfológicas. A maioria tem citoplasma metacromático e núcleos com a presença de diversos nucléolos. Mas, em alguns casos é possível observar núcleos inteiramente metacromáticos, indicando a condensação de cromatina característica da morte celular. Além disso, é possível observar claramente a presença de células com núcleos pequenos e projeções metacromáticas, indicando um processo morte celular com formação de corpos apoptóticos. Nesta fase, nos lobos ópticos também são encontradas células com esta morfologia. A FIG 33E mostra exatamente o processo de formação de corpos apoptóticos nos lobos ópticos, sendo possível observar inclusive a presença de ponte entre a célula em morte e um corpo apoptótico. No entanto, a grande maioria de corpos celulares presentes nesta estrutura apresenta características de células que não estão em processo degenerativo, com núcleos grandes e nucléolos metacromáticos. Em machos, nos corpos pedunculados, algumas células com núcleos condensados também são encontradas (FIG 33C).

As pré-pupas de operárias já apresentam os corpos pedunculados mais diferenciados, com uma massa central de neuroblastos com núcleos que perderam a coloração e, facilmente distinguíveis das células de Kenyon já diferenciadas, que apresentam núcleos consideravelmente menores e com ausência de nucléolos. O citoplasma destas células apresenta-se metacromático, sendo observado como uma fina

camada ao redor dos núcleos (FIG 33F). Pré-pupas de rainhas (FIG 33G) e zangões apresentam corpos pedunculados com esta mesma morfologia. No entanto, em rainhas células em metáfase também são observadas.

A morfologia das massas de neuroblastos nos corpos pedunculados das pupas de olhos brancos (FIGS. 34A - C) e olhos rosa (FIGS. 34D - F) de operárias, rainhas e zangões é praticamente a mesma descrita anteriormente. No entanto, nos lobos ópticos de pupas de olhos brancos (FIG. 34G - I) e pupas de olhos rosa (FIG. 34J - L) a quantidade de pontos metacromáticos representando células em processo de morte aumenta. Assim, nos lobos ópticos de pupas de olhos branco de operárias (FIG. 34G) é possível observar a presença de núcleos condensados, sendo que nesta estrutura cerebral, nesta fase, em rainhas (FIG. 34H) núcleos com esta morfologia são mais freqüentes e, em machos estão praticamente ausentes (FIG. 34I). Da mesma forma, nos lobos ópticos de pupas de olhos rosa de rainhas (FIG. 34K), são observados diversos pontos metacromáticos, sugerindo a presença de uma grande região de degeneração. Nesta fase, nos lobos ópticos de operárias (FIG. 34J) e zangões (FIG. 34L) não são encontradas células em estado degenerativo.

A região dos corpos pedunculados que tinha se mantido sem grande incidência de mortes celulares desde a larva de 5º instar, apresenta extensivas mortes nas pupas de olhos pretos (FIG. 35). Nesta fase em operárias (FIGS. 35A e B), rainhas (FIGS. 35C e D) e zangões (FIGS. 35E e F), as células que ocupam os corpos pedunculados já formam 3 populações bem distintas morfologicamente. A região basal dos corpos pedunculados é preenchida por uma pequena massa de neuroblastos, com núcleos grandes sem metacromasia e com nucléolos metacromáticos. As células de Kenyon distinguem-se em 2 classes: uma com núcleos pequenos e citoplasma bastante metacromático, as células compactas externas e outra com núcleos grandes e citoplasma pouco metacromático, células não compactas. Em operárias (FIGS. 35A e B), na primeira população de células é possível observar a presença de pontos metacromáticos, indicando que algumas células de Kenyon podem estar sofrendo morte. Em pupa de olhos pretos de rainhas (FIGS. 35C e D) na base dos corpos pedunculados uma massa de neuroblastos está presente, sendo que, ao redor desta, diversos pontos metacromáticos são observados. Assim, uma extensa área de degeneração é observada, com a presença de inúmeros corpos apoptóticos. Pupas de olhos pretos de zangões

(FIGS. 35E e F) também apresentam células condensadas nos corpos pedunculados, no entanto, aparecem, claramente, em menor quantidade que em rainhas e operárias.

A contagem do número de células que estão sofrendo apoptose não foi possível, pois como mostram as figuras, quando células presentes nas estruturas cerebrais estão sendo eliminadas diversos corpos apoptóticos estão presentes, inviabilizado a contagem das células, pois cada uma pode originar diversos corpos apoptóticos por fragmentação, optando-se portanto em fazer a mensuração da área ocupada pelas células com características de morte celular.

Em resumo a CEC permitiu evidenciar células com núcleos metacromáticos, inteiros ou fragmentados, indicativos de morte celular e perceber variação nesta ocorrência nos diferentes tipos de indivíduos e com a idade destes. Permitiu ainda, distinguir ocasiões diversas em que a morte é mais intensa, em um órgão ou noutro.

4.2.2 Coloração por Acridine-orange

O corante fluorescente acridine-orange se liga ao DNA e ao RNA. Observado no microscópio de fluorescência, o complexo de acridine-orange-DNA emite fluorescência verde-amarelada, devido à intercalação das moléculas do corante na dupla hélice do DNA, e o complexo acridine-orange-RNA emite fluorescência vermelho-amarelada, devido às ligações eletrostáticas das moléculas do corante com os fosfatos do ácido nucléico da fita simples. Além disso, núcleos condensados apresentam coloração verde brilhante, diferenciando-os de núcleos com cromatina dispersa. Portanto, este método pode ser utilizado para identificar células em morte, por um processo semelhante à CEC e foi usado como método comparativo, com fins confirmatórios.

Larvas de 5º instar de operárias (FIG. 36A) apresentaram corpos pedunculados com neuroblastos com citoplasma avermelhado, indicando a presença de grande quantidade de RNA e núcleos corados de verde-escuro pela intercalação de moléculas do corante com o DNA. Em rainhas (FIG. 36B) e zangões (FIG. 36C) desta idade, o citoplasma dos neuroblastos presentes nos corpos pedunculados está com coloração alaranjada, indicando que estas células apresentam menos RNA no citoplasma que as células de operárias. A maioria dos núcleos estão corados de verde-escuro. Em todas as castas e sexos, nesta fase, o início de formação do cálice e do pedúnculo é observado, com os prolongamentos nervosos que os formam, corados pelo acridine-orange de

verde-escuro. Este fato indica que o corante utilizado não é específico para DNA e RNA, embora o fabricante assegure o contrário e, neste caso ocorreu uma coloração inespecífica dos prolongamentos.

Com relação às mortes celulares, nesta fase foram observados núcleos condensados somente em operárias (FIG. 36A). Este resultado está de acordo com o observado na técnica anterior, mas difere em relação à rainhas e zangões, que na CEC apresentaram algumas células com núcleos condensados. Isto pode ocorrer devido a diferenças individuais, ou pelo fato da técnica de acridine-orange não ser tão sensível quanto a CEC. Outra possibilidade é que devido ao número de mortes ser pequeno, nestes cortes nenhuma célula nestas condições tenha sido detectada. O mesmo acontece nos lobos ópticos, pois com a técnica de acridine-orange, somente operárias apresentaram núcleos verde-brilhantes, indicativos de células em morte, enquanto que em rainhas e zangões estes estão ausentes. A morfologia das estruturas cerebrais em pré-pupas de operárias, rainhas e zangões (FIGS. 36G a L) não diferem das características relatadas na CEC, com ausência de células em processo de morte.

Em pupa de olhos brancos e olhos rosa, assim como nos resultados obtidos com a CEC, os corpos pedunculados de operárias (FIG. 37A e G), rainhas (FIG. 37B e H) e zangões (FIG. 37C e I) continuam sem apresentar células em morte. Nestas idades, nos lobos ópticos de operárias (FIG. 37D e J) e de rainhas (FIG. 37E e K) diversos núcleos verde-brilhantes, indicativos de morte são encontrados, enquanto que em zangões (FIG. 37F e L) células em morte estão ausentes. A técnica da CEC revelou resultados semelhantes neste órgão, para indivíduos com as idades citadas acima.

Novamente, assim com na CEC, nos corpos pedunculados de pupas de olhos pretos foram encontrados núcleos condensados com coloração verde-brilhante, indicativos de morte celular. Em operárias, estas células são encontradas ao redor dos neuroblastos (FIG. 38A) e também entre as células de Kenyon que se encontram dentro do cálice (FIGS 38B a E). Em rainhas, quando os neuroblastos ainda estão presentes, células em morte são encontradas ao redor destas (FIGS. 38F e G). No entanto, quando os corpos pedunculados já estão totalmente preenchidos por células de Kenyon, alguns núcleos picnóticos também são encontrados entre eles (FIGS. 38H e I). Em machos, com esta técnica, raramente foram observados núcleos condensados (FIG. 38J), sendo

que na maioria das vezes, os corpos pedunculados apresentam-se totalmente preenchidos por células de Kenyon íntegras (FIG 38K).

Os lobos ópticos de pupas de olhos preto e de pupas de corpo pigmentado, apresentam-se completamente diferenciados e, assim como evidenciado pela CEC, não apresentam células em processo de morte celular.

4.2.3 Reação TUNEL

A característica mais marcante, relacionada a apoptose, é a fragmentação do DNA, que ocorre em consequência da ativação de endonucleases. A detecção de quebras na cadeia dupla do DNA pode ser realizada utilizando imunocitoquímica. O princípio do “Kit” de detecção de morte celular *in situ* (ISCDDK) é o de adicionar “caudas nucleotídicas”, marcadas com fluoresceína aos fragmentos resultantes das quebras na fita de DNA das células em apoptose, a partir das extremidades 3'-OH livre (reação TUNEL). Os fragmentos aos quais foi adicionada fluoresceína emitem fluorescência que pode ser detectada usando filtro específico (comprimento de onda: 450-500nm). Em uma etapa subsequente, anticorpos anti-fluoresceína podem ser conjugados ao Conversor-AP e acoplados às “caudas nucleotídicas”. A adição do substrato (DAB) produz uma cor castanha, causada por ação da peroxidase, visível ao microscópio de luz nos núcleos com DNA fragmentado correspondente às quebras do DNA.

Os resultados fornecidos pela reação TUNEL foram importantes para confirmar se a metacromasia vista com a variante CEC da coloração com azul de toluidina e a coloração esverdeada brilhante por acridine orange, correspondia ou não a morte celular.

Em larvas de 5º instar de rainhas e zangões as únicas estruturas cerebrais a apresentar células marcadas pela reação TUNEL são as células dos primórdios dos lobos ópticos. Em rainhas (FIGS. 39A a C), os núcleos marcados são encontrados espalhados por todas as regiões que compõe os lobos ópticos, assim como evidenciado pela CEC e acridine-orange, enquanto que em machos são observados poucos núcleos com reação positiva ocupando a extremidade do órgão (FIG. 39D). Em operárias, na fase de larvas de 5º instar, não são observadas células marcadas pela reação TUNEL em nenhuma estrutura cerebral. Esta mesma situação é observada para pré-pupas sendo que,

em rainhas (FIGS. 39E e F) e operárias (FIG. 39G) diversas núcleos marcados são encontrados nos lobos ópticos. As outras estruturas cerebrais continuam sem apresentar núcleos marcados. Nas técnicas anteriores, os machos não apresentaram núcleos condensados nos lobos ópticos, em nenhuma fase. Isto indica que as mortes que estão ocorrendo neste órgão, em zangões, estão em um estágio que antecede à condensação da cromatina, que pode ser detectada pelas técnicas da CEC e do acridine-orange.

Em pupas de olhos brancos (FIGS. 39H a J) e de olhos rosa (FIGS. 39K a M) de rainhas, preferencialmente nas extremidades laterais dos cortes dos lobos ópticos são encontrados núcleos marcados, concordando com os resultados obtidos com as técnicas descritas anteriormente. Em zangões e operárias não houve marcação.

A partir do estágio de pupa de olhos pretos as mortes celulares ocorrem principalmente nos corpos pedunculados, assim como evidenciado pela CEC e acridine-orange. Nestas estruturas, em operárias (FIGS. 40A a E) células marcadas pela reação TUNEL são encontradas na base dos corpos pedunculados (FIGS. 40A a C) e também entre as células de Kenyon, ocupando a extremidade deste órgão (FIGS. 40D e E). Em rainhas, células marcadas são encontradas principalmente na base (FIGS. 40F a K), sendo que poucas células com esta marcação são vistas fora desta massa de neuroblastos, ocupando a extremidade dos corpos pedunculados (FIGS. 40I a K). Em zangões, nenhuma das estruturas cerebrais apresentou marcação pela reação TUNEL.

A Figura 41 mostra respectivamente os controles positivos e negativos com marcação fluorescente (FIGS. 41A a D) e após conversão de sinal para microscopia de luz com reação para peroxidase (FIGS. 41E a H). Nos controles positivos devido à incubação com a enzima DNase I todos os núcleos estão marcados, enquanto que nos controles negativos, que foram incubados com a solução TUNEL sem a enzima, nota-se a ausência de núcleos marcados.

Os resultados, apesar de algumas diferenças que podem ser atribuídas à diferenças individuais ou ao fato dos locais de cortes não serem exatamente os mesmos em todas as técnicas, mostra que as células, neuroblastos ou neurônios, com núcleos picnóticos, devido a condensação da cromatina, são células em processo de morte, ou seja, de eliminação.

4.2.4 Características ultra-estruturais das células em processo de morte nos corpos pedunculados

A análise ultra-estrutural das células em processo de morte celular foi direcionada para observação das alterações morfológicas pelas quais estas células passam, a fim de melhor caracterizar o tipo de morte que ocorre no cérebro durante a metamorfose.

Os estudos morfológicos anteriores mostraram que nos corpos pedunculados ocorre uma extensiva morte celular durante o estágio de pupa de olhos preto e, como comprovado pelo estudo morfométrico é em rainhas que este processo é mais marcante, justificando o fato de no presente estudo a análise ultra-estrutural ter sido focada nos corpos pedunculados de pupas de olhos pretos de rainhas.

A figura 32E mostra uma visão geral da área com maior concentração de mortes celulares visualizada através de microscopia de luz. Na figura 42A, observa-se esta região através de MET. Neste estágio do desenvolvimento, a principal região de degeneração ocorre no limite entre a área ocupada por neuroblastos e pelas células de Kenyon que se diferenciaram por último. Nesta figura, vêem-se mais à direita neuroblastos com morfologia inalterada e na transição para as células de Kenyon, neuroblastos em início de morte celular, a qual vai se tornando mais avançada na medida em que se aproxima destas últimas. Portanto, a morte celular está atingindo os neuroblastos, os quais se apresentam em diversos estágios do processo degenerativo. À esquerda, encontra-se uma região de células de Kenyon recém-diferenciadas e uma região intercalada com prolongamentos nervosos, provenientes das células de Kenyon que fazem parte da sub-população classificada como compacta interna.

Os neuroblastos intactos caracterizam-se por apresentarem núcleos volumosos com cromatina descondensada e citoplasma rico em mitocôndrias (FIG. 42A). O início da degeneração deste tipo celular é marcado por alterações nucleares, sendo que o volume nuclear é drasticamente reduzido devido a condensação cromatínica e o espaço perinuclear se dilata (FIG. 42B). A Figura 42C mostra uma célula com núcleo que sofreu marginalização da cromatina. Nesta figura o citoplasma parece estar intacto, com mitocôndrias inalteradas e rico em ribossomos.

As alterações nucleares, presentes no início do processo degenerativo e no estágio seguinte, incluem além da condensação cromatínica em massas muito eletron-

densas, a separação de porções do núcleo por lamelas anuladas, para formar corpos apoptóticos. O sistema de membranas da célula também parece alterado, incluindo a dilatação do espaço perinuclear e de cisternas do retículo endoplasmático (FIG. 42D). Além do núcleo as alterações mais evidentes afetam as mitocôndrias, algumas das quais começam a sofrer alterações em sua morfologia. No entanto, a maioria delas, se encontra inalterada, formando pacotes em determinadas regiões do citoplasma (FIG. 42E). Com o avanço do processo, as alterações citoplasmáticas se tornam mais marcantes. Aparecem diversos tipos de vacúolos digestivos, alguns contendo restos perfeitamente perceptíveis de organelas citoplasmáticas. As mitocôndrias adquirem morfologia alterada e figuras com arranjo lamelar concêntrico também são visualizadas (FIG. 43A, B). No estágio final de degeneração, verificam-se corpos extremamente eletrôn-densos, com diversos tamanhos, resultantes da desintegração final das células. Na Figura 43C vê-se a formação de corpos apoptóticos. Nos espaços entre as células, observa-se a presença de células, provavelmente de glia que se apresentam carregadas de vacúolos claros ou contendo restos celulares muito eletrôn-densos (FIG. 43C, D).

Além de morte celular nos neuroblastos, foi possível observá-la em outros tipos celulares presente nos corpos pedunculados. Na região de células já diferenciadas, s neurônios de Kenyon, as células de glia também apresentam morfologia bastante alterada, com retículo endoplasmático com cisternas dilatadas (FIG. 44A). Na figura 5B, a célula de glia apresenta um grande vacúolo contendo restos celulares. Na situação da figura é impossível dizer se o material no vacúolo é de origem endógena ou exógena, embora os prolongamentos da célula que aparecem intactos apontem mais para origem exógena. As células de Kenyon ao seu redor encontram-se íntegras.

As figuras 44C e D mostram células em processo de morte cercadas por células com morfologia inalterada, sendo que a presença de prolongamentos celulares nesta região sugere que estas células sejam neurônios já diferenciados, portanto, células de Kenyon, sugerindo que algumas células já diferenciadas também podem morrer. A morte celular nestas células parece ter características diferentes da que ocorre nos neuroblastos, mas este dado necessita de confirmação.

As mortes celulares são mais raras nas operárias e nos machos, mas sua localização e características ultra-estruturais são as mesmas que acabam de ser descritas.

4.3 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro

O crescimento das diferentes regiões do cérebro durante a diferenciação que ocorre na metamorfose deve-se em parte à produção de novas células por divisão dos neuroblastos existentes, ou seja, células tronco indiferenciadas. Em preparações coradas com H-E e azul de toluidina algumas divisões puderam ser observadas, mas parecem muito poucas para atender a todo processo de diferenciação. O pequeno número deve ser atribuído ao fato de que com estes métodos apenas as células na metáfase ou anáfase da mitose são detectadas. Portanto, para melhor avaliar a ocorrência de multiplicação celular, foi usada uma técnica específica para este fim, que permite visualizar células também na prófase, fase de início da condensação dos cromossomos.

A técnica com imuno-marcação da histona H3 foi, então utilizada para verificação das mitoses que ocorrem no cérebro de *A. mellifera* durante a metamorfose a fim de se fazer uma avaliação e comparação qualitativa deste processo entre castas e sexos. Esta técnica utiliza um anticorpo altamente específico para a histona H3 fosforilada na extremidade amino, no sítio ocupado pela serina 10. A fosforilação da histona H3 está espacialmente e temporalmente correlacionada à condensação cromossômica e ocorre quase que exclusivamente durante a mitose (HENDZEL et al., 1997). Em células de mamíferos, a marcação na serina 10 da histona H3 fosforilada, ocorre inicialmente durante a prófase, atinge o máximo durante a metáfase, diminuindo na anáfase e é completamente perdida durante a telófase (GURLEY et al. 1978; PAULSON e TAYLOR 1982).

Os resultados mostraram marcação de inúmeras células, em operárias, rainhas e zangões com localização preferencial nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos durante as fases iniciais da metamorfose, ou seja, em larvas, pré-pupas e pupas de olhos brancos.

Em larvas de 5º instar de operárias (FIG. 45A), rainhas (FIG. 45B) e zangões (FIG. 45C) as células marcadas nos corpos pedunculados aparecem distribuídas por toda a região do cálice. Nesta fase, esta estrutura cerebral está completamente preenchida por neuroblastos indicando, a reação, que muitos destes estão se dividindo. Nos lobos ópticos (FIGS. 46A – C), nesta fase, grande área de marcação foi observada nas bordas periféricas do órgão, provavelmente na região da medula. Pré-pupas

apresentam esta mesma distribuição de núcleos marcados, tanto nos corpos pedunculados (FIGS. 47A – C) quanto nos lobos ópticos (FIGS. 48A – C).

Pupas de olhos brancos apresentam marcação de núcleos em mitose nos corpos pedunculados, sendo que pelas fotomicrografias obtidas, rainhas (FIG. 49C) parecem ter menor número de células marcadas que operárias (FIG. 49A) e zangões (FIG. 49D). No detalhe (FIG. 49B) é possível observar células em prófase, metáfase, anáfase nos corpos pedunculados de operárias. Nos lobos ópticos, intensa marcação é observada nas bordas do órgão, na região da lâmina (FIGS. 50A – C).

Em pupas de olhos rosa, os zangões continuam mostrando diversos núcleos marcados tanto nos corpos pedunculados (FIGS. 51A) quanto nos lobos ópticos (FIG. 51C). Operárias apresentam pouca marcação nos corpos pedunculados (FIG. 51B) e ausência de núcleos marcados nos lobos ópticos. Nas rainhas, nesta fase (FIG. 51D) em nenhuma destas regiões cerebrais foi observada marcação de núcleos em mitose.

A partir desta fase, não ocorre marcação de células em nenhuma das estruturas cerebrais estudadas, em nenhuma classe de indivíduos.

4.4 Expressão protéica durante a diferenciação do cérebro

Da mesma forma que a morfologia do cérebro muda durante a diferenciação devido à ocorrência de divisões e mortes celulares diferenciais durante a metamorfose, o amadurecimento das células que vão se diferenciando deve prepará-las fisiologicamente para suas respectivas funções. Se as mudanças morfológicas acontecem de maneira particular para cada classe de indivíduos devido às peculiaridades de suas funções como adultos, o mesmo, ou até de maneira mais marcante, deve acontecer na diferenciação fisiológica. Assim, para dar uma visão mais completa do processo que durante a metamorfose confere ao cérebro das operárias, das rainhas e dos machos características próprias, foram pesquisadas as diferenças na expressão protéica que os caracterizam.

4.4.1 Dosagem de Proteínas

A curva padrão de BSA (bovine serum albumine) em concentrações crescentes variando de 2 a 20 μg no eixo y e 0.1 a 0.5 no eixo x, permitiu determinar a concentração final do total de proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão, utilizando-se o programa Excel (Microsoft Office 97).

A concentração de protéica de cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ está representada na tabela 1. Verifica-se através da tabela que houve pouca variação no teor protéico entre as fases do desenvolvimento e entre os grupos estudados. No entanto, é possível observar que zangões apresentam maior concentração protéica, durante praticamente todas as fases, em relação às dosagens obtidas para operárias e rainhas. Entre as fases, em todos os indivíduos estudados, as larvas apresentam a menor concentração de proteínas, sendo que em pré-pupas e pupas de olhos brancos ocorre um aumento gradativo da concentração protéica nas três classes estudadas, de maneira que em rainhas e zangões esta é a fase que apresenta a maior concentração de protéica. Na fase de pupa de olhos rosa, em todos os grupos, ocorre um declínio neste valor. Em operárias, as fases subseqüentes são marcadas por um aumento da concentração protéica em pupas de olhos marrom, que é a fase de maior expressão, seguida por uma diminuição em pupa de olhos pretos e pupa de corpo escurecido que apresentam valores semelhantes. Em rainhas, também ocorre aumento da concentração de proteínas na fase

de pupa de olhos marrom, mas, este valor se mantém nas pupas de olhos pretos, ocorrendo declínio apenas na fase de pupas de corpo escurecido. Já em zangões, não se verifica aumento na fase de pupa de olhos marrom, sendo observado um declínio gradativo da concentração protéica a partir da fase de pupa de olhos rosa.

4.4.2 Eletroforese Unidimensional

A análise do perfil eletroforético do homogeneizado do cérebro das classes de indivíduos estudadas mostrou a presença de proteínas que migraram para a mesma posição e outras que se expressaram diferencialmente entre operárias, rainhas e zangões e entre as fases da metamorfose (FIGURAS 52 a 54).

A tabela 2 mostra o número total de bandas encontradas em cada fase do desenvolvimento para cada grupo estudado. Verifica-se que em operárias o menor número de bandas é encontrado na fase de larva e a maior diversidade na fase de pupa de olhos marrom, justamente as fases que apresentam, respectivamente, a menor e maior concentração protéica.

Para rainhas, as pupas de corpo escurecido apresentam menor número de bandas e as fases de pré-pupas, pupas de olhos brancos e pupas de olhos marrom o maior. No entanto, ambas as fases apresentam concentração protéica muito semelhante, sugerindo que ocorrem diferenças qualitativas na expressão de proteínas entre estas fases.

Em machos, o maior número de bandas é encontrado em pupas de olhos marrom e as demais fases apresentam pouca variação no número de bandas. O mesmo acontece com a concentração de proteínas presentes nos extratos dos cérebros deste sexo, que apresentam distribuição mais uniforme de teor protéico que em operárias e rainhas.

As diferenças encontradas em relação ao número de bandas estão relacionadas com a presença ou ausência de determinadas proteínas. Assim, serão relatadas a seguir somente as diferenças encontradas entre os perfis protéicos, durante as fases do desenvolvimento.

As Figuras 52, 53 e 54 mostram respectivamente os perfis protéicos obtidos, para operárias, rainhas e zangões. Para todos os grupos estudados, verifica-se que de acordo com o padrão de massa molecular (MW) utilizado, as proteínas presentes nos perfis apresentam variação de massa molecular relativa (Mr) de 256 kDa a 22 kDa. As principais diferenças que podem ser observadas pelos perfis obtidos dizem respeito à

variação na expressão de proteínas que apresentam baixa a média massa molecular, com Mr de 60 a 25 KDa. As bandas que aparecem em larvas de operárias estão numeradas de 1 a 16. As bandas que passam a aparecer nos outros grupos ou fases, levam a numeração crescente a partir do número 16 e estão em verde e as bandas que deixam de aparecer nos outros grupos e fases estão em vermelho. Na tabela 3 estão representadas as bandas, mostrando em quais fases elas se expressam ou deixam de se expressar.

Como exemplo de proteínas que se expressam em comum em operárias, rainhas e zangões, mas que variam a fase em que são expressas, tem-se a banda número 2 (Mr 229 KDa) que está presente em larvas e pré-pupas de operárias, larvas e pupas de olhos marrom de rainhas e, em zangões esta proteína não se expressa apenas na fase de pupa de olhos preto. A banda de número 5, com Mr 110 KDa, está presente em todas as fases de operárias, em rainhas está ausente em pupas de olhos brancos e pupas de corpo escurecido, e em zangões está ausente somente na fase de larva. A de número 6, com Mr 100 KDa está ausente na fase de pupa de corpo escurecido em operárias, em pupas de olhos brancos e pupas de corpo escurecido em rainhas e em larvas de zangões. A banda de número 11 (Mr 49KDa) está presente em operárias nas fases de larva, pré-pupa e pupas de olhos brancos, em rainhas nas fases de pré-pupa, pupas de olhos rosa e pupas de olhos marrom e em zangões está ausente somente em larvas e pré-pupas. A banda de Mr 70 KDa, com número 17 aparece em quase todas as fases de operárias, estando ausente somente em larva. No entanto, em rainhas, esta proteína se expressa principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento (larva, pré-pupa e pupa de olhos brancos) e volta a aparecer em pupas de olhos pretos. Em zangões esta proteína está presente somente na fase de pré-pupas e pupas de corpo escurecido. A proteína de número 18, com Mr 68 KDa, está presente em praticamente todas as fases e grupos analisados, sendo que não se expressa somente em larvas de operárias. Em todos os indivíduos a proteína de número 20 e Mr 40 KDa apresenta-se com expressão em apenas algumas fases. Em operárias e rainhas está presente em pupas de olhos brancos e pupas de olhos marrom e em zangões em larvas, pupas de olhos marrom, pupas de olhos pretos e pupas de corpo escurecido. Com Mr 36 KDa a proteína de número 19 está presente somente nas fêmeas, se expressando em operárias nas fases de pupas de olhos brancos, pupas de olhos marrom, pupas de olhos pretos e pupas de corpo escurecido e em rainhas, somente na fase de pupas de olhos brancos e rosa.

Proteínas encontradas somente em operárias, foram as de números 21 (Mr 33 KDa), 22 (Mr 30 KDa), 24 (Mr 71 KDa) e 25 (Mr 70 KDa) , sendo as duas primeiras características da fase de pupas de olhos brancos e pupas de olhos marrom e as duas últimas da fase de pupas de corpo escurecido. Em contrapartida, as proteínas de número 28 (Mr 20 KDa) e 29 (Mr 22 KDa), não se expressam durante a metamorfose de operárias, mas expressam-se em rainhas e zangões. Em rainhas, a proteína de número 28 está presente nas fases de pré-pupas e pupas de olhos brancos e em zangões, está ausente somente na fase de pupa de corpo escurecido a de número 29, em rainhas se expressa nas fases de pré-pupas e pupas de olhos marrom e em zangões se expressa nas fases de pupas de olhos branco, rosa, marrom e de corpo pigmentado.

A proteína de número 23 e Mr 72 KDa está ausente em todas as fases de rainhas e se expressa em operárias nas fases de pupas de olhos pretos e pupas de corpo escurecido e em zangões nas fases de pupas de olhos rosa, marrom e pretos.

Como proteínas próprias de rainhas, têm-se as de número 26 (Mr 200KDa) e 27 (Mr 22KDa), que se expressam apenas nesta casta na fase de larva e, como característica de zangões, a proteína de número 30 (Mr 45KDa), que só não se expressa apenas nas fases de larva e pré-pupa.

Com relação às proteínas que se expressam em comum para todos os grupos e fases analisadas, verifica-se que algumas bandas se destacam por apresentarem-se em grande concentração. Dentre essas bandas estão a de número 9 e Mr 73KDa que está presente em todos os grupos e fases estudadas, sendo fortemente expressa em pupas de olhos brancos e marrom de operárias e pupas de olhos brancos de rainhas e zangões.

4.4.3 Eletroforese Bidimensional e Identificação das Proteínas

A eletroforese bidimensional possibilitou uma melhor separação das proteínas diferencialmente expressas entre as castas e os sexos de *A. mellifera*, através da obtenção de géis de concentração única (a 12;5%) ao invés de géis em gradiente (de 5% a 22%), como realizados para a eletroforese unidimensional. Esta mudança foi introduzida levando-se em consideração o objetivo do trabalho de identificar diferenças morfológicas e fisiológicas na diferenciação cerebral entre as classes de adultos componentes das colônias.

Por se tratar de uma análise comparativa todos os géis devem ser feitos exatamente da mesma maneira, e, o gel em que a concentração é em gradiente pode apresentar variações na mistura das concentrações de um gel para o outro e, portanto alterações na posição dos “spots”, já que os mesmos são preparados manualmente. Já os géis de concentração única (a 12,5%) como realizado, se mostraram altamente reproduzíveis.

Nesta etapa, ao invés de investigar a expressão de proteínas em todas as fases da metamorfose, como feito anteriormente para a eletroforese unidimensional, foram escolhidas duas fases que marcam transições entre fases de vida: a fase de pré-pupa, fase inicial da metamorfose, transição de larva para pupa, onde as características peculiares de cada indivíduo começam a se expressar, e a fase de pupa de olhos pretos, o final da metamorfose e início da transição para adulto, onde as características morfológicas das castas e sexos já estão estabelecidas, a fim de melhor direcionar o estudo de expressão protéica.

A análise dos perfis eletroforéticos obtidos nestas duas etapas do desenvolvimento, para operárias, rainhas e zangões, mostraram-se bastante semelhantes, podendo-se concluir que, durante essas transições, as principais alterações na expressão protéica é quantitativa, ou seja, ocorre preferencialmente sub ou super expressão de algumas proteínas entre as castas e sexos (Figuras 55 a 58).

Foi verificada a expressão no cérebro de inúmeras proteínas, algumas em quantidade consideráveis e outras em quantidades mínimas, com alterações do ponto isoelétrico. Muitas dessas expressam-se em todas as fases e classes de indivíduos, enquanto outras têm expressão quantitativa diferentes entre as classes. Algumas das proteínas expressas foram identificadas. Na impossibilidade de identificar todas as proteínas expressas, optou-se por escolher aquelas com maior diferença de expressão.

Através da análise realizada pelo software Image Master 2D Platinun (v. 6.0) e do teste estatístico realizado, foram selecionadas 20 proteínas com diferença de expressão entre os indivíduos na fase de pré-pupa e na fase de pupa de olhos pretos. As comparações entre os perfis obtidos foram feitas tendo-se como referência o perfil protéico das operárias, assim todas as diferenças de expressão tomaram por base a expressão da proteína em análise nas operárias e o quanto sua expressão aumentou ou diminuiu nas outras classes de indivíduos mesma fase. Deve-se ressaltar que não foram

feitas comparações entre indivíduos de fases diferentes, ou seja, comparou-se apenas a expressão de proteínas entre operárias e rainhas e operárias e zangões nas fases de pré-pupa e de pupa de olhos pretos.

A figura 55 mostra o perfil protéico obtido para pré-pupas de operárias e rainhas, bem como as proteínas que foram identificadas, enquanto que na tabela 4 estão discriminados os resultados da sua identificação e o nível da diferença qualitativa na expressão destas proteínas, obtida pelo teste T-student. É possível observar que na fase de pré-pupa todas as proteínas estudadas apresentam super expressão em operárias, sendo que em rainhas, em todo o perfil analisado, todas as proteínas estão sub expressas em relação à operária.

O perfil protéico dos extratos do cérebro de pré-pupas de operárias e zangões, bem como as proteínas identificadas que apresentaram diferenças de expressão através do test T-student estão mostradas na figura 56, os *spots* apontados em vermelho representam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original. Os resultados da identificação e as diferenças do nível de expressão destas proteínas estão na tabela 5. Novamente, proteínas com a numeração em vermelho indicam proteínas já descritas em fase anterior. Comparando-se os perfis obtidos, verifica-se que a maioria das proteínas está super expressa em operárias também em comparação com os zangões.

Na fase de pupas de olhos pretos as operárias apresentaram algumas proteínas sub expressas em relação a rainhas e zangões, diferindo assim da fase de pré-pupa, quando a maioria das proteínas estava super expressa nesta casta em comparação com os outros indivíduos componentes da colônia. Nas figuras 57 e 58, podemos observar respectivamente o perfil protéico dos extratos do cérebro de operárias e rainhas e operárias e zangões nesta fase, e na tabela 6 e 7, os resultados da identificação das proteínas, bem como as diferenças de níveis de expressão entre estes indivíduos.

FIGURAS

FIGURA 1: Fotomicrografias do cérebro de *A. mellifera*. A. operária, B. rainha, C. macho.
cp=corpos pedunculados, la=lobos antenais, lo=lobos ópticos, pi=pars intercerebralis,
cc=corpo central, oc=olhos compostos, n=neurópilas, s=soma.
Barras: 400µm

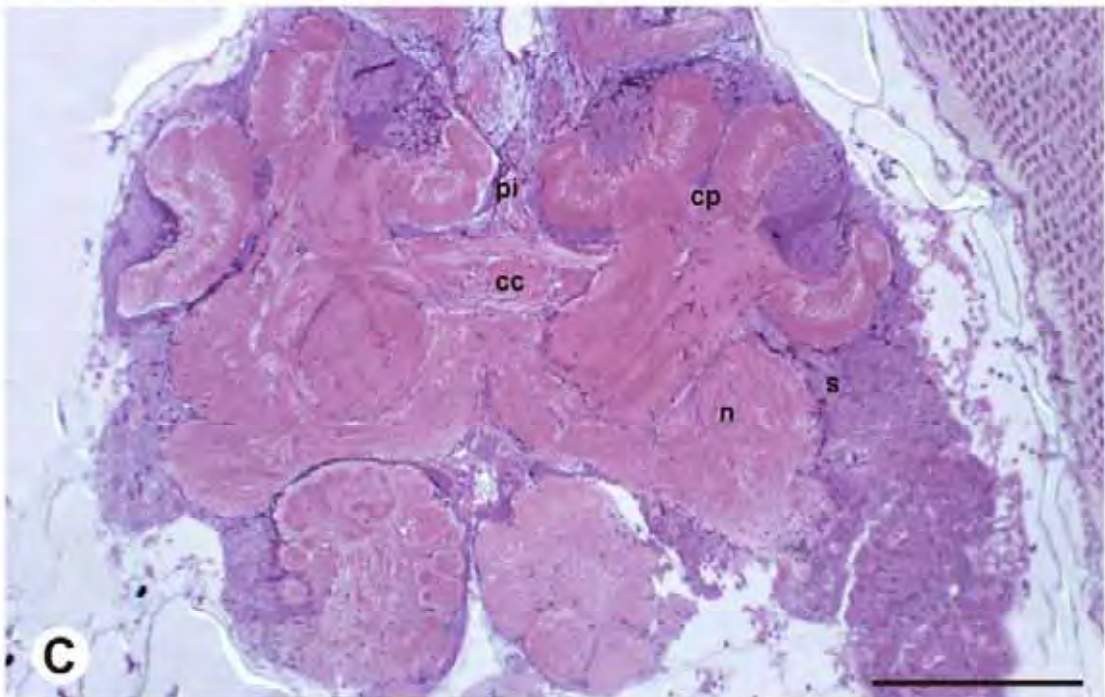
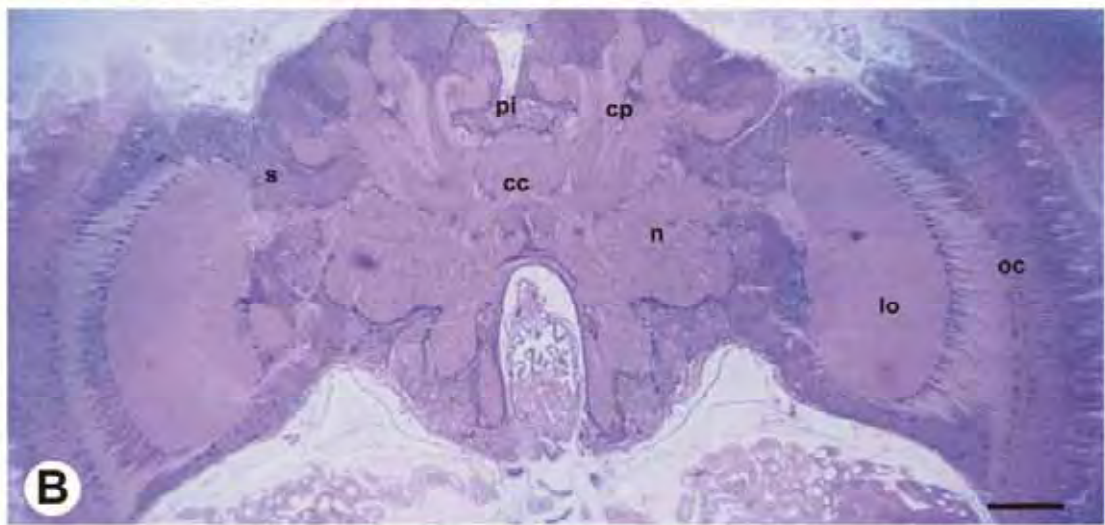
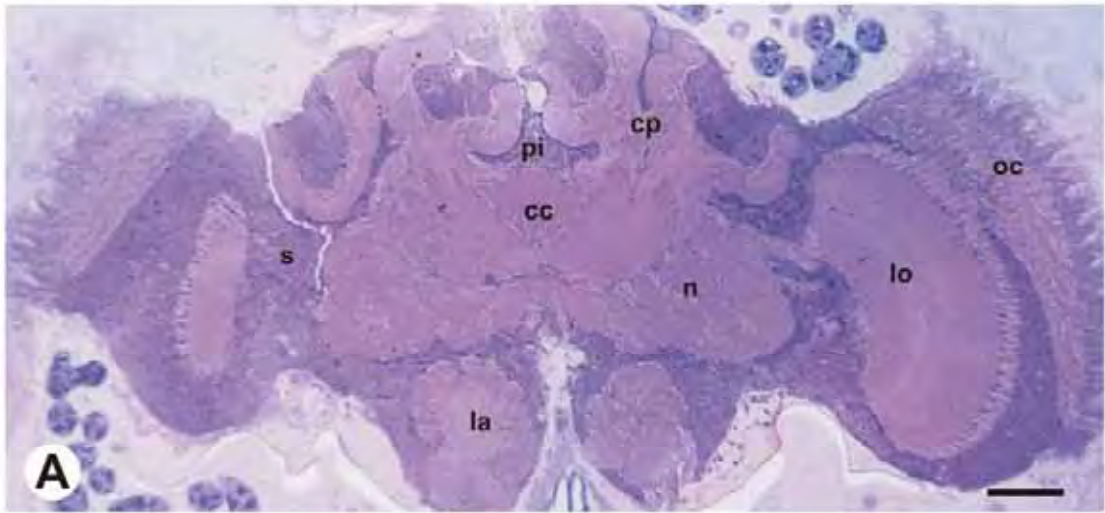


FIGURA 2: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de indivíduos recém-emergidos. A. Operária, B. Rainha, C. Macho. Notar que os corpos pedunculados (cp) das operárias têm cálices mais profundos que na rainha e estas que os machos. nk=neurônios de Kenyon, n=neurópila, bo=borda, co=colar, ba=base, p=peúnculo.
Barras: 600 μ m

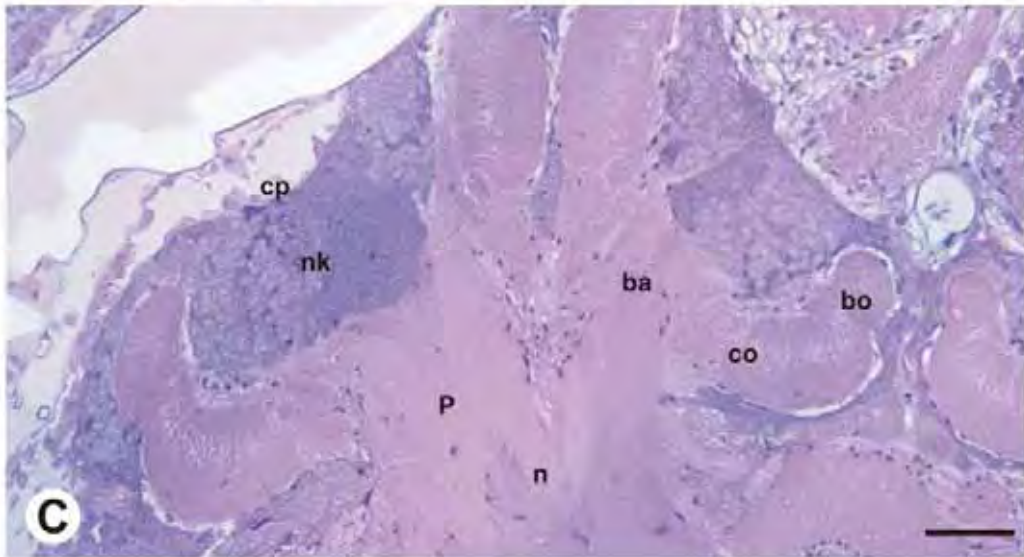
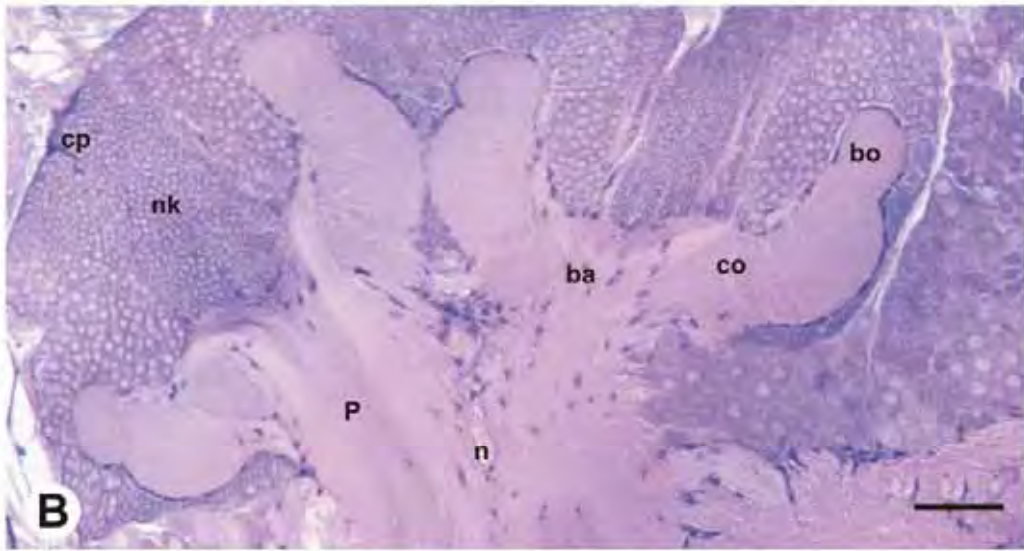
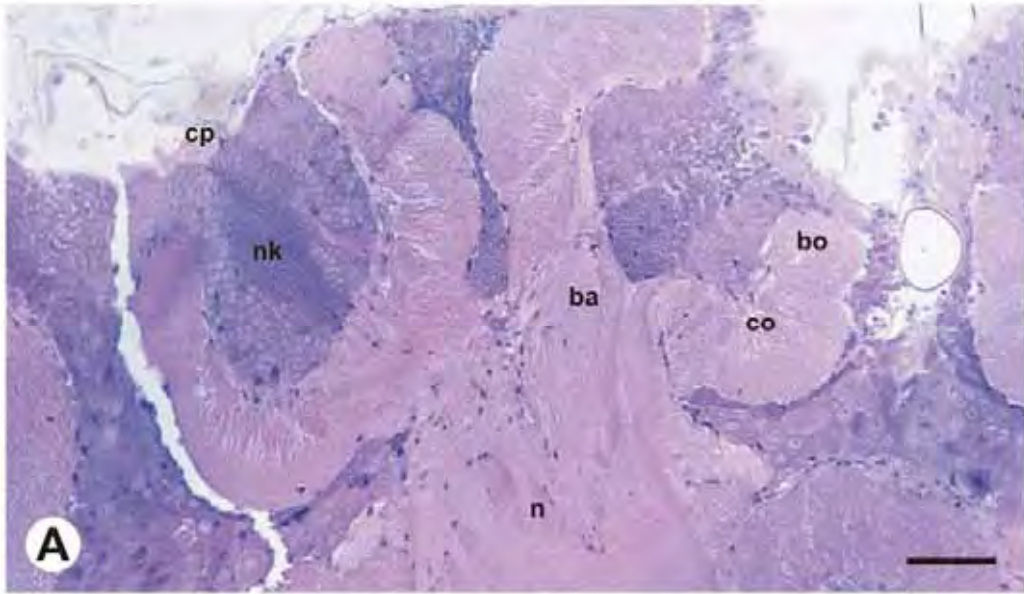


FIGURA 3: Fotomicrografias dos precursores dos corpos pedunculados em larvas de 5^o instar de *A. mellifera*. A e B. Operária, C e D. Rainha, E e F. Macho. Notar as massas globulares (mg) de neuroblastos rodeadas por células pequenas (cp), que são a primeira população de células de Kenyon a se diferenciar. Observar o início da formação do pedúnculo (P) por fibras vindas das células pequenas, periféricas localizadas na parte superior. Notar em C, D e F células pequenas muito coradas (cc), rodeando a base do pedúnculo em formação. Em operárias e rainhas e zangões é possível observar células em divisão (setas).

Barras: A, C e E: 500 μ m; B, D e F: 200 μ m

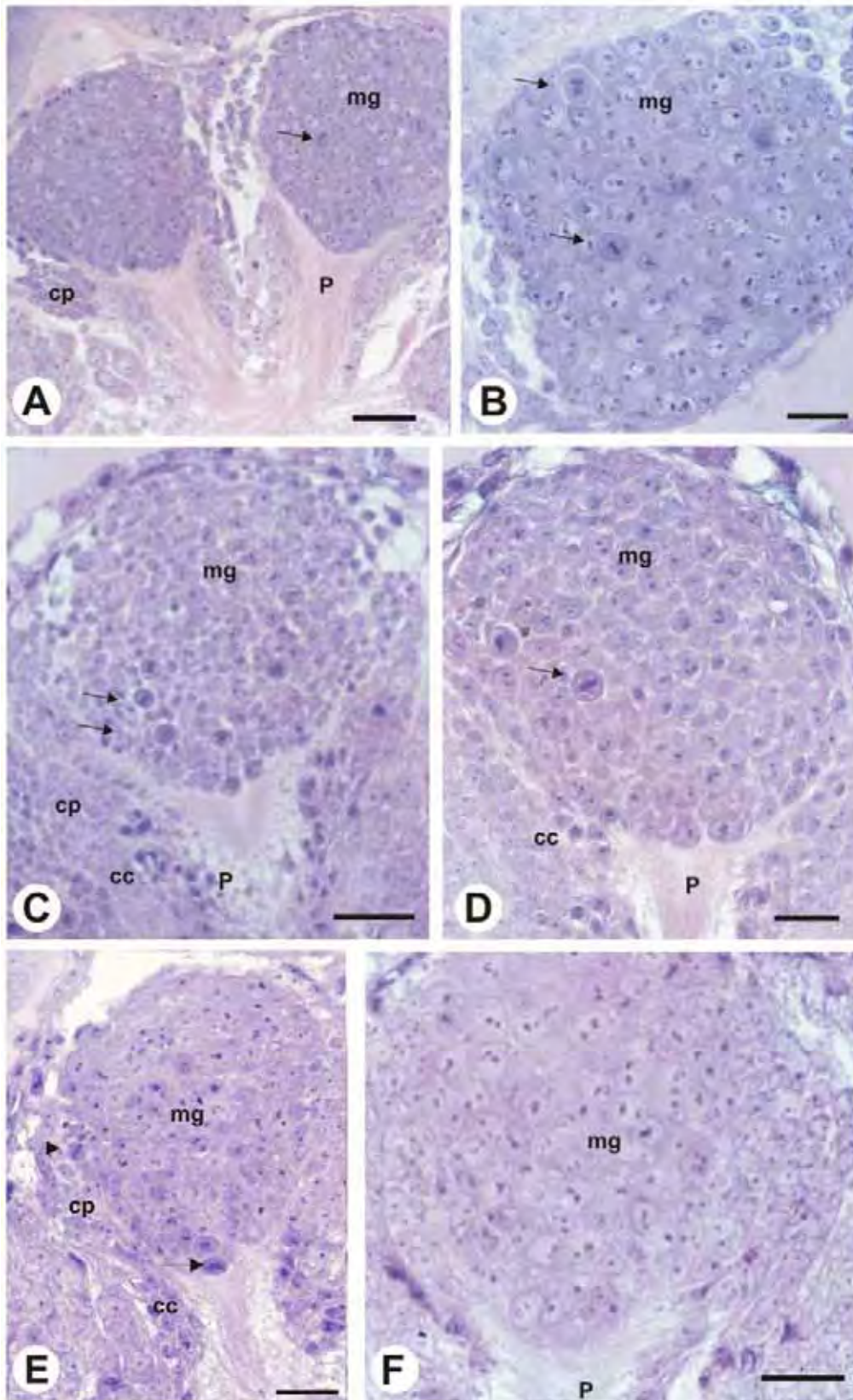


FIGURA 4: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de pupas de olhos brancos de operárias (A) e rainhas (B) de *A. mellifera*. Notar o grande aumento do número neuroblastos (n) e a separação das células de Kenyon em dois grupos: não compactas (nc) e compactas externas (ce) lateral ao pedúnculo (P). Notar a origem do pedúnculo a partir das células superiores e a rede frouxa (rf) de filamentos originados do conjunto basal.

Barras: 400µm

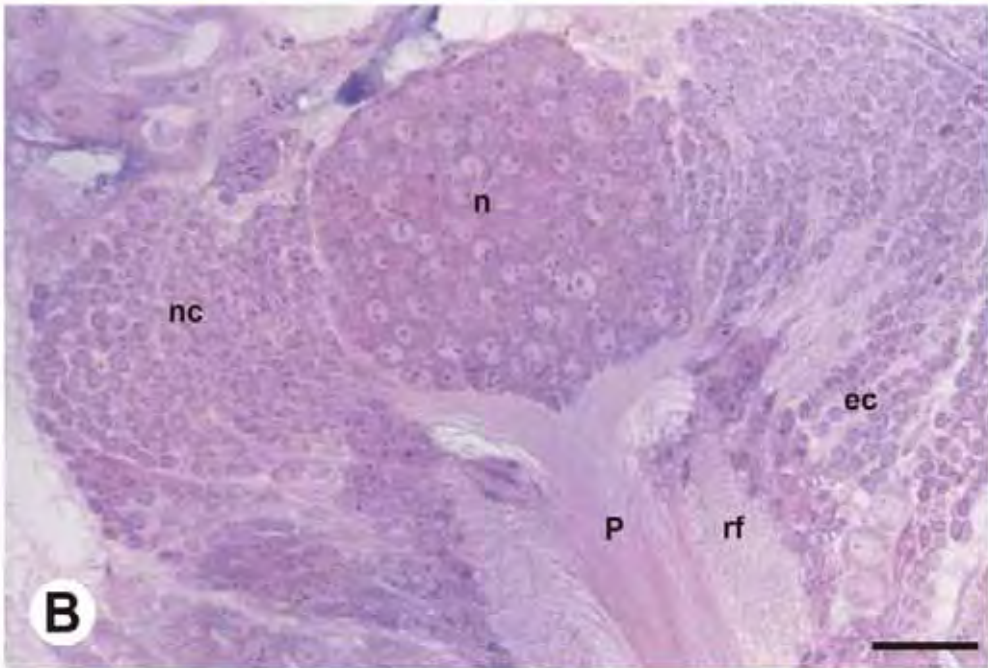
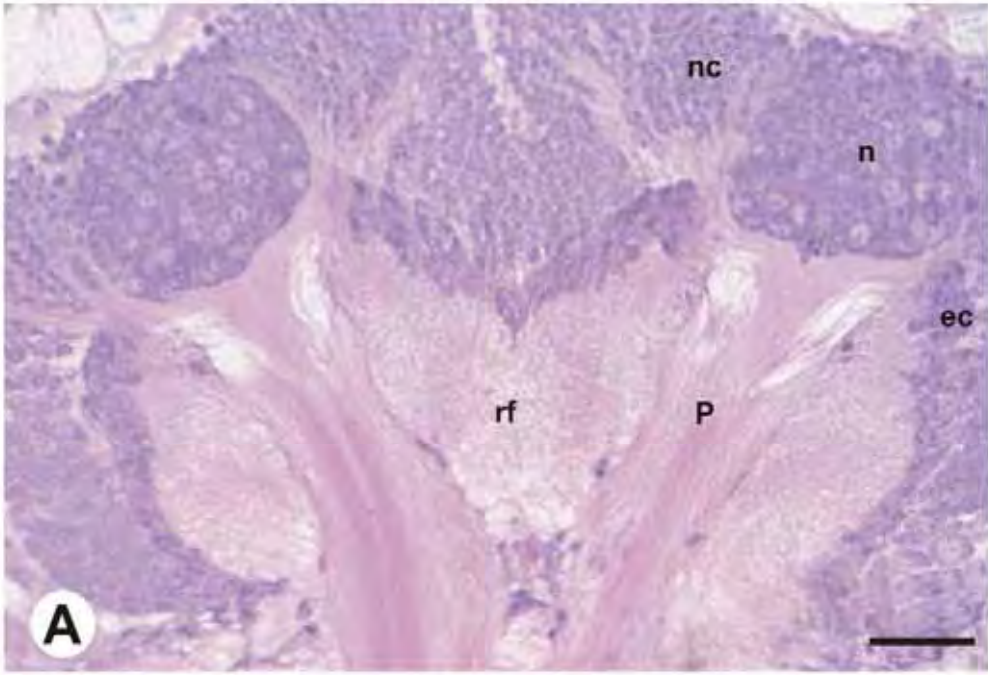


FIGURA 5: Fotomicrografias mostrando ampliação dos corpos pedunculados de pupas de olhos brancos de *A. mellifera*, vendo-se divisão celular (setas) nos neuroblastos (n) em operária (A) e rainha (B) e nas células de Kenyon não compactas (nc). Nos machos (C) divisões não foram observadas nesta fase nas secções analisadas.

Barras: 200µm

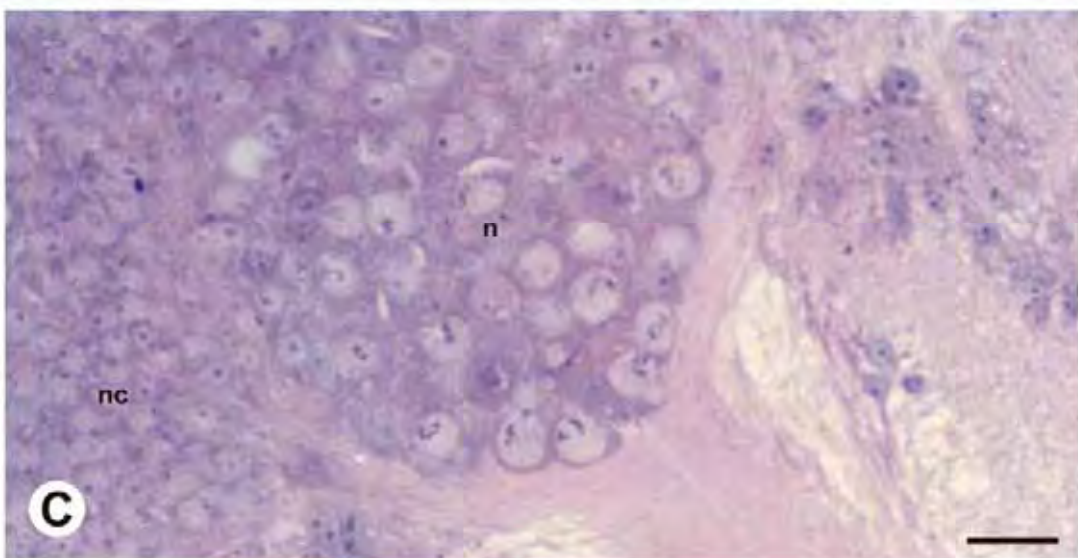
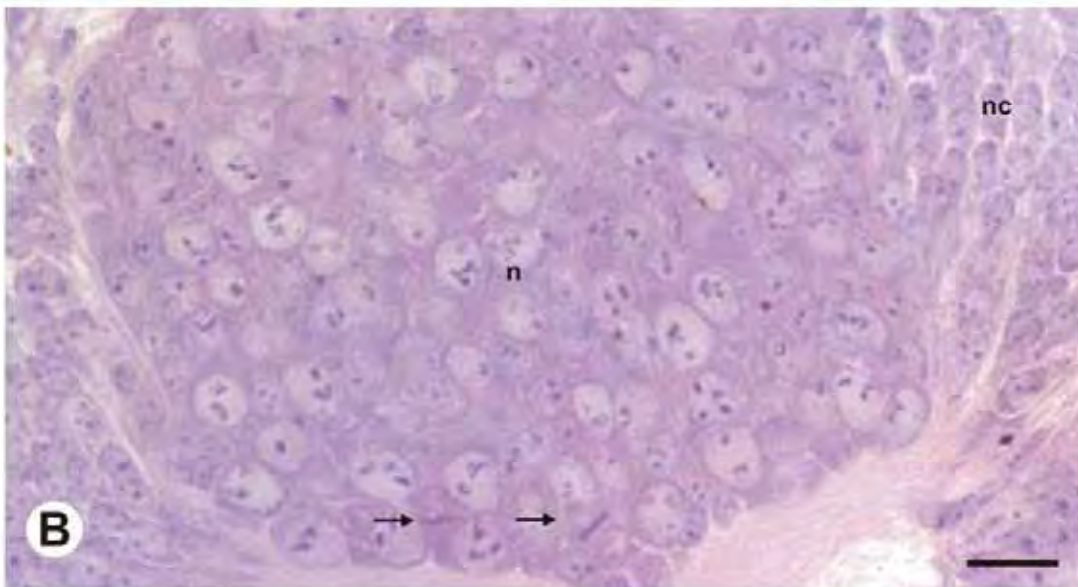
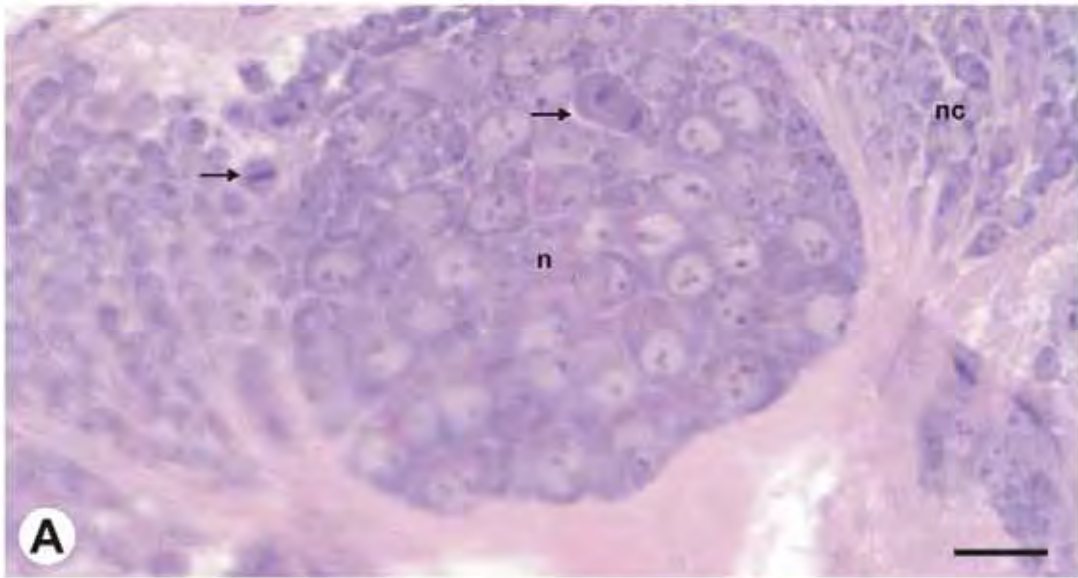


FIGURA 6: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de pupas de olhos rosa de *A. mellifera*. A. Operária, B. Rainha, C. Machos. Observar em operárias e zangões o início da divisão entre a base e o colar (setas) do cálice, a aparente diminuição da quantidade de neuroblastos (n) e presença das três sub-populações de células de Kenyon: compactas internas (ci) não compactas (nc) e compactas externas (ce), enquanto que em rainhas, o cálice continua com a mesma morfologia da fase anterior.

Barras: 400µm

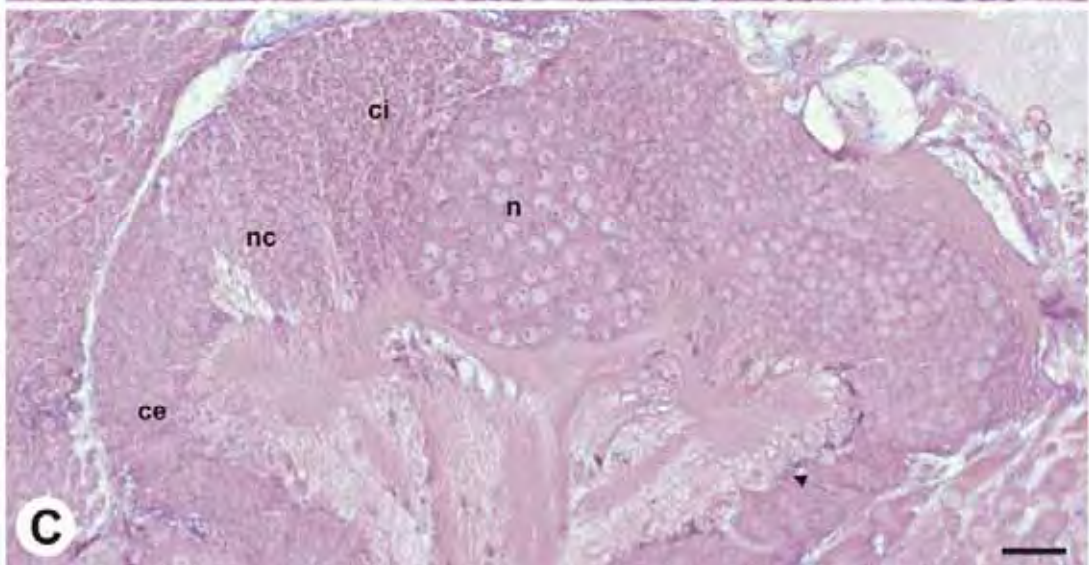
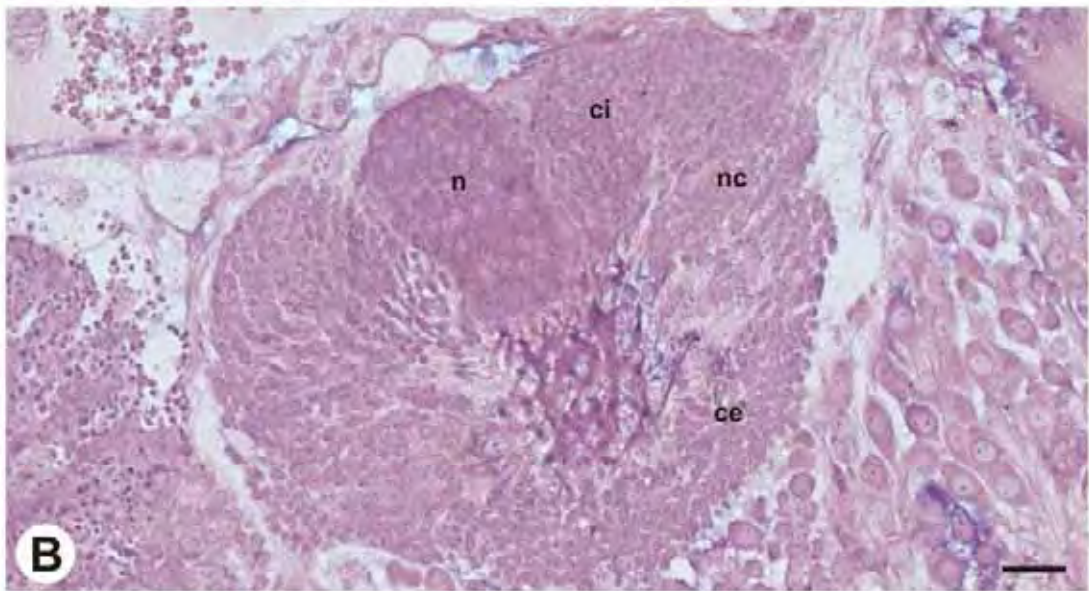
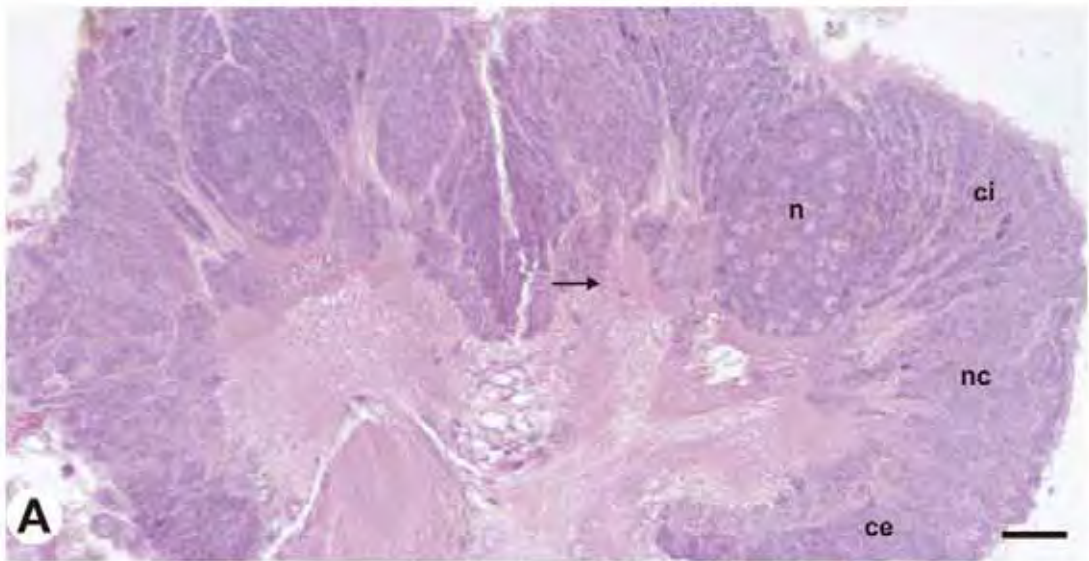


FIGURA 7: Fotomicrografias da diferenciação dos cálices dos corpos pedunculados (cp) em pupas de olhos marrom, sendo possível observar a borda (bo), o colar (co) e a base (ba) desta estrutura. A. Operária, B. Rainha, C. Macho. Notar a nítida divisão de células de Kenyon em três subpopulações: compactas internas (ci), não compactas (nc) e compactas externas (ce), além da presença de neuroblastos (n) ocupando maior área em operárias e quase ausentes nos machos. Notar que os cálices das operárias (A) já nesta fase são mais altos e mais estreitos e os de rainhas (B) e machos (C) mais largos e rasos.

Barras: 400 μ m

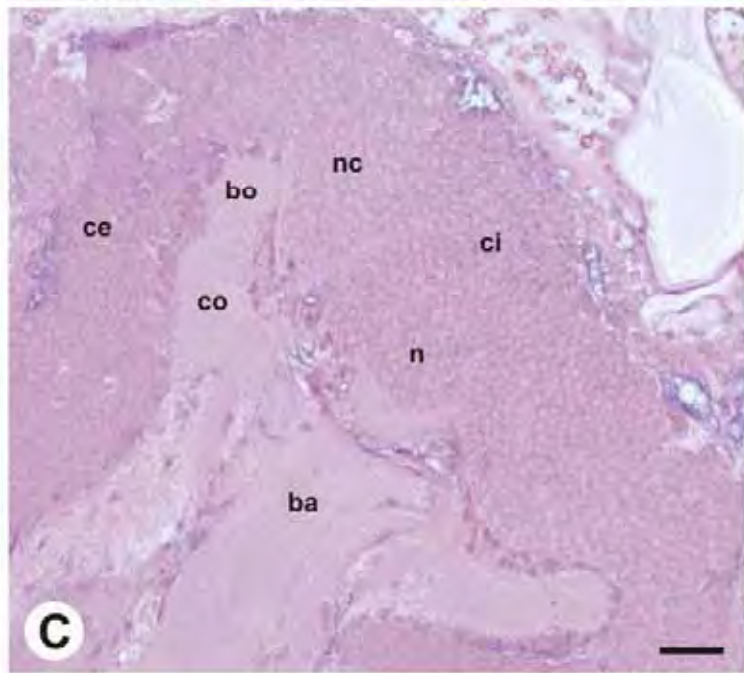
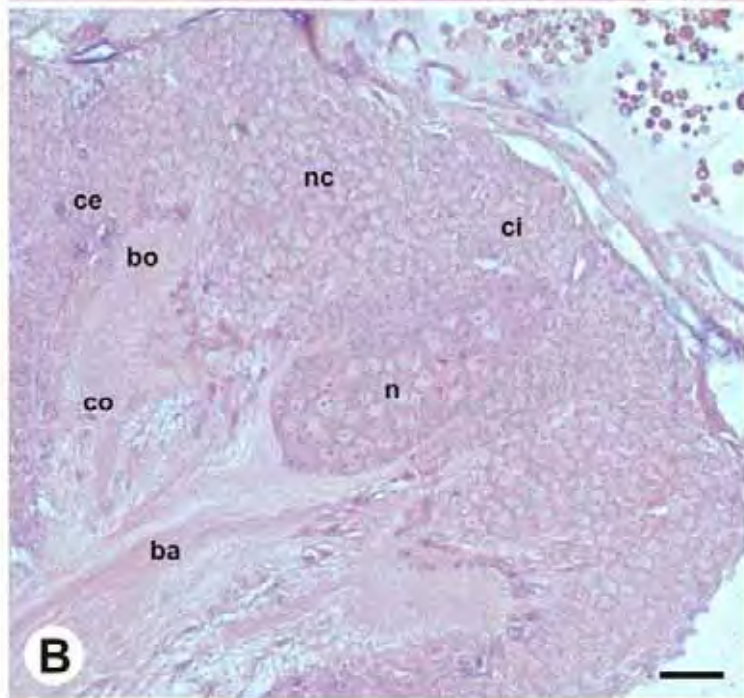
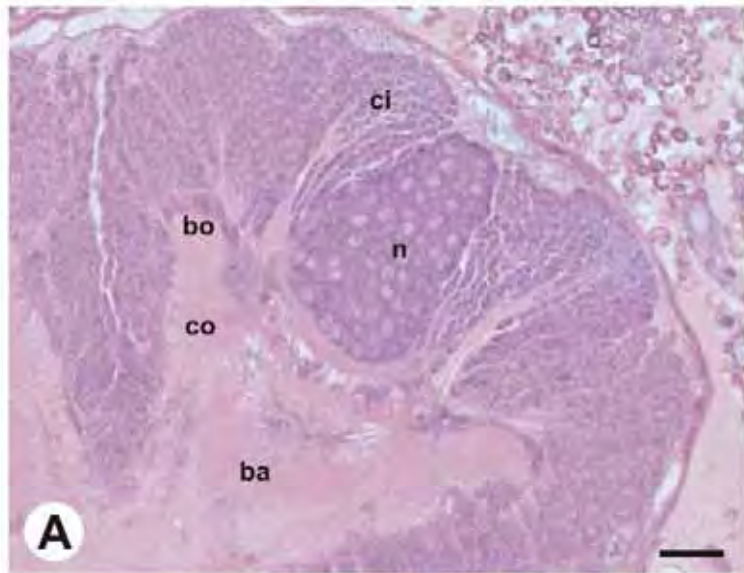


FIGURA 8: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de pupas de olhos preto de *A. mellifera*. A e B. Operária, C - F. Rainha, G e H. Macho. Notar a presença de células picnóticas (setas), ocupando a região de transição entre os neuroblastos (n) e a células de Kenyon do tipo compactas internas (ci). Em zangões encontram-se poucas células com esta morfologia.

Barras: A, C, E e G: 400 μ m; B, D, F e H: 200 μ m

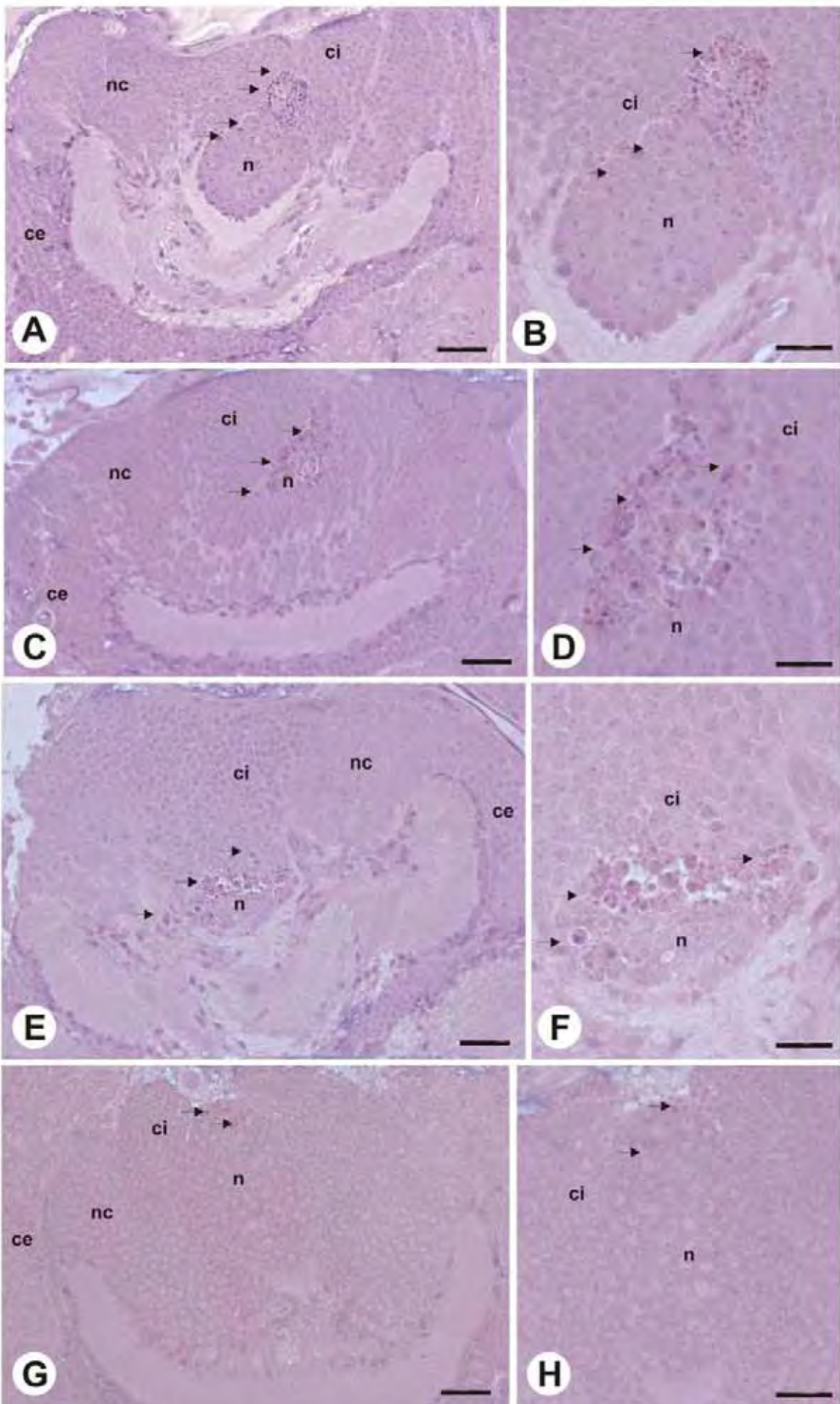


FIGURA 9: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de pupas de corpo escurecido de *A. mellifera*, com aspecto bem próximo do adulto. A. Operárias, B. Rainhas, C. Macho. Observe que nesta fase os neuroblastos estão ausentes e as sub-populações de células de Keyon são claramente distinguíveis em compactas internas (ci) que foram as últimas a se diferenciar; não compactas (nc) e compactas externas (ce) que foram as primeiras a se diferenciar.

Barras: 400µm

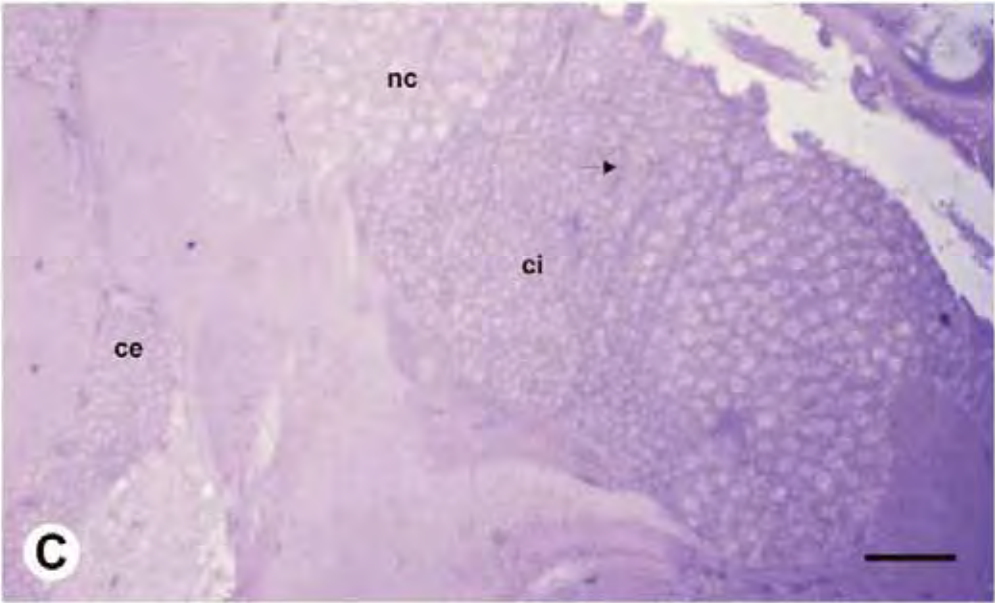
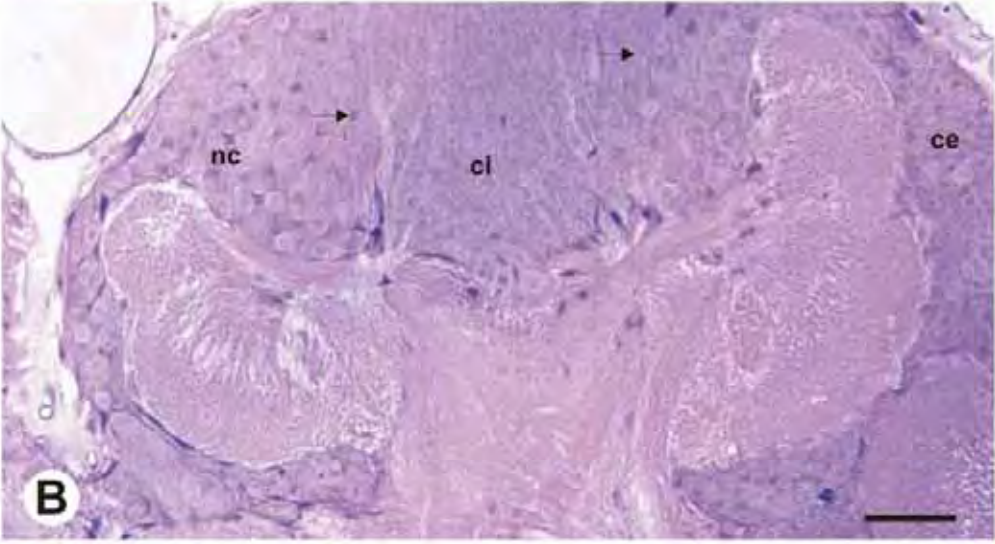
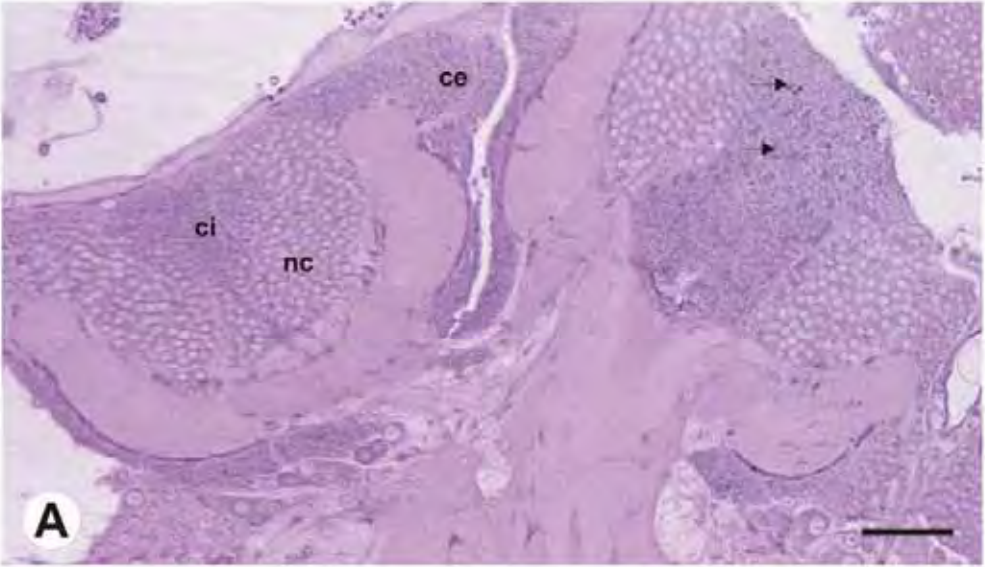


FIGURA 10: MET das células de Kenyon presentes nos corpos pedunculados de pupa de olhos preto de rainhas de *A. mellifera*. **A** e **B** – Células da sub-população conhecida como compactas internas, mostrando núcleos (n) pequenos, com cromatina (cr) descondensada e nucléolo (nu) evidente. Notar em **A** prolongamentos nervosos (pn) entre as células e em **B** a presença de Golgi (G), mitocôndrias (m), polirribossomos (pr) e pouco retículo endoplasmático granular (rer). **C** e **D** – Neurônios da sub-população do tipo não compacta, mostrando células com mais citoplasma. n = núcleo; cr = cromatina descondensada; nu = nucléolo; bi = região interna da borda cálice. **E** e **F** – Neurônios que se encontram fora do cálice (sub-população do tipo compacta externa). Em **E** vê-se parte da região externa da borda do cálice (be) e que os neurônios encontram-se mais separados entre si, mais esférico, com espaços intercelulares preenchidos por prolongamentos nervosos (pn) e ramificação de células de glia e que os nucléolos são menos evidentes. n = núcleo; cr = cromatina descondensada Em **F** nota-se a presença de Golgi (G) mais desenvolvido, com numerosas vesículas (ve) ao redor e maior quantidade de retículo endoplasmático granular (reg).

Barras: 5µm

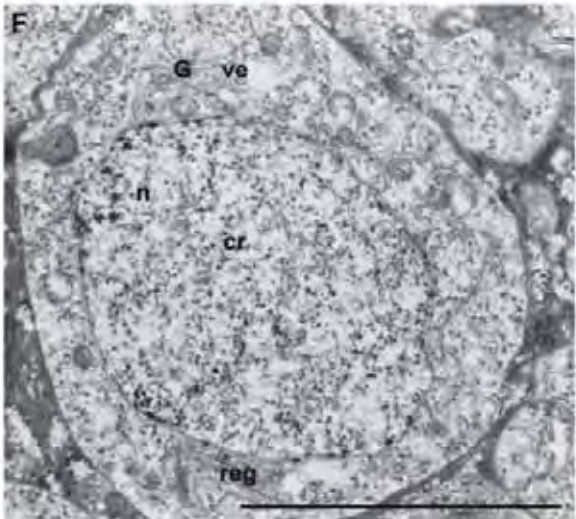
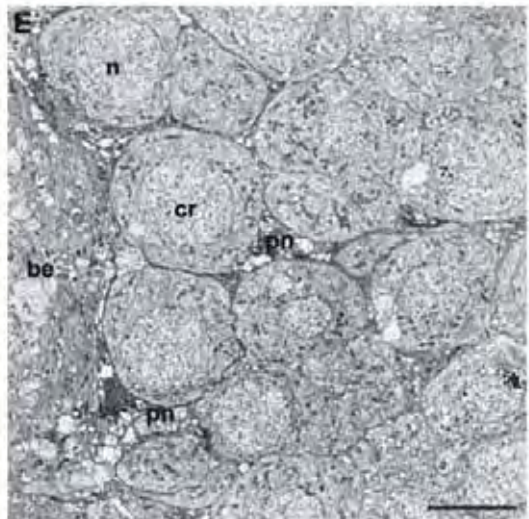
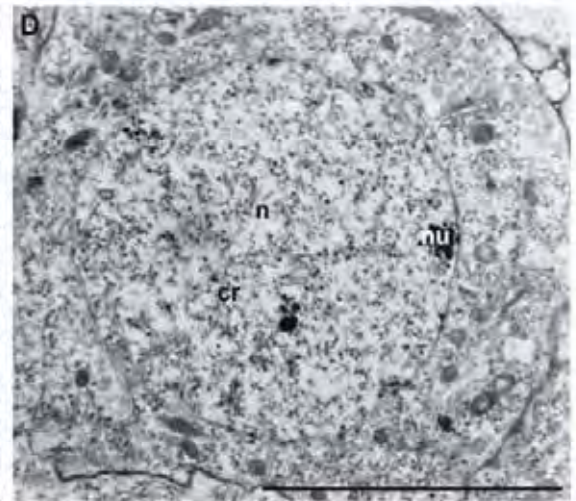
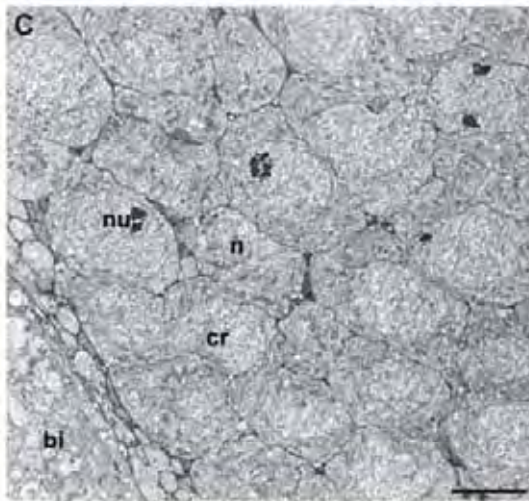
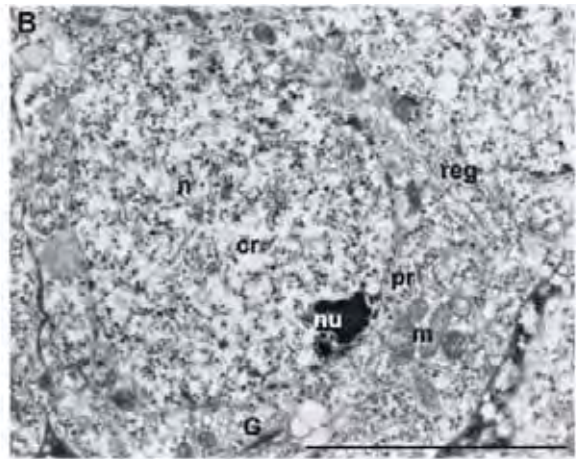
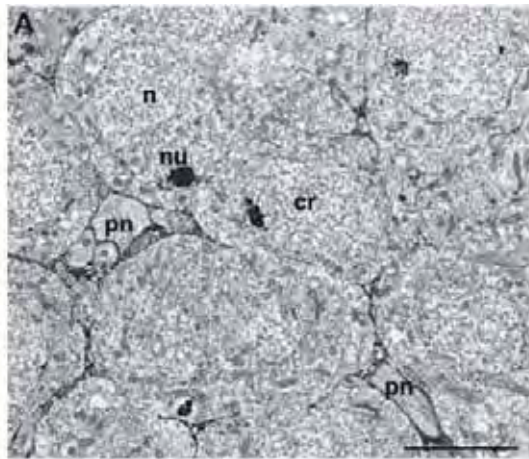


FIGURA 11: Fotomicrografias da parte intercerebral de *A. mellifera*.

A – C. larvas de 5º instar. Notar que células (c) maiores estão presentes nas operárias (A) e que nos macho (C) a região não apresenta neurônios (seta). B = rainha.

D – F. pupas de olhos brancos, mostrando poucas células grandes em operárias (D) muitas células pequenas nas rainhas (E) e de tamanho intermediário em machos (F).

Barras: A, B, C e F: 400µm; D: 200µm

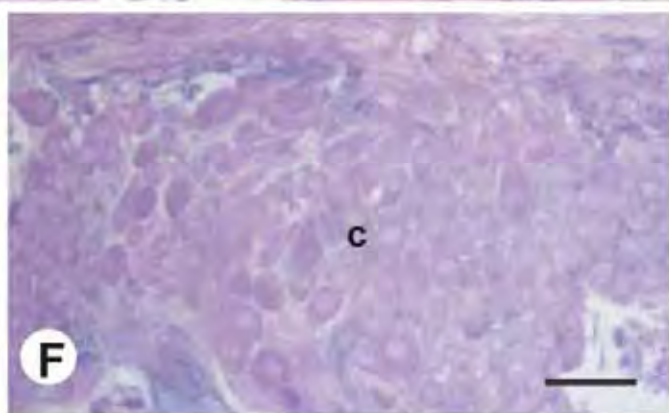
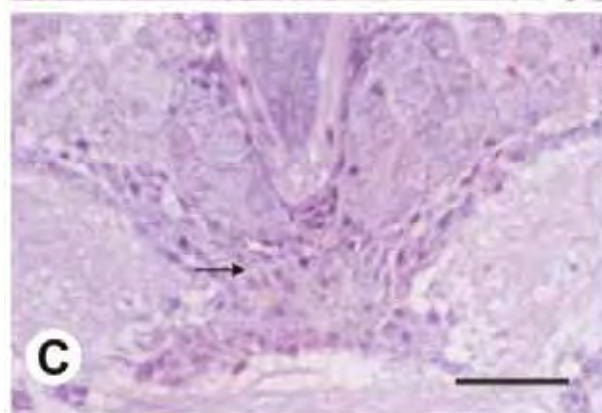
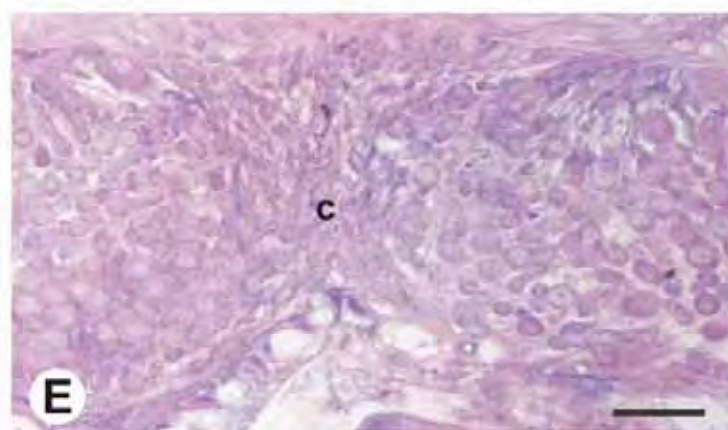
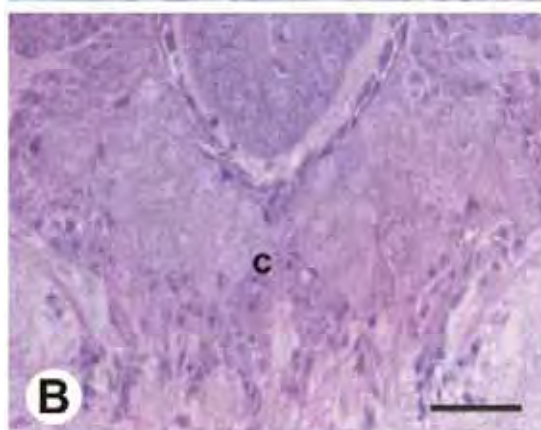
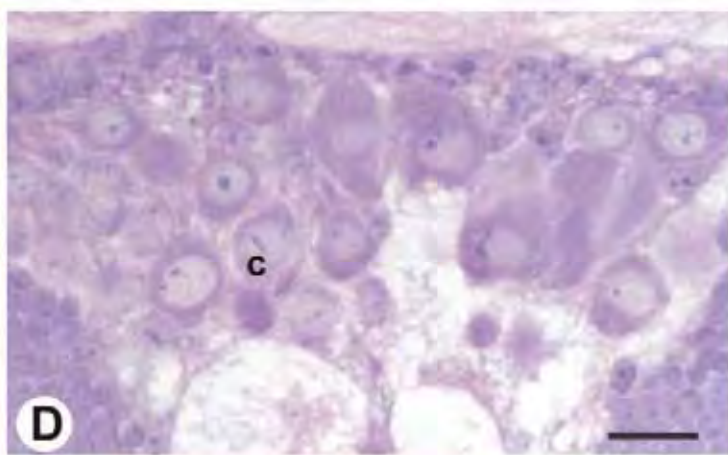
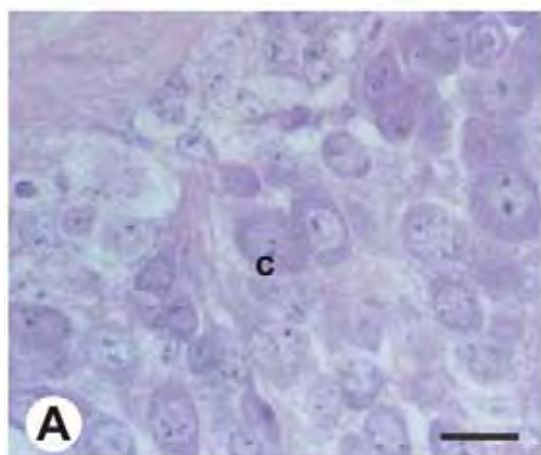


FIGURA 12: Fotomicrografias da parte intercerebral de *A. mellifera*, mostrando a presença de células (c) muito coradas, provavelmente contendo secreção (setas) em operária (A) e rainha (B) e sua ausência no macho (C), nas pupas de olho rosa. Em pupas de olho marrom (D – F), a operária (D) apresenta células (c) mais coradas, enquanto que a rainha apresenta células em maior quantidade (E). F=macho.

Barras: A: 1000 μ m; B, C, E e F: 400 μ m e D: 500 μ m

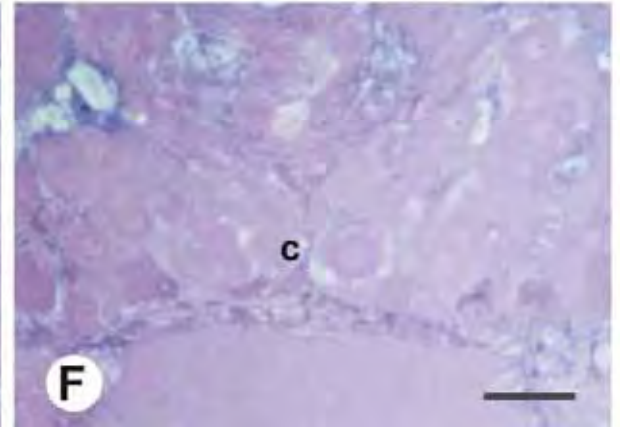
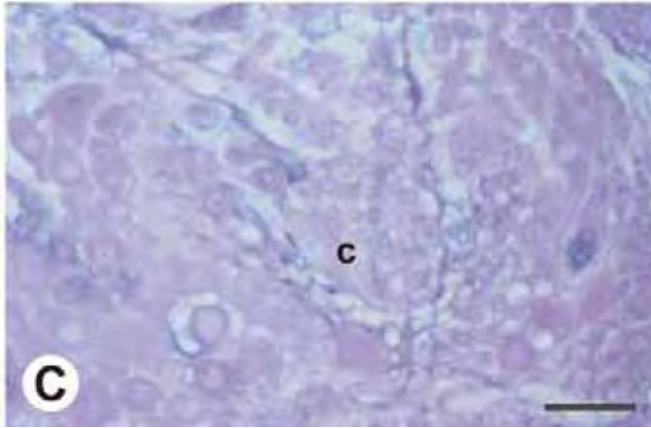
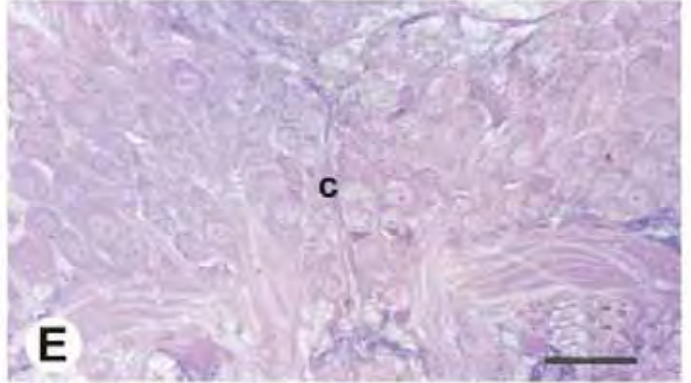
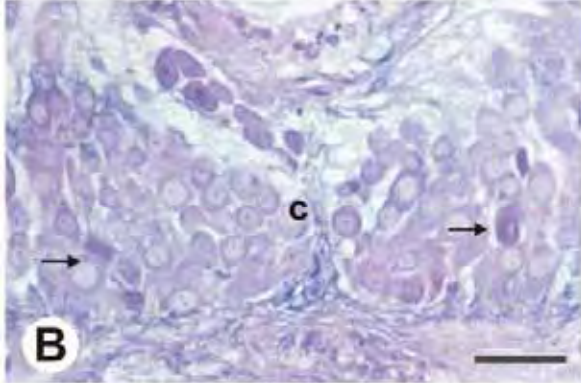
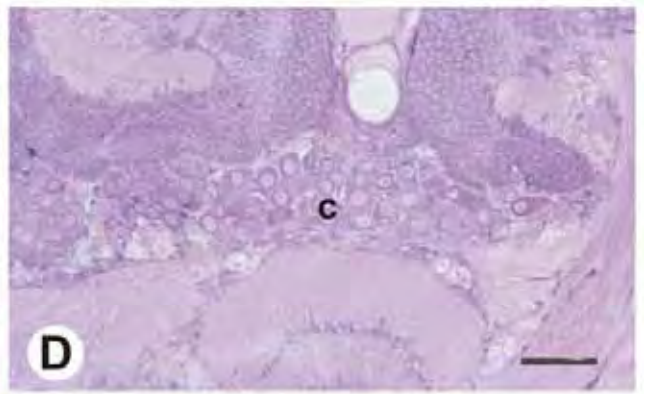
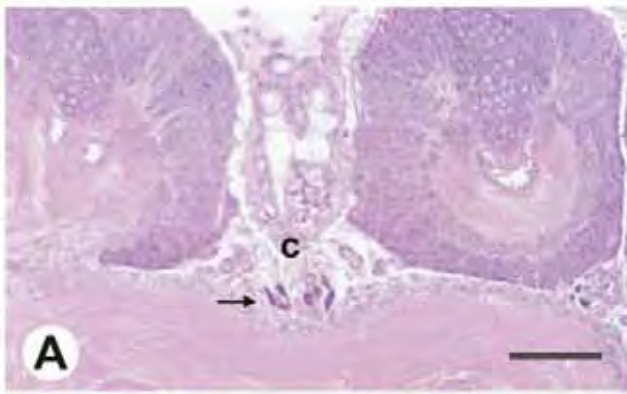


FIGURA 13: Células da parte intermediária de pupas de olhos preto (A – C) e pupas de corpo escurecido(D – F) de *A. mellifera*. Notar em operárias de pupas de olhos preto (A) células (c) muito coradas (setas) provavelmente contendo secreção e sua ausência em rainha (B) e macho (C). Em pupas de corpo escurecido notar que, neste estágio, é o macho (F) que apresenta células mais coradas e maiores (setas). D = operária, E = rainha.

Barras: 400µm

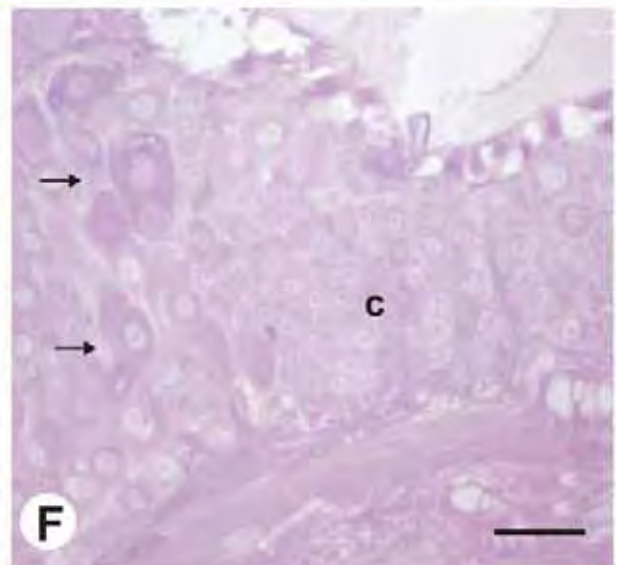
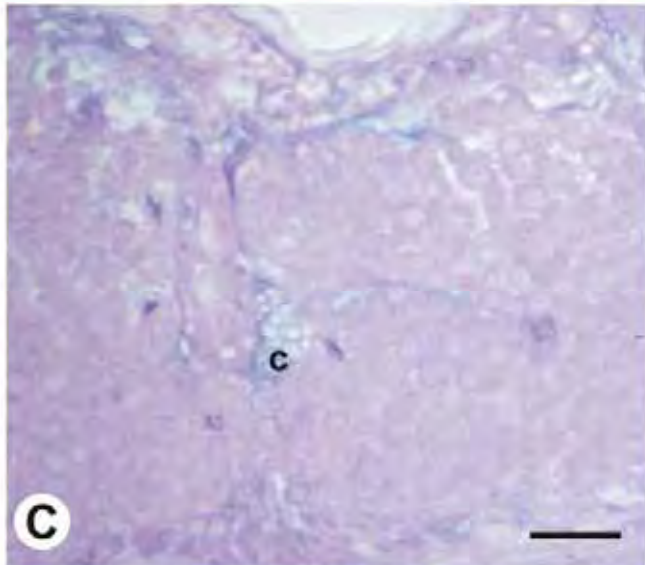
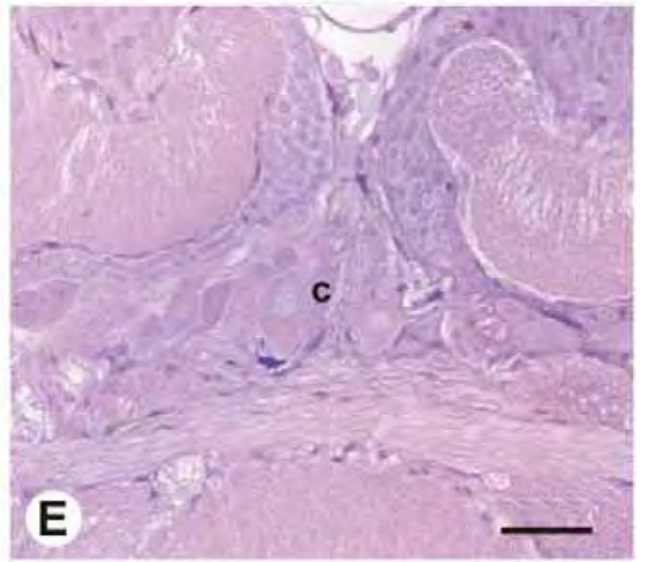
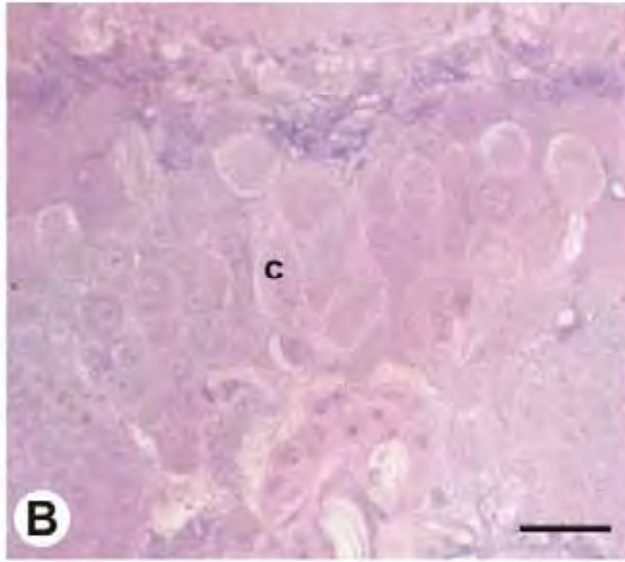
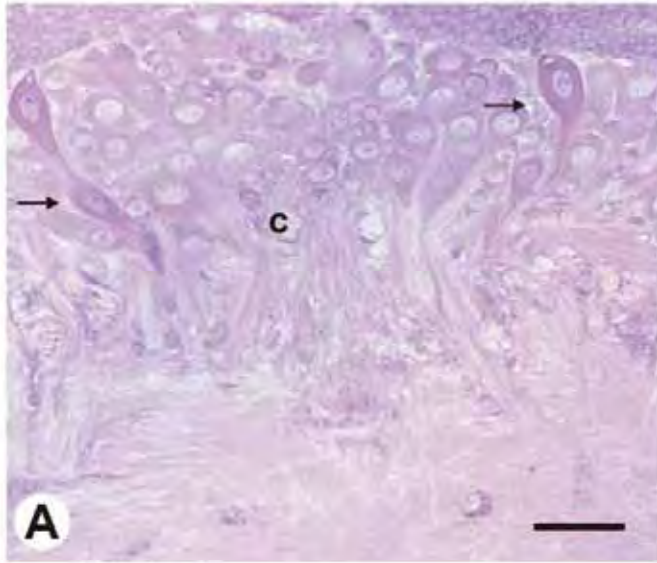


FIGURA 14: Fotomicrografias da parte intercerebral de indivíduos recém-emergidos *A. mellifera*. A = operária, B = rainha, C = macho. Notar que na rainha células maiores e nos machos células mais basófilas.

Barras: 400µm

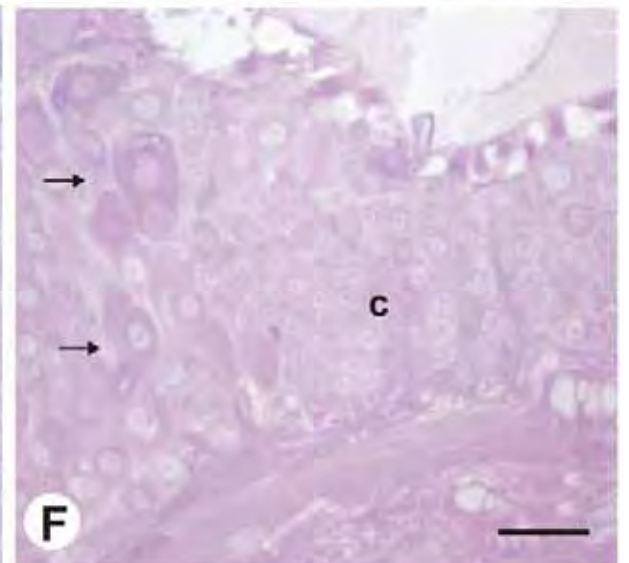
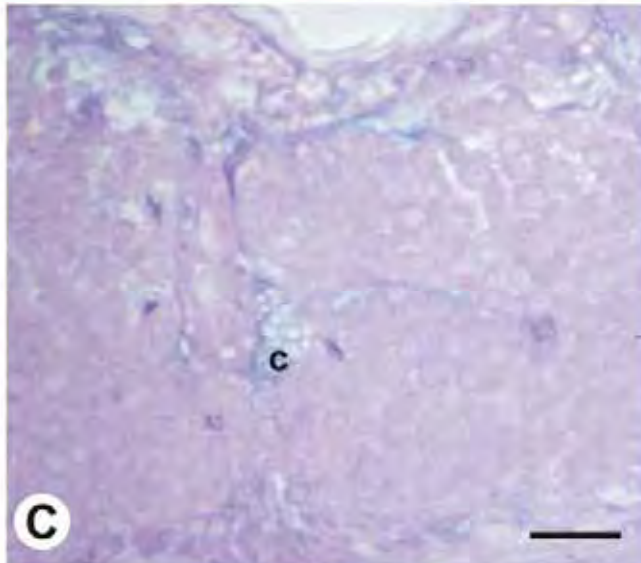
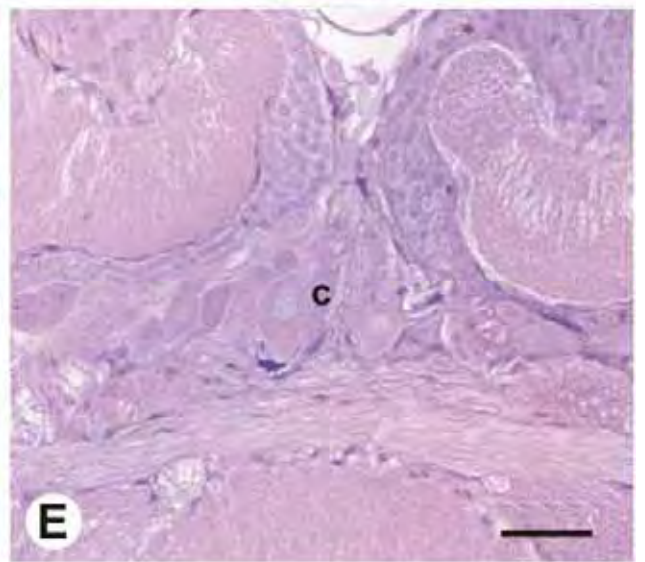
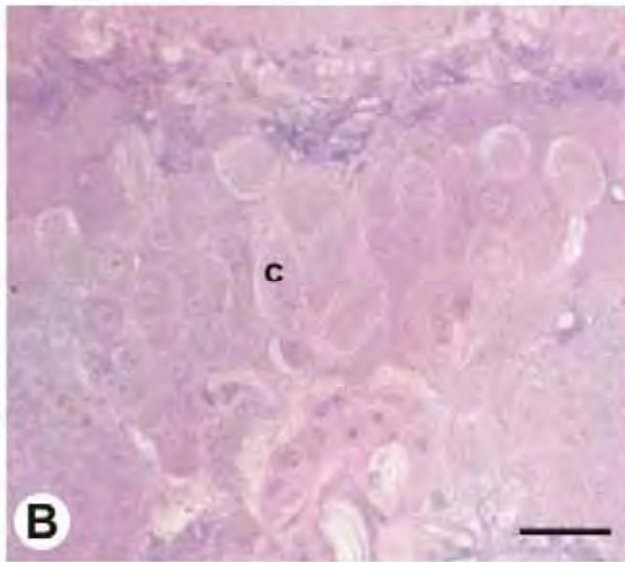
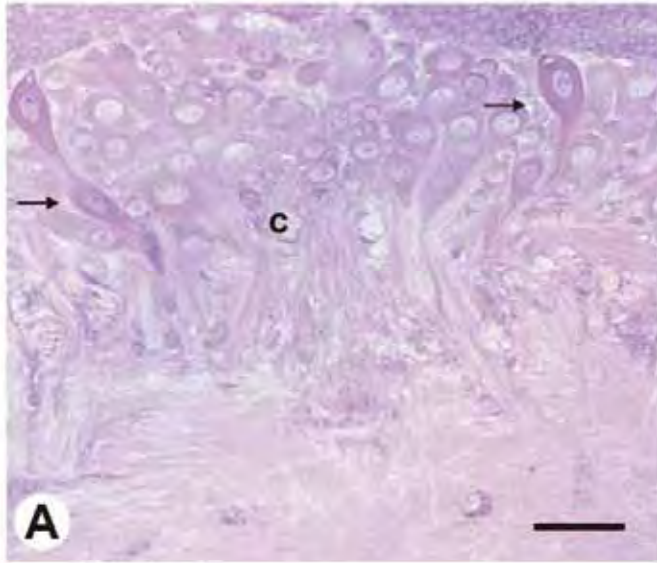


FIGURA 15: Fotomicrografias dos lobos ópticos em larvas de 5º instar de *A. mellifera*. A. Operárias, B. Rainhas e C. Zangões. Notar que larvas apresentam os primórdios desta estrutura, com a camada de neurônios designada lóbulo (lo) e o quiasma interno (qi). Em operárias, é possível observar a presença da medula (me). Algumas células em divisão (setas) parecem estar presentes.

Barras: 400µm; B e C: Barras: 600µm

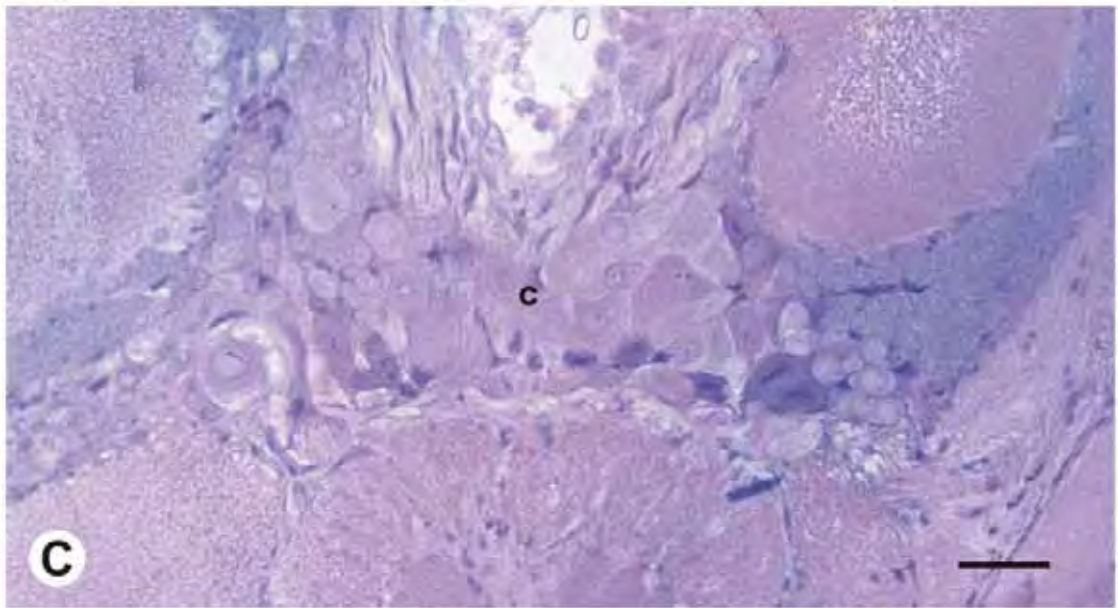
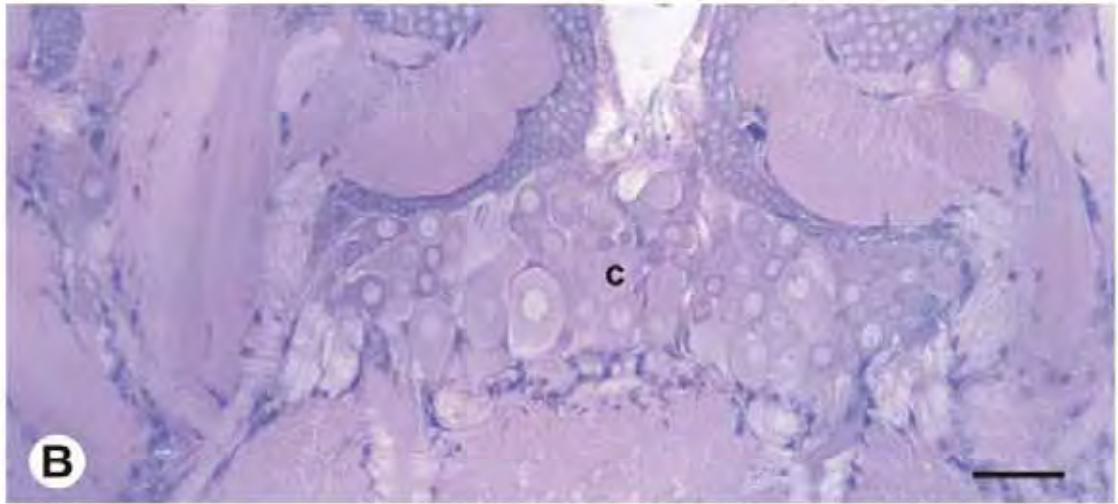
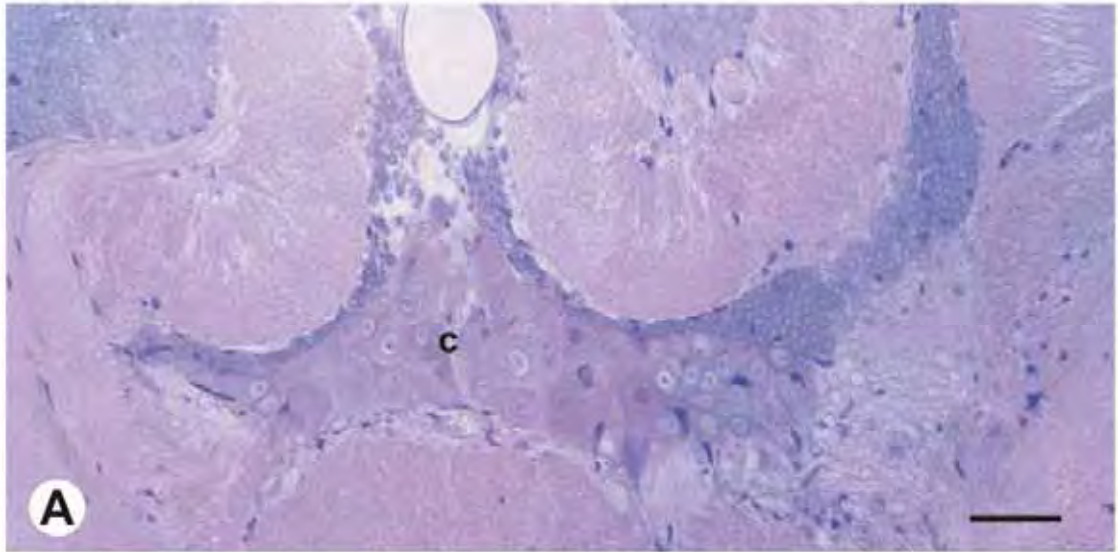


FIGURA 16: Fotomicrografias dos lobos ópticos de pupas de olhos branco de *A. mellifera*. A e B. Operárias, C e D. Rainhas e E e F. Zangões, mostrando grupos de células picnóticas (setas), provavelmente em processo de reabsorção. Notar maior avanço da diferenciação em macho e rainhas. Observar na operária (D) os neurônios da camada ganglionar formando colunas. lo= lóbulo; qi=quiasma interno; me=medula; la=lâmina.

Barras: B, D e F: 400 μ m; A: 600 μ m; C e E: 800 μ m

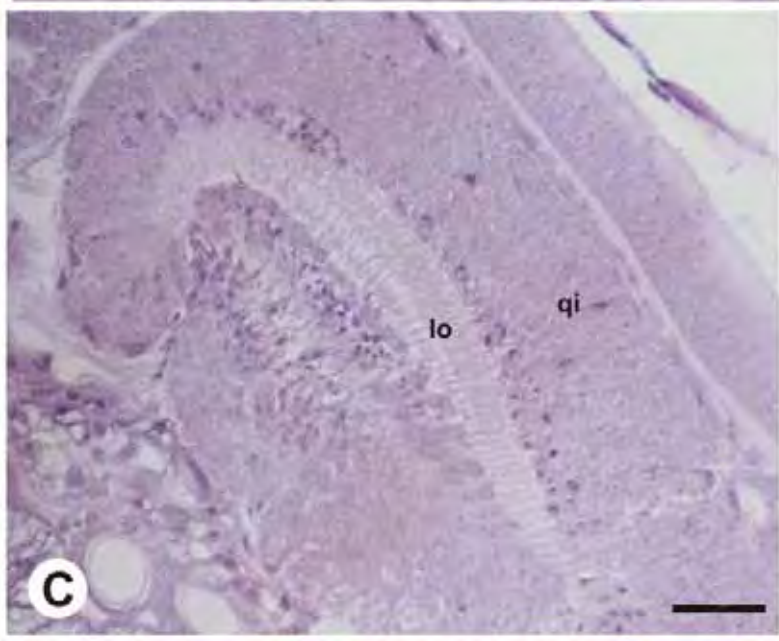
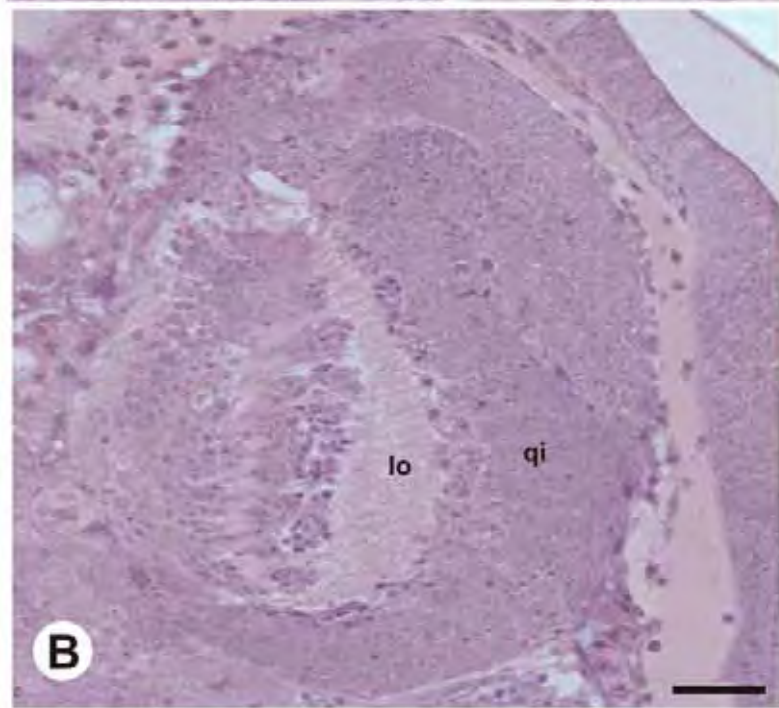
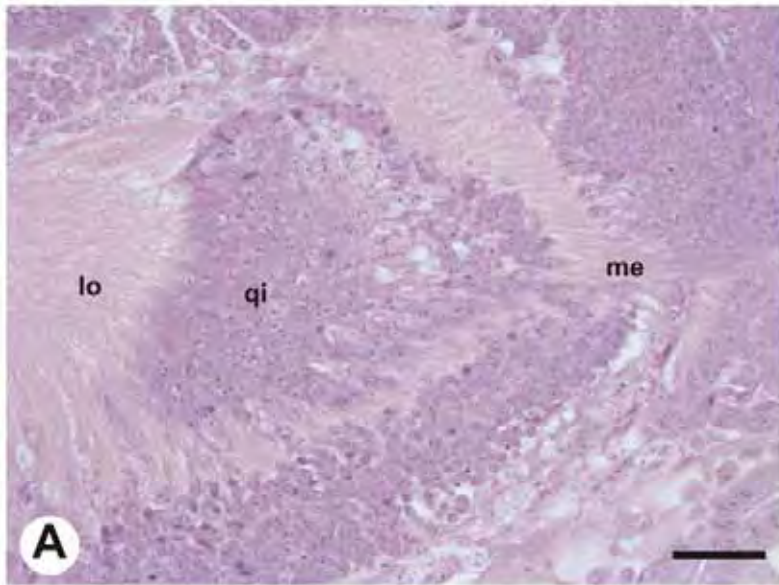


FIGURA 17: Fotomicrografias dos lobos ópticos de pupas de olhos rosa de *A. mellifera*. A e B. Operárias; C e D. Rainha; E e F. Macho. Notar morte celular (setas) nas bordas do lóbulo (lo) e medula (me), com maior incidência na rainha (C – detalhe D) e na operária (A – detalhe B) e pequena incidência no zangão (E – detalhe F). qi=quiasma interno; la=lâmina; qe=quiama externo.
Barras: B, D e F: 400 μ m; A e C: 600 μ m; E: 800 μ m

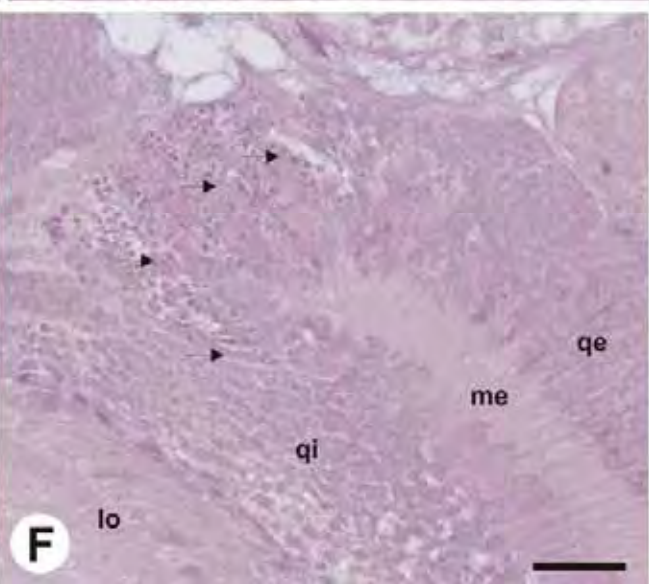
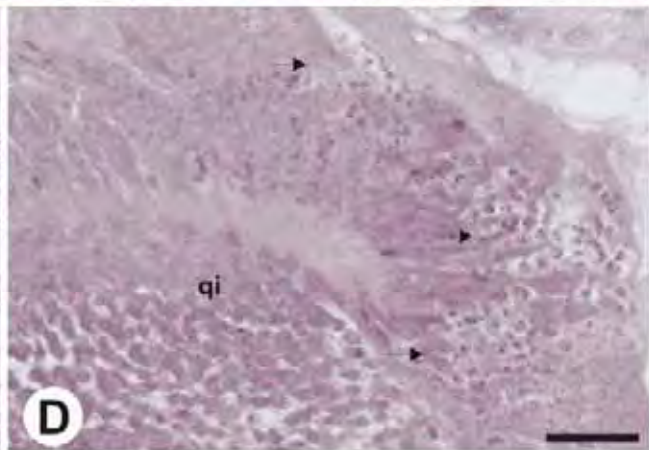
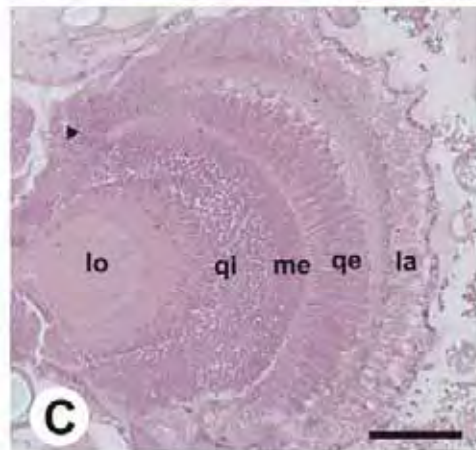
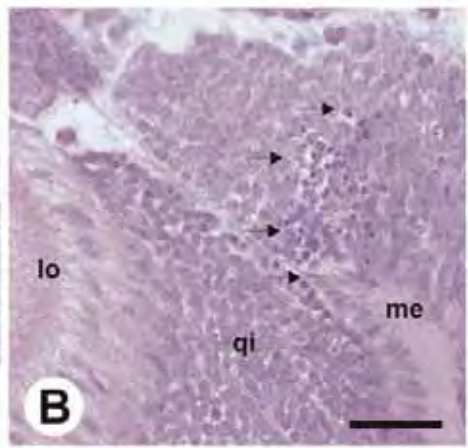
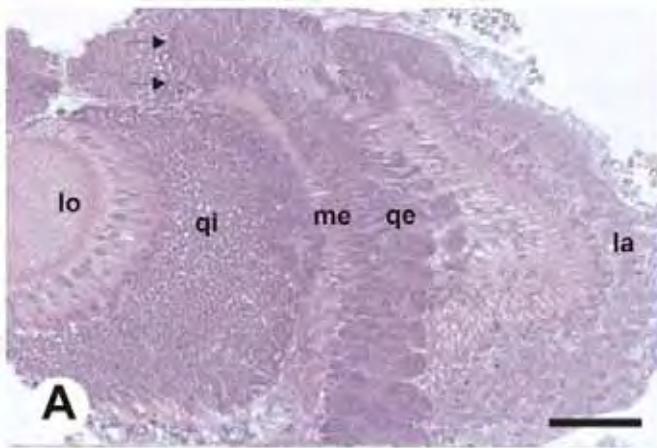


FIGURA 18: Fotomicrografias dos lobos ópticos de pupas de olhos rosa (A – C) e pupas de olhos preto (D – F) de *A. mellifera*. Observar a estrutura completamente formada. lo=lóbulo; qi=quiasma interno; me=medula; qe=quiama externo; la=lâmina.
Barras: A, B, C, D e E: 800 μ m; F: 600 μ m

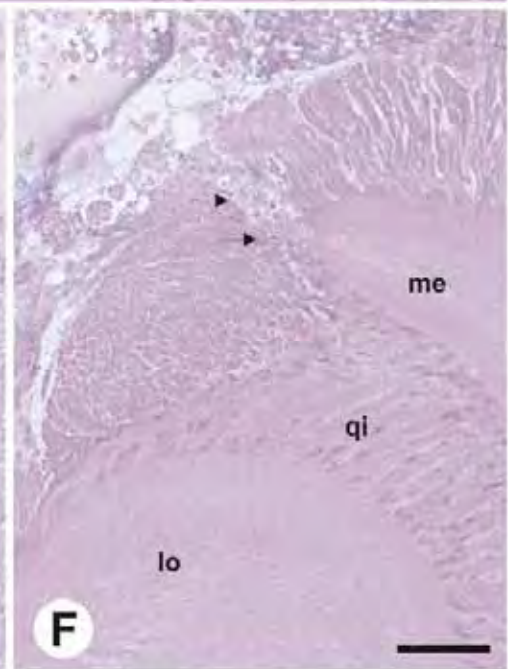
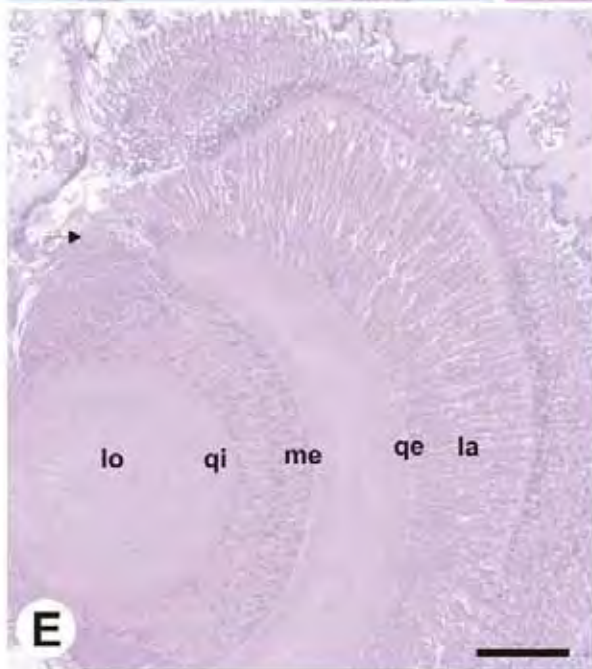
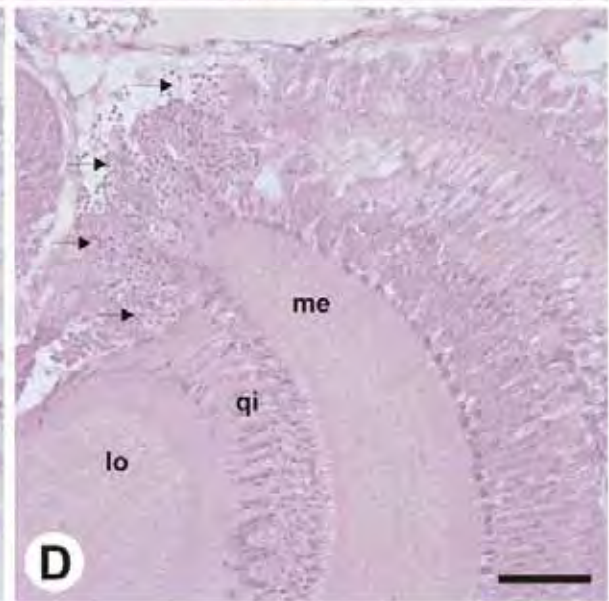
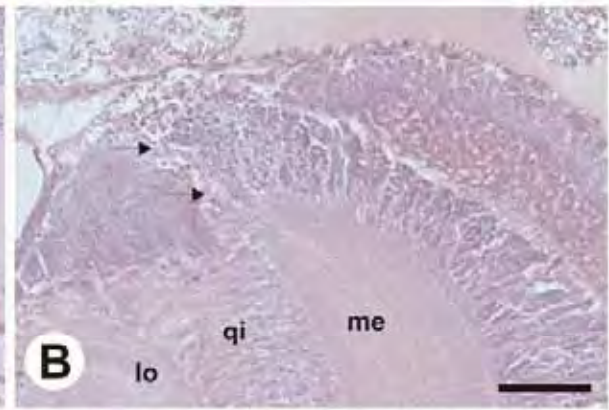


FIGURA 19: Início da formação dos lobos antenais na larva de 5º instar de *A. mellifera*. Observar área de neurópila (np) rodeada por neurônios (ne) em arranjo frouxo em operárias (A) e rainhas (B) e macho (C) com lobos antenais mais estruturados, com a neurópila rodeada por grande quantidade de neurônios. Notar que em operárias, a área que seria ocupada pela neurópila ainda contém células.

Barras: 400µm

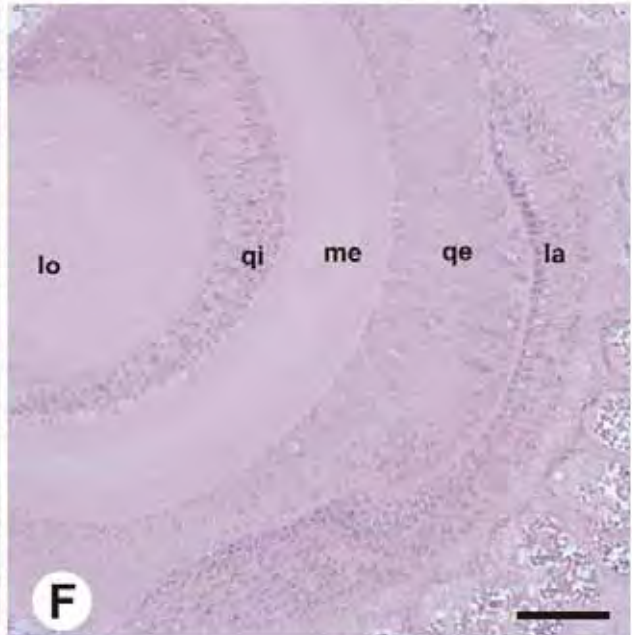
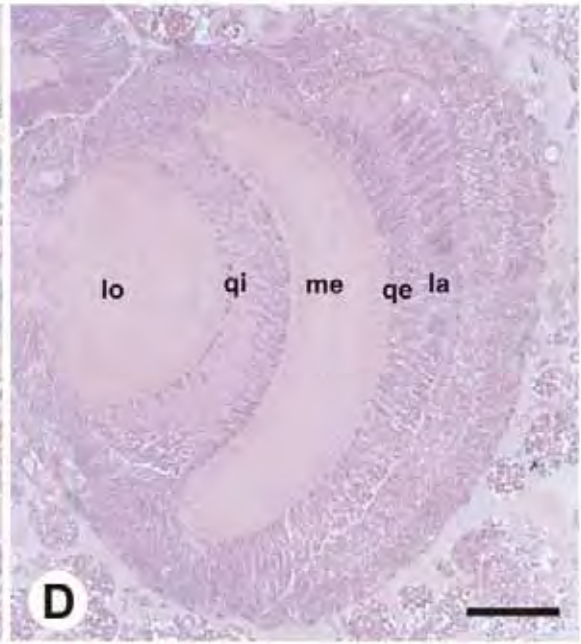
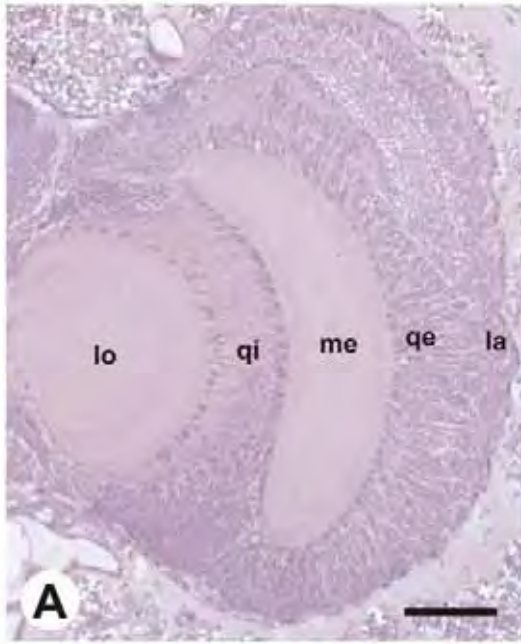


FIGURA 20: Formação da massa central de neurópila (np) rodeada por células neurogliais (cn) e com neurônios (ne) periféricos em arranjo frouxo, nas pupas de olhos branco de operária (A) e rainha (B). Notar nos machos (C) neurônios em arranjo mais denso.

Barras: 400 μ m

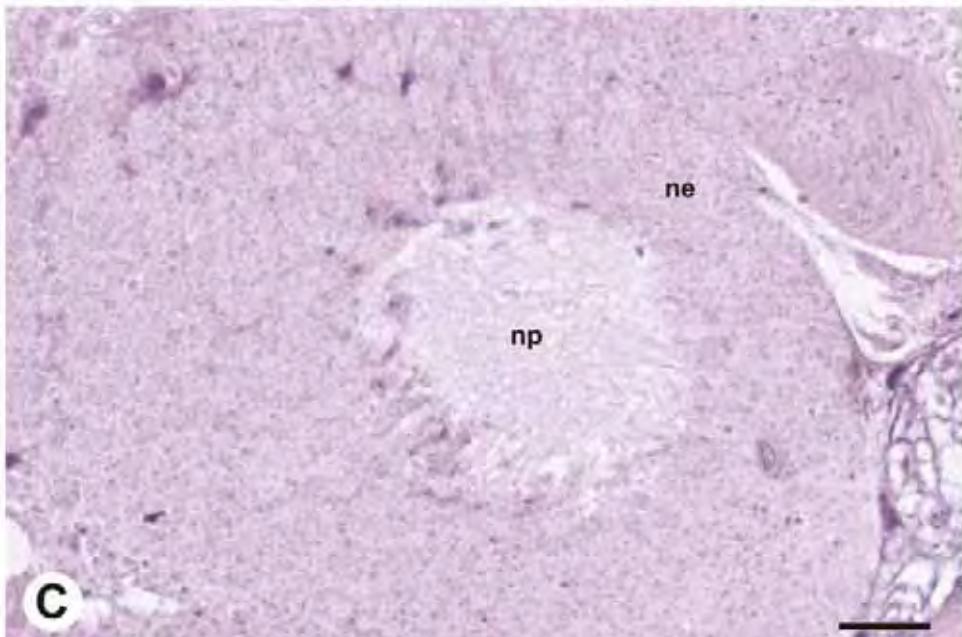
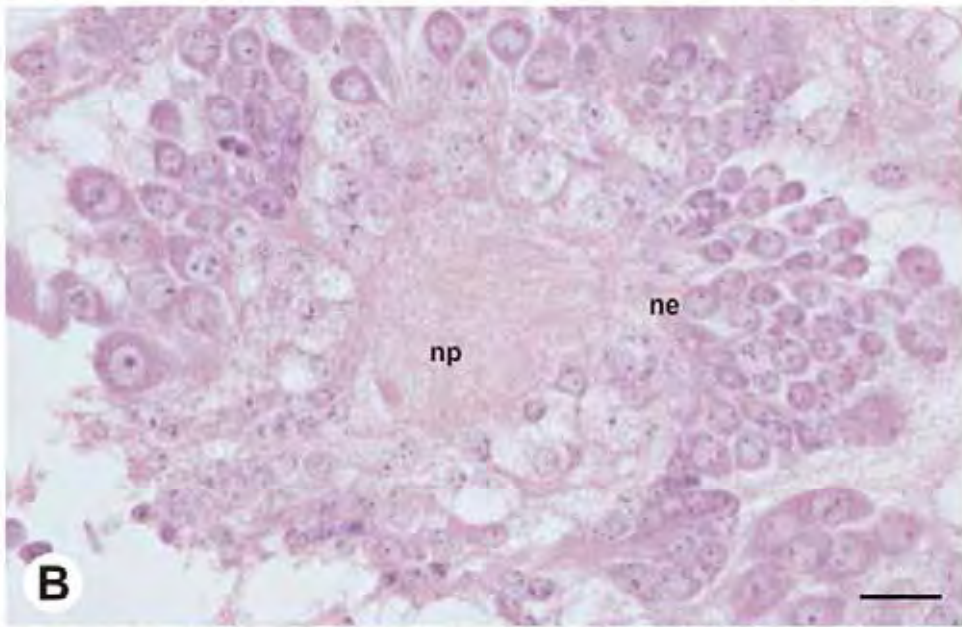
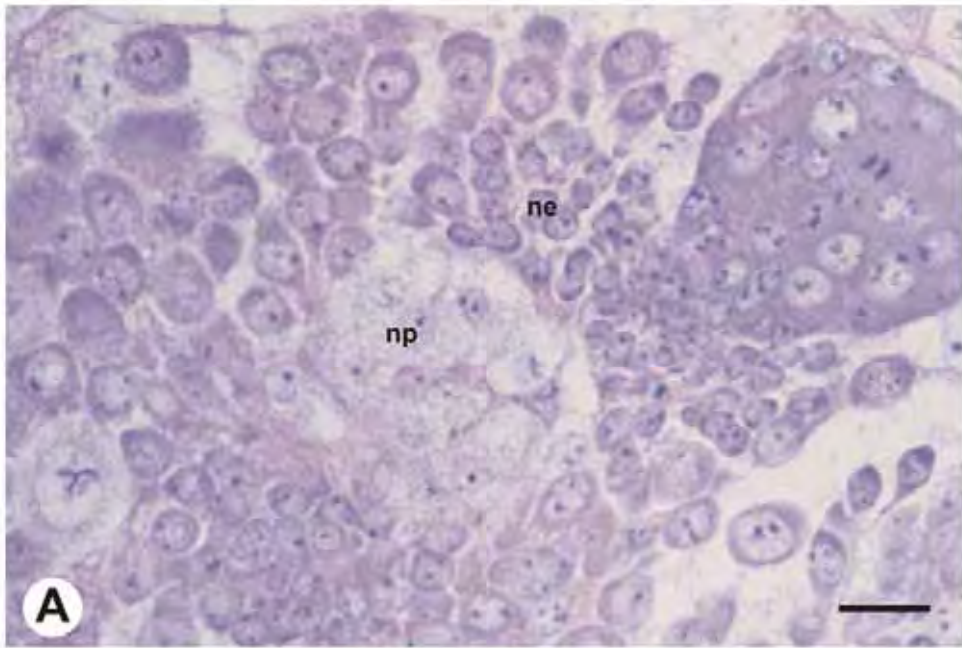


FIGURA 21: Início da formação dos glomérulos (g) na neurópila (np) dos lobos antenais (la) em machos de pupas de olhos rosa (C). Na operária (A) e rainha (B) essa diferenciação ainda não se iniciou. Há uma leve sugestão de sua formação (setas) na operária (A). Neurônios periféricos (ne) enviam prolongamentos (asterisco) para a neurólia (np).

Barras: 400µm

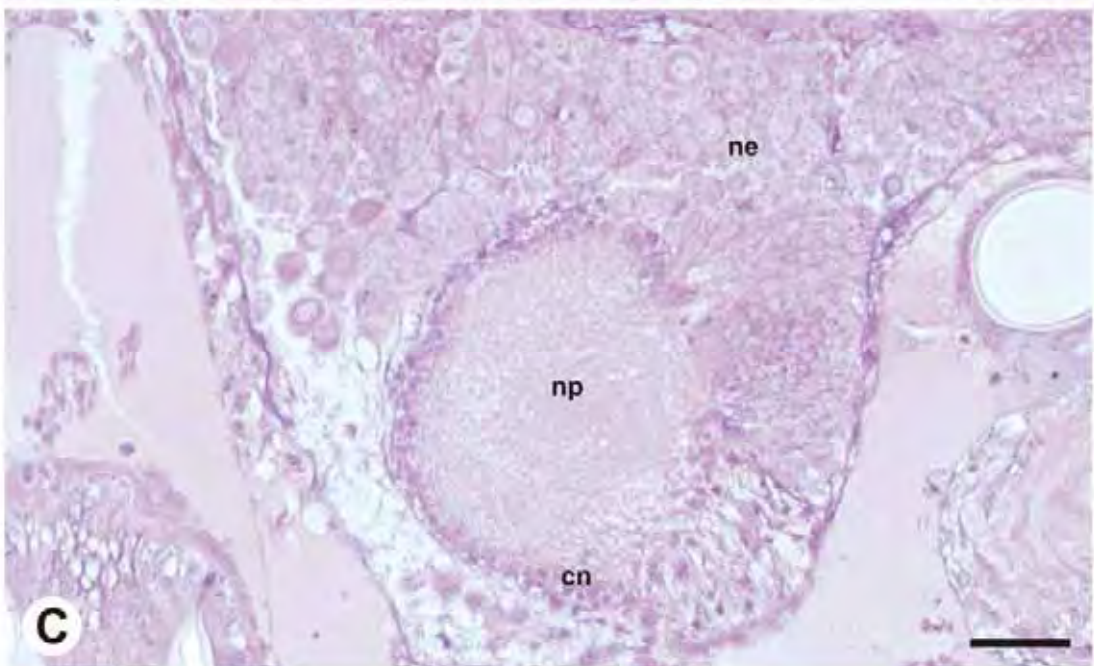
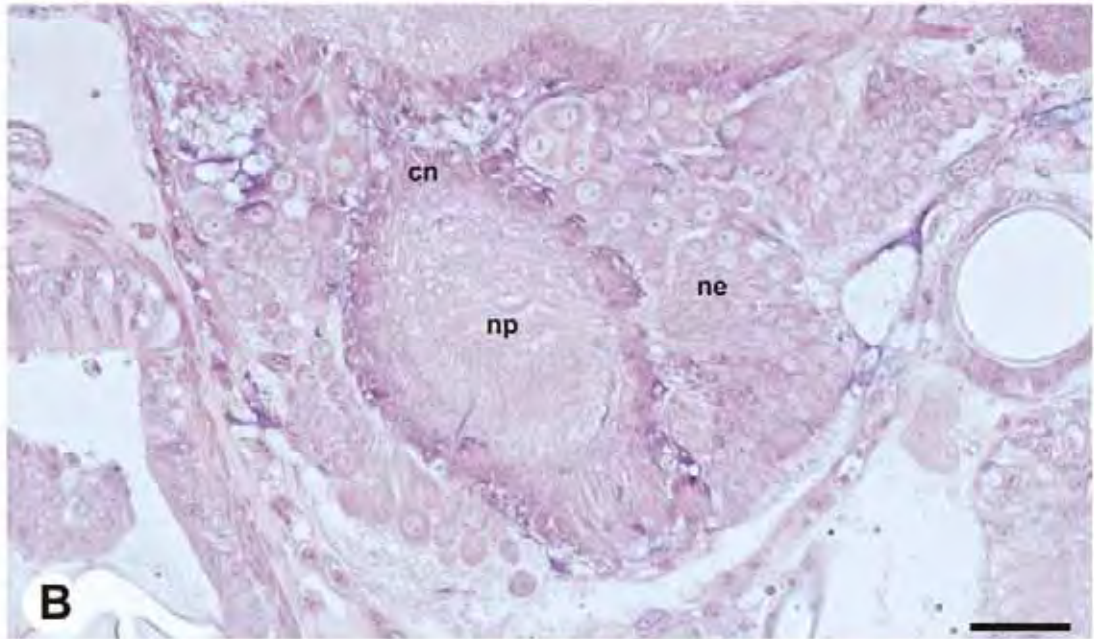
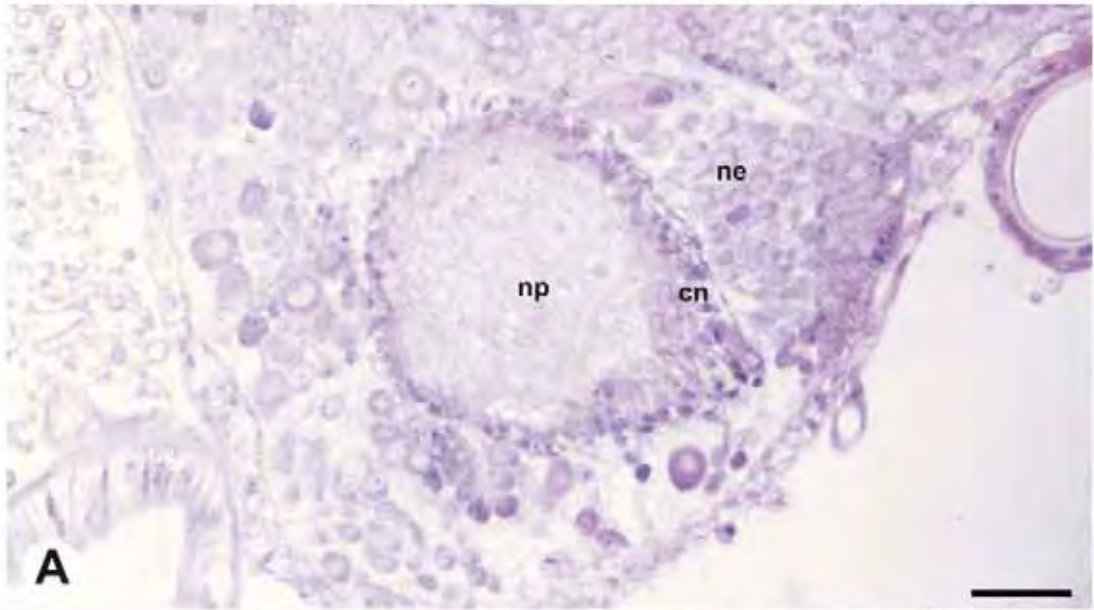


FIGURA 22: Na pupa de olhos marrom de operária (A) dos lobos antenais (la) partem grossos nervos (n) embora os glomérulos da neurópila (np) ainda não estejam definidos. No macho (C) a definição dos glomérulos (g) está quase completa e vê-se que estes aumentam em direção à região dorsal. A operária (A) é que apresenta a diferenciação mais atrasada, sendo que rainhas apresentam o início da formação dos glomérulos (seta)

Barras: A: 600 μ m; B e C: 400 μ m

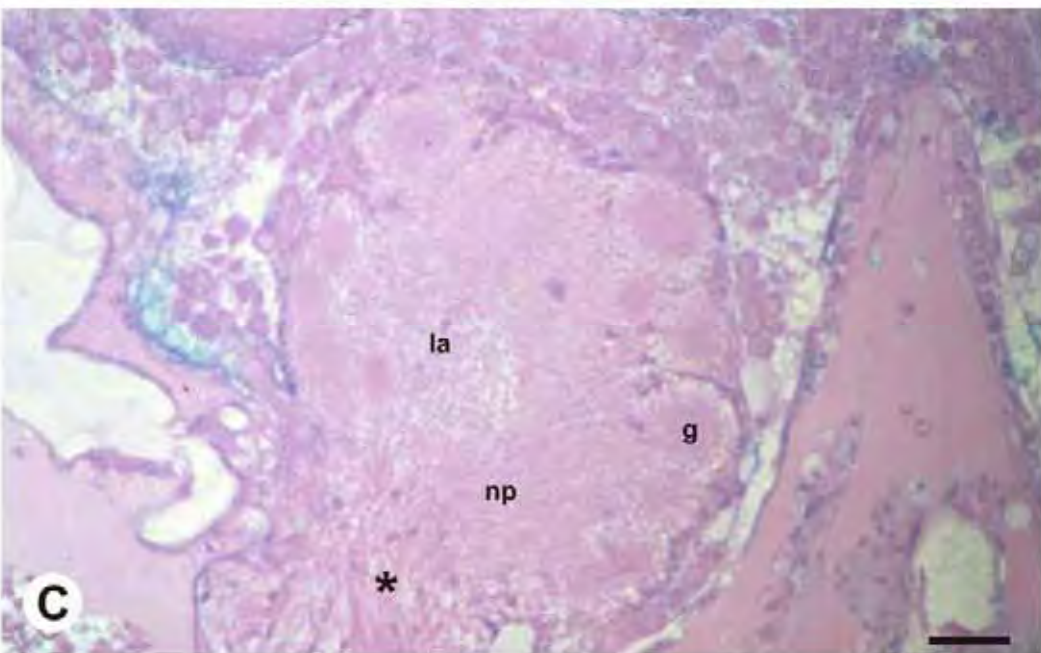
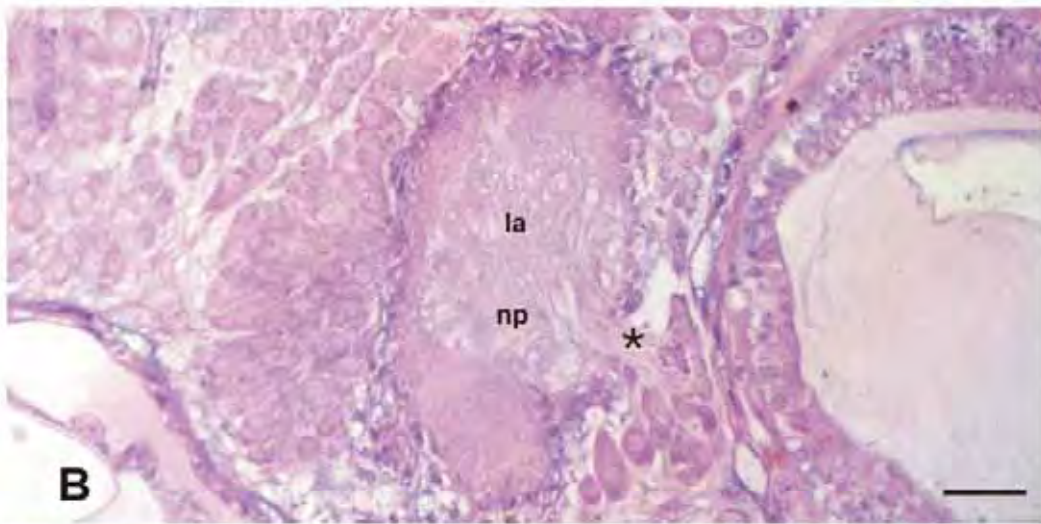
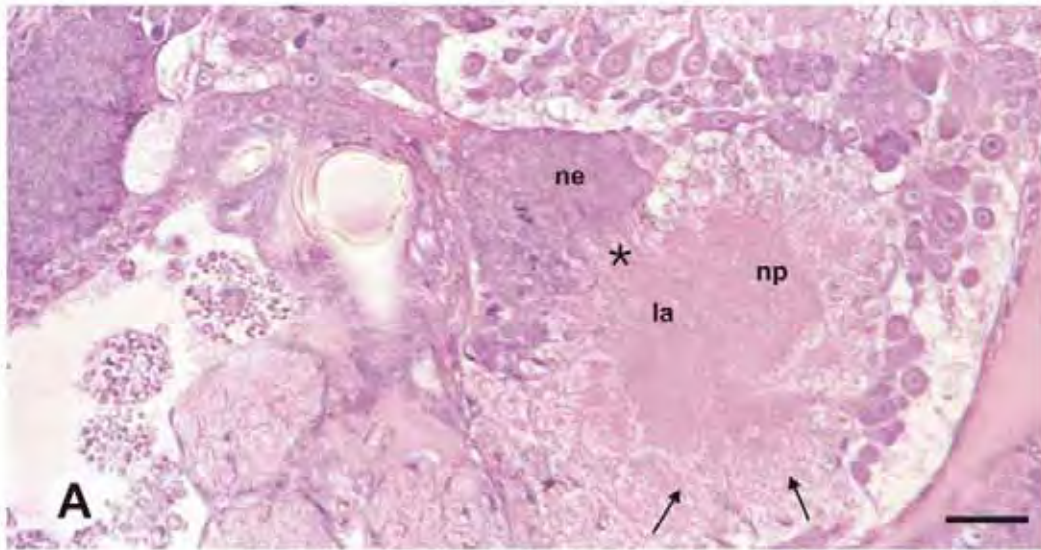


FIGURA 23: Lobos antenais de pupas de olhos preto (A – C), pupas de corpo escurecido(D – F) e indivíduos recém-emergidos (G – I). Em pupas de olhos preto, os glomérulos (g) estão presentes na neurópila de operária (A), rainha (B) e macho (C). Notar que operária (D), rainha (E) e macho (F) de pupas de corpos escurecido apresentam lobos antenais (la) com morfologia semelhante à do adulto. Em recém-emergidos, notar glomérulos (g) menos distintos nas rainhas (H) e nos machos (I) que nas operárias (G).

Barras: 400µm

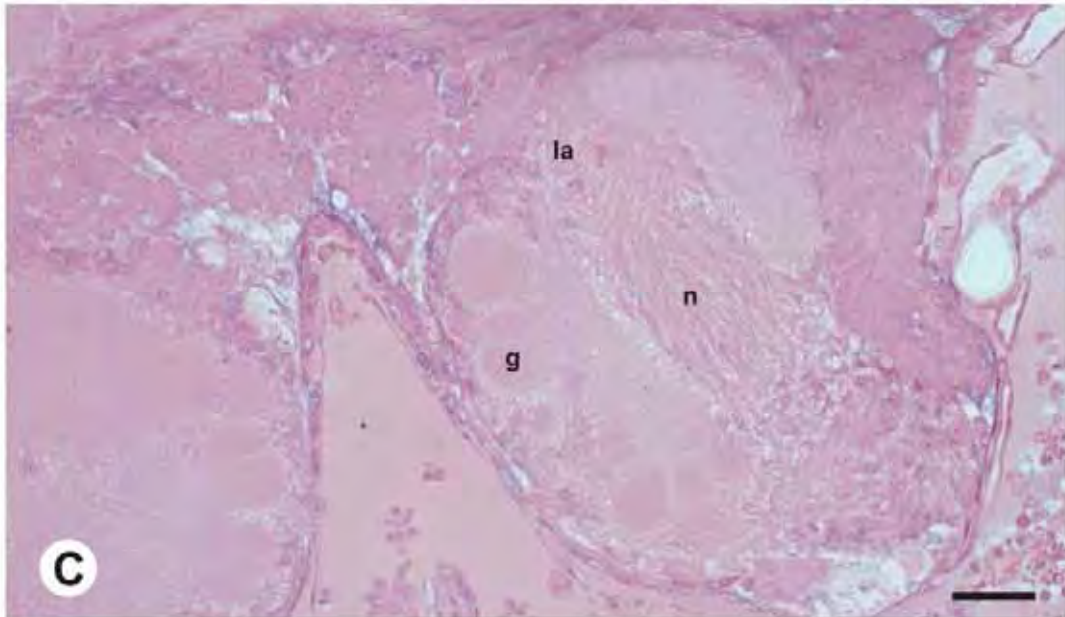
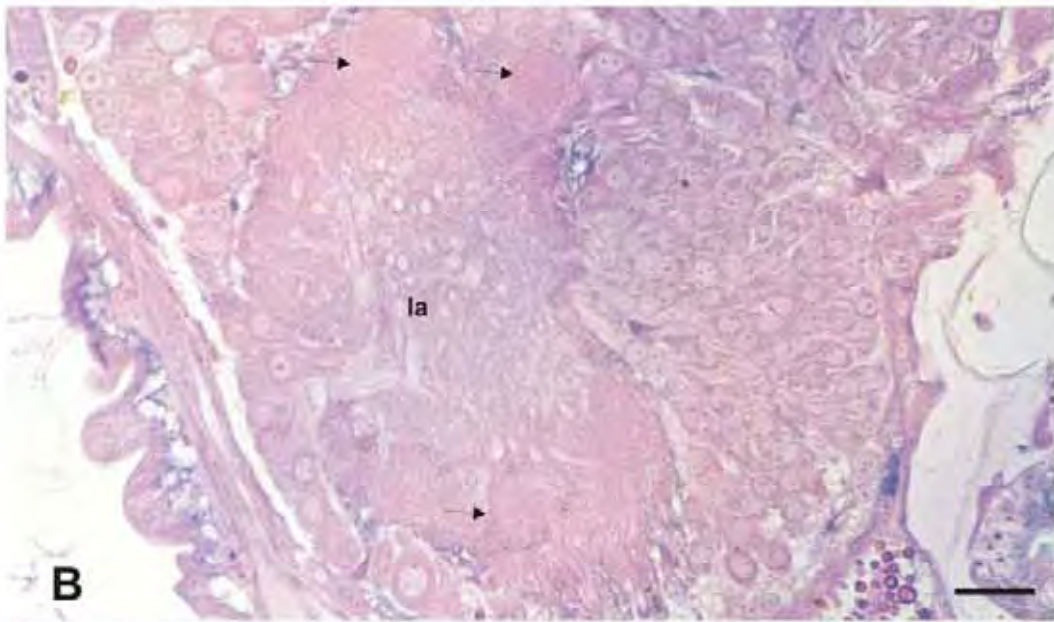
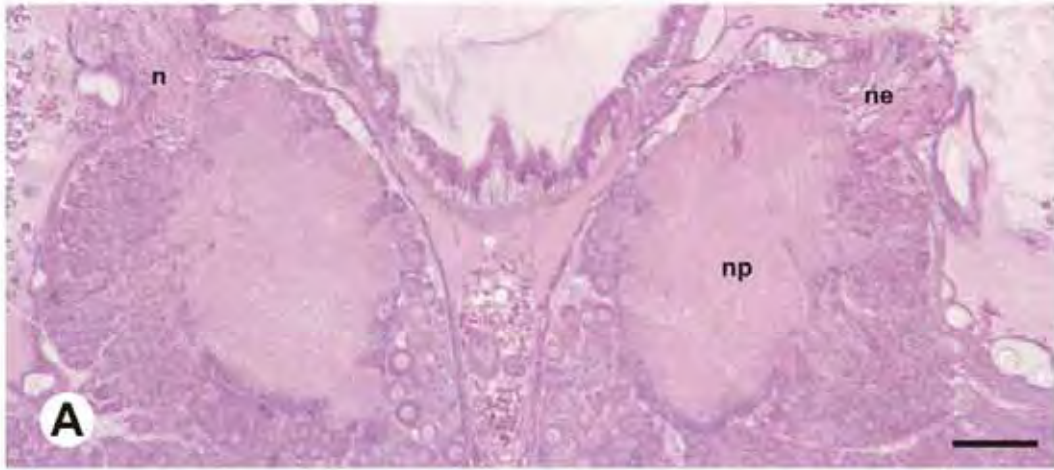
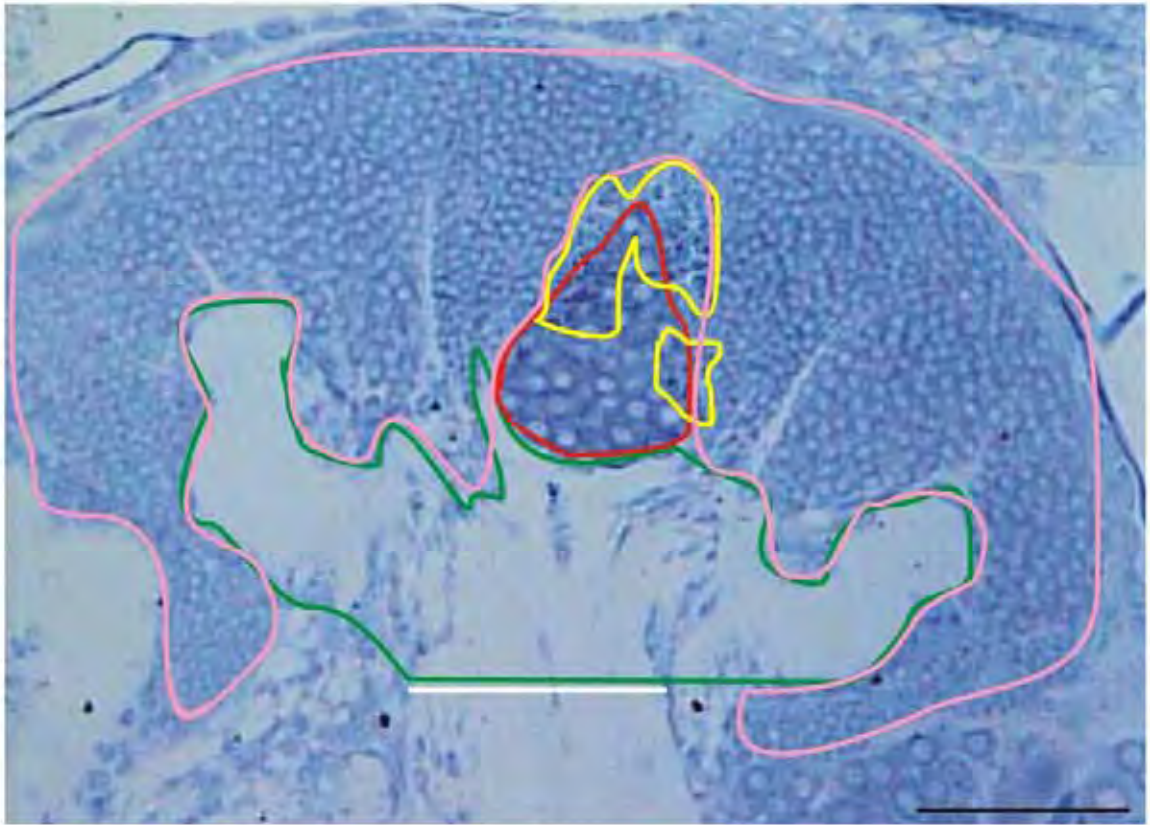


FIGURA 24: Fotomicrografia mostrando visão geral dos corpos pedunculados de pupas de olhos preto de rainhas de *A. mellifera*, coradas com azul de toluidina, para exemplificar as regiões utilizadas para análises morfométricas. Em vermelho: área dos neuroblastos; em rosa: área das células de Kenyon; em verde: área do cálice; em amarelo: área de morte celular e em branco: largura do pedúnculo.

Barra: 200 μ m



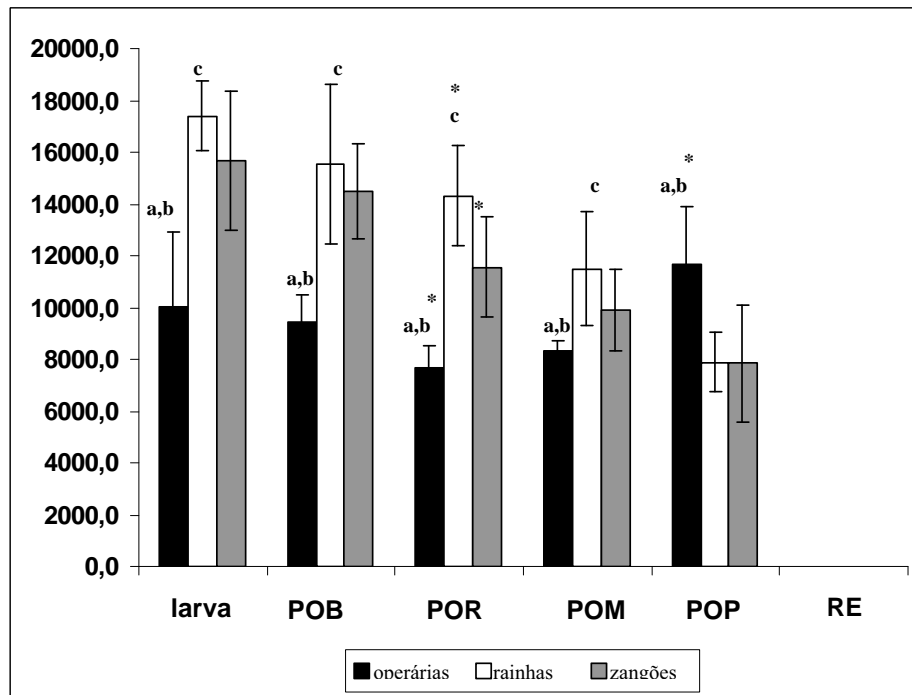


FIGURA 25: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão dos neuroblastos medidas em cortes medianos frontais dos corpos pedunculados, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

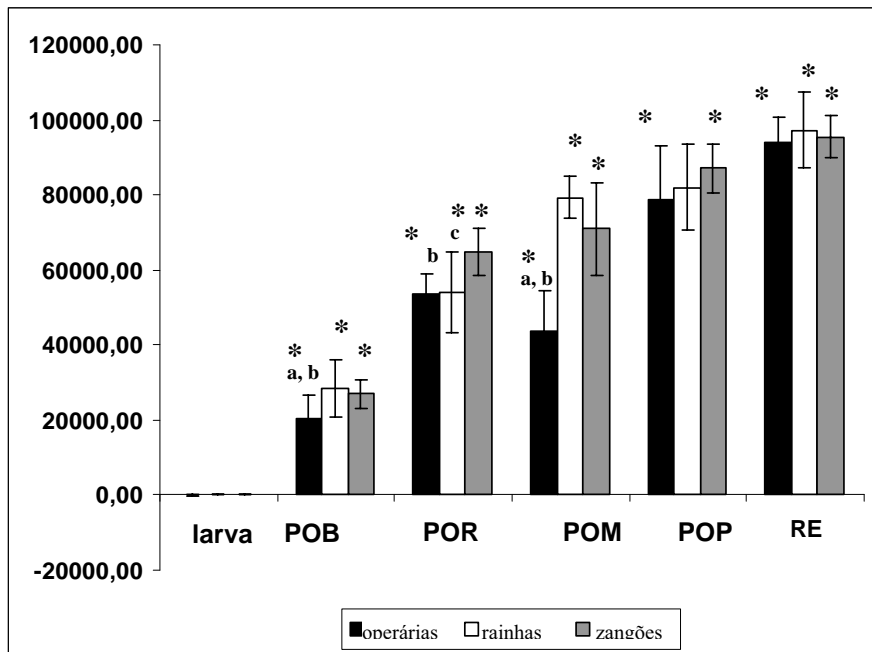


FIGURA 26: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão das células de Kenyon medidas em cortes medianos frontais dos corpos pedunculados, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

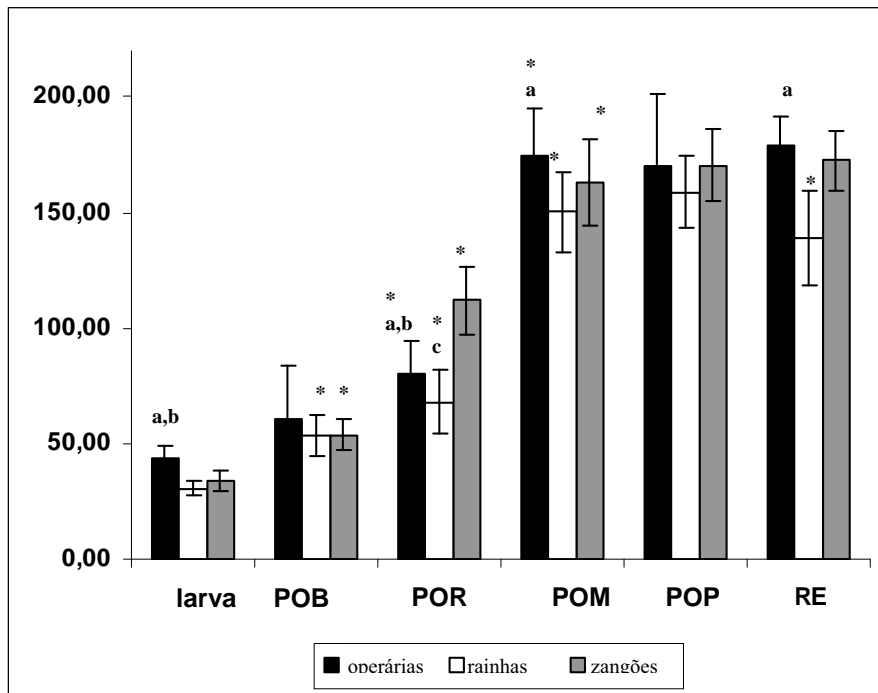


FIGURA 27: Largura média (μm) e respectivos desvios padrão do pedúnculo, medida em cortes medianos frontais dos corpos pedunculados de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

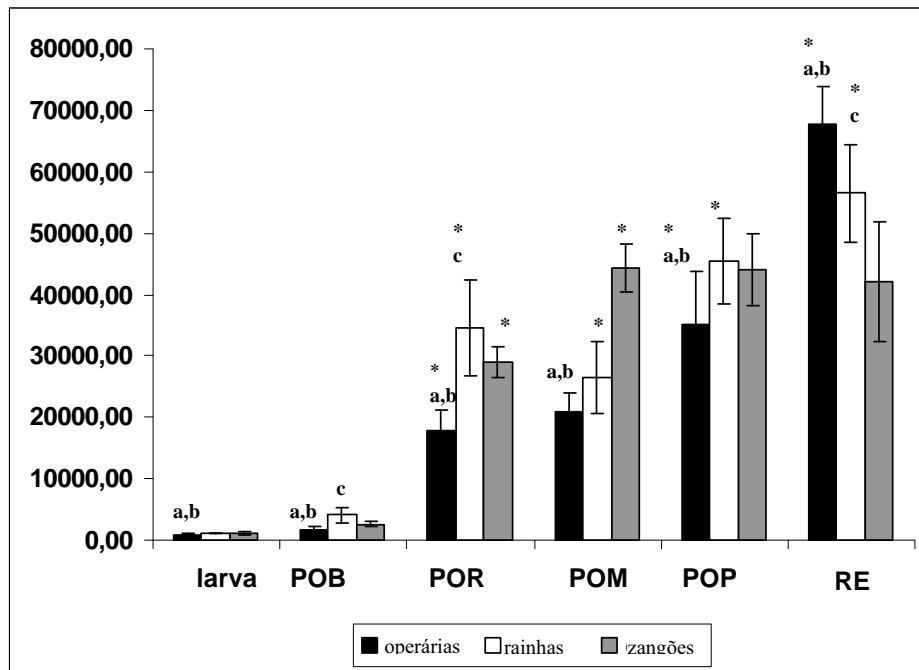


FIGURA 28: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão do cálice, medido em cortes medianos frontais dos corpos pedunculados, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

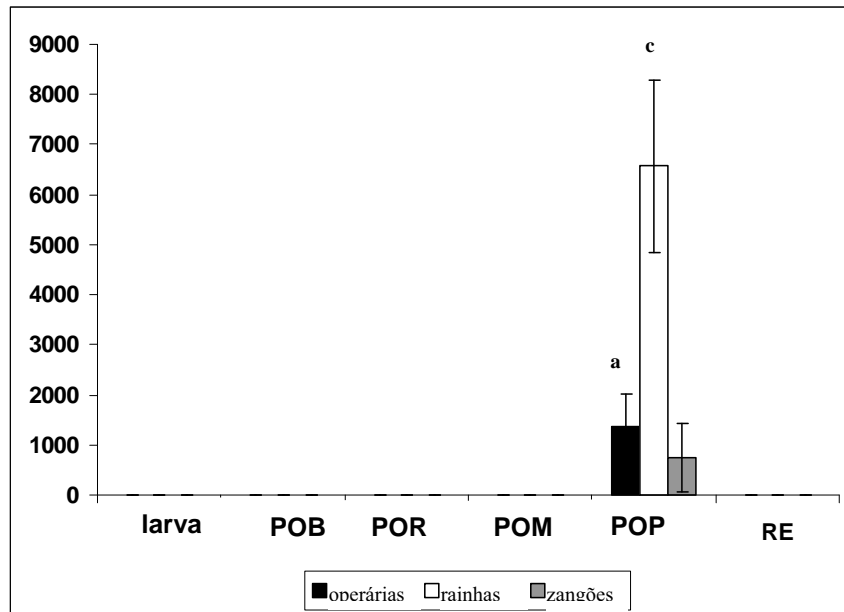


FIGURA 29: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão das células em processo de morte celular, medidas em cortes medianos frontais dos corpos pedunculados, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões.

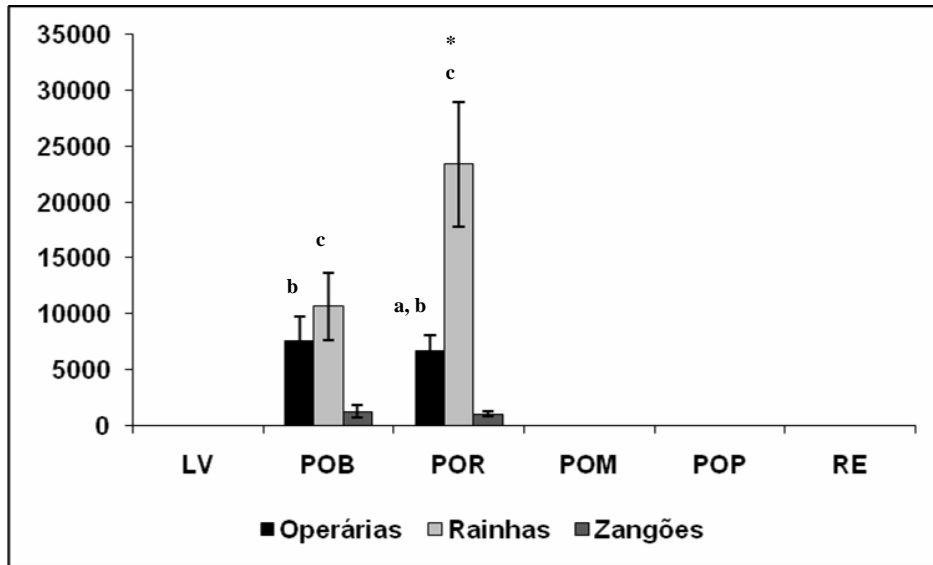


FIGURA 30: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão das células em processo de morte celular, medidas em cortes medianos frontais dos lobos ópticos, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Teste de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Teste de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

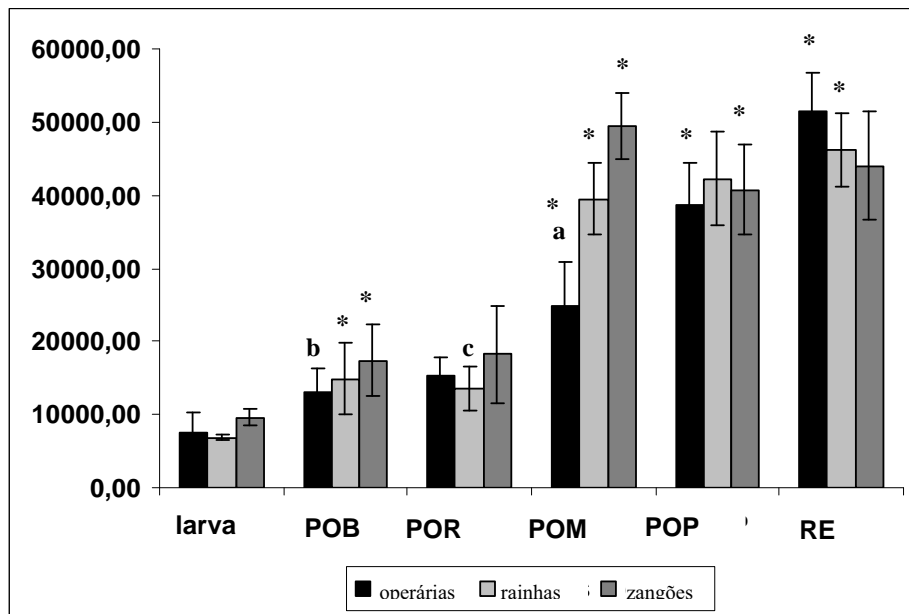


FIGURA 31: Área média (μm^2) e respectivos desvios padrão da neurópila dos lobos antenais, medida em cortes medianos frontais do cérebro, de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. Letras diferentes indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) entre: a. operárias e rainhas; b. operárias e zangões; c. rainhas e zangões. Asteriscos indicam diferença significativa com $p \leq 0,5$ (Test de Tukey) na mesma casta e sexo em comparação com a fase anterior.

FIGURA 32: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de operárias de *Apis mellifera* submetidas a variante da CEC da coloração com azul de toluidina.

A. Visão geral do cérebro de pré-pupas, mostrando o início da formação das estruturas cerebrais. Notar no protocérebro (pr) os corpos pedunculados (cp), as células neurosecretoras (cn) e os lobos ópticos (lo), que apresentam apenas as camadas: lóbulo (lb) e medula (me) intercaladas pelo quiasma interno (qi) e externo (qe) e que os lobos antenais estão ausentes neste corte. Em **(B)**, está um detalhe dos corpos pedunculados, que estão completamente preenchidos por neuroblastos (n) e, ao redor deles algumas células de Kenyon do sub-tipo não compactas (nc) estão presentes. Observar início da formação do pedúculo (P) e do cálice (ca). **C.** Visão geral do cérebro em pupa de corpo escurecido, fase em que todas as estruturas cerebrais estão completamente diferenciadas. Notar a presença dos lobos antenais (la), com glomérulos (g), no deutocérebro (de) e, no protocérebro (pr) as células neurosecretoras (cn) e os corpos pedunculados (cp). Em **(D)**, detalhe dos corpos pedunculados, onde é possível observar as regiões do cálice: base (ba), colar (co) e borda (bo), e as três populações de células de Kenyon: compactas externas (ce), não compactas (nc) e compactas internas (ci). Em **(E)** região de morte celular nos corpos pedunculados de pupa de olhos preto de rainhas. Observar que as células em processo de morte (setas) se localizam na região de transição entre os neuroblastos (n) e as células de Kenyon já diferenciadas em não compactas (cn). O lobo óptico (lo), que também faz parte do protocérebro está representado em **(E)**, sendo possível observar a presença de todas as camadas celulares e de neurópila: lóbulo (lb), medula (me), lâmina (la), quiasma interno (qi), quiasma externo e retímulas (re). Observar as regiões de neurópila sem coloração.

Barras: 100µm

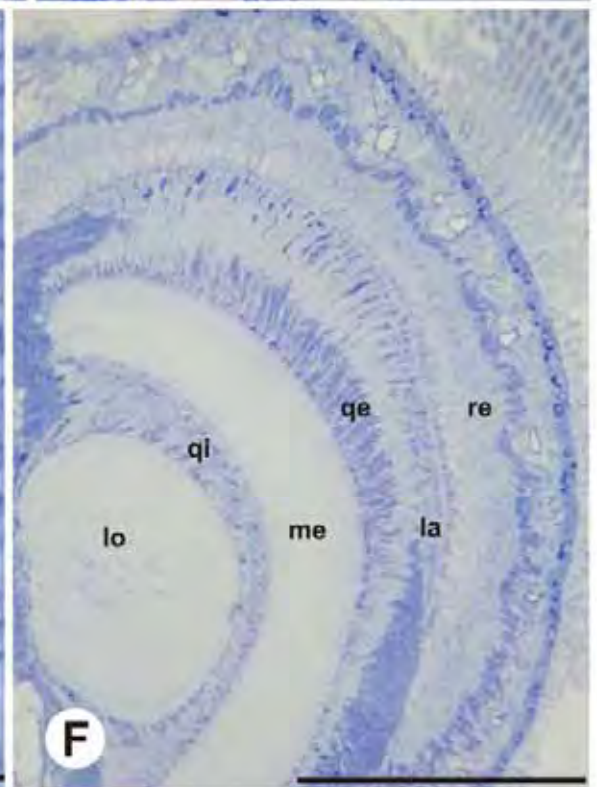
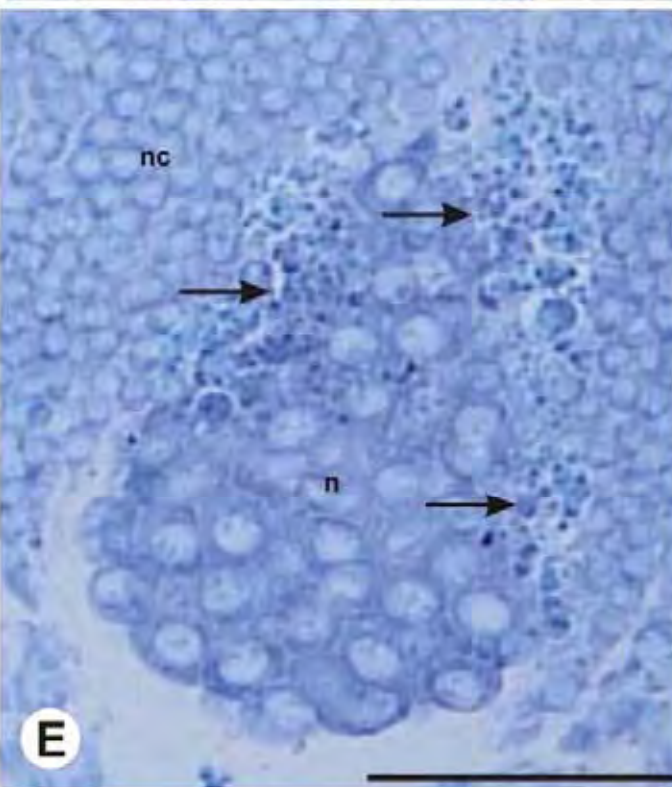
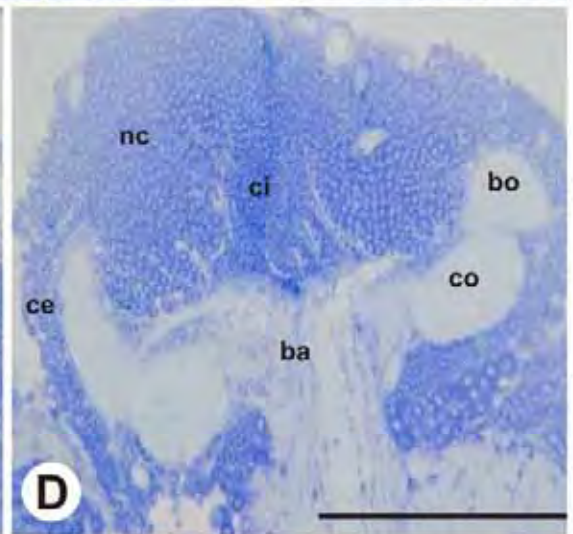
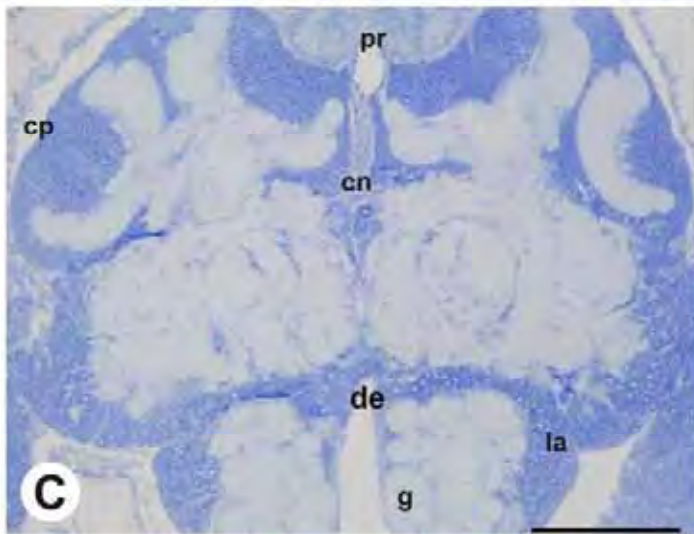
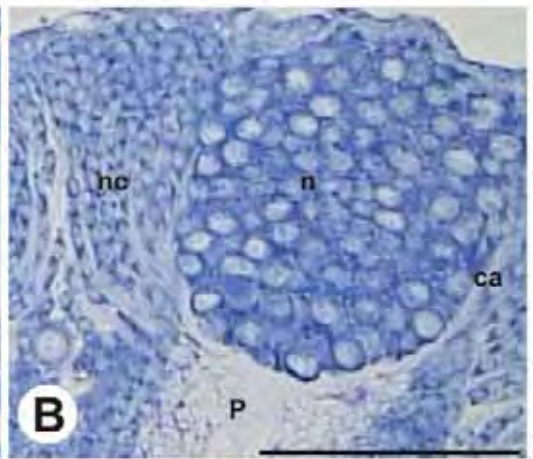
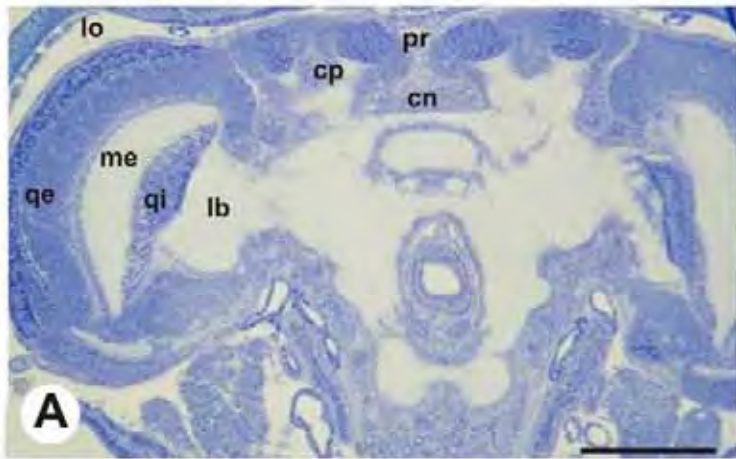


FIGURA 33: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de larvas de 5º instar e pré-pupas de *Apis mellifera* submetidas a variante da CEC da coloração com azul de toluidina.

A a C. Corpos pedunculados de larvas de 5º instar de operárias, rainhas e zangões respectivamente, mostrando manutenção de metacromasia citoplasmática e completa perda de coloração nos núcleos (n), possibilitando fácil visualização dos nucléolos (seta clara). Observar em operárias (**A**) a presença de apenas um ponto metacromático (seta escura), indicando a presença de núcleo condensado, enquanto que em rainhas (**B**) há algumas células com núcleos condensados (setas escuras) e células com núcleos pequenos e projeções metacromáticas, indicando formação de corpos apoptóticos (ap). Em machos (**C**) presença de alguns pontos metacromáticos, provavelmente representando núcleos picnóticos.

D e E. Lobos ópticos de larvas de 5º instar de operárias e rainhas. Em operárias (**D**) notar a presença de diversos pontos metacromáticos (setas) por toda estrutura, indicando núcleos condensados. Nos lobos ópticos de rainhas (**E**) é possível observar a fragmentação de uma célula, com formação de diversos corpos apoptóticos (seta).

F e G. Corpos pedunculados de pré-pupas de operárias e rainhas. Em operárias (**F**) não há núcleos condensadas e, em rainhas (**G**) células em metáfase (seta). N=neurobastos, cK=células de Kenyon.

Barras: 200µm

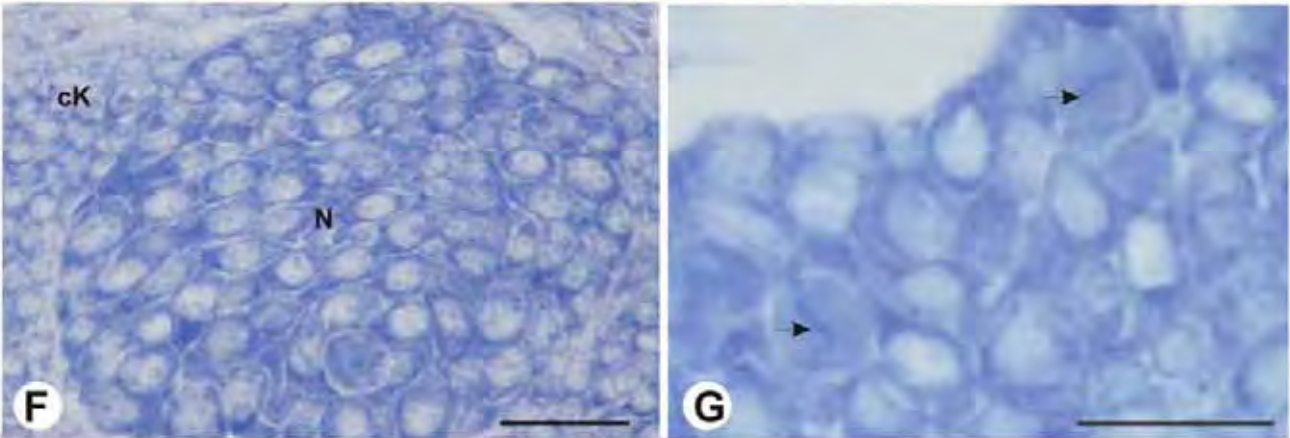
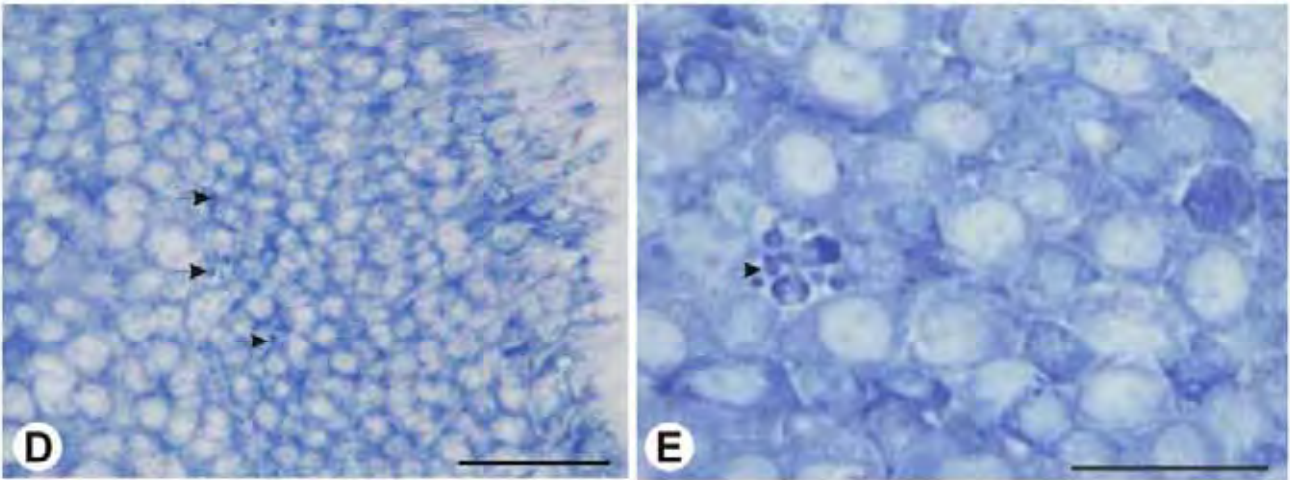
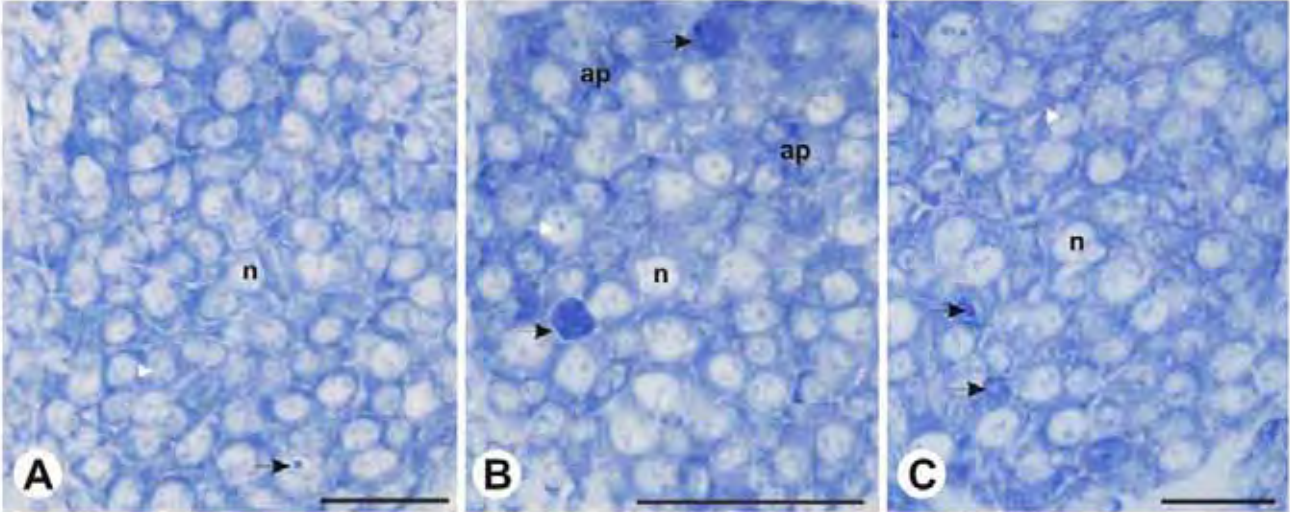


FIGURA 34: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de pupas de olhos brancos e pupas de olhos rosa de *Apis mellifera* submetidas a variante da CEC da coloração com azul de toluidina.

A a C. Corpos pedunculados de pupas de olhos branco de operárias (**A**), rainhas (**B**) e zangões (**C**), mostrando neuroblastos com citoplasma metacromático e núcleos (n) com perda de coloração e ausência de nucléolos. Notar a presença de células de Kenyon (ck) ao redor dos neuroblastos (N).

D a F. Corpos pedunculados de pupas de olhos rosa de operárias (**G**), rainhas (**H**) e zangões (**I**), mostrando as mesmas características apresentadas por pupas de olhos brancos, com aumento na quantidade de células de Kenyon (cK) ao redor dos neuroblastos (N) e ausência de células em morte.

G a I. Lobos ópticos de pupas de olhos branco, mostrando que em operárias (**D**) somente alguns núcleos condensados (setas) estão presentes nesta estrutura enquanto que, em rainhas (**E**) diversos pontos metacromáticos podem ser observados (setas), indicando extensa morte celular. Em zangões (**F**) não há presença de células condensadas nos lobos ópticos.

J a L. Lobos ópticos de pupas de olhos rosa de operárias (**J**), rainhas (**K**) e zangões (**L**). Notar que somente em rainhas ocorrem células com núcleos condensados (setas).

Barras: 200µm

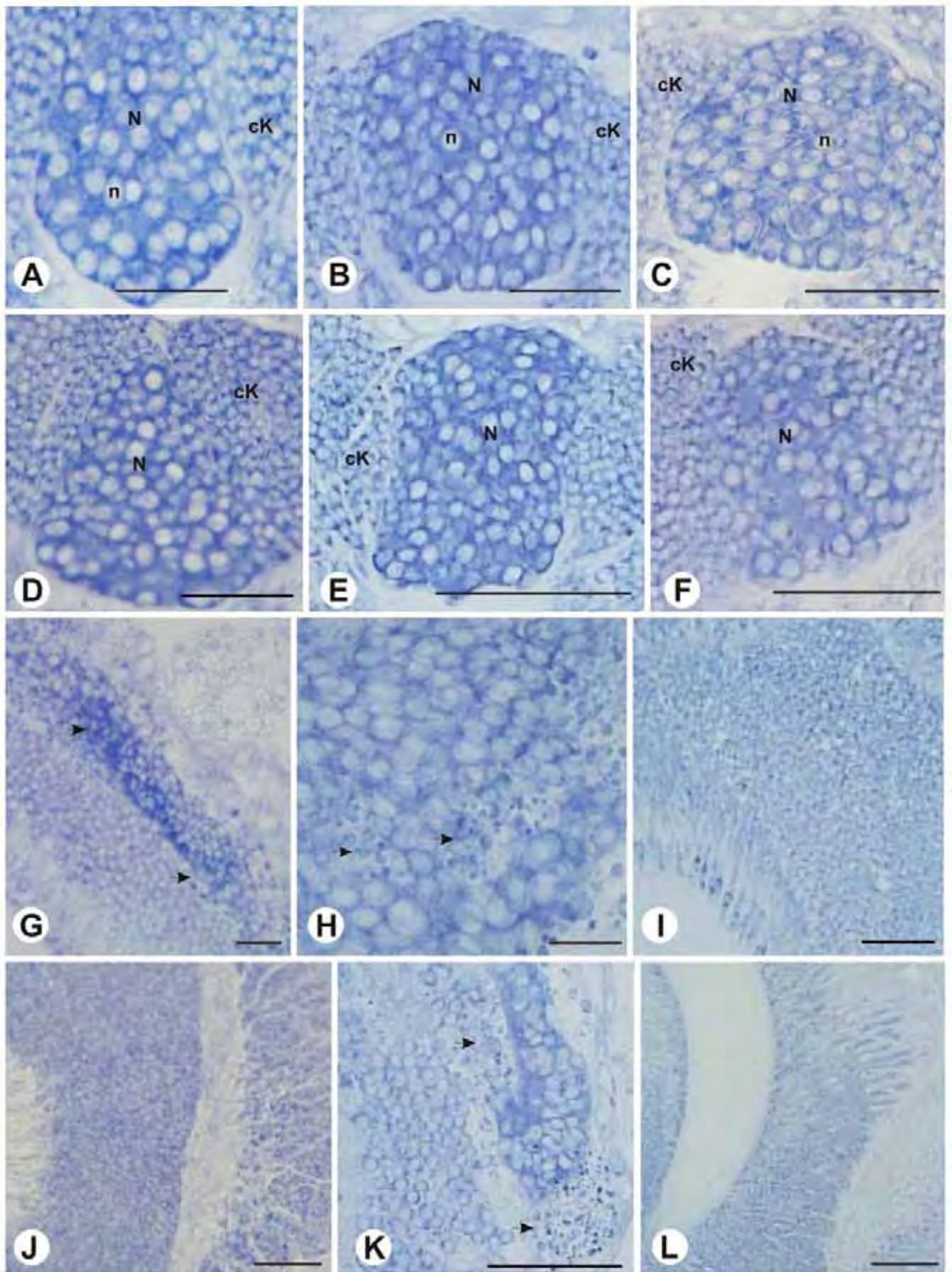


FIGURA 35: Fotomicrografias de secções histológicas de corpos pedunculados de pupas de olhos preto de *Apis mellifera* submetidas a variante da CEC da coloração com azul de toluidina. Notar em operárias (**A** e **B**) a presença de alguns núcleos condensados (setas) entre as células de Kenyon (cK) e, em rainhas (**C** e **D**) uma grande área de degeneração no limite entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK). Notar também a presença de pontos metacromáticos entre as os neuroblastos (setas). Em machos (**E** e **F**) poucos núcleos condensados são observados entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK).

Barras: 200µm

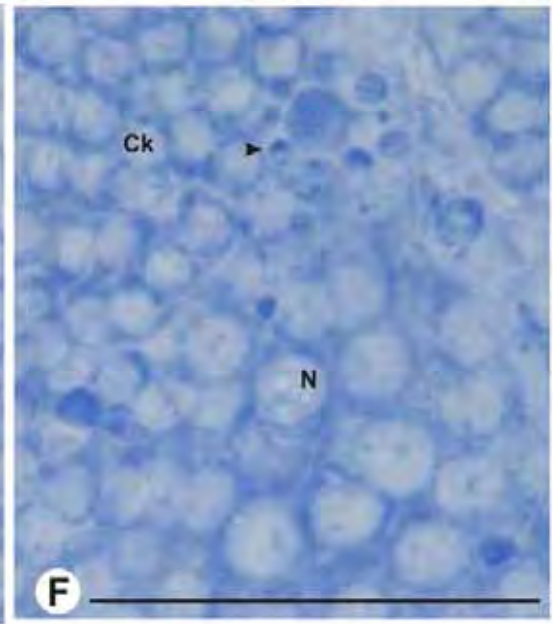
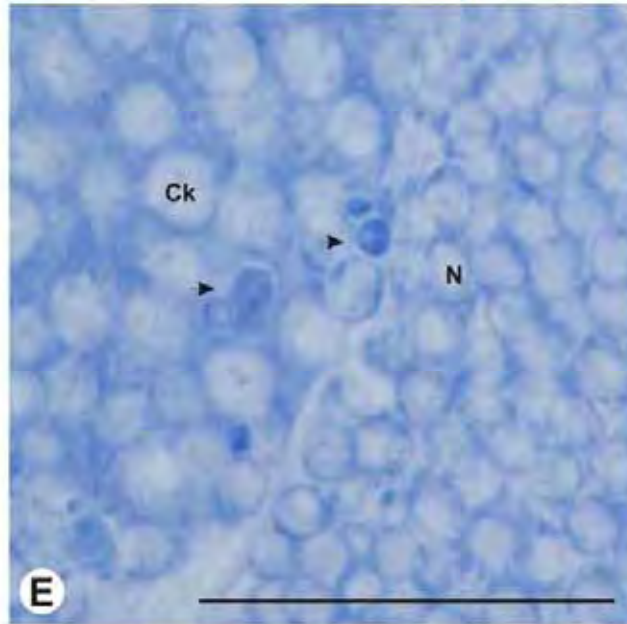
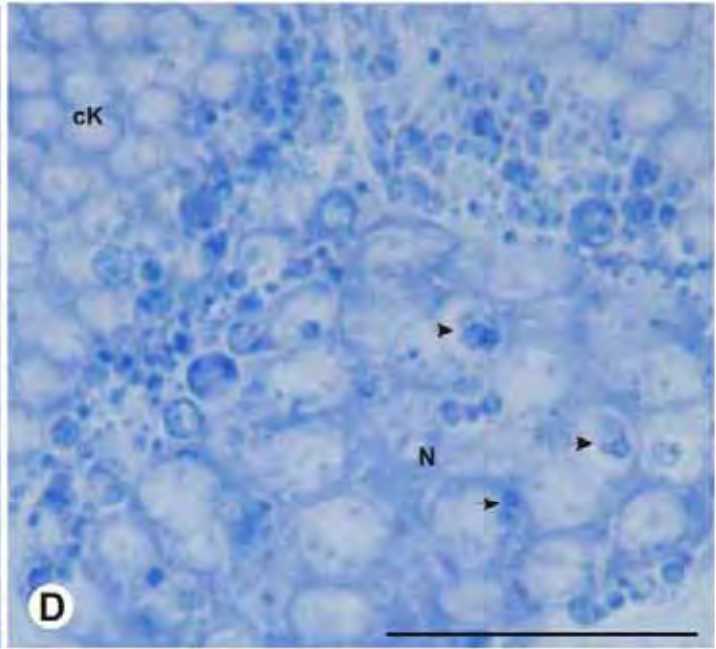
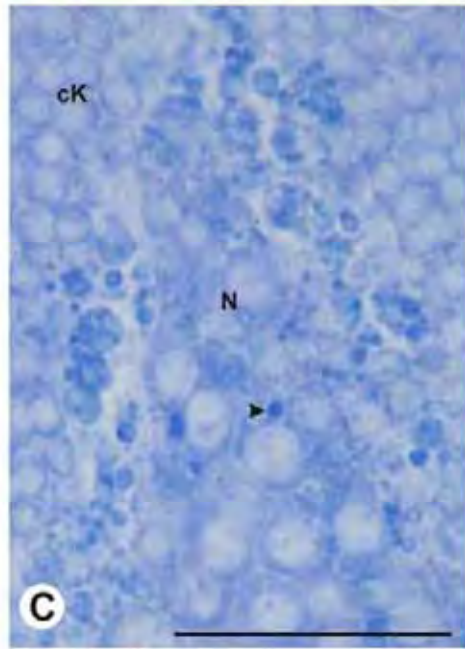
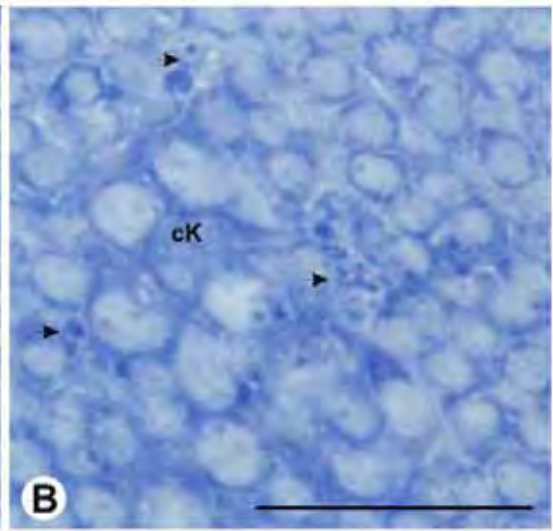
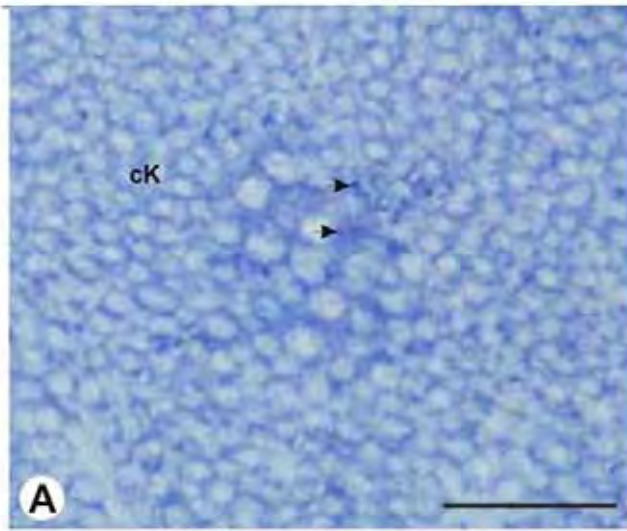


FIGURA 36: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de larvas de 5º instar e de pré-pupas de *Apis mellifera* submetidas à coloração por acridine-orange.

A a C. Corpos pedunculados de larvas de 5º instar de operárias (**A**), rainhas (**B**) e zangões (**C**), mostrando que o citoplasma dos neuroblastos (N) de operárias apresentam coloração avermelhada, indicando a presença de maior quantidade de RNA que em rainhas e zangões que apresentam citoplasma alaranjado. Os núcleos (n) apresentam coloração verde escura, devido a intercalações de moléculas do corante com o DNA, apenas em operárias (**A**) é possível observar alguns núcleos brilhantes (seta), indicativo de morte celular. Notar que os pedúnculos (P), com início da sua formação, também apresentam coloração verde escura, indicando que houve coloração inespecífica.

D a F. Início da formação dos lobos ópticos em larvas de 5º instar de operárias (**D**), rainhas (**E**) e zangões (**F**). Notar em zangões lobos ópticos mais desenvolvidos e em operárias algumas células em morte, com núcleos verde-brilhante (seta).

G a I. Corpos pedunculados de pré-pupas de operárias (**G**), rainhas (**H**) e zangões (**I**), mostrando que nesta fase, os neuroblastos (N) de rainhas e zangões apresentam maior quantidade de RNA no citoplasma.

J a L. Lobos ópticos de pré-pupas, mostrando que zangões (**L**) continuam apresentando desenvolvimento desta estrutura mais adiantado que rainhas (**K**) e operárias (**J**).

Barras: 200µm

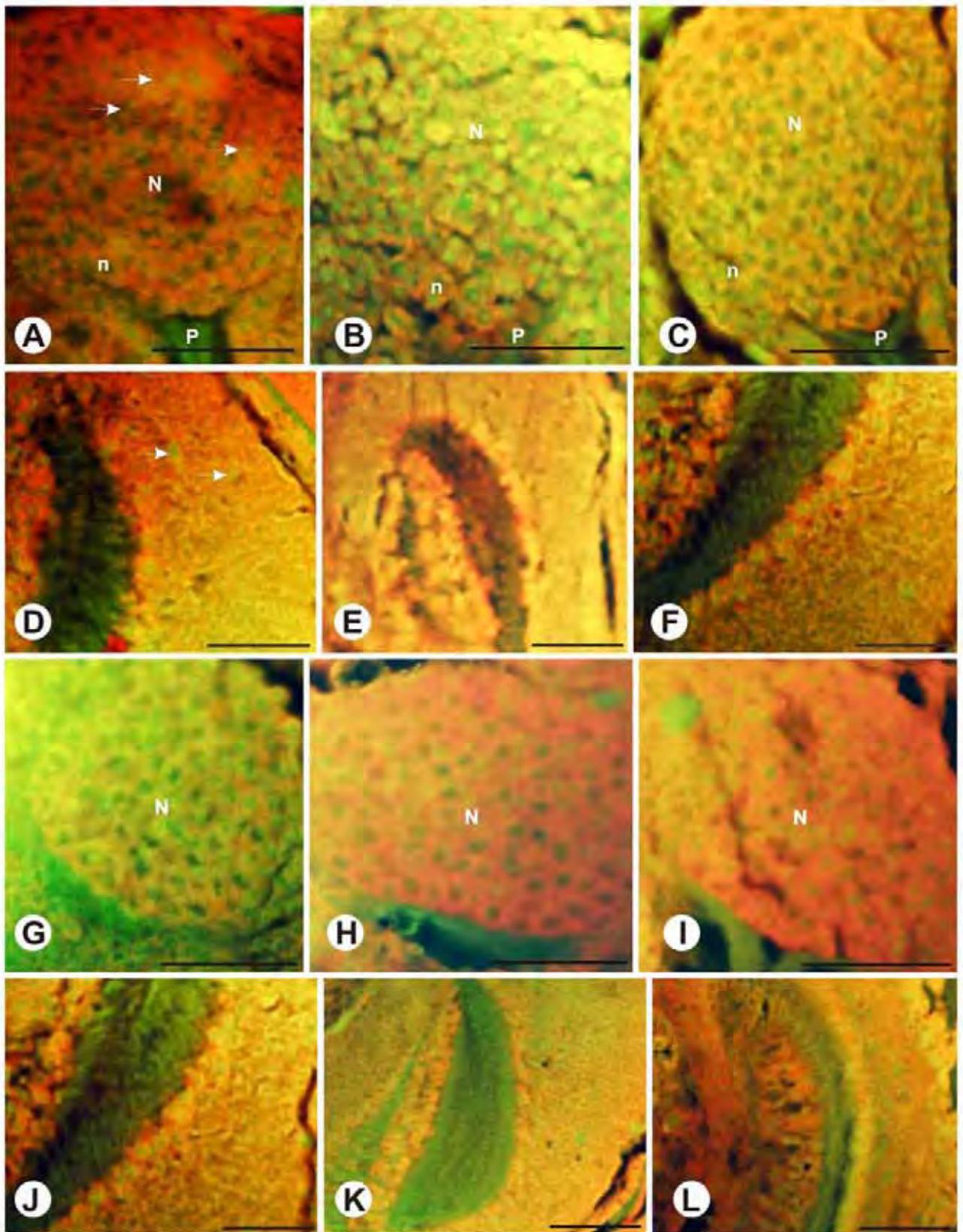


FIGURA 37: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de pupas de olhos brancos e pupas de olhos rosa de *Apis mellifera* submetidas à coloração por acridine-orange.

A a C. Corpos pedunculados de pupas de olhos branco de operárias (**A**), rainhas (**B**) e zangões (**C**). Observar que os neuroblastos (N) ainda ocupam a maior parte do cálice (ca) e que células com núcleos condensados estão ausentes.

D a F. Lobos ópticos de pupas de olhos branco, mostrando que em operárias (**D**) e rainhas (**E**) é possível observar uma região verde-brilhante (setas), indicativo de presença de núcleos com cromatina condensada, enquanto que em zangões (**F**) células com esta coloração estão ausentes.

G a I. Corpos pedunculados de pupas de olhos rosa de operárias (**J**), rainhas (**K**) e zangões (**L**). N=neuroblastos, cK=células de Kenyon.

J a L. Lobos ópticos de pupas de olhos rosa, evidenciando mortes celulares, (setas) em operárias (**J**) e rainhas (**K**). Em zangões (**L**) lobos ópticos bastante desenvolvidos e com ausência de núcleos condensados.

Barras: 200µm

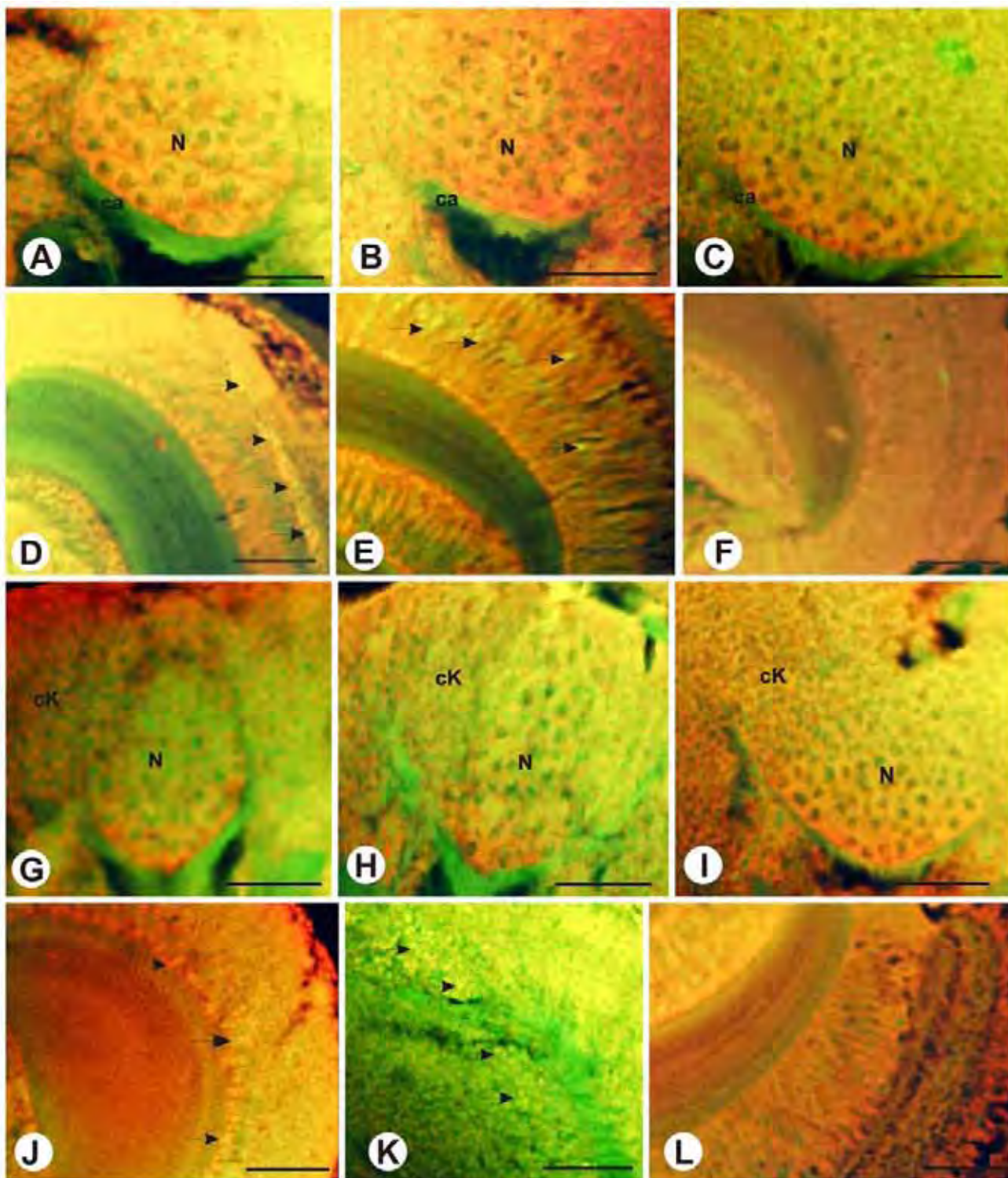


FIGURA 38: Fotomicrografias de secções histológicas dos corpos pedunculados de pupas de olhos preto de *Apis mellifera* submetidas à coloração por acridine-orange. As figuras **A** a **E** mostram núcleos verde-brilhantes nos corpos pedunculados de operárias. Notar que em **A** núcleos condensados (seta) estão presentes no limite entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK) e que em **B** a **E**, núcleos corados de verde-brilhante (seta) ocorrem entre as células de Kenyon (cK). Em rainhas (**F** a **I**), os núcleos condensados (seta) ocorrem no limite entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK) (**F** e **G**) e também entre as células de Kenyon (cK) (**H** e **I**). Em machos, somente algumas células com esta morfologia (seta) são encontradas entre as células de Kenyon (cK) (**J**), mas na maioria das vezes os corpos pedunculados não apresentam células em morte (**K**).

Barras: 200µm

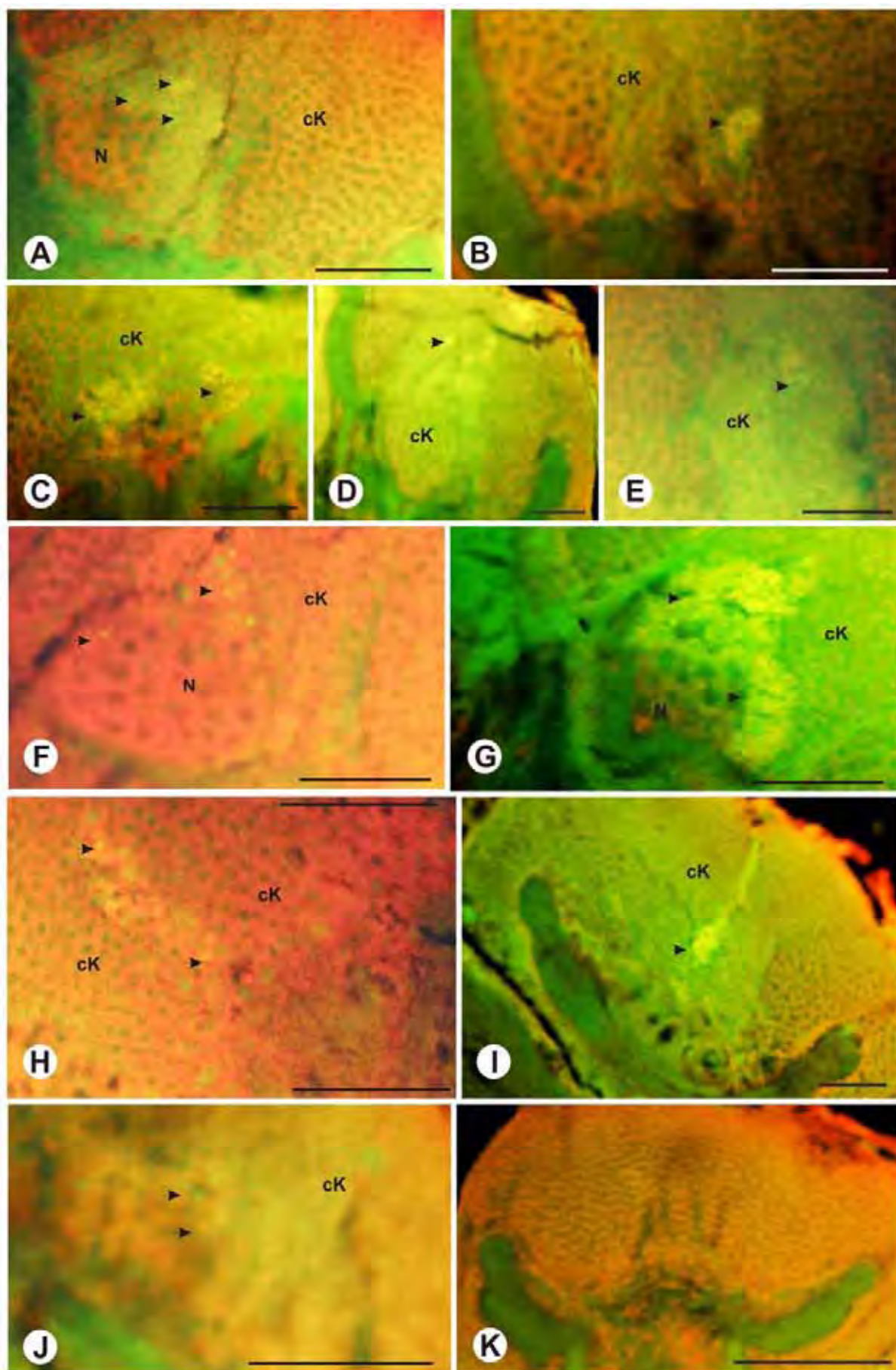


FIGURA 39: Fotomicrografias de secções histológicas dos lobos ópticos de *Apis mellifera* submetidas à reação de TUNEL.

A a C. Larvas de 5º instar de rainhas, mostrando diversos núcleos marcados, indicando que algumas células morrem no início da diferenciação desta estrutura. Barras: 100µm

D. Larvas de 5º instar de machos, mostrando somente alguns núcleos marcados na extremidade dos lobos ópticos. Barra: 300µm

E e F. Núcleos marcados pela reação de TUNEL nos lobos ópticos de pré-pupas de rainhas. Em **(G)** lobos ópticos de pré-pupas de machos, mostrando núcleos marcados nesta estrutura. Barras: 200µm

H a J. Pupa de olhos branco de rainhas. Notar em **(H)** marcação fluorescente dos núcleos pela reação TUNEL, ocupando principalmente a extremidade da estrutura. Em **I** e **J**, a marcação após a conversão do sinal para microscopia de luz. Barras: 200µm

K a M. Pupas de olhos rosa de rainhas, mostrando em **K** núcleos marcados na região central dos lobos ópticos e, em **L** e **M** núcleos marcados após a conversão do sinal para microscopia de luz. Barras: 100µm

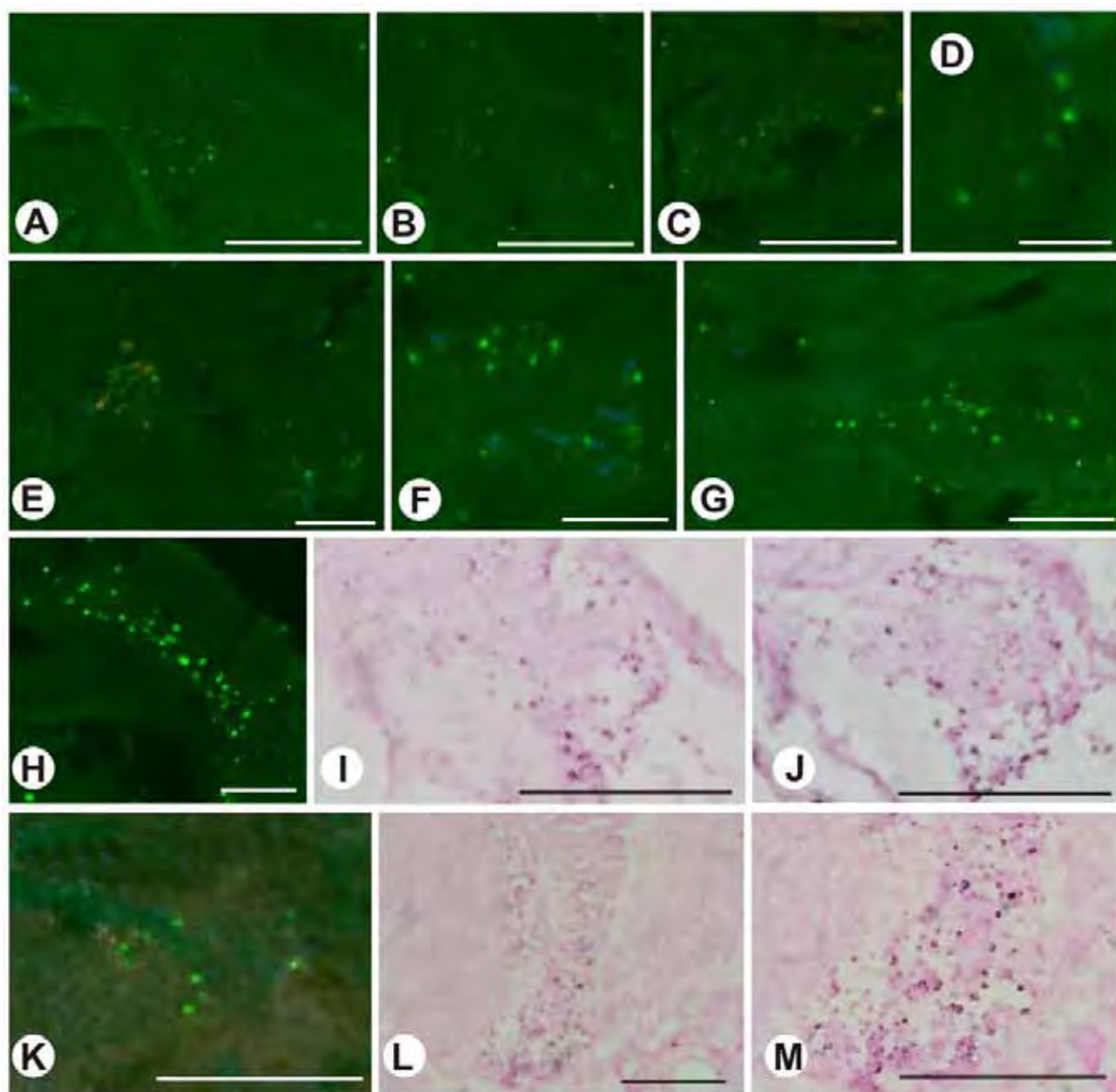


FIGURA 40: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de pupas de olhos preto de *Apis mellifera* submetidas à reação de TUNEL.

A a E. Localização de núcleos marcados nos corpos pedunculados em operárias. Em **A** visão geral desta estrutura, evidenciando diversos núcleos marcados. Em **B** e **C** estes localizam-se na região de limite entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK), mas, como mostrado em **D** e **E** núcleos marcados também ocorrem entre as células de Kenyon.

F a K. Núcleos marcados nos corpos pedunculados de rainhas, mostrando que estes localizam-se preferencialmente na região de transição entre os neuroblastos (N) e as células de Kenyon (cK), com alguns núcleos na região dos neuroblastos (setas). Notar em **I a K** alguns núcleos marcados na extremidade dos corpos pedunculados (setas), entre as células de Kenyon (cK).

Barras: 200µm

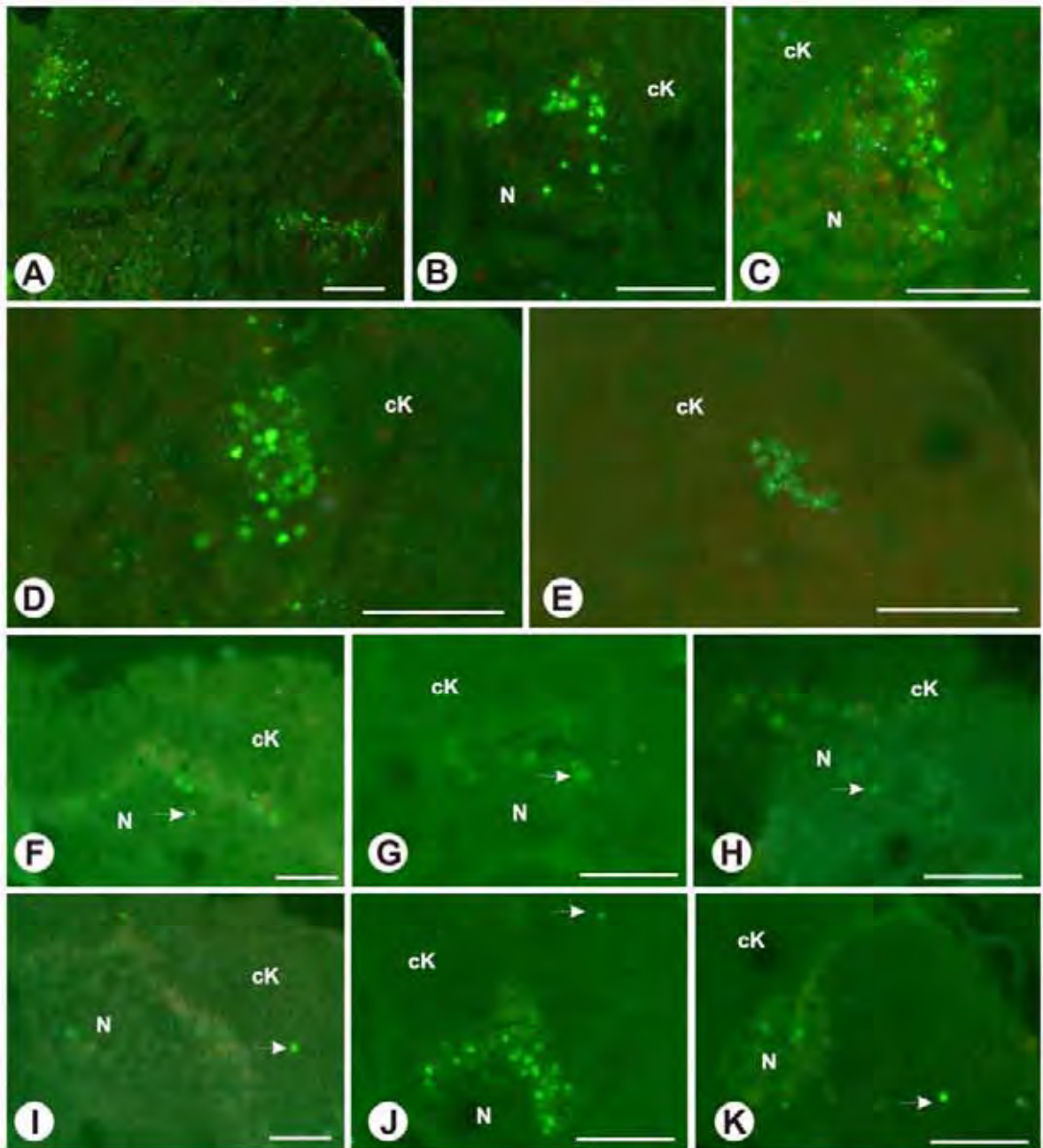


FIGURA 41: Fotomicrografias de secções histológicas do cérebro de *Apis mellifera* mostrando os controles positivos (**A e B**) e negativos (**C e D**) da reação de TUNEL, em microscópio de fluorescência. Notar que todos os núcleos nos controles positivos (**A e B**) estão marcados, devido à quebra no DNA após tratamento com a enzima DNase.I, enquanto que nos controles negativos (**C e D**), que foram incubados com a solução de TUNEL sem a enzima, nota-se a ausência de núcleos marcados. Em **E e F**, controles positivos após conversão de sinal para microscopia de luz, mostrando todos os núcleos marcados após incubação com substrato DAB e em **G e H** os respectivos controles negativos

Barras: 200µm

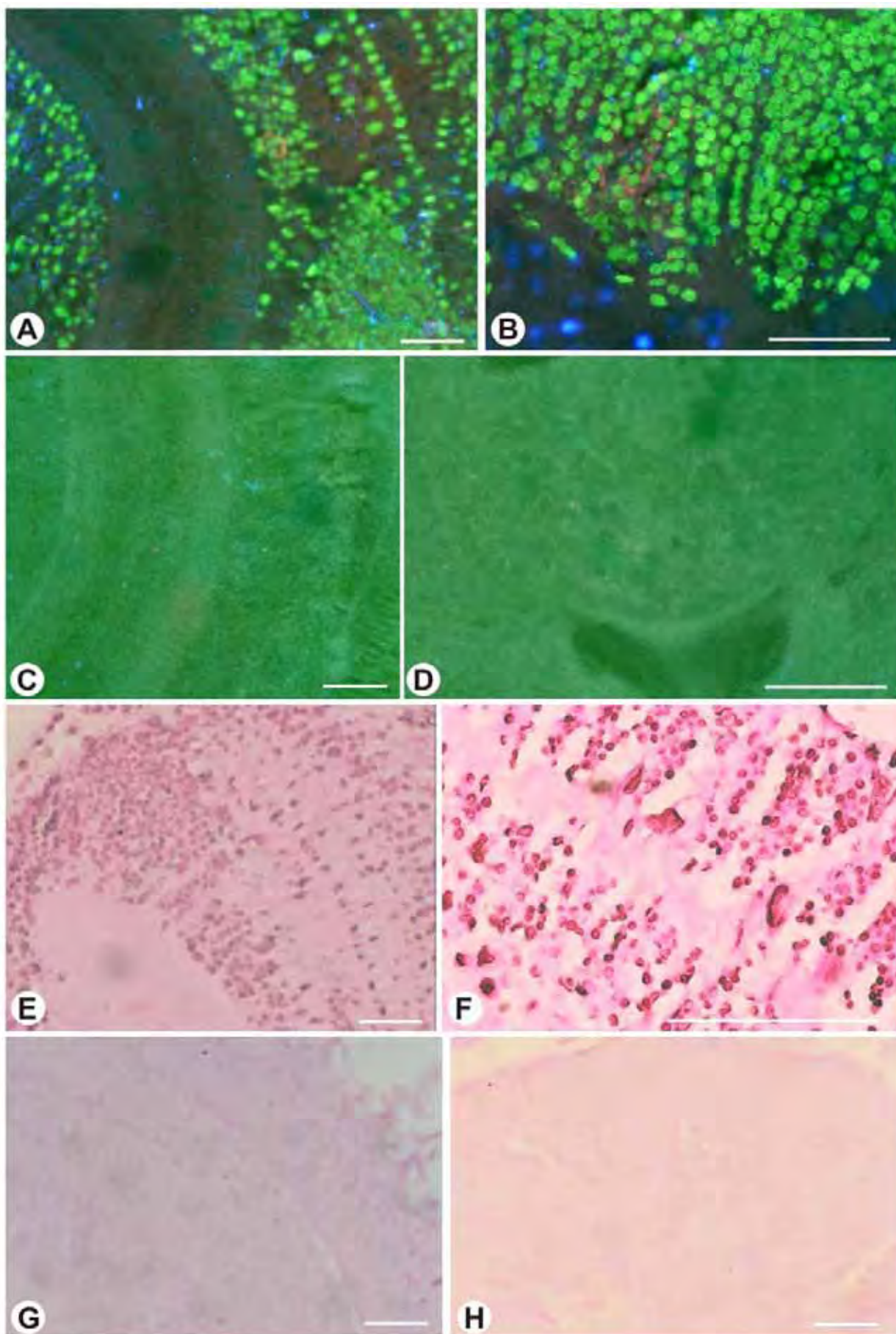


FIGURA 42: MET das células em processo de morte nos corpos pedunculados de pupa de olhos preto de rainhas de *A. mellifera*.

A – Aspecto geral da região de morte celular vendo-se neuroblastos (nb) inalterados, em início do processo de morte (i) e já completamente desintegrados (cd). Observar região de células de Kenyon recém-diferenciadas (rcK) e células de Kenyon da sub-população compacta interna (ci). Barra: 5 μ m.

B – Aspecto do núcleo (n) de célula no início do processo. Notar o espaço perinuclear (epn) e cisternas do retículo endoplasmático granular (reg) dilatados. Notar condensação da cromatina (cr) e presença de grande nucléolo (nu). Barra: 5 μ m.

C – Detalhe de núcleo com marginalização da cromatina (seta). Barra: 5 μ m.

D – Separação da parte do núcleo por lamelas anuladas (la). Observar citoplasma desprovido de organelas e cisterna do retículo endoplasmático granular (reg) com lumen dilatado e eletrólucido. Barra: 1 μ m.

E – Alterações mitocondriais. Barra: 1 μ m

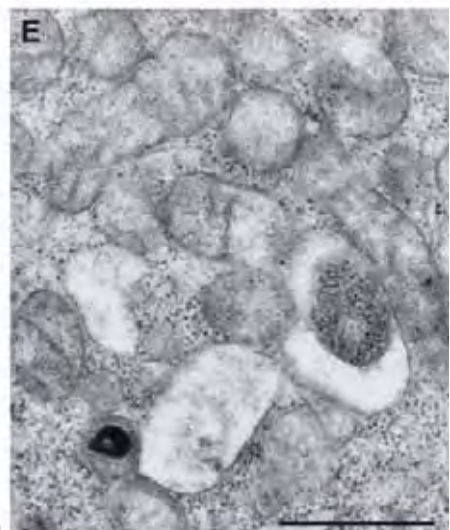
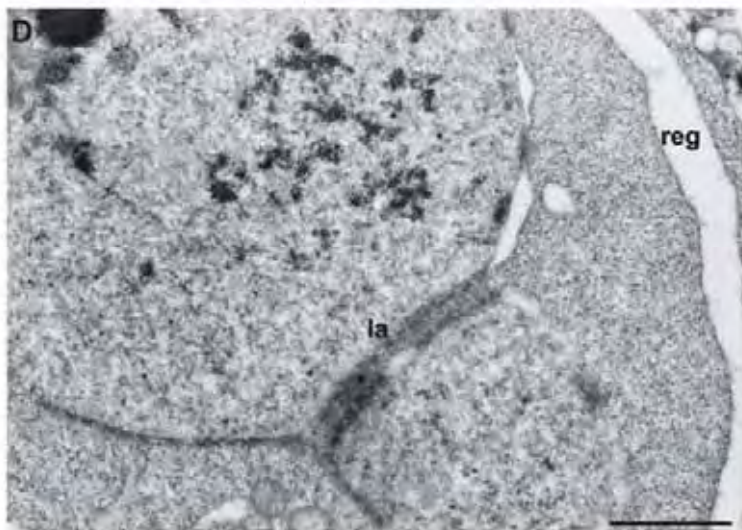
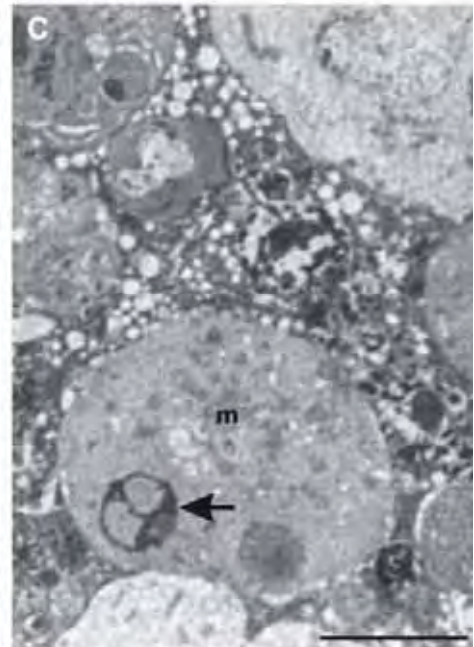
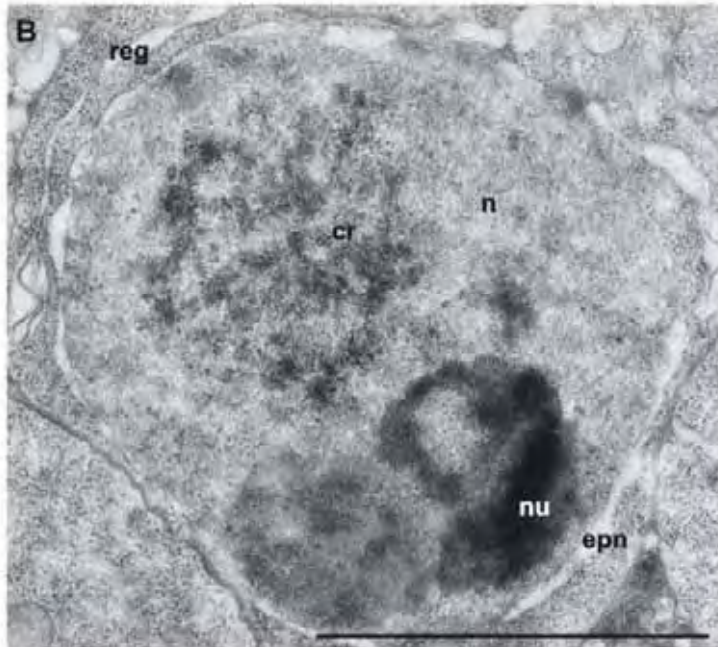
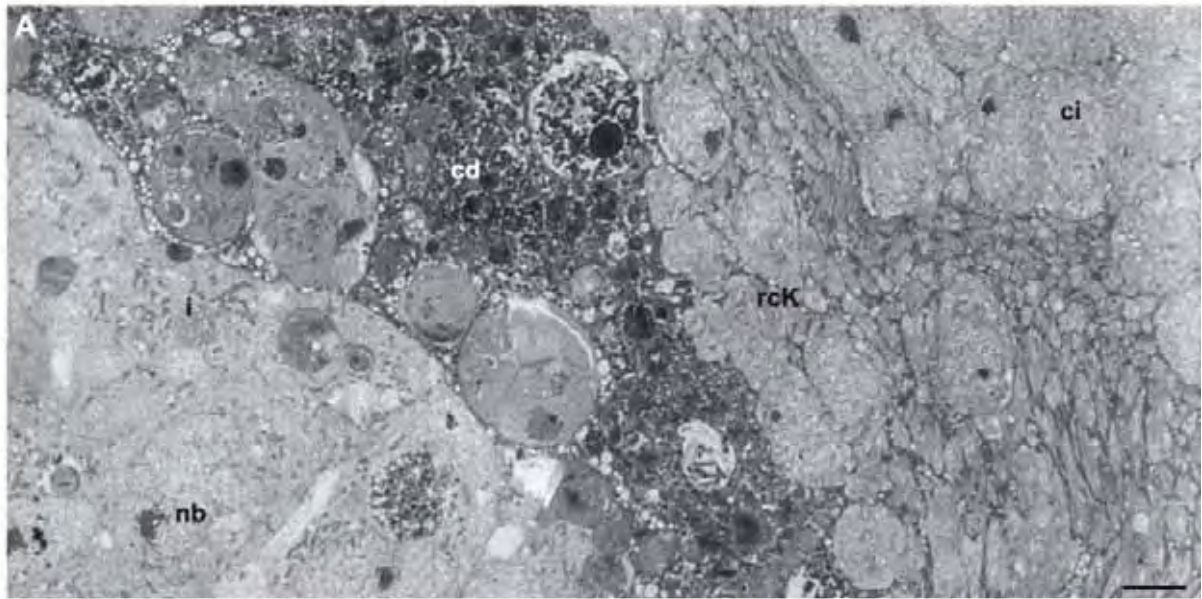


FIGURA 43: MET de células em processo de morte nos corpos pecunculados de pupas de olhos preto de rainhas de *A. mellifera*.

A – Célula aparentemente binucleada (n1, n2) pela fragmentação do núcleo original, com restos de lamelas anuladas (la) no contato entre as duas porções. Notar o aparecimento no citoplasma de vacúolos digestivos (vd). cr = cromatina condensada; nu = nucléolo volumoso; m = mitocôndria; reg = retículo endoplasmático granular com lumen dilatado.

B – Célula apresentando vários tipos de vacúolos digestivos (vd) no citoplasma em alguns dos quais se percebe digestão de componente citoplasmático (seta). Notar no núcleo (n) o volumoso nucléolo (nu) e retículo endoplasmático granular com lumen dilatado (reg).

C e D – Fases muito avançadas da morte celular, onde não se percebem mais as estruturas celulares, nem o limite das células. Notar em **C** a presença de célula intersticial, provavelmente glia (seta) com restos celulares no interior e em outra célula, formação de corpos apoptóticos (cp).

Barras: 2µm

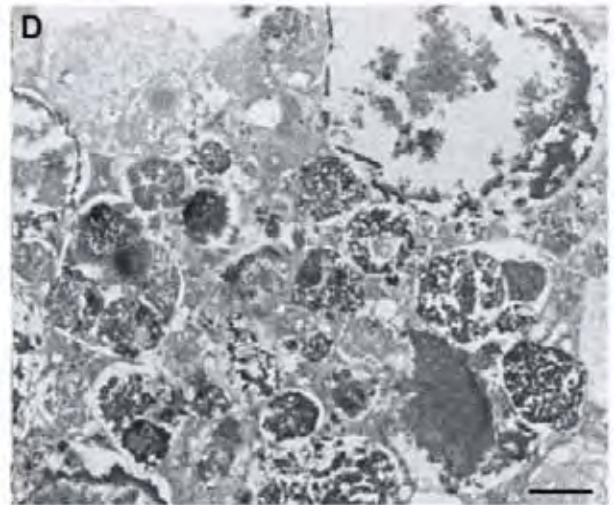
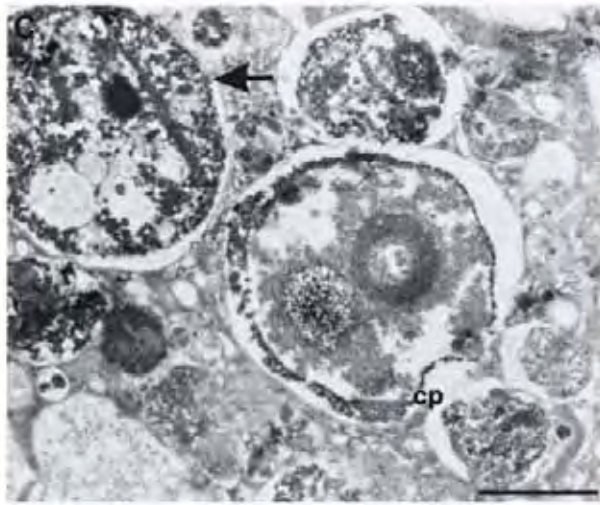
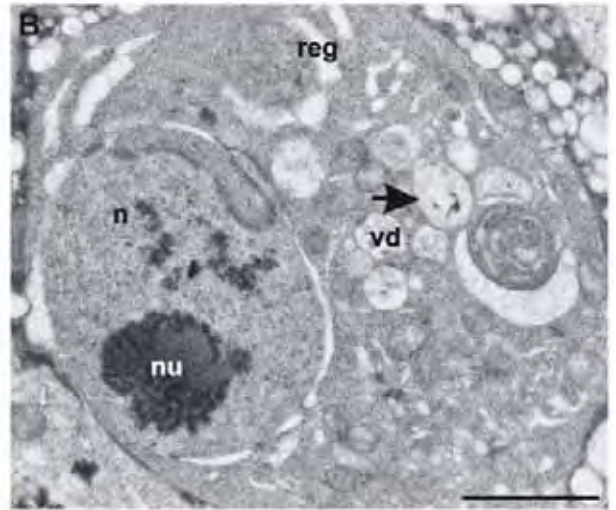
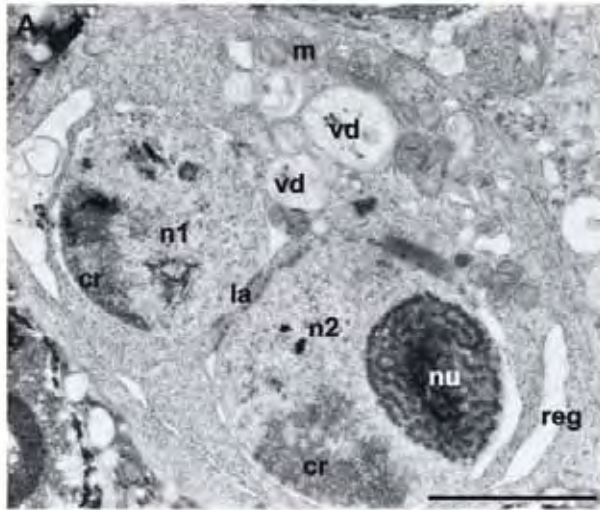


FIGURA 44: MET de células em processo de morte nos corpos pecunculados de pupas de olhos preto de rainhas de *A. mellifera*.

A – Célula de glia com aspecto alterado, caracterizado por condensação do citoplasma e retículo endoplasmático (re) com cisternas dilatadas. Notar células de Kenyon (cK) intactas ao redor.

B – Célula de glia contendo provável vacúolo heterofágico (vh) com resto de neurônio.
cK = células de Kenyon.

C e D – Morte celular de células de Kenyon (setas).

Barras: 5µm

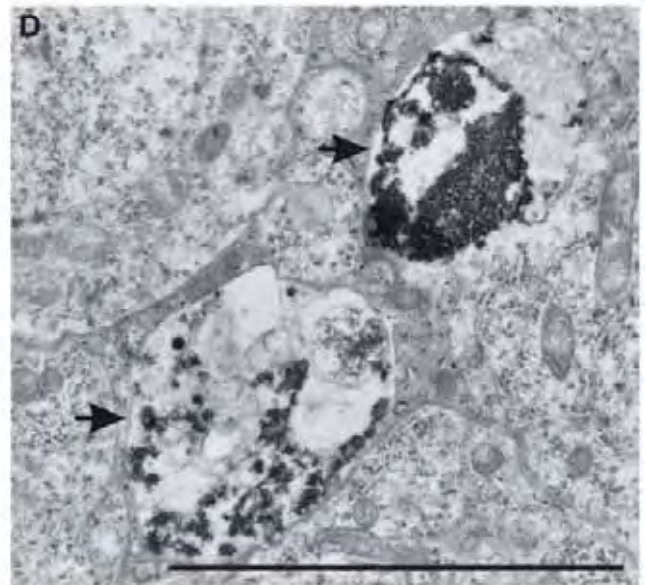
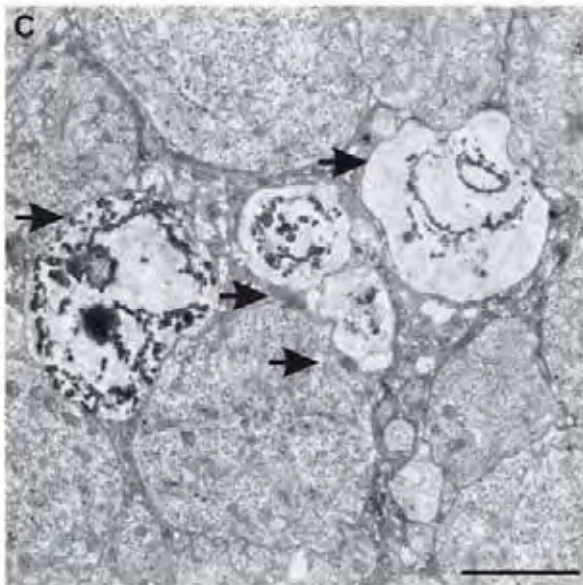
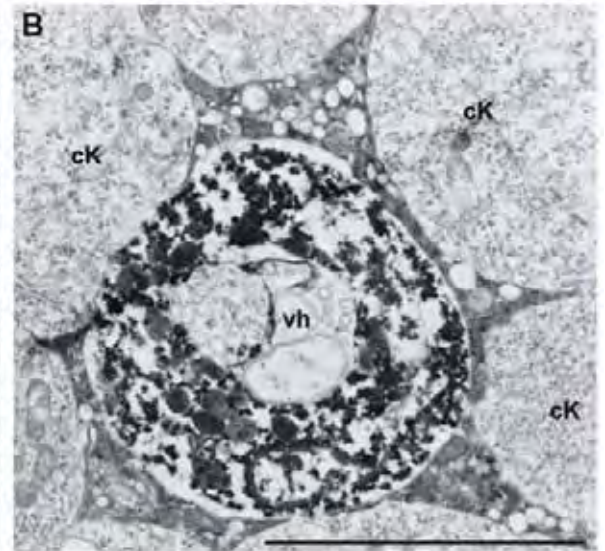
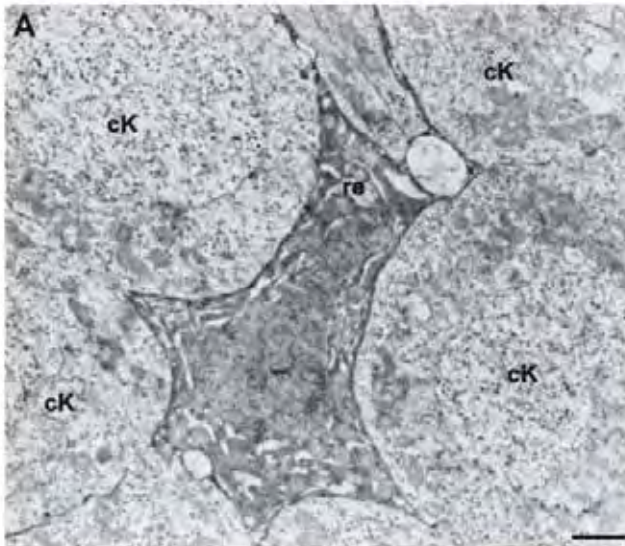


FIGURA 45: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de larvas de 5º instar de operárias (A), rainhas (B) e zangões (C) de *Apis mellifera* submetidos à imunomarcção da histona H3-fosforilada, mostrando diversos núcleos marcados, preenchendo grande parte desta estrutura.

Barras: 400µm

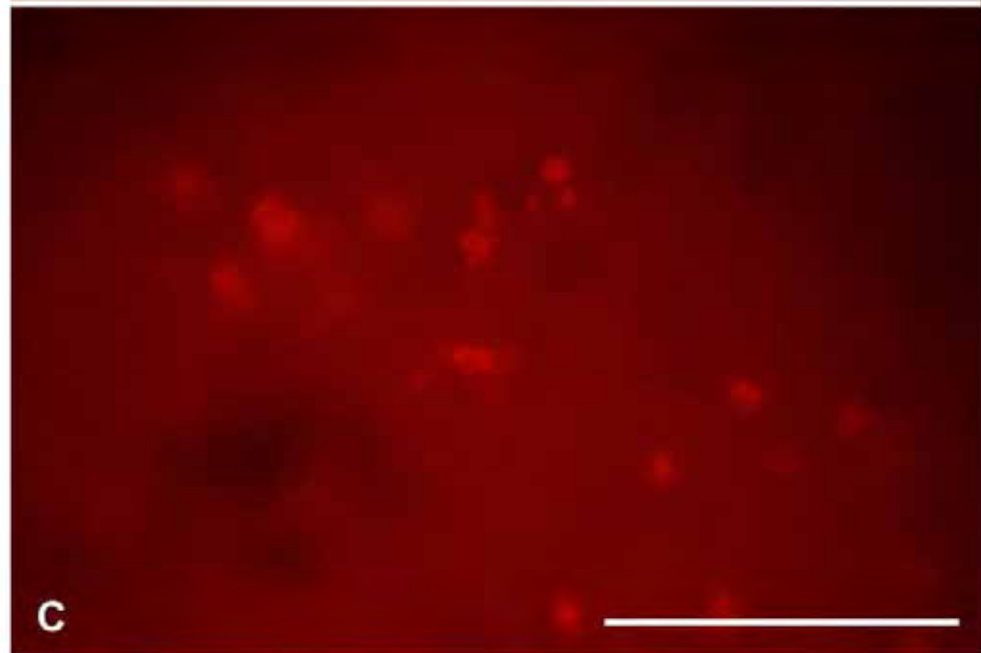
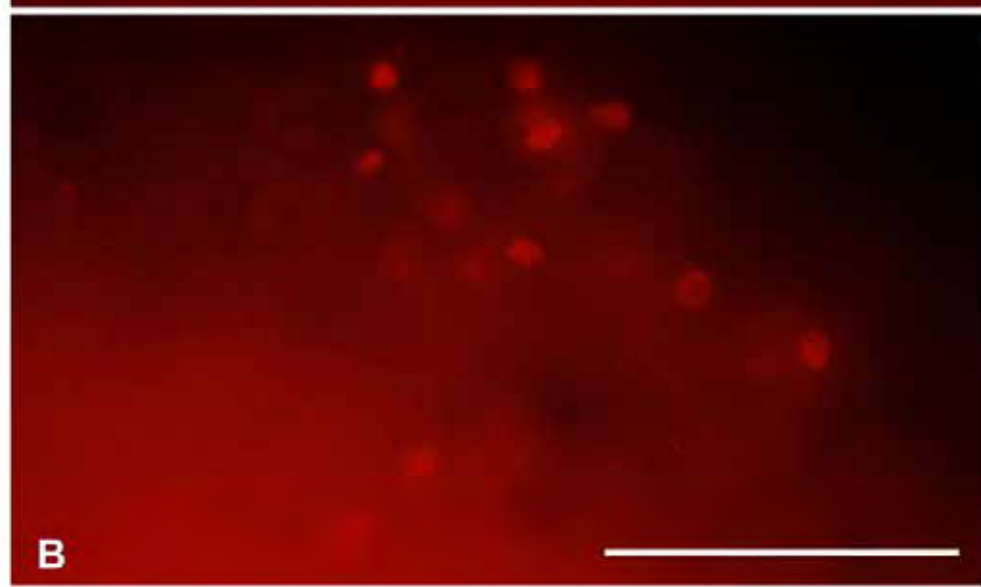
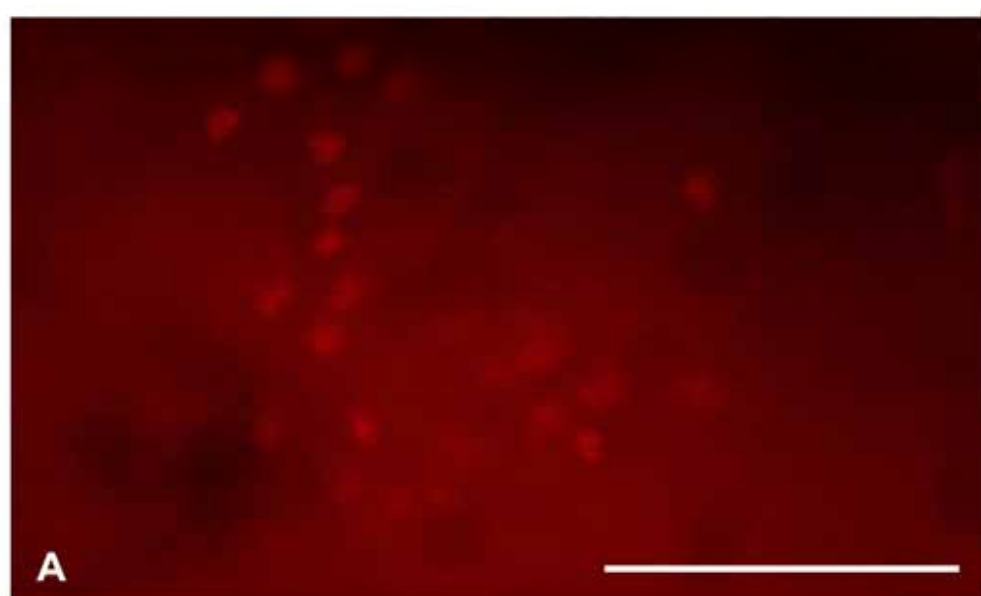


FIGURA 46: Fotomicrografias dos lobos ópticos de larvas de 5º instar de operárias (**A**), rainhas (**B**) e zangões (**C**) de *Apis mellifera*, com grande área de núcleos marcados pela histona H3-fosforilada

Barras: 400µm

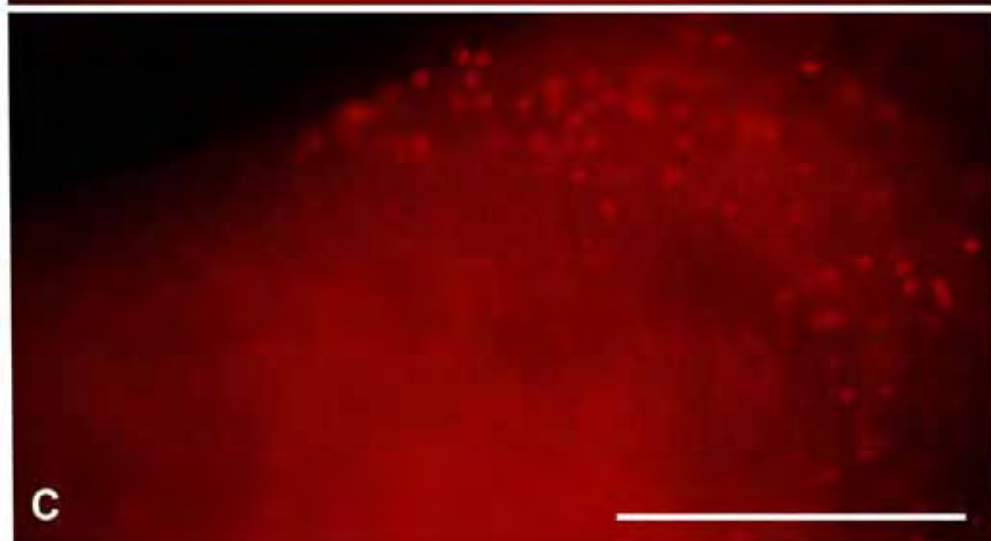
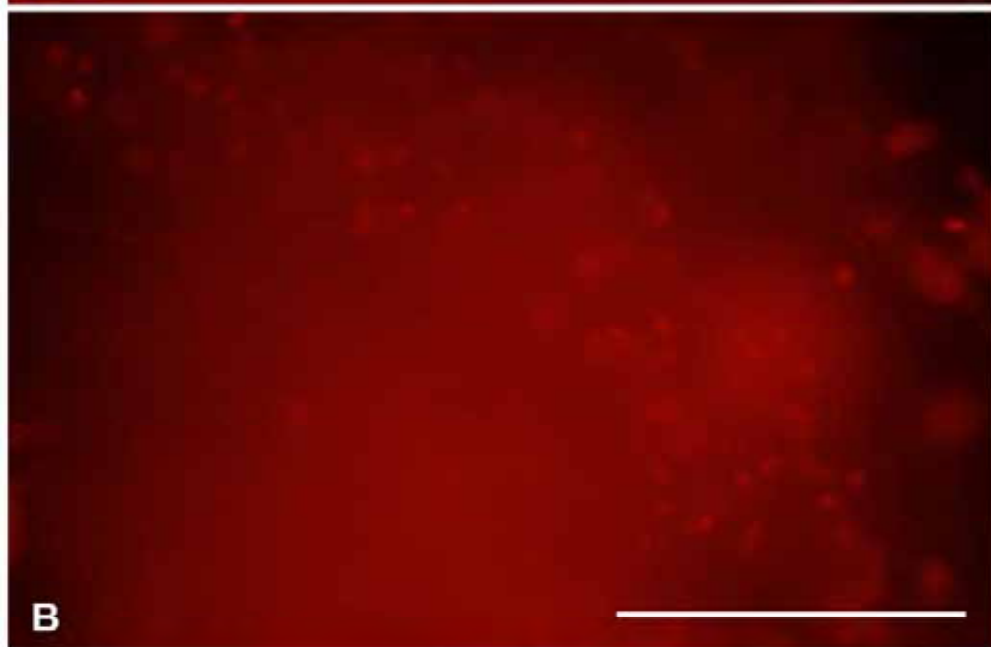
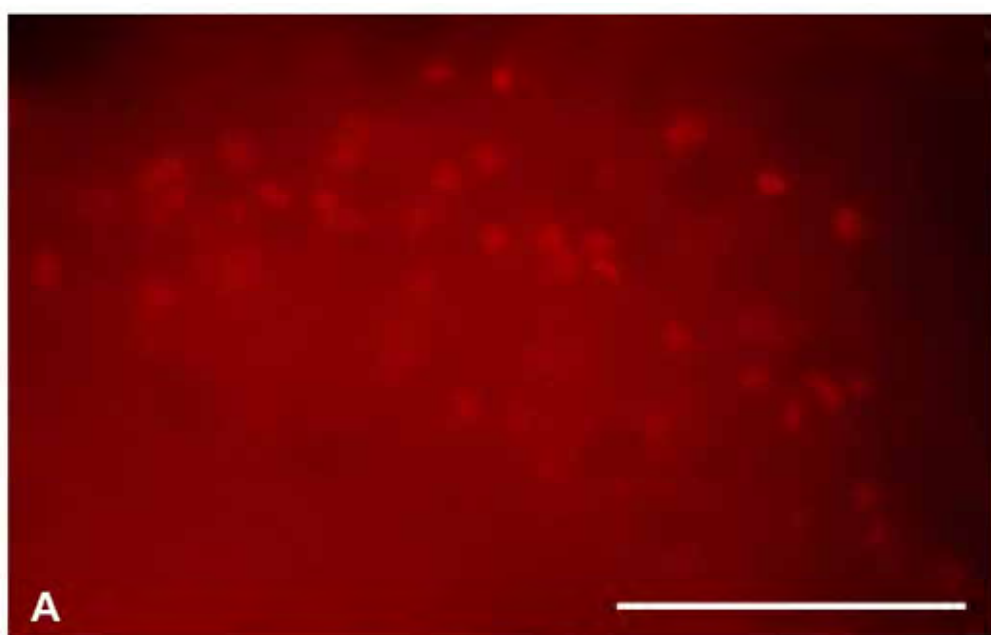


FIGURA 47: Fotomicrografias de núcleos marcados pela histona H3-fosforilada nos corpos pedunculados de pré-pupas de operárias (**A**), rainhas (**B**) e zangões (**C**) de *A. mellifera*.

Barras: 400µm

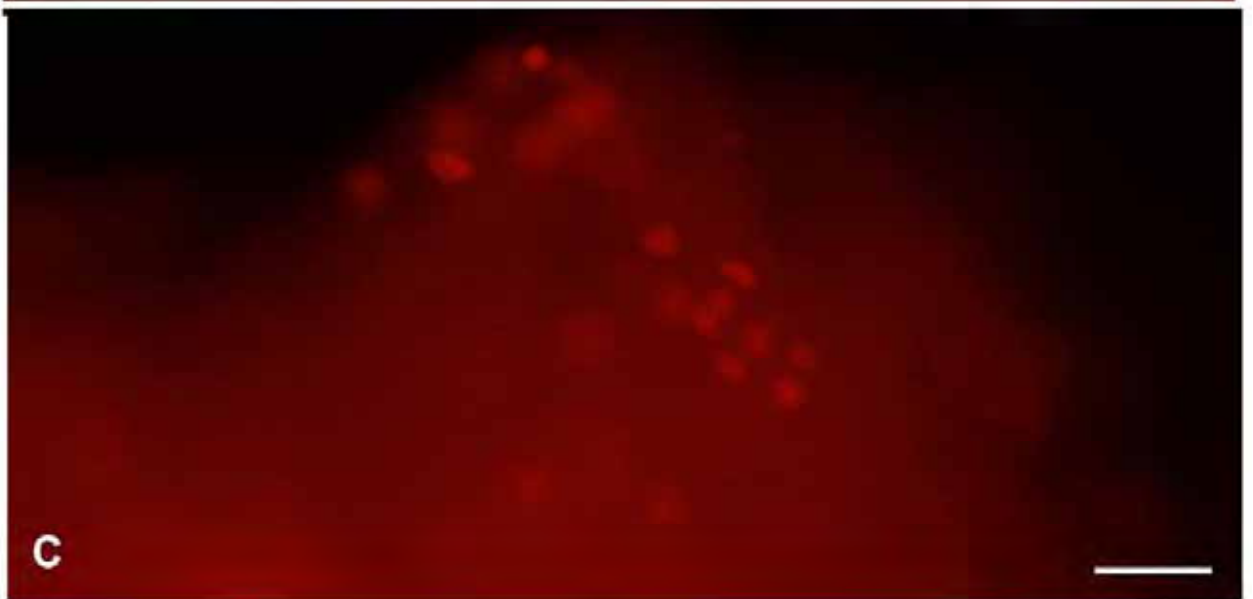
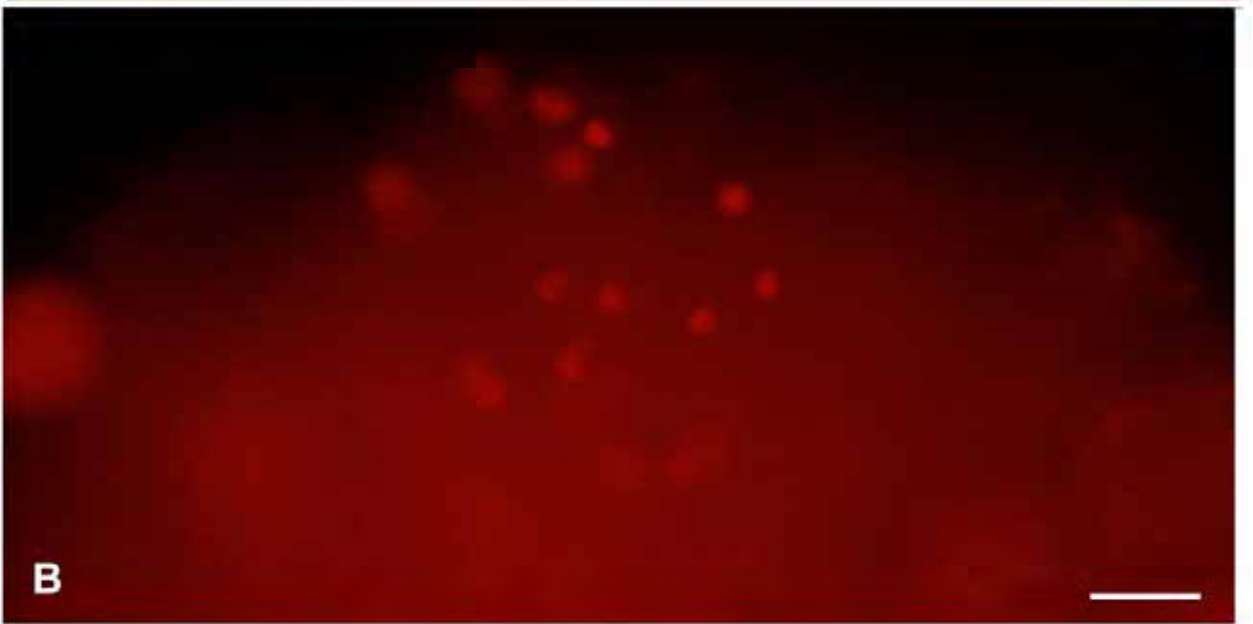
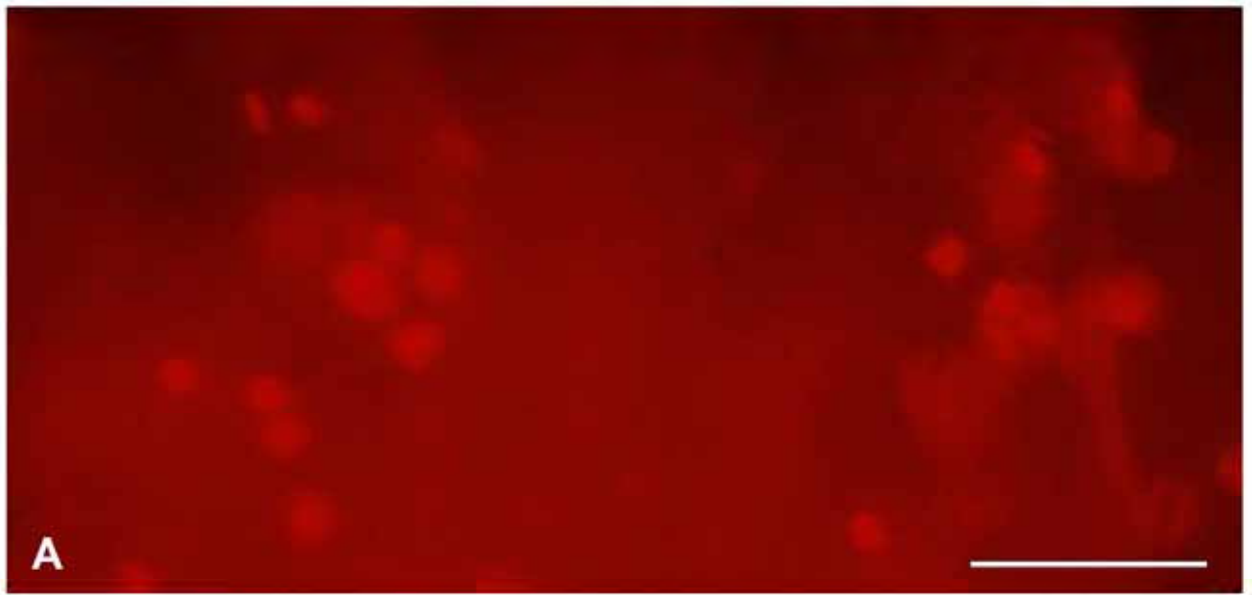


FIGURA 48: Fotomicrografias dos lobos ópticos de pré-pupas de operárias (A), rainhas (B) e zangões (C) de *Apis mellifera*, submetidos à imuno-marcação da histona H3-fosforilada, mostrando que nos machos a marcação é mais intensa.

Barras: 400µm

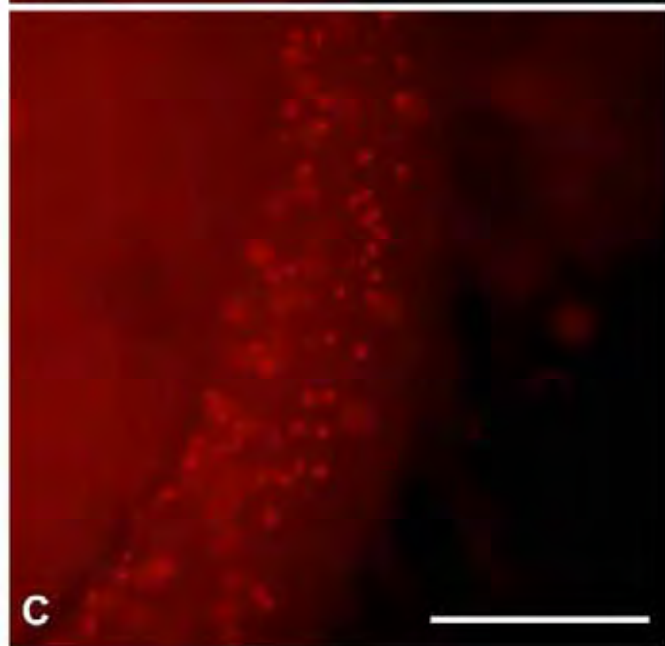
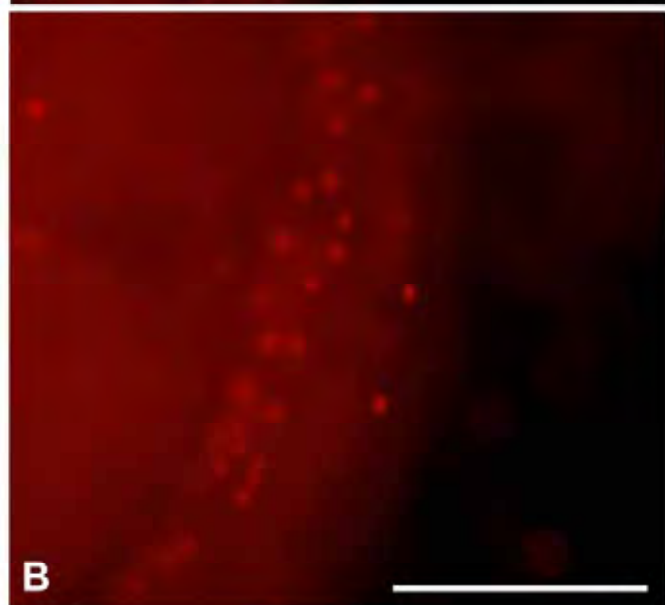
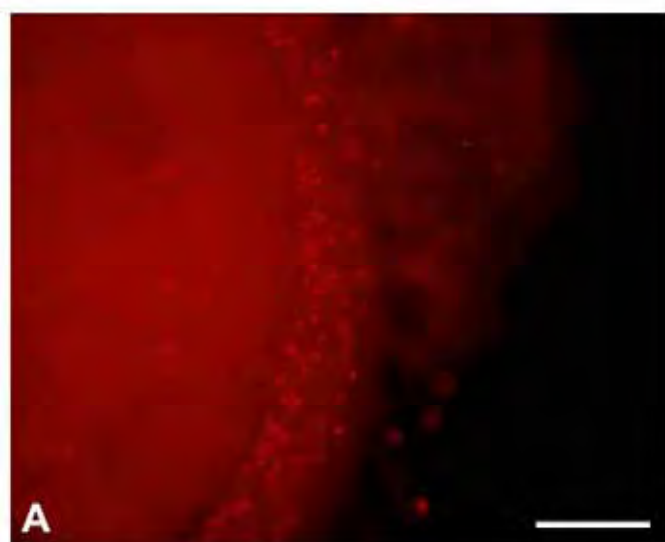


FIGURA 49: Fotomicrografias dos corpos pedunculados de pupas de olhos branco de operárias (A), rainhas (C) e zangões (D) de *Apis mellifera* submetidos à imunomarcção da histona H3-fosforilada, mostrando diversos neuroblastos marcados. B. detalhe de neuroblastos em diversos estágios de mitose: metáfase, anáfase e prófase, nos corpos pedunculados de operárias.

Barras: A, C e D: 400µm e B: 100µm

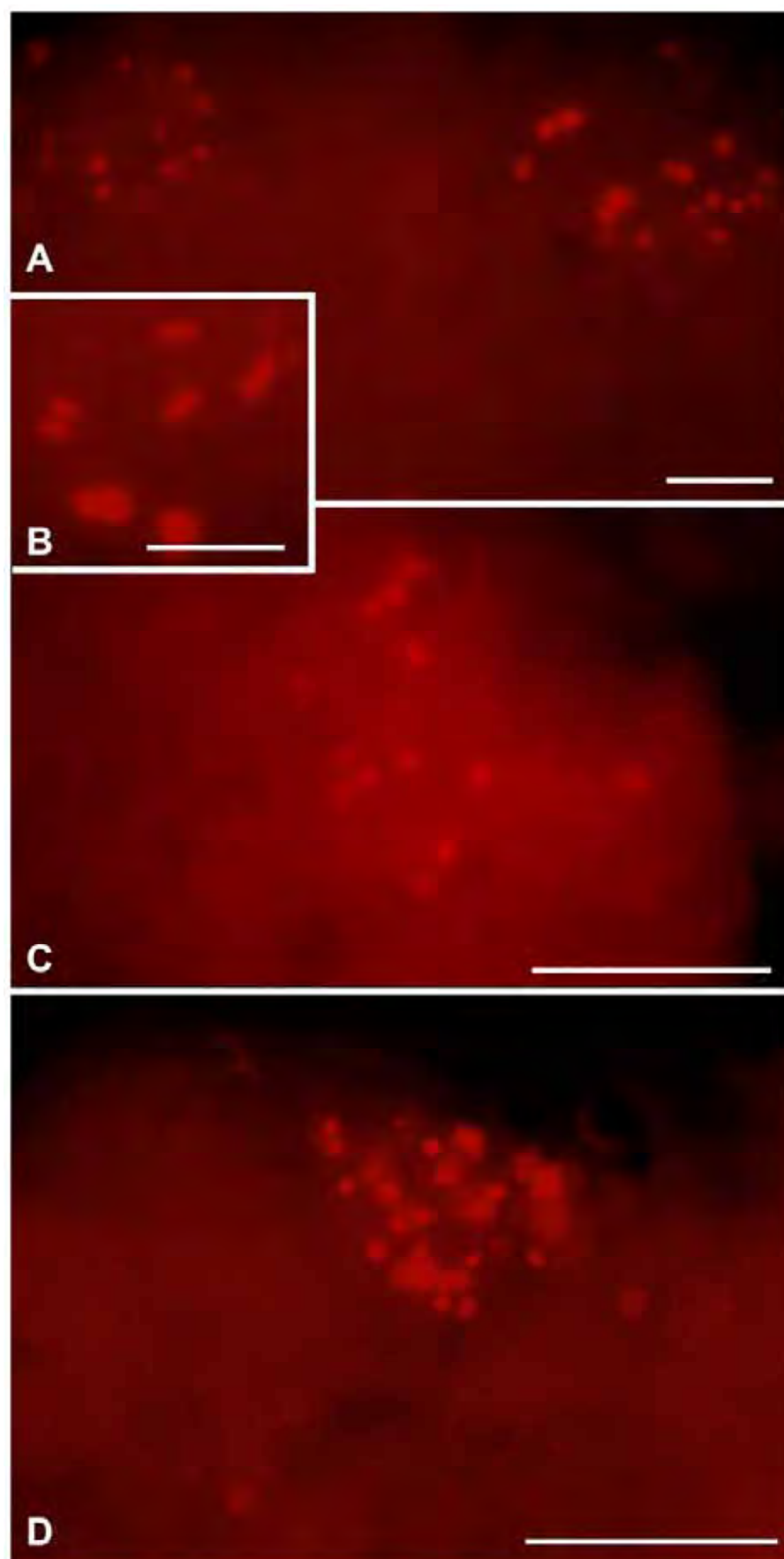


FIGURA 50: Fotomicrografias dos lobos ópticos de pupas de olhos branco de operárias (A), rainhas (B) e zangões (C) de *Apis mellifera* submetidas à imuno-marcação da histona H3 fosforilada, com grande área de núcleos marcados.

Barras: 400µm

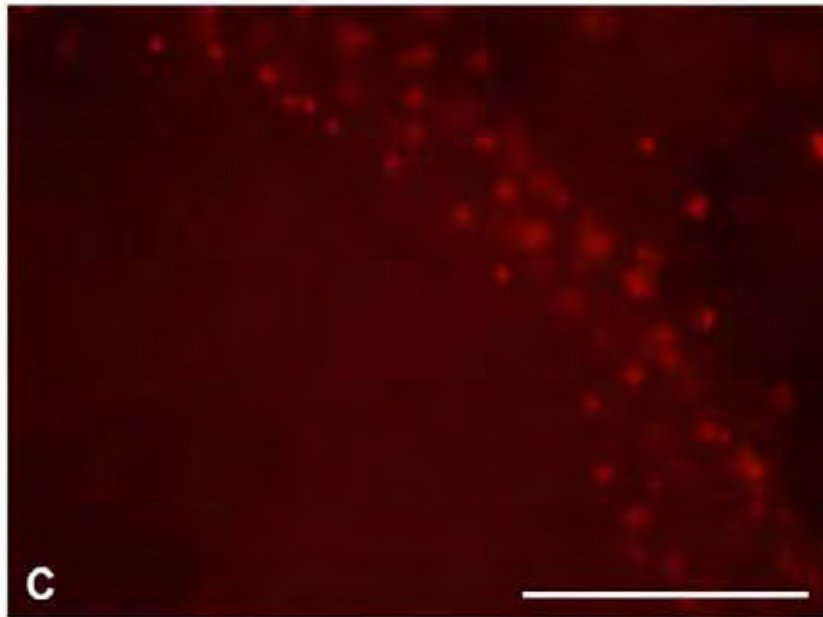
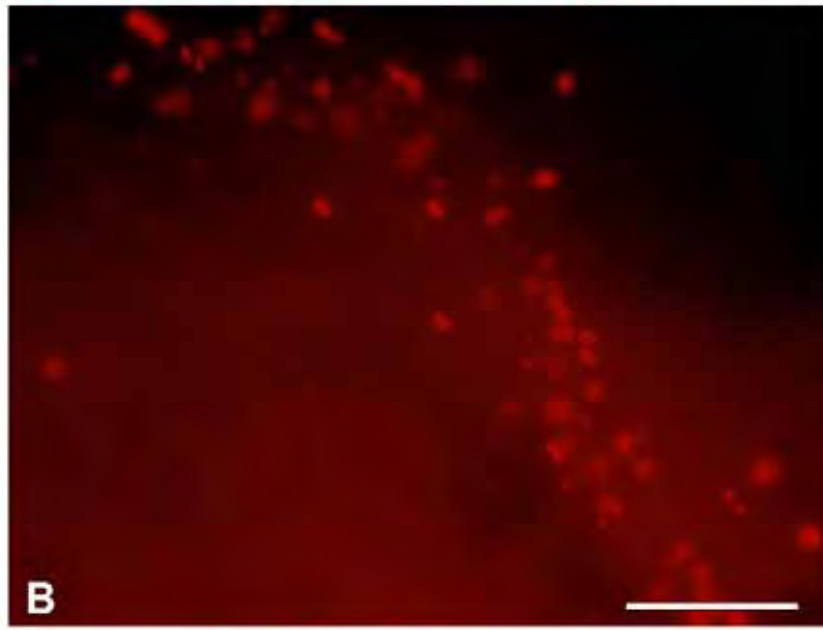
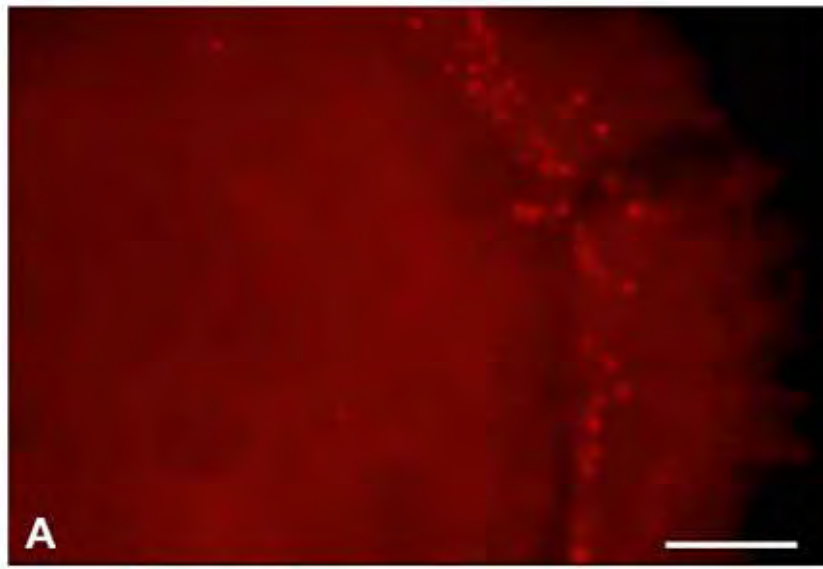


FIGURA 51: Fotomicrografias do cérebro de pupas de olhos rosa de *Apis mellifera* submetidas à imuno-marcação da histona H3 fosforilada. Corpos pedunculados de zangões (**A**) e operárias (**B**) com núcleos marcados na região central da estrutura. Lobos ópticos de zangões com núcleos marcados (**C**). Em **D**, visão geral do cérebro de rainhas, mostrando ausência de núcleos marcados em todas as estruturas do cérebro. Barras: 400µm.

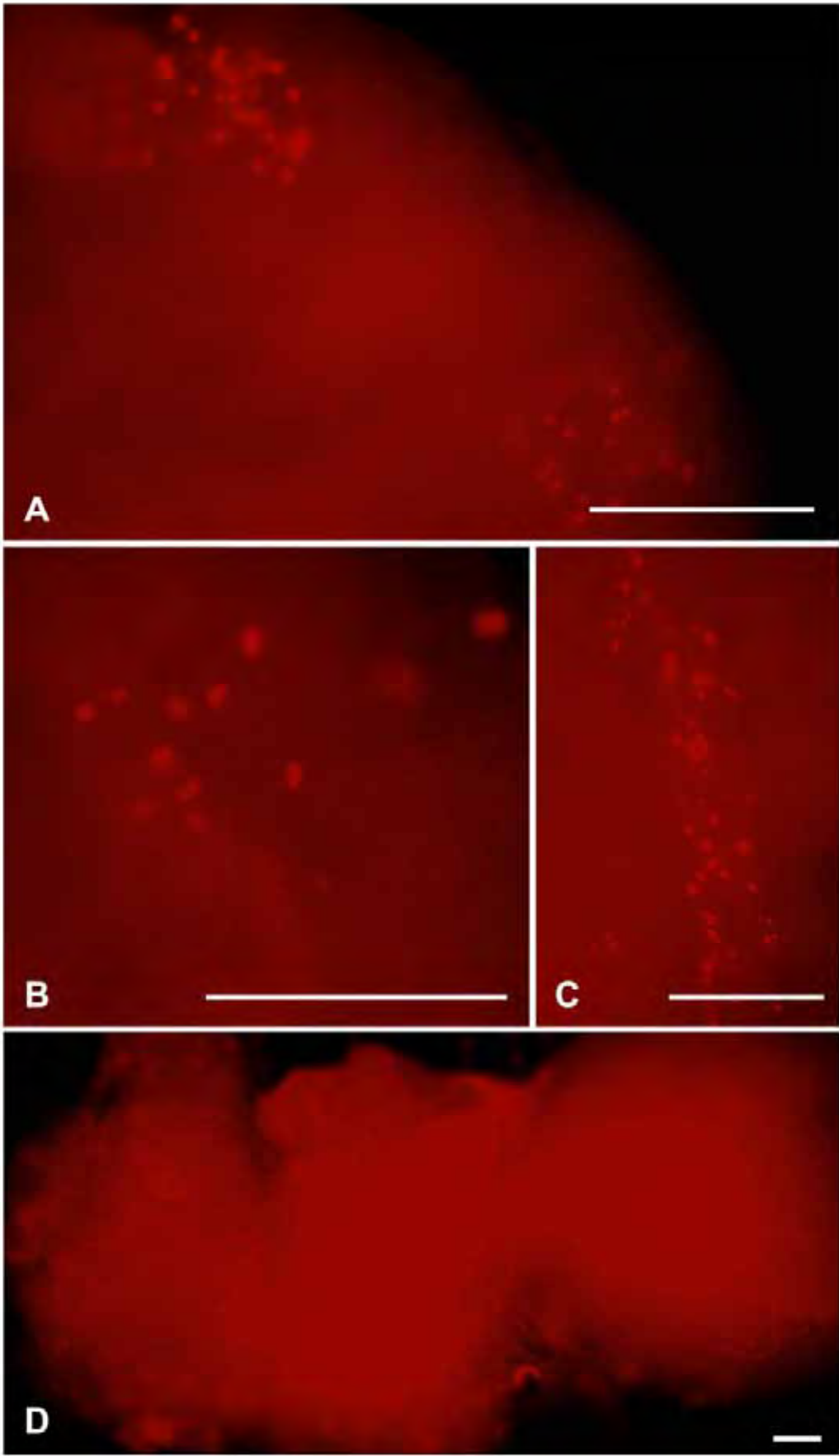
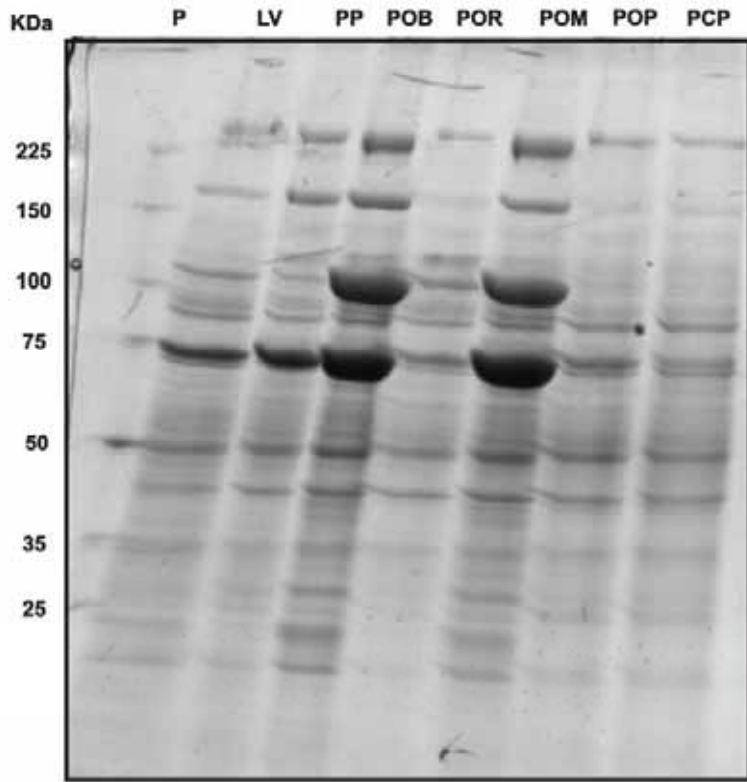
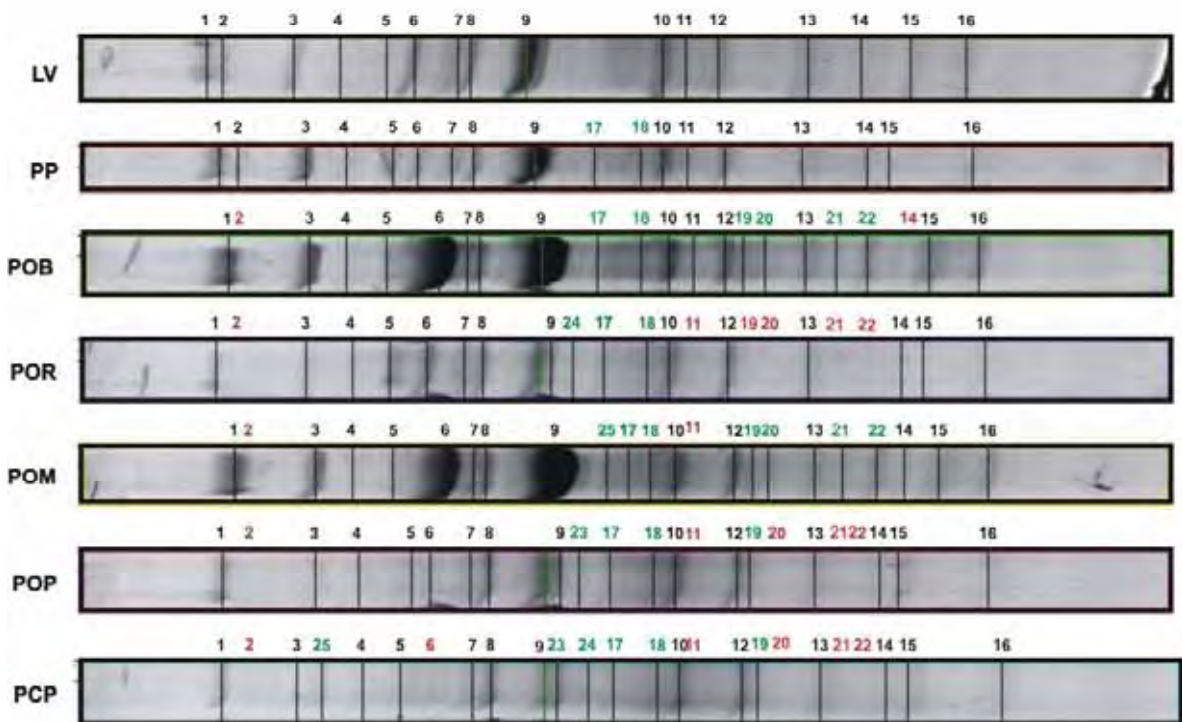


FIGURA 52: Eletroforese unidimensional de homogeneizados de extratos de cérebros de operárias de *A. mellifera* durante a metamorfose. B é um detalhe de A, com as bandas numeradas. Os números em verde correspondem a proteínas que começam a se expressar em determinada fase ou grupo e os números em vermelho, às proteínas que deixam de ser expressas. P=Padrão de Massa Molecular; LV=larvas; PP=pré-pupas; POB=pupas de olhos brancos; POR=pupas de olhos rosa; POM=pupas de olhos marrom; POP=pupas de olhos preto; PCP=pupas de corpo escurecido.

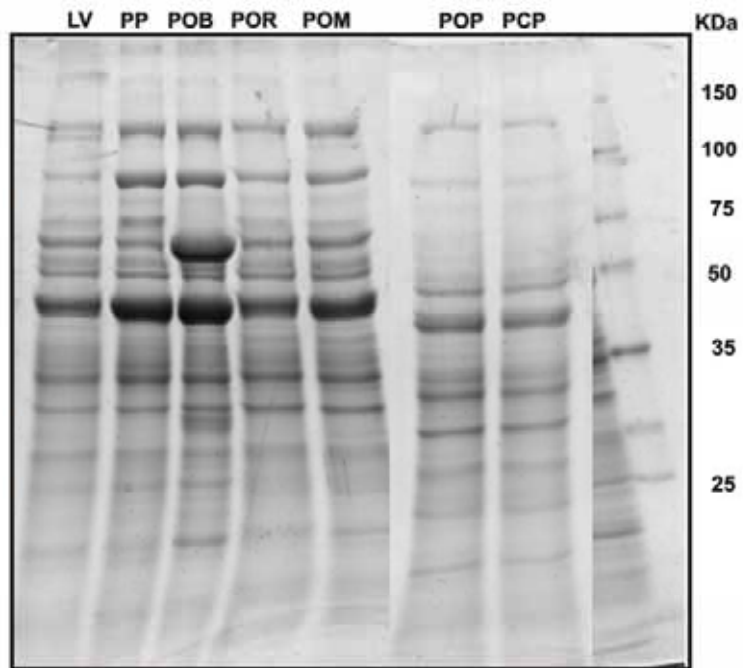


A

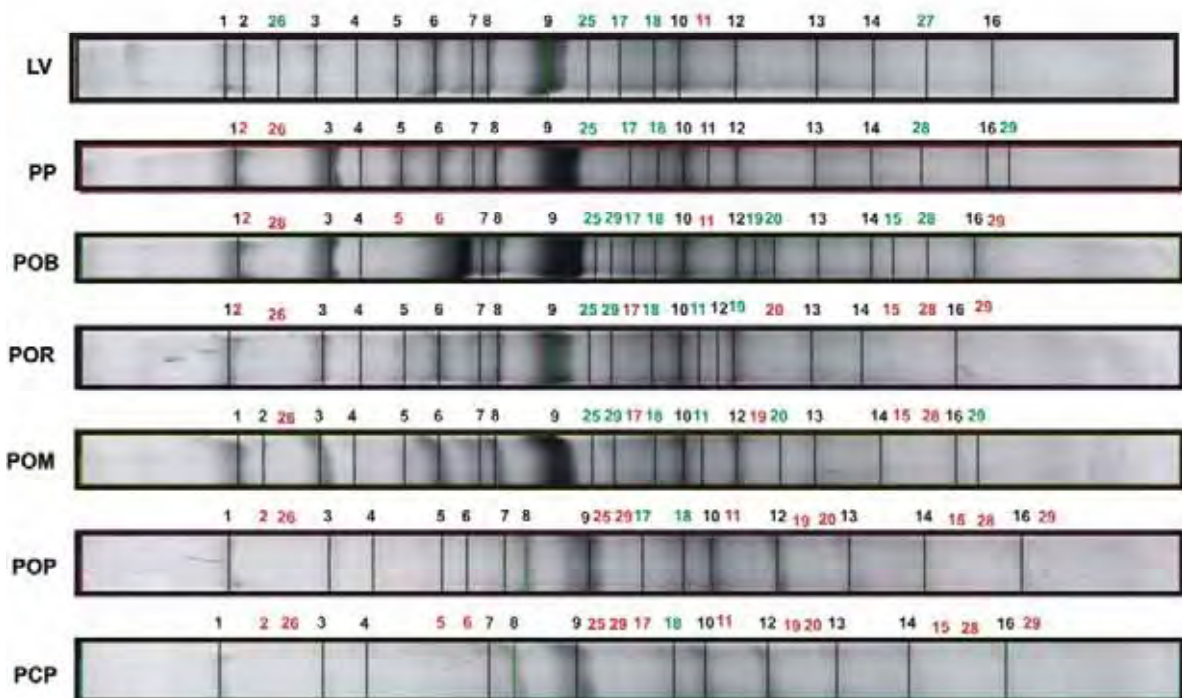


B

FIGURA 53: Eletroforese unidimensional de homogeneizados de extratos de cérebros de rainhas de *A. mellifera* durante a metamorfose. B é um detalhe de A, com as bandas numeradas. Os números em verde correspondem a proteínas que começam a se expressar em determinada fase ou grupo e os números em vermelho, às proteínas que deixam de ser expressas. P=Padrão de Massa Molecular; LV=larvas; PP=pré-pupas; POB=pupas de olhos brancos; POR=pupas de olhos rosa; POM=pupas de olhos marrom; POP=pupas de olhos preto; PCP=pupas de corpo escurecido.

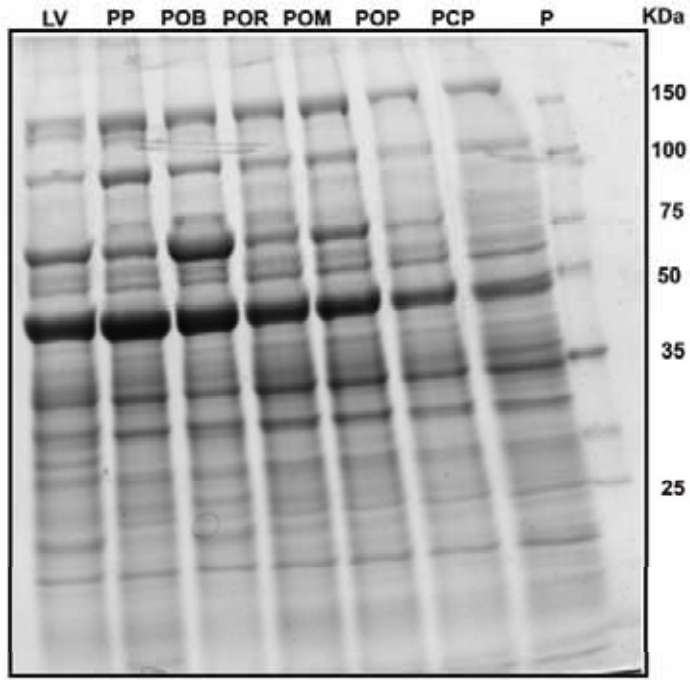


A

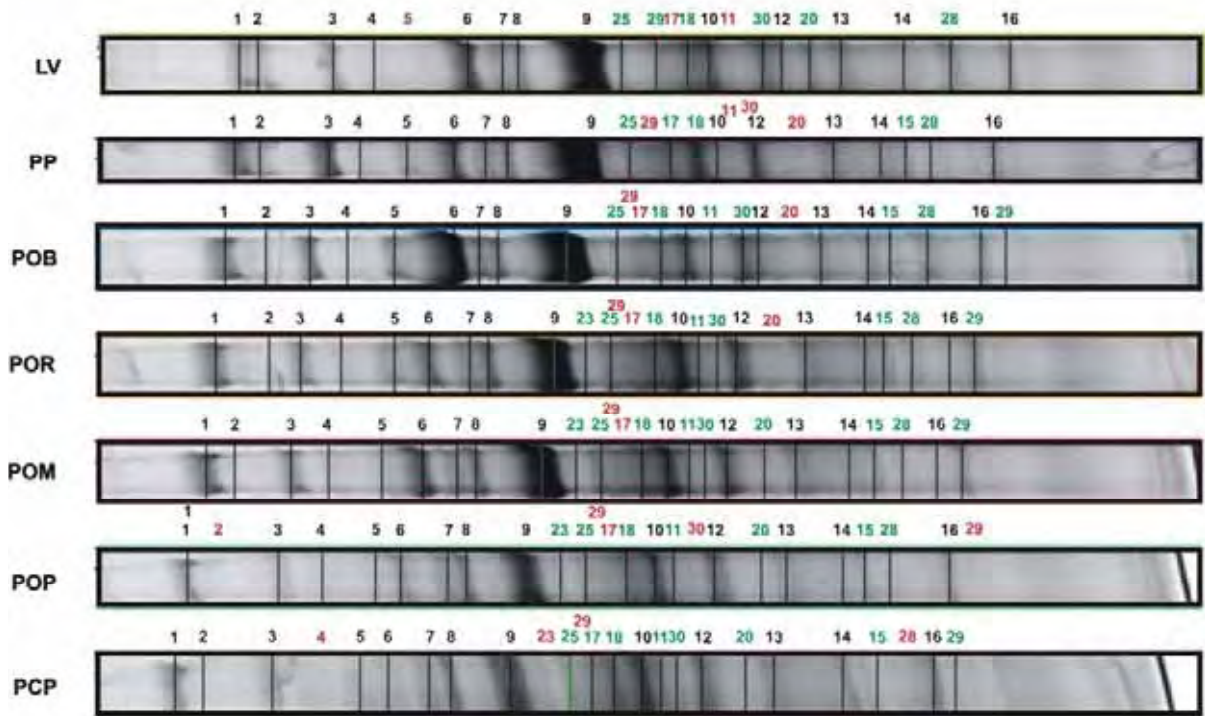


B

FIGURA 54: Eletroforese unidimensional de homogeneizados de extratos de cérebros de zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose. B é um detalhe de A, com as bandas numeradas. Os números em verde correspondem a proteínas que começam a se expressar em determinada fase ou grupo e os números em vermelho, às proteínas que deixam de ser expressas. P=Padrão de Massa Molecular; LV=larvas; PP=pré-pupas; POB=pupas de olhos brancos; POR=pupas de olhos rosa; POM=pupas de olhos marrom; POP=pupas de olhos preto; PCP=pupas de corpo escurecido.



A



B

FIGURA 55: Perfil protéico de extrato do cérebro de operárias (A) e rainhas (B) de *A. mellifera* na fase de pré-pupa. Os *spots* indicados com seta e numerados representam as proteínas que foram identificadas por apresentar diferença de expressão entre operárias e rainhas. PI=ponto isoelétrico.

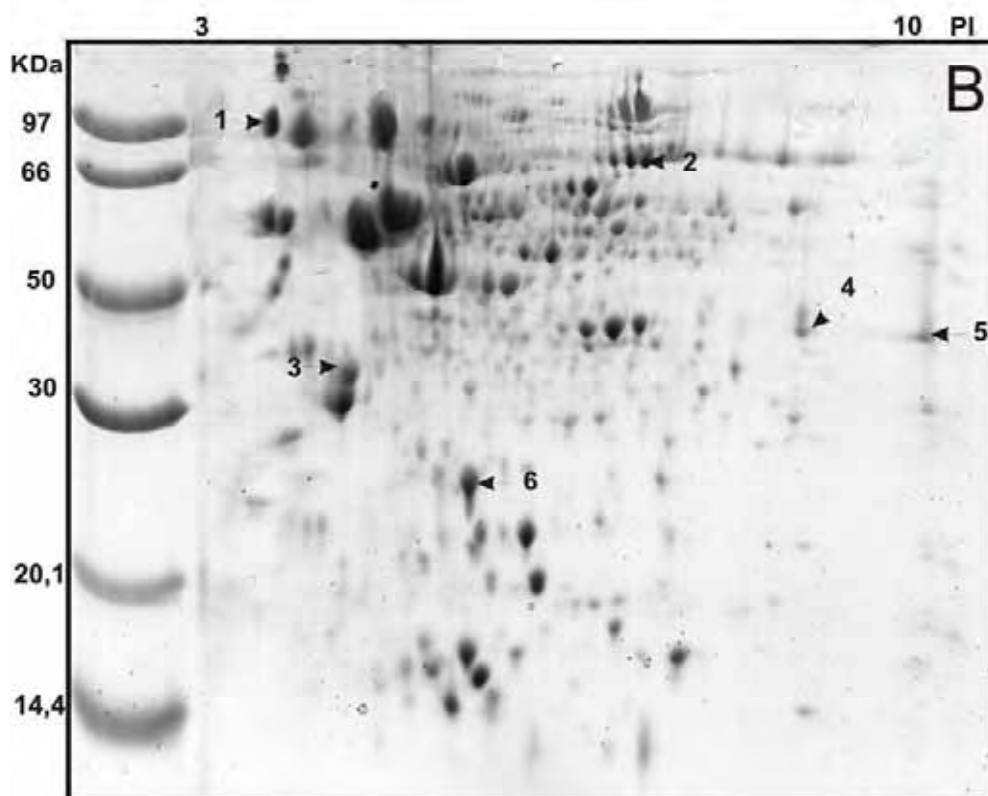
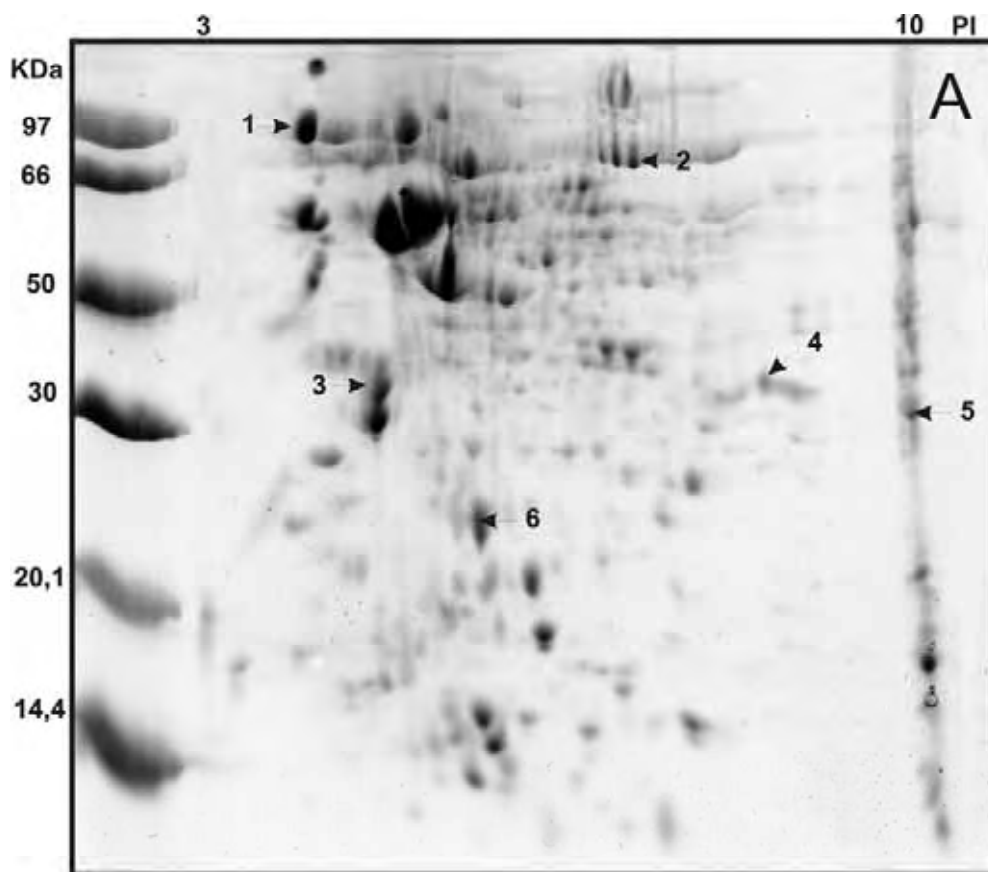


FIGURA 56: Perfil protéico de extrato do cérebro de operárias (A) e zangões (B) de *A. mellifera* na fase de pré-pupa. Os *spots* indicados com seta e numerados representam as proteínas que foram identificadas por apresentar diferença de expressão entre operárias e zangões. Os *spots* apontados em vermelho representam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original. PI=ponto isoelétrico.

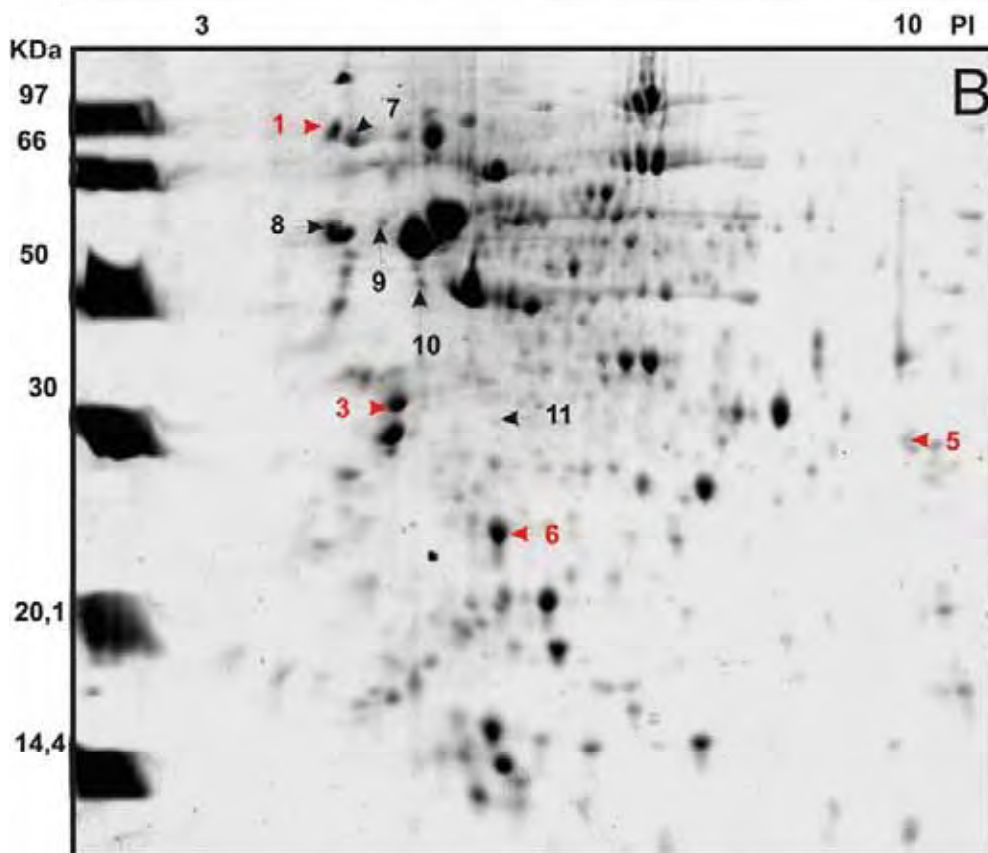
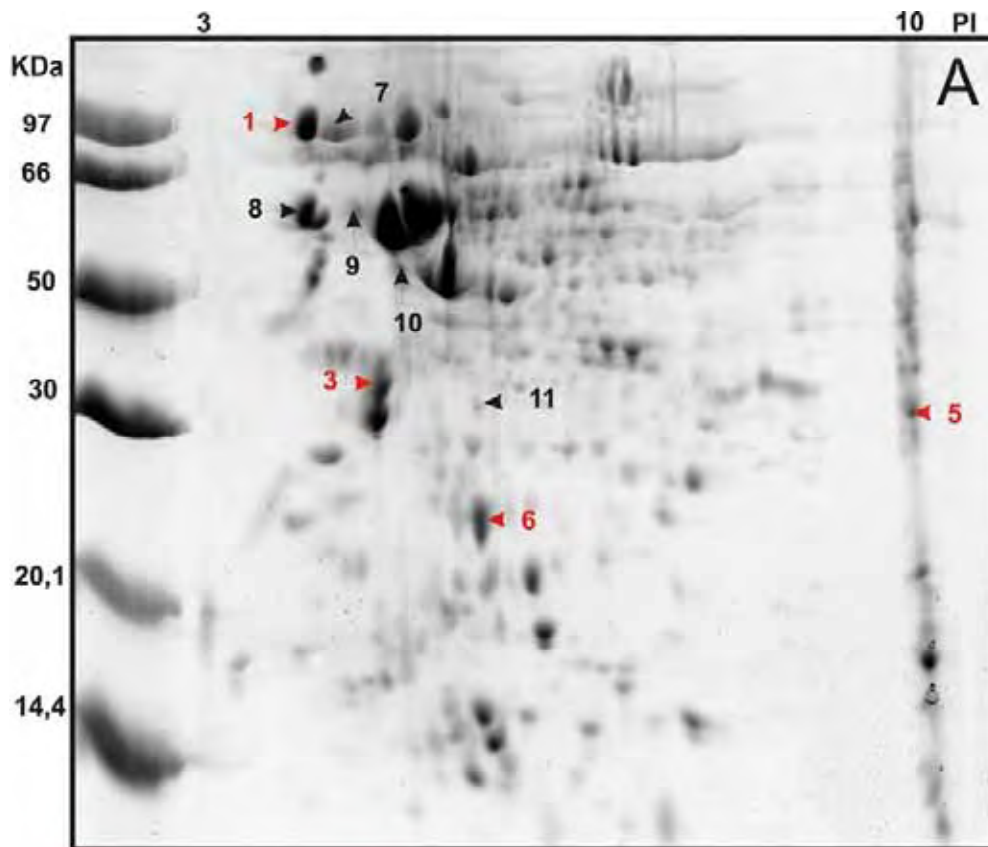


FIGURA 57: Perfil protéico de extrato do cérebro de operárias (A) e rainhas (B) de *A. mellifera* na fase de pupa de olhos pretos. Os *spots* indicados com seta e numerados representam as proteínas que foram identificadas por apresentar diferença de expressão entre operárias e rainhas. Os *spots* apontados em vermelho representam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original. PI=ponto isoeletrico

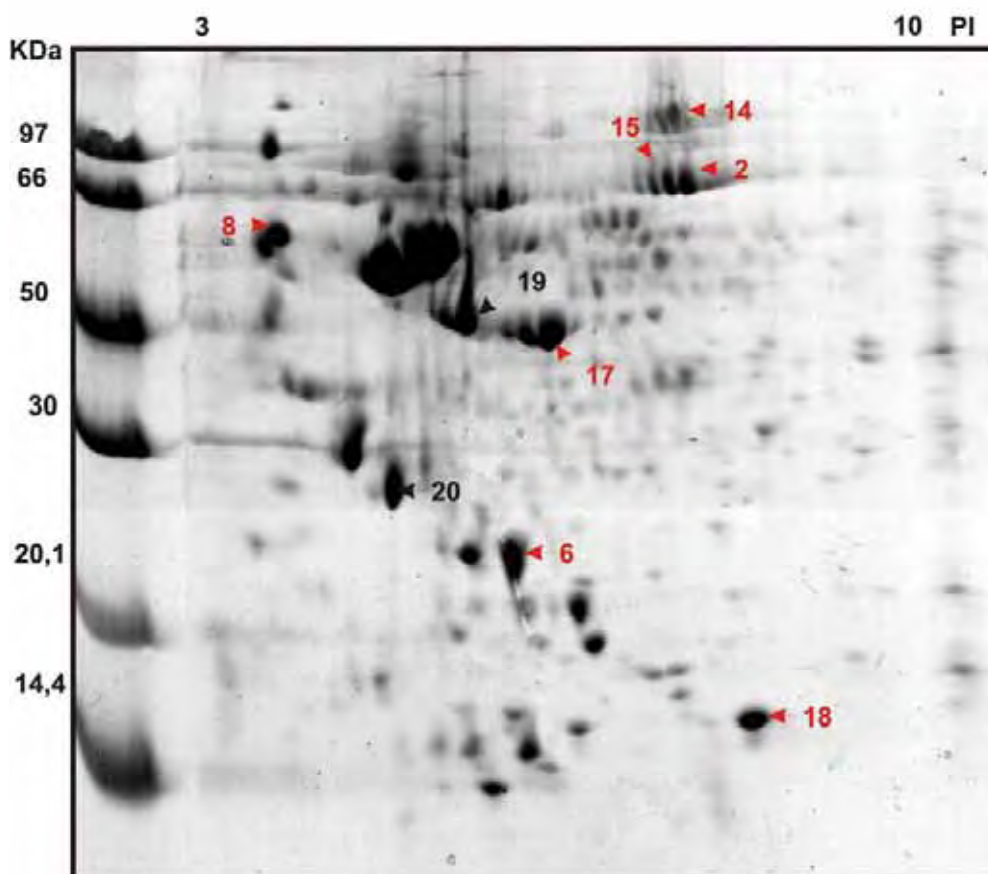
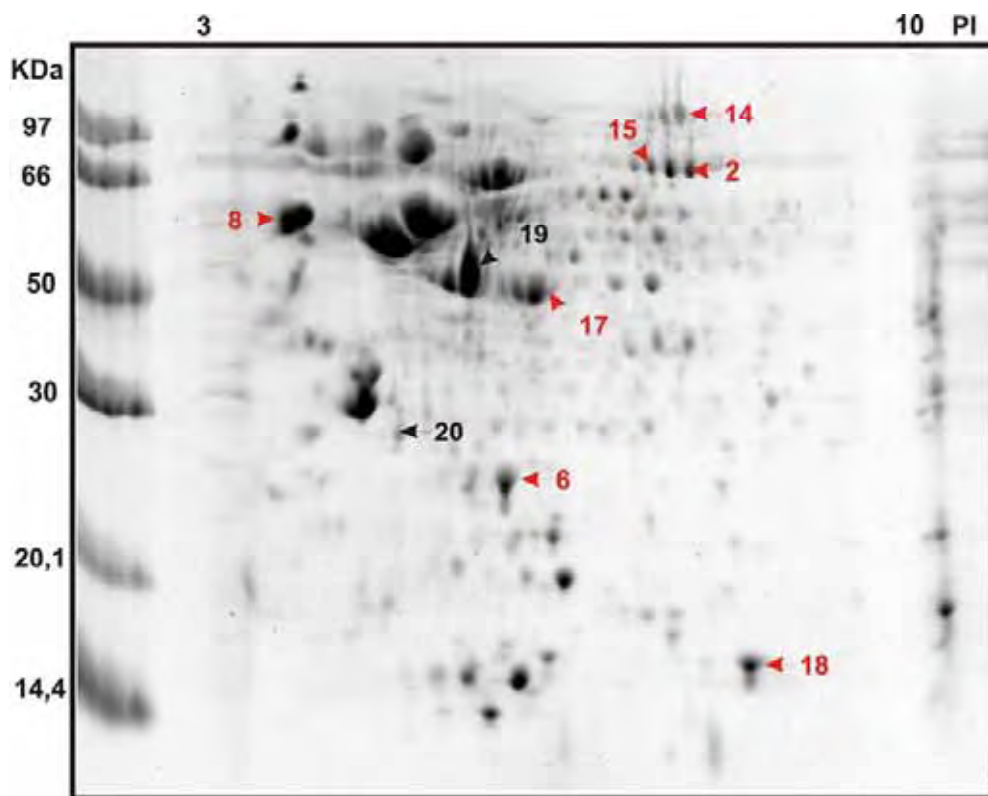


FIGURA 58: Perfil protéico de extrato do cérebro de operárias (A) e zangões (B) de *A. mellifera* na fase de pupa de olhos pretos. Os *spots* indicados com seta e numerados representam as proteínas que foram identificadas por apresentar diferença de expressão entre operárias e zangões. Os *spots* apontados em vermelho representam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original. PI=ponto isoelétrico

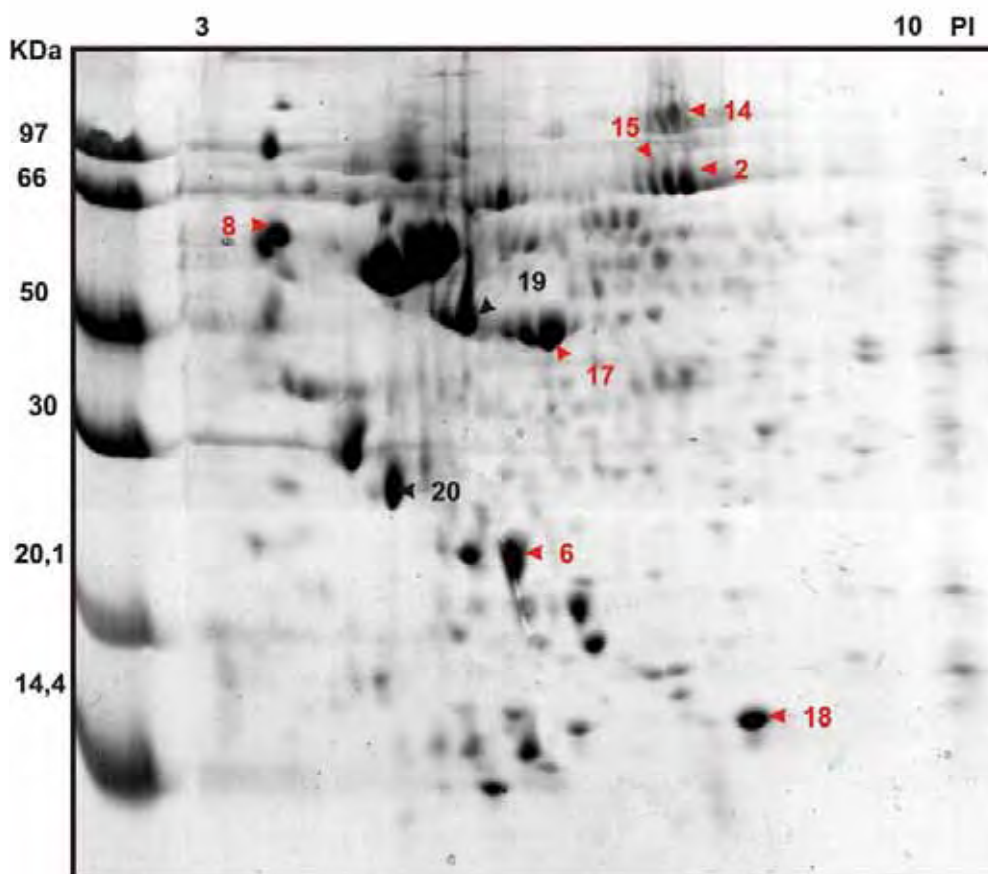
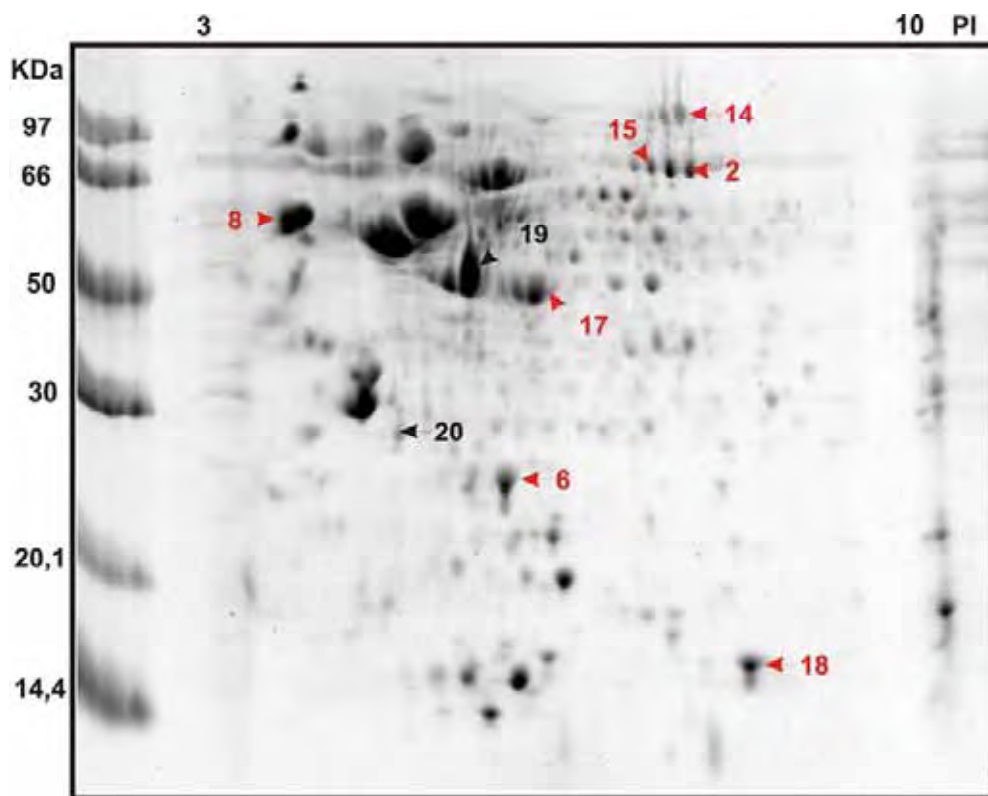


TABELA 1: Concentração de protéica de cada amostra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cérebro do *Apis mellifera* de operárias, rainhas e zangões durante a metamorfose.

Fase do Desenvolvimento/Grupo		Concnetração Protéica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
L	Rainhas	1,754
V	Operárias	0,785
	Zangões	2,167
P	Rainhas	2,177
P	Operárias	2,139
	Zangões	2,986
P	Rainhas	2,619
O	Operárias	2,393
B	Zangões	3,597
P	Rainhas	1,838
O	Operárias	1,659
R	Zangões	2,807
P	Rainhas	2,638
O	Operárias	2,835
M	Zangões	2,713
P	Rainhas	2,609
O	Operárias	1,678
P	Zangões	2,703
P	Rainhas	1,829
C	Operárias	1,688
E	Zangões	2,101

TABELA 2: Tabela mostrando o número total de bandas protéicas obtidas através da eletroforese unidimensional para extratos do cérebro de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose

Fase do desenvolvimento	Operária	Rainha	Zangão
LV	16	19	19
PP	18	20	19
POB	20	20	21
POR	17	18	22
POM	21	20	23
POP	18	15	20
PCE	19	12	21

TABELA 3: Tabela mostrando as bandas com expressão diferencial obtidas através do perfil protéico de extratos do cérebro de operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera* durante a metamorfose.

bandas	Operárias							Rainhas							Zangões						
	LV	PP	POB	POM	POP	PCE		LV	PP	POB	POM	POP	PCE		LV	PP	POB	POM	POP	PCE	
2	X	X						X							X	X	X	X			X
5	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X			X	X	X	X	X		X
6	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X					X	X	X	X				X	X	X	X	X		X
17	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
18	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
19	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
20	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
21	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
22	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
23	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
24	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
25	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
26	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
27	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
28	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
29	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X
30	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X

Tabela 4: Resultado das identificações de proteínas diferencialmente expressas entre operárias e rainhas de *A. mellifera* na fase de pré-pupa. O nível de expressão é comparativo entre estes dois indivíduos.

Spot Número	Diferença de expressão		Número de acesso	Resultado Identificação
	Super PP-Op	Super PP-R		
1		3x	gi 66513092	Proteína hipotética
2		3x	gi 148357839	Hexamerina 70a
3		5x	gi 48096523	similar a 14-3-3 CG31196-PC, isoform C isoform 1 [Apis mellifera]
4		3x	gi 110764441	similar a Ccp84Ad CG2341-PA [Apis mellifera]
5		12x	gi 66513092	similar a Adenilato quinase-2 CG3140-PA [Apis mellifera]
6		3x	gi 66534655	similar a isoforma A da Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, [Apis mellifera]

Tabela 5: Resultado das identificações de proteínas diferencialmente expressas entre operárias e zangões de *A. mellifera* na fase de pré-pupa. O nível de expressão é comparativo entre estes dois indivíduos. Os números em vermelho indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original.

Spot Número	Diferença de expressão		Número de acesso	Resultado Identificação
	Super PP-Op	Super PP-Z		
1		7x	gi 110755329	Proteína hipotética
3		4x	gi 48096523	similar a 14-3-3 CG31196-PC, isoform C isoform 1 [Apis mellifera]
5		22x	gi 66513092	similar a Adenilato quinase-2 CG3140-PA [Apis mellifera]
6		3x	gi 66534655	similar a isoforma A da Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, [Apis mellifera]
7		4x	gi 66512625	Similar a isoforma 2 da proteína de choque térmico 90-alpha [Apis mellifera]
8		3x	gi 66545506	similar a isoforma 1 da Calreticulin CG9429-PA [Apis mellifera]
9		9x	gi 110764347	similar a enzima E-1 [Apis mellifera]
10		3x	gi 66524293	Similar a isoforma A da estubarista CG14792-PA, [Apis mellifera]
11		3x	gi 48096523	similar a 14-3-3 CG31196-PC, isoform C isoform 1 [Apis mellifera]

Tabela 6 Resultado das identificações de proteínas diferencialmente expressas entre operárias e rainhas de *A. mellifera* na fase de pupas de olhos preto. O nível de expressão é comparativo entre estes dois indivíduos. Os números em vermelho indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original.

Spot Número	Diferença de expressão		Número de acesso	Resultado Identificação
	Super POP-Op	Super POP-R		
2		3x	gi 148357839	Hexamerina 70a
12	2x		gi 110764347	similar a enzima E-1 [<i>Apis mellifera</i>]
13		2x	gi 66512625	similar a isoforma 2 da proteína de choque térmico 90-alpha [<i>Apis mellifera</i>]
14		6x	gi 149939407	Proteína de reserva – Glx (hemocianinas)
15		2x	gi 148357839	Hexamerina 70
16		2x	gi 58585146	arginina quinase [<i>Apis mellifera</i>]
17		3x	gi 58585146	arginina quinase [<i>Apis mellifera</i>]
18	3x		gi 58585202	Proteína transportadora de ácido graxo [<i>Apis mellifera</i>]

Tabela 7: Resultado das identificações de proteínas diferencialmente expressas entre operárias e zangões de *A. mellifera* na fase de pupas de olhos preto. O nível de expressão é comparativo entre estes dois indivíduos. Os números em vermelho indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão em outra situação, possuindo a numeração original.

Spot Número	Diferença de expressão		Número de acesso	Resultado Identificação
	Super POP-Op	Super POP-Z		
2		2x	gi 148357839	Hexamerina 70a
6		2x	gi 66534655	similar a isoforma A da Glutathione S transferase S1 CG8938-PA,[<i>Apis mellifera</i>]
8	2x		gi 66545506	similar a isoforma 1 da Calreticulina CG9429-PA [<i>Apis mellifera</i>]
14	2x		gi 149939407	Proteína de reserva – Glx (hemocianinas) High Glx storage protein [<i>Apis mellifera</i>]
15		2x	gi 148357839	Hexamerina 70a
17		2x	gi 58585146	arginina quinase [<i>Apis mellifera</i>]
18		4x	gi 58585202	Proteína transportadora de ácido graxo [<i>Apis mellifera</i>]
19	2x		gi 67782283	actina 5 [<i>Aedes aegypti</i>]
20		4x	gi 66548280	similar a CG1386-PA [<i>Apis mellifera</i>]

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Diferenciação do cérebro

Em insetos hemimetálobos as ninfas necessitam procurar por alimento e abrigo imediatamente após a emergência, assim, precisam ter, já neste estágio, o cérebro bem desenvolvido. Para isso, a duração do estágio embrionário é aumentada e o cérebro da ninfa recém eclodida se assemelha ao do adulto.

Larvas e pupas de insetos holometábolos, como *A. mellifera*, em contraste, não desempenham funções complexas. No caso específico das abelhas eussociais serem criadas na proteção da colônia, não há necessidade nem de à procura de alimento e tampouco de defender-se. Para realizar comportamento tão simples, como o de só se alimentar, não é necessário que os corpos pedunculados estejam completamente formados, mesmo porque, nestes estágios os principais órgãos sensoriais, como os olhos e as antenas dos quais provém a maior parte dos impulsos sensoriais que originam as ordens emanadas desses centros, encontram-se sob a forma de discos imaginiais (PANOV, 1957; FARRIS et al., 1999). Por isso, os presentes resultados mostram que os primórdios dos corpos pedunculados e dos olhos compostos podem ser observados em larvas de 5º instar de operárias, rainhas e zangões, mas sua formação completa-se apenas em pupas de olhos pretos.

6.1.1 Protocérebro

6.1.1.1 Corpos pedunculados

Ao considerar as diferenças entre as classes de indivíduos estudadas no que tange os corpos pedunculados foram levadas em conta as diferenças temporais e de tamanho destas estruturas nessas classes, bem como aspectos das células de Kenyon e da neurópila que forma os cálices e pedúnculos.

As células de Kenyon presentes nos corpos pedunculados apresentam-se distribuídas em três sub-populações, identificadas de acordo com a morfologia, localização e cronologia de diferenciação. Os três subtipos de células de Kenyon puderam ser claramente distinguidos, a partir do estágio de pupas de olhos preto, de acordo com a localização e a morfologia que apresentam ao microscópio de luz.

O fato de existirem sub-populações com características distintivas e diferenciação temporal diferente demonstra que as células de Kenyon não compreendem um grupo isomórfico de neurônios. Segundo Farris et al. (1999) e Strausfeld et al. (2000) diferem com relação aos dendritos, à morfologia dos axônios, ao conteúdo de neuropeptídeos e à outros aspectos da expressão gênica, apesar de segundo as presentes observações todas se originarem da massa de neuroblastos centrais, ainda que em ocasiões diferentes da pupação.

Diversos estudos mostraram que existe variação na expressão protéica nessas células, através imunolocalização. Por exemplo, o receptor para inositol 1,4,5 (KAMIKOUCHI et al., 1998) tipo 2 de quinase protéicas dependentes de cAMP (MÜLLER, 1997) é mais fortemente expresso nas células de Kenyon não compactas. Em contraste, uma proteína encontrada como componente da geléia real é expressa pelas células compactas (KUCHARSKI et al., 1998). Outros padrões de expressão gênica também ocorrem diferencialmente de acordo com a sub-população de células (SAWATA et al., 1998; TAKEUCHI et al., 1998)

A diferenciação das células de Kenyon em tempos diferentes do desenvolvimento pupal reflete-se na organização dos corpos celulares, que formam pequenos grupos no interior do cálice. Segundo Panov (1957) e Farris et al. (1999) a geração de um subtipo somente se inicia quando todos os neurônios do subtipo anterior já se encontram formados.

Apesar da possibilidade de distinguir as sub-populações das células de Kenyon pela morfologia que apresentam com a microscopia de luz e a posição que ocupam no cálice e, apesar da literatura apontar diferenças bioquímicas entre elas, no presente estudo, estas células apresentaram-se ultra-estruturalmente bastante semelhantes, estando as diferenças relacionadas principalmente ao seu tamanho, ou mais especificamente à quantidade de citoplasma.

Os corpos pedunculados são formados também pelos prolongamentos nervosos das células de Kenyon que formam o cálice e o pedúnculo. Segundo Menzel et al. (1994) os cálices dos corpos pedunculados são detectados primeiramente no estágio de pré-pupa, como uma pequena e homogênea massa de neurópila. No entanto, no presente estudo, observou-se primeiramente a formação do pedúnculo já no estágio de larva de 5º instar, em todas as classes de indivíduos. Somente a partir do estágio de pupa de olhos brancos, a região do cálice começou a se distinguir das outras. A partir do estágio de pupa de olhos rosa a borda e o colar passam a estar presentes em operárias e zangões, sendo que a base do cálice só é observada no estágio de pupa de olhos marrom. O aparecimento da base do cálice por último está de acordo com a verificação de Farris e Sinakevitch (2003) de que esta neurópila é formada por prolongamentos dos neurônios compactos internos, os últimos a se diferenciarem. Em pupas de olhos pretos a formação do cálice está completa. No entanto, esta estrutura continua aumentando de tamanho até poucos dias após a emergência do adulto (FARRIS et al., 1999; HÄHNLEIN e BICKER, 1997; DURST et al., 1994, FAHRBARCH et al., 1998). O crescimento após a emergência deve-se a formação de novos dentritos e axônios, ou seja, ao estabelecimento de novas conexões nervosas na medida em que as tarefas características da casta vão sendo implementadas.

Verificou-se defasagem entre o aparecimento dos componentes da neurópila dos corpos pedunculados entre as classes de indivíduos estudados. A presença da borda e do colar do cálice foi observada em pupas de olhos rosa para operárias e zangões e, para rainhas, somente no estágio de pupas de olhos marrom estas estruturas estão presentes, observando-se a completa formação dos corpos pedunculados somente em pupas de olhos pretos. Portanto, ocorre nas rainhas um atraso na diferenciação das regiões da neurópila.

Poder-se-ia esperar que o atraso na diferenciação corresponde-se a menor quantidade nesta casta de células de Kenyon que enviam os prolongamentos para a formação desta neurópila. No entanto, a morfometria revelou que a área ocupada por estas células, não apresenta diferenças significativas a partir da fase de pupas de olhos pretos entre as classes de indivíduos. Segundo Farris e Sinakevitch (2003) a região basal do cálice dos corpos pedunculados é formada pelos prolongamentos das células de Kenyon pertencentes à sub-população do tipo células compactas internas, que são as últimas a se diferenciarem. Como no presente estudo foram feitas medidas da área ocupada por células de Kenyon, sem ser levada em conta a sub-população a que pertenciam, o fato de ocorrer um atraso na diferenciação desta região do cálice em rainhas, pode sugerir um atraso na diferenciação de neuroblastos em células de Kenyon pertencentes a esta sub-população. Assim, as diferenças na organização da neurópila, devido a serem resultantes da produção de prolongamentos, dendritos e axônios, pelas células de Kenyon são indicativos do estado de diferenciação dessas células e as diferenças de organização entre os indivíduos num dado estágio de desenvolvimento devem refletir o estabelecimento ou preparação de conexões quantitativa ou qualitativamente diferentes dentro do sistema nervoso, nesses indivíduos.

Os dados presentes mostram que ao final da diferenciação, os corpos pedunculados das operárias recém-emergidas têm taças mais profundas que as rainhas e os machos. Nos machos, a diferença é bem nítida, ficando as taças rasas e alargadas, mas em todos os indivíduos, as células de Kenyon são muito numerosas.

Estudos de Cruz-Landim e Zaniboni (1986, 1987) mostraram que em operárias de *Bombus atratus* os corpos pedunculados ocupam 47% da área do protocérebro, excluindo os lobos ópticos, enquanto em operárias das espécies de meliponíneos estudadas a área ocupada variou de 34 a 38%. Mostraram também que nas fêmeas das espécies solitárias a tendência é que a porcentagem da área ocupada por estas estruturas seja ainda maior. Admitindo-se que o tamanho destas estruturas esteja relacionado à complexidade do comportamento do indivíduo, o resultado justifica-se pelas fêmeas das espécies solitárias acumularem tarefas de reprodução, de construção e aprovisionamento do ninho, trabalho que nas espécies sociais se acha repartido entre as castas. Portanto, como cabe às operárias de *A. mellifera* o desempenho de tarefas mais complexas e

diversas que das rainhas e machos, o comportamento justificaria o maior desenvolvimento dos corpos pedunculados encontrado nesta casta.

Demonstra que o tamanho dos corpos pedunculados está relacionado à complexidade do comportamento do inseto o fato dessas estruturas serem pequenas em Collembola, Heteroptera, Diptera e Odonata, um pouco maiores em Coleóptera, Orthoptera, Blattodea e Lepidoptera e, altamente desenvolvidas nos insetos sociais. Em cupins o pedúnculo é bastante desenvolvido e o cálice ocupa somente um terço do volume total dos corpos pedunculados (CRUZ-LANDIM e ZANIBONI, 1986/1987). Em abelhas e vespas sociais o cálice é grande e muito complexo, representando 70% do volume total. Em *A. mellifera*, as operárias têm cerca de 170.000 células Kenyon por hemisfério cerebral, representando cerca de 40% do total de neurônios presentes no cérebro, enquanto a mosca *Calliphora* tem somente aproximadamente 21.000 células Kenyon, ou seja, 12% dos neurônios totais do cérebro (WITTHOFT, 1967; FARRIS et al., 1999), mais uma vez mostrando a relação destes órgãos cerebrais com a complexidade comportamental.

Além disso, em *Drosophila* e em *A. mellifera*, sabe-se que mudanças também ocorrem nos corpos pedunculados de acordo com a idade do inseto. Em *Drosophila*, na primeira semana de vida, o número de fibras presentes nesta estrutura aumenta em 20%, ocasionando um aumento no volume do cálice. Em *A. mellifera*, as abelhas forrageiras apresentam o colar e a borda do cálice maior quando comparados com nutridoras (TECHNAU, 1984; HEISEMBERG et al., 1995). Como já comentado anteriormente, é esperado que à medida que o adulto vai amadurecendo e assumindo as tarefas que lhe cabem, novas conexões nervosas sejam estabelecidas, resultantes do crescimento de novos prolongamentos do soma, principalmente dendritos, embora, no adulto, não existam mais neuroblastos e os neurônios diferenciados não se dividam.

Os resultados da morfometria reforçam os obtidos pelas análises morfológicas, sendo possível demonstrar assincronia no desenvolvimento das estruturas cerebrais, entre operárias, rainhas e zangões através das medidas realizadas.

Os resultados morfométricos mostraram que pupas de olhos pretos de operárias apresentam média da área com neuroblastos significativamente maior que de rainhas e zangões desta fase. Não foram feitas medidas além desta fase mas, embora as operárias não apresentem média da área de células de Kenyon estatisticamente maior que rainhas

e zangões, provavelmente apresentarão no adulto maior número destas células, visto que os neuroblastos ainda presentes na fase de pupa de olhos pretos destes indivíduos, diferenciar-se-ão em células de Kenyon nas fases posteriores. Em rainhas e zangões, nas pupas de olhos pretos a área ocupada por neuroblastos é significativamente menor que em operárias. Este fato é ainda mais reforçado levando-se em consideração que as operárias apresentam área de morte celular nos corpos pedunculados significativamente menor que as rainhas.

Em concordância com o provável maior número de neurônios nos corpos pedunculados, está a maior largura do pedúnculo nas operárias. O pedúnculo dos corpos pedunculados é formado por axônios das células de Kenyon e, visto que cada neurônio tem apenas um axônio, a grossura do pedúnculo pode ser devida ao maior número destes, o que significaria maior número destas células em operárias. Mas, a grossura também pode ser atribuída à presença de axônios mais grossos, o que de qualquer forma, significaria maior especialização nas operárias, já que maior quantidade de axônios no pedúnculo sugere resposta para mais estímulos e axônios mais grossos são mais rápidos na transmissão destes estímulos (CHAPMAN, 1998). Portanto, o pedúnculo de operárias, por apresentar maior largura deve estar relacionado com a diversidade de estímulos a que esta casta deve responder a fim da correta manutenção da colônia.

Os cálices dos corpos pedunculados, que são formados por dendritos das células de Kenyon, são mais profundos nas operárias recém-emergidas que nas rainhas e nos machos na mesma fase. Além de em um primeiro momento as maiores áreas destas estruturas significarem maior número de células de Kenyon, de onde partem estes prolongamentos celulares, a expansão da neurópila, também representa um aumento da arborização das células de Kenyon dentro do cálice e do pedúnculo, devido ao crescimento de novos processos neurais destas células, ou até a combinação de todos estes eventos. Qualquer uma destas condições pode alterar o número de sinapses estabelecidas pelas células e está relacionado ao processamento de informações pelos corpos pedunculados (ROBINSON et al., 1997).

A diminuição da área de neuroblastos e maior número de mortes celulares nos corpos pedunculados de pupas de olhos pretos de rainhas, acompanhada da diminuição da largura do pedúnculo observado em rainhas recém-emergidas, sugerem que nesta

casta, os corpos pedunculados devem atender a demanda de menor resposta a estímulos. A diminuição da espessura do pedúnculo nas rainhas recém-emergidas deve-se à degeneração dos prolongamentos nervosos das células que morreram. As análises morfométricas mostraram que operárias recém-emergidas apresentam a média da largura dos pedúnculos e da área do cálice significativamente maiores que rainhas e zangões, confirmando a capacitação do seu sistema nervoso para a maior complexidade de tarefas que lhes cabem.

6.1.1.2 “Pars intercerebralis”

Algumas diferenças entre as classes de indivíduos puderam também ser observadas na *pars intercerebralis*, onde se localizam as células neurosecretoras que produzem o hormônio proto-toracicotrópico (PTTH). Este hormônio estimula a glândula protorácica a produzir ecdisona. Assim, cada período de produção de ecdisona é precedido por um pico de PTTH. No final do período larval de *Manduca*, e provavelmente também nos outros insetos, a produção de PTTH é inibida por altas concentrações de hormônio juvenil. Assim, o fato desta região não se encontrar indiferenciada na larva de 5º estágio, deve ter essa causa. Além disso, o fato de rainhas apresentarem células neurosecretoras contendo mais secreção em praticamente todas as fases estudadas sugere uma maior necessidade de produção deste hormônio, para que a metamorfose ocorra, já que o período de desenvolvimento de rainhas é mais rápido que o das operárias.

Além do envolvimento dos ecdisteróides na metamorfose, sabe-se que estes hormônios desempenham muitas outras funções. Em *Manduca* o pico pré-pupal de ecdisteróide age sobre os dendritos de alguns neurônios motores, podendo causar a regressão e até mesmo a morte destes neurônios. Portanto, os ecdisteróides agem diferentemente sobre diferentes tipos de neurônios, matando os larvais que não terão função no adulto e promovendo a diferenciação dos que atuarão nessa fase. Isso poderia justificar em parte, o fato de rainhas apresentarem células mais coradas nas fases de pupas de olhos brancos e rosa, fase em que ocorre grande extensão de morte celular nos lobos ópticos e dos zangões apresentarem células pouco coradas durante todas as fases do desenvolvimento, já que apresentam p taxa de morte celular durante a metamorfose.

6.1.1.3 Lobos ópticos

Os lobos ópticos são projeções laterais do protocérebro que se ligam à parte epidérmica dos olhos compostos. Cada lobo óptico consiste de três massas ou camadas de neurônios e respectivas neurópilas, de dentro para fora denominadas lóbulo, medula e lâmina e de uma camada reticular logo abaixo da parte tegumentar dos olhos. Em cada camada, os corpos celulares dos neurônios localizam-se na periferia e seus prolongamentos formam a neurópila central, assim o soma aparece nas laterais dos lobos ópticos, com exceção da camada reticular que fica logo abaixo da porção epidérmica do olho composto. Entre as camadas ocorrem os quiasmas dos prolongamentos nervosos, sendo o quiasma externo entre a lâmina e a medula e o quiasma interno, entre a medula e o lóbulo.

Os resultados mostraram que a diferenciação desta estrutura cerebral ocorre da mesma forma em operárias, rainhas e zangões, não apresentando diferenças temporais e estruturais durante o seu desenvolvimento. A principal diferença observada foi em relação à taxa de morte celular. Este processo foi mais freqüente nos lobos ópticos de rainhas e menos freqüente em machos. Além disso, conforme mostrado pela técnica de imuno-marcação da histona H3 fosforilada, nos machos o período de divisão celular é maior que em rainhas e operárias. Estes resultados sugerem que, concomitantemente à diferenciação dos lobos ópticos, algumas células morrem, mas as mortes e divisões são quantitativamente diferentes entre os indivíduos. Sendo assim, menor número de mortes e maior número de divisões celulares, podem significar maior quantidade de neurônios e, conseqüentemente, maior número de conexões nervosas e maior acuidade visual. Por outro lado, a acuidade visual pode estar relacionada à função que cada membro da colônia exerce. Os zangões, como indivíduos essencialmente reprodutores, precisam ter os órgãos dos sentidos, visão e olfato (como mostrado a seguir) bastante desenvolvidos por ocasião da emergência, momento em que é realizado o vôo nupcial e ocorre a cópula. Para operárias, a visão será importante principalmente durante a fase de forrageira, em que realizam trabalhos externos à colônia, enquanto que para a rainha a visão teria importância menor. Ocorrência de maior taxa de morte celular nos lobos ópticos de rainhas em relação às operárias e destas em relação aos machos e, maior taxa de divisão nos machos, já era esperada. As rainhas têm de 3 a 4 mil omatídeos por olho composto, enquanto as operárias têm de 4 a 5 mil e os zangões de 7 a 8 mil

(SNODGRASS, 1956). Parece então, que a diferenciação dos olhos compostos entre estas classes de indivíduos é modelada tanto pela proliferação quanto pela morte celular.

6.1.2 Deuterocérebro

6.1.2.1 Lobos antenais

O deuterocérebro é formado pelos lobos antenais, os centros motores e mecanosensoriais da antena. Nas antenas das abelhas localizam-se os principais órgãos sensoriais olfatórios, os quais são de essencial importância nas interações sociais, muitas das quais feitas através de feromônios, na maioria substâncias voláteis.

O número de receptores olfatórios varia muito entre as castas e sexos de abelhas eussociais (CRUZ-LANDIM, 2006). Só para exemplificar, em *A. mellifera* Snodgrass (1956) relata a presença de 30.000 sensilos placóides na antena do zangão, 3.600 a 6.000 nas operárias e 3.000 nas rainhas.

O soma dos neurônios que formam esses órgãos encontra-se na própria antena e seus axônios dirigem-se para os lobos antenais onde estabelecem conexões com dendritos de neurônios locais, através dos quais se comunicam com os corpos pedunculados. Assim a neurópila dos lobos antenais é formada pelas terminações nervosas dos neurônios sensoriais das antenas, de células de Kenyon dos corpos pedunculados e dos neurônios motores das antenas, cujo soma se localiza dorsalmente, envolvendo parcialmente a neurópila.

Durante o desenvolvimento dos lobos antenais, verifica-se, que primeiramente a neurópila desta estrutura tem aspecto homogêneo e, dependendo da fase, do sexo e casta considerada, começam a aparecer estruturas globulares na periferia, chamadas de pré-glomerulos, que são regiões de neurópila adensada, formadas por prolongamentos dos neurônios sensoriais. Estas aumentam de tamanho, formando os glomerulos. Segundo Arnold et al. (1984), o pré-glomerulo de operárias de *A. mellifera* tem aproximadamente 27 µm diâmetro, enquanto que o glomerulo de adulto tem de 44 a 50 µm de diâmetro.

Portanto, os lobos antenais dos adultos consistem de uma massa de neurópila, arranjada em diversos novelos de fibras nervosas concêntricas e compactas, os glomerulos, locais onde axônios provenientes neurônios olfatórios presentes nas antenas terminam e fazem sinapse. Cada tipo de axônio, ou seja, os axônios provenientes de

cada tipo de sensilo antenal, conecta-se somente com um determinado glomérulo, de maneira que a informação olfatória é separada no interior da neurópila glomérulo (HANSSON et al., 1992; CHRISTENSEN et al., 1995).

Dentro dos lobos antenais, interneurônios locais inervam muitos, ou até mesmo todos os glomérulos. Estes interneurônios locais retransmitem a informação para outros neurônios, que conectam os lobos olfatórios aos corpos pedunculados e a outras partes do protocérebro, onde a informação é processada e a resposta é produzida. As características fisiológicas destes interneurônios variam. Alguns respondem somente quando os receptores antenais são estimulados por odores específicos, como um componente de feromônio. Poucos respondem quando a antena é estimulada por misturas específicas de componentes com particular importância para a espécie. Outros interneurônios, no entanto, respondem quando a antena é exposta a qualquer um de uma gama de odores (HANSSON e ANTON; 2000; CHRISTENSEN et al., 1995).

Os resultados do presente trabalho mostraram diferenças temporais no desenvolvimento dos lobos antenais entre operárias, rainhas e zangões. Assim, durante a pupação, o desenvolvimento desta estrutura é mais rápido em zangões, seguido por rainhas, sendo que operárias apresentam o desenvolvimento mais lento. Apesar das diferenças temporais e de tamanho dos lobos antenais durante o seu desenvolvimento, as três classes de indivíduos ao emergirem apresentam os lobos antenais completamente estruturados, mostrando a importância deste órgão desde o início da vida adulta.

Arnold et al. (1985) contaram 166 ± 2 glomérulos nas operárias e 103 ± 1 nos machos de *A. mellifera*. Estes mesmos autores descreveram a presença de dois tipos de glomérulos em operárias e um complexo glomerular, representado pelo super desenvolvimento dos glomérulos em zangões. No entanto, o presente estudo mostra que os indivíduos recém-emergidos não apresentam diferenças significativas na área ocupada pela neurópila dos lobos antenais, embora durante o desenvolvimento pupal, os machos apresentem área significativamente maior em praticamente todos os estágios do desenvolvimento. Isto significa que no adulto as diferenças entre os indivíduos no que diz respeito a esta parte do cérebro deve-se mais à sua organização interna que ao seu tamanho.

Para rainhas e, principalmente para os zangões a estruturação precoce dos lobos antenais é necessária para a realização das atividades de acasalamento, que

desenvolvem logo que emergem, enquanto que para operárias esta estrutura é necessária tanto para as interações intra como para as extra-nidais que tem a percepção feromonal como habilidade crucial.

O presente estudo mostra também que apesar do número extremamente maior de órgãos sensoriais presentes nas antenas dos zangões e da complexidade de glomérulos na sua neurópila, a área ocupada por esta não é significativamente maior, evidenciando poucas interações com interneurônios que promovem diversificação de respostas aos estímulos recebidos.

A discussão acima mostra que os estudos morfológicos desenvolvidos detectaram diferenças no desenvolvimento das estruturas cerebrais entre operárias, rainhas e zangões. Os corpos pedunculados têm desenvolvimento mais lento em rainhas e os lobos olfatórios demoram mais para se formar em operárias. As diferenças entre zangões e rainhas são similares àquelas encontradas entre sexos em outras espécies de animais e devem ser devidas a suas funções no acasalamento. As diferenças entre as castas devem ser devidas à divisão do trabalho reprodutivo e de manutenção da colônia entre as fêmeas.

6.2 Morte celular durante a diferenciação do cérebro

O estudo das mortes celulares no cérebro nas diferentes castas e sexos que compõe a colônia de *A. mellifera*, durante a pupação, fase em que as estruturas larvais são remodeladas para adquirir as características presentes na forma adulta, além de verificar a ocorrência, procurou enfatizar o local e a quantidade de células nesse processo, através de diversas técnicas que destacam características presentes nas células que estão morrendo.

Todas as técnicas utilizadas foram de natureza a mostrar alterações morfológicas na células, como a coloração com a variante da CEC do azul de toluidina, o corante fluorescente acridine-orange e a ultra-estrutura, ou bioquímicas, como o TUNEL que mostra quebras do DNA. Estas técnicas mostraram que mortes estão presentes desde fase de larva de 5º instar e continuam até a fase de pupas de olhos pretos, com diferenças quanto ao local e fase em que acontecem, entre as classes de indivíduos.

Os resultados revelaram que nos corpos pedunculados a morte celular acontece durante os estágios de larvas de 5º instar e, principalmente durante a fase de pupa de olhos pretos nos neuroblastos. Estes resultados sugerem que na larva devem estar sendo eliminados neurônios que tinham função apenas nesta fase e que nas pupas de olhos pretos as mortes estão contribuindo para a modelagem das estruturas cerebrais próprias de cada classe. As análises morfológicas realizadas também mostraram a presença de células com núcleos condensados nos corpos pedunculados, nesta fase.

Em pupas de olhos pretos, na região dos neuroblastos, foram observadas células com núcleos condensados picnóticos, indicando que todas as células desse tipo foram eliminadas nesta fase, pois, a partir da fase de pupas de corpo escurecido os neuroblastos não estão mais presentes e só existem células de Kenyon nos corpos pedunculados.

Fahrbach et al. (1995), Farris et al. (1999), Ganeshina et al. (2000) já haviam observado que os neuroblastos de *A. mellifera*, sofrem morte celular programada durante a metade do estágio de pupa e desaparecem totalmente antes da emergência do adulto. Os neuroblastos de *Drosophila* também sofrem morte celular durante o período pupal (TECHNAU, 1984; ITO e HOTTA, 1992), e a presença de neuroblastos nos corpos pedunculados de adultos de insetos holometálobos, foi observada somente em algumas espécies de Coleoptera (BIEBER e FULDNER, 1979; CAYRE et al., 1996)

Trabalhos realizados por GANESHINA et al. (2000) sobre a proliferação e a morte celular que ocorrem nos copos pedunculados de *A. mellifera* durante a metamorfose, revelaram que as mortes celulares nos corpos pedunculados acontecem durante os estágios P4 à P5, sendo este período dividido em 4 fases: P4 inicial, pupas de olhos marrom escuro e corpo branco, P4 tardio, pupas com os primeiros sinais de escurecimento do tegumento na base das asas ou na junção tibiotarsal dos dois primeiros pares de pernas, com o resto do corpo branco e os olhos marrom bem escuro, quase preto. O estágio P5 inicial é caracterizado por apresentar as junções tibiotarsal dos dois primeiros pares de pernas totalmente pigmentadas, as junções do terceiro par de pernas estão brancas, o corpo é amarelado e os olhos estão quase pretos, e, o estágio P5 tardio é caracterizado por possuir os olhos completamente pretos, mas o corpo ainda não está totalmente escurecido. Estes autores mostraram que no período P4 inicial os primeiros núcleos apoptóticos aparecem no limite entre os neuroblastos e as células de Kenyon e durante os períodos P4 tardio e P5 inicial as células apoptóticas se espalham e passam a ocupar a região basal do grupo de neuroblastos. De acordo com a divisão de fases destes autores, a fase de pupa de olhos pretos, utilizada no presente estudo, corresponde ao estágio P4, portanto, nossos resultados concordam com os obtidos por aqueles autores.

Segundo Ganeshina et al. (2000) somente os precursores neurais sofrem morte celular nos corpos pedunculados durante os estágios P4 e P5, mostrando através de estudos ultra-estruturais que estas mortes têm características morfológicas de apoptose, como, condensação cromatínica, fragmentação do envelope nuclear e fragmentação celular. Conforme observado pelas análises morfológicas no presente estudo e pelos dados morfométricos obtidos, a diferenciação dos corpos pedunculados inclui uma fase de intensa morte celular. A morfometria mostrou que é na fase de pupa de olhos pretos que em rainhas este processo é mais intenso e a morfologia e a reação TUNEL que estas são classificáveis como apoptose.

No entanto, nem toda morfologia típica deste tipo de morte esteve presente nas observações ultra-estruturais.

Uma série de alterações citoplasmáticas acontece nas células em morte concomitantemente às alterações nucleares, como por exemplo, a presença de vacúolos digestivos. Embora as organelas intracelulares aparentem manter morfologia normal,

sabe-se que logo nos estágios iniciais da apoptose, as mitocôndrias tornam-se progressivamente mais inchadas fazendo com que as cristas da membrana interna se desfaçam. Como a capacidade de distensão da membrana externa é limitada e a membrana interna apresenta maior extensão depois de desfeitas as cristas, pode ocorrer uma ruptura na membrana externa. Em casos extremos a membrana interna pode extravasar e expor no citoplasma os componentes da cadeia transportadora de elétrons. Esta abertura aumenta a permeabilidade da membrana interna e gera um desequilíbrio iônico entre a matriz e o espaço intermembranoso. Como a manutenção do gradiente de íons é essencial para a síntese de ATP estas alterações mitocondriais desencadeiam o processo de morte, pondo em ação a cascata de caspases (SESSO, 2006). No presente estudo foram observadas mitocôndrias com perda de cristas, mas não a formação de hérnias da membrana interna para o citoplasma. De qualquer maneira, o inchaço das mitocôndrias que resulta no desmanche das cristas configura alteração do potencial transmembrana dessas organelas, fator desencadeante da ação das caspases.

No presente caso a condensação citoplasmática das células em morte foi acompanhada por fragmentação celular, com formação de corpos apoptóticos e indícios de que os resíduos celulares sejam fagocitados por células localizadas entre os neurônios, as células de glia. Aliás, segundo a literatura são mesmo as células de glia que apresentam a função de remover os restos celulares da apoptose (GANESHINA et al., 2000).

No presente trabalho observou-se também dilatação da luz do retículo endoplasmático, tanto as cisternas citoplasmáticas quanto as que formam o envelope nuclear, sugerindo alterações osmóticas que culminam no inchado da célula, fenômeno comum na necrose. Assim sendo, as características morfológicas presentes no tipo de morte observado, só em parte são compatíveis com a morte decorrente de apoptose, podendo tentativamente ser classificada como necro-apoptose (LOCKSKIN e ZAKERI, 1996).

A morte celular nos neuroblastos é esperada, visto que esta costuma ser mais freqüente em células indiferenciadas e cumpre a finalidade de regular o número de células presente nas sub-populações. No entanto, no presente estudo, verificou-se que não somente os neuroblastos apresentaram morte celular. Algumas células de glia parecem também morrer nesta fase do desenvolvimento, além de neurônios já incluídos

nas populações de células de Kenyon e, portanto, diferenciados, também apresentaram morte celular. No entanto, não foi possível verificar a qual sub-população estas células faziam parte. Ganeshina et al (2000) também mostraram que além dos neuroblastos, algumas células de Kenyon que acabaram de se diferenciar sofriam apoptose. A morte de células de Kenyon pode representar tanto um ajuste no número destes neurônios entre as classes de indivíduos, como a eliminação de células diferenciadas defeituosamente.

As células de glia parecem ser afetadas pelo tipo de morte conhecido como autofágico. É possível que sejam células relacionadas a neurônios que morreram, visto haver em alguns casos, estreita relação destes com os neurônios, ou às células que fagocitaram os resíduos destas.

Enquanto a ultra-estrutura mostrou o tipo de morte que afeta as células, a microscopia de luz, através das várias técnicas empregadas, mostrou diferenças na incidência e localização das mortes celulares entre os indivíduos. Nas larvas somente algumas células em morte foram observadas, entre os neuroblastos em operárias, rainhas e zangões através da técnica da variante da CEC e, em operárias pelo acridine-orange. A reação TUNEL não evidenciou este resultado. Portanto, pode ser que a condensação cromatínica tomada como picnose e relacionada com morte celular, fosse apenas funcional. Contudo, como dito anteriormente, a morte celular nesta fase é esperada para eliminar neurônios larvais. Desta forma, fica a dúvida, visto que a fragmentação do DNA captada pelo TUNEL não é a única evidência de morte celular.

Nos lobos ópticos, todas as técnicas utilizadas, evidenciaram células em morte em larvas de 5º instar, pupas de olhos branco e olhos rosa. Também em pupas de olhos preto todas as técnicas realizadas mostraram células em processo de morte nos corpos pedunculados.

Nos corpos pedunculados a massa de células que estão morrendo estão localizadas na região de transição dos entre os neuroblastos e as células de Kenyon e, algumas vezes na região apical dos corpos pedunculados. A variante da CEC e a coloração por acridine-orange mostraram que em rainhas uma maior quantidade de células está sofrendo este processo, seguidas pelas operárias, que também apresentam diversas células morrendo nesta região, enquanto que em machos somente poucas células exibem sinal de morte celular. No entanto, com a reação TUNEL, embora se

comprove que mortes ocorrem nos corpos pedunculados durante esta fase do desenvolvimento, não são mostradas diferenças na quantidade entre operárias e rainhas, só em machos menor quantidade de células marcadas foi observada. As diferenças entre os resultados, podem dever-se ao estágio do processo de morte que a célula se encontra. Quando os núcleos são marcados apenas pela reação TUNEL pode ser que estes estejam em estágio inicial da apoptose, enquanto que a condensação cromatínica, evidenciado pela CEC e acridine-orange pode ocorrer no estágio final do processo de morte, ou então, ser característica de células necro-apoptóticas, em que o DNA não sofre fragmentação por endonucleases.

As mortes celulares que ocorrem durante a fase de pupa de olhos pretos, podem ser desencadeadas por influência hormonal. Já está bastante demonstrado que tanto a proliferação quanto a morte celular que ocorrem em uma variedade de tecidos durante a metamorfose dos insetos estão sob forte controle hormonal (TRUMAN, 1996; CAYRE et al., 1997). Na metamorfose de *A. mellifera* os títulos de ecdisteróides atingem um pico durante os estágios 2 e 4 do desenvolvimento pupal e retornam para seu nível inicial ao redor do 6º dia do desenvolvimento. Nossos resultados demonstram claramente que as mortes celulares ocorrem na fase de pupas de olhos pretos, que corresponde ao estágio 4, evidenciando a relação entre o início das mortes e o pico do título de ecdisteróide. Diversos trabalhos, desenvolvidos por outros autores, também sugerem esta relação entre morte celular de neurônios e ecdisteróides. Champlim e Truman (1998) mostraram através de estudos dos lobos ópticos *in vitro*, que baixas e moderadas taxas de ecdisteróides mantêm os neurônios em estágio proliferativo e, que altas doses deste hormônio desencadeiam extensiva apoptose nesta estrutura. Os neurônios motores de *Manduca* exibem morte celular em resposta ao pico pré-pupal de 20-ecdisona (WEEKS e TRUMAN, 1985; WEEKS et al., 1992).

Além dos ecdisteróides o hormônio juvenil também pode influenciar no processo de morte neural. No presente estudo, além de mortes nos corpos pedunculados durante a fase de pupa de olhos pretos, também foram encontradas mortes celulares nos lobos ópticos na fase de larva de 5º instar e em pré-pupas. Em *A. mellifera* durante estas fases ocorre um pico de hormônio juvenil. É importante ressaltar que estes dois picos de hormônio juvenil apresentam diferenças específicas entre as castas, sendo que as rainhas apresentam um maior nível deste hormônio na hemolinfa (RACHINSKY et al.,

1990). Este fato pode justificar que as mortes celulares, nesta fase, ocorram principalmente em rainhas. Estudos realizados por Monsma e Booker (1996) mostraram que o hormônio juvenil está envolvido na regulação da proliferação e da apoptose nos lobos ópticos de *Manduca*.

A morte celular que ocorre nos lobos ópticos de pupas de olhos brancos e rosa principalmente em rainhas, provavelmente não ocorre sob influência do hormônio juvenil, já que nesta fase, o título deste hormônio já caiu bruscamente, inclusive desaparecendo na pupa de olhos brancos (RACHINSKY et al., 1990). No entanto, estas mortes podem estar sendo desencadeadas pela ecdisona, ou então por outros fatores que também causam a degeneração neural. Além dos hormônios, fatores agindo localmente também podem ser responsáveis por desencadear o processo de morte, como o fator neurocidina (CHOI e FARBACH, 1995) que induz a morte celular programada em neurônios específicos. Em *Drosophila* o óxido nítrico também tem mostrado ter um efeito anti-proliferativo (KUZIN et al., 1996) e ser um regulador da sobrevivência neural (NICOTERA et al., 1997). Células gliais também podem influenciar no destino celular (XIONG e MONTELL, 1995) e estão envolvidas na remoção de neurônios apoptóticos durante o desenvolvimento do sistema nervoso de insetos (SONNENFELD e JACOBS, 1995).

No entanto, neste estudo o que deve ser ressaltado são as diferenças encontradas na quantidade de mortes celulares entre operárias, rainhas e zangões, conforme os resultados morfométricos. Rainhas apresentam uma maior taxa de morte celular nos corpos pedunculados em pupas de olhos pretos. Além disso, resultados morfológicos obtidos no presente estudo, mostraram que os corpos pedunculados de rainhas recém-emergidas têm cálices mais rasos que operárias e zangões.

Os corpos pedunculados são os principais centros que guiam o comportamento do inseto pela estimulação sensorial através informações trazidas das antenas e dos olhos. Assim, estas estruturas estão relacionadas com o sistema olfatório e, em alguns insetos, com a aprendizagem visual. Estudos recentes mostram seu envolvimento na integração sensorial (SCHILDBERGER, 1984; LI e STRAUSFELD, 1997; 1999), no comportamento motor (MIZUNAMI et al., 1998; OKADA et al., 1999) e em certos tipos de aprendizagem e memória (ZARS et al., 2000; PASCUAL e PRÉAT, 2001). Portanto, o fato de ocorrer um maior número de mortes em rainhas e, o fato dos corpos

pedunculados serem mais rasos nesta casta, pode estar relacionado à função deste indivíduo na colônia. As rainhas saem do ninho apenas para o vôo nupcial, ocasião em que são fecundadas e, a partir daí ficam na colônia fazendo a postura dos ovos. Todas as demais tarefas são desempenhadas pelas operárias. Partindo do ponto que operárias e rainhas apresentam o mesmo genoma, a degeneração neural deve ocorrer para eliminar neurônios que seriam responsáveis por todas as outras funções.

6.3 Divisões celulares durante a diferenciação do cérebro

O estudo da ocorrência das divisões celulares visou complementar os dados já obtidos pelas análises morfológicas, através de uma estimativa da taxa diferencial de células em divisão durante a metamorfose nas castas e sexos de *A. mellifera*.

Estudo com neuroblastos de insetos holometábolos mostram que estas células parecem dividir-se continuamente durante todo o período larval e pupal, cessando as divisões apenas antes do indivíduo emergir (NORLANDER e EDWARDS, 1970; TRUMAN e BATE, 1988; ITO E HOTTA, 1992; FARRIS et al., 1999; GANESHINA et al., 2000).

Conforme observado pelos estudos morfológicos, em larvas de 5º instar os corpos pedunculados são ocupados quase que inteiramente por neuroblastos, que, nesta fase e nas várias fases subsequentes do desenvolvimento, sofrem mitose e se diferenciam para gerar as células de Kenyon que estarão presentes nos adultos. A marcação da histona H3 fosforilada com corante fluorescente, confirmou estas diferenças, como será visto adiante.

Convém ressaltar que a análise das divisões celulares que foi feita foi qualitativa, devido ao fato de terem sido feitas montagens totais, que não permitem a visualização de todos os núcleos marcados em um único foco do microscópio. A mensuração da área também não foi viável, por serem as divisões visíveis nos estudos morfológicos muito poucas e a marcação de células em divisão por corante fluorescente para histona H3 fosforilada não permitir boa delimitação de sua localização. Para que uma quantificação pudesse ser feita com confiança seria necessário proceder conforme Malun et al. (2003) que fizeram espalhamento das células dos corpos pedunculados, permitindo uma contagem mais segura dos núcleos em divisão.

Como em *A. mellifera* não ocorre proliferação de neuroblastos nos adultos, todas as células de Kenyon presentes no cérebro são produzidas durante o período pós-embrionário. Segundo Witthoft (1967) nos corpos pedunculados dos adultos estão presentes cerca de 340.000 células de Kenyon. Esta enorme quantidade de células justifica as grandes áreas de proliferação celular e o longo período pelo qual este processo se estende, como observado no presente estudo.

As divisões celulares foram observadas preferencialmente nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos durante as fases iniciais da metamorfose. Operárias,

rainhas e zangões apresentaram grande área de núcleos marcados nestas estruturas cerebrais no 5º instar larval, pré-pupas e pupas de olhos brancos.

Neurogênese de células de Kenyon dos corpos pedunculados em operárias de *A. mellifera* inicia-se no primeiro estágio larval e cessa abruptamente na metade do período pupal, ou seja, no período P4, segundo Ganeshina et al (2000). Este período, segundo estes autores é caracterizado por pupas de olhos marrom escuro e corpo branco. No entanto, os dados obtidos para os estágios de proliferação celular, inclusive para operárias, no presente estudo diferem destes descritos por Ganeshina e colaboradores, de maneira que nos corpos pedunculados de operárias as divisões celulares foram observadas até a fase de pupas de olhos rosa, que corresponderia aos estágios P2/P3 de Ganeshina e colaboradores. A diferença no tempo de proliferação entre nossos estudos e os desses autores pode ser devido às técnicas utilizadas. Ganeshina e colaboradores utilizaram marcação de mitoses pela técnica de incorporação BrdU e sua subsequente detecção inumo-histoquímica. Devido ao fato do BrdU ser incorporado no DNA recém-sintetizado durante a fase S da mitose, toda progênie de células mitoticamente ativas são marcadas durante o tempo que vai entre a aplicação e a fixação do tecido. Por outro lado, a técnica de marcação da histona H3 fosforilada, detecta apenas as células que estão se dividindo no momento da fixação. Malun et al (2003) compararam ambas as técnicas marcação de células em divisão nos corpos pedunculados de *A. mellifera* e verificaram que a incorporação com BrdU permite a visualização de aproximadamente 3 vezes mais células que a técnica de marcação da histona. Isto pode ter acontecido no presente estudo, já que na conforme verificado por Ganeshina e colaboradores, na fase P4 o número de células em divisão é menor que nas fases anteriores e a marcação realizada no presente estudo, por ser menos sensível não detectou nenhuma célula.

Contudo, para os objetivos do presente estudo os resultados foram satisfatórios já que mostraram diferenças temporais na proliferação celular nos corpos pedunculados de operárias, rainhas e zangões, sendo que os machos e as operárias apresentaram divisões até a fase de pupas de olhos rosa, enquanto que em rainhas as células em proliferação foram observadas somente até a fase de pupas de olhos brancos.

Nos lobos ópticos fato semelhante ocorre, mas nesta parte do cérebro embora os zangões apresentem divisões celulares até a fase de pupas de olhos rosa, operárias e

rainhas apresentam apenas até a fase de pupas de olhos brancos. Estudos sobre os lobos ópticos de *Manduca sexta* (TRUMAN et al., 1993; CHAMPLIN e TRUMAN, 1998) e de *Drosophila melanogaster* (MONSMA e BOOKER, 1969) indicam que os eventos de desenvolvimento deste órgão ocorrem de maneira similar aos observados para os corpos pedunculados de abelhas melíferas (PANOV, 1957; MALUN, 1998). Em ambas as estruturas cerebrais os neuroblastos dividem-se simetricamente (MALUN, 1998) para produzir um grande número de células, que por sua vez dividem-se de maneira assimétrica para gerar os neurônios. Além disso, sugerem que nestas duas estruturas cerebrais a neurogênese diminui com o avanço do desenvolvimento e a partir daí os neuroblastos começam a sofrer apoptose, sendo que este fato estaria relacionado com um pico de ecdisona na hemolinfa.

No entanto, em nossos estudos, as mortes celulares nos lobos ópticos ocorrem predominantemente em concomitância com as divisões celulares, ou seja, durante as fases de pupas de olhos brancos e rosa (ver resultados morfológicos e de morte celular). Assim, as mortes celulares e as divisões que ocorrem nos corpos pedunculados e nos lobos ópticos provavelmente são desencadeadas por diferentes mecanismos, já que nos corpos pedunculados as divisões antecedem as mortes e nos lobos ópticos ambos os processos ocorrem simultaneamente.

Os olhos compostos dos machos de *A. mellifera* são muito maiores que os das fêmeas. Segundo Snodgrass (1956) os machos têm de 7 a 8 mil omatídeos em cada olho composto, enquanto que as operárias têm de 4 a 5 mil e as rainhas, 3 a 4 mil. Pode-se aventar a hipótese de que nas fases iniciais do desenvolvimento o número de neurônios produzidos seja o mesmo em todas as classes de indivíduos e que a diferença entre estes se estabeleça por divisões e mortes celulares posteriores, sendo as divisões mais frequentes e as mortes quase ausentes nos zangões. Neste caso, as mortes dos neurônios poderiam ser controladas por diferenças nas taxas hormonais entre os machos e as fêmeas.

Diferente seria o que ocorre nos corpos pedunculados em que a proliferação celular é temporalmente também diferente entre as classes de indivíduos. Neste caso, é possível que as diferenças entre operárias e rainhas não sejam estabelecidas apenas pelas taxas de divisão celular, mas também pelas de mortes, visto que os neuroblastos da rainha parecem morrer em maior quantidade em relação ao das operárias. Por outro

lado, as diferenças entre os sexos parecem dever-se a uma proliferação mais lenta e mais tardia nos machos, sem tanta influência das taxas de morte celular.

6.4 Expressão protéica durante a diferenciação do cérebro

Esta parte da investigação buscou verificar em que medida a diferenciação morfológica do cérebro de *A. mellifera* durante a metamorfose, estava sustentada por mudanças fisiológicas das células. A expressão protéica durante o período de desenvolvimento acompanhado mostrou a presença de proteínas comuns às diversas fases de operárias, rainhas e zangões. Algo bastante comum nos perfis obtidos foi a presença de isoformas, sugerindo que algumas proteínas apresentam modificações traducionais.

As alterações de ponto isoelétrico das proteínas geram isoformas, que podem responder pelas diferenças encontradas principalmente entre operárias e rainhas, pois sabe-se que estas castas apresentam o mesmo genoma. No entanto, como ambas as castas desempenham diferentes funções na colônia, justificam-se as alterações pós-traducionais, que resultam em funções diferentes para proteínas com a mesma composição de aminoácidos. As operárias partilham com a rainha e com o macho, seu pai, $\frac{1}{2}$ de seus genes e apenas $\frac{3}{4}$ com suas irmãs. No entanto, nos perfis protéicos obtidos, observou-se grande similaridade entre operárias, rainhas e machos.

A expressão protéica deve estar relacionada principalmente à expressão gênica, que está em parte, controlada pelas diferenças hormonais, as quais, por sua vez, podem ser controladas nas fêmeas pela alimentação diferencial. Assim, a expressão protéica está também relacionada com aspectos estruturais e comportamentais das classes de indivíduos, determinadas pelo ambiente.

Winston (1987) relacionaram o fato dos corpos pedunculados de rainhas e operárias apresentarem as mesmas alterações morfológicas depois de adultas à atividade de vôo. Assim, rainhas apresentam aumento do volume da neurópila entre o 1º e 14º dias de vida adulta, enquanto as operárias apresentam este mesmo padrão de alteração da neurópila dos corpos pedunculados durante as primeiras semanas de vida. Apesar das rainhas nunca forragearem, as alterações nos corpos pedunculados, pode dever-se a estas terem também que voar para a cópula. O comportamento de vôo requer uma série de aprendizagens, como por exemplo, a da localização espacial do ninho, que seria necessária a ambas, justificando o mesmo padrão morfológico e, no caso, bioquímico, em rainhas e operárias. Os machos também realizam a atividade de vôo e, embora não retornem ao ninho depois do acasalamento, precisam localizar os locais de agrupamento

e as rainhas, o que implica em aprendizagem semelhante a das fêmeas. Estes comportamentos podem requerer a síntese de proteínas específicas para esses tipos de atividade, que, portanto, devem estar presentes em todos os indivíduos que fazem parte da colônia, explicando também as semelhanças encontradas entre fêmeas e machos.

Portanto, embora o genoma das fêmeas e dos machos possa apresentar diferenças, as atividades gerais desenvolvidas pelos indivíduos na colônia, podem promover alterações transcricionais e traducionais que os aproximam em níveis bioquímicos. Além das proteínas que se expressam em todas as classes de indivíduos, há também as que se expressam diferencialmente entre as fases e entre eles. As funções características de cada indivíduo ou fase estariam relacionadas com as proteínas específicas de cada um. As semelhanças e diferenças seriam, portanto, tanto genéticas como epigenéticas.

Estes comentários mostram a importância de se estudar comparativamente operárias, rainhas e zangões o que não se encontra com frequência na literatura, que na maioria dos trabalhos, principalmente os relacionados com sistema nervoso enfocam principalmente as fêmeas, ou então, somente operárias, comparando fases de atividade destas, como nutridoras e campeiras (KAMIKOUCHI et al., 1998, SAWATA et al., 1998; TAKEUCHI et al., 1998; ROBINSON et al., 2003a,b; AMDAM et al., 2006; KUBO et al., 2006; KUBO et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Neste sentido, o presente estudo sobre expressão protéica fornece dados interessantes para elucidar o grau de semelhanças e diferenças bioquímicas que existem durante a diferenciação do cérebro entre as classes de indivíduos na colônia.

A discussão da identificação protéica será conduzida considerando a função da proteína e tentando esclarecer, o mais possível, a razão da sua presença.

6.4.1 Proteínas de reserva – Glx (proteína nº 14) e hexamerina 70a (proteínas número 15 e 2)

As proteínas de reserva ou estocagem estão envolvidas em diversos processos como taxas metabólicas, reprodução, imunidade, etc... São proteínas que, como diz o nome, ficam armazenadas no organismo para atenderem as demandas que se configurem. Fazem parte deste tipo de proteína a vitelogenina (reprodução), as lipoforinas (transportadoras) e as hexamerinas.

A maioria das proteínas de reserva pertence à classe das hexamerinas, as quais são sintetizadas em grande quantidade pelas células do corpo gorduroso. As hexamerinas dos insetos pertencem à mesma família filogenética de proteínas de artrópodes muito antiga, que inclui também as hemocianinas (BURMESTER, 2002).

Em *A. mellifera*, Ryan et al (1984) identificaram a subunidade de 74KDa da hexamerina na hemolinfa larval. Posteriormente, Danty et al (1998) demonstraram a existência de distintas subunidades de hexamerinas nas abelhas, que foram nomeadas de acordo com sua massa molecular. Assim as hexamerinas 70a, 70b e a 70c, na eletroforese migram muito próximas umas das outras, próximo a escala de 70KDa. Três outras subunidades, uma de 100KDa e outras duas próximas a 80KDa também foram identificadas. As hexamerinas com massa molecular em torno de 70KDa apresentam diferentes aminas terminais, mas as subunidades com aproximadamente 80KDa apresentam aminas terminais comuns, sendo portanto, descritas como hexamerinas 110.

No presente estudo, a hexamerina 70a está presente tanto na fase de pré-pupa como na de pupa de olhos pretos. Nos perfis eletroforéticos esta proteína corresponde aos *spots* de número 2 e 15.

Outra proteína identificada como pertencente à família das hemocianinas, e, portanto uma hexamerina, é a correspondente ao *spot* número 14. No entanto, por sua posição no gel, esta proteína não deve pertencer as hexamerinas de 70KDa, podendo, portanto, fazer parte do grupo das descritas como 110KDa.

Diversos estudos têm sido realizados com as hexamerinas em formigas (WHEELER e MARTINEZ, 1995) vespas (HUNT et al., 2003) e abelhas (RYAN et al., 1984; DANTY et al., 1998; CUNHA et al., 2005; BITONDI et al., 2006) a fim de identificar sua função. É sabido que se trata de proteínas de reserva, de maneira que antes do início da metamorfose grandes quantidades dessas proteínas são estocadas no corpo gorduroso dos insetos.

As hexamerinas são sintetizadas pelo corpo gorduroso e lançadas na hemolinfa, onde são encontradas em altas concentrações, mas no final do estágio larval, as hexamerinas são seletivamente seqüestradas pelo corpo gorduroso, em um processo controlado por ecdisteróides (UENO et al., 1983; BURMESTER et al., 1995; BURMESTER e SCHELLER 1995). Assim, tem sido proposto que as hexamerinas

sirvam de fonte de aminoácidos para a reconstrução dos tecidos durante o desenvolvimento pupal.

Danty et al.(1998) e Bitondi et al. (2006) mostraram, respectivamente que em operárias de *A. mellifera* a hexamerina 70b e a 110 são abundantes na hemolinfa de larvas de 5º estágio durante a fase de alimentação, diminuindo sua expressão quando a larva pára de se alimentar e entra na metamorfose. Segundo estes autores, durante os estágios de pupa e até o início da vida adulta esta proteína apresenta baixos títulos na hemolinfa. Este padrão de expressão seria consistente com sua função de proteína de reserva, apresentando-se em grandes quantidades em larvas que se alimentam, para posteriormente serem consumidas durante o estágio pupal (em que a abelha não se alimenta) e no início da fase adulta. Levando-se em conta o exposto é provável que as hexamerinas presentes na fase de pré-pupa, conforme verificado neste trabalho sejam proteínas de reserva.

No adulto, diversos estudos sugerem que as hexamerinas estocadas sejam utilizadas para auxiliar a produção de ovos. (PAN e TELFER, 1996, 1999, 2001; SEO et al., 1998; WHEELER et al., 2000; CAPURRO et al., 2000; HAHN e WHEELER, 2003). Bitondi et al. (2006) mostraram que, em colônias sem rainhas, operárias com ovários ativos, apresentaram níveis mais altos da hexamerina 110 na hemolinfa que suas irmãs com ovários inativos, sugerindo assim, que a vitelogênese demanda um aumento na expressão desta proteína. A expressão de hexamerina também está relacionada ao consumo de proteínas na alimentação. Em *Polistes*, na ausência de proteínas de reserva devido à baixa disponibilidade de alimento, as vespas tornam-se operárias não reprodutivas, enquanto que quando o alimento é abundante e as fêmeas apresentam proteínas de reserva (hexamerinas), tornam-se rainhas reprodutivas, sugerindo assim, a função desta proteína também na reprodução destas vespas (HUNT et al., 2003).

No presente estudo as hexamerinas foram identificadas no cérebro de pré-pupas de operárias e rainhas com diferentes taxas de expressão, com super expressão em rainhas. Este fato pode ser decorrente da alimentação recebida pelas larvas de rainhas que são alimentadas com geléia real, alimento mais digerível que o pólen, por não apresentar envoltório de celulose e que contém muitos aminoácidos livres. Na fase de pupa de olhos pretos a super expressão de hexamerinas deu-se em rainhas e zangões.

Esta super expressão pode estar relacionada a um maior consumo pelas operárias da proteína que foi estocada durante a fase larval.

Além disso, fica clara a necessidade de estudos que abordem a função e o padrão da expressão das hexamerinas em zangões. Como descrito acima, a maioria dos trabalhos realizados com esta proteína está relacionada a operárias, tendo sido verificadas para esta casta, diferentes funções para esta proteína.

6.4.2 Calreticulina (proteína nº 8)

Calreticulina é uma proteína de 46KDa que, apesar de ser uma única proteína codificada por um único gene apresenta diversas funções (MICHALAK et al., 1999). É uma proteína residente na face luminal do retículo endoplasmático e afeta diversas funções celulares, tanto no lúmen do retículo endoplasmático quanto fora deste. No lúmen do retículo esta proteína realiza duas das suas principais funções: como chaperona e na regulação da homeostase de íons cálcio. Como chaperona é altamente versátil, atuando no “controle de qualidade” da síntese de uma grande variedade de moléculas, incluindo proteínas que constituem canais de cálcio, receptores de membrana, integrinas e moléculas transportadoras. Como reguladora do trânsito de íons cálcio, esta proteína controla sua disponibilidade intracelular pela modulação do transporte e estoque de cálcio no retículo endoplasmático. Alterações na concentração de cálcio intracelular regulam uma grande variedade de funções celulares, incluindo secreção, contração-relaxamento muscular, mobilidade celular por pseudópodos, metabolismo citoplasmático e mitocondrial, síntese protéica, expressão gênica, progressão do ciclo celular atuando sobre o fuso e apoptose.

Como era de se esperar, devido às múltiplas funções desta proteína, no presente estudo foi verificada a presença de calreticulina nas duas fases analisadas, pré-pupa e pupa de olhos pretos, sugerindo que esta proteína esteja presente durante todas as fases do desenvolvimento do cérebro, agindo como chaperona de controle de qualidade das sínteses nesse órgão, ou seja, eliminando proteínas defeituosas que por ventura sejam produzidas ou sinalizando diversos processos celulares atuantes na diferenciação, como por exemplo, as divisões e mortes celulares, através da distribuição de íons cálcio.

Alguns genes envolvidos na transdução de sinais de cálcio estão concentrados nos corpos pedunculados de *A. mellifera*, preferencialmente nas células de Kenyon não

compactas. O sinal de cálcio nesta estrutura cerebral pode contribuir para o aumento da plasticidade sináptica de redes neurais e para a aprendizagem (KAMIKOUCHI et al., 2000).

No presente estudo, esta proteína apresentou maior expressão na fase de pré-pupa em zangões e na fase de pupa de olhos pretos em operárias (quando comparados com zangões). Kamikouchi et al (2000) analisaram a concentração da expressão de cálcio dependente de calmodulina nos corpos pedunculados de operárias, rainhas e zangões recém-emergidos de *A. mellifera* e verificaram o mesmo padrão de concentração de cálcio nos corpos pedunculados das três classes de indivíduos, sugerindo que não ocorre expressão diferencial de calreticulina entre eles. Segundo estes autores, esta expressão pode estar relacionada a comportamentos comuns, que requerem aprendizagem, para todos os indivíduos, como por exemplo, a atividade de vôo, já que todos necessitam aprender a localização espacial do ninho, mesmo que em tempo diferentes de suas vidas.

Como no presente estudo as análises foram feitas durante a metamorfose, a super expressão desta proteína em pré-pupa de zangões pode estar relacionada à divisão celular que ocorre principalmente nos lobos ópticos nesta fase, e em pupa de olhos pretos de operárias pode estar relacionada à morte celular por apoptose que ocorre nestes indivíduos nesta fase, levando-se em consideração que a super expressão ocorreu em comparação com zangões. A calreticulina na apoptose está envolvida no processo inume sendo requerida na fagocitose de células apoptóticas (WATERHOUSE e PINKOSKI, 2007). A análise ultra-estrutural de células dos corpos pedunculados, principalmente de neuroblastos em morte celular, mostrou o envolvimento das células de glia na remoção das células mortas, que pode ser sinalizada pela calreticulina.

As explicações que estão sendo aventadas para a expressão diferencial das proteínas entre os indivíduos e as fases são tentativas e baseadas nas funções que lhes são atribuídas no geral. Algumas vezes, estas funções não se coadunam com os eventos que estão ocorrendo. É o que se verifica com as rainhas. Esperava-se uma super expressão da calreticulina nas pupas de olhos pretos desta casta, fase em que as taxas de morte celular nos corpos pedunculados são altas, o que não se verificou. Além disso, como esta proteína desempenha diversas funções, é difícil relacionar a sua expressão a apenas um evento, quando na verdade, sua super expressão pode ocorrer em

conseqüência aos diversos processos metabólicos nos quais pode estar envolvida em uma determinada fase.

6.2.3 Proteínas de choque térmico (proteínas nº 7 e 13)

As proteínas de choque térmico (HSPs – heat shock proteins) receberam esta denominação devido à descoberta de grande quantidade destas nas células expostas ao aumento da temperatura, mas têm sido detectadas em células expostas a vários outros tipos de estresse o que lhes conferiu uma segunda denominação: proteínas de estresse celular.

Geralmente as proteínas de choque térmico são classificadas em quatro grandes famílias, de acordo com seu peso molecular: HSP90, HSP70, HSP60 e as HSPs15 a 30. No presente estudo foram identificadas as pertencentes à família das HSP90, em todos os indivíduos nas fases de pré-pupa e de pupa de olhos pretos.

A presença destas proteínas na metamorfose do cérebro das abelhas pode ser justificada levando-se em consideração a grande variedade de funções por ela exercidas. As HSPs funcionam, principalmente, como chaperonas moleculares, assim como a calreticulina descrita acima, permitindo às células adaptarem-se gradualmente a mudanças em seu ambiente e sobreviverem em condições adversas. Ao atuar como chaperonas, as HSPs, podem estar envolvidas na importação de proteínas para diferentes compartimentos celulares; dobramentos de proteínas no citossol, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias; degradação de proteínas instáveis; dissolução de complexos protéicos, prevenção de agregação indesejável de proteínas; correção dos dobramentos inadequados das proteínas e controle da atividade de proteínas regulatórias (GARRIDO et al. 2001).

A identificação de proteínas de choque térmico, no presente estudo, com diferenças de expressão, ocorreu em ambas as fases estudadas. Na fase de pré-pupa, estas proteínas estão super expressas em zangões em relação às operárias e na fase de pupa de olhos pretos, em rainhas quando comparadas às operárias. A super expressão na fase de pupas de olhos pretos em rainhas, pode ser relacionada aos estudos morfológicos constantes desse trabalho, que mostraram que nesta fase ocorre morte celular nos corpos pedunculados de rainhas. Além disso, através da realização da reação TUNEL foi possível observar marcação positiva para os núcleos nestas regiões, e

através de estudos ultra-estruturais, foram observadas algumas alterações morfológicas típicas de células em morte por apoptose. Assim, este resultado bioquímico, com a constatação de super expressão de proteínas de choque térmico corrobora os resultados já obtidos em nossos estudos anteriores, pois segundo Garrido et al (2001) além da função de chaperonas, as HSPs participam da apoptose, atuando em múltiplos pontos da via de sua sinalização. Apesar da maioria das proteínas de choque térmico serem constitutivamente expressas, sabe-se que a expressão gênica *de novo* dessas proteínas pode, também, estar envolvida na regulação da apoptose. As HSP27 e HSP70 de mamíferos são anti-apoptóticas, enquanto que HSP60 e HSP90 são pró-apoptóticas, apesar da participação da HSP90 na apoptose ser controversa, pois alguns membros desta família podem comportar-se como anti-apoptóticos e, outros membros como pró-apoptóticos dependendo do estímulo desencadeante da morte celular. No presente estudo a diferença de expressão entre operárias e rainhas na fase de pupas de olhos preto, deixa clara sua função, neste caso, como um agente pró-apoptótico.

No entanto, a super expressão em pré-pupas de zangões não pode ser relacionada à morte celular, já que nesta fase, nos lobos ópticos parece ocorrer maior taxa de morte em rainhas e operárias. Assim, neste caso, a interpretação da proteína como pró-apoptótica não encontra respaldo e, no caso de zangões esta proteína pode ter um papel sinalizador, nesta fase.

Ainda neste contexto, segundo Garrido et al (2001) a HSP90 associa-se com uma variedade de proteínas sinalizadoras, incluindo fatores de transcrição dependentes de ligantes, tais como, receptores de esteróides. A principal função da HSP90 é promover a maturação conformacional destes receptores e também das proteínas-quinases transdutoras de sinais. Truman et al (1992) sugerem que muitos neurônios específicos das larvas exibem sinais de morte celular programada, quando expostos as altas concentrações de ecdisteróides presentes durante os estágios de pré-pupa e pupa. Além disso, é sabido que o controle da degradação de tecidos próprios das larvas e a diferenciação daqueles próprios dos adultos é em grande parte dependente de ecdisteróides, portanto, a expressão destas proteínas deve estar relacionada com o próprio processo de diferenciação cerebral.

6.2.4 Arginina-quinase (proteínas nº 16 e 17)

A arginina-quinase é membro de uma família de proteínas altamente conservadas, encontrada em diversas espécies de invertebrados e possui função análoga a creatina-quinase dos vertebrados.

Em *A. mellifera* está presente sob três isoformas, designadas a, b e c, que são transcritas de um único gene (KUCHARSKI e MALESKA, 1998). Nos perfis obtidos para operárias, rainhas e zangões as três isoformas da proteína arginina-quinase estão presentes nas duas fases estudadas, apresentando diferença de expressão entre os indivíduos apenas na fase de pupa de olhos pretos.

A arginina-quinase está relacionada ao metabolismo de ATP. Assim, esta molécula energética é formada pela fosforilação reversível da arginina pelo ATP, reação catalisada pela arginina-quinase. Em condições normais, a reação: $\text{ATP} + \text{arginina} \leftrightarrow \text{fosfoarginina} + \text{ADP}$, opera próximo ao equilíbrio. No entanto, em momentos de alta atividade metabólica, quando a quantidade de ATP disponível é baixa, o equilíbrio é desfeito. A fosfoarginina atua, neste caso, como um tampão nas células que contém arginina-quinase. A importância fisiológica desta reação é considerada por alguns autores, como sendo responsável pela capacidade metabólica, onde a arginina-quinase controla a redução de picos de síntese de ATP em células que alternam entre períodos de alto e baixo consumo de energia (DUMAS e CAMONIS, 1993; STRONG e ELLINGTON, 1995).

Kucharski e Maleska (1998) verificaram a expressão de arginina-quinase em diversos tecidos de operárias *A. mellifera*, encontrando maior expressão desta proteína nos olhos compostos, relativa abundância no cérebro, nas antenas e no tórax e pequena expressão nos ovários. Entre os estágios de desenvolvimento das operárias, os níveis de arginina-quinase apresentaram variações, sendo pouco expressas no cérebro de pupas, aumentando sua expressão em indivíduos jovens e alcançando o nível mais alto de expressão em forrageiras. Assim, a maior expressão desta proteína nos olhos compostos está relacionada à necessidade de um sistema energético eficiente, que transfere o ATP gerado pelas mitocôndrias para a região do rabdoma das células da retina, em um processo de alto consumo de energia, possibilitando a visão da abelha. Além disso, a sua maior expressão nas forrageiras pode estar relacionada à diferença de luminosidade que estas abelhas enfrentam ao saírem para a coleta e ao retornarem para a colônia,

sendo necessário um eficiente sistema de controle de conversão de energia para a abelha se adaptar as estas diferenças de luminosidade.

Como no presente estudo foi utilizado extrato do cérebro total, incluindo os lobos ópticos e antenais, provavelmente a expressão desta proteína represente a soma de arginina-quinase presente nos olhos compostos e no restante cérebro. Na fase de pupa de olhos pretos, a expressão desta proteína foi maior em rainhas e zangões que nas operárias. Rainhas e zangões, logo que emergem precisam estar com o sistema visual bastante desenvolvido para a realização do vôo nupcial, portanto, a maior expressão de arginina-quinase na fase de pupa de olhos pretos, fase final da metamorfose, pode ser tentativamente relacionada à necessidade de percepção visual por estes indivíduos logo que emergem. Isso explica também, a menor expressão desta proteína em operárias desta fase, já que estes indivíduos ao emergirem realizam apenas tarefas intra-nidais, necessitando, portanto, de um sistema visual mais atuante apenas na fase de forrageira, que ocorre ao redor de 25 dias de idade.

6.2.5 Glutathione S-transferase S1 (proteína nº6) e Proteína similar a antdh CG1386-PA (proteína nº 20)

A glutathione S-transferase (GST) e a proteína similar a antdh (PSA) são enzimas biotransformadoras envolvidas no processo de desintoxicação. A desintoxicação geralmente ocorre em duas fases: na fase I, um composto inicial é transformado em uma espécie mais reativa. Uma variedade de transformações químicas está envolvida neste processo, como ação de enzimas da família das desidrogenases-redutases, como é o caso da PSA; a fase II consiste na adição tanto aos produtos da fase I como diretamente aos compostos químicos tóxicos de um grupamento altamente polar, como por exemplo, a glutathione (catalisada pela GST). Os produtos da fase II são hidrofílicos, não podendo atravessar a membrana plasmática e são eliminados pela excreção. Além da eliminação de toxinas do ambiente, as enzimas de biotransformação das fases I e II participam da remoção de produtos tóxicos do metabolismo normal.

As glutathiones S-transferases estão presentes em praticamente todos os animais e, na maioria deles sob formas isoenzimáticas, constituindo mecanismo intracelular significativo na desintoxicação. Em insetos estas enzimas representam um mecanismo de desintoxicação muito interessante devido ao seu envolvimento na tolerância a

inseticidas (KOSTAROPULOS et al., 2001). Alguns autores relatam o aumento na atividade de GST relacionada à resistência a inseticidas organofosforados (CLARK, 1989). Em insetos, foi descrita alteração na expressão de GST induzida por várias substâncias, como por exemplo, qualidade da alimentação e administração de determinados inseticidas (HAYAOKA e GAUTERMAN, 1982; PAPADOPOULOS et al., 2000).

No presente estudo, foi observada a presença de GST nos dois estágios de desenvolvimento analisados. Na fase de pré-pupa ocorre super expressão desta proteína em rainhas e em zangões quando comparados à operárias. Em pupas de olhos pretos a super expressão ocorreu apenas em zangões (em relação à operárias). Smirle e Winston (1988) verificaram que em *A. mellifera macedônica* a atividade de GST aumenta em adultos, atingindo os níveis mais altos quando a abelha torna-se forrageira. Papadopolos et al (2004) também observaram o mesmo padrão de expressão desta enzima, mostrando que sua expressão está de acordo com sua função principal de desintoxicação, pois nesta fase, a abelha estaria mais exposta aos fatores externos tóxicos do meio ambiente que podem ocorrer no contato com as flores.

Segundo Wag et al (1999) as enzimas biotransformadoras apresentam como característica evolutiva a expressão conservada em órgãos olfatórios, sugerindo importante função na olfação.

De acordo com o exposto, a expressão de GST e PSA durante a metamorfose, conforme observada no presente estudo pode estar relacionada à desintoxicação de resíduos metabólicos, já que durante a fase de pupa nem o intestino e nem os túbulos de Malphigi são funcionais, podendo, portanto, acumularem-se muitos resíduos do metabolismo neste período, parte dos quais são retirados de circulação acumulando-se em urócitos. No caso específico de sua super expressão no cérebro, principalmente de pré-pupas de rainhas, esta poderia estar também relacionada com os processos de morte celular, que por não serem tipicamente apoptótico, pode gerar alguma toxidez.

Além disso, conforme mencionado para a arginina-quinase, a super expressão de GST em zangões na fase de pré-pupa e pupa de olhos pretos e de PSA em pupas de olhos pretos pode estar associada a função olfativa, sendo que estes indivíduos, por apresentarem função essencialmente reprodutiva, necessitam de um sistema olfatório

desde a emergência desenvolvido, para o vôo de acasalamento onde a percepção de feromônios liberados pelas rainhas são extramente importantes.

6.2.6 Isoforma 1 da proteína 14-3-3 CG31196-PC, similar a isoforma C (proteínas nº 3 e 11)

Segundo van Heusden (2005) proteínas 14-3-3 formam uma família altamente conservada de proteínas ácidas diméricas com massa molecular de aproximadamente 30KDa. Muitos organismos apresentam múltiplas isoformas desta proteína, como por exemplo, mamíferos, onde são observadas 7 isoformas. No presente estudo, proteínas pertencentes à família da 14-3-3 foram observadas, em todos os indivíduos e fases analisadas. No entanto, foram identificadas por apresentarem diferença de expressão apenas na fase de pré-pupa sendo super expressas em rainhas e zangões, comparados a operárias desta fase.

Originalmente estas proteínas foram descritas como proteínas específicas do cérebro e a primeira função descrita para elas foi de ativação da síntese de neurotransmissores. Posteriormente foi observado que as proteínas 14-3-3 estão presentes em todas as células e tecidos de eucarióticos e são transportadoras de uma longa lista de proteínas (aproximadamente 200), envolvidas em praticamente todos os processos celulares. Assim, de uma maneira geral, estão envolvidas na formação do citoesqueleto e maturação de oócitos, no desenvolvimento dos discos imaginais, na regulação do ciclo celular, na apoptose, na resposta ao estresse, checagem de danos no DNA, etc...

A presença desta proteína nas fases analisadas e, provavelmente durante todas as fases da metamorfose está de acordo com a função. A super expressão desta proteína em pré-pupas de rainhas e zangões pode estar relacionada ao próprio metabolismo destes indivíduos.

6.2.7 Proteína transportadora de ácidos graxos (proteína nº18)

O transporte e biossíntese tanto de moléculas solúveis em água, como daquelas insolúveis é essencial para todas as células. A solubilidade e o transporte de moléculas hidrofóbicas são facilitados, nos fluidos intra e extra-celulares, por proteínas transportadoras de ácidos graxos (PTAG). As PTAG formam um grupo de pelo menos

9 tipos distintos de proteínas, que apresentam massa molecular entre 14 e 15 KDa . Muitas das proteínas dessa família transportam ácidos graxos como principal ligante, mas outras proteínas com diferentes estruturas também apresentam afinidade pelas PTAG, como por exemplo, as proteínas de choque térmico e a calreticulina, já descritas anteriormente. No presente estudo, as PTAG estão presentes nas duas fases do desenvolvimento analisadas, apresentando diferença de expressão entre os indivíduos apenas na fase de pupa de olhos pretos, sendo super expressas em operárias, quando comparada a expressão desta proteína em rainhas desta fase, e em zangões, quando comparados a operárias.

A presença de PTAG durante o desenvolvimento de alguns animais, principalmente mamíferos, já foi descrita por diversos autores. Segundo Kennedy (2000) a quantidade de PTAG presente em um determinado tecido corresponde ao fluxo de ácidos graxos neste tecido sendo, portanto sua regulação importante durante o desenvolvimento do animal. Em cérebros de mamíferos são encontradas 3 tipos diferentes de PTAG. Os genes destas PTAG apresentam diferenças temporais e espaciais de expressão durante o desenvolvimento e maturação do cérebro (LIU et al., 1997; OWADA et al., 1996). Em ratos, a expressão de um destes tipos torna-se evidente por ocasião do nascimento. Em camundongos, níveis desta proteína são detectados após o 19º dia de desenvolvimento fetal e aumentam até o 14º dia após o nascimento, mas ficam mais baixos em cérebros de adultos (SELLNER et al 1995). Outro tipo de PTAG apresenta altos níveis de expressão durante a neurogênese, migração neural e diferenciação terminal dos neurônios em ratos e camundongos (LIU et al., 1997; LIU et al., 2000).

As considerações expostas acima levam a sugerir que a presença da PTAG no cérebro durante as fases do desenvolvimento de *A. mellifera* esteja relacionada com o envolvimento desta proteína em processos que normalmente ocorrem nesta fase, como a neurogênese, a migração e diferenciação neural. No entanto, devido à falta de trabalhos que elucidem a função desta proteína no sistema nervoso durante o desenvolvimento pós embrionário em insetos, é difícil deduzir o porquê de ocorrer super expressão de PTAG em operárias e zangões na fase de pupa de olhos pretos.

6.2.8 Similar a isoforma A da estubarista CG14792 (proteína n° 10)

A proteína estubarista ou P40, está localizada no citoplasma das células associada a poliribossomos e ao citoesqueleto (KEPPEL e SCHALLER, 1991). No presente estudo, apesar de não ser uma proteína muito marcante nos perfis protéicos obtidos, foi identificada por apresentar diferença de expressão na fase de pré-pupa entre operárias e zangões, com super expressão em zangões.

Em *Drosophila melanogaster* a P40 é codificada pelo gene estubarista e é requerida para a proliferação celular dos discos imaginais tendo picos de expressão no 6º dia do quinto instar larval, mostrando correlação entre a P40 e o início da metamorfose (MELNICK et al., 1993). Mutantes viáveis com super expressão deste gene apresentam um fenótipo com antenas mal formadas, cerdas finas e pequenas e as fêmeas são estéreis (MELNICK et al., 1993). Por outro lado, a sub-expressão com redução à metade da expressão deste gene produzem um mutante também viável com fenótipo que apresenta atraso de desenvolvimento, cerdas pequenas e delgadas e corpo com tamanho reduzido (TOROK et al, 1999).

A super expressão da P40 em zangões na fase de pré-pupa de *A. mellifera* deve estar dentro dos níveis de expressão normal desta proteína, sendo necessária para um desenvolvimento adequado das antenas nestes indivíduos.

6.2.9 Actina 5 (proteína n°19)

Foi observada a presença da proteína actina 5 com expressão marcante nas fases de pré-pupa e pupa de olhos pretos. A actina é uma proteína estrutural das células e componente crucial para a mobilidade celular e processos de crescimento. Dentro do sistema nervoso, neurofilamentos de actina são diferencialmente distribuídos dependendo do tipo de neurônio, bem como do seu estado funcional e de desenvolvimento. Além disso, a actina está associada com sinapses em neurópilas tanto em vertebrados como em invertebrados. Frambach et al (2004) verificaram intensa marcação de actina nos complexos sinápticos dos cálices dos corpos pedunculados.

No presente estudo houve super-expressão de actina em operária na fase de pupa de olhos preto, quando comparado a expressão desta proteína com zangões desta fase o que mais uma vez, pode estar relacionado com a necessidade de funcionamento mais precoce de algumas vias nervosas em operárias.

6.2.10 Proteína Ccp84Ad CG2341-PA (proteína nº4)

Trata-se de uma proteína estrutural conhecida como constituinte da cutícula de insetos, sendo uma molécula que contribui para a integridade da quitina da cutícula. O sistema nervoso dos insetos apresenta uma camada especializada de células gliais, chamada perineuro que é coberta por uma lâmina basal fina, a lamela neural. A lamela neural é uma camada acelular composta de mucopolissacarídeos neutros e mucoproteínas e proporciona um suporte mecânico para o sistema nervoso central. Como a quitina é um polissacarídeo nitrogenado, pode ser que esta proteína estrutural, a Ccp84Ad CG2341-PA, também esteja presente nesta camada. Além disso, o sistema nervoso é de origem ectodérmica e as células desta origem são capazes de sintetizar as proteínas e quitina que constituem o exoesqueleto. Em algumas espécies de abelhas solitárias, como por exemplo, espécies de *Xylocopa* o cérebro é envolvido por uma espécie de cutícula, ou lamela neural esclerotizada, parecida à cutícula do tegumento. Portanto, como esperado esta proteína foi encontrada em todos os perfis analisados. Apresentou super expressão em rainhas de pré-pupas em relação a operárias, sendo que pelo fato de ser uma proteína estrutural pode esta diferença de expressão estar relacionada a diferenças temporais no desenvolvimento entre as castas femininas.

6.2.11 Proteína similar a Adenilato-quinase-2 CG3140-PA (proteína nº5)

Adenilato-quinase é uma proteína mitocondrial que catalisa a reação reversível de transferência de fosforil do ATP para ADP e então para o AMP. Assim como a arginina-quinase, descrita acima, a adenilato-quinase é uma enzima importante na geração de energia para diversos processos celulares. Esta proteína apresentou-se super expressa em pré-pupas de rainhas e zangões em comparação a operárias desta fase. Isto pode estar relacionado aos processos metabólicos característicos de cada fase e indivíduo, que demandam energia e necessitam de tipos diferentes de quinases para sua geração.

6.2.12 Proteína similar a enzima E-1 (proteínas nº 9 e 12)

Esta é outra enzima envolvida na conversão e produção de energia. Apresenta tanto atividade de enolase, ou seja participa na glicólise, catalizando a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, o penúltimo passo na conversão de glicose em

piruvato, quanto na atividade fosfatásica, com ação oposta às quinases, pois remove grupos fosfatos dos substratos. No presente estudo esta enzima está presente nas duas fases estudadas, com diferença de expressão em ambas as fases, estando super expressa na fase de pré-pupa de zangões e em pupa de olhos pretos de operárias (quando comparados à rainhas). Novamente, esta enzima deve estar envolvida nos processos metabólicos da metamorfose do cérebro.

Por fim foi identificada com diferença de expressão uma proteína hipotética super expressa em pré-pupas de rainhas e zangões. Esta seqüência foi predita a partir de anotação do genoma de abelhas, que foi completamente seqüenciado. Seriam necessários estudos mais aprofundados de caracterização desta proteína para se certificar de sua seqüência e verificar sua função.

O estudo bioquímico realizado possibilitou uma visão geral das proteínas presentes no cérebro de *A. mellifera* durante a metamorfose, através da identificação de algumas destas proteínas diferencialmente expressas entre os indivíduos em determinadas fases, que podem caracterizar as funções peculiares em cada fase da vida ou de cada classe de indivíduo na colônia. No entanto, as proteínas identificadas foram escolhidas pelo maior grau de expressão, que podem não ser as melhores para mostrar as diferenças, visto que nem sempre são necessárias quantidades expressivas de um composto nos eventos que regulam os processos celulares. Apesar disso, muitos dos resultados obtidos, corroboram os já observados nos estudos morfológicos, como o envolvimento de proteínas relacionadas à apoptose em fases onde foram observadas mortes celulares. Contudo, não foi possível fazer uma correlação mais aproximada com os eventos da diferenciação em curso nas fases da vida estudadas, ou com as diferenças entre os indivíduos. A escolha das proteínas a serem identificadas pode ter contribuído para essa impossibilidade. Seria necessária uma análise proteômica mais ampla dos perfis, que não era o foco principal deste trabalho.

Pelo que se pôde deduzir da função das proteínas identificadas, seja em abelhas ou em outros organismos, estas são de ocorrência geral, não só nos diversos organismos, como em diferentes tipos de células e tecidos, não podendo, portanto, ser usadas com segurança para explicar as diferenças de desenvolvimento do cérebro, como

se pretendia. Apesar disso, não há dúvida que a expressão diferencial entre as fases da vida e/ou entre as classes de indivíduos deve ter algum significado, o qual se tentou explicar com base na função conhecida para elas.

De uma maneira geral, todos os enfoques sob os quais a metamorfose do cérebro nas três classes de indivíduos foi examinada, mostraram que as diferenças detectadas neste órgão nos adultos das abelhas, se estabelecem por mecanismos de divisão e mortes celulares em tempos e fases diferentes, que resultam em tamanhos e morfologias que diferem entre eles. Os controles que regulam esses mecanismos dependem do ambiente interno geral do organismo, talvez com maior peso para os teores hormonais, mas também da expressão gênica e protéica no interior do próprio cérebro.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Embora o padrão geral de organização do cérebro das três classes de adultos componentes das colônias de *A. mellifera* seja o mesmo, as classes apresentam diferenças perceptíveis nos corpos pedunculados, lobos ópticos e “pars intercerebralis” do protocérebro e no deutero cérebro, nos lobos antenais.
2. Essas diferenças estabelecem-se durante a metamorfose devido à taxas de divisão e morte celular diferenciais entre as classes, sejam estas temporais ou quantitativas.
3. Os corpos pedunculados, por serem locais de processamento de estímulos oriundos das antenas e olhos compostos e organização das respostas condizentes são as estruturas que apresentam maiores diferenças estruturais entre operárias, rainhas e zangões.
4. Na diferenciação dos corpos pedunculados, as rainhas apresentam atraso no desenvolvimento do cálice, ou seja, na produção de dendritos pelos neurônios.
5. Medidas das partes componentes dos corpos pedunculados mostram que estas estruturas apresentam-se mais desenvolvidas em operárias recém-emergidas, com correlação com o comportamento mais complexo desta casta.
6. As sub-populações de células de Kenyon presentes nos corpos pedunculados apresentam apenas diferenças sutis em sua ultra-estrutura, portanto, as diferenças devem expressar-se mais em nível fisiológico.

7. Os lobos ópticos são outra das estruturas cerebrais que diferem devido aos diferentes requerimentos visuais das classes de indivíduos. A divisão celular ocorre por mais tempo em zangões e menos tempo em rainhas e as mortes celulares são mais freqüentes em rainhas e menos freqüentes em zangões, resultando em lobos ópticos maiores para este sexo.
8. Os lobos antenais mostram características próprias de desenvolvimento relacionado aos requerimentos olfativos de cada indivíduo com desenvolvimento mais rápido nos zangões e mais lento em rainhas.
9. As diferenças desenvolvimentais e morfológicas correspondem a diferenças na expressão protéica, embora nem sempre a razão das diferenças de expressão possam ser adequadamente explicadas.
10. As diferenças na expressão de proteínas durante a metamorfose do cérebro em operárias, rainhas e zangões são principalmente quantitativas.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C., CRUZ-LANDIM, C. Estudo Comparativo da Área Ocupada pelos Corpos Pedunculados no Cérebro de duas Espécies de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p.955 - 962, 1996.

ABRAMS, J.M.; WHITE, K.; FESSLER, L.; STELLER, H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, p. 29-43, 1993.

AKAMATSU, Y; DUNN, P.E.; KEZDY, F.J.; KRAMER, K.J.; LAW, J.H.; RUBSTEIN, D.; SANBURG, L.L. Biochemical aspects of juvenile hormone action in insects. In: MEINST, R.; DAVIES, E.(eds.). **Control mechanism in development**. New York: Plenum Publishing Corporation, p.123-49, 1975.

AMDAM, G.V.; SEEHUUS, S-C.; KREKLING, T. Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. **Experimental Gerontology**, v.41, p.1117-1125, 2006.

ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H. Apoptosis mechanism and roles in pathology. **International review of experimental pathology**, v.32, p.223-254, 1991.

ARNOLD, G.; MASSON, C.; BUDHARUGSA, S. Demonstration of a sexual dimorphism in the olfactory pathways of the drones (*Apis mellifera* L, Hymenoptera, Apidae). **Experientia** v.40, p.723-725, 1984.

ARNOLD, G.; MASSON, C.; BUDHARUGSA, S. Comparative study of the antennal lobes and their afferent pathway in the worker bee and the drone (*Apis mellifera*). **Cell and Tissue Research**, v.242, p.593-605, 1985.

BATE, C.M. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.35, p.107-23, 1976.

BIEBER, M.; FULDNER, D. Brain growth during the adult stage of a holometabolous insect. **Naturwissenschaften**, v.66, n.8, p.426-433, 1979.

BITONDI, M.M.G.; NASCIMENTO, A.M.; CUNHA, A.D.; GUIDUGLI, K.R.; NUNES, F. M.F.; SIMÕES, Z.L.P. Characterization and Expression of the Hex 110 Gene Encoding a Glutamine-Rich Hexamerin in the Honey Bee, *Apis mellifera*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.63, p.57-72, 2006.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v.2, p.248-254, 1976.

BURMESTER, T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. **Journal of comparative physiology . Biochemical, systematic, and environmental physiology . B**, v.172, p.95–107, 2002.

BURMESTER T, SCHELLER K. Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.25, p.799-806, 1995.

BURMESTER T, MATZNER U, SCHELLER K. Effect of 20-hydroxyecdysone on synthesis and uptake of arylphorin by the larval fat body of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). **European journal of entomology**, v.92, p.217-227, 1995.

BURSCH, W.; KLEINE, L.; TENNISWOOD, M. The biochemistry of cell death by apoptose. **Biochemistry and Cell Biology.**, v. 68, p.1071-1074, 1990.

BUSS, R.R.; OPPENHEIN, R.W. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. **Anatomical Science International**, 79: 191-97. 2004

CAMPOS-ORTEGA, J.A. Mechanisms of early neurogenesis in *drosophila melanogaster*. **Journal of neurobiology.**, v.24, p.1305-1327, 1993.

CAMPOS-ORTEGA, J. A. Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Cellular and molecular neurobiology.**, v.10, p.75-89, 1995.

CAPALDI, E.A.; ROBINSON, G.E.; FAHRBACH, S.E. Neuroethology of Spatial Learning: The Birds and the Bees. **Annual Review of Psychology**, v.50, p.651-682, 1999

CAPURRO M DE L, MOREIRA-FERRO CK, MARINOTTI O, JAMES AA, BIANCHI AG. Expression patterns of the larval and adult hexamerin genes of *Musca domestica*. **Insect molecular biology**, v.9, p.169-177, 2000.

CAYRE, M.; STRAMBI, C.; CHARPIN, P.; AUGIER, R. ; MEYER, M.R.; EDWARDS, J.S.; STRAMBI, A. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. **Journal of comparative neurology**. v.371, p.300-310, 1996.

CAYRE, M.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control. **Nature**, v.368, p. 57-58, 1994.

CHAMPLIN, D.T.; TRUMAN, J.W. Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. **Development**, v.125, p.269-77, 1998.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. New York, Cambridge University Press, 1998, 770p.

CHOI, M.K.; FAHRBACH, E.S. Evidence for an endogenous neurocidin in the *Manduca* ventral nerve cord. **Archives of insect biochemistry and physiology.**, v.28, p.273-89, 1995.

CHRISTENSEN, T.A.; HARROW, I.D.; CUZZOCREA, C.; RANDOLPH, P.W.; HILDEBRAND, J.G. Distinct Projections of Two Populations of Olfactory Receptor Axons in the Antennal Lobe of the Sphinx Moth *Manduca sexta*. **Chemical Senses** v.20, p.313-323, 1995.

CLARK, A.G. The comparative enzymology of the glutathione Stransferases from non-vertebrate organisms. **Comparative biochemistry and physiology., Biochemistry and molecular biology . Parte B** v.92, p.419–446, 1989.

CRUZ-LANDIM, C. Órgãos dos sentidos em abelhas eussociais. VII Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto, SP. Hipertexto – CD, 2006.

CRUZ-LANDIM, C.; HOFLING, J.F.. The post-embryonic changes in *Melipona quadifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera: Apoidea). V. Development of the nervous system. **Papéis Avulsos de Zoologia.**, v.26, p.137-147, 1972.

CRUZ-LANDIM, C.; ZANIBONI, M.C.. Estudo do tamanho relativo de algumas estruturas cerebrais de abelhas (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia**, v.11/12, p.23-32, 1986/1987

CRUZ-LANDIM, C., CHAUD-NETTO, J. e GONÇALVES, L.S. Morphological alterations in the compound eyes of eye-color mutants of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera- Apidae). **Revista Brasileira de Genética. II**, v.3, p.223-231, 1979.

CUNHA, A.D.; NASCIMENTO, A.M.; GUIDUGLI, K.R.; SIMÕES, Z.L.P.; BITONDI, M.M.G. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of insect physiology**. v.51, p.1135–1147, 2005.

DANTY, E., ARNOLD, G., BURMESTER, T., HUET, J.C., HUET, D., PERNOLLET, J.C., MASSON, C. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.28, p.387–397, 1998.

DOE, C.Q. Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. **Development**, v.116, p.855-863, 1992.

DOOLITTLE, G.M. N.G.M. Doolittle queen-rearing methods. **American Bee Journal**, v.39, p.435-36, 1899.

DUMAS, C., CAMONIS, J. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle. **The Journal of biological chemistry**, v.29, p.21599–21605, 1993.

DURST, C.; EICHMÜLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behavioral and neural biology**, v.62, p.259-263, 1994.

FAHRBACH, S.E.; STRANDE, J.L.; ROBINSON, G.E. Neurogenesis is absent in the brains of adult honeybees and does not explain behavioural plasticity. **Neuroscience Letters**. v.197, p.145-148, 1995.

FAHRBACH, S.E.; MOORE, D.; CAPALDI, E.A.; ROBINSON, G.E. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honey bee. **Learning & memory**, v.5, p.115-123, 1998.

FARRIS, S.M.; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Structure and Development**, v.32, n.1, p.79-101, 2003.

FARRIS, S.M.; STRAUSFELD, N.J. A unique mushroom body substructure common to basal cockroaches and to termites. **The Journal of Comparative Neurology**, v.456, p.305-320, 2003.

FARRIS, S.M.; ROBINSON, G.E.; DAVIS, R.L.; FAHRBACH, S.E.. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.414, p.97-113, 1999.

FRAMBACH, I.; ROESSLER, W.; WINKLER, M.; SCHUERMANN, F.W. F-actin at identified synapses in the mushroom body neuropil of the insect brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.475, n. 3, p.303-314, 2004.

GANESHINA, O.; SCHAFER, S.; MALUN, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. **The Journal of Comparative Neurology**, v.417, p.349-365, 2000.

GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. **Biochemical and biophysical research communications**, v.286, p.433–442, 2001.

GIEBULTOWICS, J.M. e TRUMAN, J.W. Sexual differentiation in the terminal ganglion of the moth *Manduca sexta*: role of sex-specific neuronal death. **Journal of comparative neurology**, v.226, p.87-95, 1984.

GOODMAN, C.S.; BATE, M. Neuronal development in the grasshopper. **Trends in neurosciences**, v.4, p.163-69, 1981.

GOODMAN, C.S. e DOE, C. Q. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: BATE, M.; MARTINEZ ARIAS, A. (eds.). **The development of *Drosophila melanogaster***. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY. 1993. p.1131-1206.

GURLEY LR, D_ ANNA JA, BARHAN SS, DEAVEN LL, TOBEY RA. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. **European journal of biochemistry** v.84, p.1-15, 1978.

HAHN DA, WHEELER DE. Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.49, p.1189-1197, 2003.

HÄHNLEIN, I.; BICKER, G. Glial patterning during postembryonic development of central neuropiles in the brain of the honey bee. **Development Genes and Evolution**, v.207, p.29-41, 1997.

HANSSON, B. S.; ANTON, S. Function and Morphology of the Antennal Lobe: New Developments. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.203-231, 2000.

HANSSON, B.S.; LJUNGBERG, H.; HALLBERG E.; LOFSTEDT. C. Functional specialization of olfactory glomeruli in a moth. **Science**, v.256, n.5061, p.1313-1315, 1992.

HAYAOKA, T; DAUTERMAN, W. C. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various house fly strains and its effect on toxicity, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.17, p.113-118, 1982.

HEISENBERG, M.; BORST, A.; WAGNER, S.; BYERS, D. *Drosophila* Mushroom Body Mutants are Deficient in Olfactory Learning. **Journal of Neurogenetics**, v.2, n.1, p.1-30, 1995.

HENDZEL MJ, WIE Y, MANCINI MA, VAN HOOSER A, RANALLI T, BRINKLEY BR, BAZETT-JONES DP, ALLIS CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v.106, p.348–360, 1997.

HUNT, J.H., BUCK, N.A., WHEELER, D.E. Storage proteins in vespid wasp: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. **Journal of Insect Physiology**, v.49, p.785–794, 2003.

ITO, K.; HOTA, Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology**, v.149, p.134-148, 1992.

JAWLOWSKI, H. Nerve tracts in bees (*Apis mellifera*) running from the sight and antennal organs to the brain. **Annalis universitatis mariae curie-shlodowska**. Lublin-Polônia, v.XII, p. 307-323, section D, 1957.

JAY, S.C. The development of honeybees in their cells. **Journal of Apicultural Research**, v.2, p.117–134, 1963.

JIANG. C.; BAEHRECKE, E.H.; THUMMEL. C.S.; Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Development**, v.124, p.4673-83, 1997.

KAMIKOUCHI, A.; TAKEUCHI, H.; SAWATA, M.; OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-triphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honey bee *Apis*

mellifera L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.242, p.181-186, 1998.

KAMIKOUCHI, A.; TAKEUCHI, H.; SAWATA, M.; NATORI, S.; KUBO, T. Concentrated expression of Ca⁺² Calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. **The Journal of Comparative Neurology**, v.417, p.501-510, 2000.

KENNEDY M. W., SCOTT J. C., LO S., BEAUCHAMP J.; MC-MANUS D. P. Sj-FABPc fatty acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue. **The Biochemical journal**, v.349, p.377– 384, 2000.

KEPPEL, E., SCHALLER, H.C. A 33-kDa protein with sequence homology to the “laminin binding protein” is associated with the cytoskeleton in hydra and in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v.100, p.789–797, 1991.

KERR, J.F.R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. **Journal of Pathology**, v.105, p.8-20, 1971.

KIMURA. K.; TRUMAM. J.W. Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular system of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Neuroscience**. v.10, p.403-11, 1990.

KLOPPENBURG, P. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). **The Journal of Comparative Neurology**, v.363, n.2, p.333–343, 1995.

KOSTAROPOULOS, I., PAPADOPOULOS, A.I., METAXAKIS, A., BOUKOUVALA, E., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insect. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.313–319, 2001.

KUBO, T.; SAKANI, M.; NAKAMURA, J., SASAGAWA, H., OHASHI, H.T.; NATORI, S. Change in the expression hypopharyngeal glands proteins of the worker honey bee (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. **Journal of Biochemistry**, v.119, p.291-295, 1996.

KUBO, T.; YAMAZAKI, Y.; SHIRAI, K.; PAUL, R.K.; FUJIYUKI, T.; WAKAMOTO, A.; TAKEUCHI, H. Differential expression of HR38 in the mushroom bodies of the honey bee brain depends on the caste and division of labor. **FEBS Letters.**, v.580, p.2667-2670, 2006.

KUBO, T.; UNO, Y.; FUJIYUKI, T.; MORIOKA, M.; TAKEUCHI, H. Identification of proteins whose expression is up- or down-regulated in the mushroom bodies in the honeybee brain using proteomics. **FEBS Letters.**, v.581, p.97-101, 2007.

KUCHARSKI, R. MALESZKA, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. **Gene**, v.211, p.343–349, 1998.

KUCHARSKI, R.; HAYWARD, D.; BALL, E.E.; MALESKA, R. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. **Naturwissenschaften**, v.85, p.343-346, 1998.

KUZIN, B.; ROBERTS, I.; PEUNOVA, N.; ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. **Cell**, v.87, p.639-49, 1996.

LANCET, D. Vertebrate Olfactory Reception. **Annual Review of Neuroscience**, v.9, p.329-355, 1986.

LEVINE, R.B.; TRUMAN, J.W. Dendritic reorganization of abdominal motoneurons during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*. **Journal of Neuroscience**. v.5, p.2424-31, 1985.

LI, Y., STRAUSFELD, N.J. Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of cockroach, *Periplaneta americana*. **Journal of Comparative Neurology**, v.387, p.631-650, 1997.

LIU Y., MOLINA C. A., WELCHER A. A., LONGO L. D. ; DE LEÓN M. Expression of DA11, a neuronal-injury-induced fatty acid binding protein, coincides with axon growth and neuronal differentiation during central nervous system development. **Journal of Neuroscience Research**, v.48, p.551–562, 1997.

LIU Y., LONGO L. D., DE LEÓN M. In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain. **Brain Research**, v.852, p.16–27, 2000.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. The biology of cell death and its relationship to cellular aging and cell death. In: HOLBROOK, N.K.; LOCKSHIN, R.A. (eds.). **Cellular Aging and Death**. New York: Wiley-Liss, 1996. p. 167-180.

MACGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUOI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J. The end of the cell line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. In: SCHWARTZ, L.M.; OSBORNE, B.A. (eds.). **Cell death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 153-185.

MALUN, D. Early Development of Mushroom Bodies in the Brain of the Honeybee *Apis mellifera* as Revealed by BrdU Incorporation and Ablation Experiments. **Learning & memory**, v.5, n.1, p.90-101, 1998.

MALUN, D.; MOSELEIT, A.D.; GRÜNEWALD, B. 20-hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Neurobiology**, v. 57, p.1-14, 2003.

MELNICK, M.B., NOLL, E., PERRIMON, N. The *Drosophila* stubarista phenotype is associated with a dosage effect of the putative ribosome-associated protein D-p40 on *spineless*. **Genetics**, v.135, p.553–564, 1993.

MENZEL R.; DURST, C.; ERBER, J.; EICHMÜLER, S.; HAMMER, M.; HILDEBRANDT, H.; MAUELSHAGEN, J.; MÜLER, U.; ROSENBOOM, H.; RYBAK, J.; SCHÄFER, S.; SCHEIDLER, A.. The mushroom bodies in the honeybee: from molecules to behaviour. In: SCHILDBERGER, K.; ELSNER, N. (eds.). Fortschritte der Zoologie, 39. **Neural basis of behavioral adaptations**. Stuttgart: Fischer, 1999. 481-102p.

MICHALAK, M.; CORBETT, E.F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **The Biochemical Journal**, v. 344, p.281-292, 1999.

MIZUNAMI, M.; OKADA, R.; LI, Y-S.; STRAUSFELD, N. Mushroom bodies of the cockroach: activity and identities of neurons recorded in freely moving animals. **The Journal of Comparative Neurology**, v.402, p.501-519, 1998.

MOBBS, P.G. The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.298, p.309-54, 1982.

MOSMA, S.A.; BOOKER, R. Genesis of the adult retina and outer optic lobes of the moth *Manduca sexta*. I. Patterns of proliferation and cell death. **Journal Of Comparative Neurology**, v.367, p.10-20, 1996.

MÜLLER, U. Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Neurobiology**, v.33, p.33-44, 1997.

NICOTERA, P.; BRANE, B.; BAGETTA, G. Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.18, p.189-90, 1997.

NORDLANDER, R.H e EDWARDS, J.S Postembryonic brain development in the monarch butterfly *Danaus plexippus plexippus* L.I. Cellular events during brain morphogenesis. **Wilhelm Roux's Archives**, v.162, p.197-21, 1969.

NORDLANDER, R.H.; EDWARDS, J.S. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus*. L. III. Morphogenesis of centers other than the optic lobes. **Wilhem Roux's Archive of Developmental Biology**, v.164, p.247-260, 1970.

OWADA Y., YOSHIMOTO T., KONDO H. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.12, p.13–122, 1996.

OKADA, R.; IKEDA, J.; MIZUNAMI, M. Sensory responses and movement-related activities in extrinsic neurons of the cockroach mushroom bodies. **Journal of Comparative Physiology**, v.185, p115-129, 1999.

PAN ML, TELFER WH. Methionine-rich hexamerin and arylphorin as precursor reservoirs for reproduction and metamorphosis in female luna moths. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.33, p.149-162, 1996.

PANDAZIS, G. Über die relative ausbildung der gehirnzentren bei biologisch verschiedenen ameisenarten. **Zeitschrift für morphologie und ökologie der tiere**, v.18, p.114-169, 1930.

PANOV, A.A.. The structure of the brain in insects in successive stages of postembryonic development. **Revue d'Entomologie de URSS**, v.36, p.269-284, 1957

PAPADOPOULOS, A.I., BOUKOUVALA, E., KAKALIOURAS, G., KOSTAROPOULOS, I., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.68, p.26–33, 2000.

PAPADOPOULOS, AI.; POLEMITOU, I.; LAIFI, P.; YIANGOU,A.; TANANAKI, C. Glutathione S-transferase in the developmental stages of the insect *Apis mellifera macedonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology and Pharmacology: Part C**, v.139, p.87–92, 2004.

PASCUAL, A.; PRÉAT, T. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. **Science**, v.294, p.1115-1117, 2001.

PAULSON JR, TAYLOR SS Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.6064-6072, 1982.

PROKOP, A. e TECHNAN, G.M. The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. **Development**, v.111, p.79-88, 1991.

RACHINSKY A.; STRAMBI, C.; STRAMBI A.; HARTFELDER K. Caste and metamorphosis: haemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. **General and Comparative. Endocrinology**, v.79, p.31-8, 1990.

REMBOLD, H.; HANSER, G. On the royal jelly of the honey bees 8. Demonstration of the determining principle in the jelly of queen bee larvae. **Hoppe-Seyler Zeitschrift der Physiologische Chemie**, v. 339, n.1, p. 251-254, 1964.

ROBINSON, G.E.; FAHRBACH, S,E.; WINSTON, M.L. Insect societies and the molecular biology of social behavior. **BioEssays**, v.19, n.2, p.1099-1108, 1997.

ROBINSON, G.E.; GROZINGER, C.M.; SHARABASH, N.M.; WHITFIELD, C.W.

- Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.2, p.14519-14525, 2003a.
- ROBINSON, G.E.; WHITFIELDS, C.W.; CZIKO, A-M. Gene Expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. **Science**, v.302, p.296-299, 2003b.
- RYAN, R.O., SCHMIDT, J.O., LAW, J.H. Arylphorin from the haemolymph of the larval honey bee. **Insect Biochemistry**, v.14, p.515–520, 1984.
- RYBAK, J.; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, v.334, n.3, p.444-65, 1993.
- SAWATA, M.; TAKEUCHI, H.; KAMICHOUCHI, A.; OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Identification and characterization of a gene expressed specifically in the small type Kenyon cells of the brain of the worker honey bee (*Apis mellifera* L.). **Proceedings of the XIII International Congress of the IUSSI**, p. 418. 1998.
- SCHILDBERGER, K. Multimodal interneurons in the cricket brain: properties of identified extrinsic mushroom body cells. **Journal of Comparative Physiology**, v.154, p.71-79, 1984.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, v.68, p.850-858, 1996.
- SEELEY TD Life-history strategy of the honey bee *Apis mellifera*. **Oecologia**, v.32, p.109–118, 1978.
- SELLNER P. A., CHU W., GLATZ J. F. C, BERMAN N. E. J. Developmental role of fatty acid-binding proteins in mouse brain. **Developmental Brain Research**, v.89, p.33–46, 1995.

SEO SJ, KANG YJ, CHEON HM, KIM HR. Distribution and accumulation of storage protein-1 in ovary of *Hyphantria cunea* Drury. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.37, p.115-128, 1998.

SESSO, APitfals in the use of electron microscopy to study the mitochondrial membrane permeability transition in apoptotic cells and pellets: where do we stand in relation to the induce of mitochondrial swelling in apoptosis? **Brazilian Journal of Morphological Sciences.**, v.23, n.1, p.57-74, 2006.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N.J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. 2ed. Mc Graw-Hill, Inc, 1988. 399pp.

SILVA, L.O.; CALÁBRIA, L.K. ; GUIMARÃES, L.M.A.D.; ESPINDOLA, F.S (2007) Effect of W7, melittin and NMDA on the brain protein profile of the honeybee *Apis mellifera* L. Annals of XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Meio de divulgação: Digital.

SMIRLE, M.J., WISNTON, M.L. Detoxifying enzyme-activity in worker honey bees. An adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**,. v.66, p.1938–1942, 1988.

SNODGRASS, R.E.. **Principles of insect morphology**. New York and London, McGraw-Hill Book Company, 1935. 667p.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey bee**. Ithaca, New York, Comstock Publishing Associates, 1956. .334p.

SONNENFELD, M.J.; JACOBS, J.R. Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the *Drosophila* embryonic nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v.359, p.644-652, 1995.

STRAUSFELD, N. J.; HOMBURG, U.; KLOPPENBERG, P. Parallel organization in honey bee mushroom bodies by peptidergic kenyon cells. **The Journal of Comparative Neurology**, v.424, n.1, p.179–195, 2000.

STRONG, S.J., ELLINGTON, W.R. Isolation and sequence analysis of the gene for arginine kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus hauser, polyphemus*: insights into catalytically important residues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1246, p.197–200, 1995.

TAKEUCHI, H.; SAWATA, M.; KAMIKOUCHI, A.; OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. cDNA cloning and the characterization of the gene expressed specifically in the large type of Kenyon cells of the mushroom bodies of the worker honey bee (*Apis mellifera*). **Proceedings of the XIII International Congress of the IUSI**, p.465, 1998.

TECHNAU, G.M. Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience. **Journal of Neurogenetics**, v.1, p.113-126, 1984.

THORN, R.S.; TRUMAN, J.W. Sex-specific neuronal respecification during the metamorphosis of the genital segments of the tobacco hornworm moth *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Neurology**, v.284, p.489-503, 1989.

TISSOT, M. e STOCKER, R.F. Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. **Progress in Neurobiology**, v.62, n.1, p.89-111, 2000.

TOROK, I., HERRMANN-HORLE, D., KISS, I., TICK, G., SPEER, G., SCHMITT, R. Down-regulation of RpS21, a putative translation initiation factor interacting with P40, produces viable minute imagos and larval lethality with overgrown hematopoietic organs and imaginal discs. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, p.2308–2321, 1999.

TRUMAN. J.W. Programmed cell death in the nervous system of an adult insect. **Journal of Comparative Neurology**, v.216, p.445-52., 1983.

TRUMAN, J.W. Cell death in invertebrate nervous systems. **Annual Reviews in Neuroscience**, v.7, p.171-88, 1984.

TRUMAN, J.W. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. **Journal of Neurobiology**, v.21, p.1072-1084, 1990.

TRUMAN, J.W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects. **Developmental Neuroscience**, v.18, p.87-101, 1996.

TRUMAN, J.W.; BATE, M. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. **Developmental Neuroscience**, v.125, p.145-157, 1988.

TRUMAN, J.W.; THORN, R.S.; ROBINOW, S. Programmed neuronal death in insect development. **Journal of Neurobiology**, v.23, p.1295-311, 1992.

TRUMAN JW, TAYLOR BJ, AWAD TA. Formation of the adult nervous system. In: BATE M, MARTINEZ-ARIAS A. (eds.). **The development of *Drosophila melanogaster***. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. p 1245–1275.

UENO K, NATORI S. Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for the selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae. **Insect biochemistry**, v.12, p.185-191, 1982.

Van HEUSDEN, G.P. 14-3-3 Proteins: Regulators of Numerous Eukaryotic Proteins. **IUBMB Life**, v.57, n.9, p.623-629, 2005.

VIDAL, B.C. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, v.1, p.218-21, 1996.

WATERHOUSE, N.J.; PINKOSKI, M.J. Calreticulin: Raising awareness of apoptosis. **Apoptosis**, v.12, p.631–634, 2007.

WEEKS, J.C.; TRUMAN, J.W. Independent steroid control of the fates of motoneurons and their muscles during metamorphosis. **Journal of Neuroscience**, v.5, p.2290-300, 1985.

WEEKS, J.C.; TRUMAN, J.W. Hormonally mediated reprogramming of muscles of motoneurons during the larval-pupal transformation of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Experimental Biology**, v.125, p.1-13, 1986.

WEEKS, J.C.; ROBERTS, W.M.; TRIMBLE, D.L. Hormonal control and segmental specificity of motoneuron phenotype during metamorphosis of tobacco hornworm *Manduca sexta*, **Developmental Biology**, v.149, p.185-96, 1992.

WHEELER, D., MARTINEZ, T. Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). **Comparative biochemistry and physiology. Biochemistry and molecular biology: Parte B**. v.112, p.15–19, 1995.

WHEELER DE, TUCHINSKAYA I, BUCK NA, TABASHNIK BE. Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.951-958., 2000.

WHITE, K. E KANKEL, D.R. Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. **Developmental Neurobiology**, v.65, p.296-321, 1978.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. Cambridge, Massachusetts London, England, Harvard University Press, 1987. 281p.

WITTHOFT W. Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. **Zeitschrift fur Morphologie der Tiere**, v.61, p.160–184, 1967

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associate with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v.284, p.55-556, 1980.

WYLLIE, A.H.; DUVALL, E.; BLOW, J.J. Intracellular mechanism in cell death in normal pathological tissues, In: DAVIES, I.; SIGER, D.C. (eds.). **Cells aging and cell death**. Cambridge University Press, 1984a. p.269-294.

WYLLIE, A.H.; DUVALL, E.; BLOW, J.J. Cromatin cleavage in apoptosis association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. **Journal of Pathology**, v. 142, p.67-78, 1984b.

XIONG, W-C.; MONTELL. C. Defective glia induce neuronal apoptosis in the *repo* visual system of *Drosophila*. **Neuron.**, v.14, p.581-90, 1995.

YIN, V.P.; THUMMEL, C.S. A balance between the diap 1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid triggered cell death in *Drosophila* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.8022-8027, 2004.

ZANIBONI, M.C.,CRUZ-LANDIM, C. Estudo do tamanho relativo de algumas estruturas cerebrais de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) **Naturalia**,v.11/12,p.23-32, 1987.

ZARS, T.; FISCHER, M., SCHULTZ, R.; HEISEMBERG, M. Localization of the short-term memory in *Drosophila*. **Science**, v.228, p.672-675, 2000.

Rio Claro, 07 de agosto de 2008.

Orientada:

Thaisa Cristina Roat

Orientadora:

Profª. Dra. Carmina da Cruz-Landim