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

**RELAÇÃO ENTRE O CORPO GORDUROSO
E A VITELOGÊNESE EM FÊMEAS DE
Melipona quadrifasciata anthidioides Lep.**

VAGNER TADEU PAES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Bociências 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).

Dezembro - 2005

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

**RELAÇÃO ENTRE O CORPO GORDUROSO
E A VITELOGÊNESE EM FÊMEAS DE
Melipona quadrifasciata anthidioides Lep.**

VAGNER TADEU PAES DE OLIVEIRA

Orientadora: Profa. Dra. Carminda da Cruz-Landim

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia 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).

Dezembro - 2005



A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) apoiou o desenvolvimento desta Tese concedendo minha bolsa de doutorado (Processo – 02/01407-2).

ABRIL

(Adriana Calcanhoto)

*Sinto o abraço do tempo apertar
e redesenhar minhas escolhas
logo eu, que queria mudar tudo
me vejo cumprindo ciclos
gostar mais de hoje e gostar disso
Me vejo com meus olhos, tempo
espero pelas novas folhas
e imagino jeitos novos
para as mesmas coisas
logo eu, que queria ficar
para ver encorparem os caules
lá vou eu, eu queria ficar
pra me ver mais tarde
sabendo o que sabem os velhos
pra ver o tempo e seu lento ácido
dissolver o que é concreto
E vejo o tempo em seu claro-escuro
vejo o tempo em seu movimento
me marcar a pele fundo
me impelindo, me fazendo
logo eu, que fazia girar o mundo
logo eu, quem diria esperar pelos frutos
Conheço o tempo em seus disfarces
em seus círculos de horas
se arrastando feito meses
se o meu amor demora
E vejo bem, tudo recomeçar todas as vezes
e vejo o tempo apodrecer e brotar e seguir sendo sempre ele
Me vejo o tempo todo
começar de novo
e ser e ter tudo pela frente
Me vejo o tempo todo
começar de novo
e ser e ter tudo pela frente*

As minhas avós queridas:

*Albertina Matos Paes de Oliveira e
Maria Luiza de Souza Cascão*

Dedico

*A minha professora e orientadora:
Dra. Carinda da Cruz-Landim*

*“A tarefa do professor:
Mostrar a frutinha vermelha.
Comê-la diante dos olhos dos alunos.
Erotizar os olhos.
Provocar a fome.
Fazê-los babar de desejo.
Acordar a inteligência adormecida
Ai a cabeça fica grávida: Preenhe de idéias.
E quando a cabeça engravida não há nada que segure o corpo”*

(Rubem Alves)

Agradeço por ter ajudado a me tornar o que eu sou

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que estiveram ao meu lado durante este importante momento de minha vida e que, não por coincidência, são ou estão se tornando partes essenciais de mim, especialmente:

Meus pais Sidinei e Ana Maria e todos os familiares que torceram por mim.

Meus amigos: Fabiana, Bia Triano, Carol Malaspina, Giovana Bottura, Karina, Karla, Malú, Maria Cláudia, Rodrigo, Fábio Brito, Girlei, Gustavo, Ivan, Marielle, Naila, Nilma, Rafael, Ricardo, Valéria, Flávia, Joelma, Rosinha, Alessandro, Gilson, Aparecida do Carmo, Mara...

Se todos fossem no mundo iguais a você

Que maravilha viver.

(Tom Jobim)

A Fabiana Julião, seus pais Hachid e Lena e seu irmão Nando, que me acolheram com tanto carinho durante a minha estada em Ribeirão Preto.

A Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi e Dra. Zilá Luz Paulino Simões que abriram as portas do laboratório de abelhas – USP/RP, para que eu pudesse desenvolver parte do trabalho aqui apresentado. Ainda a Dra. Vera Lúcia Gonçalves e todos alunos e funcionários do referido laboratório. Também ao Rodrigo P. Dallacqua e Weyder C. Santana pela ajuda mais que fundamental.

Ao Dr. José Eduardo Serrão e Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca por terem me ajudado nos momentos críticos do meu trabalho fornecendo abelhas, abrindo mão de material de seus próprios laboratórios.

As Dras. Ana Maria Costa Leonardo, Doralice Maria Cella, Itamar Romano Ruiz, Sanae Kasahara e ao Dr. Flávio Henrique Caetano pelas contribuições, ainda que indiretamente relacionadas ao meu trabalho.

Ao meu grande amigo e companheiro Josivaldo, que tem acompanhado os momentos bons e também os difíceis desse percurso, sempre acreditando em mim, às vezes mais que eu mesmo.

Aos colegas de orientação e Pós – Silvana, William, Thaisa, Bruno, Giovana, Lorena, Fernanda e Michele pelo convívio e aos meus colegas e orientados Rúben, Lincoln e Giodani.

ÍNDICE

I. RESUMO	09
II. ABSTRACT	11
III. INTRODUÇÃO	13
IV. OBJETIVOS	18
V. RESULTADOS	16
CAPÍTULO I - CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL DOS TROFÓCITOS DO CORPO GORDUROSO E OVÁRIOS DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> Lep. DURANTE A VITELOGÊNESE	19
CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DA VITELOGENINA EM EXTRATOS DO CORPO GORDUROSO E OVÁRIO DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> Lep. DURANTE A VITELOGÊNESE	66
CAPÍTULO III - EFEITO DA ADIÇÃO DE HJ-III E 20-HE AO MEIO DE CULTURA, SOBRE OS TROFÓCITOS DO CORPO GORDUROSO DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>: UMA ABORDAGEM CITOQUÍMICA	81
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
VII. REFERÊNCIAS GERAIS	108

I. RESUMO:

Nas abelhas eussociais há duas castas femininas, as rainhas que são responsáveis pela produção dos indivíduos que mantêm a população da colônia e fazem sua multiplicação e as operárias que compartilham entre si todas as tarefas de manutenção da colônia e das próprias atividades da rainha. Na espécie estudada, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, uma abelha sem ferrão, as operárias normalmente produzem ovos em seus ovários na fase em que se ocupam do provisionamento das células de cria (operárias nutridoras), diferentemente de *Apis mellifera* em que feromônios da rainha são capazes de inibir a vitelogênese nos ovários das operárias. As diferenças funcionais entre rainhas e operárias em ambas espécies são controladas hormonalmente. O corpo gorduroso (CG) é um tecido constituído basicamente por um único tipo de célula designado trofócito, cuja função se assemelha em vários aspectos à dos hepatócitos. Os trofócitos ao mesmo tempo em que retiram substâncias da hemolinfa e as armazenam ou metabolizam, sintetizam outras que nela descarregam. Entre estas últimas está a vitelogenina, uma proteína precursora do vitelo acumulado pelos ovócitos durante a vitelogênese, como reserva para o futuro desenvolvimento do embrião. Neste trabalho a citoquímica dos trofócitos de rainhas virgens, fisogástricas e de operárias nutridoras foi estudada com microscopia eletrônica de transmissão (MET) e comparadas com a morfologia do desenvolvimento dos ovócitos no ovário com a finalidade de comparar a atividade dos trofócitos com a absorção de substâncias da hemolinfa pelo ovário. Em outra vertente a presença da vitelogenina foi pesquisada no CG e no ovário de ambas as castas, na tentativa de verificar se havia concordância quanto à produção da proteína nos trofócitos e sua presença nos ovários. Por fim, levando em conta a ação dos hormônios morfogenéticos sobre os trofócitos, estas células de ambas as castas foram incubadas em meios contendo hormônio juvenil III e 20-hidroxiecdisona e sua citoquímica novamente observada com MET com a finalidade de simular, ou de entender, as diferenças entre rainhas e operárias. Os resultados mostraram que o lipídio é o principal tipo de reserva presente nos trofócitos, tanto para as operárias quanto para as rainhas, variando em quantidade e topologia conforme a casta ou seu estado funcional. Os testes citoquímicos também indicaram uma situação intermediária para as rainhas virgens entre o padrão observado em operárias nutridoras e rainhas fisogástricas. Os testes também permitiram identificar que a rota do material originado no CG com destino ao ovário é a mesma nas duas castas, diversificando-se somente quanto à intensidade. As fosfatases parecem estar envolvidas nos processos de reestruturação estrutural pela qual passam os tecidos estudados e na alteração do material que deverá ser acumulado no ovócito. A vitelogenina foi identificada nos extratos de

ovário das rainhas, independente da fisogastria, mas somente no CG de rainhas fisogástricas. Os resultados da incubação do CG no meio contendo os hormônios mostraram um efeito do HJ mais claro e facilmente correlacionável à estrutura do CG e ovário que da ecdisona no caso das operárias nutridoras. Estes resultados permitem concluir que o desenvolvimento dos trofócitos mantém relação com a função reprodutiva da espécie, ou seja, que estes apresentam um polimorfismo tanto estrutural como fisiológico entre as castas femininas e que há uma relação entre este tecido e a vitelogênese que, no entanto, demanda maiores estudos.

II. ABSTRACT:

Eusocial bees have two female castes, the queens that are responsible for producing individuals that will keep the colony population and workers that share among them the tasks of colony maintenance and of the queen care. In the studied species *Melipona quadrifasciata anthidioides*, a stingless bee, workers normally produce eggs in their ovaries when they are provisioning the brood cells (nurse workers), differently from *Apis mellifera*, where pheromones from the queen are able to prevent the vitellogenesis in the workers ovaries. The functional differences between queens and workers are, in both castes controlled by hormones. The fat body (FB) tissue is constituted basically by a single kind of cell designated trophocyte whose function is similar in several aspects to the hepatocytes. The trophocytes at the same time that take substances from the hemolymph and storage or metabolize them also synthesize others that are discharged in the body fluid. Among these is the vitellogenin, a precursor protein of the yolk accumulated by oocytes during the vitellogenesis as a reserve for further development of the embryo. In this work the cytochemistry of trophocytes of virgin and physogastric queens and nurse workers was studied with transmission electron microscopy (TEM) and compared to the morphology of oocytes development in the ovary with the purpose of correlate morphologically the activity of trophocytes to the absorption of substances from hemolymph by the ovaries. The presence of vitellogenin was searched in the FB and ovaries extracts of both castes by electrophoresis, as an attempt to see if there was an agreement between production of the protein in the trophocytes and their presence in the ovaries. Finally, taking into account the action of the morphogenetic hormones over the trophocytes, these cells of both castes were incubated into medium containing juvenile hormones III and 20-hydroxyecdisona and their cytochemistry were once more observed using a TEM with the purpose of simulate, or understand the differences between queens and workers. Results showed that lipid is the principal kind of reserve for workers and queens, only varying in quantity and topology in these cells. The cytochemical test also indicated an intermediary pattern for the virgin queens between nurse workers and physogastric queens. These tests also allowed to identify that the route followed by the material originated in the FB throughout the ovaries is the same in both castes, varying only the flux intensity. Phosphatases seems to be involved in the structural changes by which the studied tissues pass and also in the modification of the material that shall be accumulated into the oocyte. The vitellogenin was identified in the extracts of ovaries from queens, independent of the physogastry, but only in the FB of physogastric queens. Results from the incubation of the FB in the medium containing the hormones, indicated an effect of HJ easily correlatable to the structure of CG and ovary than 20-HE in the case of nurse workers. These

results allow to conclude that the development of trophocytes keeps a straight relationship with the reproductive function of the species, since it presents a structural and physiological polymorphism between female castes and functional stages. Also it indicates that there is a relation between these tissue and vitellogenin presence, but will it demands further studies.

III. INTRODUÇÃO:

III.I. OS MELIPONÍNEOS

A espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* está inserida na sub-família Apinae dos himenópteros, abelhas com comportamento seguramente eussocial. A tribo Meliponini, juntamente com Apini (MICHENER, 1974, 1990, 2000), constitui o grupo de abelhas com grau de organização social mais complexo, comportamento classificado como eussocial avançado, em razão das suas rainhas terem perdido a capacidade de viverem isoladas.

Os meliponíneos, compreendidos pelas abelhas sem ferrão, estão entre as abelhas mais antigas, com comportamento social segundo os registros fósseis encontrados. São encontradas em todos os continentes já que sua dispersão se deu antes da deriva continental (VELTHUIS, 1998).

Sendo insetos holometábolos, os meliponíneos passam por uma fase larval, logo após a eclosão do ovo, no início de sua vida, que é seguida por uma metamorfose (fase de pupa), onde ocorrem as mudanças que os transformarão nos insetos adultos (imagos). Durante a fase larval, as características e nichos ecológicos dos insetos holometábolos são distintos daqueles observados na fase adulta. No caso das abelhas a fase larval passa-se confinada em alvéolos de cria enquanto as abelhas adultas são insetos de vida livre.

A fase larval neste tipo de inseto é uma fase de alimentação intensiva. Os nutrientes obtidos dessa alimentação são utilizados para o crescimento e desenvolvimento da massa corporal, a qual se processa através de mudas sucessivas do exoesqueleto, e também para acumulação em tecidos de reserva para serem utilizados durante a metamorfose, visto que a pupa não se alimenta. As reservas alimentares não utilizadas durante a vida larval são acumuladas no corpo gorduroso (CG) e em sua maior parte utilizada durante a metamorfose, na remodelagem dos órgãos e tecidos ou na produção de novos tecidos.

As castas nas abelhas eussociais refletem uma divisão das funções reprodutivas (rainhas) e de manutenção da colônia (operárias) entre fêmeas, assim as rainhas são indivíduos férteis e as operárias em geral consideradas estéreis. No entanto, na maioria dos meliponini diferentemente do que ocorre em *Apis*, as operárias desenvolvem ovários mesmo na presença da rainha e põem ovos, alguns dos quais servem de alimento para as rainhas e outros podem originar machos (BEIG & SAKAGAMI, 1964; BEIG, 1971; BEGO, 1983; KOEDAM *et al.*, 2005; VELTHUIS, *et al.*, 2005).

III.II. O CORPO GORDUROSO E SUAS RELAÇÕES COM OS HORMÔNIOS

A morfologia do CG tem sido bastante explorada em uma grande diversidade de insetos (SNODGRASS, 1935; LOCKE & COLLINS, 1966; BABTHAN & GILBERT, 1972; PRICE, 1973; THOMSEN & THOMSEN, 1978; WYATT, 1980; HAN & BORDEREAU, 1982; LOCKE, 1984; DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985; MARX, 1987; CHAPMAN, 1998; PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003a).

Entre as principais funções atribuídas as células do CG estão: 1) reserva de proteínas, lipídios e carboidratos que fornecem precursores para o metabolismo de outros tecidos (WIGGLESWORTH, 1942; PRICE, 1973; THOMSEN & THOMSEN, 1978; TADBOWSKI & JONES, 1979; WYATT, 1980; KEELEY, 1985; ROSELL & WHEELER, 1995); 2) regulação da composição química da hemolinfa através da absorção, armazenamento, síntese e liberação de lipídios, proteínas e carboidratos (WYATT, 1978; STAURENGO DA CUNHA E CRUZ-LANDIM, 1983; CRUZ-LANDIM, 1985a). 3) armazenamento e metabolismo de produtos tóxicos no caso, os urócitos – trofócitos modificados que armazenam o urato que é tóxico para o organismo e 4) produção de vitelogeninas, proteínas precursoras do vitelo dos ovócitos.

Os trofócitos, especificamente, apresentam características polimórficas de acordo com a função que estão desempenhando. Nos machos não há variações, sendo que o seu maior papel está relacionado com a síntese protéica. Já nas fêmeas, as variações são grandes em decorrência da necessidade de produção das vitelogeninas (LOCKE, 1984). Nos insetos sociais há diferenças também relacionadas às castas.

É bastante conhecido que o desenvolvimento do CG é controlado por hormônios morfogenéticos que por sua vez podem ser liberados devido a influências externas (LOCKE, 1980). Neste aspecto a importância da influência do hormônio juvenil (HJ) sob o CG do adulto é a que tem sido mais estudada porque este, além de controlar a produção de proteínas da hemolinfa, também tem participação na vitelogênese, pois controla a produção das vitelogeninas, precursoras da vitelina do vitelo (ADAMCZYK *et al.*, 1996). Processo como a lise do CG durante a pupação também é hormonalmente controlado, sendo os hormônios atuantes, neste caso, os ecdisteróides (LOCKE, 1970; DEAN, 1978; POSTLETHWAIT & JONES, 1978; PELT-VERKUIL, 1979; SASS & KOVACS, 1980).

Alguns estudos ultra-estruturais do CG têm demonstrado a importância dos hormônios 20-ecdisona e HJ na organização ultra-estrutural dessas células (COLLINS, 1969, 1974), já que elas são tidas como células alvo, onde esses hormônios atuam de maneira intensa e onde as diversas funções do tecido permitem uma análise integrada da sua ação. Estudos sobre a ação hormonal no CG foram feitos *in vivo* por DEAN (1978), no CG de *Calpodes ethlius*, THOMASSON & MITCHELL (1972), TYSELL & BUTTERWORTH (1978) e POSTLETHWAIT e JONES (1978), em *Drosophila melanogaster*

PELT-VERKUIL (1979), em *Calliphora erythrocephala*, COTTON & ANSTEE (1991), em *Locusta migratoria*. Em Lepidoptera, o CG foi utilizado em experimentos *in vitro* por SASS & KOVACS, 1977.

É atribuído ao HJ o controle da presença de grânulos protéicos nos trofócitos. Na passagem da vida larval para a adulta, o HJ agiria de maneira a produzir a citólise do CG larval e formação do correspondente tecido do adulto. Análogo do HJ, o HJ-I causa vacuolização nos trofócitos e aceleração na metamorfose (ENGELMANN, 1976; COUBLE *et al.*, 1979, COTTON & ANSTEE, 1991; SAYAH *et al.*, 1994; BARBOSA-HETEN, 1998).

Em *Apis mellifera*, estudos da influência hormonal sobre o CG foram realizados por BISHOP (1958), MARX, (1987). Em 1998 BARBOSA-HETEM, *et al.*, estudaram o efeito tanto do HJ como do 20-ecdisona sobre a ultra-estrutura das células do CG e observaram que o aumento no título do HJ propiciou um aumento no número de mitocôndrias e diminuição das regiões de Golgi. Já o 20-ecdisona impediu a diminuição do volume nuclear, induziu o aumento dos grânulos protéicos, pró-vacuólos e vacuólos no citoplasma e o aparecimento precoce de estruturas autofágicas.

COTTON & ANSTEE (1991), utilizando um análogo do HJ, mostraram alterações nas células do CG de *Locusta migratoria* L., como aumento no tamanho nuclear e na concentração de RNA e de retículo endoplasmático granular. O tratamento também causou o aparecimento precoce das proteínas específicas das fêmeas, provavelmente as vitelogeninas.

Dentre as abelhas, Apini e Meliponini tem sido os grupos mais estudados quanto a ultra-estrutura dos trofócitos (CRUZ-LANDIM, 1975; CRUZ-LANDIM, 1983; CRUZ-LANDIM, 1985a, b). Particularmente, a espécie *M. quadrifasciata anthidioides* possui muitos destes aspectos elucidados, tanto na fase larval quanto na adulta. Estudos sobre o CG de adultos desta espécie (Paes de Oliveira, 2002; Paes de Oliveira & Cruz-Landim, 2003b; 2004), relacionaram a morfologia ultra-estrutural dessas células ao grau do desenvolvimento ovariano. Os dados indicaram que as células do CG de rainhas têm participação ativa na síntese protéica, e que há concordância entre a atividade sintética e o desenvolvimento dos ovários. Já nas operárias a morfologia das células parece demonstrar especialização para absorção e armazenamento de material enquanto que as sínteses parecem acontecer durante as fases imaturas. Apesar disso, alguns dados mostram a existência de alguma relação com a produção de proteínas com peso molecular alto semelhante ao das vitelogeninas. Não foram encontradas diferenças acentuadas que indicassem trofócitos especializados na função de produzir vitelogeninas e a taxa de ovogênese é baixa nas operárias (PAES DE OLIVEIRA, 2002).

Os dados obtidos mostraram também que as rainhas fecundadas e em postura tem as células do CG muito mais desenvolvidas que as virgens. Relação correspondente não foi, no entanto, encontrada com tanta consistência entre operárias com e sem ovários desenvolvidos.

III.III. AS CÉLULAS FOLICULARES DO OVÁRIO:

Os ovários das abelhas possuem origem mesodérmica e são encontrados em número de dois localizados látero-dorsalmente ao tubo digestivo (CHAPMAN, 1998). São constituídos por células somáticas (mesodérmicas) e germinativas. Entre as células da linhagem somática estão as foliculares, que envolvem os ovócitos em maturação.

Os ovários das abelhas recebem a denominação de meroísticos politróficos, segundo a classificação de BRANDT (1874) por apresentarem células nutridoras alternadas aos ovócitos ao longo dos ovaríolos.

As células foliculares das abelhas, como de outros insetos, são consideradas células com alta taxa sintética (BIER, 1965; ENGELS, 1968, 1973). Dados ultra-estruturais como: 1) nucléolos pronunciados durante a pré-vitelogênese e a vitelogênese; 2) alto conteúdo de retículo endoplasmático granular; 3) ribossomos livres; 4) grande quantidade de vacúolos e 5) Complexo de Golgi desenvolvido, corroboram essa função. Além disso, também tem sido observado aumento no teor de DNA dessas células durante o crescimento dos ovócitos, indicando poliploidização.

As células foliculares são polarizadas, sendo os vacúolos e as mitocôndrias acumuladas mais freqüentemente na região basal. As membranas laterais apresentam as típicas especializações para comunicação (gap junction) e as junções de adesão (junções septadas e desmossomas). As junções comunicantes (gap junction) e os desmossomas deixam regiões de contato desobstruídas como fendas entre as células foliculares, por onde a hemolinfa entra para a tomada da vitelogenina a partir desta por pinocitose pelos ovócitos. Durante a pré-vitelogênese as membranas das células foliculares são lisas ou se interdigitam com a membrana dos ovócitos. Dessa forma, são formadas as junções comunicantes (gap junction) entre os ovócitos e as células foliculares (TELFER *et al.*, 1981).

Durante a desobstrução dos espaços intercelulares os ovócitos desenvolvem numerosas microvilosidades (ANDERSON & TELFER, 1969) enquanto que a membrana das células foliculares se mantém lisas. Durante a absorção da vitelogenina e na coriogênese a quantidade de microvilosidades é abundante nas células foliculares. Outras alterações ultra-estruturais são observadas durante os períodos de pré-vitelogênese e vitelogênese que levam a mudanças na arquitetura da célula (GUTZEIT *et al.*, 1993; CRUZ-LANDIM, 2000; PAES DE OLIVEIRA, 2002; PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2004).

Tendo em vista que nos insetos com ovários meroístico, como é o caso das abelhas, a literatura atribui e identifica o CG como sítio da produção da vitelogenina, precursora das proteínas do vitelo (DUTKOWSKI 1974; BEHAN e HAGEDORN, 1978; STAURENGO DA CUNHA & CRUZ-LANDIM, 1983; CRUZ-LANDIM 1985a; GIORGI e MAZZINI, 1986) e que essa proteína seria lançada na

hemolinfa de onde seria captada pelos ovócitos. Tendo em vista também que os hormônios (HJ e ecdisona) controlam o funcionamento do CG e a produção de vitelogenina (COLLINS, 1969; 1974; THOMASSON & MITCHELL, 1972; DEAN, 1978; PELT-VERKUIL, 1978; COTTON & ANSTEE, 1991; HARTFELDER & ENGELS, 1998) e tendo em vista ainda que as células foliculares constituem um envoltório ao redor do ovócito que deverá ser ultrapassado pelas proteínas da hemolinfa antes que estas cheguem ao ovócito, e que embora geralmente se admita que parte destas proteínas passe pelos espaços intercelulares, as células foliculares não são passivas no transporte, os processos envolvidos na captação de material para ser incorporado ao ovócito deve apresentar diferenças entre operárias e rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* durante a vitelogênese. Portanto, os objetivos perseguidos neste trabalho foram os delineados abaixo.

IV. OBJETIVOS:

Em vista do conhecimento prévio sobre a organização e o funcionamento das células do CG quando relacionado ao período de ovogênese, este trabalho teve por objetivo esclarecer o período de síntese e liberação de proteínas na hemolinfa, o controle exercido pelos hormônios sobre o processo e a participação das células foliculares no processo de sua absorção à partir da hemolinfa em operárias e rainhas *M. quadrifasciata anthidioides*. Para tanto foram usados os seguintes procedimentos:

1) Citoquímica ultra-estrutural, para determinar a composição química das inclusões celulares, sua organização e para estudar as vias de acesso de material da hemolinfa às células do CG e ao ovócito com marcadores citoquímicos dos contatos e invaginações celulares.

2) Eletroforese, para determinar nos extratos do CG e dos ovários das duas castas analisadas a presença de proteínas de alto peso molecular e a verificação se se trata de vitelogenina por imunodeteccção nos géis.

3) Cultivo do CG “*in vitro*” com aplicação dos hormônios morfogenéticos (HJ-III e 20-HE) para verificar a ação destes sobre sua fisiologia.

Os resultados dos diferentes objetivos serão apresentados separadamente sob a forma de três capítulos independentes. O material e os métodos utilizados em cada caso serão descritos no capítulo.

CAPÍTULO I

CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL DOS TROFÓCITOS DO CORPO GORDUROSO E OVÁRIOS DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP. DURANTE A VITELOGÊNESE

INTRODUÇÃO

Os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do corpo gorduroso (CG) têm sido amplamente estudados em diversos grupos de insetos (PRICE, 1973; THOMSEN & THOMSEN, 1978; LOCKE, 1984; DEAN *et al.*, 1985; KEELEY, 1985; PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003b), e se referem, na maior parte dos trabalhos, ao seu principal tipo celular, o trofócito, bem como suas diferenciações funcionais, pois estes constituem um modelo interessante de plasticidade celular, visto as múltiplas funções que desempenham (WIGGLESWORTH, 1942; ENGELMANN, 1971; BEHAN & HAGEDORN, 1978; WYATT, 1980) e também por serem alvos celulares dos principais hormônios morfogenéticos dos insetos (COLLINS, 1969; ENGELMANN, 1976; DEAN, 1978; COUBLE *et al.*, 1979; SASS & KOVACS, 1977; SAYAH *et al.*, 1994; BARBOSA-HETEN, 1998).

Dentre as abelhas, as tribos Apini e Meliponini têm sido as mais estudadas quanto aos aspectos morfológicos do CG (CRUZ-LANDIM, 1975; 1985a; 1985b). *M. quadrifasciata anthidioides* já possui os trofócitos bem caracterizados tanto na fase larval (CRUZ-LANDIM, 1983), quanto adulta (PAES DE OLIVEIRA, 2002; PAES DE OLIVEIRA E CRUZ-LANDIM, 2003a; 2004). Nesta última fase o papel dos trofócitos nos insetos tem sido abordado mais do ponto de vista da sua função como produtores das vitelogeninas (Vgs), proteínas precursoras do vitelo (KUNKEL & NORDIN, 1985), portanto, do ponto de vista de sua relação com a vitelogênese ou amadurecimento dos ovócitos no ovário.

M. quadrifasciata anthidioides é uma espécie de abelha com organização eussocial avançada pertencente a tribo dos Meliponini (MICHENER, 2000). Como tal possui castas bem definidas, que refletem uma divisão social de funções entre os componentes da colônia e uma divisão de tarefas entre as operárias, chamada de polietismo etário (GIANINI, 1997; GIANINI & BEGO, 1998a; 1998b) sujeita a influências ambientais.

O que em essência diferencia os Meliponini dos Apini quanto ao padrão reprodutivo, é que na maioria das espécies dos primeiros, as operárias desenvolvem ovários e botam ovos, alguns dos quais servem de alimento para as rainhas (ovos tróficos) e outros originam machos (BEIG & SAKAGAMI, 1964; BEGO, 1983; CRUZ-LANDIM, 2000). Sendo assim, esperar-se-ia que o padrão de

produção das Vgs nestas espécies, fosse diferente do que ocorre em *Apis mellifera* onde as operárias na maior parte das vezes estão submetidas à inibição reprodutiva por parte da rainha, embora, tem sido relatado tanto o desenvolvimento do ovário em operárias de *A. mellifera* na presença de rainha (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003), como também a produção das Vgs pelas operárias desta espécie (ENGELS, 1968), ou por indivíduos que se apresentam fora da fase vitelogênica, ou que não produzem ovos, como os machos (TRENCEK *et al.*, 1989). Tem sido relatado também, que a taxa de postura nas duas castas varia nos Meliponini (BEGO, 1983; STAURENGO DA CUNHA, 1979; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1998), e que, portanto, a taxa de síntese de Vgs deveria acompanhar essa variação. Esses dados, acrescidos do fato de que uma quantidade considerável de RNA mensageiro para a Vg é encontrada na operária (AMDAM *et al.*, 2003), sugerem um controle traducional para a produção dessa proteína e não transcricional.

Dada a natural produção de ovos pelas operárias dos Meliponini, estas apresentam-se como um interessante material para o estudo da dinâmica da vitelogênese, uma vez que exibem indivíduos numa condição reprodutiva intermediária em relação à rainha, a qual apresenta alto grau de desenvolvimento ovariano e postura (ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990). Neste caso, pode-se obter do estudo de espécies deste grupo também, indicações de funções diversificadas exercidas pelas células do CG além da síntese de Vgs, as quais já vêm sendo citadas na literatura.

Nos trofócitos é sintetizado o precursor solúvel da proteína depositada nos ovócitos, a Vg (DUTKOWSKI, 1974; CRUZ-LANDIM, 1985a; GIORGI & MAZZINI, 1986), que por sua vez é lançada, através da via secretora, para fora destes e chega até o ovário via hemolinfa (GIORGI & MAZZINI, 1986). Entre a hemolinfa e o ovócito existe uma barreira formada pelas células foliculares que o envolvem, delimitando o assim chamado folículo ovariano. As células foliculares e a túnica própria do ovário constituem uma barreira hemal seletiva ao redor das células germinativas e do ovócito, com a função de protegê-las contra influências externas e mediar o acesso de substâncias da hemolinfa a elas.

As células foliculares na maioria dos insetos são tidas como capazes de alta taxa de síntese protéica (ENGELS, 1968, 1973; TELFER, 1975). Apesar disso, são os trofócitos do CG os responsáveis pela produção da grande quantidade do vitelo presente nos ovócitos (ISSAC & BOWNES, 1982), no caso das abelhas. Nem mesmo as células presentes na câmara nutridora, que se intercala com a ovocítica nos ovários meroísticos politróficos das abelhas parecem fornecer precursores para o vitelo (TELFER, 1975; TORRES JÚNIOR, 1980; MOHANTY, 1981; PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2001).

No entanto, muitos estudos apontam para uma contribuição indireta das células foliculares para a deposição do vitelo nos ovócitos, servindo como “mão de obra” na passagem da Vg para

dentro do ovócito, através da produção proteína paravitelogenina, uma proteína com função carreadora (ANDERSON & TELFER, 1969; BAST & TELFER, 1976; RUBENSTEIN, 1979).

O mecanismo da passagem de material da hemolinfa para o ovócito parece realmente encontrar-se na interface entre esta e o ovócito, representado pelas células foliculares, mais especificamente pelas especializações das suas membranas, principalmente as junções laterais de comunicação e de adesão as quais deixam espaços intercelulares desobstruídos em determinadas fases, por onde a hemolinfa circula até o espaço periovocítico de onde pode haver a tomada de Vg pelos ovócitos por pinocitose. Durante o período vitelogênico, o ovócito também desenvolve numerosas microvilosidades superficiais que aumentam o contato com o conteúdo de espaço periovocítico, enquanto que a membrana das células foliculares se mantém lisa.

Em vista do que ficou dito, este trabalho teve os seguintes objetivos: 1) Identificação da composição química das reservas acumuladas nos trofócitos e ovários; 2) Verificação da existência de atividade de fosfatase ácida e alcalina nos trofócitos e nos ovários, que pudesse indicar mobilização das reservas ou fase específica de síntese ou, até mesmo, morte celular e; 3) Esclarecimento do padrão de movimentação de material para o ovócito durante a vitelogênese em operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas, comparativamente.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL:

Porções do CG e os ovários de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides*, capturadas de uma colônia experimental, presente no biotério do Instituto de Biociências de Rio Claro (UNESP/RC) foram dissecadas em solução fisiológica para insetos (3,75g de NaCl; 1,36g de KH_2PO_4 ; 1,98g de Na_2HPO_4 ; 500ml de H_2O -destilada) e processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) conforme os protocolos a seguir.

MÉTODOS:

I. ÓSMIO IMIDAZOL (ANGERMÜLLER & FAHINI, 1982). Teste citoquímico para detecção de lipídios sob a forma de inclusões citoplasmáticas. O material dissecado foi fixado em uma mistura contendo *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, (pH 7,4)*, por 1 hora. Em seguida foi lavado duas vezes no mesmo Tampão e pós-fixado em *Tetróxido de Ósmio a 2%* em *Tampão Imidazol 0,1M, (pH 7,4)*, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente foi lavado em *Tampão Imidazol* e em *PBS*, desidratado em uma bateria de concentrações crescentes

(70-95%) de *Acetona*, infiltrado e incluído em resina *Epon-araldite*. Secções ultrafinas foram recolhidas em telinhas de cobre, observadas ao MET (Zeiss e Philips) sem contrastação prévia e fotografadas. Posteriormente o material foi contrastado e observado novamente (controle).

II. VERMELHO DE RUTÊNIO (LUFT, 1971). Teste citoquímico para detecção de carboidratos e para verificar o percurso do material endocitado pelas células. O material dissecado foi fixado em uma mistura contendo *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio a 0,1M, (pH 7,2)*, contendo *1,5mg/ml de Vermelho de Rutênio*. Os procedimentos posteriores foram os mesmo utilizados rotineiramente para MET, exceto a pós-fixação, onde a solução utilizada foi o *Tetróxido de Ósmio 1%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M* contendo *1,5mg/ml de Vermelho de Rutênio*. Como controle o material foi observado primeiramente sem contraste e em seguida contrastado com *Acetato de uranila a 2%* e *Citrato de chumbo 1%*.

III. PRATA AMONICAL (MACRAE & MELTZ, 1970). Teste citoquímico para detecção de proteínas básicas revela proteínas ricas em arginina e lisina (BENCHIMOL, 1998). O material foi fixado em uma mistura contendo *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M* por 2 horas, lavado no mesmo tampão e em água destilada, incubado em solução de *Prata amoniacal*, por 5 minutos. Posteriormente foi lavado em água destilada durante 20 minutos e incubado em solução de *Formalina a 3%* por 5 minutos, lavado novamente em água destilada e em *Tampão Cacodilato* por 1 minuto. A pós-fixação foi feita com *Tetróxido de Ósmio a 1%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M*.

IV. LOCALIZAÇÃO DE ATIVIDADE FOSFATÁSICA, ÁCIDA E ALCALINA, UTILIZANDO-SE COMO SUBSTRATO O P-NITROFENILFOSFATO (p-NPP) (RYDER & BOWEN, 1975). Para testar a atividade e localização de fosfatases ácidas, o material após ter sido dissecado em solução fisiológica para insetos (0-4 °C), foi pré-fixado em uma mistura contendo *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M a pH=7,2 (0-4 °C)* por 1 hora, lavado rapidamente em *Tampão Acetato 0,1M a pH=4,8 (0-4 °C)*, incubado à 37°C numa mistura contendo *p-NPP, Tampão Acetato de Sódio 0,1M (pH=4,8)* e *acetato de chumbo* por 45 minutos. Posteriormente o material foi Pós-fixado em *Tetróxido de Ósmio (OsO₄ 1% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M)* por 1 hora (2 °C) e processado rotineiramente. Os controles da reação foram feitos com material incubado por 45 minutos a 37 °C numa mistura contendo as mesmas substâncias do meio acima citado, com exceção do substrato (*p-NPP*).

Para testar a atividade de fosfatase alcalina e sua localização, os procedimentos foram idênticos aos descritos acima, com exceção do Tampão utilizado, que neste caso foi o *Tris 0,1M* ($pH=8,3$).

V. PERCOLAÇÃO PELO NITRATO DE LANTANO (LANE, *et al.*, 1986). O material foi fixado numa mistura contendo: *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M* ($pH = 7,2$), contendo *nitrato de Lantano* a 2% por 1 hora e processado de acordo com a rotina para preparações para observação em MET. Foram omitidas as contrastações durante a pós-fixação e na telinha.

RESULTADOS

A pesquisa realizada teve dois focos principais, quais sejam a identificação das substâncias de reserva presentes no CG e nos ovócitos e a rota seguida por substâncias captadas da hemolinfa até o ovócito. Várias técnicas citoquímicas que permitiram a detecção do que se consideraram substâncias-chave, foram aplicadas.

Lipídio: - A pesquisa de lipídios foi feita através da técnica de pós-fixação do material com tetróxido de ósmio em tampão imidazol. Além de penetrar com facilidade nas células o complexo ósmio-imidazol facilita a interação da molécula de tetróxido de ósmio com os lipídios insaturados, provocando o grande contraste dessas estruturas, já que a substância imidazol tem forte capacidade de se ligar a metais pesados (SOARES, 1998).

Nos trofócitos do CG de operárias nutridoras, material positivo ao tratamento apareceu na forma de grandes gotas citoplasmáticas, geralmente esféricas, de tamanhos variados e eletrondensidade intermediária. Essas apresentam um halo mais eletrondenso na superfície (Fig. 1A). Além delas, poucas estruturas menores com eletrondensidade heterogênea também foram observadas (Fig. 1B) e linhas de contorno ao redor de gotas de baixa eletrondensidade (Fig. 1C). No ovócito, marcação apareceu como gotas pequenas, dispersas entre mitocôndrias na periferia, nas células foliculares como uma grande inclusão, muito eletrondensa, principalmente na região apical do epitélio (Fig. 1D), enquanto que nas células nutridoras, disperso por todo o citoplasma (Fig. 1E).

Os trofócitos de rainhas virgens apresentaram características muito semelhantes ao que acaba de ser descrito. Gotas com halo mais eletrondenso na superfície (Fig. 2A) e material positivo ao redor das mitocôndrias (Fig. 2B). As células foliculares da câmara ovocítica (Fig. 2C) e o ovócito (Fig. 2D) também apresentaram inclusões como as observadas em operárias nutridoras.

Nos trofócitos do CG de rainhas fisogástricas, a técnica evidenciou três tipos diferentes de depósitos: 1) Abundantes gotas de vários tamanhos inclusas em estruturas maiores limitadas por membranas, localizadas na periferia dos trofócitos (Fig. 3A). Esses depósitos são heterogêneos no tamanho, na quantidade de gotas e na sua composição, pois, além do lipídio contém material amorfo de eletrondensidade média e membranas concêntricas formando figuras mielínicas (Fig. 3B). 2) Ao redor de algumas mitocôndrias, (Fig. 3C e E) e 3) Como gotas típicas deste tecido no citossol, raras nesta casta (Fig. 1D e E). Nas células ovarianas, o tratamento evidenciou de maneira tênue, gotas citoplasmáticas no ovócito (Fig. 4A) e nas células nutridoras (Fig. 4D e E), enquanto que nas células foliculares é visto contornando as mitocôndrias (Fig. 4B) e nos limites externos de vesículas transparentes, modalidade que aparece no ovócito também (Fig. 4C). Além disso, o lipídio pode ser visto realçando as membranas dos espaços intercelulares das células foliculares e entre as microvilosidades que ocupam o espaço periovocítico (Fig. 4B).

Carboidrato: - A principal estrutura nos trofócitos do CG de operárias nutridoras com positividade para o vermelho de rutênio foi a lâmina basal (Fig. 5A). Grânulos eletrondensos presentes no citoplasma das células não contrastadas correspondem aos acúmulos de ferro e não são resultantes de resposta positiva ao tratamento. O vermelho de rutênio penetrou pelas invaginações da membrana plasmática marcando o labirinto periférico dos trofócitos (Fig. 5A e C), o qual se apresenta com lúmen bem estreito. A figura 5B mostra material extracelular presente na hemolinfa também positivo ao teste, potencialmente absorvível pela membrana dos trofócitos. Quanto aos ovários, a impregnação se limitou a pequenos pontos localizados nos espaços intercelulares das células foliculares, interrompidos por regiões pouco ou não impregnadas (Fig. 5D e E), inclusive onde o espaço intercelular se mostra muito estreito.

Reação positiva nos trofócitos do CG de rainhas virgens se deu basicamente na superfície celular (Fig. 6A) e invadindo o espaço extracelular formado pelas invaginações da membrana plasmática (Fig. 6B), como em operárias nutridoras. O mesmo tratamento marcou no ovário o limite entre a túnica própria e as células foliculares, além de ter marcado alguns pontos nos espaços intercelulares destas (Fig. 6C), que em maior aumento exibem marcação mais intensa (Fig. 6D).

Nos trofócitos do CG de rainhas fisogástricas, o teste marcou igualmente a superfície das células e delineou o labirinto periférico (Fig. 7A). Algumas vezes foi possível perceber material positivo sob a forma de pequenos blocos, no interior das invaginações (Fig. 7B). A camada de células foliculares que recobre o ovócito apresentou reação positiva nos espaços intercelulares (Fig. 7C). Algumas vezes depósitos de material positivo são vistos acumulados em maior quantidade nos

interstícios formados entre várias células (Fig. 7D), diferindo basicamente das operárias nutridoras e rainhas virgens.

Proteínas básicas: - Os trofócitos do CG de operárias nutridoras apresentaram no citoplasma grânulos eletrondensos espalhados entre as inclusões com a reação para proteínas básicas (Fig. 8A). Mais raramente, um material eletrondenso e pulverulento foi observado sobre grânulos de eletrondensidade intermediária (Fig. 8B). No ovário, reação intensa foi observada no limite entre as células nutridoras e as células foliculares que as envolvem. Além disso, pequenos grânulos foram observados na parte basal dessas células (Fig. 8C). O ovócito não apresentou material positivo, mas no limite entre este e as células foliculares, bem como na região basal e espaços intercelulares dessas células, foi observado material positivo que, raramente chega até a parte mediana da célula, sua presença se limita a um curto trecho basal do espaço intercelular. Alguns núcleos apresentaram positividade na forma de alguns grânulos concentrados em certas regiões do nucleoplasma (Fig. 8D), provavelmente correspondentes a regiões heterocromáticas.

Nos trofócitos do CG de rainhas virgens, reação positiva pôde ser observada somente em alguns pontos no citoplasma como uma marcação sob a forma de glóbulos em pontos específicos de estruturas membranosas (Fig. 9A), que apesar da forma arredondada, não parecem ser constituídos por material armazenado (Fig. 9B). No ovário a marcação pela prata foi mais acentuada, aparecendo nas células foliculares da câmara nutridora, no contato entre a túnica própria e as células foliculares e entre estas e o ovócito, como pode ser percebido nas figuras 9B e C. Nas células nutridoras também foi observada marcação pela prata amoniacal no citoplasma e no núcleo de algumas células (Fig. 9D).

Reação positiva pôde ser percebida na lâmina basal dos trofócitos do CG (Fig. 10A) e em algumas regiões citoplasmáticas como grumos, e pequenos pontos na região de retículo endoplasmático granular (Fig. 10B) em rainhas fisogástricas. A membrana peritoneal e a túnica própria dos ovariolos foram as regiões mais intensamente marcadas no ovário, apresentando-se como grânulos finos espalhados ou formando agregados por toda a sua extensão (Fig. 10C). Além da túnica própria, as células foliculares que recobrem a câmara nutridora (Fig. 10D) e aquelas que recobrem a câmara ovocítica (Fig. 10E) foram marcadas na região apical no contato com as células nutridoras e ovócito. Outras marcações aleatórias parecem reações inespecíficas à prata.

Fosfatase ácida: - A fosfatase ácida foi localizada sob a forma de pequenos grânulos distribuídos homoganeamente pelo citoplasma (Fig. 11A) dos trofócitos de operárias nutridoras. Nos ovários a enzima foi identificada na túnica própria sob a forma de depósitos irregulares (Fig.

11B). Nas células foliculares, alguns núcleos mostraram forte positividade na heterocromatina, às vezes, apresentaram forma irregular, com espaço perinuclear alargado (Fig. 11C). A Fig. 11D mostra, ainda, que o ovócito também apresentou estruturas positivas ao teste em alguns núcleos acessórios.

Os trofócitos do CG de rainhas virgens apresentaram marcação positiva no citoplasma, sob a forma de pequenos grânulos homogêneos (Fig. 12A) mais frequentes na região periférica da célula logo acima do labirinto periférico formado pelas invaginações da membrana plasmática (Fig. 12B). As células foliculares do ovário apresentaram-se negativas (Fig. 12C). Apenas algumas células foliculares apresentaram núcleos com marcação na cromatina (Fig. 12D), porém, de maneira geral não houve marcação.

A reação para a atividade das fosfatases ácidas foi praticamente negativa no citoplasma dos trofócitos do CG de rainhas fisogástricas, com raras marcações tênues, provavelmente inespecíficas (Fig. 13A). A maior positividade foi observada na cromatina nuclear enquanto que os nucléolos mostraram-se negativos (Fig. 13B). As células foliculares também apresentaram-se negativas (Fig. 13C). Em contrapartida, os ovócitos apresentaram uma granulação fina, distribuída no ovoplasma, deixando livre a maioria dos grânulos de vitelo (Fig. 13D).

Fosfatase alcalina: - Nos trofócitos do CG de operárias nutridoras as regiões positivas apareceram como pequenos grânulos espalhados no citoplasma, como na fosfatase ácida, porém, em menor quantidade e próximo às gotas lipídicas (Fig. 14A e C). Positividade nuclear foi observada nos nucléolos (Fig. 14B). As células foliculares apresentaram uma intensa atividade dessa enzima nos núcleos, sendo que alguns foram marcados inteiramente enquanto outros somente nos nucléolos. Marcação também foi observada nos espaços intercelulares (Fig. 14D).

Nos trofócitos do CG de rainhas virgens, a reação positiva apareceu em algumas regiões do espaço extracelular formado pelas invaginações da membrana plasmática (Fig. 15A), somente em algumas células. Também foi observada uma granulação muito fina no interior de algumas gotas lipídicas (Fig. 15B). Os ovários apresentaram marcação entre as células foliculares e nutridoras na câmara nutridora, e também em alguns núcleos das células foliculares da mesma câmara (Fig. 15C). Nos espaços intercelulares das células foliculares e entre essas e o ovócito (Fig. 15D) a marcação foi muito intensa.

A reação foi intensamente positiva na lâmina basal dos trofócitos do CG de rainhas fisogástricas (Fig. 16A) e pulverulenta em pequenas porções do citoplasma, especificamente em estruturas alongadas, aparentemente retículo endoplasmático granular (Fig. 16B). Marcação desse tipo também apareceu entre as células foliculares que recobrem a câmara nutridora e na sua região

apical, que está em contato direto com as células nutridoras (Fig. 16C), entre as células foliculares e o ovócito, na câmara ovocítica (Fig. 16D) e também no ovócito (Fig. 16E) sempre da mesma maneira. Neste último caso formando grumos arredondados sobre estruturas mais eletrondensas, aparentemente protéicas.

Nitrato de Lantano: - Nos trofócitos do CG de operárias nutridoras a impregnação pelo Lantano foi vista no labirinto basal de maneira semelhante ao vermelho de rutênio. (Fig. 17A e C). Dependendo da extensão das invaginações periféricas essa marcação pode ser mais superficial na célula (Fig. 17A) ou estender-se a regiões mais centrais (Fig. 17C). Nas células foliculares do ovário a percolação seguiu os espaços intercelulares, porém não por toda a altura da célula, sendo interrompida na porção apical. O Lantano impregnou moderadamente a túnica própria (Fig. 17D).

Em rainhas virgens o teste marcou os trofócitos na região do espaço extracelular formado pelas invaginações da membrana plasmática (Fig. 18A). Marcação foi observada também na túnica própria (Fig. 18B) entre as células foliculares do câmara nutridora (Fig. 18C) com pontos de interrupção da passagem do material e entre as células foliculares e o ovócito (Fig. 18D).

Em rainhas fisogástricas a penetração do nitrato de Lantano marcou de maneira bastante clara o percurso que deve ser percorrido pelo material da hemolinfa a ser incorporado ao ovócito, desde a camada mais externa do ovário, a membrana basal da câmara peritoneal (Fig. 19A e C), passando pelos espaços intercelulares das células foliculares, sem interrupção (Fig. 19B) chegando até as microvilosidades apicais no espaço periovocítico (Fig. 19B e D).

DISCUSSÃO

MATERIAL DE RESERVA:

Os resultados apontaram o lipídio, na maior parte triglicerídeos (KILBY, 1963; PAES DE OLIVEIRA, 2002), como principal material de reserva metabólica nos trofócitos do CG e para sua presença também nas estruturas ovarianas inclusive nos ovócitos. Os depósitos variaram em extensão nas diferentes classes de indivíduos analisados, mas geralmente apresentaram-se como gotas citoplasmáticas envoltas por meia unidade de membrana que representa a porção hidrofílica das moléculas do lipídio em contato com o citossol (SOARES, 1998). Nos trofócitos, esses depósitos apresentam-se heterogêneos enquanto que nos ovários homogêneos e isso parece indicar que, pelo menos, a origem desses lipídios é distinta.

Os trofócitos do CG de operárias nutridoras e rainhas virgens apresentam depósitos semelhantes e distintos daqueles encontrados em rainhas fisogástricas, o que está de acordo com a

verificação de Paes de Oliveira (2002) de que os trofócitos destas duas classes de indivíduos são semelhantes e indica que o metabolismo dos trofócitos nas rainhas muda com a fisogastria. As operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* apresentam ovários desenvolvidos (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003a) inclusive com ovócitos prontos para ovulação (SAKAGAMI *et al.*, 1963), as rainhas virgens são, em essência, indivíduos recém-emergidos uma vez que não permanecem por muito tempo na colônia na presença de outra rainha, mas apresentam ovários com certo grau de desenvolvimento apesar disso sem, contudo, terem entrado na vitelogênese. Desta maneira, seria esperado que os trofócitos das operárias se assemelhassem mais aos das rainhas fisogástricas. O fato disto não acontecer, parece mostrar que parte do grande desenvolvimento destas células nesta classe de indivíduos pode estar relacionada com o tipo de nutrientes ingeridos.

Nas operárias os trofócitos além de acumularem lipídios como principal material de reserva, em certas fases da vida, contém também proteínas (Paes de Oliveira 2002). O fato destas não terem sido detectadas no presente trabalho, talvez possa ser atribuído ao fato de tratar-se de proteínas ácidas e da técnica aqui empregada destinar-se principalmente a proteínas básicas, principalmente nucleares ou ao fato delas não serem armazenadas (Paes de Oliveira & Cruz-Landim, 2003a; 2004). Os trofócitos das rainhas fisogástricas como regra geral não acumulam reservas (Cruz-Landim, 1985a; Paes de Oliveira, 2002) embora gotas lipídicas tenham sido observadas no CG de *A. mellifera* durante a ovoposição às quais foram atribuídas a função de mobilização do material armazenado, pois, além da heterogeneidade do material, outras características morfológicas reforçaram essa hipótese tais como a forma irregular das gotas caracterizando desgaste de sua superfície, proximidade de glicogênio e a associação dessas gotas com figuras mielínicas. Essa última característica foi observada nos trofócitos de rainhas fisogástricas, o que poderia estar relacionado com uma mobilização mais acentuada (Cruz-Landim, 1985a).

O lipídio encontrado nos trofócitos de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata* é escasso e este não apresenta características relacionadas à sua síntese nem tão poucas estruturas que indiquem a sua absorção no ovário, caso em que os trofócitos poderiam ser a fonte dos lipídios ovarianos, o que sugere que sua síntese ocorre no próprio ovário. Contribui para esta interpretação o fato do lipídio se encontrar no interior das células foliculares e não aparecer no espaço intercelular destas, nem no espaço periovocítico. Alguns autores afirmam que o lipídio incorporado ao ovócito é extra-ovariano na origem e transportando até este por proteínas transportadoras de lipídios, as lipoforinas (KAWOoya & LAW, 1988; KAWOoya *et al.*, 1988; LIU & RYAN, 1991), cujo peso molecular da sua maior subunidade é 240 kDa (SUN *et al.*, 2000), banda que, aliás, é freqüentemente visualizada nos géis acima da banda referente a Vg. A indicação morfológica que corroboraria a opinião desses autores refere-se a localização das gotas lipídicas na periferia do ovócito e a variação no seu

tamanho, sugerindo sua absorção e aumento de tamanho por fusão de gotículas. Neste caso ficaria mascarado pela lipoforina e seu transporte se confundiria com o transporte de proteínas. Fica de qualquer forma caracterizado que o lipídio presente nas células foliculares não é passado aos ovócitos. Reforça essa interpretação o fato de lipídio também estar presente nas células foliculares e aparentemente ser mais raro nos ovócitos. Nas rainhas fisogástricas a quantidade de lipídio é muito pequena e este aparece predominantemente sob a forma de gotículas muito pequenas. Estes dados apontam para uma diferença na composição das reservas nutritivas presentes nos ovócitos de rainhas e operárias.

Os lipídios presentes nos trofócitos além de apresentar-se sob morfologias diversas também apresentam heterogeneidades internas. As porções das gotas com eletrondensidade diferente podem conter triglicerídeos diferentes, sendo os com localização periférica menos solúveis, ou então resultar da interação entre o lipídio e outras substâncias presentes no citossol, neste caso sem implicações funcionais. Depósitos lipídicos heterogêneos foram detectados por Wigglesworth (1982) e Locke (1984). A superfície mais eletrondensa foi atribuída por estes autores a presença de lipofucsina e funcionalmente relacionado com a muda, o que não é o caso nos adultos. Contudo se a heterogeneidade relacionada a muda, significa mobilização destes para produção de energia, o fundamento da heterogeneidade verificada aqui pode ser o mesmo, isto é, mobilização para produção de energia para a reprodução. Alguns autores sugerem que, esse tipo de material acumulado nas células, representa reservas endógenas de energia para o metabolismo (Gilbert, 1967; Keeley, 1985) do indivíduo, corroborado pela constituição triglicerídica. Os resultados citoquímicos utilizando o Ósmio Imidazol parecem indicar que o lipídio armazenado nos trofócitos do CG teria essa função, atuando, só indiretamente no processo de ovogênese, fenômeno biológico que requer uma alta demanda de material estrutural e energético.

O teste realizado para evidenciação de carboidratos com vermelho de Rutênio, não marcou reservas citoplasmáticas nos trofócitos do CG nem nas células foliculares que envolvem o ovócito, provavelmente por ser este um teste que detecta carboidratos ácidos ligados a superfície celular e a constituintes de matriz extracelular (SOUZA, 1998) ou por haver dificuldade de penetração do rutênio na célula. PAES DE OLIVEIRA (2002), no entanto, notou que a presença de carboidratos em adultos da espécie em estudo se restringia a grandes quantidades de glicoproteínas e glicogênio, principalmente na primeira fase da vida adulta das operárias (recém-emergidas) na forma de grânulos e que com a mudança de tarefa da operária para a função nutridora, essas reservas desapareciam, predominando a partir de então, as lipídicas. Esta pode, portanto, ser a razão para o presente resultado negativo.

A pequena quantidade de substâncias detectadas nas células ovarianas deve-se ao fato destas não serem células destinadas a acumular reservas, como é o caso das células foliculares e nutridoras, ou à fase do desenvolvimento em que se encontravam como é o caso dos ovócitos. Devido a dificuldade de se obterem boas preparações de ovócitos no final da vitelogênese e também porque a finalidade do presente trabalho não era a de estudar os materiais constituintes do vitelo, apenas fases iniciais da vitelogênese foram observadas. Por isso, ou porque o método para detecção de proteínas não foi adequado, pouco destes compostos, que constituem a maior parte do vitelo nas abelhas, foi detectado nos ovócitos, pelo método empregado. No entanto, por comparação com os dados da literatura é possível inferir que os grandes grânulos eletrondensos presentes nos ovócitos são de proteína.

ROTA DO MATERIAL COM DESTINO AO OVÓCITO:

Já está bem estabelecido que, em grande parte dos insetos incluindo as abelhas a origem do vitelo acumulado nos ovócitos é, em sua maior parte, exógena, especialmente as proteínas. A tomada das proteínas, caracterizadas como Vgs, pelo ovócito se dá à partir da hemolinfa (ENGELMANN, 1979; HAGEDORN & KUNKEL, 1979; GIORGI E MAZZINI, 1986) para a qual estas são exocitadas pelos trofócitos e absorvidas pelo ovócito por pinocitose mediada por receptores (TELFER, 1961; ANDERSON, 1964; ROTH & PORTER, 1964). Os trofócitos além da Vg (KUNKEL & NORDIN, 1985), secretam outras proteínas em pequenas quantidades, principalmente a lipoforina (TELFER *et al.*, 1981), que é uma transportadora de moléculas de lipídio. Os testes citoquímicos para evidenciação de proteínas (prata amoniacal); carboidratos (vermelho de rutênio) e a percolação pelo nitrato de Lantano forneceram bons indicativos da rota do material desde o momento que cega ao ovário até a sua incorporação pelo ovócito.

Tanto o vermelho de Rutênio como a prata amoniacal e o lantano evidenciaram os elementos da lâmina basal e invaginações da membrana plasmática formando um labirinto periférico nos trofócitos, cuja extensão permitiu obter um parâmetro da extensão do contato dessas células com o material extracelular, no caso a hemolinfa, indicativa da capacidade de trocas com o meio.

Adicionalmente o vermelho de rutênio ao fixar-se na hemolinfa represada entre os trofócitos mostrou que esta percola o labirinto periférico e que, portanto, sua existência aumenta muito a superfície de interação entre a célula e o seu meio, seja para absorção ou eliminação de substâncias. Em geral, admite-se que a extensão maior ou menor do labirinto periférico dos trofócitos esteja relacionada à intensidade de absorção de produtos da hemolinfa por essas células. No entanto, exocitose de material sintetizado por elas não foi observado, o que faz pensar que a via de

eliminação também se faça simplesmente permeando a membrana plasmática, sem a formação de estruturas específicas.

Da mesma forma, os tratamentos mencionados acima evidenciam os espaços intercelulares do epitélio folicular, variando somente a topologia e a intensidade da marcação nas classes de indivíduos, indicando que o material capturado da hemolinfa e que é transportado para o ovócito usa essa via de acesso. A combinação do material presente nos espaços com o vermelho de rutênio indica a presença de carboidratos e possivelmente representa o carboidrato da molécula de Vg. Os espaços entre as células foliculares foram marcados também pela fosfatase alcalina e pela prata amoniacal, indicando a ação de enzimas hidrolíticas básicas nessa região, as quais poderiam atuar em modificações das moléculas que permitiram sua absorção final pelos ovócitos e a presença de proteínas detectáveis pela prata amoniacal.

WALLACE & BERGENK (1974) e ANDERSON (1971) atribuíam às células foliculares a função de transporte de material contribuindo, desta maneira, para o crescimento do ovócito. KING & CASSIDY (1973), notaram que durante a fase de incorporação de material externo ao ovócito, os espaços intercelulares do epitélio folicular, aparecem alargados, facilitando a passagem da hemolinfa até o espaço periovocítico, preenchido por microvilosidades do ovócito, as quais aumentam a superfície celular através da qual componentes do vitelo são absorvidos por pinocitose. Apesar dos espaços intercelulares do epitélio folicular das operárias e mesmo das rainhas apresentarem-se estreitos, foram observados espaços translúcidos que lembram pequenas bolhas na região apical das células, apesar desses serem bem menores que aqueles observados por KING & CASSIDY (1973). Sua pequena dimensão pode estar relacionada à velocidade de passagem do material, já que a taxa de ovogênese é baixa para essa espécie em estudo se comparada, por exemplo, a *Apis*. No caso da rainha, o fato pode dever-se à, na maioria dos casos, vitelogênese estar apenas se iniciando, nos folículos examinados.

O grande desenvolvimento do aparato sintetizador de proteínas das células foliculares está relacionado com a produção dos envoltórios do ovo no final da vitelogênese e com a produção de um produto que estimula a incorporação da Vg pelo ovócito (WYATT & PAN, 1978; CAMARGO-MATHIAS E CAETANO, 1998), possivelmente proteínas carreadoras, as paravitelogeninas, responsáveis pelo carregamento da Vg (MARGARITS, 1985). Porém, além desses materiais, é possível que as células foliculares contribuam também com material que irá compor o vitelo, isto é, que algum material produzido nas células foliculares seja incorporado ao ovócito. Outra possível função atribuída a essas células é a propriedade de promover o endereçamento das moléculas adicionando-lhe radicais de carboidratos, possivelmente modificando de alguma maneira a estrutura

das moléculas de Vg antes de serem incorporadas ao ovoplasma. Essa possibilidade foi sugerida por BAST E TELFER (1976), HUEBNER & INJEYAN (1981) e CAMARGO-MATHIAS E CAETANO (1998).

No entanto, uma das principais funções atribuídas às células foliculares parece ser a formação de uma barreira hemal que regula a permeabilidade do ovário aos componentes da hemolinfa. Nos dados obtidos, principalmente pela percolação pelo nitrato de Lantano, fica clara a existência de pontos de barreira no caso de operárias nutridoras e rainhas virgens com interrupção da passagem de material pelos espaços intercelulares das células foliculares na porção apical do epitélio, ou seja, na interface com o ovócito. Observações desse tipo já haviam sido feitas por KING & CASSIDY (1973). Rainhas fisogástricas apresentam os espaços intercelulares completamente desobstruídos, o que mais uma vez, pode indicar uma seleção quantitativa ou qualitativa do material presente na hemolinfa que alcançará o espaço periovocítico. No caso da rainha virgem o bloqueio pode destinar-se a impedir uma vitelogênese precoce e indesejável devido à impossibilidade do ovócito vir a ser fecundado. Nas rainhas fecundadas e fisogástricas a vitelogênese deve prosseguir com eficiência e rapidez, justificando o livre acesso da hemolinfa ao espaço periovocítico. Neste caso se houver absorção seletiva de material esta será mediada por receptores de membrana plasmática do ovócito.

Material positivo à prata amoniacal apareceu somente no espaço periovocítico (contato entre as células foliculares com o ovócito) no caso da câmara ovocítica de rainhas fisogástricas. A ausência desse material nos espaços intercelulares coloca em pauta uma questão: Uma vez que o material incorporado nas células tem origem lipídica, carboidrática e protéica (considerando a Vg como o principal produto incorporado ao ovócito), por que a localização citoquímica desses materiais é distinta?

Uma possível resposta para esta questão é a de que em fases alternadas, os diferentes compostos sejam “estocados” no espaço periovocítico, indicando uma tomada diferencial dos constituintes do ovócito em momentos diferentes do processo de ovogênese. Essa hipótese pode ter validade uma vez que, em operárias nutridoras os espaços intercelulares apresentaram-se positivos a prata amoniacal, portanto ali se encontra material protéico, além disso, é sabido que lipídios, glicogênio e proteínas depositam-se no ovócito em tempos diferentes da vitelogênese.

O fato de o produto protéico ser encontrado apenas no espaço periovocítico e não nos espaços intercelulares das células foliculares de rainhas fisogástricas, pode significar também, que os produtos de natureza protéica passam por esses espaços em pequenas quantidades a ponto de não serem detectados ou que a modificação que sofrem no transporte por ação das fosfatases os torne detectáveis somente no espaço periovocítico. A presença de material de origem carboidrática nos espaços intercelulares corrobora essa hipótese, além disso, a literatura indica que durante a

passagem da Vg, antes de sua incorporação pelo ovócito, o material pode ser modificado, inclusive recebendo endereçamento (BAST & TELFER, 1976; HUEBNER & INJEYAN, 1981; CAMARGO-MATHIAS E CAETANO, 1998).

Como barreira, diferente do observado em operárias nutridoras e rainhas virgens, parece que as células foliculares de rainhas fisogástricas não impedem a entrada de material, provavelmente em função da grande demanda de material energético e construtor para a formação e maturação dos ovócitos, já que a taxa de ovogênese é infinitamente maior nestas. Neste caso, as células foliculares não barram os produtos, pois não são visualizados pontos de interrupção como aqueles observados em ovários de operárias nutridoras e rainhas virgens que podem ser interpretados conjuntamente como barreiras que regulam a passagem de material já que nas operárias, ainda que nutridoras, a taxa de ovogênese é menor.

ATIVIDADE DAS FOSFATASES (ÁCIDA E ALCALINA):

As fosfatases são enzimas hidrolíticas intracelulares que agem em pH específico, ácido ou alcalino. As fosfatases ácidas estão normalmente localizadas nos lisossomos e atuam na digestão intracelular de compostos endógenos ou exógenos (PEARSE, 1960; CHAYEN *et al.*, 1973). Sua localização tem-se realizado através da abordagem citoquímica que permite tanto a sua identificação como localização *in situ*. A presença da atividade das fosfatases ácidas nas células pode indicar vários aspectos de sua atividade além da digestão intracelular (SKELTON & BOWEN, 1987): secreção, autofagia (SKELTON & BOWEN, 1987; COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000; 2001) e morte celular (KOCH & KING 1969; LOCKSHIN, 1969; BOWEN 1990; BÜNING, 1994; SILVA-DE-MORAES 1998; REGINATO, 1998; CAVALCANTE, 1998).

Nas operárias nutridoras, a fosfatase ácida foi localizada no citossol dos trofócitos do CG em regiões inespecíficas, na forma de grânulos muito eletrondensos espalhados. Nos ovários, a atividade dessa fosfatase foi observada na túnica própria, na forma de grânulos sem forma definida, em alguns núcleos em degeneração de apenas algumas células foliculares e nos núcleos acessórios dos ovócitos também sob a forma de uma granulação fina e inespecífica.

COSTA E CRUZ-LANDIM (2001), verificaram a presença de fosfatase ácida nas células das glândulas hipofaríngeas de *Scaptotrigona postica*, mostrando que com a utilização do (p-NPP) foi observada uma fina granulação sem localização específica. Para as autoras essa característica foi interpretada como indicativa de atividade secretora por estar relacionada com a fase de secreção da glândula. Morfologicamente, resultado similar foi observado tanto nas células do CG como nos ovários de operárias nutridoras. Além disso, na morfologia ultra-estrutural, organelas envolvidas

com a síntese protéica estão presentes, principalmente o retículo endoplasmático granular, o que reforça essa idéia.

A técnica convencional de microscopia eletrônica mostra algumas células foliculares que envolvem o ovócito com características de degeneração como: espaço perinuclear alargado, compactação do citoplasma, ausência de identificação das organelas, etc. Porém, parece pouco provável que essas características indiquem degeneração desse órgão, uma vez que o ovário permanece muito desenvolvido nesta fase (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003a) e a maioria das células foliculares está ativa. O teste para detecção de fosfatase ácida evidenciou núcleos apoptóticos em algumas células foliculares e pequenos grânulos nos núcleos acessórios dos ovócitos, mas essa característica não foi geral, portanto, parece que deve estar muito mais relacionada com a fase secretora da célula que propriamente com o fenômeno de reabsorção, já que outras características de reabsorção de ovócitos não foram observadas, portanto, se tratando de um fenômeno isolado no tecido. No caso dos meliponíneos, a reabsorção do ovócito se dá de maneira drástica, em função da troca de função da operária nutridora (que está na verdade aprovendo as células de cria) para forrageira, na qual o desenvolvimento ovariano não faz mais sentido, visto a perda da sua função, ocorrendo então um redirecionamento funcional e reutilização do material componente (CRUZ-LANDIM & SILVA-DE-MORAES, 2000).

As células foliculares constituem uma população diversificada de células, responsáveis na fase final da ovogênese pela produção do cório do ovócito e de suas estruturas características como, por exemplo, a micrópila por onde penetram os espermatozoides. Neste sentido pode haver regiões onde células foliculares morram precocemente.

A fosfatase alcalina é uma enzima que atua nos processos de divisão celular (MURRAY & KISHNER, 1991), no controle do ciclo celular, comunicação célula-célula e em resposta a fatores de crescimento externo durante o período embriogênico (GLENNEY, 1992). Talvez seja pela função de comunicação célula-célula, que a fosfatase alcalina esteja presente justamente nos espaços intercelulares das células foliculares do ovário, porém, a maior probabilidade é que sua presença também possa ser atribuída a atividade secretora.

A reação positiva para a fosfatase alcalina nos núcleos, na cromatina e nos nucléolos têm sido atribuída a degradação das proteínas que atuam na expressão gênica específica de cada fase do desenvolvimento, principalmente relacionada a metamorfose (CAVALCANTE, 1998). No presente estudo, relação similar pode lhe ser atribuída. Essas enzimas localizadas no núcleo teriam relação com a mudança de função das células durante a ovogênese, no qual uma grande quantidade de proteínas específicas é requerida. As células do corpo gorduroso apresentam inúmeras funções e a

degradação nesse caso pode estar agindo sobre proteínas que atuam nas mudanças de expressão gênica nessas células quando da passagem de uma fase para outra da atividade sintética.

Muitos trabalhos têm relatado a presença de atividade de fosfatase no núcleo celular, porém na maior parte deles, tratando da enzima ácida e não da alcalina, como encontrado aqui. Porém, de maneira geral essas enzimas atuam sobre os mesmos substratos em decorrência da variação do pH, podendo então apresentar características funcionais similares. A função dessas enzimas no núcleo ainda não está totalmente esclarecida (LOVE, *et al.*, 1969; SORIANO & LOVE 1971; VOLBRODT 1974; BUCHWALOW & UNGER, 1977). Muitos autores consideram que a marcação nuclear pela fosfatase não tem um significado funcional, tratando-se assim de um artefato de técnica, porém trabalhos que barram reações inespecíficas, não alteram a marcação nuclear (BARKA & ANDERSON, 1962). CRUZ-LANDIM *et al.*, 2002, observaram que a marcação das fosfatase ácidas não acontece simultaneamente nas diferentes regiões do núcleo, indicando fase funcional específica. Apesar dos resultados presentes não apresentarem esse tipo de marcação para a fosfatase ácida, mas sim para a alcalina, parece claro que ela também pode indicar fase fisiológica específica, provavelmente como mencionado por CRUZ-LANDIM *et al.*, 2002, uma relação com a transcrição. Além disso, outras características morfológicas das células são normais, indicando que a atividade dessa enzima não tem relação com processos degenerativos, como observado anteriormente por CRUZ-LANDIM, *et al.*, 2002.

A presença de atividade fosfatásica alcalina ao redor das gotas lipídicas parece reforçar a idéia da disponibilização do material lipídico como fonte de energia. Resultados similares foram obtidos por REGINATO *et al.*, (***enviado para publicação***) no CG larval de *A. mellifera*.

A análise integrada e comparativa entre os resultados obtidos de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas indicam que os processos e mecanismos envolvidos na deposição do vitelo no ovócito seguem os mesmos mecanismos nas duas classes de fêmeas, variando a taxa na qual a entrada de substâncias ocorre e a própria composição do vitelo. A atividade e localização das enzimas (fosfatases) podem estar envolvidas com três processos nesta espécie: 1) modificação do material que será incorporado ao ovócito, 2) O redirecionamento funcional, dependente da casta e 3) mais provavelmente mobilização de material para fornecer energia para o metabolismo energético.

REFERÊNCIAS

AMDAM, G. V., SIMÕES, Z. L. P., GUIDUGLI, K. R., NORBERT, K. & OMHOLT, S. W. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. **BMC Biotechnology** **3**(1):1-8, 2003.

ANDERSON, L. M. Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*, **Journal of Cell Biology** **20**:131-155, 1964.

ANDERSON, L. M. & TELFER, W. H. A follicle cell contribution to the yolk spheres of moth oocytes. **Tissue & Cell** **1**:633-634, 1969.

ANDERSON, L. M. Protein synthesis and uptake by isolated *Cecropia* oocytes. **Journal of Cell Science** **8**:735-750, 1971.

ANGERMÜLLER, S. & FAHIMI, D. H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochemistry Journal** **14**:823-825, 1982.

BARBOSA-HETEM, J. M. N.; PAULINO-SIMÕES, Z. L. & BITONDI, M. M. G. Ultrastructural study of the effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on the larval fat body of africanized bees (*Apis mellifera* L.) after *in vitro* incubation. **Brazilian Journal of Morphological Science** **15**(2):191-201, 1998.

BARKA, T. & ANDERSON, P. J. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** **10**:741-753, 1962.

BAST, R. E. & TELFER, W. H. Follicle cell protein synthesis and its contribution by isolated *Cecropia* moth oocyte. **Developmental Biology** **52**:83-97, 1976.

BEGO, L. R. 1983. On some aspects of bionomics in *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Biologia** **27**:211-224.

BEHAN, M. & HAGEDORN, H. H. Ultrastructural changes in fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. **Cell and Tissue Research** **186**:499-506, 1978.

BEIG, D. & SAKAGAMI, S. F. Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the ovoposition process II. *Melipona seminigra merrillae* Cockerell. **Annotationes Zoologicae Japonenses** **37**(2):112-119, 1964.

BENCHIMOL, M. Localização de proteínas básicas. *In: Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. 1ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, p.57-73, 1998.

BOWEN, I. D. & BOWEN, S. M. **Programmed Cell Death in Tumours and Tissues**. London: Chapman & Hall, 1990.

BUCHWALOW, I. B. & UNGER, E. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. **Experimental Cell Research** **106**:139-152, 1977.

BÜNING, J. **The insect ovary: structure, previtellogenic growth and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. & CAETANO, F. H. Ultrastructural study of the follicular epithelium in oocytes of *Pachycondyla (neoponera) villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). **Biocell** **22**(1):53-60, 1998.

CAVALCANTE, V. M. Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: Estudos ultra-estruturais e citoquímicos. 1998, 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1998.

CHAYEN, J. BITENSKY, L. & BUTCHER, R. G. **Practical Histochemistry**, London: John Wiley & Sons, 1973.

COLLINS, J. V. The hormonal control of fat body development in *Calpododes ethlius* Stoll (Lepidoptera, Hesperiiidae). **Journal of Insect Physiology** **15**:341-352, 1969.

COSTA, R. A. C. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the ultrastructural and secretory dynamic of hypopharyngeal glands in queens, workers and males of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Biocell** **24**:39-48, 2000.

COSTA, R. A. C. & CRUZ-LANDIM, C. Distribution of acid phosphatases in the hypopharyngeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille: An ultrastructural cytochemical study. **The Histochemical Journal** **33**:653-662, 2001.

COUBLE, P.; CHEN, T. T.; WYATT, G. R. Juvenile hormone controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body: cytological development. **Journal of Insect Physiology** **25**:327-337, 1979.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo do corpo gorduroso de *Apis mellifera adansonii* ao microscópio óptico e eletrônico. Anais do 3^o Congresso Brasileiro de Apicultura – ESALQ – USP, Piracicaba, SP. 137-144, 1975.

CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae). **Naturalia** **8**:7-23, 1983.

CRUZ-LANDIM, C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. **Revista Brasileira de Biologia** **45**(3):211-232, 1985a.

CRUZ-LANDIM, C. Modificações das células do corpo gorduroso de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura** **37**:471-475, 1985b.

CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R. D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Variation on ovariole number in meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queen's ovaries, with comments on ovary development and caste differentiation. **Papéis Avulsos de Zoologia** **40**(18):289-296, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genetics and Molecular Biology** **23**(1):83-88, 2000.

CRUZ-LANDIM, C. & SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa**. Editora Costa, Rio Claro/SP, 2000.

CRUZ-LANDIM, C., REGINATO, R. D., SILVA DE MORAES, R. L. M. & CAVALCANTE, V. M. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. **Genetics and Molecular Research** **1**(2):131-138, 2002.

DEAN, R. L. The induction of autophagy in isolated insect fat body by β -ecdysone. **Journal of Insect Physiology** **24**:439-447, 1978.

DEAN, R. L., LOCKE, M. & COLLINS, J. V. Structure of fat body. *In*: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. L. (Ed.), **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford, Pergamon Press, 3, p.155-210, 1985.

DUTKOWSKI, A. B. Fat body of *Galleria mellonella* during metamorphosis. Cytochemical and ultrastructural studies. **Folia Histochemica et Cytochemica** **12**(3-4):269-280, 1974.

ENGELMAN, F. Juvenile hormone - controlled synthesis of female specific protein in the cockroach *Leucophaea maderae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **145**:439-447, 1971.

ENGELMANN, F. Induction of the insect vitellogenin "in vivo" and "in vitro". *In*: GILBERT, L. I. **The juvenile hormones**. New York: Plenum Press, p.470-485, 1976.

ENGELMANN, F. Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis, **Advances in Insect Physiology** **14**:49-108, 1979.

ENGELS, W. Extraocytäre Komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifera*. **Insect Sociata** **3**:271-288, 1968.

ENGELS, W. Das zeitliche und räumliche muster der dottereinlagerung in die oocyte von *Apis mellifera*. **Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** **142**:409-430, 1973.

ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honey bees and stingless bees. *In*: ENGLES, W. **Social Insects: An evolutionary approach to caste and reproduction**. Germany: Springer Verlag, 1990.

GIANNINI, K. M. Labor division in *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **26**(1):153-162, 1997.

GIANNINI, K. M. & BEGO, L. R. On the ovoposition behavior of *Melipona compressipes fasciculata* (Hymenoptera, Meliponinae). **Iheringia, Série Zoologia** **84**:83-94, 1998a.

GIANNINI, K. M. & BEGO, L. R. Labor division among workers of *Melipona compressipes fasciculata* with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Iheringia, Série Zoologia** **85**:109-114, 1998b.

GILBERT, L. I. Lipid metabolism and function in insects. **Advances on Insect Physiology** **6**:51-96, 1967.

GIORGI, F. MAZZINI, M. Secretory and endocytic pathways of vitellogenin in stick insects, *In*: PORCHET, M., ANDRIES, J. V., and DHAINAUT, A. **Advances in Invertebrate Reproduction** **4**. N.Y., Elsevier Science Publisher, v.3, p.79-84, 1986.

GLENNEY, J. R. Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. **Biochimica et Biophysica Acta** **1134**:113-127, 1992.

HAGEDORN, H. H. & KUNKEL, J. G. Vitellogenin and vitelin insects. *In*: MITTLER, T. E., RADOVSKY F. J. & RESH V. G. **Annual Review of Entomology** **24**:475-505, 1979.

HUEBNER, E. & INJEYAN, H. S. Patency of the follicular epithelium in *Rhodnius prolixus*: A re-examination of the hormone response and technique refinement. **Canadian Journal of Zoology** **58**:1617-1625, 1980.

ISSAC P. G. & BOWNES, M. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. **European Journal of Biochemistry** **123**:527-534, 1982.

KAWOOYA, J. K. & LAW, J. H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. **Journal of Biology Chemistry** **263**:8746-8753, 1988.

KAWOOYA, J. K., OSIR, E. O. & LAW, J. H. Uptake of the major haemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. **Journal of Biology Chemistry** **263**:8740-8747, 1988.

KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. *In*: KERKUT & GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. N. Y.; Pergamon Press, 3, p.211-248, 1985.

KILBY, B. A. The Biochemistry of the insect fat body. **Archives of Insect Physiology** **1**:111-174, 1963.

KING, R. C. & CASSIDY J. D. Ovarian development in *Habrabacon juglandis* (Ashmeas) (Hymenoptera: Braconidae). II Observations of component cells of eggs chamber and their bearing upon interpretation of radiosensitive data from *Habrabacon* and *Drosophila*. **Journal of Insect Morphology and Embryology** **2**:117-136, 1973.

KOCH, E. A. & KING, R. C. Further studies on the ring canal system of the ovarian cystocytes of *Drosophila melanogaster*. **Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** **102**:129-152, 1969.

KUNKEL, J. G. & NORDIN, J. H. Yolk proteins. *In*: GILBERT, L. I. & KERKUT, G. A. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**. 1ed. New York: Pergamon Press. Oxford, 1, p.83-111, 1985.

LANE, N. J., DALLAI, R. BURIGHEL, P. & MARTINUCCI, G. B. Tight and gap junctions in invertebrates. **Journal of Cell Science** **84**:1-18, 1986.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. *In*: KING, R. C. & AKAI, H., **Insect ultrastructure**. N. Y., Plenum Press, p.151-197, 1984.

LOCKSHIN, R. A. Lysosomes in insects. *In*: DINGLE, J. T. *et al.*, **Lysosomes in Biology and Pathology. Vol. 6 Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics**. London: North Holland, 1969.

LOVE, R., STUDZINSKI, G. P. & WALSH, R. J. Nuclear nucleolar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. **Experimental Cell Research** **58**:62-72, 1969.

LIU, H. & RYAN, R. O. Role of lipid transfer particle in transformation of lipophorin insect oocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** **1085**:112-118, 1991.

LUFT, J. H. Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. **The Anatomical Record** **171**:369-376, 1971.

MACRAE, E. K.; MEETZ, G. D. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. **Journal of Cell Biology** **45**:235-245, 1970.

MARGARITIS, L. H. Structure and physiology of the egg shell. *In*: GILBERT, L. I. and KERKUT, G. A. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**. 1ed. New York: Pergamon Press. Oxford, 1, p.30-82, 1985.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 1.ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 2000.

MOHANTY, S. C. Growth of the vitellarium during oogenesis in the fly *Lucilia cuprina* (Diptera) oocyte-nurse cell interrelation. **Growth** **15**:90-99, 1981.

MURRAY, A. W. & KIRSCHNER, M. W. What controls the cell cycle. **Science American** **264**:57-63, 1991.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. **Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** 2002. 164f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2002.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Sociobiology** **41**(3):701-709, 2003a.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: A review. **Biociências** **11**(2):195-205, 2003b.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Protein content and electrophoretic profile of fat body and ovary extracts from workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepetelier, 1836. **Iheringia, Série Zoologia** **94**(4):417-419, 2004.

PATRÍCIO, K. & CRUZ-LANDIM, C. Tipos de ovários presentes nos insetos. Características morfológicas e ultra-estruturais: Uma revisão. **Naturalia** **26**:53-68, 2001.

PATRÍCIO, K. & CRUZ-LANDIM, C. *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apini) ovary development in queens and in workers from queenright and queenless colonies. **Sociobiology** **42**(3):771-780, 2003.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. London: J & A Churchill ed., 1960.

PRICE, G. M. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. **Biological Review**, **48**:333-375, 1973.

REGINATO, R. D. **Diferenciação dos ovários em rainhas e operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae): Aspectos ultra-estruturais e citoquímicos**. 1998. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1998.

REGINATO, R. D., PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Composição das Reservas e Presença de Fosfatase Ácida em Células do Corpo Gorduroso de Pré-pupas de *Apis mellifera* Lineaus (Hymenoptera, Apidae). **Enviado a Neotropical Entomology**.

ROTH, T. F. & PORTER, K. R. Yolk protein uptake in the mosquito *Aedes aegypti* L. **Journal of Cell Biology** **20**:313-332, 1964.

RUBENSTEIN, E. C. The role of an epithelial occlusion zone in the termination of vitellogenesis in *Hylophara cecropia* ovarian follicles. **Developmental Biology** **71**:115-127, 1979.

RYDER, T. A. & BOWEN, I. D. A method for the fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** **23**(3):235-237, 1975.

SAKAGAMI, S. F.; BEIG, D.; ZUCCHI, R.; AKAHIRA, Y. Occurrence of Ovary-developed Workers in Queenright Colonies of Stingless Bees. **Revista Brasileira de Biologia** **23**(2):115-129. 1963.

SASS, M. & KOVACS, J. The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of *Manduca brassicae*. **Cell and Tissue Research** **180**:403-409, 1977.

SAYAH, F.; KARLINSKI, A.; BRECIZET, M. Hormones regulating structural changes in the adipocytes of the female earwig *Labridura riparia*. **Tissue & Cell** **26**:587-597, 1994.

SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 1998. 97f.. Tese (Livre docência em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

SKELTON, J. K. & BOWEN, I. D. The cytochemical localization and backscattered electron imaging of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing *Calliphora vomitoria* larvae. **Epithelia** **1**:213-223, 1987.

STAURENGO DA CUNHA, M. A. **Dinâmica da ovogênese em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera: Apidae)**. 1979. 185f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. SP, 1979.

SOARES, M. J. Detecção de lipídios. In: SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 1ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179p. 1998.

SORIANO, R. Z. & LOVE, R. Electron microscopic demonstration of acid phosphatase in nucleoli and nucleoplasm. **Experimental Cell Research** **65**:467-470, 1971.

SOUZA, W. Citoquímica de carboidratos. *In*: SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 1ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179p. 1998.

SUN, J., HIRAOKA, T., DITTMER, N. T., CHO, K. & RAIKHEL A. S. Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **30**:1161-1171, 2000.

TELFER, W. H. The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **Journal of Biophysical and Biochemistry Cytology** **9**:747-759, 1961.

TELFER, W. H. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. **Advances on Insect Physiology** **11**:223-319, 1975.

TELFER, W. H., RUBENSTEIN, E. C. & PAN, M. L. How the ovary makes yolk in *Hyalophora*. *In*: SEHNAL, F. MENN, J. J. & CYMBOROWSKI, B. **Regulation of Insect development and behavior**, Wroclaw Technical Univ., p.637-654, 1981.

THOMSEN, E. & THOMSEN, M. Production of specific protein secretion granules by fat body cells of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **Cell and Tissue Research** **193**:25-33, 1978.

TORRES JÚNIOR, J. A stereological analysis of developing egg chambers in the honeybee queen, *Apis mellifera*. **Cell and Tissue Research** **208**:29-33, 1980.

TRENCZEK, T.; ZILLIKENS, A. & ENGELS, W. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** **35**(6):475-481, 1989.

VOLBRODT, A. Cytochemistry of nuclear enzymes. *In*: BUSCH, H. **The cell nucleus**. Academic Press. New York and London, pp.344-399, 1974.

WALLACE R. A. & BERGENK, E. W. Amphibian hepatic synthesis and ovarian uptake and conversion to yolk proteins. **American Zoologist** **14**:1155-1175, 1974.

WIGGLESWORTH, V. B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larva. **Journal of Experimental Biology** **19**:56-77, 1942.

WIGGLESWORTH, V. B. Fine structural changes in the fat body cells of *Rhodnius* (Hemiptera) during extreme starvation and recovery. **Journal of Cell Science** **53**:337-346, 1982.

WYATT, G. R. & PAN, M. L. Insect plasma proteins. **Annual Review of Biochemistry** **47**:779-817, 1978.

WYATT, G. R. The fat body as a protein factory. *In*: LOCKE, M. & SMITH, D. S. **Insect biology in the future**. New York, Academic. p.201-225, 1980.

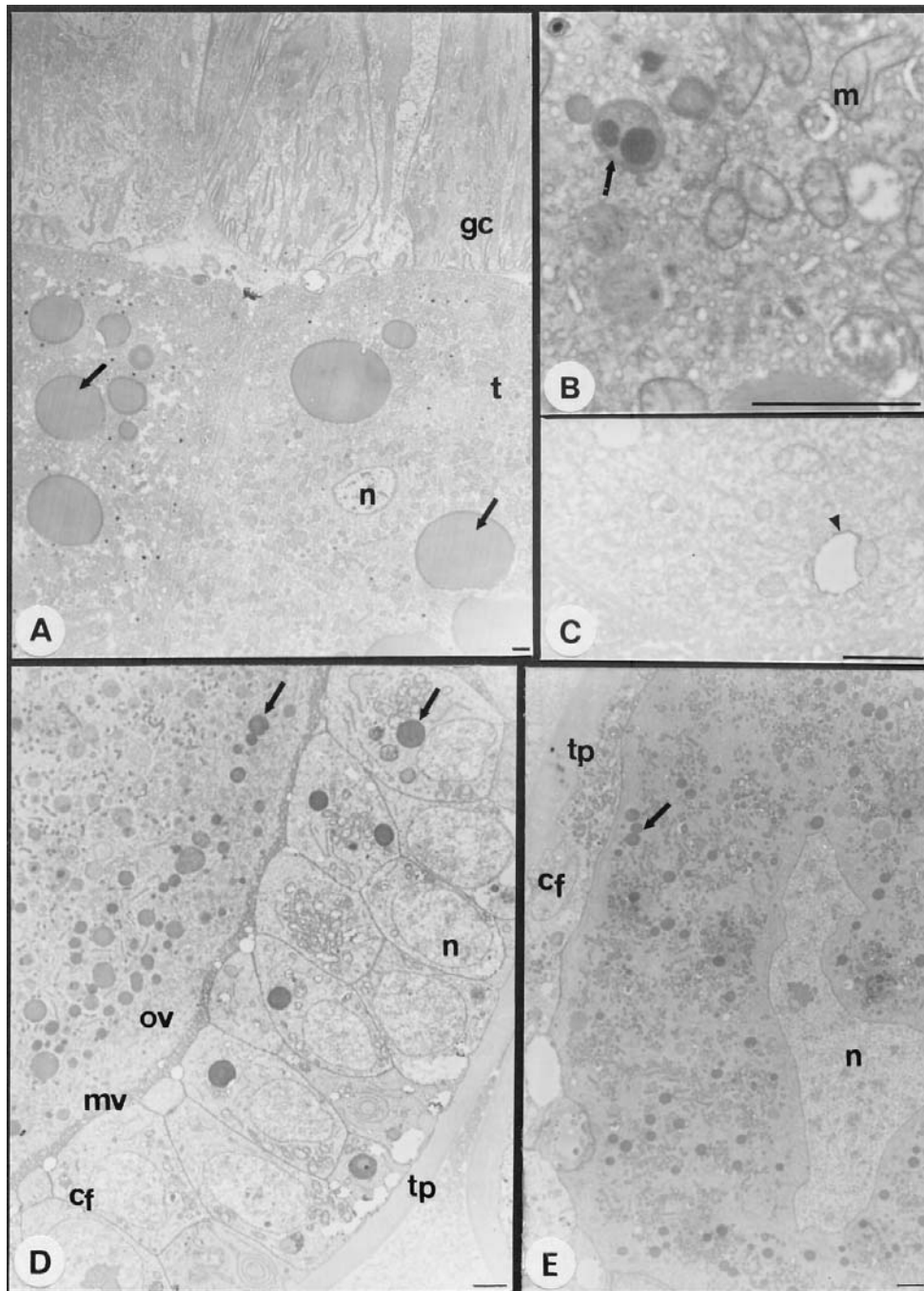


Figura 01 – Trofócitos (t) do CG e ovário de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Ósmio Imidazol. Material positivo apresenta-se como inclusões citoplasmáticas (setas) com a região periférica mais eletrondensa (A), como grânulos citoplasmáticos heterogêneos (seta) (B) e contornando inclusões eletrtransparentes (seta) (C) nos trofócitos. No ovócito (ov) e nas células foliculares (cf) (setas) (D) e no citoplasma das células nutridoras (cn) (seta) (E). Barra – 1,5 μ m. gc – glândula de cera; m – mitocôndria; mv – microvilosidades; n – núcleo; tp – túnica própria.

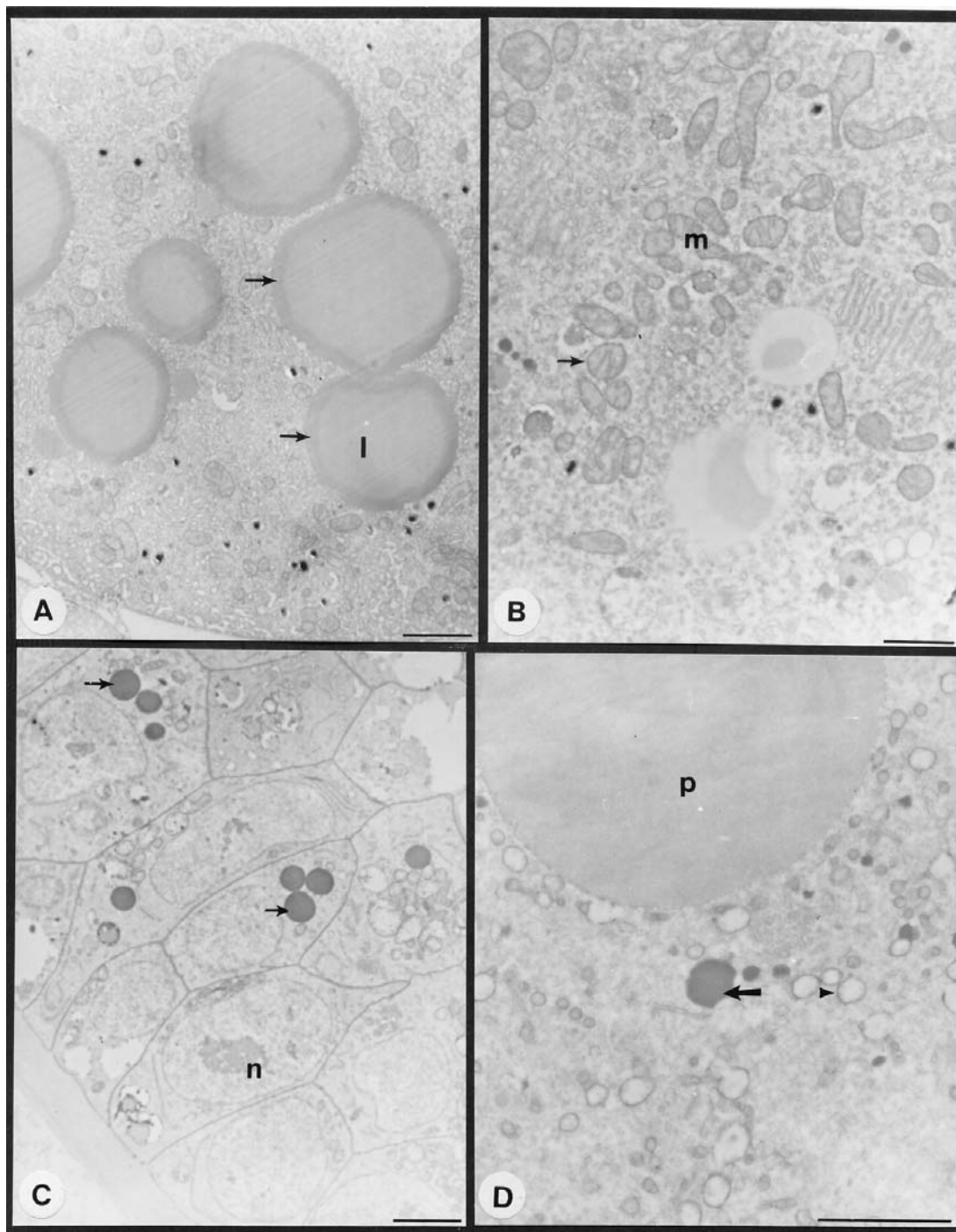


Figura 02 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Ósmio Imidazol. **A)** Inclusões com a borda mais eletrondensa (setas). Marcação (seta) realçando a membrana das mitocôndrias (m) (**B**) e grandes inclusões citoplasmáticas (setas) nas células foliculares que envolvem o ovócito (**C**). **D)** A seta indica gotas mais eletrondensas enquanto que a cabeça de seta indica vacúolos vazios com o contorno marcado no ovócito. Barra – 3,0µm. l – lipídio; n – núcleo; p - proteína.

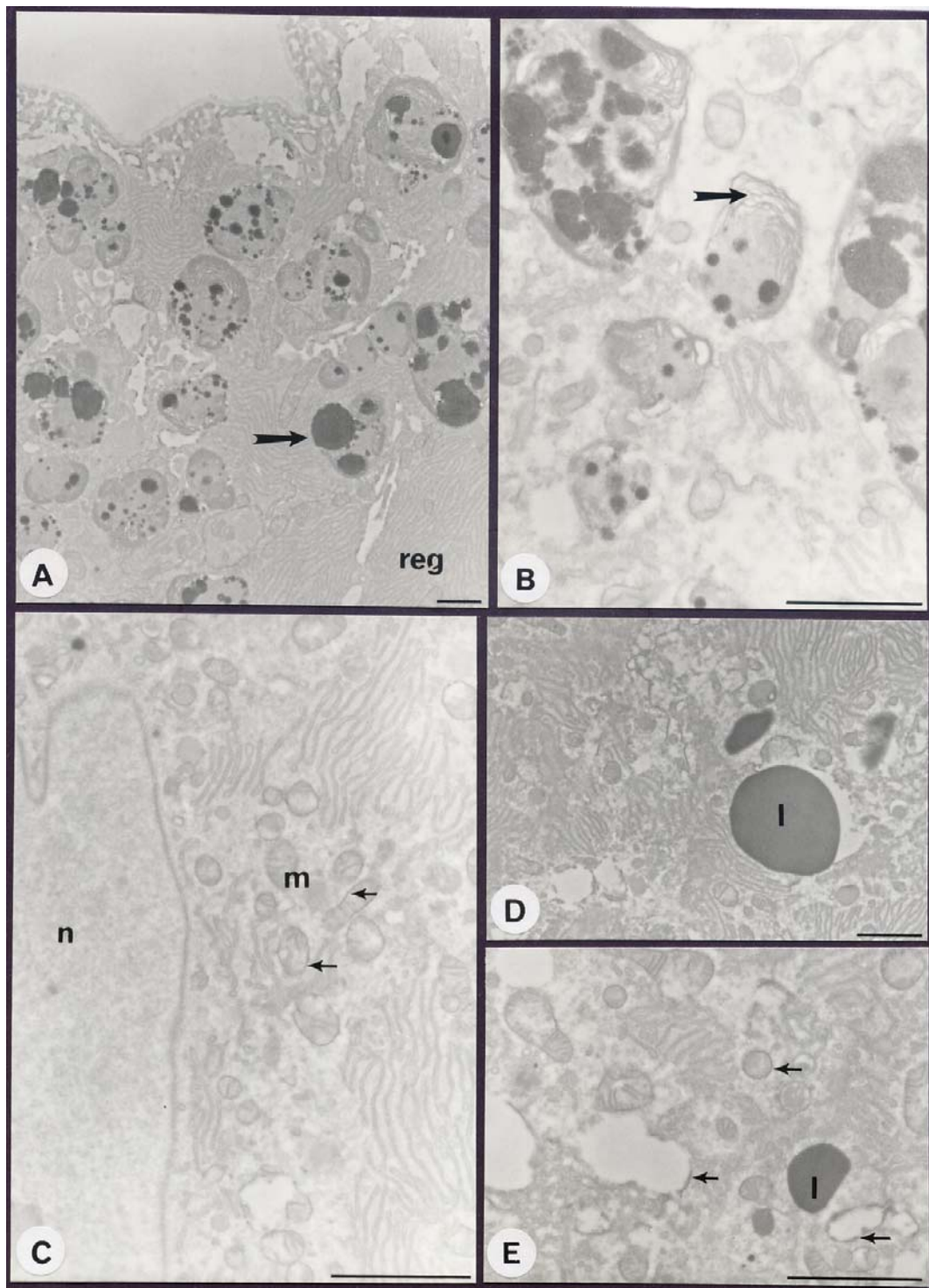


Figura 03 – Trofócitos do CG de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Ósmio Imidazol. **A)** Depósitos heterogêneos (seta) positivos para lipídios. **B)** Detalhe dos depósitos heterogêneos e suas estruturas membranas. **C)** Marcação (setas) contornando mitocôndrias. **D)** Gotas de lipídio (l) típicas desse tecido. **E)** Marcação ao redor de inclusões eletrônicas transparentes. Barra – 2,0μm. n – núcleo; reg – retículo endoplasmático granular.

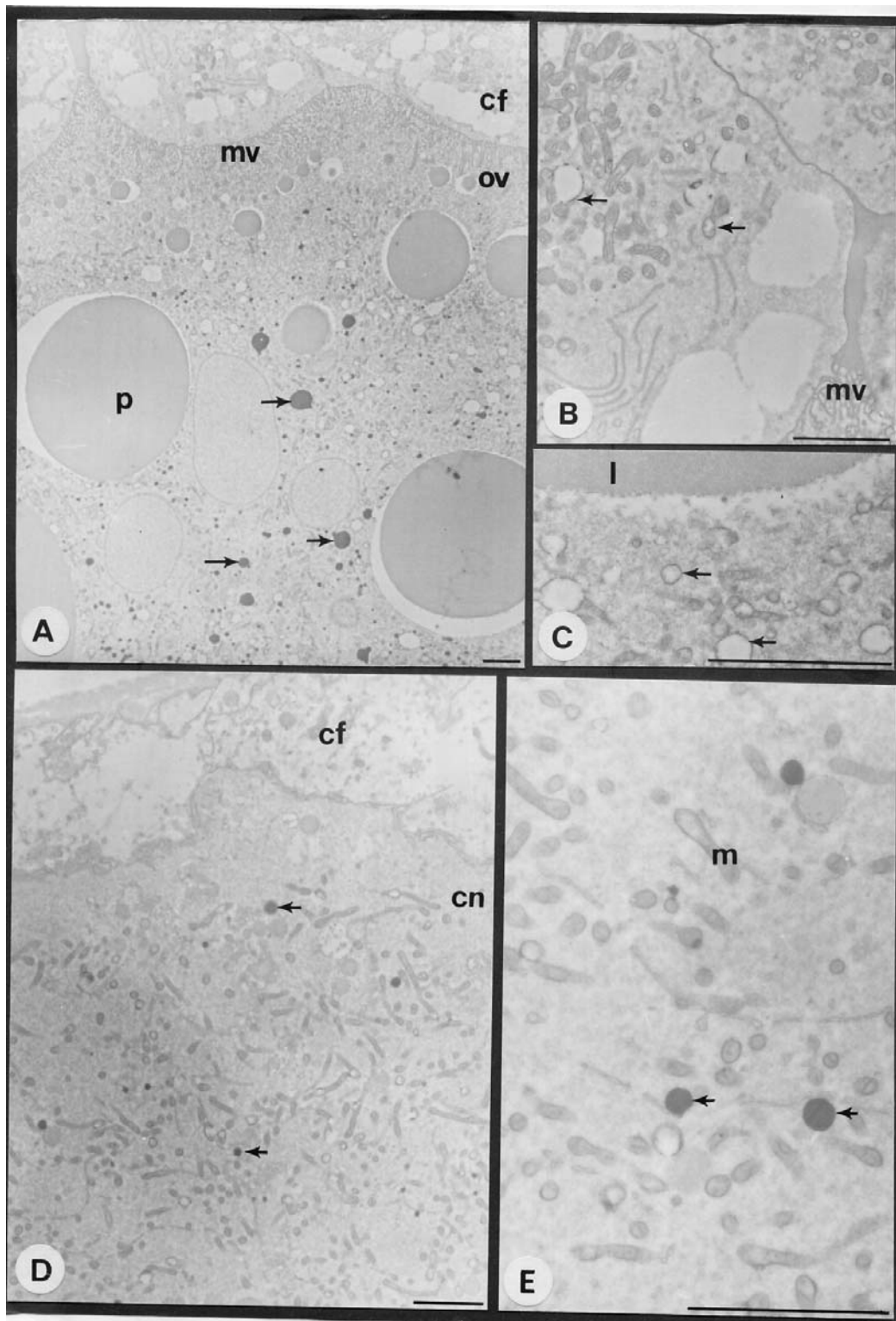


Figura 04 – Ovários de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Ósmio Imidazol. Marcação no ovócito (setas) (A), contornando as mitocôndrias (setas) das células foliculares do ovócito (B). Ao redor de vesículas claras no ovócito (setas) (C) e nas células nutridoras (setas) (D) e (E). Barra – 2,0µm. cf – célula folicular; cn – célula nutridora; l – lipídio; m – mitocôndria; mv – microvilosidades; ov – ovócito; p – proteína..

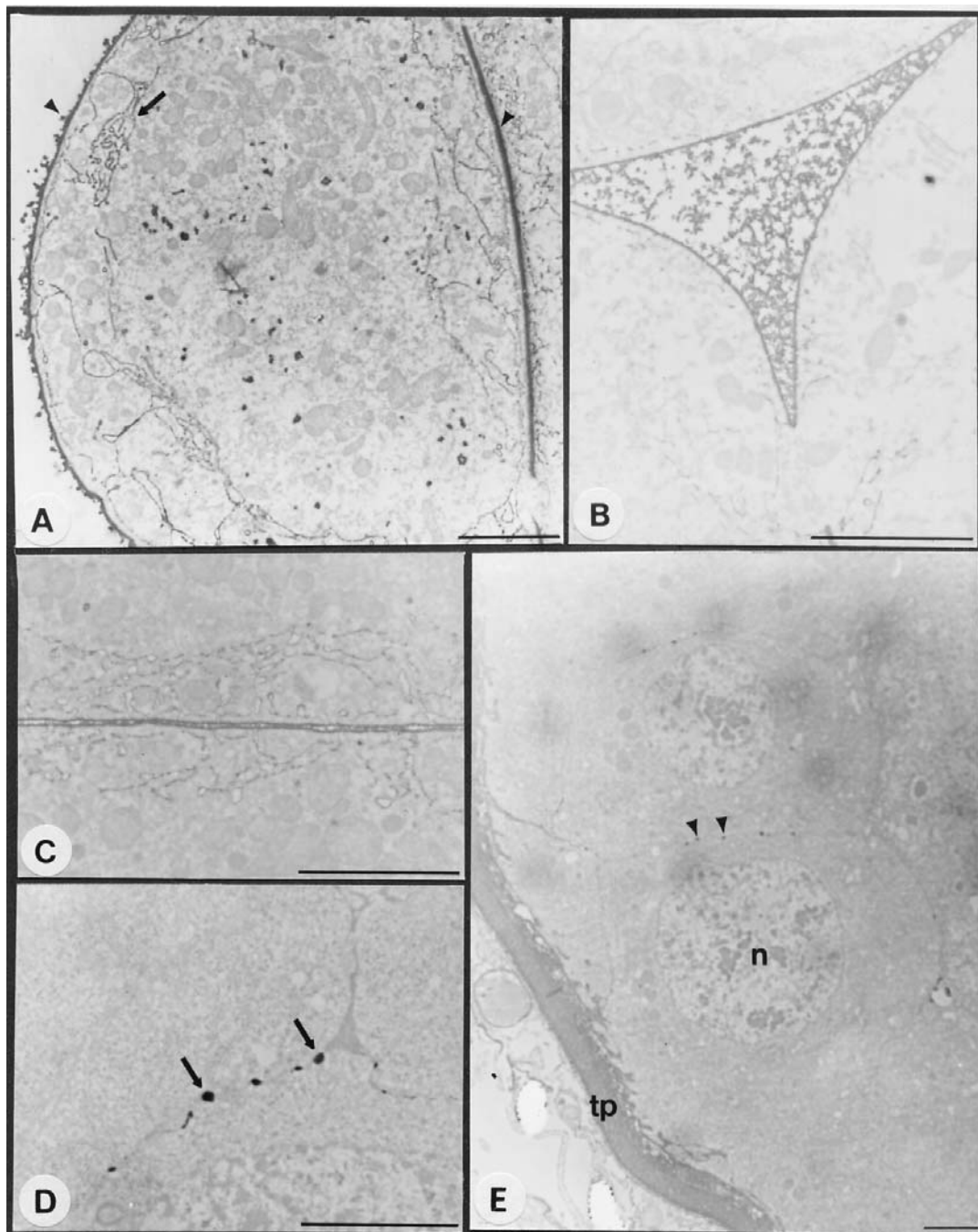


Figura 05 – Trofócitos do CG e ovários de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Vermelho de Rutênio. Marcação na lâmina basal (cabeça de seta) e no lúmen das invaginações periféricas da membrana plasmática (seta) dos trofócitos (**A**). **B**) Espaço extracelular com material positivo. **C**) O material positivo está em contato direto com a membrana, deixando um espaço aberto sem material positivo. **D**) Detalhe de um espaço entre duas células foliculares do ovário, mostrando pontos positivos (setas) e sua localização no epitélio de células foliculares (setas) (**E**). Barra - 3 μ m. n – núcleo; tp – túnica própria.

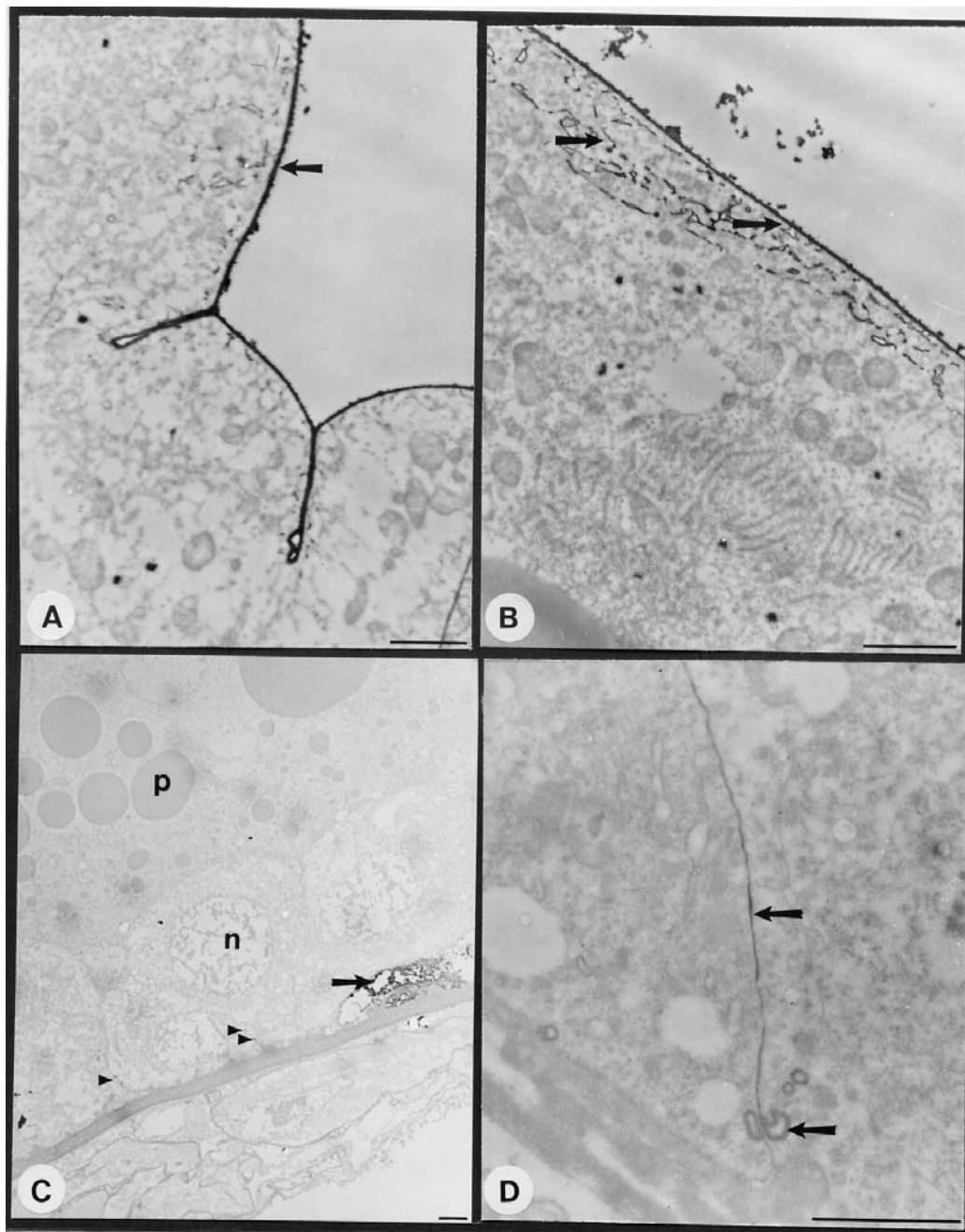


Figura 06 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Vermelho de Rutênio. Material positivo na lâmina basal (seta) dos trofócitos (A). B) Invaginações da membrana plasmática marcadas pelo teste (setas). C) Espaços intercelulares das células foliculares pontualmente marcados (cabeças de setas). As setas indicam material positivo na túnica própria. D) Acúmulo de material corado pelo vermelho de Rutênio no espaço intercelular (setas). Barra – 2,0 μ m. l – lipídio; n – núcleo; p – proteína.

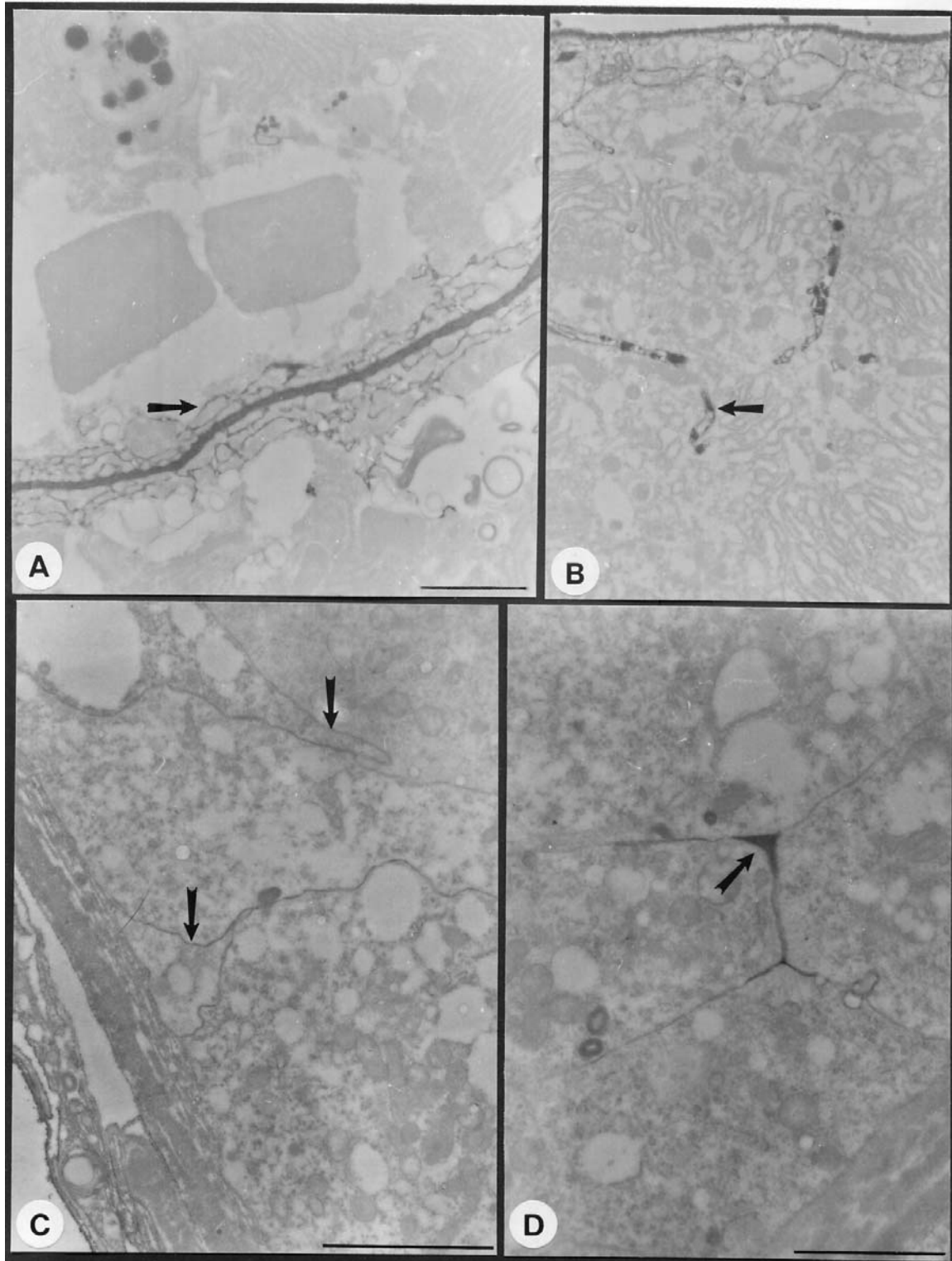


Figura 07 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Vermelho de Rutênio. **A)** Impregnação na lâmina basal e no labirinto periférico (setas) e as invaginações profundas da membrana plasmática contendo grumos de material positivo **(B)**. **C)** Espaços intercelulares das células foliculares positivamente delineados (setas), com material acumulado **(D)**. Barra – 1,5 μ m.. 1 – lipídio.

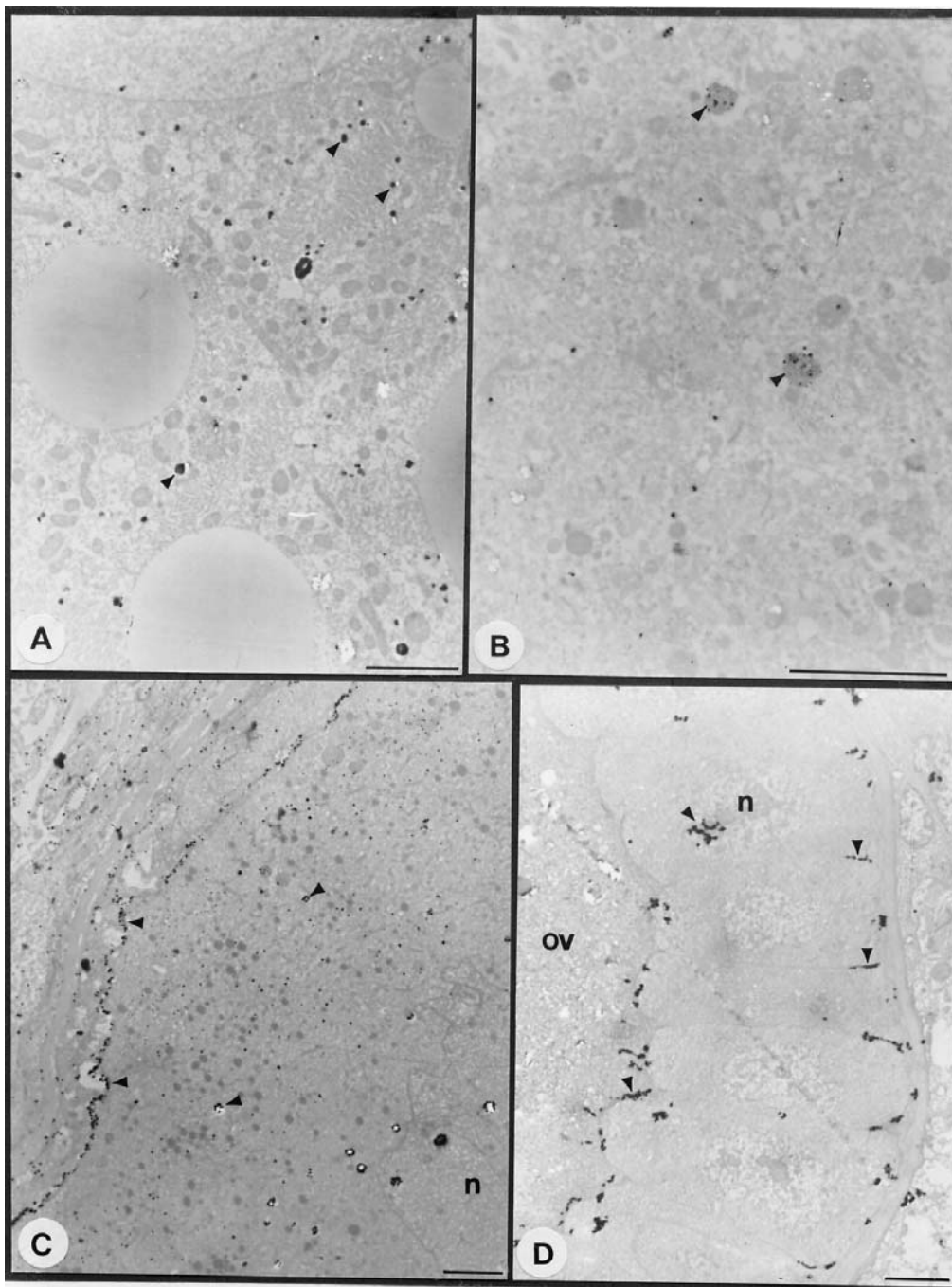


Figura 08 – Trofócitos do CG e ovários de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Prata Amoniacal. **A)** Nos trofócitos, a marcação se deu na forma de pequenos grânulos (setas) no citoplasma ou sobre grânulos de eletrondensidade intermediária (setas) **(B)**. **C)** Célula nutridora do ovário, mostrando reação positiva (setas) no limite entre essas e as células foliculares e no núcleo (n). **D)** Células foliculares que envolvem o ovócito (ov) com marcação positiva nas regiões basal e apical dos espaços intercelulares e no contato com o ovócito. Alguns núcleos (n) dessas células também foram marcados (seta). Barra – 3,0 μ m.

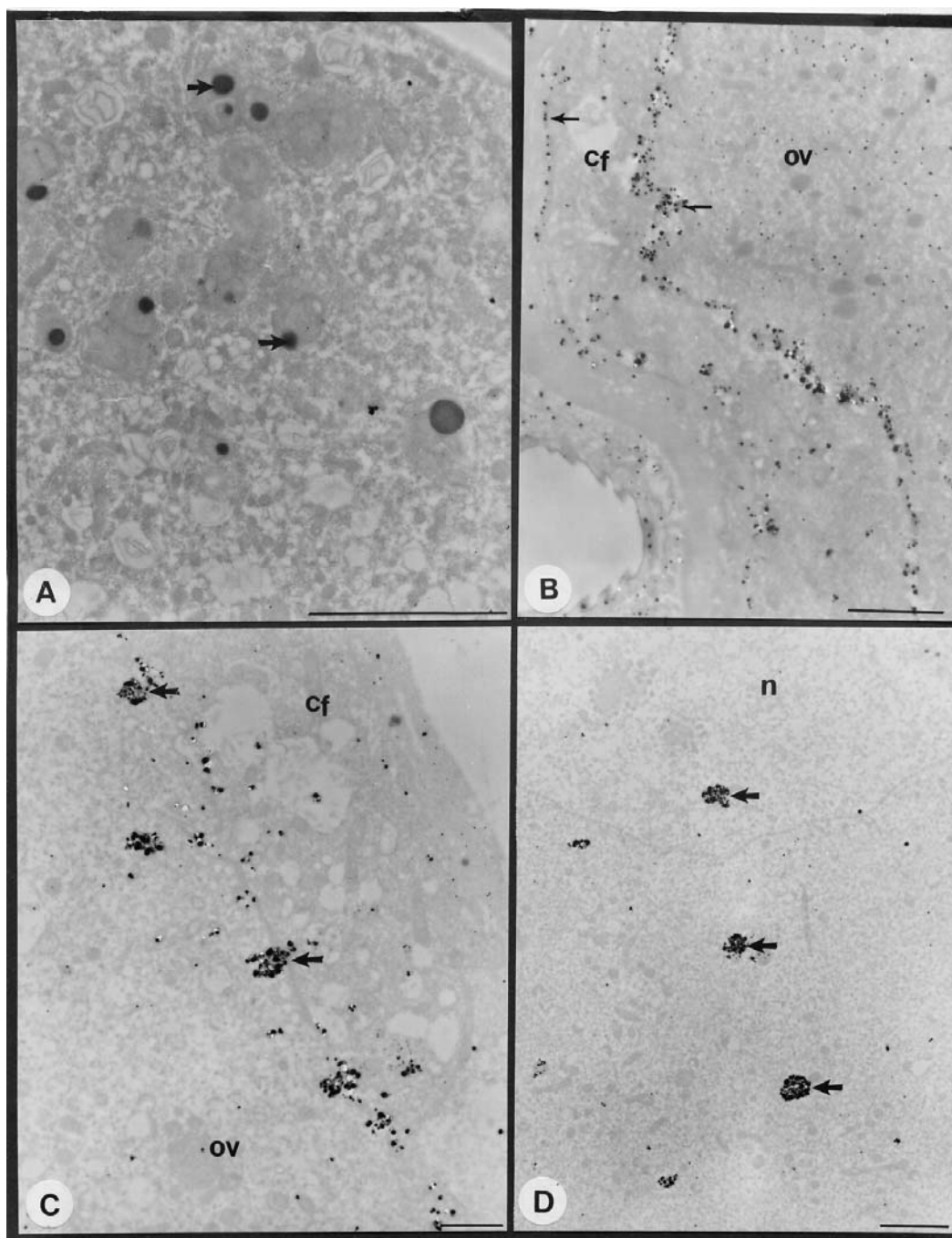


Figura 09 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Prata Amoniaca. **A)** Depósitos eletrondensos (setas) no citoplasma dos trofócitos. **B)** Câmara ovocítica do ovário mostrando marcação na forma de grânulos finos tanto na região basal como na apical (setas) das células foliculares (cf) que envolvem o ovócito (ov). **C)** Depósitos de material positivo (setas) na região do espaço periovocítico. **D)** Marcação aparentemente não específica na forma de grumos (setas) no núcleo (n) e no citoplasma das células nutritoras. Barra – 2,0 μ m.

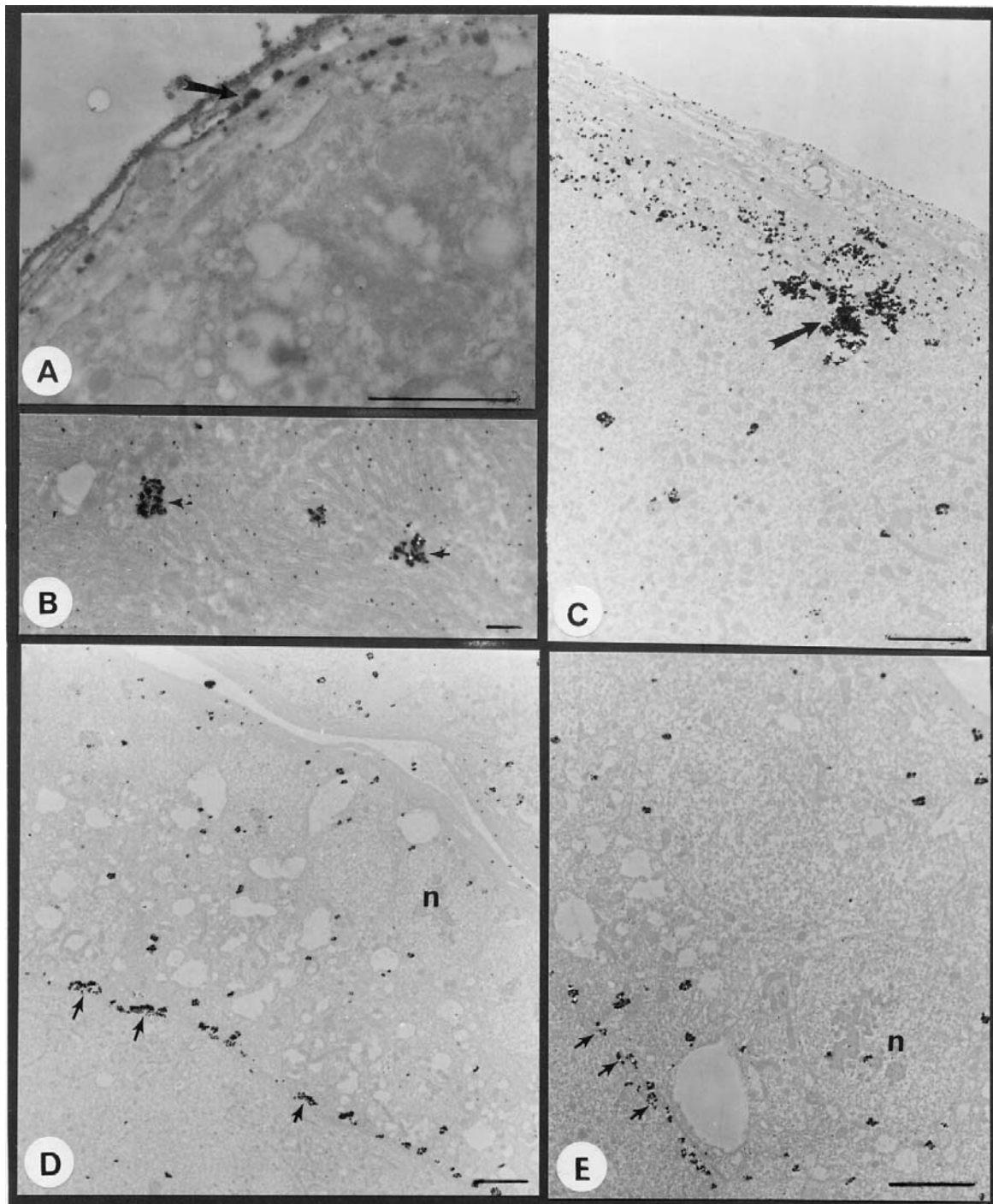


Figura 10 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* tratados com Prata Amoniacal. Depósitos na membrana basal (A) e na região do retículo endoplasmático granular nos trofócitos mostrando depósitos pontuais e na forma de grumos (setas) (B). C) Ovariolo mostrando a região marcada pela prata amoniacal (seta). Notar pequenos depósitos no interior da célula. Marcação no limite das células foliculares com a câmara nutridora (D) (setas) e com o ovócito (E) (setas). Barra – 2,0 μ m. n = núcleo.

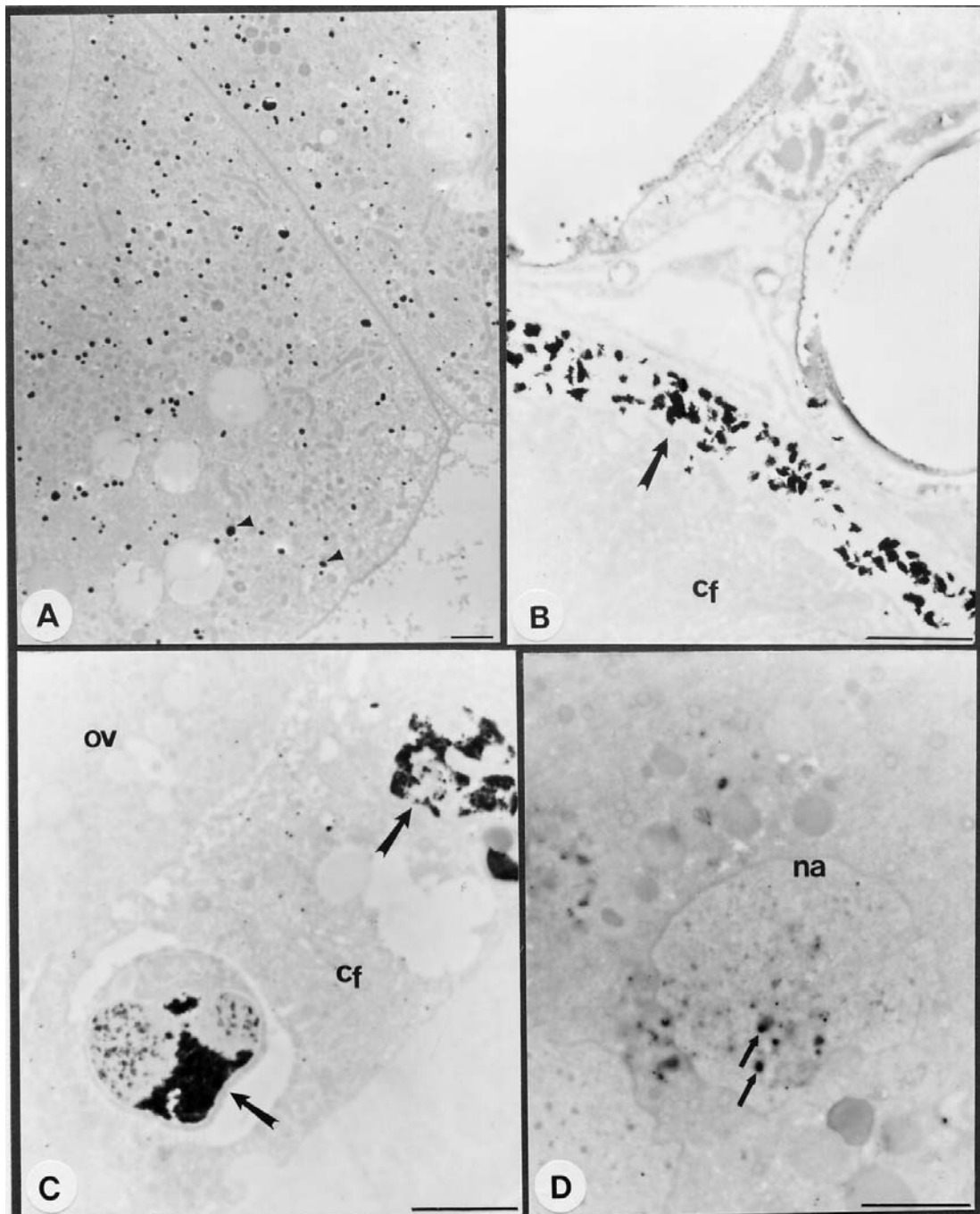


Figura 11 - Trofócitos do CG e ovários de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase ácida. **A)** Aspecto geral dos trofócitos mostrando a localização da enzima, espalhada pelo citoplasma homogeneamente (cabeça de setas). **B)** A reação positiva, nos ovários, principalmente na túnica própria, com grandes grânulos bem definidos (seta). **C)** Células foliculares (cf) que envolvem o ovócito (ov) com núcleos em degeneração (setas) marcados intensamente pelo teste na cromatina. **D)** Núcleos acessórios (na) do ovócito mostrando positividade (setas). Barra – 2,0 μ m.

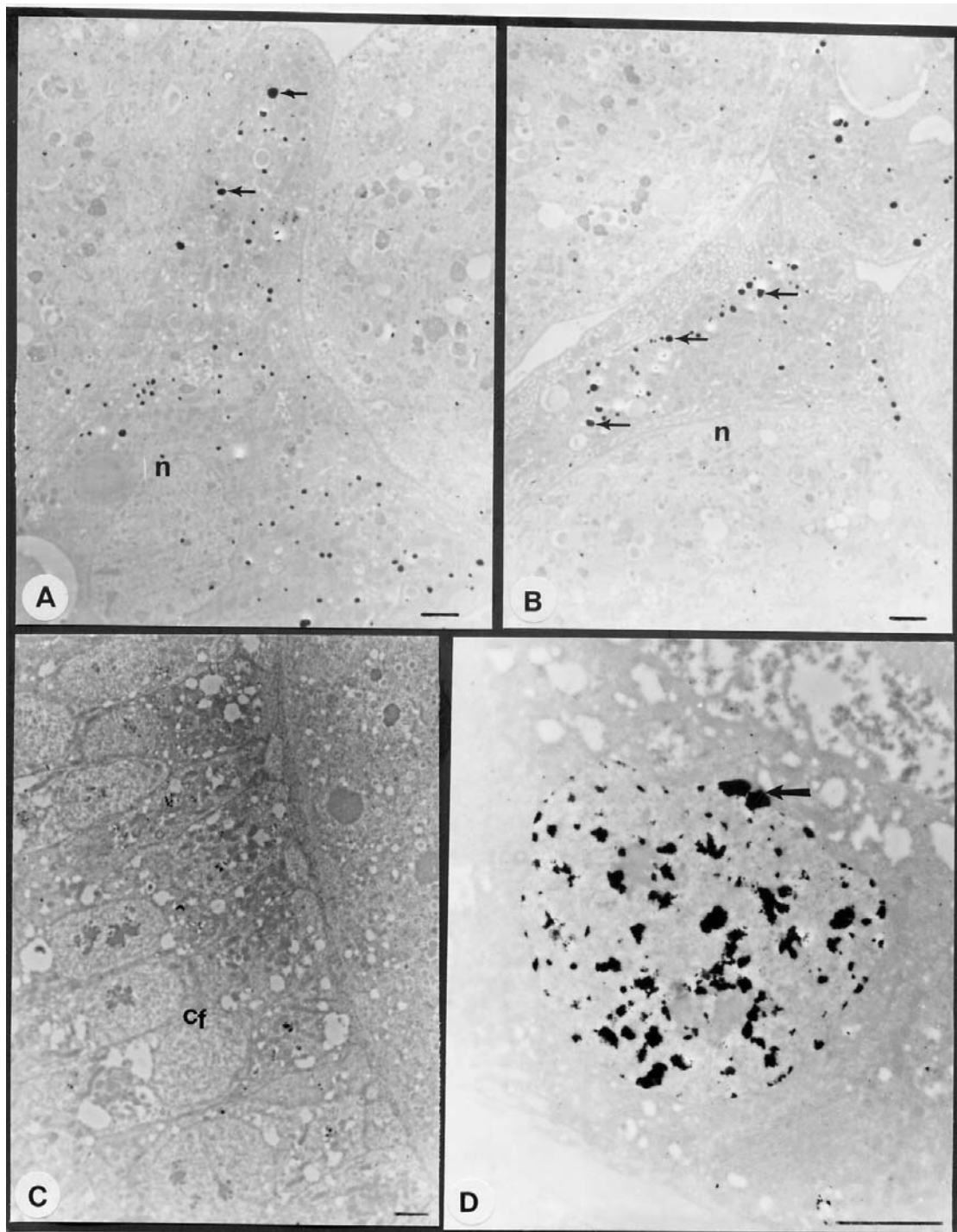


Figura 12 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase ácida. Marcação positiva (setas) no citoplasma dos trofócitos na forma de grânulos espalhados pelo citoplasma (A) e (B) e ausência de marcação nas células foliculares (cf) (C). O núcleo de algumas células folicular apresentou marcação na cromatina (setas) (D). Barra – 2,0 μ m.

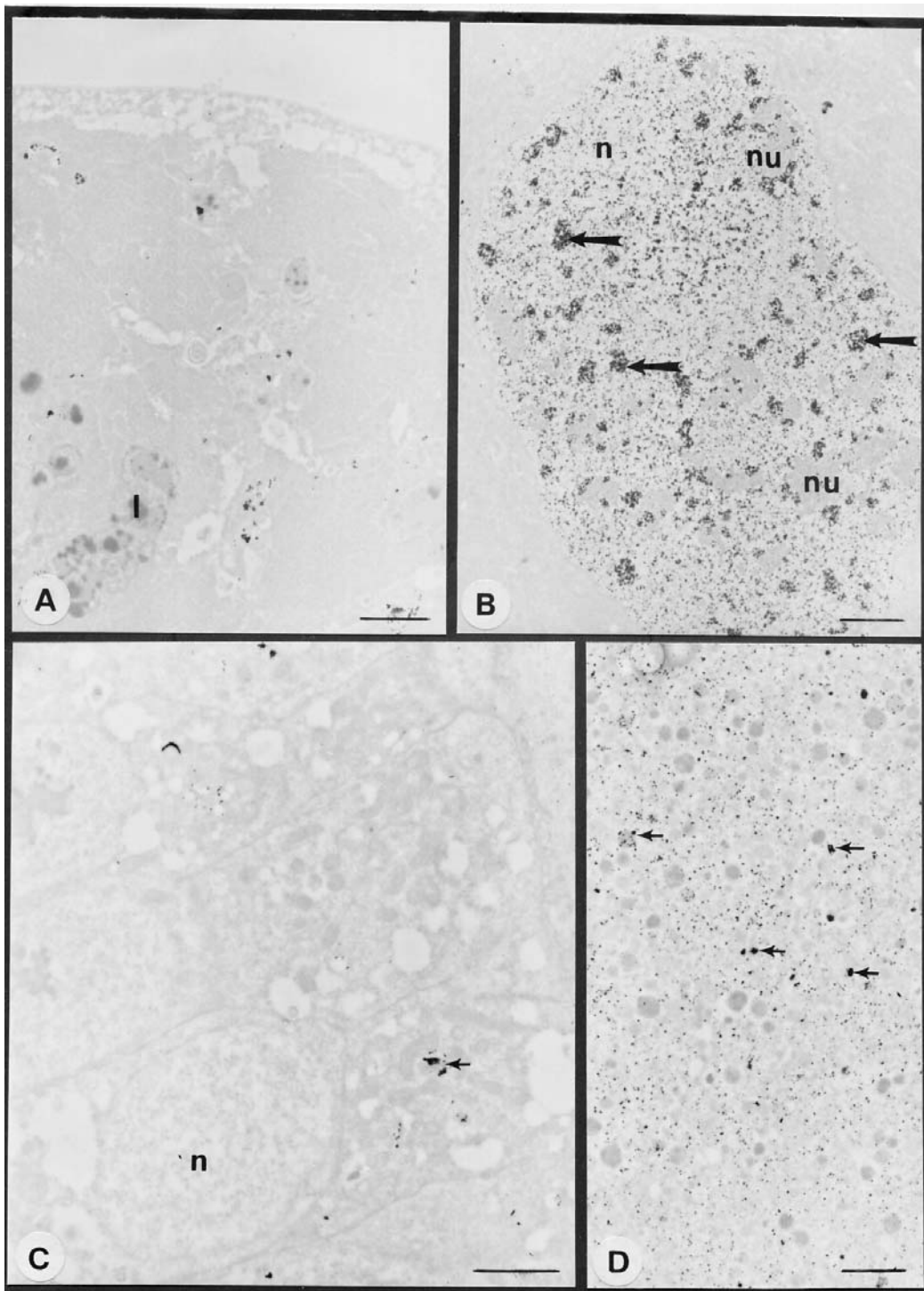


Figura 13 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase ácida. Reação negativa nos citoplasma dos trofócitos (A), positiva na cromatina (setas) e negativa nos nucléolos (nu) de seus núcleos (n) (B). As células foliculares também não apresentaram reação (C), mas o ovoplasma apresentou uma marcação granular fina (D). Barra – 2,0 μ m.

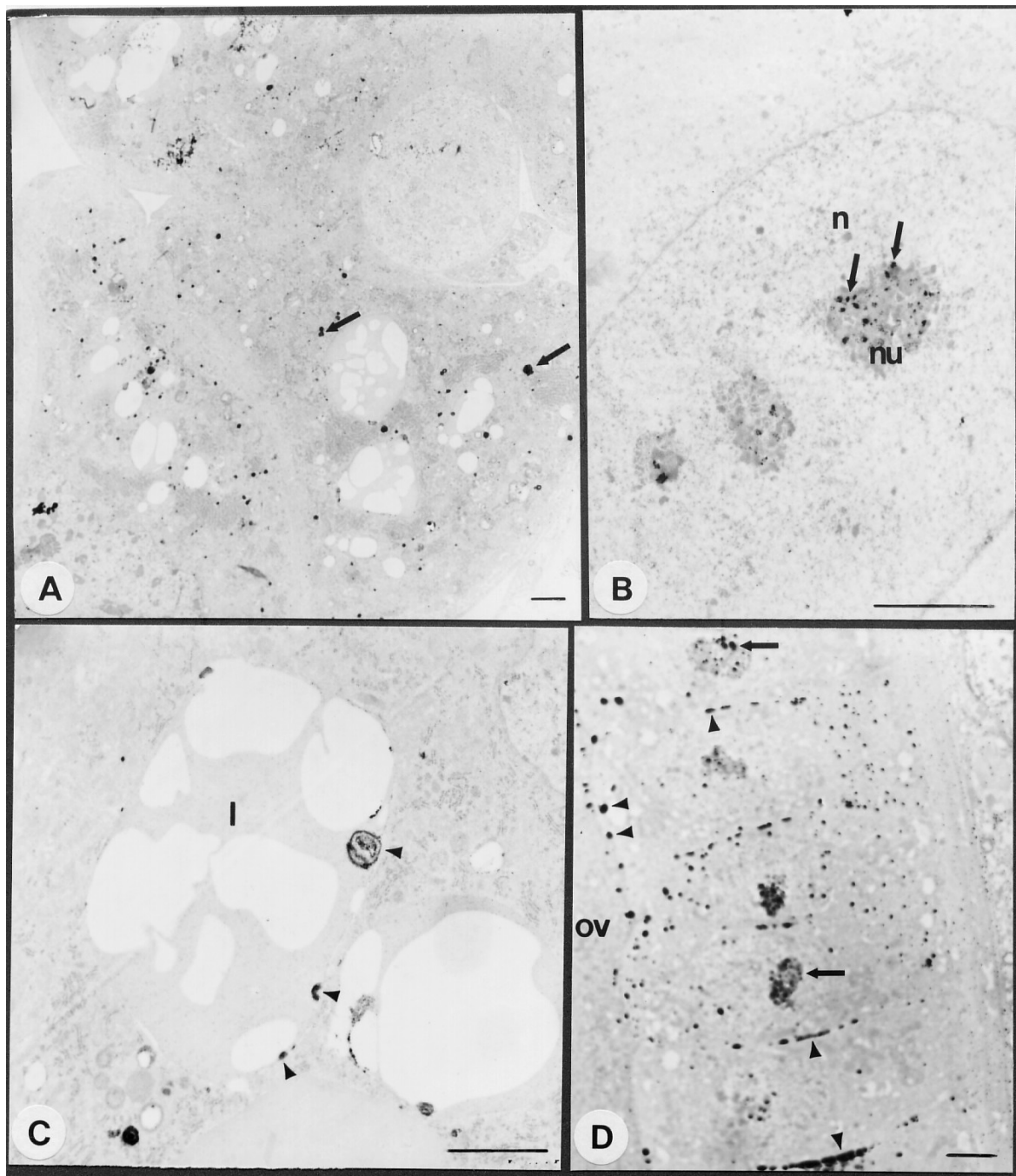


Figura 14 - Trofócitos do CG e ovários de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase alcalina. **A)** Trofócitos mostrando pontos positivos espalhados pelo citoplasma (setas) e na região nucleolar (nu) (setas) de seus núcleos (n) **(B).** **C)** Detalhe do citossol com marcação positiva na superfície de inclusões lipídicas (l) (setas). **D)** Aspecto geral das células foliculares que envolvem o ovócito (ov) mostrando marcação nos espaços intercelulares, no contato entre a superfície dessas células e o ovócito (cabeça de setas), em alguns núcleos e em certos nucléolos (setas). Barra – 2,0 μ m.

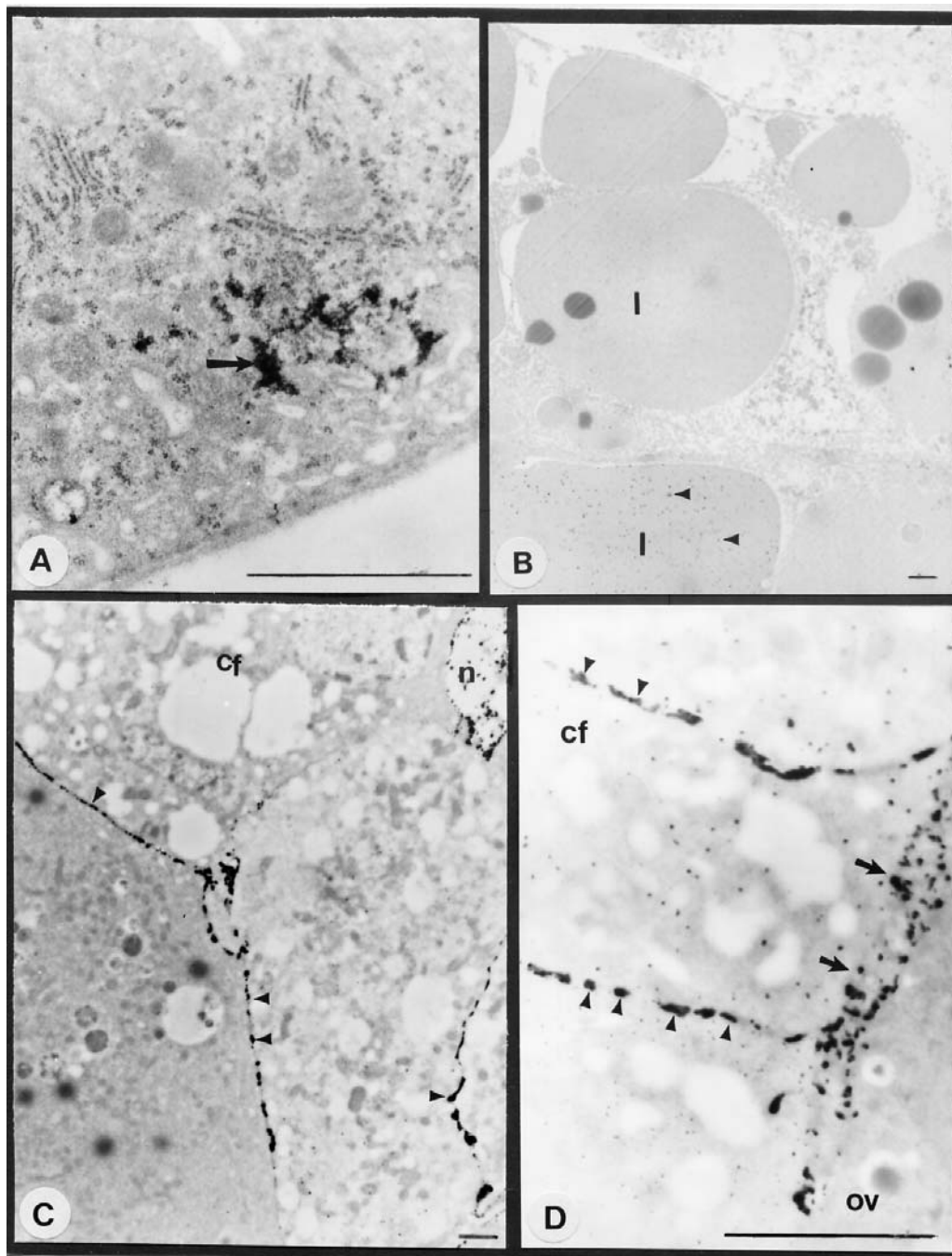


Figura 15 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase alcalina. **A)** Marcação tênue nos espaços formados pelas invaginações da membrana plasmática (seta) em algumas células. **B)** Granulação muito fina (cabeça de setas) nos depósitos lipídicos (l). **(C)** Marcação acentuada em alguns núcleos (n) e nas regiões apical e basal (cabeça de setas) de algumas células foliculares (cf), enquanto que outras apresentaram marcação mais acentuada no espaço periovocítico (setas) e nos espaços intercelulares das células foliculares (cf) (cabeça de setas) **(D)**. Barra – 2,0µm. ov – ovócito.

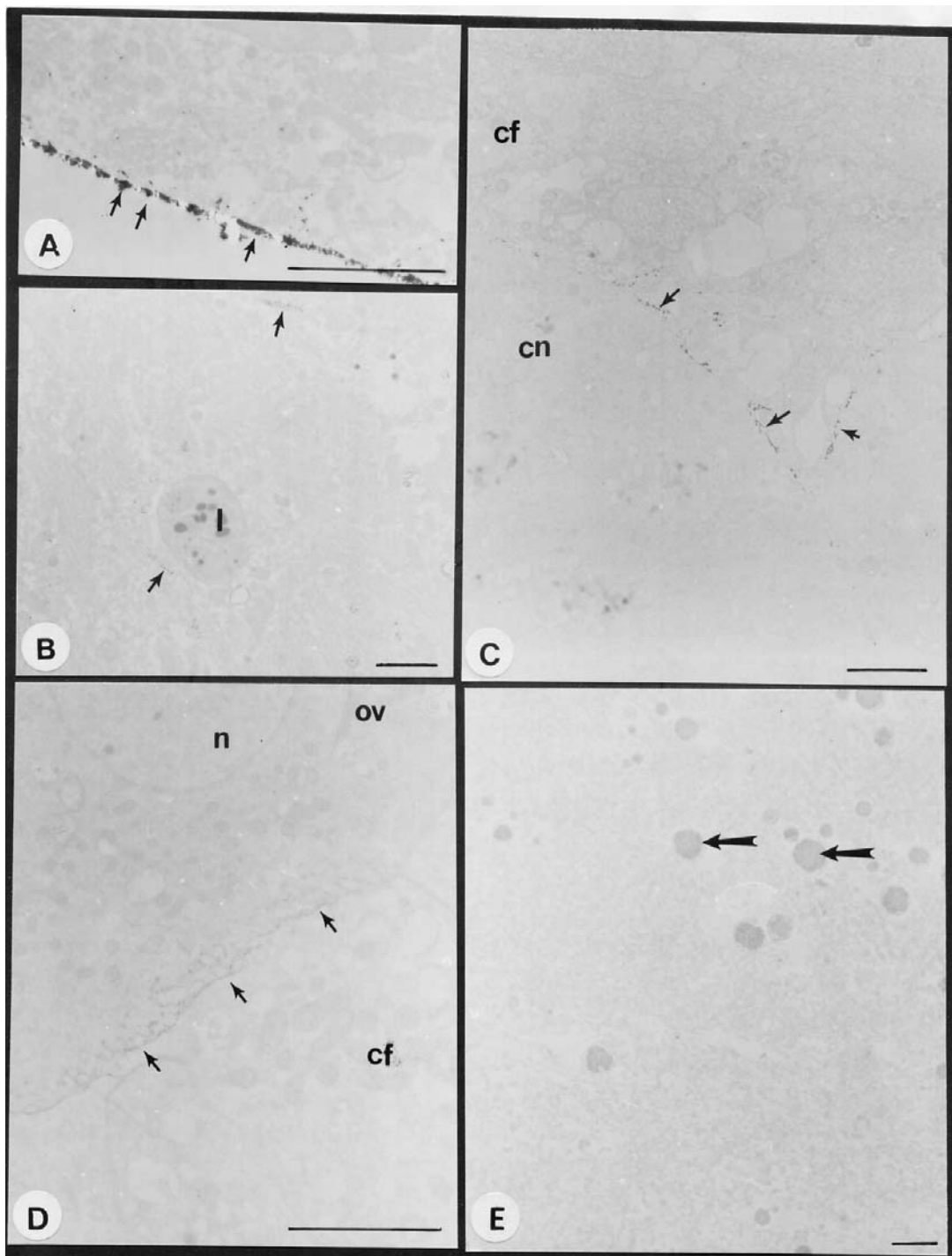


Figura 16 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de detecção de atividade de fosfatase alcalina. **A)** Marcação na lâmina basal. **B)** Granulação citoplasmática pulverulenta (setas) na região de retículo endoplasmático. Granulação também foi encontrada nos espaços intercelulares das células foliculares (cf) da câmara nutridora (cn) e no espaço periovocítico (setas) **(C)**. Também no espaço periovocítico da câmara ovocítica (setas) **(D)** e no próprio ovócito (setas) **(E)**. Barra – 2,0 μ m. l – lipídio; n – núcleo; ov – ovócito.

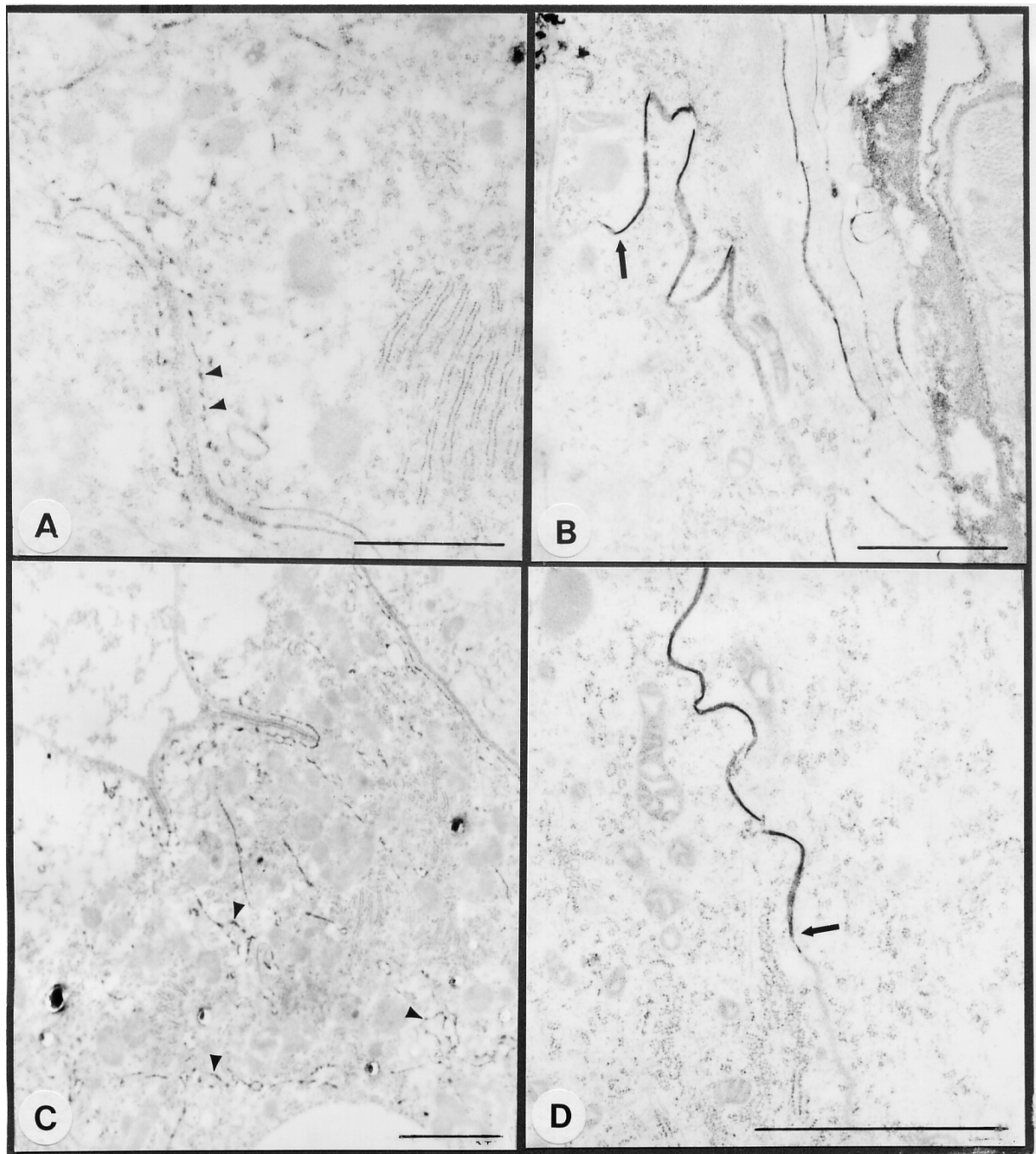


Figura 17 - Trofócitos do CG e ovários de operárias nutridoras de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de impregnação pelo Nitrato de Lantano. **A)** Detalhe de duas células do corpo gorduroso mostrado a impregnação no labirinto basal (cabeça de setas). **B)** O contato entre duas células foliculares da câmara ovocítica do ovário mostrando que o lantano é barrado no ápice do epitélio (seta). **C)** Trofócito do CG com o lúmen do labirinto basal mais profundo evidenciado pelo teste (setas). **D)** Detalhe de duas células foliculares do ovário que envolvem o ovócito com a passagem do Lantano interrompida (seta). Barra – 2,0 μ m.

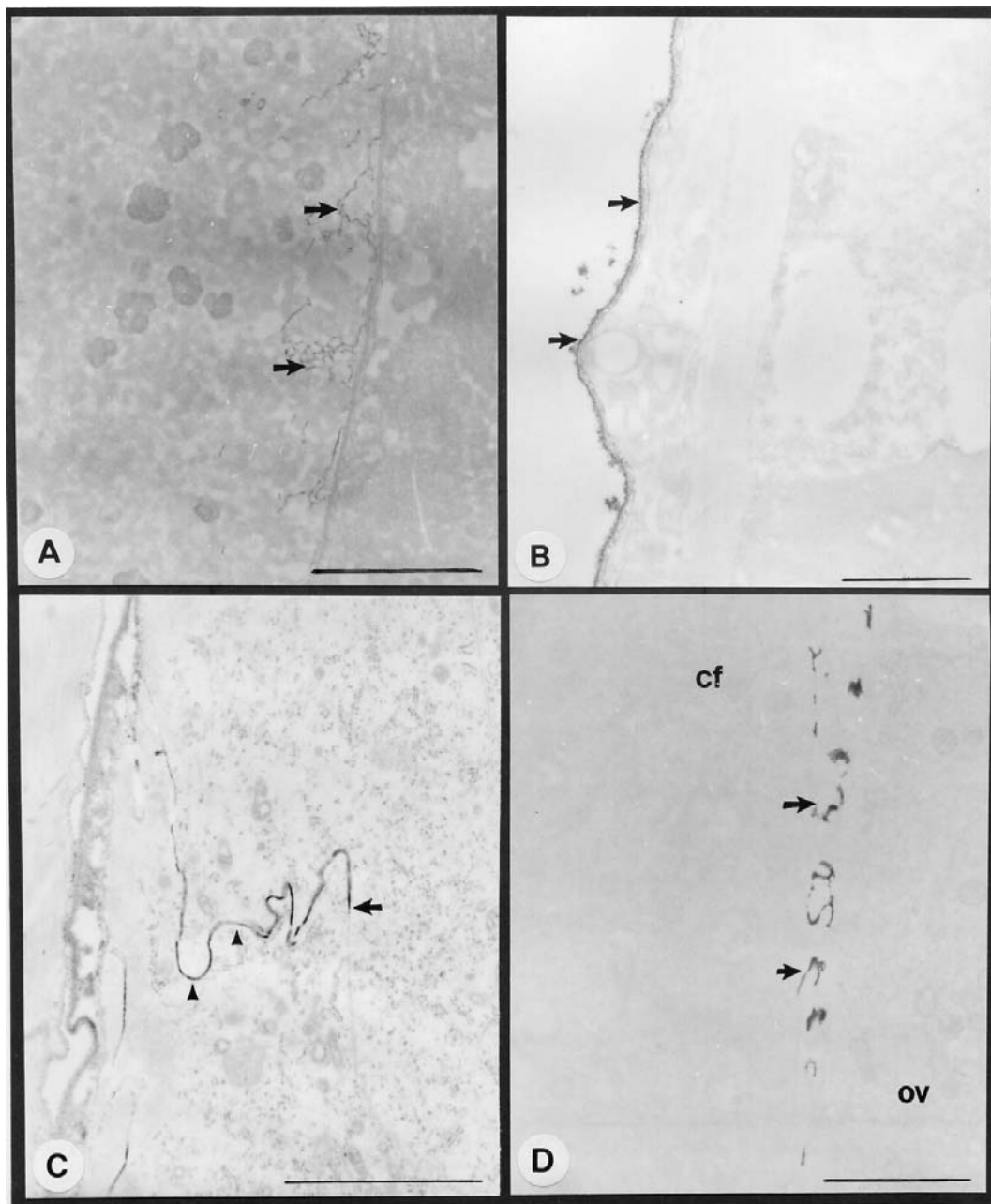


Figura 18 – Trofócitos do CG e ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de impregnação pelo Nitrato de Lantano. Nos trofócitos apenas permitiu delimitar os espaços formados pelas invaginações da membrana plasmática (setas) (A). B) Marcação na membrana peritoneal (setas) do ovário. C) Espaço intercelular da câmara ovocítica marcado pela percolação (cabeça de setas) e o ponto de interrupção da passagem do material (seta). D) Detalhe da região apical das células foliculares (cf) em contato com o ovócito (ov), mostrando positividade nos espaços intercelulares (seta) e delimitando as invaginações da membrana basal fortemente marcadas (setas maiores). Barra – 2,0 μ m.

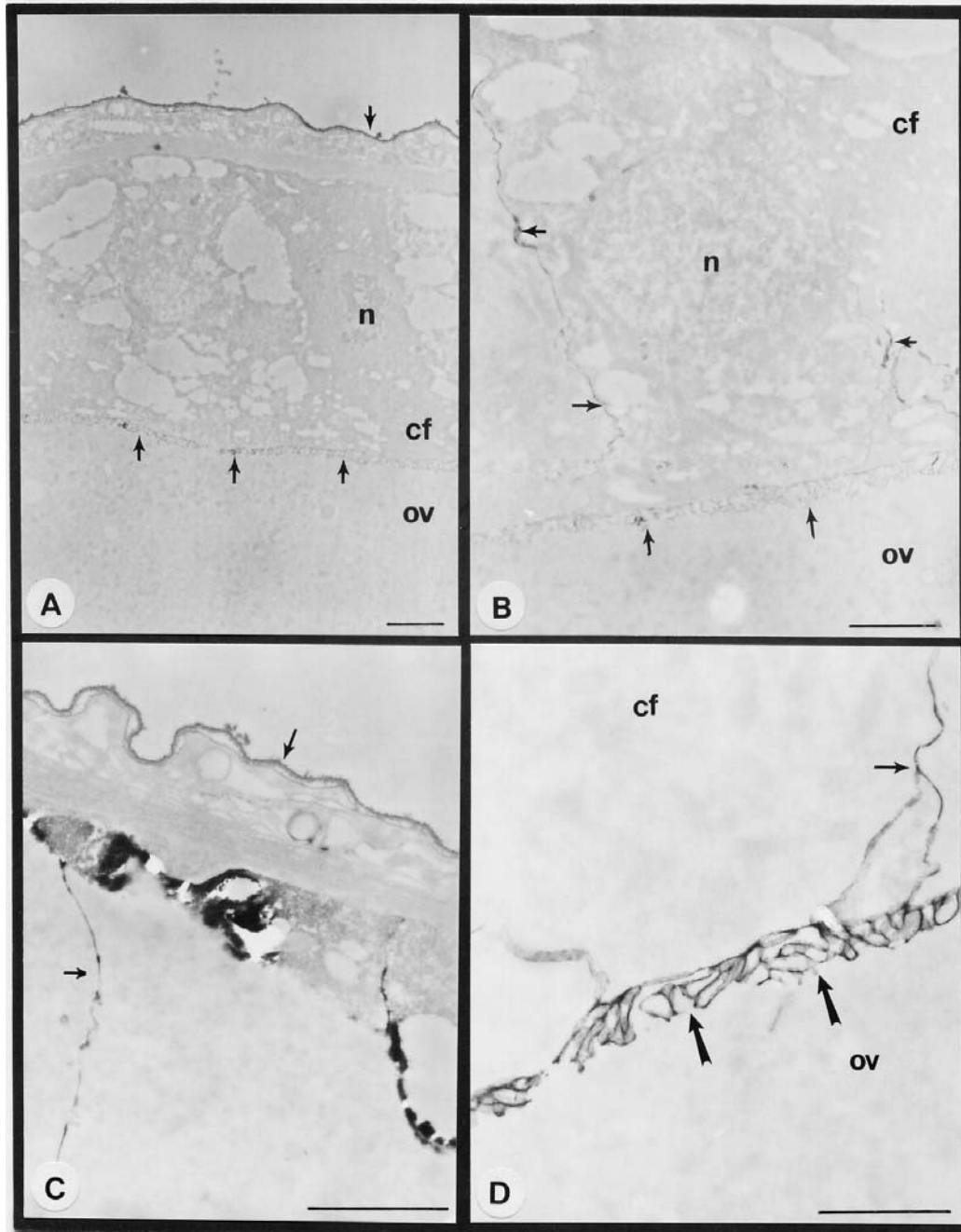


Figura 19 – Ovários de rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidos a técnica de impregnação pelo Nitrato de Lantano. **A)** Visão geral mostrando reação positiva (setas) nas invaginações das células foliculares (cf) em contato com o ovócito (ov) e na membrana peritoneal. **B)** Detalhe da marcação nos espaços intercelulares (setas). **C)** Na membrana peritoneal (seta) e acúmulo de material na região basal da célula folicular. **D)** Detalhe da região basal das células foliculares em contato com o ovócito, marcada nos espaços intercelulares (seta) e nas invaginações da membrana basal (setas maiores). Barra – 2,0 μ m.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DA VITELOGENINA EM EXTRATOS DO CORPO GORDUROSO E DE OVÁRIOS DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP. DURANTE A VITELOGÊNESE

INTRODUÇÃO

Entre as diversas funções atribuídas as células do corpo gorduroso (CG) dos insetos, está a de produzir o principal componente do vitelo, a vitelogenina (Vg) (ENGELMANN, 1971; TADBOWSKI & JONES, 1979), proteína que constitui cerca de 60 a 90% das proteínas solúveis do vitelo. Sua presença, até há algum tempo atrás, era quase que exclusivamente associada à condição de postura exercida pelas fêmeas dos insetos, de tal modo que era denominada “proteína específica da fêmea” (TELFER, 1954, 1960; HAGEDORN & KUNKEL, 1979). Contudo, mesmo na hemolinfa de machos de *Apis* essa proteína está presente (PAULINO-SIMÕES, 1984; TRENCZEK *et al.*, 1989) e em outros insetos sua síntese pelas células do CG de machos já foi também constatada (LAMY, 1984). No entanto, na maior parte dos insetos as fêmeas reprodutivas são as principais produtoras dessa proteína, o que a associa primariamente ao fenômeno reprodutivo (HARNISH & WHITE, 1982; TRENCZEK & ENGELS, 1986; WHEELER & KAWOoya, 1990).

A Vg chega aos ovócitos via hemolinfa, onde é liberada após a síntese no CG (ENGELS, 1973). A Vg é uma lipoglicoproteína (WYATT & PAN, 1978; HAGEDORN & KUNKEL, 1979), com peso molecular de 180 kDa, que funciona como precursora solúvel da vitelina (ENGELS *et al.*, 1990). A conversão de Vg para vitelina ocorre durante a sua tomada pelo ovócito (WYATT & DAVEY, 1996).

A Vg pode ser identificada tanto em rainhas como operárias de *A. mellifera* como uma única banda através da utilização de anticorpos, anti-ovo de *Apis* (SIMÕES, 1980). Outros métodos baseados em imunodeteção também foram utilizados (ENGELS, 1972; ENGELS & FAHREHORST, 1974; RUTZ & LÜSCHER, 1974).

Segundo ENGELS *et al.*, (1990), em *Apis mellifera*, a rainha é a casta que produz maior quantidade de Vg. Em *M. quadrifasciata*, apesar da espécie apresentar características sociais semelhantes às de *A. mellifera*, as operárias sempre desenvolvem os ovários em certa fase da vida,

que corresponde à atividade de aprovisionamento das células de cria, e botam ovos que podem originar zangões ou servir de alimento para a rainha, os ovos tróficos (SAKAGAMI *et al.*, 1963; BEIG & SAKAGAMI, 1964). Portanto espera-se que apesar de em menor quantidade, pelo menos na fase em que está aprovisionando células de cria (correspondente à fase nutridora de *Apis*) encontre-se a Vg, no seu CG ou hemolinfa.

Em *A. mellifera* a síntese da proteína é controlada pelos hormônios juvenil e ecdisteróides (ADAMS *et al.*, 1985; HAGEDORN, 1985). A organização social da espécie, em castas, pode representar, também, uma forma de regulação da síntese dessa proteína e de sua incorporação pelos ovócitos, já que em colônias com a rainha presente, os feromônios por ela produzidos inibem a vitelogênese nos ovários das operárias. No entanto a Vg, como já foi dito, está presente na hemolinfa destas e na dos machos.

Em espécies de abelhas nas quais a produção de ovos nos ovários das operárias ocorre mesmo na presença da rainha, como em *M. quadrifasciata*, alvo do presente estudo, a presença da proteína na hemolinfa, é esperada, levando em conta sua relação com a vitelogênese, e já foi demonstrada em muitos insetos.

Tendo em vista o que foi dito, o objetivo deste trabalho foi examinar comparativamente a maneira como se apresenta a Vg nos extratos de CG e de ovários de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas, através de: 1) Determinação da concentração de proteínas no CG e ovários e do perfil protéico para cada casta e condição fisiológica estudada através de eletroforese; e 2) Identificação da Vg utilizando um anticorpo inespecífico (anti-ovo de *Apis*) através das técnicas de Western Blotting;

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL:

Para a execução deste trabalho foram utilizados fragmentos do CG e ovários de 09 operárias nutridoras, 06 rainhas virgens e 04 fisogástricas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, de uma colônia mantida no biotério do Instituto de Biociências de Rio Claro (UNESP/RC).

MÉTODOS:

I. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA:

A determinação da concentração protéica no CG e ovários das diferentes amostras de operárias e rainhas foi feita através do método do Ácido Bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985). Em tubos de ensaio foi colocado 1,0 ml do reagente teste (CuSO₄.5H₂O e ácido bicinconínico, na

proporção 1:50), ao qual foram adicionados volumes com concentrações conhecidas de *albumina sérica bovina* para a obtenção de uma curva-padrão. Após leitura em espectrofotômetro a 562nm (amostras em duplicatas), procedeu-se à estimativa da concentração de proteínas nos homogeneizados de CG e ovários, pelo mesmo método e utilizando-se volumes conhecidos das amostras.

II. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE):

As proteínas presentes nos extratos do CG e ovários das operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas foram separadas utilizando-se géis de *Poliacrilamida-SDS* (7,5%) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). As amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 min, a 12°C, coletando-se os respectivos sobrenadantes para a utilização nas eletroforeses. Amostras com igual concentração protéica, estimada anteriormente pelo método do *Ácido Bicinonínico* foram colocadas nos poços dos géis de 100x90x0,9mm. A migração ocorreu a 4°C sob corrente de 15mA por aproximadamente 3 horas. Utilizaram-se marcadores de peso molecular (SDS 200, Sigma), diluídos 1:1 em tampão para amostra: *Miosina* (205 kDa); *β-galactosidase* (116 kDa); *Fosforilase b* (97 kDa); *Albumina bovina* (66 kDa); *Albumina de ovo* (45 kDa); *Anhidrase carbônica* (29 kDa). Após a separação os géis foram fixados utilizando-se uma mistura de *Etanol 50%* (45,4 ml) e *Ácido acético glacial* (4,6 ml), por 2 min, seqüencialmente corado com *Coomassie (Coomassie Blue Brilliant R-250 0,25%)* e lavadas em uma mistura de *Ácido acético glacial* (75 ml), *Etanol* (50 ml) e *água destilada* (875 ml).

III. IDENTIFICAÇÃO DA Vg POR WESTERN BLOT:

As proteínas separadas anteriormente por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) Immobilon-P 0,45µm (Millipore). Utilizou-se um método de transferência “em tanque” em tampão (20mM Tris; 192mM glicina e 20% metanol) por 2,5h e 30V, 63mA e 2 W. Após secar a membrana esta foi embebida por 15 minutos em TTBS (0,01M Tris/HCL; 0,9% NaCl; 0,1% TritonX-100; pH 7,6), depois incubada por 1h em solução bloqueadora (TTBS; soroalbumina bovina 5%; leite desnatado 5%) e lavada por 10 segundos em TTBS. Em seguida, foi incubada por 2,5h em soro anti-ovo de abelha (SIMÕES, 1980) diluído 1:5000, lavada

três vezes por 5 min em TTBS e incubada no segundo anticorpo (*swine Ig to rabbit Ig, Z196 DAKO A/S, 1:250*) por 1h. A membrana após ser lavada novamente por três vezes em TTBS por 5 min, foi incubada em PAP (*horsehadish peroxidase e rabbit anti-horseradish peroxidase, Z113, DAKO A/S, 1:250*) por 1h e lavada em TBS (0,01M Tris HCL; 0,9% NaCl. PH 7,5) antes de ser

revelada com uma solução de DAB (0,005g de DAB, 15 ml de TBS e 400 μ l de H₂O₂ 3%) preparada imediatamente antes de usar.

RESULTADOS

I. Determinação da concentração protéica nas células do CG e ovários de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas:

Tanto os extratos do CG como os de ovários de operárias nutridoras apresentam uma concentração protéica baixa, mas esta é menor nos ovários. Nas rainhas virgens a concentração protéica é maior no CG enquanto que nas fisogástricas o é nos ovários (Fig. 1).

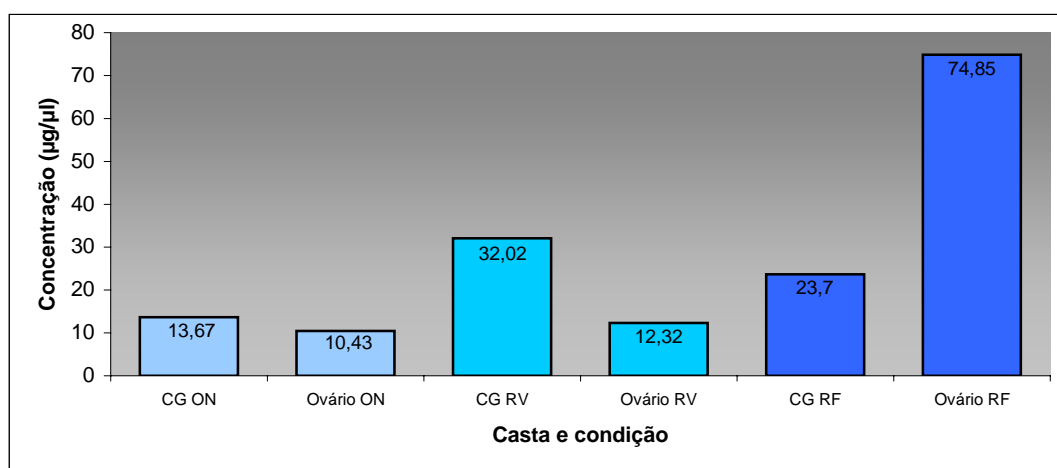


Fig. 1 – Concentração média ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de proteínas nos extratos do CG e de ovários de operárias nutridoras (ON), rainhas virgens (RV) e fisogástricas (RF) (“pools”) de *M. quadrifasciata anthidioides*, obtidas pelo método do Ácido Bicinconínico.

II. Perfil eletroforético do CG e ovário de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas:

O perfil eletroforético das amostras de CG e ovários mostrou-se muito semelhante. A banda indicada na figura 2 é correspondente a Vg (180 kDa), presente principalmente nas amostras 4 e 6, ou seja nos extratos dos ovários de rainhas virgens e fisogástricas respectivamente. A amostra 5, CG de rainhas fisogástricas, também apresentou esta banda, porém, sua intensidade é visivelmente menor. As outras amostras como pode ser percebido, não apresentaram essa banda (Fig. 2).

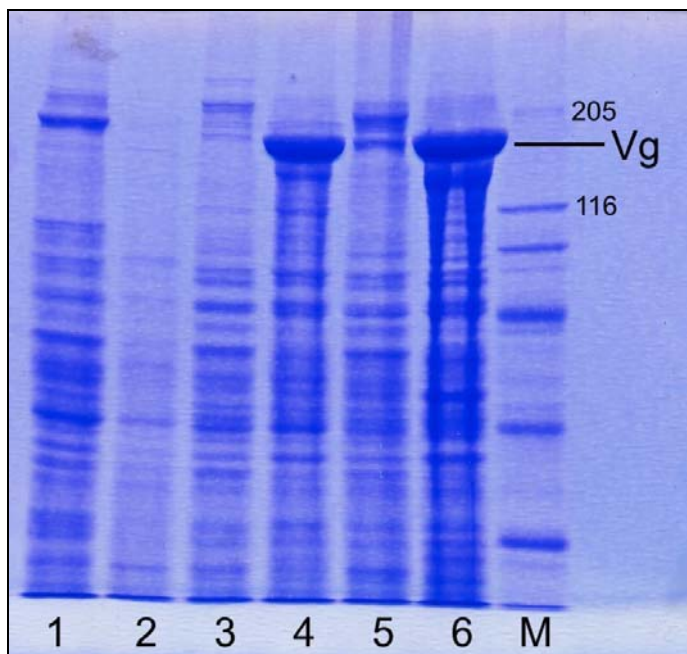


Fig. 2 – Perfil eletroforético protéico dos extratos do CG e de ovários de operárias nutridoras (1 e 2), rainhas virgens (3 e 4) e rainhas fisogástricas (5 e 6). M = marcador de peso molecular (em kDa) SDS-PAGE, 7,5%, corado com Coomassie Blue. Cada amostra contém 15 μ l de proteína. Vg indica a posição da vitelogenina (de 180kDa).

III. IDENTIFICAÇÃO DA Vg POR WESTERN BLOT:

A técnica de Western Blot com anti-ovo de *Apis mellifera* evidenciou a Vg nas amostras de extratos ovário de rainha virgem (4), CG de rainha fisogástrica (5) e ovário de rainha fisogástrica (6) (Fig. 3). Nenhuma marcação para proteína foi encontrada nas amostras de CG de operária nutridora (1), ovário de operária nutridora (2) e CG de rainha virgem (3). Apesar da marcação ter ocorrido esta apresentou-se muito fraca.

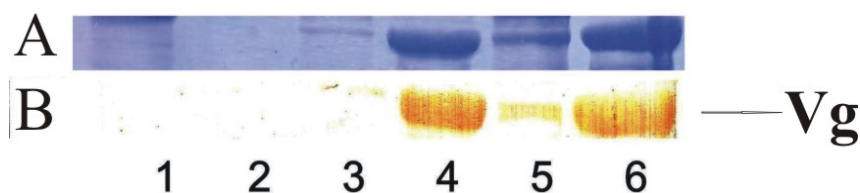


Fig. 3 – Western blot (B) (revelado com anticorpo anti-ovo de abelha 1:500 e DAB) após separação eletroforética (A) (SDS-PAGE, 7,5%) de amostras (1,5 μ g de proteínas) de extratos de CG e de ovários de operárias nutridoras (1 e 2), rainhas virgens (3 e 4) e rainhas fisogástricas (5 e 6). Vg indica a banda correspondente a Vg no Western blot (B) para cada amostra. (A) SDS-PAGE.

DISCUSSÃO

As operárias são capazes de produzir dois tipos de ovos em seus ovários, tróficos que são dados como alimento às rainhas e funcionais que podem originar machos. Em *Melipona bicolor* foi verificado que os ovos tróficos são produzidos antes e os funcionais mais tardiamente quando a operária já está abandonando a função de nutridora (VELTHUIS, *et al.*, 2003). Por outro lado CRUZ-LANDIM & CRUZ-HOFLING (1971) estudando os ovos tróficos de *Scaptotrigona postica* chegaram à conclusão que estes são postos ainda imaturos. Apresentam os glóbulos de vitelo pouco eletrondensos e reagem fracamente a ninhidrina-Schiff, uma reação para proteínas, e o glicogênio apresenta-se disperso.

Como hipótese, esperava-se que nos extratos de ovários das operárias nutridoras fosse encontrada a principal proteína relacionada com a reprodução, a Vg, uma vez que os ovários desses indivíduos encontram-se em seu máximo desenvolvimento nesta fase (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003). No entanto, tanto o momento da produção dos ovos como a sua imaturidade podem explicar a fraca reação ou a “ausência” da Vg nos extratos dos ovários das operárias nutridoras, os quais conforme sugerido pela citoquímica (*ver Cap. I*) parecem acumular mais lipídios que os ovócitos das rainhas. Além disso, outras explicações podem ser encontradas. Segundo FLURI *et al.* (1982) e ENGELS *et al.* (1990), na hemolinfa de operárias de *A. mellifera* recém-emergidas, quantidades muito pequenas, às vezes não detectáveis por métodos usuais, de Vg são encontradas, porém, com o desenvolvimento, a tendência é a de haver um aumento nessa quantidade que segundo BITONDI & SIMÕES (1996), está relacionada com a dieta de pólen (protéica) ingerida durante a primeira semana de vida adulta da operária.

Neste trabalho, a fração Vg pôde ser detectada nas amostras de extratos de ovários de rainhas virgens e fisogástricas e um pequeno rastro foi detectado nas amostras de extratos do CG de rainhas fisogástricas. A marcação muito fraca pela reação com o anticorpo anti-ovo de *A. mellifera* pode dever-se à inespecificidade deste. Apesar da seqüência gênica entre as duas espécies ser muito semelhante (SILVA & SIMÕES, 2005), algum fator, ainda desconhecido como a seqüência de aminoácidos ou a estrutura tridimensional da proteína pode estar impedindo uma reação mais expressiva. Além disso, muitos trabalhos sobre ovogênese em insetos tratam a Vg como uma precursora das proteínas presentes no vitelo (ENGELMANN, 1979; GONG & CHAI, 1979; HAGEDORN & KUNKEL, 1979), dentre as quais está a vitelina. A vitelina é considerada a principal proteína nutritiva do vitelo, encontrada no ovócito enquanto que a sua proteína precursora, a Vg é

encontrada na hemolinfa (KUNKEL & NORDIN, 1985). Porém, a diferença entre elas é bastante sutil para a maioria dos insetos e não justifica a fraca reação, pois, vitelina e Vg apresentam alta identidade quanto ao peso molecular, composição de aminoácidos e reatividade imunológica. Contudo, em algumas espécies, clivagens proteolíticas endógenas mudam o padrão de peptídeos da vitelina quando comparada com a Vg, o que pode ocorrer de maneira diferente de *A. mellifera* na espécie estudada, resultando na fraca reação verificada. Diferenças em relação às modificações nas regiões carboidráticas e lipídicas da Vg podem existir, mas também são sutis e dizem respeito principalmente à porcentagem de lipídios presentes e as quantidades de diglicerídeos, colesterol, fosfolipídios e hidrocarbonetos constituintes. Essas evidências, porém, foram observadas em Ortoptera – *Locusta migratoria* (CHINO *et al.*, 1977) e Lepidoptera – *Philosamia cynthia* (CHINZEI *et al.*, 1981).

Visto a seqüência gênica da Vg de *M. quadrifasciata*, apresentar cerca de 99% de homologia em relação à de outros himenópteros, entre eles *A. mellifera* (SILVA & SIMÕES, 2005), a marcação fraca verificada, não parece estar associada à utilização do anticorpo anti-ovo de *Apis* ao invés de anti-Vg, mas sim em função das razões citadas acima ou da menor quantidade dessa proteína nos ovócitos presentes nos ovários utilizados, obtidos de operárias provisionando as células de cria, as quais poderiam conter apenas ovócitos imaturos.

Tomando esses argumentos como corretos, verifica-se uma diferença entre operárias e rainhas quanto à captação de Vg pelo ovário. A Vg já aparece nos ovários de rainhas desde a sua fase jovem (virgem) que representa a fase recém-emergida, quando ainda não estaria, portanto, ocorrendo vitelogênese, mas os dados morfo-citoquímicos apresentados no capítulo I, mostram ovócitos em início de vitelogênese o que justificaria a sua presença. Em rainhas de *A. mellifera* HARTFELDER & ENGELS (1998) relataram o aparecimento da Vg na hemolinfa logo após a sua emergência. Este fato parece sugerir que o CG não seja local exclusivo da síntese da Vg já que naquela espécie a vitelogênese só se inicia após o acasalamento (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2002) e que esta possa também ocorrer em células somáticas do ovário no caso das rainhas (FLEIG, 1995; GUIDUGLI, 2004). No entanto, na espécie objeto de estudo a presença da proteína pode dever-se ao vitelo. Neste sentido os presentes dados não confirmam a síntese de vitelogenina no ovário.

Em *A. mellifera*, a Vg pôde ser detectada na hemolinfa de rainhas recém-emergidas e fisogástricas (ENGELS & FAHRINHORST, 1974), indicando que, quando essa casta emerge, a expressão do gene para Vg começa a estar ativo, embora alguns autores contestem esse argumento (LENSKY & SKOLINIK, 1980). KAAZ (1990), observou o aparecimento da Vg durante o

desenvolvimento da rainha de *A. mellifera* aproximadamente dez horas antes da sua emergência, o que corrobora o dado sobre a presença da Vg nesta casta recém-emergida (virgem).

Já em operárias e machos, a Vg aparece em quantidade significativa ao redor do terceiro dia de idade adulta (ENGELS *et al.*, 1990). Segundo BARCHUCK (2000) o início da expressão da Vg na hemolinfa além de ser mais precoce é maior em rainhas que operárias e acontece na fase larval. A Vg pode, portanto, ser uma proteína de armazenamento da hemolinfa que apenas é concentrada e utilizada como material de reserva no ovo. A favor desta interpretação está sua presença nos imaturos, fora da fase reprodutiva e nos machos e o fato de sua quantidade aumentar com a alimentação protéica (BITONDI & SIMÕES, 1996).

PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM (2000; 2003), analisaram as células do CG de rainhas virgens e fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* comparativamente quanto ao seu tamanho (área), morfologia, ultraestrutura e histoquímica. Os resultados mostraram que as células do CG de rainhas virgens se assemelham muito as de operárias recém-emergidas e difere das células de rainhas fisogástricas, porque estas apresentam o aparato de síntese protéica muito desenvolvido, porém, completa ausência de depósitos que indiquem o acúmulo de substâncias sintetizadas no citoplasma. Logo essas células produzem proteínas, mas não as armazenam, e sim as eliminam rapidamente para a hemolinfa, o que vem a ser confirmado pelos dados obtidos a partir da eletroforese e da imunodeteção que mostram a banda para Vg ausente ou muito fraca nesse tecido. O rastro, ainda que tênue obtido para o CG de rainhas fisogástricas, provavelmente deve-se a grande quantidade de Vg produzida nestas células, e apesar de não ocorrer a sua estocagem, a alta taxa de sua produção a evidencia na reação.

Segundo alguns autores, em operárias de *A. mellifera*, ocorre um acúmulo de Vg na hemolinfa durante um curto período após a emergência, a qual não é incorporada ao ovócito, uma vez que seus ovários não se desenvolverão, portanto há uma regulação da tomada da Vg pelos ovários a partir da hemolinfa, o que de certa maneira foi verificado para a espécie em estudo morfológicamente. O acesso ao espaço periovocítico bloqueado nas operárias e nas rainhas virgens constituiria o mecanismo de controle (Cap. I). Segundo PLETTNER *et al.*, (1993), o período no qual a Vg fica na hemolinfa sem ser incorporada ao ovócito é variável nas diferentes raças de *A. mellifera* e é chamado de período latente.

A Vg não pode mais ser considerada uma proteína específica das fêmeas e não está relacionada somente com a função reprodutiva. Trabalhos recentes demonstram sua função no transporte de açúcares, lipídios, fosfatases, vitaminas, zinco e hormônios. Também a relacionam com o sistema imune e com a longevidade (AMDAM & OMHOLT, 2002; AMDAM *et al.*, 2003;

AMDAM *et al.*, 2004). Por outro lado, mostram que ela, ou proteína muito semelhante é produzida em outros locais como, por exemplo, nas glândulas hipofaríngeas das operárias (AMDAM *et al.*, 2003) e serve como matéria prima para o alimento de cria. Portanto, o que regula a

vitelogenese não é a produção de Vg, mas a sua absorção pelo ovário, a qual é controlada por hormônios. Neste sentido a relação entre Vg e desenvolvimento ovariano passa a ter outro sentido.

O sistema de regulação da tomada de Vg pelo ovócito pode ser diferente para esta espécie entre as castas, isto é ser casta-específica, assim como sugerido por GUIDUGLI (2004), pela regulação da taxa de captação hormonalmente controlada (RAIKHEL & LEA, 1991; RAIKHEL & DADHIALLA, 1992). Como a taxa de ovogênese é muito menor nas operárias nutridoras em comparação às rainhas (as operárias botam poucos ovos durante toda a sua vida enquanto a taxa em rainha é muito maior) a Vg pode ser encontrada na hemolinfa (BITONDI & SIMÕES, 1996), mas não nos ovários e no CG, quer dizer, a sua incorporação é controlada nesse nível, em função do acesso ao espaço periovocítico e da presença ou ausência de receptores para a Vg nas membranas do ovócito (OLIVEIRA *et al.*, 1986; KANG *et al.*, 1995) e/ou pela formação ou não dos espaços intercelulares entre as células foliculares dos ovários, fenômeno conhecido como patência (Davey, 1981). Portanto, quanto a este aspecto, dentro do propósito deste trabalho pode dizer-se que a Vg tendo como principal fonte o CG, aparece na hemolinfa de acordo com a capacidade sintética deste órgão, visto não ser por ele armazenada e que sua incorporação aos ovócitos, ai sim, depende do status reprodutivo do indivíduo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, T. S., HAGEDORN, H. H. & WHEELOCK, G. D. Haemolymph ecdysteroid in the housefly, *Musca domestica*, during oogenesis and its relationship with vitellogenin levels. **Journal of Insect Physiology** 31:91-97, 1985.

AMDAM, G. V. & OMHOLT, S. W. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. **Journal of Theoretical Biology** 216:209-228, 2002.

AMDAM, G. V., NORBERG, K., HAGEN, A. & OMHOLT, S. W. Social exploitation of vitellogenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100(4):1799-1802, 2003.

AMDAM, G. V., SIMÕES, Z. L., HAGEN, A., NORBERG, K., SCHRODER, K., MIKKELSEN, O., KIRKWOOD, T. B. & OMHOLT, S. W., hormonal control of the yolk precursor vitellogenin

regulates immune function and longevity in honeybees. **Experimental Gerontology** **39**:767-773, 2004.

BARCHUK, A. R. **Controle hormonal do início da expressão de vitelogenina em castas femininas de *Apis mellifera***. 2000. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2000.

BEIG, D.; SAKAGAMI, S. F. Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the ovoposition process II. *Melipona seminigra merrillae* Cockerell. **Annotationes Zoologicae Japonenses** **37**(2):112-119, 1964.

BITONDI, M. M. G. & SIMÕES Z. L. P. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. **Journal of Apicultural Research** **35**(1):27-36, 1996.

CHINO, H., DOWNER, R. G. H. & TAKAHASHI, K. The role of diacylglycerol-carryng lipoprotein-I in lipid transport during insect vitellogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** **487**:508-516, 1977.

CHINZEI, Y., CHINO, H. & WYATT, G. R. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry** **11**:1-7, 1981.

CRUZ-LANDIM, C. & CRUZ-HOFLING, J. F. The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apoidea). V. Development of the nervous system. **Papéis Avulsos de Zoologia** **26**:137-147, 1971.

DAVEY, K. G. Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rodnius prolixus*. **American Zoologist** **21**:701-705, 1981.

ENGELMANN, F. Juvenile hormone - controlled synthesis of female - specific protein in the cockroach *Leucophaea maderae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **145**:439-447, 1971.

ENGELMANN, F. Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis, **Advances on Insect Physiology** **14**:49-108, 1979.

ENGELS, W. Quantitative untersuchungen zum dotterprotein-haushalt der Honigbiene (*Apis mellifera*). **Willhelm Roux' Archives of Developmental Biology** **171**:55-86, 1972.

ENGELS, W. Das zeitliche und räumliche muster der Dottereinlagerung in die oocyte von *Apis mellifera*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** **142**:409-430, 1973.

ENGELS, W. & FAHRENHORST, H. Alters- und kasten-spezifische veränderungen der Haemolymph-protein-spektren bei *Apis mellifica*. **Willhelm Roux' Archives of Developmental Biology** **174**:285-296, 1974.

ENGELS, W., KAAZT, H., ZILLIKENS, A., PAULINO-SIMÕES, Z. L., TRUBE, A., BRAUN, R. & DITTRICH, F. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. *In*: HOSHI M. & YAMASHITA, O. **Advances in Invertebrate reproduction** **5**, p.495-502. Elsevier, Amsterdam, 1990.

FLEIG, R. Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology** **24**:427-433, 1995.

FLURI, P., LÜSHER, M., WILLE, H. & GERIG, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titers of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. **Journal of Insect Physiology** **28**:61-68, 1982.

GONG, H. & CHAI, C. H. Insect vitellogenin and vitellogenesis. **Acta Entomologica Sinica** **22**:219-236, 1979.

GUIDUGLI, K. R. Functional versatility of *Apis mellifera* vitellogenin: a multipurpose protein in the honey bee life cycle. **Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro Sobre Abelhas**, p.162-165, 2004.

HAGEDORN, H. H. & KUNKEL, J. G. Vitellogenin and vitelin insects. *In*: MITTLER, T. E., RADOVSKY F. J. & RESH V. G. **Annual Review of Entomology** **24**:475-505, 1979.

HAGEDORN, H. H. The role of ecdysteroids in reproduction. *In*: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 8:205-262, 1985.

HARNISH, D. G., WYATT, G. R. & WHITE, B. N. Insect vitellins – identification of primary products of translation. **Journal of Experimental Zoology** 220:11-19, 1982.

HARTFELDER, K. & ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics in Developmental Biology** 40:45-77, 1998.

KAATZ, H. Juvenilhormon-unabhängige initiation und regulation der vitellogenin-synthese bei der bienenkonigin (*Apis mellifera* L.). **Verhandlungen Der Deutschen Zoologischen Gesellschaft** 81:272-273, 1990.

KANG, Y., KULAKOSKY, P. C., VAN-ANTWERPEN R. & LAW, J. H. Sequestration of insecticyanin, a blue hemolymph protein, into egg of the hawlmoth *Manduca sexta* evidence for receptor mediated endocytosis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 25(4):503-510, 1995.

KUNKEL, J. G. & NORDIN, J. H. Yolk proteins. *In*: GILBERT, L. I. & KERKUT, G. A. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**. 1 ed. New York: Pergamon Press. Oxford 1:83-111, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685, 1970.

LAMY, M. Vitellogenesis, vitellogenin and vitellin in the males of insects: a review. **Journal of Invertebrate Reproduction and Development** 7:311-321, 1984.

LENSKY, Y. & SKOLNIK, H. Immunochemical and electrophoretic identification of the vitellogenin proteins of the queen bee (*Apis mellifera*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 66(B):185-193, 1980.

OLIVEIRA, P. L., GONDIM, K. C., GUEDES, D. & MASUDA, H. Uptake of yolk protein in *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology** **32**:859-866, 1986.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. **Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** 2002. 164f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2002.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Sociobiology** **41**(3):701-709, 2003.

PATRÍCIO, K. & CRUZ-LANDIM, C. Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology** **62**(4A):641-649, 2002.

PAULINO-SIMÕES, Z. L. Haploid and diploid honey bee drones are JH sensitive: female specific proteins in fat body and hemolymph. In: ENGELS W. *et al.*, **Advances in Invertebrates Reproduction** **3**. Elsevier, Amsterdam, 1984.

PLETTNER, E., SLESSOR, K. N., WINSTON, M. L., ROBINSON, G. E. & PAGE, R. E. Mandibular gland components and ovarian development as measures of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology** **39**(3):235-240, 1993.

RAIKHEL A. S. & LEA, A. O. Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. **Tissue & Cell** **23**(4):577-591, 1991.

RAIKHEL, A. S. & DADHIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in the insect oocytes. **Annual Review of Entomology** **37**:217-251, 1992.

RUTZ, W. & LÜSCHER, M. The occurrence of vitellogenin in workers and queens of *Apis mellifera* and the possibility of its transmission to the queen. **Journal of Insect Physiology** **20**:897-909, 1974.

SAKAGAMI, S. F.; BEIG, D.; ZUCCHI, R.; AKAHIRA, Y. Occurrence of Ovary-developed Workers in Queenright Colonies of Stingless Bees. **Revista Brasileira de Biologia** **23**(2):115-129, 1963.

SILVA, F. A. & SIMÕES, Z. L. P. Partial vitellogenin cDNA sequence in *Melipona quadrifasciata*. *In: Proceedings of the 8th International Conference on Tropical Bees and VI Encontro Sobre Abelhas*, p.423, 2005.

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, M. D., PROVENZANO, E. K., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON B. J. & KLENK, D. C. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. **Annals of Biochemistry** **150**:76-85, 1985.

SIMÕES, Z. L. P. **Estudo da vitelogenina e da vitelina em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apoidea)**. Tese de doutoramento, Universidade de São Paulo. 1980.

TADBOWSKI, J. M.; JONES, J. C. Changes in fat body and oocytes during starvation and vitellogenesis in mosquito, *Aedes aegypty* (L). **Journal of Morphology** **179**:185-264, 1979.

TELFER, W. H. Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. **Journal of General Physiology** **37**:539-558, 1954.

TELFER, W. H. The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. **Biology Bulletin** **118**:338-351, 1960.

TRENCZEK, T. & ENGELS, W. Occurrence of vitellogenin in drone honeybees. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development** **10**:307-311, 1986.

TRENCZEK, T., ZILLIKENS, A. & ENGELS, W. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titter and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** **35**(6): 475-481, 1989.

VELTHUIS, H. W., PEREBOOM Z., KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Cooperation and competition in a colony of the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*, illustrated by two kinds of worker eggs and the behaviours of workers laying them. **Proceedings of Experimental & Applied Entomology 14**: 49-52, 2003.

WHEELER, D. E. & KAWOOYA, J. K. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. **Archives on Insect Biochemistry and Physiology 14**:253-267, 1990.

WYATT, G. R. & PAN, M. L. Insect plasma proteins. **Annual Review of Biochemistry 47**:779-817, 1978.

WYATT, G. R. & DAVEY, K. G. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. **Advances on Insect Physiology 26**:1-155, 1996.

CAPÍTULO III

EFEITO DA ADIÇÃO DE HJ-III E 20-HE AO MEIO DE CULTURA, SOBRE OS TROFÓCITOS DO CORPO GORDUROSO DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE *Melipona quadrifasciata anthidioides*: UMA ABORDAGEM CITOQUÍMICA

INTRODUÇÃO

Há tempo que os principais hormônios dos insetos vêm sendo alvo de estudos que abrangem tanto o entendimento de sua ação sobre as células somáticas quanto germinativas dos órgãos reprodutivos. Do vasto conhecimento acumulado até o momento, além de algumas funções básicas, estes parecem exibir funções específicas dependendo de uma série de variáveis tais como: espécie, sexo, idade, casta (nos insetos eussociais) e fase do desenvolvimento.

Segundo KOEPPE *et al.* 1985, o hormônio juvenil (HJ) pode tanto atrasar como acelerar a espermatogênese, dependendo do grupo de inseto, enquanto que os ecdisteróides parecem aumentar o índice mitótico das espermatogônias (DUMSER & DAVEY, 1975; DUMSER, 1980), e atuar nos processos de amadurecimento dos espermátócitos (KAMBYSELLIS & WILLIAMS, 1972; FUKUSHIMA & YAGI, 1975), mas não necessariamente em todas as espécies (GIEBULTOWICZ *et al.*, 1987). Quanto a reprodução na fêmea, é conhecido o efeito desses hormônios sobre o amadurecimento dos ovócitos, ou seja, sobre a vitelogênese (HAGEDORN, 1985; HARTFELDER & ENGELS, 1998; HARTFELDER, 2000; BLOCH *et al.*, 2000a; b; BARCHUK *et al.* 2002; HARTFELDER *et al.*, 2002)

Um grande número de trabalhos tem também, procurado entender a ação desses hormônios sobre células somáticas. Entre elas, estão as células que compõem o corpo gorduroso (CG), principalmente os trofócitos, células relacionadas ao metabolismo intermediário, com importantes funções tanto no inseto imaturo quanto adulto. Por apresentar funções diversificadas e por estarem sempre em contato com a hemolinfa, essas células se tornam evidentes alvos hormonais, assim como também as células somáticas que formam as gônadas.

Importante função do HJ e da ecdisona é a determinação das castas, durante o desenvolvimento pós-embrionário, nos insetos eussociais. Em *Apis mellifera*, há indicações de que a alimentação diferencial oferecida às larvas de operárias e rainhas desencadeie respostas específicas do sistema endócrino, que por sua vez levarão a liberação de diferentes quantidades de hormônios (RACHINSKY & HARTFELDER, 1990). Em *Scaptotrigona postica*, em que a determinação das castas também é trófica, os mecanismos são semelhantes (RACHINSKY *et al.*, 1990; HARTFELDER & REMBOLD, 1991). Em *Melipona*, apesar da determinação das castas ser genética,

existem evidências de que o HJ exerça um papel importante, agindo epigeneticamente no controle da diferenciação das castas visto ser possível induzir o aparecimento, a partir da aplicação tópica de HJ em larvas de operárias, de indivíduos com características morfológicas de rainhas (KERR, 1974; CAMPOS *et al.*, 1975; CAMPOS, 1979). O aparecimento dessas características pode dever-se a expressão, nas operárias, de genes que normalmente só se expressam nas rainhas.

Nos adultos, tanto o HJ quanto o 20-HE controlam diversos aspectos da ovogênese e, portanto, são considerados como tendo importante papel reprodutivo (WYATT & DAVEY, 1996), mais precisamente relacionado com a síntese de algumas proteínas, entre elas as vitelogeninas (Vgs) (ENGELMAN, 1979; WYATT & DAVEY, 1996; DHADIALLA *et al.*, 1987; LOCKE *et al.*, 1987), agindo como seus promotores durante a transcrição. Neste caso, os ecdisteróides parecem atuar como reguladores da ação gênica (BOWNES, 1986; BOWNES *et al.*, 1996).

A indução da transcrição dos genes para as Vgs no CG pelo HJ tem sido demonstrada em vários insetos, como *Rhodnius prolixus*, *Pissodes strobi* e *Athalia infumata* (CHINZEI *et al.*, 1994, HATAKEYAMA *et al.*, 1995; LEAL, *et al.*, 1997). Outra função importante atribuída ao hormônio é controlar a entrada dessas proteínas no folículo ovariano através de receptores de membrana para o HJ, causando um alargamento nos espaços intercelulares do epitélio folicular, conhecido como patência, por onde as proteínas chegam ao ovócito (DAVEY, 1981).

A 20-HE tem sido relacionada com a produção da protease cisteínica ácida em *Bombix mori* (BCP), uma enzima responsável pela degradação do vitelo acumulado no ovócito (TAKAHASCHI *et al.*, 1993, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2000). Nesse mesmo inseto tem sido demonstrado que o aumento nos níveis de ecdisteróides (20-HE) é que tem papel fundamental para iniciar o processo de vitelogênese, sendo que o HJ parece não ter papel algum durante esse processo (IZUMI *et al.*, 1984) e que a queda dos níveis está associada ao início da coriogênese (formação do córion ou casca do ovo), levando a “obstrução” dos espaços intercelulares do epitélio folicular e conseqüentemente interrupção da captação do vitelo pelo folículo onde o ovócito se desenvolve (KAFATOS, 1987; TSUCHIDA *et al.*, 1987; SWEVERS & IATROU, 2003).

O estudo do efeito de cada um desses hormônios em separado, nos insetos “*in vivo*” é, portanto, complicado pelas interações entre eles. Estudos “*in vitro*” são por isso muitas vezes desejáveis.

EPPLER *et al.* (1980) e SOHI & ENNIS (1981) foram os primeiros a relatarem o estabelecimento de linhagens de células de Hymenoptera obtidas a partir de cultura “*in vitro*”. Desde então vem crescendo este tipo de abordagem em estudos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos em diversas espécies (HINK & BUTZ, 1985). A ação do HJ e 20-HE já foi experimentada *in vitro* sobre as células do CG larval de várias espécies de insetos (SASS & KOVACS,

1977; THOMASON & MITCHELL, 1972; TYSSSEL & BUTTERWORTH, 1978), inclusive de *Apis mellifera* (BARBOSA-HETEN *et al.*, 1998). Em adultos estes estudos são menos freqüentes.

Foi demonstrado que ambos hormônios, “*in vitro*”, agem na regulação da taxa de captação de proteínas do vitelo pelos folículos ovarianos (RAIKHEL & LEA, 1991; RAIKHEL & DADHIALLA, 1992). A ação *in vitro* da 20-HE sobre o desenvolvimento ovariano também tem sido experimentada em *Bombix mori*, tendo ela papel na indução de genes para receptores nucleares do hormônio (HENRICH & BROWN, 1995; SWEVERS, *et al.*, 1995).

Tendo em vista o que ficou posto, o objetivo deste trabalho foi o de analisar comparativamente o efeito “*in vitro*” do HJ-III e 20-HE sobre os trofócitos do CG em operárias nutridoras e rainhas virgens de *Melipona quadrifasciata anthidioides* utilizando uma abordagem citoquímica ultraestrutural no tecido incubado, na qual três testes foram utilizados como parâmetro para a análise da presença e morfologia dos depósitos lipídicos e protéicos e de fosfatase ácida que indicassem atividade dessa enzima.

MATERIAL E MÉTODOS:

MATERIAL:

Foram utilizados fragmentos do CG de operárias nutridoras e de rainhas virgens de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, coletadas de uma única colônia localizada no apiário experimental do *campus* USP em Ribeirão Preto.

MÉTODOS:

I – INCUBAÇÃO DO CORPO GORDUROSO COM HJ-III E 20-HE:

I.I – PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA:

Para a preparação do meio de cultura segundo RACHINSKY *et al.* (1990), foram adicionadas as seguintes quantidades de aminoácidos, açúcares, PIPES, sais inorgânicos e vitaminas (meio completo):

Aminoácidos: 70 mg de *L-Alanina*; 100mg de *L-Argenina*; 30mg de *L-Asparagina*; 5mg de *Ácido aspártico*; 140mg de *L-Ácido glutâmico*; 20mg de *L-Glutamina*; 35mg de *L-Glicina*; 20mg de *L-Histidina*; 10mg de *L-Isoleucina*; 30mg de *L-Lisina*; 20mg de *L-Fenilalanina*; 690mg de *L-Prolina*; 20mg de *DL-Serina*; 40mg de *L-Treonina*; 5mg de *L-Triptofano*; 20mg de *L-Valina*; 5mg de *Metionina* e 20mg de *Leucina* foram dissolvidos em 15ml de *H₂O destilada*. 5mg de *L-Cistina* foram separadamente dissolvidos em 1ml de *HCl 1N* e depois de diluída, a solução foi neutralizada com a adição de 1ml de *NaOH 1N*. O mesmo procedimento foi utilizado para diluir 5mg de *L-Tirosina*.

Açúcares e PIPES: 100mg de Frutose; 150mg de Glicose; 3080mg de Sacarose e 1513 mg de Trealose. 302mg de PIPES foram pesados separadamente em um Becker. Os açúcares foram dissolvidos em 40ml de H_2O destilada, com agitação. Posteriormente foi acrescentado o PIPES. À solução obtida foi titulado $NaOH$ 1N até que o PIPES estivesse dissolvido ($pH \approx 5,8 - 6,1$).

Sais inorgânicos: Foram dissolvidos 41mg de $NaCl$; 147mg de $MgSO_4$; 149mg de KCl ; 42mg de $NaHCO_3$ em 15ml de H_2O destilada. Separadamente 82mg de $MgCl_2$ foram dissolvidos com um pouco da própria solução de sais obtida anteriormente e depois misturada a esta. 81mg de $CaCl_2$ foi dissolvido em 10ml de H_2O destilada.

Vitaminas: 0,5mg de *D*-Biotina; 10mg de *Ca*-Pan; 2mg de Cianocobalina; 0,5mg de Ácido fólico; 5mg de Inositol; 2,5mg de Nicotinamida; 2,5mg de Peridoxina; 5mg de Riboflavina e 20mg de Tiamina foram dissolvidos em 10ml de H_2O destilada.

A solução final foi obtida pela mistura das soluções na seguinte ordem: **Aminoácidos gerais** + **sais inorgânicos** + $CaCl_2$ + **açúcares** + **Cistina** + **Tirosina** + **vitaminas** (com agitação até que ficasse homogeneizado). Posteriormente a solução obtida foi completada para 100ml com H_2O destilada, o pH foi checado, devendo estar em torno de aproximadamente 6,0 e 100 μ l de antibiótico foi adicionado.

Depois de pronto, o meio de cultura foi filtrado utilizando-se um filtro contendo uma membrana a vácuo com poros de 0,2 μ m em frascos de 100ml estéreis, em alíquotas e congelados até o momento da incubação.

I.II – OBTENÇÃO DE OPERÁRIAS NUTRIDORAS E RAINHAS VIRGENS:

Para a obtenção das operárias nutridoras, foi preparada uma colônia de observação (com tampa de vidro). As características morfológicas fenotípicas e comportamentais (cuidado com a cria) foram observadas no momento da coleta. A observação do grau de desenvolvimento ovariano foi utilizado durante a dissecação para confirmar o estágio de desenvolvimento das operárias. Para se obter rainhas virgens, favos de cria foram colocados em Placas de Petri grandes, os alvéolos desoperculados e mantidos em estufa a 35 °C até o momento do nascimento. Características morfológicas fenotípicas foram utilizadas para distingui-las.

I.III – INCUBAÇÃO DO CORPO GORDUROSO:

1ml do meio de cultura foi colocado em cada unidade da placa de cultura (24 well cell culture cluster – Tissue Culture Treated, Polystyrene, Sterile – Costar[®]), as quais foram numeradas de **1** a **9**. Na unidade **1** adicionou-se 1 μ l de *HJ-III* (Sigma) diluído em acetona (1 μ g/ μ l), na **2**, 1 μ l de acetona (**controle**), na **3**, 5 μ l de *HJ-III* (Sigma) diluído em acetona (5 μ g/ μ l), na **4**, 5 μ l de acetona

(controle), na **5**, 1µl de 20-HE (Sigma) diluído em álcool etílico (1µg/µl), na **6**, 1µl de álcool etílico (controle), na **7**, 5µl de 20-HE (Sigma) diluído em álcool etílico (5µg/µl), na **8**, 5µl de álcool etílico (controle) e na **9** nada foi adicionado (controle não tratado).

Depois de coletadas as abelhas foram dissecadas em solução fisiológica estéril (5g de NaCl; 0,42g de KCl e 0,25g de CaCl₂.2H₂O) em câmara asséptica. Os tergitos e esternitos foram separados cuidadosamente para que o intestino não fosse perfurado e então submetidos à incubação *in vitro*, por 6 horas sob agitação (100rpm/min) à 35°C.

I.IV – PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MET:

Decorrido o tempo de incubação, os tecidos foram removidos do meio de cultura, fixados e processados rotineiramente para MET. As seguintes técnicas citoquímicas ultra-estruturais foram empregadas:

ÓSMIO IMIDAZOL (ANGERMÜLLER & FAHINI, 1982). Teste citoquímico para detecção de lipídios sob a forma de inclusões citoplasmáticas. A finalidade do tratamento foi a de verificar em detalhe a extensão dos depósitos lipídicos nas células do CG das rainhas virgens e possíveis alterações decorrentes dos tratamentos com os hormônios. O material previamente incubado foi fixado em *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M*, (pH 7,4), por uma hora. Em seguida foi lavado duas vezes no mesmo Tampão e pós-fixado em *Tetróxido de Ósmio a 2%* em *Tampão Imidazol 0,1M*, (pH 7,4), à temperatura ambiente, por trinta minutos. Posteriormente foi lavado em *Tampão Imidazol* e em *PBS*, desidratado em uma bateria de concentrações crescentes (70-100%) de *Acetona*, infiltrado e incluído em resina *Epon-araldite*. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo, os cortes recolhidos em telinhas de cobre, observados e fotografados ao MET (Philips) sem prévia contrastação. Posteriormente as telinhas foram contrastadas e observadas novamente (controle).

PRATA AMONICAL (MACRAE & MELTZ, 1970). Teste citoquímico para detecção de proteínas básicas. Essa técnica foi inicialmente introduzida para microscopia óptica e dela adaptada para a MET para a localização de histonas e, na verdade, revela proteínas ricas em arginina e lisina (BENCHIMOL, 1998). O material foi fixado em *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M* por 2 horas, lavado no mesmo tampão e em água destilada, incubado em solução de *Prata amoniacal*, por 5 minutos. Posteriormente foi lavado em água destilada durante 20 minutos e incubado em solução de *Formalina a 3%* por 5 minutos, lavado novamente em água destilada e em *Tampão Cacodilato* por 1 minuto. A pós-fixação foi feita com *Tetróxido de Ósmio a 1%* em

Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. Posteriormente o material foi lavado no mesmo tampão. Os procedimentos seguintes foram os mesmos utilizados na MET rotineira.

FOSFATASE ÁCIDA. Para testar a atividade e localização de fosfatase ácida, o material após ter sido incubado, foi pré-fixado em uma mistura contendo *Glutaraldeído 2,5%* em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M* a $pH=7,2$ (0-4 °C) por uma hora, lavado rapidamente em *Tampão Acetato 0,1M* a $pH=4,8$ (0-4 °C), incubado a 37 °C numa mistura contendo *p-NPP* (*p-Nitrofenilfosfato*), *Tampão Acetato de Sódio 0,1M* ($pH=4,8$) e *acetato de chumbo* por 45 minutos. Posteriormente o material foi Pós-fixado em *Tetróxido de Ósmio* (OsO_4 1% em *Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M*) por uma hora (2 °C). A desidratação foi feita em uma bateria em concentração crescente de álcool etílico (30-100%), sendo o tempo para cada banho de 10 minutos. O material foi incluído em resina Epon-araldite conforme as técnicas rotineiras para MET. Os controles da reação foram feitos no material incubados por 45 minutos a 37 °C numa mistura contendo as mesmas substâncias do meio acima citado, com exceção do substrato (*p-Nitrofenilfosfato*).

RESULTADOS

Efeito da adição de HJ-III e 20-HE ao meio de cultura sobre os depósitos lipídicos dos trofócitos do CG de operárias nutridoras e rainhas virgens

Os trofócitos de operárias nutridoras incubados somente no meio de cultura, isto é, sem a adição de nenhum hormônio, apresentam reação positiva ao teste basicamente em dois tipos de estruturas: 1) inclusões citoplasmáticas heterogêneas e 2) na membrana das mitocôndrias. A incubação no meio contendo 1µl de HJ-III não causou grande alteração no lipídio armazenado, a não ser pelo fato das inclusões passarem a apresentar característica homogênea (Fig. 1A). A incubação no meio com 1µl de acetona (solvente do HJ-III) causou alteração na morfologia dessas inclusões, que freqüentemente aparecem com um halo mais eletrondenso na sua periferia (Fig. 1B e

C). Quando 5µl de HJ-III e de acetona foram adicionados ao meio, verificou-se um aumento mais pronunciado nas inclusões homogêneas.

Quando o material foi incubado no meio com 1µl de 20-HE, a resposta observada foi a presença de pronunciadas inclusões lipídicas com halo periférico mais eletrondenso, semelhante ao observado quando se administrou a acetona ao meio de cultura enquanto que a adição no meio de 1µl de álcool não provocou este efeito tão pronunciado, mas sim o desaparecimento das inclusões heterogêneas. Entretanto, com a adição de 5µl do 20-HE, as inclusões permaneceram homogêneas e

com 5µl de álcool (solvente do 20-HE) as inclusões lipídicas permaneceram como no controle (Tabela I).

Com relação aos trofócitos do CG de rainhas virgens, o grupo controle apresentou reação positiva ao teste basicamente no conteúdo de inclusões homogêneas e contornando as mitocôndrias. A adição ao meio de cultura de HJ-III e 20-HE causou alterações pouco significativas na morfologia dessas inclusões, em relação ao grupo controle e aos grupos incubados em meio contendo acetona e álcool mesmo utilizando-se diferentes doses dos hormônios (1 e 5µl). (Tabela II).

Em resumo, verificaram-se maiores efeitos dos HJ-III e 20-HE sobre os trofócitos das operárias, nas quais também houve maior influência da incubação com os veículos em que foram dissolvidos os hormônios.

Efeito da adição de HJ-III e 20-HE ao meio de cultura sobre as proteínas dos trofócitos do CG de operárias nutridoras e rainhas virgens

A presença de material marcado pelo teste nas amostras de CG de operárias nutridoras do grupo controle apresentou-se apenas como uma granulação fina espalhada pelo citoplasma e ao redor de inclusões claras, aparentemente lipídicas. A adição ao meio de cultura de 1µl de HJ-III causou um aumento acentuado na quantidade de marcação na superfície dessas células comparado também ao grupo que recebeu 1µl de acetona. No entanto, quando 5µl de HJ-III foram adicionados ao meio, a marcação predominante ocorreu ao redor das gotas de lipídio, semelhante ao controle e ao tratamento com 5µl de acetona – solvente do HJ-III (Fig. 1D).

A adição de 1µl de 20-HE e 1µl de álcool (solvente do 20-HE) ao meio de cultura não parece não ter causado alteração significativa na marcação quando comparado ao controle enquanto que a adição de 5µl de ambos os produtos (20-HE e álcool) parece ter causado pouca alteração em relação ao controle (Tabela I).

No caso das rainhas, a presença de material positivo nas amostras do grupo controle apresentou-se apenas como uma granulação fina espalhada pelo citoplasma e modestamente ao redor de algumas inclusões, aparentemente lipídicas. A incubação dos trofócitos com HJ-III e 20-HE nas duas concentrações testadas (1 e 5µl) causou uma diminuição da presença de grânulos ao redor de inclusões lipídicas. Outras alterações, no entanto, não foram notadas (Tabela II).

Em suma, o principal efeito dos hormônios estudados sobre a presença de proteínas ocorreu quando da adição de baixa dose (1µl) do HJ, o qual provocou um aumento na quantidade de proteínas presentes na superfície dos trofócitos de operárias nutridoras.

Efeito da adição de HJ-III e 20-HE ao meio de cultura sobre a fosfatase ácida dos trofócitos do CG de operárias nutridoras e rainhas virgens

A atividade de fosfatase ácida aparece nos trofócitos do CG de operárias nutridoras, nos grupos controle, como uma granulação citoplasmática não muito intensa. A adição de 1µl de HJ-III causou aumento da marcação positiva no núcleo (Fig. E), citoplasma e também um pequeno aumento na marcação ao redor das inclusões. No caso do material incubado em meio com 1µl do solvente do HJ-III (acetona) e com 5µl de HJ-III, acentuou-se a marcação citoplasmática e ao redor das inclusões lipídicas, e diminuiu o aparecimento de marcação nuclear. A adição de 5µl do solvente do HJ-III não resultou em alteração significativa de marcação.

A adição de 1µl de 20-HE ao meio provocou um aumento da atividade de fosfatase ácida citoplasmática e o aparecimento de marcação ao redor de inclusões (Fig. 1 F). A adição de 1 e 5µl de álcool (solvente) ao meio na presença do substrato parece ter interferido pouco na marcação se comparado ao grupo controle. No caso, 5µl de 20-HE adicionados ao meio parece ter acentuado principalmente a marcação citoplasmática pela fosfatase ácida, exibindo um comportamento semelhante ao observado pela adição de 1µl de 2-HE (Tabela I).

No grupo controle das rainhas virgens, a atividade de fosfatase ácida aparece como uma granulação fina no citoplasma e densa ao redor das gotas lipídicas, o que tratamos de fosfatase livre. A adição de 1 e 5µl de HJ-III ao meio causou um aumento geral na quantidade de marcação citoplasmática (Fig. 1G), principalmente pelo aparecimento de marcação sob a forma de estruturas muito eletrondensas, provavelmente lisossomos e o desaparecimento de marcação ao redor das inclusões. Essas características também foram detectadas no material incubado somente com o solvente do HJ-III (acetona), independente da dose testada, mas não nos respectivos controles da reação sem o substrato p-NPP.

A adição de 20-HE e seu solvente, álcool, nas duas concentrações testadas (1 e 5µl) também parece ter provocado um aumento significativo na atividade de fosfatase ácida lisossômica (Fig. 1H) que não é observado ou aparece em menor quantidade nos controles das reações e um desaparecimento ou diminuição da marcação ao redor das inclusões (Tabela II).

A influência dos hormônios estudados e de seus veículos parece ser casta-específica quanto ao tipo de marcação encontrada. Enquanto que, nas operárias ocorre somente um aumento ou aparecimento das chamadas fosfatases livres, nas rainhas virgens esses hormônios induzem a atividade da enzima em estruturas fortemente marcadas, que se parecem com estruturas digestivas.

DISCUSSÃO

A análise citoquímica ultraestrutural dos trofócitos das fêmeas de *M. quadrifasciata anthidioides*, demonstra que o lipídio presente em inclusões citoplasmáticas é o principal produto de armazenamento nessas células (ver capítulo I). Nos trofócitos de operárias nutridoras, essas inclusões tendem a perder sua heterogeneidade em decorrência dos tratamentos com o HJ e acetona, mas diferentes doses do hormônio, aparentemente, não acentuam seu efeito, diferente do ocorrido com a 20-HE, a qual necessita de uma dose mais alta para causar o mesmo efeito. Já nas rainhas virgens os hormônios e seus veículos não provocaram alterações significativas nesses depósitos.

A princípio, a heterogeneidade dos depósitos lipídicos pode significar diferenças químicas existentes na constituição dessas inclusões, principalmente quanto à solubilidade para a sua própria manutenção e estabilidade, sendo o lipídio mais periférico menos solúvel ou então à interação dessas moléculas, triglicerídeos neutros (Paes de Oliveira, 2002) com outros constituintes celulares, sem implicação funcional neste caso.

Para CRUZ-LANDIM (1985) e REGINATO *et al.* (**enviado para publicação**) essa característica indica mobilização de material armazenado, para suprir o desenvolvimento de outros tecidos, entre eles o ovário que, nas operárias estudadas, apresenta o seu pico de seu desenvolvimento (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003). Os depósitos lipídicos presentes nos trofócitos das rainhas virgens não apresentam essa heterogeneidade ou ela é pequena e é justamente nesta casta que os níveis hormonais, principalmente do HJ, são mais altos por ocasião da emergência, quando comparados às operárias (SANTANA, 2002), então, possivelmente os hormônios testados impeçam essa heterogeneidade o que em última instância significaria a proteção desses depósitos contra a mobilização de seu conteúdo. Uma explicação possível para ausência de efeito sobre os trofócitos

das rainhas é que já se encontrem previamente modificados pelos títulos naturais desses hormônios, nessa casta.

Portanto, a ausência da heterogeneidade nos depósitos os mantém “desprotegidos” da ação de outras substâncias, tais como as enzimas, o que atribuiria ao halo eletronênso uma função protetora destas, a qual estaria presente em situações nas quais as taxas de HJ e 20-HE são mais altas. Os testes para detecção de proteínas e da atividade de fosfatase ácida se intensificam nessa região quando o halo não está presente, indicando que os hormônios em questão parecem promover e/ou estimular a mobilização desse material.

No caso presente em que operárias e rainhas estão sendo comparadas, as diferenças encontradas podem ser focalizadas sobre o desenvolvimento dos ovários, visto a comprovada função do CG na produção dos precursores do vitelo (Vgs).

Durante a ovogênese dos insetos, alterações nas células do CG não são observadas somente quanto às reservas protéicas, mas também em relação as lipídicas (IGNATTI-PATTISON, 2001; MARTINEZ & WHEELER, 1994), indicando a existência de uma relação direta entre essas substâncias e o desenvolvimento ovariano. *M. quadrifasciata* é uma espécie de abelha, em que as operárias normalmente desenvolvem os ovários e põem ovos. O mais alto grau no desenvolvimento dos ovários é alcançado justamente na fase estudada, a de aprovisionadora de células de cria. Portanto, se essa relação realmente existir, é possível que o HJ e até mesmo o 20-HE, sejam responsáveis pelo estímulo à mobilização desses materiais, promovendo a liberação desses depósitos na hemolinfa para posteriormente serem captados e acumulados no ovócito ou servirem como fonte de energia para a ovogênese.

Uma função básica, geral, atribuída aos trofócitos é justamente o armazenamento de nutrientes, para posterior fornecimento de material energético para as atividades metabólicas do organismo (GILBERT, 1967; KEELEY, 1985), desta maneira a disponibilização das reservas energéticas pelos trofócitos pode também servir para o metabolismo geral do organismo. Já foi demonstrado na espécie em estudo, que a área dos trofócitos das operárias diminui em função do envelhecimento e que a utilização dos estoques de lipídio deve influenciar essa diminuição do tamanho celular (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003). Como a tarefa de forrageamento parece requerer uma maior demanda de energia e é executada quando a operária se torna mais velha, é possível que os estoques lipídicos sejam mobilizados para suprir a necessidade metabólica gerada pelo vôo. Neste caso, o HJ, nas operárias, estaria relacionado mais com a ativação do programa genético de trocas das tarefas desempenhadas pelas operárias (polietismo etário) do que propriamente com a ovogênese.

No caso das rainhas a demanda energética é mais acentuada em razão do desenvolvimento ovariano e constante postura de ovos, o que também justifica a não alteração dos depósitos lipídicos dos trofócitos incubados com os hormônios nas rainhas virgens.

A presença de grande quantidade de proteínas acumuladas na superfície dos trofócitos de operárias nutridoras que receberam dose extra de HJ-III representa o principal ponto-chave da ação hormonal sobre esses compostos. Pode indicar a presença de receptores de membrana para a Vg ou outra proteína envolvida na vitelogênese, já que os trofócitos passam por fases de absorção e outras de liberação de material da hemolinfa (HAUNERLAND *et al.*, 1990). Já está bem estabelecido que, em grande parte dos insetos incluindo as abelhas, a Vg tem origem nas células do CG (ADACZYK *et al.*, 1996), o que reforça essa possibilidade. Essa marcação também pode ser devida, no entanto, a presença na superfície dos trofócitos da lipoforina (TELFER, 1960; TELFER *et al.*, 1981), que é uma molécula transportadora de lipídio presente na hemolinfa dos insetos. Sua produção e localização

periférica, pronta para ser liberada na hemolinfa, poderiam indicar o envolvimento com o transporte do lipídio mobilizado do trofócito para o ovócito em desenvolvimento ou no segundo caso, para as atividades metabólicas, sendo o HJ o indutor ou estimulante da liberação e transporte. Pode ainda indicar acúmulo de outras proteínas da hemolinfa prontas à serem exocitadas.

A atividade da fosfatase ácida se apresentou diferente entre as castas. Nas operárias, sempre que presente, independente do hormônio e de seu veículo, seu aparecimento limitou-se a fosfatase livre, enquanto que nas rainhas, se concentrou em estruturas definidas e grandes, provavelmente lisossomos.

As fosfatases ácidas estão normalmente localizadas nos lisossomos e atuam na digestão intracelular de compostos endógenos ou exógenos (PEARSE, 1960; CHAYEN *et al.*, 1973) e, especificamente neste caso, podem ter alguma relação, ainda que indireta, com a mobilização do lipídio armazenado, o que as relaciona com a remodelagem funcional dos tecidos, hormonalmente regulada, independentemente se o destino desse material é fornecer precursores para a ovogênese ou desenvolvimento de outro tecido qualquer. Não se pode afastar a hipótese que a reação positiva, principalmente no caso da fosfatase livre, seja devida a danos celulares causados pela incubação. A fosfatase presente nos lisossomos não tem efeito lítico geral sobre a célula, mas a livre sim.

Durante a fase adulta do inseto, o HJ pode agir no desenvolvimento ovariano (Smith, 1985) e no polietismo etário (ROBINSON, 1987). Em operárias de *A. mellifera* os títulos desse hormônio são baixos se comparado às rainhas (HARTFELDER & ENGELS, 1998), mas variam dependendo da idade, sendo maior nas forrageiras (ROBINSON, 1992). SANTANA (2002) não detectou diferenças significativas do título de HJ durante a vida adulta de *Melipona quadrifasciata*, no entanto,

percebeu que este se mantém mais baixo em operárias confinadas se comparado às rainhas. Além disso, dados indiretos mostraram que operárias adultas de alguns meliponíneos apresentam baixos títulos de HJ, ou seja, pequeno desenvolvimento dos *corpora allata*, relacionados ao alto desenvolvimento ovariano (AKAHIRA & BEIG, 1967). Lavando-se em conta estes aspectos, é provável que a maior disponibilização de material, principalmente o de constituição lipídica causada pela dose extra do HJ-III adicionado ao meio de cultura, esteja realmente em condições normais, mais relacionada com a ativação do programa genético de troca de tarefas do que propriamente com o desenvolvimento ovariano.

Embora presente no adulto, pouco se sabe sobre a origem e ação dos ecdisteróides nesta fase da vida nas abelhas. Os poucos trabalhos existentes indicam atuação durante a reprodução (BLOCH *et al.*, 2000) em *Bombus*, mas em *A. mellifera* parece não estar associados ao status reprodutivo (Hartfelder *et al.*, 2002), o que torna difícil qualquer associação desse hormônio com os processos reprodutivos. No entanto, segundo Santana (2002) as operárias de *Melipona quadrifasciata*

apresentam basicamente dois picos de ecdisteróides durante a fase adulta. Um ocorrendo entre 0 e 4 dias, associado a maturação sexual e outro entre 10 e 14 dias. Nesta segunda faixa etária, a operária já pode ser considerada “nutridora” por estar executando principalmente tarefas relacionadas à manutenção da cria. Também é nessa fase que as operárias botam ovos, indicando que se trata do período de vitelogênese, portanto, parece existir uma relação positiva entre o aumento dos títulos de ecdisteróides e do desenvolvimento ovariano, indicando status reprodutivo, ou seja, vitelogênese, a qual pode, no entanto, ser conjuntural.

No caso das rainhas virgens, tanto os hormônios estudados (HJ-III e 20-HE), como seus veículos (acetona e álcool) apresentaram pouco efeito sobre os depósitos lipídicos e protéicos, mas promoveram o aparecimento de grande quantidade de estruturas fortemente positivas para fosfatase.

Para os trofócitos do CG de rainhas virgens, a atividade dessa enzima parece estar relacionada com uma reestruturação funcional dos órgãos em decorrência da recente passagem da fase pupal para a adulta afinal, os indivíduos estudados são indivíduos recém-emergidos, já que foram coletados de favos mantidos em estufa. Nas colônias as rainhas virgens não são toleradas por muito tempo na presença da rainha fisogástrica. A grande quantidade de estruturas positivas para a fosfatase ácida corrobora a hipótese de que o CG passa por uma reorganização estrutural em função da lise dessas células ou de estruturas celulares.

A presença da fosfatase ácida tem sido associada ao fenômeno de morte celular. Quando livre no citoplasma, pode indicar morte do tipo apoptótica e quando nos lisossomos, autofágica (BOWEN & BOWEN, 1990; BÜNING, 1994; SILVA-DE-MORAES 2000; REGINATO & CRUZ-LANDIM,

2001, CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 2004). O fato de uma série de estruturas positivas ser observada nos trofócitos de rainhas virgens além de indicar a reorganização tecidual intensa, normalmente atribuída a apoptose, pode indicar também danos causados na estrutura celular durante o tempo em que se manteve em incubação. COSTA E CRUZ-LANDIM (2001), relacionaram a presença da enzima livre no citoplasma à atividade secretora das glândulas hipofaríngeas, o que também pode estar acontecendo no caso presente.

Nas rainhas virgens, a grande quantidade de estruturas positivas ao teste, supostamente em lisossomos, observada também parece relacionada com uma reestruturação funcional dos órgãos e tecidos, não em função de trocas de tarefas, mas sim pela recente passagem do indivíduo pela fase larval e pupal, sendo o CG adulto, remanescente do larval.

Uma questão intrigante é que, tanto os hormônios estudados quanto os seus veículos estimularam o aparecimento de lisossomos, os quais não são encontrados nos controles dos tratamentos ou aparecem em menor quantidade, portanto, não está afastada a possibilidade de

efeitos danosos da incubação, indicando morte celular autofágica. Desta maneira, se torna um tanto difícil distinguir a ação dos hormônios da dos veículos.

Os resultados mostraram um efeito do HJ mais claro e facilmente correlacionável à estrutura do CG e ovário que da ecdisona no caso das operárias nutridoras. No entanto, dados de outros insetos e outros tipos de experimentos mostram que o HJ no adulto tem mais um papel regulador do metabolismo geral, enquanto a ecdisona é responsável pelo controle da atividade gênica (VELTHUIS & SOMMEIJER, 1991). Nesse sentido, a correlação mais evidente entre o HJ e as variações morfológicas nos trofócitos, dever-se-ia a esse papel regulador, enquanto o efeito da ecdisona seria o de por em ação ou inibir genes que atuam no processo de ovogênese estejam eles atuando no corpo gorduroso ou no ovário.

Como a determinação das castas em *Melipona quadrifasciata* é tida como genética (KERR, 1974), possivelmente as rainhas virgens estão sujeitas a um controle da produção de proteínas em nível diferente e até mesmo da ação da fosfatase ácida no redirecionamento funcional, que diferentemente das operárias, pode levar os trofócitos deste indivíduo a se tornarem maiores (PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2003) e mais adaptados para a importante função de produção da vitelogenina que será depositada nos ovócitos.

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, J. J.; FESCEMYER, H. W.; HECKEL, D. G.; GAHAR, L. I.; DAVIS, R. E.; KELLY, T. J. Sex-specific and hormone – controlled expression of a vitellogenin – encoding gene in the gypsy moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 31(3):237-256, 1996.

AKAHIRA, Y. & BEIG, D. Comparative study of *corpora allata*. In: Brazilian Stingless bees. **Papéis Avulsos de Zoologia** 20(16):165-190, 1967.

ANGERMÜLLER, S.; FAHIMI, D. H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochemistry Journal** 14:823-825, 1982.

BARBOSA-HETEM, J. M. N.; PAULINO-SIMÕES, Z. L. & BITONDI, M. M. G. Ultrastructural study of the effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on the larval fat body of

africanized bees (*Apis mellifera* L.) after *in vitro* incubation. **Brazilian Journal of Morphological Science** **15**(2):191-201, 1998.

BARCHUK, A. R.; BITONDI, M. M. G. & SIMÕES, Z. L. P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science** **2**(1), Available online: insectscience.org/2.1, 2002.

BENCHIMOL, M. Localização de proteínas básicas. In: **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 1ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, p.57-73, 1998.

BLOCH, G., HEFETZ, A. & HARTFELDER, K. Ecdysteroid titer, ovary status, and dominance in adult worker and queen bumble bees (*Bombus terrestris*). **Journal of Insect Physiology** **46**:1033-1040, 2000a.

BLOCH, G., BORST, D. W., HUANG, Z. Y., ROBINSON, G. E., CNAANI, J. & HEFETZ, A. juvenile hormone titers, juvenile hormone synthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. **Journal of Insect Physiology** **46**:47-57, 2000b.

BOWNES, M. Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). **Annual Review of Entomology** **31**:507-531, 1986.

BOWEN, I. D. & BOWEN, S. M. **Programmed Cell Death in Tumors and Tissues**. London: Chapman & Hall, 1990.

BOWNES, M., RONALDSON, E. & MAUCLINE, D. 20-Hydroxyecdysone, but not juvenile hormone, regulation of yolk protein gene expression can be mapped to cis-acting DNA sequences. **Developmental Biology** **173**:475-489, 1996.

BÜNING, J. **The insect ovary: structure, previtellogenic growth and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.

CAMPOS, L. A. O., VELTHUIS-KLUPPEL F. M. & VELTHUIS H. H. W. Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. **Naturwissenschaften** **62**:98-99, 1975.

CAMPOS, L. A. O. Determinação do sexo nas abelhas. XIV: Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Biologia** **39**:965-971, 1979.

CAVALCANTE, V. M. & CRUZ-LANDIM, C. Electrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. **Neotropical Entomology** **33**(2):169-172, 2004.

CHAYEN, J. BITENSKY, L. & BUTCHER, R. G. **Practical Histochemistry**, London: John Wiley & Sons, 1973.

CHINZEI, Y.; AZUMI, C.; MIURA, K.; MATSUOKA, H. & ANDO, K. Changes in hemolymph proteins and their synthetic activities during development and engorgement, and after juvenile hormone treatment in the kissing bug, *Rhodnius prolixus* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). **Journal of Insect Physiology** **40**:491-499, 1994.

COSTA, R. A. C. & CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the ultrastructural and secretory dynamic of hypopharyngeal glands in queens, workers and males of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Biocell** **24**:39-48, 2000.

CRUZ-LANDIM, C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. **Revista Brasileira de Biologia** **45**(3):211-232, 1985.

DAVEY, K. G. Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rhodnius prolixus*. **Annual of Zoology** **21**:701-705, 1981.

DHADIALLA, T. S., COOK, K. E. & WYATT, G. R. Vitellogenin mRNA in locust fat body: coordinate induction of two genes by a juvenile hormone analog. **Developmental Biology** **123**:108-114, 1987.

DUMSER, J. B. & DAVEY J. G. The *Rhodnius testis*: Hormonal effects on germ cell division. **Canadian Journal of Zoology** 52:1682-1689, 1975.

DUMSER, J. B. *In vitro* effects of ecdysterone on the spermatogonial cell cycle in *Locusta*. **International Journal of Invertebrate Reproduction** 2:165-174, 1980.

ENGELMANN, F. **Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis.** *Advances of Insect Physiology*, 14, 1979.

EPPLER, A., ADAM, G. & SANDER, E. Nutritional requirements and growth of two cell lines from the aphid parasite *Ephedrus plagiator* under different culture conditions. *In*: KURSTAK, E., MARAMOROSCH, K. & DUBENDORFER, A. **Invertebrate Systems In Vitro.** Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 598p. 1980.

FUKUSHIMA. T. & YAGI, S. Hormonal effect on cultivated insect tissues. III. Effects of α - and β -ecdysone or prothoracic glands on spermiogenesis in two noctuid insects *in vitro* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology Zoology** 10:220-225, 1975.

GIEBULTOWICZ J. M., LOEB, M. J. & BORKOVEC A. B. *In vitro* spermatogenesis in Lepidopteran larvae: Role of the testis sheath. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development** 11:211-226, 1987.

GILBERT, L. I. Lipid metabolism and function in insects. **Advances in Insect Physiology** 6:51-96, 1967.

HAGEDORN, H. H. The role of ecdysteroids in reproduction. *In*: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.** 8, p.205-262, 1985.

HARTFELDER, K. & ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics in Developmental Biology** 40:45-77, 1998.

HARTFELDER, K. insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **33**:157-177, 2000.

HARTFELDER, K.; BITONDI, M. M. G.; SANTANA, W. C. & SIMÕES Z. L. P. Ecdysteroid titer and reproduction in queen and worker of the honey bee and of a stingless bee: Loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **32**:211-216, 2002.

HARTFELDER, K. & REMBOLD, H. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. **Comparative Physiology B** **160**:617-620, 1991.

HATAKEYAMA, M.; KAGEYAMA, Y.; KINOSHITA, T. & OISHI K. Completion of development in *Athalia rosae* (Hymenoptera) eggs matured with heterospecific *Athalia infumata* yolk protein. **Journal of Insect Physiology** **41**:351-355, 1995.

HAUNERLAND, N. H., NAIR, K. K. & BOWERS, W. S. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. **Insect Biochemistry** **20**:829-837, 1990.

HENRICH, V. C. & BROWN, N. E. Insect nuclear receptors: a development and comparative perspective. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **25**:881-897, 1995.

HINK, W. F. & BULTZ, J. J. Primary culture of ant venom cells. **In Vitro and Cell Advance of Developmental Biology** **21**:333-339, 1985.

IGNATTI-PATTISON, A. C. **Histoquímica e Citoquímica Ultra-estrutural do Corpo Gorduroso de Rainhas de Formigas *Atta sexdens* (L., 1758) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**. 2001. 247f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2001.

IZUMI, S., KIGUCHI, K. & TOMINO, S. Hormonal regulation of biosynthesis of major plasma proteins in *Bombix mori*. **Zoological Science** **1**:223-228, 1984.

KAFATOS, F. C., SPOEREL, N. MITSIALIS, S. A., NGUYEN, H. T., ROMANO, C. Developmental control and evolution in the chorion gene families of insects. **Advances in Genetics** **24**:223-242, 1987.

KAMBYSELLIS, M. P. & WILLIAMS, C. M. Spermatogenesis in cultured testes of the *Cynthia* silkworm: Effects of ecdysone and of prothoracic glands. **Science** **1975**:769-770, 1972.

KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. *In*: KERKUT & GILBERT, I. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. N. Y.; Pergamon Press, 3, p.211-248, 1985.

KERR, W. E. Sex determination in bees. III Caste determination and genetic control in *Melipona*. **Insect Sociaux** **21**:357-368, 1974.

KOEPPE, J. K., FUCHS, M., CHEN, T. T., HUNT, L. -M., KOVALICK, G. E. & BRIERS, T. The role of juvenile hormone in reproduction. *In*: Kerkut, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, vol. 8, Pergamon Press, p.165-203, 1985.

LEAL, I.; WHITE, E. E.; SOHATA, T. S. & MANVILLE, J. F. Differential expression of the vitellogenin gene in the spruce terminal weevil feeding on resistant versus susceptible host trees. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **27**:569-575, 1997.

LOCKE, J. WHITE, B. N. & WYATT, G. R. Cloning and 5' end nucleotide sequences of two juvenile hormone-inducible vitellogenin genes of the African migratory locust. **DNA** **6**:331-342, 1987.

MACRAE, E. K. & MEETZ, G. D. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. **Journal of Cell Biology** **45**:235-245, 1970.

MARTINEZ, T. & WHEELER, D. E. Storage proteins in adult ants *Camponotus festinales*: role in colony founding by queens and in larval rearing by workers. **Journal of Insect Physiology** **40**:723-729, 1994.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. **Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2002, 167f.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Size of fat body trophocytes and ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Sociobiology** **41**(3):701-709, 2003.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. London: J & A Churchill ed., 1960.

RACHINSKY, A. & HARTFELDER, K. *Corpora allata* activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titres in honeybee larvae (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** **36**(3):189-194, 1990.

RACHINSKY, A., STRAMBI, C., STRAMBI, A. & HARTFELDER, K. Caste and metamorphosis: haemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in the last instar honey bee larvae. **General and Comparative Endocrinology** **79**:31-38, 1990.

RAIKHEL A. S. & LEA, A. O. Control of follicular epithelium development and vitteline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. **Tissue & Cell** **23**(4):577-591, 1991.

RAIKHEL A. S. & DADHIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology** **37**:217-251, 1992.

REGINATO R. D.; PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Composição das reservas e presença de fosfatase ácida em células do corpo gorduroso de pré-pupas de *Apis mellifera* Lineaus (Hymenoptera, Apidae) (*enviado para publicação*).

REGINATO, R. D. & CRUZ-LANDIM, C. Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. **Invertebrate Reproduction and Development** **29**(2):127-134, 2001.

ROBINSON, G. E. Regulation of honey-bee age polyethism by juvenile-hormone. **Behavioral Ecology and Sociology** **20**(5):329-338, 1987.

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insects societies. **Annual Reviews Entomological** **37**:637-665, 1992.

SANTANA, W. C. **Hormônio juvenil e ecdisteróides na vida adulta de machos, rainhas e operárias de *melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae): Relação com a reprodução e divisão de trabalho.** 2002. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2002.

SASS, M. & KOVACS, J. The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of *Manduca brassicae*. **Cell Tissue Research** **180**:403-409, 1977.

SILVA DE MORAES, R. L. & BOWEN, I. D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Cell Biology International** **24**(10):737-743, 2000.

SMITH, S. L. Regulation of ecdysteroid titer: synthesis. *In*: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, 7. Pergamon Press, New York, pp.295-341, 1985.

SOHI, S. S. & ENNIS, T. J. Chromosomal characterization of cell lines of *Neodiprion lecontei* (Hymenoptera: Diprionidae). **Proceedings of Entomological Society Ontario** **112**:45-48, 1981.

SWEVERS, L., DREVET, J. R., LUNKE, M. D. & IATROU, K. The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1) isoform: cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **29**:955-963, 1995.

SWEVERS, L. & IATROU, K. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **33**:1285-1297, 2003.

TAKAHASHI, S. Y.; YAMAMOTO, Y.; SHINOYA, Y. & KAGEYAMA, T. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombix mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biochemistry** **114**:267-272, 1993.

TAKAHASHI, S. Y.; YAMAMOTO, Y., ZHAO, X. & WATABE, S. *Bombix* acid cysteine proteinase. **International Journal of Invertebrate Reproduction Development** **30**:265-281, 1996.

TELFER, W. H. The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. **Biology Bulletin** **118**:338-351, 1960.

TELFER, W. H., RUBENSTEIN, E. C. & PAN, M. L. How the ovary makes yolk in *Hyalophora*. *In*: SEHNAL, F. MENN, J. J. & CYMBOROWSKI, B. **Regulation of Insect development and behavior**, Wroclaw Technical Univ., p.637-654, 1981.

THOMASSON, W. A. & MITCHELL, H. K. Hormonal control of protein granule accumulation in fat bodies of *Drosophila melanogaster* larvae. **Journal of Insect Physiology** **18**:1885-1899, 1972.

TSUCHIDA, K., NAGATA, M. & SUZUKI, A. Hormonal control of ovarian development in the silkworm, *Bombix mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Biophysical** **5**:167-177, 1987.

TYSSEL, B. & BUTTERWORTH, F. M. Different rate of protein granule formation in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology** **24**:201-206, 1978.

VELTHUIS, H. H. W. & SOMMEIJER, M. J. 9 Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in stingless bees. *In*: GUPTA, A. P. **Morphogenetic hormones of arthropods**. Rutgers University Press, p.346-383, 1991.

WYATT, G. R., DAVEY, K. G. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. **Advanced Insect Physiology** **26**:1-147, 1996.

YAMAMOTO, Y.; YAMAHAMA, Y.; KATOU, K.; WATABE, S. & TAKAHASHI S. Y. *Bombix* acid cysteine protease (BCP): hormonal regulation of biosynthesis and accumulation in the ovary. **Journal of Insect Physiology** **46**:783-791, 2000.

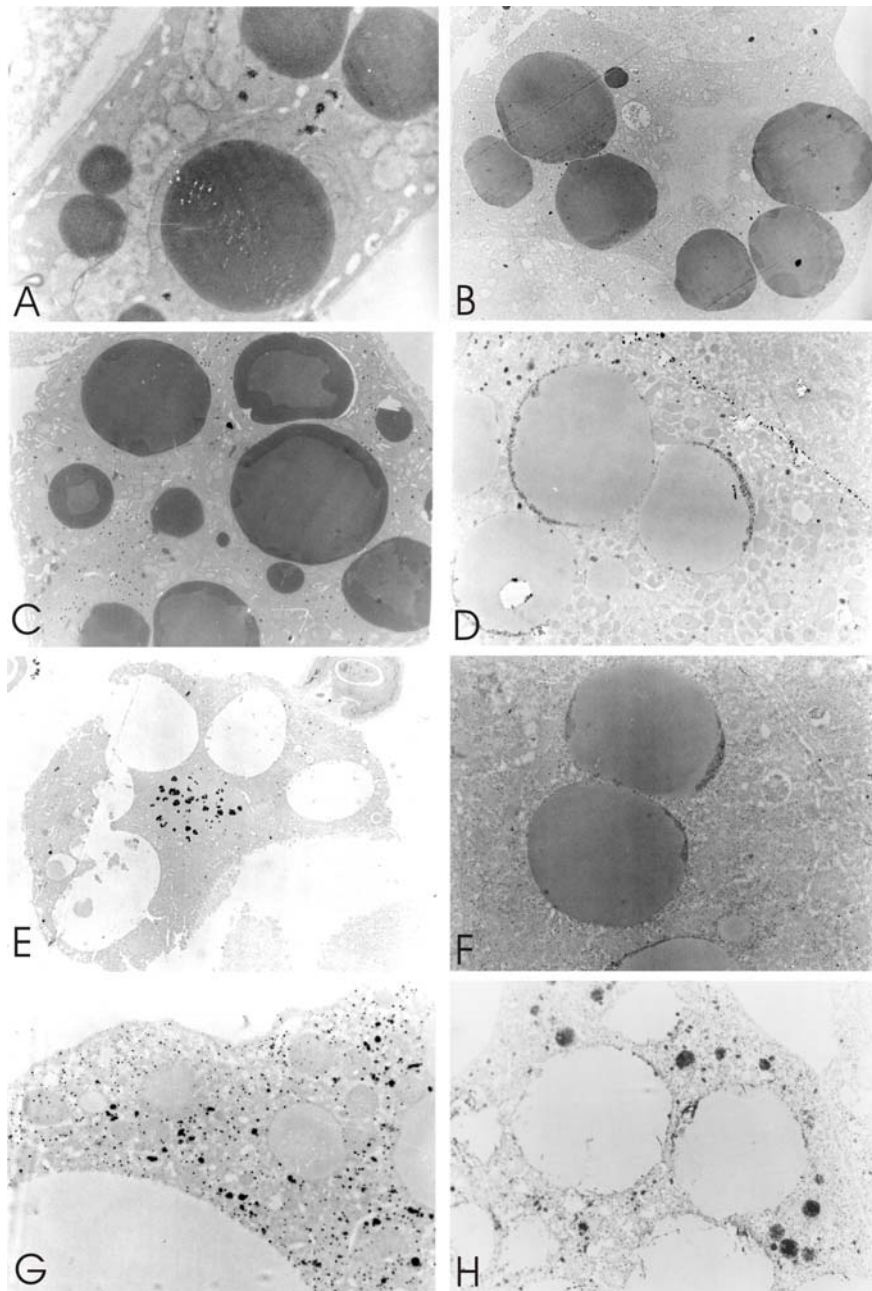


Figura 1. Testes citoquímicos de trofócitos do CG incubados em hormônios. **A)** Adição de 1 μ l de HJ-III ao meio de cultura, analisado pela técnica de Ósmio Imidazol. Notar a característica homogênea dos depósitos lipídicos (39.000X). **B e C)** Adição de 1 μ l de acetona – solvente do HJ-III ao meio de cultura, analisado pela técnica de Ósmio Imidazol. Notar que nestes casos os depósitos são heterogêneos (5.800X) (24.000X). **D)** Adição de 5 μ l de acetona – solvente do HJ-III ao meio de cultura, analisado pela técnica de Prata amoniacal. Marcação ao redor de inclusões lipídicas (5.000X). **E)** Adição de 1 μ l de HJ-III ao meio de cultura, analisado pela técnica de fosfatase ácida mostrando marcação nuclear (1.400X). **F)** Adição de 1 μ l de 20-HE ao meio de cultura, analisado pela técnica de fosfatase ácida. Marcação ao redor de inclusões lipídicas (5.000X). **G)** Adição de 5 μ l de HJ-III ao meio de cultura, analisado pela técnica de fosfatase ácida. Marcação espalhada pelo citoplasma (5.000X). **H)** Adição de 20-HE ao meio de cultura, analisado pela técnica de fosfatase ácida. Neste caso, estruturas eletrondensas estão presentes em grande quantidade no citoplasma (3.500X).

Tabela I – Resultado dos testes citoquímicos aplicados aos trofócitos do CG de operárias nutridoras.

	ESTRUTURA	OPERÁRIA NUTRIDORA								
		C	1µl		5µl		1µl		5µl	
			HJ	AC	HJ	AC	HE	AL	HE	AL
Lipídio	Inclusões densas e homogêneas	-	++	-	++	++	-	+	++	+
	INCLUSÕES DENSAS E HETEROGÊNEAS	++	-	++	-	+	-	-	-	++
	INCLUSÕES DENSAS COM HALO	-	-	++	-	+	++	+	-	+
	MARCAÇÃO CONTORNANDO MITOCÔNDRIAS	++	++	++	++	++	++	+	++	++
Proteína	GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS DISPERSOS	++	+	+	+	-	+	+	++	++
	GRÂNULOS AO REDOR DE INCLUSÕES	++	++	+	++	++	++	++	+	+
	GRÂNULOS NA SUPERFÍCIE CELULAR	-	++	-	+	-	+	+	+	-
Fosfatase ácida	GRÂNULOS MÉDIOS E DENSOS	+	++	+	++	+	+	+	-	+
	MARCAÇÃO AO REDOR DE INCLUSÕES	-	+	++	++	+	++	-	+	-
	GRANULAÇÃO CITOPLASMÁTICA PULVERULENTA	+	+	++	++	+	++	+	++	+
	ESTRUTURAS FORTEMENTE POSITIVAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MARCAÇÃO NUCLEAR	-	++	+	+	-	-	-	-	-

(-) ausente; (+) pouco presente; (++) muito presente.

(AC) acetona; (AL) álcool; (C) controle; (HE) 20-hidroxicedisona; (HJ) hormônio juvenil.

Tabela II – Resultado dos testes citoquímicos aplicados aos trofócitos do CG de rainhas virgens.

	ESTRUTURA	RAINHA VIRGEM								
		C	1µl		5µl		1µl		5µl	
			HJ	AC	HJ	AC	HE	AL	HE	AL
Lipídio	Inclusões densas e homogêneas	++	++	+	+	+	++	++	++	++
	INCLUSÕES DENSAS E HETEROGÊNEAS	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	INCLUSÕES DENSAS COM HALO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MARCAÇÃO CONTORNANDO MITOCÔNDRIAS	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Proteína	GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS DISPERSOS	++	++	++	++	+	++	++	++	++
	GRÂNULOS AO REDOR DE INCLUSÕES	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	GRÂNULOS NA SUPERFÍCIE CELULAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatase ácida	GRÂNULOS MÉDIOS E DENSOS	-	++	++	++	++	++	+	++	+
	MARCAÇÃO AO REDOR DE INCLUSÕES	++	-	-	-	-	-	-	-	+
	GRANULAÇÃO CITOPLASMÁTICA PULVERULENTA	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	ESTRUTURAS FORTEMENTE POSITIVAS	-	++	++	++	++	++	++	++	++
	MARCAÇÃO NUCLEAR	+	-	-	-	+	-	-	-	-

(-) ausente; (+) pouco presente; (++) muito presente.

(AC) acetona; (AL) álcool; (C) controle; (HE) 20-hidroxicedisona; (HJ) hormônio juvenil.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O objetivo geral deste trabalho foi o de buscar, através dos métodos utilizados, evidências da função exercida pelos trofócitos do CG de fêmeas de *Melipona quadrfaciata anthidioides*. Lembrando que nesta espécie, não somente as rainhas, mas também as operárias desenvolvem ovários e chegam a botar ovos durante a vida, foi tentado correlacionar o desenvolvimento dos trofócitos com a vitelogênese.

Os resultados obtidos no capítulo I indicaram que os trofócitos de rainhas virgens apresentaram características intermediárias entre trofócitos de operárias nutridoras e rainhas fisogástricas e que, apesar dos processos e mecanismos envolvidos na deposição do vitelo no ovócito seguem mecanismos similares nas duas castas, diferenças importantes podem ser percebidas. Os trofócitos das operárias e rainhas virgens não apresentam um aparato sintetizador de proteínas tão desenvolvido como nas rainhas fisogástricas e o acesso da hemolinfa ao espaço periovocítico encontra-se bloqueado. Apesar disso há indicações de que a vitelgênese nesta espécie pode iniciar-se antes da fecundação. Entre rainha fisogástrica e operária, o que varia é a taxa com qual a vitelogenese, ou seja, a produção de ovos ocorre. Mostraram ainda que a atividade e localização das enzimas (fosfatases) podem estar envolvidas em três processos nesta espécie: 1) modificação do material que será incorporado ao ovócito, 2) O redirecionamento funcional dos trofócitos, nas rainhas e 3) mais provavelmente mobilização de material para fornecer energia para o metabolismo energético geral.

O capítulo II buscou rastrear a vitelogenina nos extratos do CG e ovários de operárias nutridoras, rainhas virgens e fisogástricas, considerando que esta é a principal proteína envolvida no processo de formação do vitelo do ovo. Como a fase nutridora das operárias representa a fase em que os ovários se apresentam com o maior grau de desenvolvimento, esperava-se encontrar a banda Vg tanto nos extratos de CG como nos de ovários, indicando a relação procurada entre sua produção nos trofócitos, liberação na hemolinfa e captação pelos ovários mostrando que o desenvolvimento do corpo gorduroso está relacionado à vitelogenese e ao status reprodutivo, isto é, ao desenvolvimento ovariano, independentemente da casta. No entanto, os resultados mostraram que a Vg aparece nos extratos de ovários de rainhas virgens e fisogástricas e está ausente nos de operárias, demonstrando diferença quanto à captação de Vg pelo ovário, o que está de acordo com os dados morfo-citoquímicos e parece indicar, por sua vez que a Vg aparece na hemolinfa de acordo com a capacidade sintética do CG, visto não ser por ele armazenada e que sua incorporação aos ovócitos, depende do status reprodutivo do indivíduo, sugerindo que a função dessas células nas operárias nutridoras parece não estar relacionada, diretamente com a reprodução, mas possivelmente à execução do programa de trocas de tarefas. No entanto, nas rainhas a relação se

verifica e exatamente no aumento da capacidade sintetizadora refletida no grande aumento de retículo endoplasmático granular e na ausência de depósitos lipídicos (PAES DE OLIVEIRA, 2002). Neste caso fica claro que os trofócitos, principalmente os periviscerais mudaram de função. Portanto, seja a vitelogenina uma proteína especificamente relacionada à reprodução ou não a taxa de sua produção, ou de outras proteínas, aumenta nas rainhas fisogástricas, com reflexos sobre a morfologia dos trofócitos.

O capítulo III buscou evidências do controle hormonal sobre essas células e, portanto, sobre suas funções. Os resultados mostraram que os efeitos dos tratamentos hormonais foram maiores sobre os trofócitos das operárias que nas rainhas e que a 20-HE teve menor influência, tendo mostrado maior efeito sobre a atividade de fosfatase ácida. O efeito do HJ é mais claro e facilmente correlacionável à estrutura do CG e ovário que da ecdisona no caso das operárias nutridoras. Essas diferenças entre as castas devem estar relacionadas os títulos hormonais naturais nelas presentes. Pode haver um “ótimo” hormonal presente nas rainhas além do qual doses extra não causam efeito, enquanto nas operárias os títulos seriam “sub-ótimos”.

Quando os testes citoquímicos foram aplicados no material “*in vivo*” (capítulo I), as gotas lipídicas tanto em operárias como nas rainhas virgens apresentaram-se heterogêneas. “*In vitro*” essas inclusões apresentaram-se homogêneas nas operárias, portanto indicando que o funcionamento do tecido foi alterado em função da presença dos hormônios. Nas rainhas virgens embora tenham sido observadas diferenças desses depósitos comparando os resultados “*in vivo*” e “*in vitro*”, diferenças quanto ao controle não foram observadas, indicando menor efeito que nas operárias, o que pode ser explicado pelas razões já expostas acima. Diferença entre os resultados “*in vivo*” e “*in vitro*” também foram notadas quanto ao padrão de marcação protéica, indicando maior efeito dos hormônios também nas operárias nutridoras em relação às rainhas virgens. Quanto a distribuição das fosfatases ácidas, os estudos “*in vivo*” mostraram apenas a enzima livre independentemente da casta estudada, enquanto que os resultados “*in vitro*” se mostraram ser casta-específicos. A correlação mais evidente entre o HJ e as variações morfológicas nos trofócitos parece dever-se a esse papel regulador, enquanto o efeito da ecdisona seria o de por em ação ou inibir genes que atuam no processo de ovogênese estejam eles atuando no corpo gorduroso ou no ovário.

Embora os trofócitos sejam diretamente especializados para síntese protéica nas rainhas, o que remete a uma correlação destes com a produção de ovos, não é possível fazer uma correlação direta entre eles e a vitelogênese nas operárias, assim como não é possível demarcar claramente a ação dos hormônios testados sobre essas células, embora diferenças sejam observadas entre as castas tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”.

Em conclusão pode ser dito que tanto os trofócitos como o trânsito de substâncias da hemolinfa para os ovócitos têm características próprias nas operárias, nas rainhas virgens e nas

rainhas fisogástricas. A relação das características dos trofócitos e a casta, ou a reprodução só é evidente entre operárias e rainhas fisogástricas, mesmo assim apenas por evidências morfológicas de maior capacidade de síntese de proteínas que estes apresentam nas rainhas fisogástricas. Quanto ao trânsito de substâncias da hemolinfa para o ovócito o que se verifica é que embora as vias sejam as mesmas, o trânsito não flui igualmente por elas, isto é, há bloqueio na passagem no caso das operárias e das rainhas virgens, e liberação total no caso das rainhas fisogástricas. A razão para isto parece óbvia dada as condições específicas de cada tipo de fêmea, em relação à produção de ovos. Estas diferenças no trânsito possivelmente são controladas hormonalmente conforme já mostrado na literatura. Portanto, no presente trabalho teria sido importante verificar o efeito da incubação dos ovários em meio contendo os hormônios o que não foi feito por motivos vários. Desta forma não foi possível verificar se a aparente mobilização dos depósitos armazenados nos trofócitos das operárias corresponderia igual modificação nas vias de acesso aos ovócitos no ovário. Fica, portanto, a sugestão para próximos trabalhos.

VII. REFERÊNCIAS GERAIS:

- ANDERSON, L. M. & TELFER, W. H. A follicle cell contribution to the yolk spheres of moth oocytes. **Tissue & Cell** **1**:633-634, 1969.
- ADAMCZYK, J. J.; FESCEMYER, H. W.; HECKEL, D. G.; GAHAR, L. I.; DAVIS, R. E. & KELLY, T. J. Sex-specific and hormone – controlled expression of a vitellogenin – encoding gene in the gypsy moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **31**(3):237-256, 1996.
- BABTHAN, N. M. G. & GILBERT, L. I. Studies on the cytophysiology of the fat body of American silk-moth. **Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** **124**:433-444, 1972.
- BARBOSA-HETEM, J. M. N.; PAULINO-SIMÕES, Z. L. & BITONDI, M. M. G. Ultrastructural study of the effects of juvenile hormone and 20 – Hydroxyecdysone on the late larval fat body of africanized bees (*Apis mellifera* L.), after *in vitro* incubation. **Brazilian Journal of Morphological Science** **15**(2):191-201, 1998.
- BEGO, L. R. On some aspects of bionomics in *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Entomologia** **27**:211-224, 1983.
- BEHAN, M. HAGEDORN, H. H. Ultrastructural changes in fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. **Cell and Tissue Research** **186**:499-506, 1978.
- BEIG, D.; SAKAGAMI, S. F. Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the ovoposition process II. *Melipona seminigra merrillae* Cockerell. **Annotationes Zoologicae Japonenses** **37**(2):112-119, 1964.
- BEIG, D. Desenvolvimento embrionário das Abelhas *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera: Meliponinae). **Arquivos de Zoologia** **21**:179-234, 1971.

BIER, K. Zur funktion der Nährzellen im meroistischen insektenovar unter besonderer Berücksichtigung der oogenese adephager Coleopteren. **Zoology Jb. Physiology** 71:371-384, 1965.

BISHOP, G. P. Nuclear and cytoplasmic changes in fat body cells of queen bee during metamorphosis. **The Journal of Experimental Zoology** 137:501-525, 1958.

BRANDT, A. Über die Eiröhren der *Blatta orientalis* (Periplaneta). **Memoires De L'Academie Imperiale Des Sciences De St. Petersbourg** 21(12):1-30, 1874.

CHAPMAN, R. F. **The insect: Structure and Function**, 4ed. Cambridge, University Press, 1998.

COLLINS, J. V. The hormonal control of fat body development in *Calpodes ethlius* Stoll (Lepidoptera, Hesperiiidae). **Journal of Insect Physiology** 15:341-352, 1969.

COLLINS, J. V. Hormonal control of protein sequestration in the fat body of *Calpodes ethlius* Stoll, **Canadian Journal of Zoology** 52:639-642, 1974.

COTTON, G., & ANSTEE, J. H. A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria* L. **Journal of Insect Physiology** 37:525-539, 1991.

COUBLE, P.; CHEN, T. T. & WYATT, G. R. Juvenile hormone controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body: cytological development. **Journal of Insect Physiology** 25:327-337, 1979.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo do corpo gorduroso de *Apis mellifera adansoni* ao microscópio óptico e eletrônico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 3º, 1975, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: ESALQ - USP, 1975. p.137-144.

CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP. (Apidae, Meliponinae). **Naturalia** 8:7 -23, 1983.

CRUZ-LANDIM, C. Histological and Cytological Studies on the Fat Body of the Queen Honeybee Abdomen during the active ovoposition phase. **Revista Brasileira de Biologia** 45(3):221-232, 1985a.

CRUZ-LANDIM, C. Modificações das células do corpo gorduroso de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura** 37:471-475, 1985b.

CRUZ-LANDIM, C. Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genetic and Molecular Biology** 23(1):83-88, 2000.

DEAN, R. L. The induction of autophagy in isolated insect fat body of β -ecdysone, **Journal of Insect Physiology** 24:439 -447, 1978.

DEAN, R. L.; LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Structure of fat body. *In*: KERBUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 1ed. Oxford, Pergamon Press, 3, 1985, p.155-210.

DUTKWOSKI, A. B. Fat body of *Galleria mellanella* during Metamorphosis. Cytochemical and Ultrastructural Studies. **Folia Histochemica et Cytochemica**, 12(3-4):269-280, 1974.

ENGELMANN, F. Induction of the insect vitellogenin “in vivo” and “in vitro”. *In*: GILBERT, L. I. **The juvenile hormones**. New York: Pleurum Press, 1976, p.470–485.

ENGELS, W. Extraocytäre Komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifera*. **Insect Socialis** 3:271-288, 1968.

ENGELS, W. Das zeitliche und räumliche muster der Dottereinlagerung in die oocyte von *Apis mellifera*. **Zeitschrift Fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** 142:409-430, 1973.

GIORGI, F. & MAZZINI, M. Secretory and endocytic pathways of vitellogenin in stick insects, *In*: PORCHET, M., ANDRIES, J. V., & DHAINAUT, A. **Advances in Invertebrate Reproduction** 4. N.Y., Elsevier Science Publisher, 3, p.79-84, 1986.

GUTZEIT, H. O., ZISSLER, D. & FLEIG, R. Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. **Wilhelm Roux' Archives of Developmental Biology** **202**:181-191, 1993.

HAN, S. H. & BORDEREAU, C. Ultrastructure of the fat body of reproductive pair in higher termites. **Journal of Morphology** **172**:317-320, 1982.

HARTFELDER, K. & ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics in Developmental Biology** **40**:45-78, 1998.

KEELEY, L. L., Physiology and Biochemistry of the fat body In: KIRKUT, G. A. & GILBERT, L. I. **Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 1ed. New York: Pergamon Press. Oxford, 3, 1985, p.211-248.

KOEDAM, D., CONTRERA, F. A. L., FIDALGO, A. O. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. How queens and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). **Insect Societaux** **52**(2):114-121,2005.

LOCKE, M. & COLLINS, J. V. Sequestration of protein by the fat body of an insect. **Nature** **210**(5035):552-553, 1966.

LOCKE, M. The molt-intermolt cycles in the epidermis and other tissues of an insect *Calpodex ethlius* (Lepidoptera, Hesperiiidae). **Tissue & Cell** **2**:197-223, 1970.

LOCKE, M. The cell biology of fat body development. In: LOCKE, M. & SMITH, D. S. **Insect Biology in the Future**. 1ed. New York: Academic. Press, Inc., 1980. p.227-252.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: KING, R. C. & AKAI, H. **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. p.151-197.

MARX, R. Changes in the fat body ultrastructure during the fifth larval instar in workers, queen and drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. In: EDER, J. & REMBOLD, N., **Chemistry and biology of social insects**. Berlin: Peperny Verlag München, 1987, p.86-87.

MICHENER, C. D. **The Social Behavior of the Bees**. Cambridge, Harvard University Press, 1974.

MICHENER, C. D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **University of Kansas Science Bulletin** **54**(4):75–164, 1990.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 1.ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 2000.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. **Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** 2002. 164f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2002.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências** **11**:195-205, 2003a.

PAES DE OLIVEIRA, V.T. & CRUZ-LANDIM, C. Size of fat body trophocytes and the ovarian development in workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Sociobiology** **41**:701-709, 2003b.

PAES DE OLIVEIRA, V. T. & CRUZ-LANDIM, C. Protein content and eletrophoretic profile of fat body and ovary extracts from workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Meliponini). **Iheringia, Série Zoologia** **94**(4):417-419, 2004.

PATRÍCIO, K. & CRUZ-LANDIM, C. Development of worker ovaries in Brazilian africanized honeybees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology** **44**(3):695-705, 2004.

PELT-VERKUIL, E. Hormone mediated induction of acid phosphatase activity in the fat body of *Calliphora erythrocephala* prior to metamorphosis. **Journal of Insect Physiology** **25**:965-973, 1979.

POSTLETHWAIT, J. H. & JONES, G. J. Endocrine control of larval fat body histolysis in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Experimental Zoology** **203**:207-214, 1978.

PRICE, G. M. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. **Biological Review** **48**:333-375, 1973.

ROSSEL, R. C. & WHEELER, D. E. Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Bukley) (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology** **24**:413-426, 1995.

SASS, M. & KOVACS, J. The effect of ecdysone on the fat body cells of the penultimate larvae of *Mamestra brassicae*. **Cell and Tissue Research** **180**:403-409, 1977.

SAYAH, F.; KARLINSKI, A. & BRECIZET, M. Hormones regulating structural changes in the adipocytes of the female earwig *Labridura riparia*. **Tissue & Cell** **26**:587-597, 1994.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. 1ed. New York, Mc Graw-Hill book Company Inc., 1935.

TADBOWSKI, J. M. & JONES, J. C. Changes in fat body and oocytes during starvation and vitellogenesis in mosquito, *Aedes aegypti* (L). **Journal of Morphology** **179**:185-264, 1979.

TELFER, W. H., RUBENSTEIN, E. C. & PAN, M. L. How the ovary makes yolk in *Hyalophora*. In: SEHNAL, F. MENN, J. J. & CYMBOROWSKI, B. **Regulation of Insect development and behavior**, Wroclaw Technical Univ., p.637-654, 1981.

THOMSEN, E. & THOMSEN, M. Production of specific protein secretion granules by fat body cells of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **Cell and Tissue Research** **193**:25-33, 1978.

THOMASSON, W. A. & MITCHELL, H. K. Hormonal control of protein granule in fat bodies of *Drosophila melanogaster* larvae. **Journal of Insect Physiology** **18**:1885-1899, 1972.

TYSELL, B. & BUTTERWORTH, F. M. Different rate of protein granule formation in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology** **24**:2001-2066, 1978.

VELTHUIS, H. H. W. **Biologia das abelhas sem ferrão**. 1998.

VELTHUIS, H. H. W., KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The males of *melipona* and other stingless bees, and their mothers. **Apidologie** **36**:169-185, 2005.

WIGGLESWORTH, V. B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larva. **Journal of Experimental Biology** **19**:56-77, 1942.

WYATT, G. R.; PAN, M. L. Insect plasma proteins. **Annual Review of Biochememistry** **47**:779-817, 1978.

WYATT, G. R. The fat body as a protein factory. In: LOCKE, M. & SMITH, D. S. **Insect biology in the future**. New York: Academic Press, 1980. p.201-225.