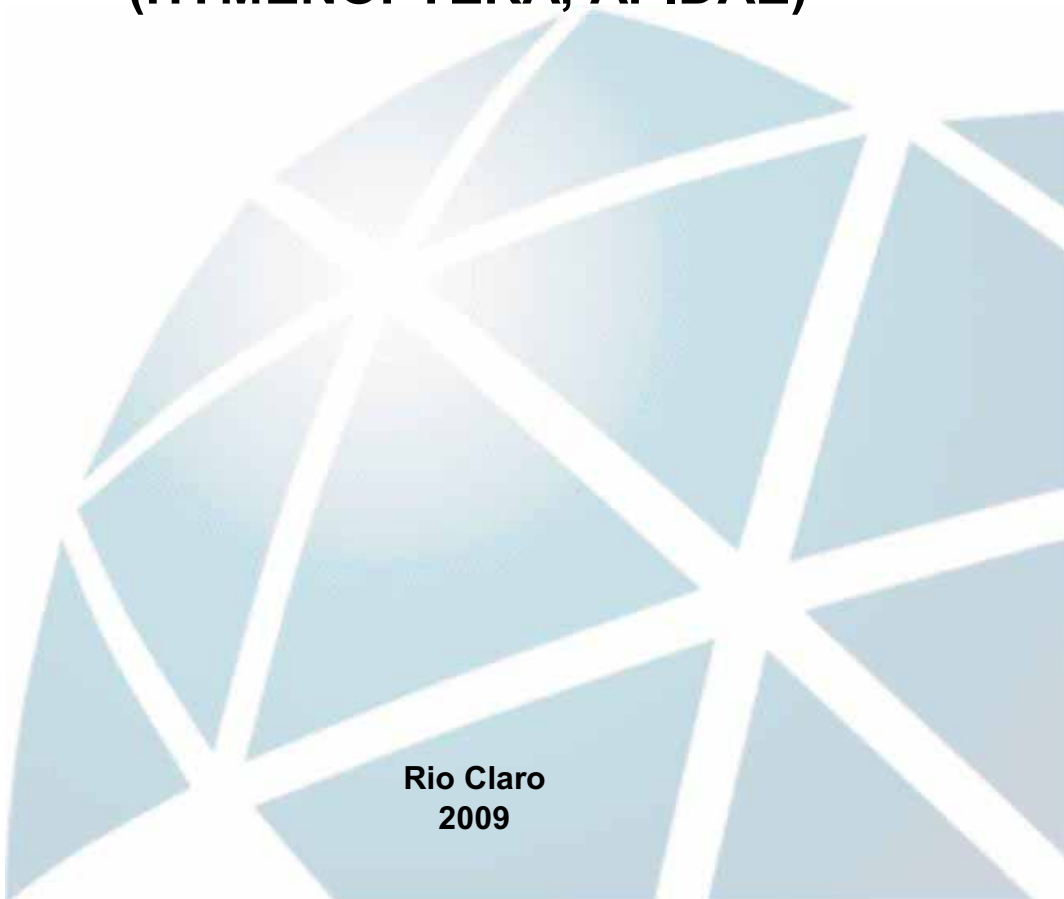

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CYNTHIA RENATA DE OLIVEIRA JACOB

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIÓXIDO
DE CARBONO NO SISTEMA NERVOSO
DE *Apis mellifera*
(HYMENOPTERA, APIDAE)”**



Rio Claro
2009

CYNTHIA RENATA DE OLIVEIRA JACOB

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DIÓXIDO DE CARBONO NO
SISTEMA NERVOSO DE *Apis mellifera*
(HYMENOPTERA, APIDAE).

Orientador: Prof Dr. OSMAR MALASPINA

Co-orientador: Dra. ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOCELLI

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - *Campus* de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2009

595.799 Jacob, Cynthia Renata de Oliveira
J15a Avaliação da toxicidade do dióxido de carbono no sistema nervoso de
Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae) / Cynthia Renata de Oliveira Jacob.
- Rio Claro : [s.n.], 2009
53 f. : il., gráfs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Co-Orientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Abelha. 2. Sistema nervoso de insetos. 3. Dióxido de carbono. 4.
Proteína c-Fos. I. Título.

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

*Dedico este trabalho aos meus pais José Maria Jacob e
Luiza Aparecida de Oliveira Jacob e aos meus avós Paulo Jacob
e Benedita Lopes Jacob (in memoriam) sem os quais não estaria aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, além da força e coragem de continuar a batalha de cada dia.

Aos meus pais Luiza e José e irmã Jéssica pelo apoio, paciência, preocupação e encorajamento nos momentos de desânimo, pelo carinho e cuidados até hoje.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Osmar Malaspina e co-orientadora Dra. Roberta Nocelli pelos ensinamentos, confiança e direcionamento.

Ao Prof Mario Sergio Palma pelo suporte e permissão para utilização do laboratório do CEIS durante os experimentos e ao técnico Antônio Sérgio Pascon pelas coletas, amizade e paciência durante esses anos.

Aos alunos do Curso de Ciências Biológicas Noturno 2005 em especial a Leila Miguel Stávale, Wagner Paschoal de Andrade Antonio, Priscila Felipe Silva (Fuka), Ana Carolina Amaral Pereira, Gabrielle Silveira de Paula e amigos Thaís Nícia Azevedo, Andréa Tonda, Cíntia Castanho, Rafaela Almeida que fizeram destes cinco anos cheios de muitas risadas e conversas que me fizeram mudar, crescer e ver que posso muito mais do que imaginava, sinceramente não sei como agradecer por tudo!

À Hellen Maria Soares, minha companheira de todas as horas, que muito me ajudou na realização deste projeto, agradeço pelas risadas, compreensão, conversas, paciência e especialmente pela amizade sincera.

Aos amigos que mesmo longe e pouco contato, sempre são lembrados com carinho e saudade.

Aos meus familiares que desde o início sempre me deram força e torceram pelo meu sucesso.

Meu muito obrigada a todos vocês, que levarei sempre no coração.

*Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas;
para os cientistas, no final de toda a reflexão."
(Max Planck).*

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	08
2. INTRODUÇÃO.....	11
3. OBJETIVOS.....	21
4. JUSTIFICATIVA.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS	
5.1 Material Biológico.....	25
5.2 Obtenção dos animais.....	25
5.3 Microtomia.....	25
5.4 Imunohistoquímica.....	26
5.5 Aquisição de Imagens.....	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
7. TABELAS E FIGURAS	
7.1 Tabela 01.....	34
7.2 Tabela 02.....	35
7.3 Tabela 03	35
7.4 Figura 01.....	36
7.5 Figura 02	36
7.6 Figura 03	37
7.7 Figura 04.....	38
7.8 Figura 05.....	39
7.9 Figura 06.....	40
7.10 Figura 07	41
8. CONCLUSÕES.....	43
9. REFERÊNCIAS.....	45

Resumo

Resumo

A concentração de dióxido de carbono (CO_2) global eleva-se a cada ano, isso deve-se a um desequilíbrio entre as taxas de emissão deste gás por atividades antropogênicas e fontes naturais e a taxa que a biosfera e oceanos o removem da atmosfera. O CO_2 é um importante constituinte químico do ambiente, pois este é um gás que aprisiona radiação infravermelha emitida pela superfície da Terra, contribuindo, assim, para a manutenção da temperatura global necessária a vida. As alterações na concentração de CO_2 na atmosfera afetam inúmeros animais que dependem que estas estejam altamente controladas para poderem sobreviver. Em abelhas *Apis mellifera* valores elevados de temperatura ou níveis de CO_2 dentro da colméia podem ter efeitos deletérios. Estes insetos são considerados bioindicadores naturais, pois apresentam diferenças fisiológicas conforme as condições do ambiente, sendo utilizadas na avaliação de efeitos a várias substâncias presentes no meio. Atualmente uma das técnicas utilizadas para a avaliação do efeito de estímulos externos é a utilização da marcação da proteína c-Fos através da expressão do gene *c-fos*, que indicam tanto a existência de atividade celular como também possibilita a identificação de áreas cerebrais determinadas. Esta proteína foi utilizada com o intuito de verificar se concentrações elevadas de gás carbônico são capazes de alterar as funções cerebrais da abelha *Apis mellifera*, comprometendo sua atividade de orientação e, conseqüentemente seu forrageamento. Marcações positivas à proteína Fos foram observadas nas regiões dos lobos ópticos e ocelos tanto do grupo controle quanto dos grupos

expostos ao gás dióxido de carbono para todas as idades coletadas, estes resultados estão relacionados com a variação da intensidade luminosa, que neste caso constitui um fator estressante para estes insetos. Nos corpos pedunculados e lobos antenais as marcações foram observadas principalmente em indivíduos a partir de 21 dias de idade, tal fato está, possivelmente, relacionado com a função destas estruturas como centros de integração de informações multimodais e de integração primários do sistema olfativo respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação do dióxido de carbono não altera a morfologia do cérebro de *Apis mellifera*, assim como não foram observadas um padrão significativo de expressão da proteína Fos em relação a exposição ao gás nos diferentes tempos, bem como mudanças quanto a aprendizagem e orientação destes insetos, sendo necessário a associação de outras metodologias de avaliação de atividade neural à marcação da proteína Fos.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, dióxido de carbono, proteína c-Fos.

Introdução

Introdução

O estado da atmosfera e biosfera terrestre tem passado por diversas alterações, desde a Revolução Industrial a média da concentração de dióxido de carbono (CO₂) global aumentou aproximadamente de 280 ppm para 368 ppm (BALDOCCHI et al, 2001; GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008), com uma elevação de cerca de 2 ppm por ano (GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008). Essas mudanças na concentração de CO₂ atmosférico ocorrem devido a um desequilíbrio entre as taxas de emissão deste gás por atividades antropogênicas e fontes naturais e a taxa que a biosfera e oceanos o removem da atmosfera (BALDOCCHI et al, 2001).

O CO₂ é um importante constituinte químico do ambiente, sua importância deve-se por este ser um gás que aprisiona radiação infravermelha emitida pela superfície da Terra, contribuindo, assim, para a manutenção da temperatura global necessária a vida (CARVALHO; LACAVA, 2003).

O aumento do nível de CO₂ e outros gases do efeito estufa preocupam cientistas e políticos, uma vez que são responsáveis por alterações climáticas, derretimento das calotas polares, elevação do nível do mar, além de alterações fisiológicas de plantas e ecossistemas, permanecendo como foco de debates (BALDOCCHI et al, 2001). Essas alterações afetam inúmeros animais que dependem de concentrações de CO₂ altamente controladas para sobreviver.

Naturalmente ocorre a liberação natural de dióxido de carbono pelas abelhas (respiração) e o aumento de sua concentração no interior da colméia (resultante do aumento do metabolismo) desencadeia como resposta a ventilação, ou abanamento (FREE, 1980), este comportamento, entre os insetos sociais, está envolvido com o controle na variação ambiental no interior do ninho. Essa resposta ocorre, pois valores elevados de temperatura ou níveis de CO₂ dentro da colméia podem ter efeitos deletérios, assim, a regulação depende da ventilação coletiva entre as operárias próximas à entrada da colméia, promovendo a circulação do ar e a diminuição da concentração de CO₂ (SEELEY, 1974 e GUERENSTEIN, HILDEBRAND, 2008). Variações nas concentrações desse gás resultam em

modificações fisiológicas nas abelhas, a partir desse princípio é que se utiliza o CO₂ como agente anestésico para insetos.

É comum a prática de anestesia de insetos com a exposição a elevadas concentrações de CO₂ ou baixas temperaturas. Tanto adultos como larvas respondem rapidamente a essa exposição, tornando-se paralisado e não responsivo a estímulos sensoriais (BADRE et al, 2005). Sillans e Biston (1979, apud BADRE et al, 2005) propuseram que em insetos o CO₂ poderia ter relação direta com a função neural o que conseqüentemente alteraria a função corporal.

Após anos de estudos e pesquisas envolvendo CO₂ e sua possível ação nos insetos, o mecanismo de transdução de seu estímulo e o processamento de sinais cerebrais foi avaliado (GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008). Recentemente receptores sensíveis ao CO₂ foram localizados na superfície de insetos adultos e tem sido anatomicamente e fisiologicamente caracterizados (STANGE; STOWE, 1999; BUSTAMI et al, 2002).

Diversos estudos enfatizam a função e a influência do CO₂ ambiental no comportamento biológico de insetos, incluindo abelhas, formigas e mosquitos vetores de doenças. Existem evidências que sugerem múltiplos papéis nessa interação (STANGE, 1996; GUERENSTEIN et al, 2004; GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008).

Trabalhos como o de Stange et al (1995) (apud GUERENSTEIN; HILDEBRAND, 2008) sugerem que uma das funções do CO₂ está relacionada com o comportamento de ovoposição de mariposas e insetos herbívoros parasitas de frutas que seriam capazes de perceber a magnitude de CO₂ associado à planta ou fruto. Além deste, observou-se que larvas de coleóptero usam esse gás como sinalização para encontrar fonte de alimento, tendo, assim, um importante papel no forrageamento desses insetos. Respostas ao CO₂ durante o forrageamento também são encontrados em abelhas, mosquitos hematófagos e outros insetos (BADRE et al, 2005).

Pesquisas sugerem que o dióxido de carbono é um importante fator exógeno e que participa na modulação de variados aspectos da vida social dos insetos. Partindo dessa hipótese evidências foram obtidas quanto a alterações no mecanismo de ativação do ovário de operárias e rainhas através de intermediários moleculares do CO₂ (KOYWIWATTRAKUL et al, 2005), aumento no nível desse gás

no interior do ninho provoca respostas para sua diminuição, como o comportamento de ventilação (SEELEY, 1974), tem efeitos no forrageamento precoce (EBADI, 1980) e no polietismo etário (RIBBANDS, 1950) através da alteração do nível de hormônio juvenil presente na hemolinfa do inseto (KOYWIWATTRAKUL et al, 2005). Combinados, esses estudos sugerem que o CO₂ é um fator na modulação de especialização de tarefas.

Por apresentarem células especializadas na detecção de CO₂ no ambiente, diferenças fisiológicas conforme as condições do ambiente e um sistema nervoso bastante complexo, as abelhas *Apis mellifera* são consideradas bioindicadores naturais, sendo utilizadas como classificadores e na avaliação de efeitos a várias substâncias presentes no ambiente.

As abelhas são insetos holometábolos, ou seja, realizam metamorfose completa, onde cada indivíduo passa pelo estágio de ovo, larva, pupa e adulto (MICHENER, 1974).

Sua organização social faz com que existam em cada colméia três tipos de indivíduos ou castas: as operárias, os zangões ou machos e uma rainha (CAMARGO; STORT, 1973) onde são notadas diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais, resultando numa divisão nítida de trabalho entre elas (FREE, 1980).

A rainha é a casta mais longa e tem a função exclusiva de pôr ovos e durante vários anos ela desempenha esse papel. A longevidade dos zangões é menor e possuem a função de fecundar a rainha (CAMARGO; STORT, 1973). As operárias não se especializam em tarefas particulares, mas a cada idade realizam uma variedade de tarefas diferentes, sendo que nas primeiras duas ou três semanas ocupam-se com a construção de favos, depois com a alimentação da cria e posteriormente com forrageamento e transporte de alimento. Sua longevidade está relacionada com a estação do ano e a disponibilidade de alimento (FREE, 1980).

Devido a sua grande capacidade de adaptação a diferentes climas, a *Apis mellifera* africanizada é a variedade mais amplamente distribuída (FREE, 1980) e uma das mais estudadas devido a sua importância econômica (CAMARGO; STORT, 1973). Esse híbrido passou a dominar a apicultura nacional a partir dos anos 70 e responde pela maior parte da produção de mel brasileiro (PIRANI; CORTOPASSI, 1993). Além deste, outros produtos e subprodutos como o própolis,

cera, geléia real e o veneno de abelhas são utilizados pela indústria de cosméticos e fármacos, todos visando suas propriedades terapêuticas (CRANE, 1996). No entanto, seu grande papel econômico é como agente polinizador, onde estima-se que seja responsável por 70% da produção mundial de alimentos.

Para desempenhar diferentes tarefas ao longo de sua vida e manter uma organização social altamente complexa, existe a necessidade de um sistema de controle da colméia refinado, assim como um sistema de orientação para o forrageamento elaborado, as abelhas apresentam um sistema nervoso bastante complexo.

O sistema nervoso de insetos é organizado em Sistema Nervoso Central e Periférico, assim como em vertebrados (CRUZ-LANDIM, 2009), constituído basicamente por dois tipos celulares, sendo os neurônios a unidade fundamental, apresentando morfologia e função especializada na percepção e condução de estímulos e as células glia ou neuroglias que ocupam os espaços entre os neurônios e têm a função de sustentação, isolamento entre outras (KRETZSCHMAR; PFLUGFELDER, 2002).

O padrão geral de organização do sistema nervoso de abelhas adultas é basicamente o mesmo existente no larval, embora ocorra uma reestruturação durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009). Além do cérebro, situado dorsalmente na cabeça, o sistema nervoso central é constituído pela cadeia nervosa ventral e pelo sistema estomogástrico (CHAPMAN, 1998).

O cérebro de operárias ocupa um volume de 1 mm^3 e apresenta cerca de 1 mg, sendo o número de neurônios estimado em 850-950.000 (RIBI et al, 2008). Ele é constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominada de somata, e as regiões que contêm os prolongamentos celulares chamados de neurólipas (CHAPMAN, 1998; MACHADO, 2006). Em abelhas adultas, é formado pela fusão de três gânglios e apresentam três regiões distintas: o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro.

A região do protocérebro apresenta projeções laterais que correspondem aos lobos ópticos, estes possuem estrutura complexa e contêm elementos nervosos que formam os olhos compostos, responsáveis pela captação de estímulos visuais. A região do deutocérebro apresenta os lobos antenais, estas são estruturas esféricas que recebem estímulos olfatórios captados por neurônios sensitivos presentes nas

antenas e nas estruturas da boca (RIBI et al, 2008). O tritocérebro é uma pequena região composta por um par de lobos localizados ventralmente aos lobos antenais e paralelamente ao esôfago, esta porção do sistema nervoso fica localizada fora do corpo do cérebro e apresenta elementos motores e sensoriais que o ligam ao sistema estomogástrico (CRUZ-LANDIM, 2009).

Na região relacionada à fotorrecepção os insetos apresentam duas estruturas: os olhos compostos e os ocelos. Os olhos compostos são formados por um complexo arranjo celular e estão localizados dorsolateralmente no crânio. Os lobos ópticos (LO) constituem uma massa de fibras e células nervosas que formam três camadas internas conhecidas como lâmina, medula e lóbulo, onde existem receptores específicos para os estímulos enviados pelos fotorreceptores da camada externa, a retina. A retina é formada por lentes ópticas, células pigmentadas e fotorreceptores arranjados em unidades oculares, chamadas de omatídeos. (CRUZ-LANDIM et al, 1979 apud ROAT, 2008).

Nas abelhas os olhos compostos são formados por um número variável de omatídeos, variando entre as espécies e no caso de *Apis mellifera* entre o sexo e as castas. A acuidade visual está relacionada ao número dessas unidades básicas, ou seja, quanto maior o seu número, melhor a imagem formada, assim, o maior número de omatídeos em operárias está relacionado à utilização da informação visual em suas atividades (CRUZ-LANDIM, 2009).

Muitos insetos apresentam ocelos em adição aos seus olhos compostos, geralmente três situados anteriormente no topo da cabeça (observado nas operárias e rainha de *Apis mellifera*) formando um triângulo (GULLAN; CRANSTON, 2005). Eles apresentam uma lente convexa colocada sobre uma camada de células vítreas e abaixo destas encontra-se a camada retinular, que em *Apis mellifera* é formada por cerca de 80 retínulas, constituída por dendritos modificados dos neurônios fotorreceptores (CRUZ-LANDIM, 2009). Segundo Wilson (1978) e Laughlin (1981) (apud MOBBS, 1985) suas pesquisas demonstraram que essas estruturas apresentam ótima sensibilidade para mudanças na iluminação com diferentes intensidades, além de combinar com uma resolução espacial possibilitando um monitoramento das posições horizontais durante o voo. Estes são moduladores de sensibilidade dos olhos compostos, receptores que participam do ciclo circadiano, detectores de alta sensibilidade para locais de baixa intensidade luminosa (níveis

abaixo da taxa funcional dos olhos compostos) e detectores de polarização de elevados níveis de luz (MOBBS, 1985). Em insetos voadores, o ocelo, situado no topo da cabeça, pode monitorar a posição no horizonte e funcionar através de conexões com centros motores para manter a orientação durante o voo (DALY et al, 1998).

Outra estrutura que atualmente tem despertado interesse são os corpos pedunculados (CP), que consistem em três divisões principais: uma região em forma de copo, chamada de cálice, uma haste ou pedúnculo e os lobos. Em abelhas existem dois pares de cálices, sendo um em cada lado do protocérebro, em outras espécies os cálices podem ser únicos (MOBBS, 1985; FAHRBACH, 2006). No interior dos cálices existem as células Kenyon ou interneurônios consistem em milhões de pequenas células nervosas intrínsecas (ZARS, 2000). Em abelhas essa região do protocérebro é formado por três tipos de interneurônios facilmente identificadas pelo tamanho e localização de seus corpos celulares, uma sub população com pequenos corpos celulares (compactos) presentes no centro do cálice e o restante do cálice é preenchido por células com grandes corpos celulares (não-compactos). Outra sub população de células Kenyon com pequenos corpos celulares ficam no exterior do cálice (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; KIYA, 2007).

O tamanho relativo do CP está relacionado com a complexidade do comportamento dos insetos como a organização social. (FARRIS, 2008; CRUZ-LANDIM, 2009). Em abelhas e vespas os cálices do CP são grandes representando cerca de 40% dos neurônios cerebrais de operárias. Ao comparar o tamanho relativo desta estrutura entre operárias, rainhas e zangões de *Apis mellifera* verifica-se que estas são maiores em operárias, as quais apresentam comportamentos mais diversificados dentro da colméia (CRUZ-LANDIM, 2009).

Os lobos antenais (LA) são regiões também de importância no papel de interação entre insetos e o ambiente. Os LA formam centros de integração primários para o sistema olfativo, esta região apresenta semelhanças não apenas quanto à organização morfológica como também no número de propriedades fisiológicas básicas presentes em vertebrados (bulbo olfativo) e outros artrópodes (LA), (GALIZIA et al, 1999; MICHAELIS et al, 2005) tendo os glomérulos como locais de integração sináptica entre os terminais olfativos (LAISSUE et al, 1999).

A função dessas regiões, particularmente no processo de olfação, aprendizagem e memória tem sido explorada e uma variedade de modelos de estudos está fornecendo detalhes sobre sua estrutura e conexões com o cérebro (FARRIS, 2008).

As abelhas são modelos importantes na neurobiologia, isto se deve ao seu sistema nervoso relativamente simples, em termos de estrutura e número de células nervosas, quando comparado ao cérebro humano, apresentando surpreendentes aprendizados, memória e habilidades cognitivas como comunicação, navegação e outras. Estes fatores influenciaram desde o século XVII, e principalmente no XIX a realização de diversos trabalhos sobre a anatomia do cérebro desses insetos através de dissecações, investigações histológicas e reconstruções cerebrais (RIBI et al, 2008).

Atualmente uma das técnicas utilizadas para a avaliação do efeito de estímulos externos, mapeamento de atividade celular, identificação de áreas cerebrais determinadas e no mapeamento de funções anatômicas do cérebro é a utilização da marcação da proteína c-Fos através da expressão do gene *c-fos* (HOFFMAN et al, 1993). A descoberta de que os neurônios expressam esse gene quando estimulado adicionou uma nova dimensão ao conceito da neuroanatomia funcional (HOFFMAN; LYO, 2002).

O gene *c-fos* foi identificado originalmente em vertebrados, como um oncogene celular homólogo ao *v-fos* (ORDWAY et al, 2005), este foi isolado em 1982 do vírus causador do sarcoma osteogênico murino (CURRAN, 1982; HEDERGEN; LEAH, 1998), e que codifica fosfoproteínas causadoras de tumores (CURRAN et al, 1982). O *c-fos* produz a proteína Fos (380 aminoácidos) que atua como regulador transcricional através de sua interação com outros fatores nucleares (SETOYAMA et al, 1986).

Esse gene é transitório e rapidamente expresso em muitos tecidos em resposta a variados estímulos, como proliferação celular (MÜLLER et al, 1984), diferenciação, apoptose (ORDWAY et al, 2005), estresse, despolarização neural (KOVÁCS, 1998) e outros. É considerado um IEG, ou seja, um gene de expressão imediata que é ativado rapidamente, cerca de 15 minutos, (BASBOUS et al, 2008) e por períodos breves de estimulação, codificando proteínas denominadas fatores de

transcrição induzível que são capazes de controlar a expressão de outros genes que se expressam tardiamente (SHENG; GREENBERG, 1990).

Fatores de transcrição induzível, como a proteína Fos, necessitam se associar a fatores de mesma ordem antes de se unir ao DNA e iniciar a expressão de determinado gene (HERDEGEN; LEAH, 1998). A proteína Fos liga-se, através de um zíper de leucina, com a proteína c-Jun codificada pelo gene *c-jun*, formando assim um heterodímero (PRADO; DEL BEL, 1998).

O heterodímero resultante, denominado de Ativador da Proteína-1 ou AP-1 (SAGAR et al, 1988), liga-se com afinidade e especificidade a determinada sequência do DNA sendo responsável pela transcrição de muitas proteínas e pela regulação da expressão do gene em resposta a sinais extracelulares (RAUSCHER et al, 1988; HERDEGEN; LEAH, 1998).

A partir de estudos realizados com vertebrados e a verificação da associação da expressão do gene fos em variados processos celulares, estudiosos como Perkins et al (1988) passaram a mostrar a presença de fatores transcrpcionais análogos ao Fos e Jun em embriões de drosófila e posteriormente outros estudos como o de Fonta et al (1995), Bidmon et al (1991); Cymborowski e King (1996) tem sido desenvolvidos com o intuito de entender semelhanças entre o gene fos de insetos e mamíferos, e sua função nesses organismos.

A expressão basal do RNAm c-fos e da proteína Fos é relativamente baixa na maior parte do sistema nervoso (KOVÁCS, 1998), sendo que a maioria dos neurônios pouco expressam essa proteína em condições normais (MORGAN et al, 1987), porém quando ocorrem estimulações diversas, a expressão de Fos é rapidamente induzida (ORDWAY et al, 2005), assim cientistas podem examinar a atividade de neurônios dentro de múltiplos locais do sistema nervoso e identificar especificamente os neurônios que estão ativados pelo estímulo, avaliando informações de como, quando e onde o estímulo do sistema neuroendócrino foi processado (HOFFMAN; LYO, 2002). Esses são alguns dos motivos pelo qual a proteína Fos é utilizada como marcador de atividade celular, identificação de áreas cerebrais determinadas e no mapeamento de funções anatômicas do cérebro (HOFFMAN et al, 1993).

Outra importância do gene fos é sua participação no armazenamento de informações, na percepção de mudanças externas, no processo adaptativo, no

aprendizado e influência em atividades neurais que podem resultar em mudanças duradouras no sistema nervoso (HERRERA; ROBERTSON,1996).

Objetivos

Objetivos

Verificar se concentrações elevadas de gás carbônico são capazes de alterar as funções cerebrais da abelha *Apis mellifera*, comprometendo sua atividade de orientação e, conseqüentemente seu forrageamento. Para identificar se as áreas cerebrais responsáveis por estas atividades foram afetadas, utilizou-se uma metodologia para detecção do gene *fos*.

Justificativa

Justificativa

Como a espécie *Apis mellifera* é considerada um eficiente marcador da qualidade ambiental e atualmente cresce a preocupação quanto à poluição atmosférica, e sendo o gene *c-fos* expresso em condições de estresse, é interessante a determinação de sua expressão no sistema nervoso central desses insetos que foram submetidos a tratamentos com diferentes tempos de exposição ao dióxido de carbono, já que este é um dos compostos mais abundantes e apresenta importante participação na poluição atmosférica terrestre e no processo de aquecimento global.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

Material Biológico

Foram utilizados exemplares de operárias de *Apis mellifera* coletadas no apiário do Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Rio Claro. Para mapeamento da expressão do gene *fos* foram coletados exemplares nas fases de recém-emergida e forrageira submetidas a diferentes tempos de exposição ao gás carbônico na fase de recém-emergida.

Obtenção dos animais

Favos limpos foram introduzidos em colméias em plena atividade para que suas rainhas realizassem a postura e transferidos 24 horas depois, para as áreas de recria, onde foram monitorados para obtenção de operárias com idades controladas.

A exposição ao dióxido de carbono foi realizada da seguinte maneira:

- Um primeiro grupo composto de abelhas em fase de recém-emergidas foi exposto ao gás carbônico pelos tempos de 30 segundos, 1 minuto, 1 minuto e meio e 2 minutos e os exemplares foram coletados na fase de recém-emergida, aos 21, 28 e 35 dias de idade.
- Um segundo grupo foi mantido, manipulado e coletado nos mesmos períodos, mas não foi exposto ao gás carbônico, funcionando como grupo controle.

Microtomia

Após coleta dos animais nas idades mencionadas, os cérebros foram dissecados e colocados em fixador paraformaldeído 4% (Sigma) durante aproximadamente 48 horas e transferido para solução tampão, sendo posteriormente submetidos a desidratação com concentrações crescentes de álcool e dois banhos de xilol, com duração de 20 minutos cada etapa e inclusão

em paraplast (Merck). Os cortes foram realizados em micrótomo Leica com espessura de aproximadamente 6µm e colocados sobre lâmina histológica. As lâminas permaneceram na estufa com temperatura aproximada de 37°C por uma noite para secagem completa da polilisina utilizada para a melhor fixação dos cortes as lâminas. Após essa fase os cortes foram submetidos a desparafinização utilizando concentrações decrescente de álcool e xilol com tempos aproximados de 20 minutos cada etapa e deixados para secar em estufa.

Imunohistoquímica

Os cortes foram incubados em solução de água oxigenada 0,3% durante 10 minutos, sendo posteriormente transferidos para uma solução bloqueadora contendo soro normal de cabra anti-coelho (Laboratório Vector) onde permaneceu por 40 minutos. Transcorrido este tempo o material foi lavado e transferido para o anticorpo primário policlonal anti c-Fos (Ab-5) (Calbiochem) por 24 horas sob refrigeração. Após esse tempo ficou por 60 minutos no anticorpo secundário biotilado anti- coelho IgG (Laboratório Vector) e posteriormente exposto ao kit imunoperoxidase (Kit A + B) (Laboratório Vector) também por 60 minutos. Para melhor resultado foi colocado rapidamente numa solução contendo DAB (tetrahydroclorato de diaminobenzidina) (concentração final 0,05%). Durante todo o processo foram realizadas lavagens com KPBS 0,02M (tampão potássio de fosfato pH 7,4) durante 10 minutos cada.

Algumas lâminas foram submetidas a técnica de coloração com hematoxilina, que permaneceu durante 10 minutos nesta solução e posteriormente realizada a técnica de coloração com eosina, durante 5 minutos.

Aquisição de imagens

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmara digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição foi utilizado o software DP Controller. As

imagens foram trabalhadas utilizando-se o programa Corel Draw 11 apenas para ajustes finos, como brilho, contraste e balanço de cores.

Para análise quantitativa de células imunorreativas a fos foram escolhidas fotomicrografias, aumento de 40X, de cada região de interesse. Em cada uma das imagens, o número de células com marcação positiva foram contadas pelo programa Image - Pro 6.3 numa área tecidual de 1001 μm X 1001 μm , zoom de 25%.

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

Foram realizadas aplicações de dióxido de carbono no grupo de recém-emergida nos tempos de 30 segundos, 1 minuto, 1 minuto e meio e 2 minutos. Posteriormente realizou-se a marcação dos indivíduos e a coleta de seis deles, os indivíduos marcados foram devolvidos às suas respectivas colônias e posteriormente, coletados com idades de 21, 28 e 35 dias, seus cérebros dissecados e fixados de acordo com os procedimentos descritos acima, para os quatro diferentes períodos de exposição. Realizou-se o mesmo procedimento de marcação, coleta e preservação com o grupo controle. A desidratação, inclusão, cortes e a montagem de lâminas histológicas destes materiais foram realizadas de acordo com a metodologia citada, assim como as reações de imunohistoquímica e a obtenção de fotomicrografias das lâminas que apresentavam os cortes mais representativos.

Algumas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para observação de alterações morfológicas que não foram verificadas no presente trabalho (**Figura: 01**).

Indivíduos do grupo controle, assim como os grupos submetidos à exposição de diferentes tempos de dióxido de carbono, demonstraram a expressão positiva para a proteína Fos (**Tabela: 01**) nas idades de recém-emergida, 21, 28 e 35 dias com a região lobos ópticos (**Figura: 03**) e dos ocelos (**Figura: 04**) fortemente marcados. Nos lobos ópticos, a marcação foi observada na região de conexão da lâmina com os omatídeos e nas células que o compõem, já na região dos ocelos marcação pode ser observada no local constituído pelos corpos celulares e não na região onde predomina os prolongamentos dessa estrutura.

A verificação de marcação positiva à proteína Fos nas regiões dos lobos ópticos e ocelos do grupo controle e dos grupos expostos ao gás dióxido de carbono foram semelhantes aos observados na região dos LO por Fonta et al (1995) que analisou a expressão da proteína c-Fos em *Apis mellifera*, Cymborowski (1996) em *Calliphora vicina*, Bidmon (1991) em *Manduca sexta*, Nocelli et al (2009) com a expressão basal deste gene em abelhas *Apis mellifera* forrageiras e Soares (2008) que avaliou a presença de Fos após

ingestão de imidaclopride por abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas e forrageiras em diferentes concentrações. Segundo essas pesquisas estes resultados estão relacionados com a variação da intensidade luminosa no momento da manipulação dos insetos. As operárias de *A. mellifera* passam a primeira parte de suas vidas realizando tarefas no interior do ninho e a retirada de indivíduos recém-emergidos do interior da colméia, onde a luminosidade é baixa, constitui um fator estressante.

A marcação da proteína Fos nas regiões dos corpos pedunculados (**Tabela 01, Figura: 05**) foram observadas para indivíduos expostos ao dióxido de carbono nos seguintes tempos e idades: 30 segundos- 21, 35 dias; 1 minuto- RE, 21, 35 dias; 1 minuto e meio- RE, 21, 35 dias; 2 minutos- 28, 35 dias e grupo controle- 21, 28 e 35 dias. Para os lobos antenais (**Tabela 01, Figura: 06**) as marcações foram observadas em: 1 minuto- RE, 21, 35 dias; 1 minuto e meio- RE, 21 dias e grupo controle- 21 e 35 dias. Nos CP a marcação foi observada nas células de Kenyon do interior e borda do cálice. Segundo Farris e Sinkevitch (2003) os CP são constituídos por subpopulações de células Kenyon, com pequenos corpos celulares, residentes no interior do cálice, e o restante preenchido por células com largos corpos celulares, além de uma outra subpopulação com células Kenyon de corpo celular pequeno presente no exterior dos cálices (**Figura 02**). Tais estruturas são associadas às tarefas que requerem certo nível de plasticidade comportamental, como a capacidade de operárias em responder às alterações conforme as necessidades da colônia. Em abelhas, *Apis mellifera*, acredita-se que estas estruturas são centros de integração multimodal por receberem informações olfativas, visuais, gustatórias e provavelmente mecanosensoriais (KOMISCHKE et al, 2005; KIYA, 2007).

Pesquisas com alterações das estruturas neurais ou com o meio de processamento em uma área particular do cérebro podem ajudar a entender as funções desta região. Diversas técnicas de intervenções genéticas com *Drosophila* são desenvolvidas para que ocorram alterações estruturais dos CP, insetos com ausência ou malformação desta estrutura são completamente normais em muitos casos, porém, em poucas situações podem apresentar efeitos prejudiciais no comportamento como o papel da aprendizagem,

memória, distinção olfativa, condição de corte, aprendizado visual e espacial (ZARS, 2000).

Os lobos antenais, assim como os lobos ópticos, desempenham importante papel na interação entre os insetos e o ambiente. Os LA formam centros de integração primários para o sistema olfativo, esta região apresenta semelhanças não apenas quanto à organização morfológica como também no número de propriedades fisiológicas básicas presentes em vertebrados (bulbo olfativo) e outros artrópodes (lobos antenais) (GALIZIA, et al, 1999; MICHAELIS et al, 2005). Tal fato explica o porquê da presença de marcações positivas para c-Fos no somata destas regiões.

A análise dos locais de expressão nos cortes de 28 dias – 1 minuto e meio; RE, 21 dias – 2 minutos, foram prejudicadas por problemas durante a coleta e na preservação do material (**Figura: 07**). A obtenção de exemplares, para realização de uma nova coleta, foi prejudicada pela oscilação da temperatura ambiental. Em períodos de baixa temperatura o número de indivíduos no interior da colméia diminui e operárias se mostram mais sensíveis as mudanças da colônia. A falta de indivíduos nas idades de 28 e 35 dias pode ser explicada também pela interferência do gás no desenvolvimento etário dos indivíduos, levando-os a um forrageamento precoce. Indivíduos que iniciam o forrageamento precocemente também apresentam um ciclo de vida mais curto.

Fotos evidenciando detalhes da marcação da proteína c-Fos (com aumento de 100 vezes) não foram anexadas ao trabalho, pois faltou um contraste para melhorar a visualização, porém a contra coloração de lâminas para esta técnica é inviável, já que seu resultado mascara a observação da proteína Fos nas células do sistema nervoso.

A contagem das células imunorreativas à c-fos restringiu-se apenas para os CP (**Tabela: 02**) e LA (**Tabela: 03**) uma vez que ficou comprovado que a expressão deste gene nos LO e OC é decorrente do estresse luminoso. Devido a dificuldade de preservação dos cortes histológicos, algumas contagens se mostraram inviáveis. Não foram observados padrões na expressão do c-Fos, já que os valores oscilaram consideravelmente. Esta variação na presença de c-Fos também foi verificada no trabalho de Soares (2008) onde esperava-se um aumento na expressão desta proteína em decorrência da exposição ao inseticida imidaclopride, cuja ação no sistema nervoso central é relacionada

com alterações de memória nos insetos. Como no trabalho de Soares (2008), a conclusão deste estudo é que tal proteína não é um bom indicativo das condições ambientais. Apenas com o uso desta técnica não foi possível identificar o quanto da expressão de *fos* foi decorrente do CO₂ e o quanto foi decorrente de outros fatores ambientais. No entanto, estes resultados não descartam a abelha *Apis mellifera* como um potencial sentinela das variações do CO₂ ambiental, sendo necessária a realização de experimentos com intervalos mais curtos entre a exposição ao gás e a coleta dos indivíduos. Além disso, os resultados apontam para a necessidade de uma análise comportamental para se verificar se, logo após a exposição, estes indivíduos são capazes de desempenhar normalmente suas atividades de acordo com o polietismo etário existente.

Outro fato a ser verificado é de que o CO₂ pode afetar as abelhas momentaneamente. Após cessar a aplicação deste gás o cérebro pode se recuperar não refletindo uma atividade diferencial dos neurônios nas abelhas forrageiras. É comum a prática de anestesia de insetos com a exposição a elevadas concentrações de CO₂. Os insetos tornam-se paralisados e não responsivos a estímulos sensoriais (BADRE et al, 2005) apenas por alguns minutos.

Tabelas e Figuras

Regiões de marcação positiva para a proteína c-Fos				
Controle				
Idade	Lobo Óptico	Lobo Antenal	Ocelo	Corpo Pedunculado
RE	X	-	X	-
21 dias	X	X	X	X
28 dias	X	X	X	X
35 dias	X	-	X	X
30 segundos				
RE	X	-	X	-
21 dias	X	-	X	X
28 dias	X	-	X	-
35 dias	X	-	X	X
1 minuto				
RE	X	X	X	X
21 dias	X	X	X	X
28 dias	X	-	X	-
35 dias	X	X	X	X
1 minuto e meio				
RE	X	X	X	X
21 dias	X	X	X	X
28 dias	X	-	X	-
35 dias	X	-	X	X
2 minutos				
RE	X	-	X	-
21 dias	X	-	X	-
28 dias	X	-	X	X
35 dias	X	-	X	X

TABELA 01: Regiões do cérebro de abelhas dos grupos controle e expostas ao CO₂ na fase de recém-emergida onde observou-se a marcação positiva para a proteína c-Fos. Marcação positiva (X) e ausência de marcação (-).

Expressão do c-Fos nos Corpos Pedunculados										
Idade	Controle		30 segundos		1 minuto		1 minuto e meio		2 minutos	
RE	-	-	0	0	47	49	11	28	-	-
21 dias	39	93	0	15	0	38	41	73	-	-
28 dias	1	146	0	0	-	-	-	-	28	77
35 dias	13	102	0	109	19	57	0	30	31	41

TABELA 02: Contagem da expressão da proteína c-Fos na região dos corpos pedunculados de indivíduos dos grupos controle e expostos ao dióxido de carbono na fase de recém-emergida. (-) indica a ausência de lâminas para a análise.

Expressão do c-Fos nos Lobos Antenais										
Idade	Controle		30 segundos		1 minuto		1 minuto e meio		2 minutos	
RE	-	-	0	0	0	20	29	106	-	-
21 dias	1	4	0	0	0	6	20	47	-	-
28 dias	26	59	0	0	-	-	-	-	-	-
35 dias	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0

TABELA 03: Contagem da expressão da proteína c-Fos na região dos lobos antenais de indivíduos dos grupos controle e expostos ao dióxido de carbono na fase de recém-emergida. (-) indica a ausência de lâminas para a análise.

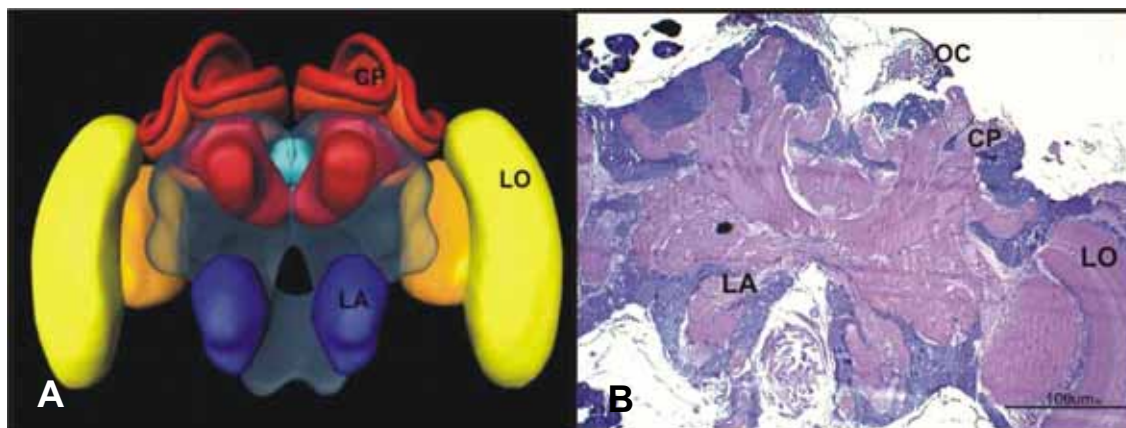


FIG 01: Modelo tridimensional do sistema nervoso de abelha *Apis mellifera* (BRANDT, R. et al, 2005) (A) e fotomicrografia com visão geral, corada com hematoxilina/ eosina (B), mostrando as regiões dos Lobos ópticos (LO), Lobos antenais (LA), Corpos pedunculados (CP) e ocelo (OC).

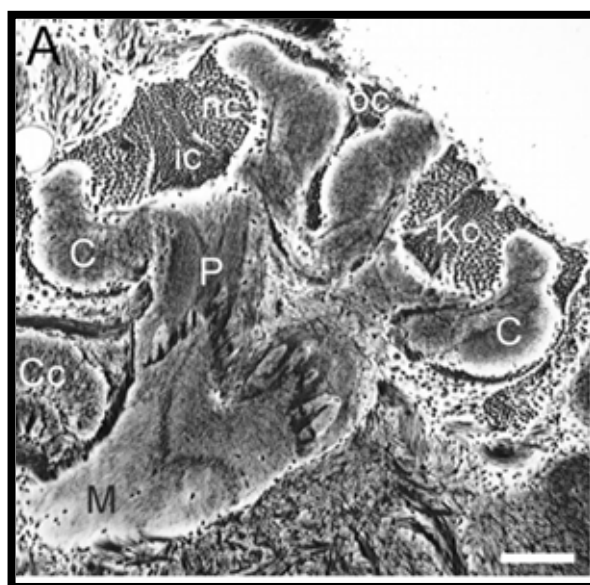


FIG 02: Secção frontal do corpo pedunculado de um dos hemisférios do cérebro de abelha *Apis mellifera* no nível do lobo medial (M), Nesta espécie o somata das células de Kenyon (Kc) podem ser subdivididos dentro de três subpopulações (oc, nc, ic) baseado no tamanho e localização de cada uma no cálice (C). Os dendritos das células de Kenyon penetram nos cálices e seus axônios continuam para o interior de pequenos pedúnculos (P), onde eles bifurcam para o lobo medias e vertical (FONTE: FARRIS; SINAKEVITCH, 2003).

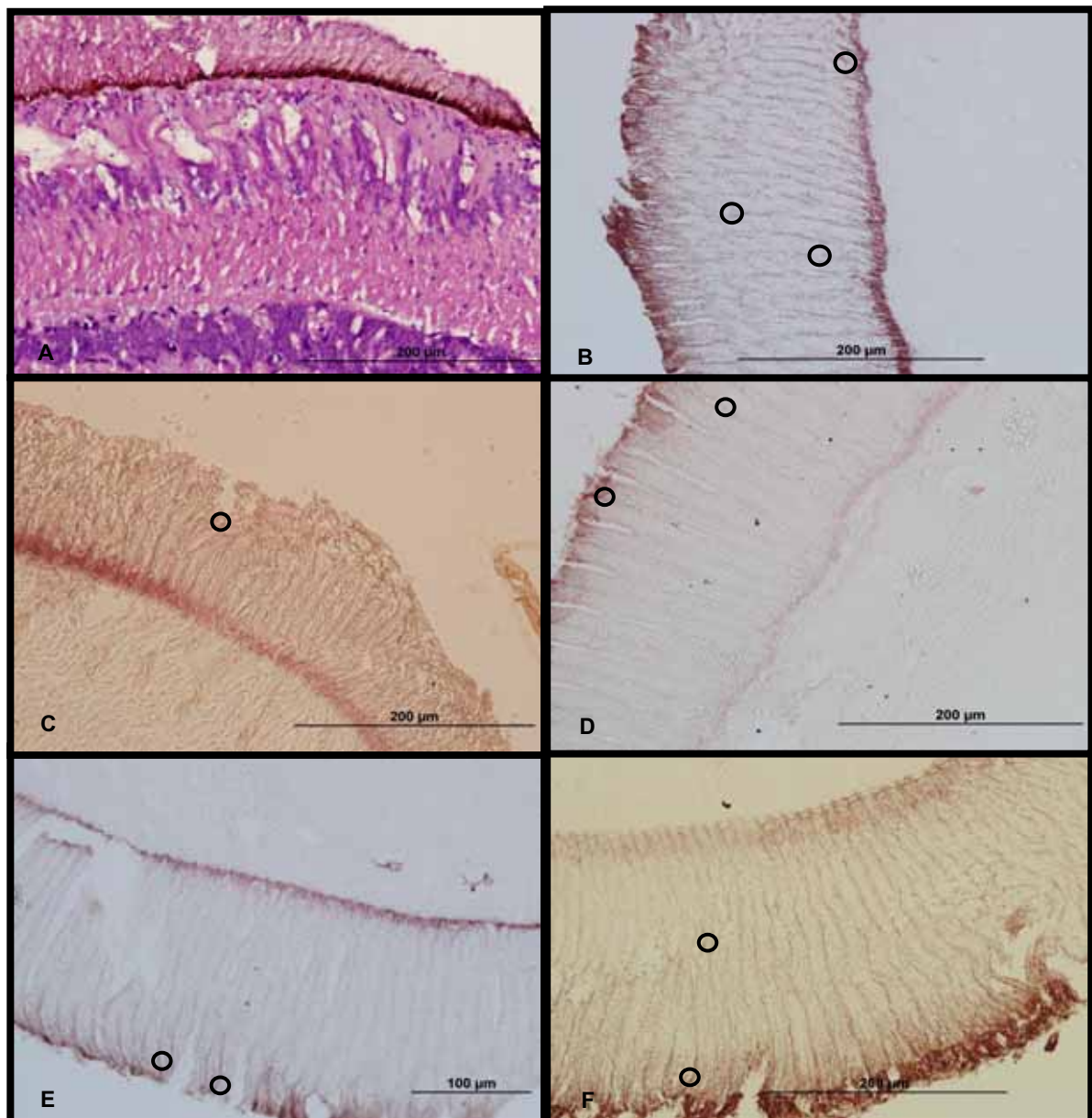


FIG 03: Fotomicrografia da região do lobo óptico corado com hematoxilina e eosina (**A**). Marcação através de técnica de imunohistoquímica da proteína c-Fos em indivíduo exposto ao dióxido de carbono durante 30 segundos (**B**), 1 minuto (**C**), 1 minuto e meio (**D**) e 2 minutos (**E**).

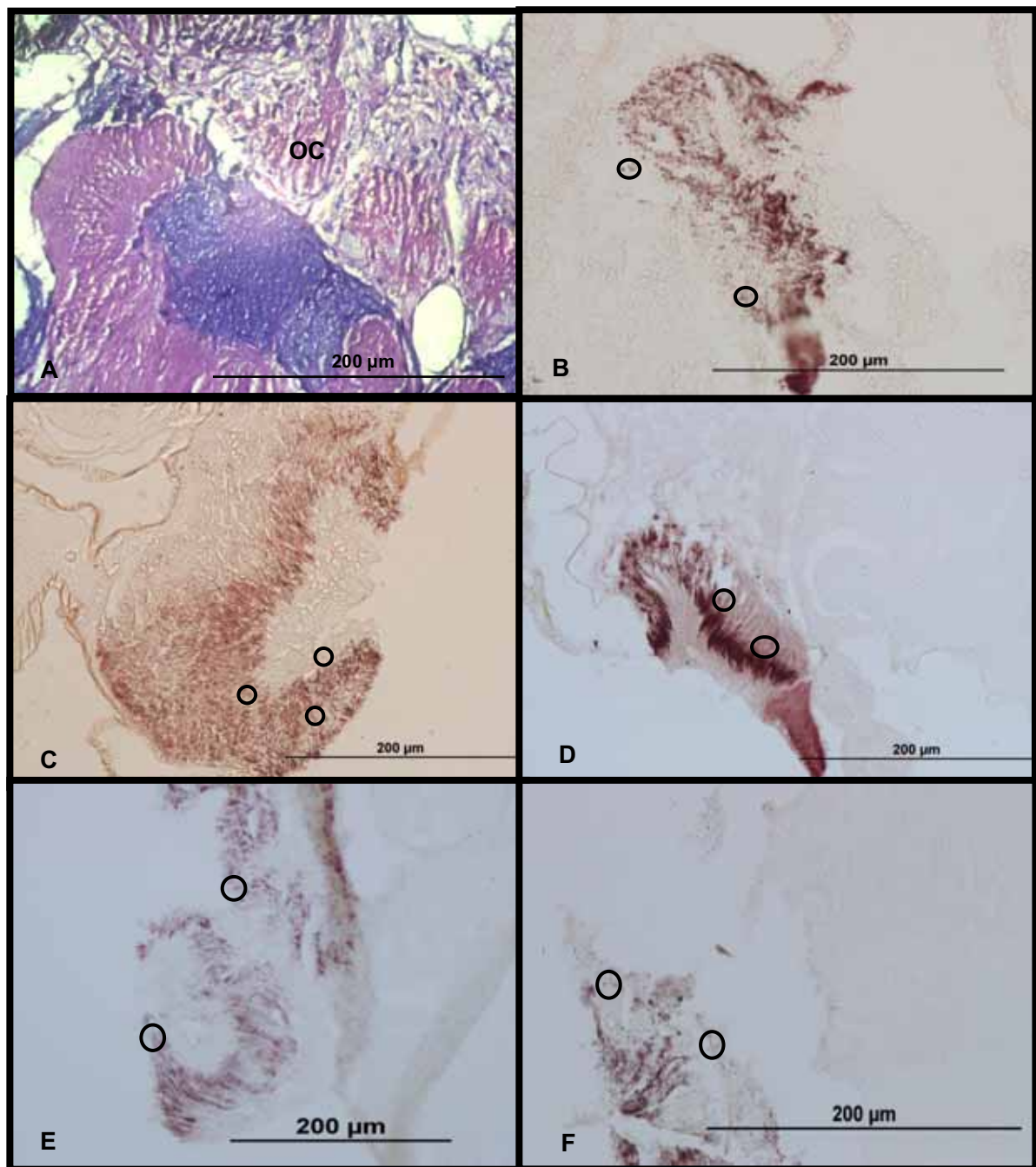


FIG 04: Fotomicrografia da região do ocelo corado com hematoxilina e eosina (A). Marcação através de técnica de imunohistoquímica a proteína c-Fos em indivíduo exposto ao dióxido de carbono durante 30 segundos (B), 1 minuto (C), 1 minuto e meio (D) e 2 minutos (E). Os círculos indicam as células que expressam a proteína.

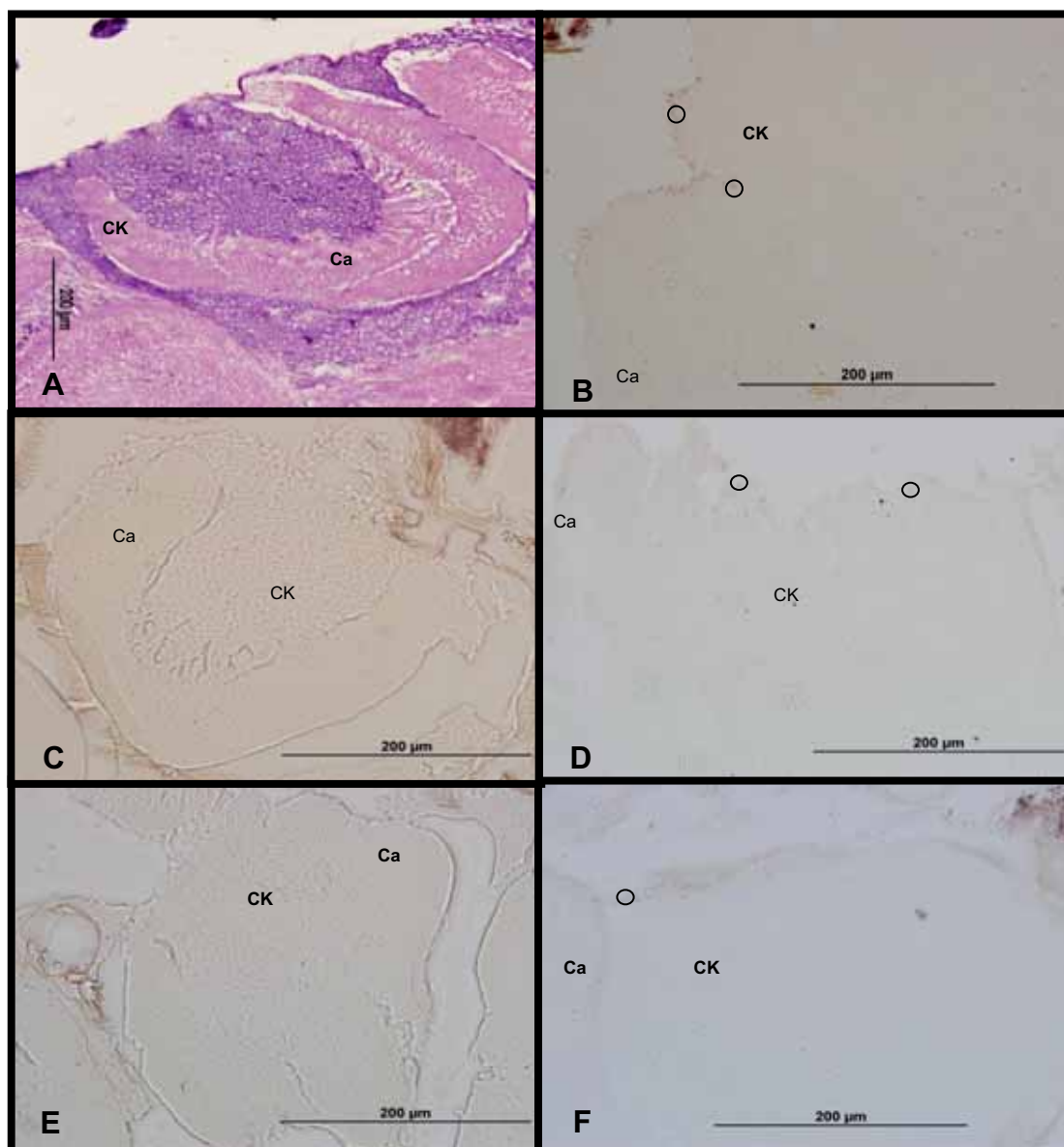


FIG 05: Fotomicrografia da região do corpo pedunculado de indivíduos expostos ao dióxido de carbono durante a fase de recém-emergida corado com hematoxilina e eosina (A) e marcação através de técnica de imunohistoquímica da proteína c-Fos no cérebro de indivíduos de grupo controle (B), do grupo exposto a 30 segundos (C), 1 minuto (D), 1 minuto e meio (E) e 2 minutos (F) de abelhas coletas com 35 dias de idade. Região das Células de Kenyon (CK). Região do Cálice (Ca). Os círculos indicam as células que expressaram a proteína.

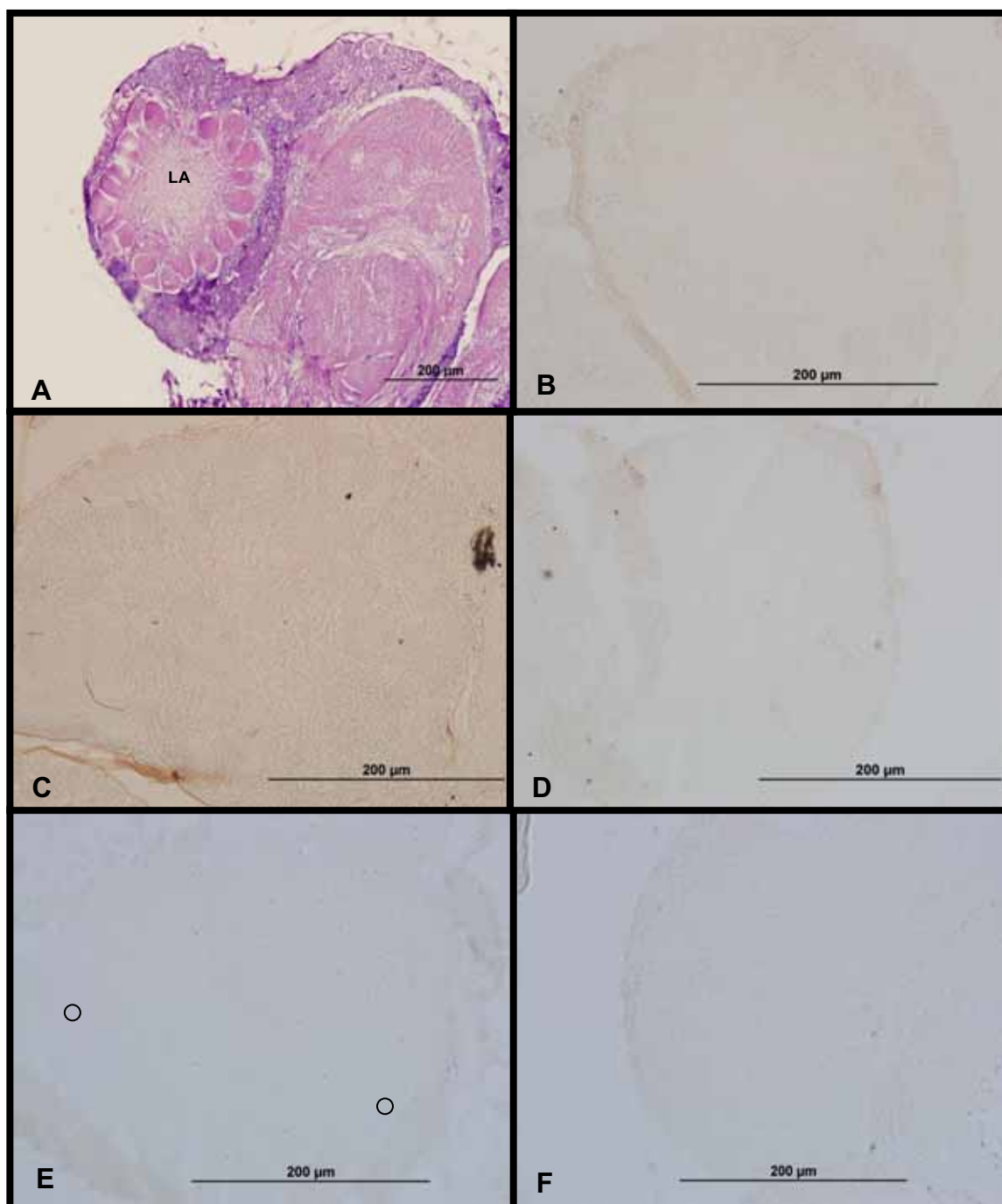


FIG 06: Fotomicrografia da região do lobo antenal de indivíduos expostos ao dióxido de carbono durante a fase de recém-emergida corado com hematoxilina e eosina (A) e marcação através de técnica de imunohistoquímica da proteína c-Fos no cérebro de indivíduos do grupo controle (B), o grupo exposto durante 30 segundos (C) e 1 minuto e meio (E) de abelhas coletadas aos 21 dias de idade e os grupos de 1 minuto (D) e 2 minutos (F) coletadas aos 35 dias de idade. Os círculos indicam as células que expressam a proteína.

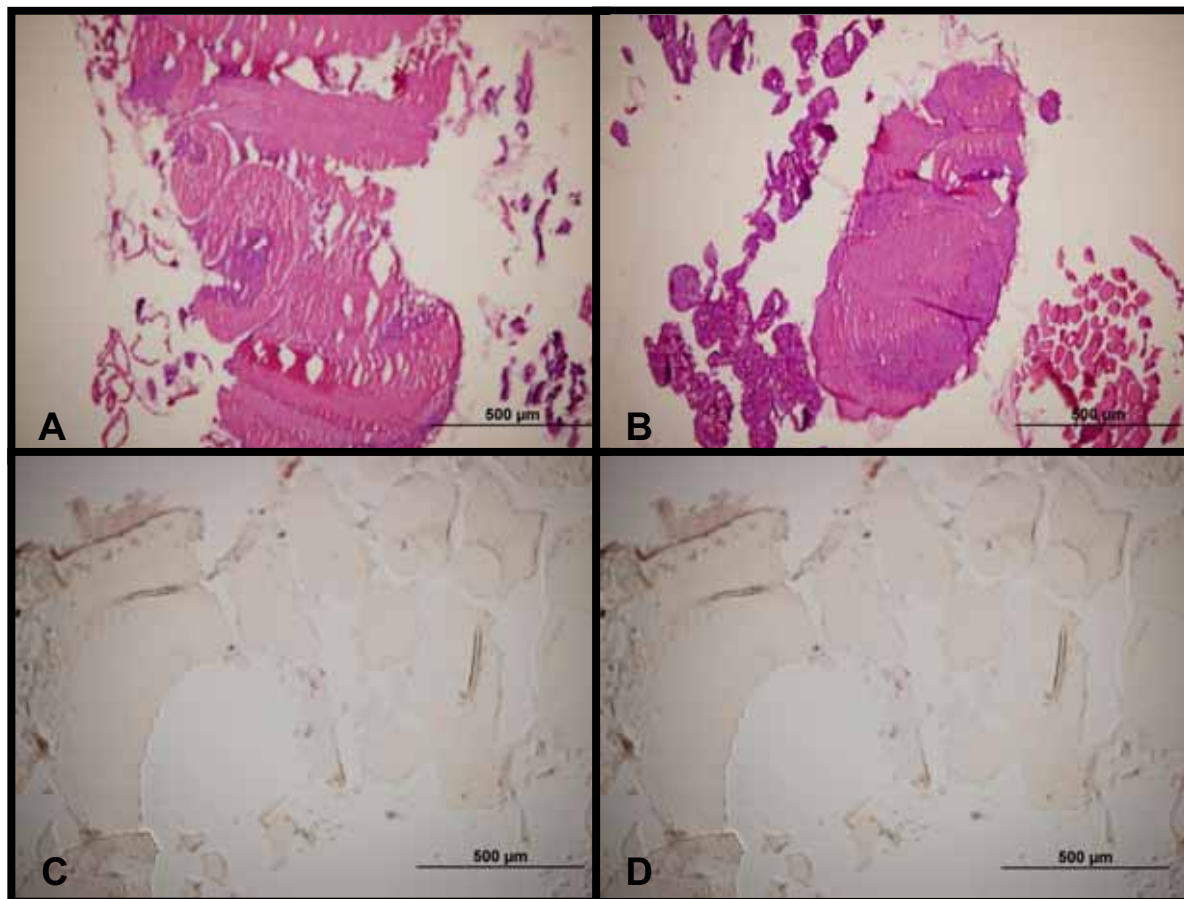


FIG 07: Cortes histológicos corados com HE e após a técnica de imunohistoquímica para a marcação da proteína c-Fos, evidenciando a dificuldade de obtenção de cérebros intactos. Cérebro exposto ao dióxido de carbono na fase de recém-emergida em indivíduos com 28 dias de idade durante 1 minuto e meio (**A**). 28 dias de idade exposto ao dióxido de carbono durante 2 minutos (**B**). 35 dias de idade exposto ao dióxido de carbono durante 1 minuto e meio (**C**). 35 dias de idade exposto ao dióxido de carbono durante 2 minutos (**D**).

Conclusão

Conclusão

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho nos permitiram concluir que:

- 1- A aplicação do dióxido de carbono na fase de recém-emergida não altera a morfologia do cérebro de *Apis mellifera*, que mostrou células íntegras apesar da dificuldade de obtenção dos cortes em determinadas idades.
- 2- Não se pode afirmar que a exposição ao dióxido de carbono foi capaz de alterar o padrão de expressão da proteína Fos, pois os resultados obtidos não apresentaram um padrão significativo.
- 3- Não se pode afirmar que a exposição a doses elevadas de dióxido de carbono seja capaz de alterar a orientação e aprendizagem das abelhas, pois apesar de encontrarmos regiões relacionadas a essas atividades Fos-positivas, isso não se repetiu em todos os experimentos.
- 4- A expressão da proteína Fos é sensível à alterações nas concentrações de dióxido de carbono, mas para um conhecimento mais aprofundado de sua ação faz-se necessária a realização de outros experimentos associando a marcação da expressão da proteína Fos a outras metodologias de avaliação da atividade neuronal.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

ALAUX,C.; ROBINSON,G.E.. Alarm pheromone induces immediate-early gene expression and slow behavioral response in honey bees. **Journal Chemical Ecology**. 33: 1346-1350, 2007.

BADRE,N.H.; MARTIN,M.E.; COOPER,R.L.. The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 140: 363-376, 2005.

BALDOCCHI,D.; FALGE,E.; GU,L.; OLSON,R.; HOLLINGER,D.; RUNNING,S.; ANTHONI,P.; BERNHOFER,C.; DAVIS,K.; EVANS,R.; FUENTES,J.; GOLDSTEIN,A.; KETUL,G.; LAW,B.; MALHI,Y.; MEYERS,T.; MUNGER,W.; OECHEL,W.; PAW,U.K.T.; PILEGAARD,K.; SCHIMID,H.P.; VALENTINI,R.; VERMA,S.; VESALA,T.; WILSON,K.; WOFSY,S.. FLUXNET: A new tool to study the temporal and spatial of ecosystem-scale carbon dioxide, water vapor, and energy flux densities. **Bulletin of the American Meteorological Society**. 11(82): 2415-2433, 2001.

BASBOUS,J.; JARIEL-ENCONTRE,I.; GOMARD,T.; BOSSIS,G.; PIECHACZK,M.. Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: Is there a unique answer?. **Biochime**. 90: 296-305, 2008.

BIDMON, H.J.; GRANGER, N.A.; STUMPF, W.E. Co-localization of ecdysteroid receptors and c-fos-like protein in the brain of *Manduca sexta* larvae. **Developmental Genes and Evolution**. 200(3):149-155,1991.

BRANDT,R.; ROHLFING,T.; RYBAK,J.; KROFCZIK,S.; MAYE,A.; WESTERHOFF,M.; HEGE,H.C.; MENZEL,R.. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of Comparative Neurology**. 492: 1-19, 2005.

BÜHLER,A.; LANZREIN,B.; WILLE,H. Influence of temperature and carbon dioxide concentration on juvenile hormone titre and dependent parameters of adult worker honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Physiology**.29 (12):885-893,1983.

BUSS, R.R.; OPPENHEIM, R.W. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. **Anatomical Science International**.79:191-197,2004.

BUSTAMI,H.P.; HARRISON,J.F.; HUSTERT,R.. Evidence for oxygen and carbon dioxide receptors in insect CNS influencing ventilation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. 133: 595-604, 2002.

CAMARGO, J.M.F.; STORT, A.C. **A abelha *Apis mellifera* Linnaeus**, 2º edição Revista São Paulo, EDART,79p, 1973.

CARVALHO JR., J.A; LACAVAL, P.T. **Emissões em processos de combustão**. Editora UNESP, São Paulo, 135p, 2003.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. Elsevier Publishing. 5ª Edição, 1998.

COVIELLA, C.E., TRUMBLE, J.T. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. **Conservation Biology**. 13:700-712, 1999.

COUTO, A.; ALENIUS, M.; DICKSON, B.J.. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. **Current Biology**. 15: 1535-1547, 2005.

CRANE, E. **Bee Products: Properties, applications and Apitherapy**. Edited by Avshalom Mizrahi and Yaacov Lensky. Plenum Press, New York, 1-13, 1996.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas - **Morfologia e Função de Sistemas**. Editora UNESP. São Paulo, 2009.

CURRAN, T.; PETERS, G.; VAN BEVEREN, N.M.; VERNA, I.M. The FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. **Journal of Virology**. 44:674-682, 1982.

CYMBOROWSKI, B.; KING, V. Circadian regulation of Fos-like expression in the brain of the blow fly *Calliphora vicina*, **Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology, Endocrinology**. 115(3):239-246, 1996.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL III, A. H. **Introduction to Insect Biology and Diversity**. Oxford University Press. Inc., New York, 680p, 1998.

DEISIG, N.; GUIRFA, M.; LACHNIT, H.; SANDOZ, J.C.. Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. **European Journal of Neuroscience**. 24: 1161-1174, 2006.

EBADI, R.; GARY, N.E.; LORENZEN, K. Effects of carbon dioxide and low temperature narcosis on honey bees, *Apis mellifera*. **Environmental Entomology**. 9:144-147, 1980.

EDENFELD, G.; STORK, T.; KLÄMBT, C.. Neuron-glia interaction in the insect nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**. 15: 34-39, 2005.

ENGELS, W.; GONÇALVES, L.S.; ENGELS, E. Effects of carbon dioxide on vitellogenin metabolism in unmated queen honeybees. **Journal of Apicultural Research**. 15:3-9, 1976.

FAHRBACH, S.E.. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Reviews Entomology**. 51:209-232, 2006.

FARRIS,S.M.. Structural, functional and developmental convergence of the insect mushroom bodies with higher brain centers of vertebrates. **Brain, Behavior and Evolution**. 72: 1-15, 2008.

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

FAUCHER,C.; FORSTREUTER,M.; HILKER,M.; BRUYNE,M.. Behavioral responses of *Drosophila* to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. **The Journal of Experimental Biology**. 209: 2739-2748, 2006.

FELLENBERG,G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda- EPU e Editora Springer Ltda, São Paulo, 1980.

FONTA, C.;GASCUEL, J.; MASSON, C. Brain FOS-like expression in developing and adult honeybees. **NeuroReport**.6:745-749, 1995.

FREE, J.B. **A organização social das abelhas (Apis)**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil,79p, 1980.

GALIZIA,C.G.; MCILWRATH,S.L.; MENZEL,R.. A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. **Cell Tissue Research**. 295: 383-394, 1999.

GUERENTEIN,P.G.; CHISTENSEN,T.A.; HILDEBRAND,J.G.. Sensory processing of ambient CO₂ information in the brain of the moth *Manduca sexta*. **Journal Comparative Physiology A**. 190: 707-725, 2004.

GUERENSTEIN, P.G.; HILDEBRAND, J.G.. Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. **Annual Reviews Entomology**. 53:161-178, 2008.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The Insects an outline of entomology**. Blackwell Publishing Ltd., 505p, 2005.

HEDERGEN,T.;LEAH,J.D. Inducible and constitutive transcription in the mammalian nervous system: control of gene expression by, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Research**. 28:370-490, 1998.

HERRERA,D.G.; ROBERTSON,H.A. Activation of *c-fos* in the brain. **Progress in Neurobiology**.50:83-107, 1996.

HOFFMAN,G.E.; LYO,D.. Anatomical markers of activity in neuroendocrine system: Are we all "Fos-ed out"? **Journal of Neuroendocrinology**. 14: 259-268, 2002.

HOFFMAN,G.E.; SMITH,M.S.; VERBALIS,J.G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**.14:173-214,1993.

JACOBY,G.C.; D'ARRIGO,R.D.. Tree rings, carbon dioxide, and climatic change. **Proceedings of the National Academy Science USA**. 94: 8350-8353, 1997.

KIYA,T.; KUNIEDA,T.; KUBO,T.. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, 4: 370-371, 2007.

KOCKEL, L.; HOMSY, J.G.; BOHMANN, D. *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. **Oncogene**. 20:2347-2364, 2001.

KOMISCHKE,B.; SANDOZ,J.C.; MALUN,D.; GIURFA,M.. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L.. **European Journal of Neuroscience**. 20: 477-485, 2005.

KOVÁCS, K.J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**. 33:287-297, 1998.

KOYWIWATTRAKUL,P.; THOMPSON,G.J.; SITTHIPRANEED,S.; OLDROYD,B.P.; MALESZKA,R. Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**. 5(36),01-09, 2005.

KRETZSCHMAR,D.; PFLUGFELDER,G.O.. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. **Brain Research Bulletin**. 57: 121-131, 2002.

LAISSUE,P.P.; REITER,C.; HIESINGER,P.R.; HALTER,S.; FISCHBACH,K.F.; STOCKER,R.F.. Three-Dimensional Reconstruction of the Antennal Lobe in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Comparative Neurology**. 405:543–552, 1999.

LE CONTE.Y.; NAVAJAS,M.. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique Office International des**. 27(2): 499-510, 2008.

LEVINE, R.B.; MORTON, D.B.; RESTIFO, L.L. Remodeling of the insect nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**.5:28-35, 1995.

MACHADO,a.B.M.. **Neuroanatomia Funcional**. Editora Atheneu, São Paulo, 2º ed., 2006.

MICHAELIS,T.; WATANABE,T.; NATT,O.; BORETIUS,S.; FRAHM,J.; UTZ,S.; SCHACHTNER,J.. In vivo 3D MRI of insect brain: cerebral development during metamorphosis of *Manduca sexta*. **NeuroImage**. 24: 596-602, 2005.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 374p,1974.

MILLER,S.L.. A theory of gaseous anesthetics. **Physiology**. 47: 1515-1524, 1961.

MOBBS,P.G.. Brain Structure. In: KERKUT,G.A.; GILBERT,L.I..**Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press Ltda.,1985. cap. 8,v. 6..

MORGAN,J.I.; COHEN,D.R.; HEMPSTEAD,J.L.; CURRAN,T.. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**. 237:192-197, 1987.

MORGAN,J.I.;CURRAN,T. Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun. **Annual Review of Neuroscience**. 14:421-451,1991.

MÜLLER,R.; BRAVO,R.; BURCKHARDT,J.; CURRAN,T. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. **Nature**.312:716-719,1984.

NOCELLI, RCF; CÉSAR-TOGNOLI, LMM; SILVA-ZACARIN, ECM; SOARES, HM;JACOB, CRO; ROAT, TC; PALMA, MS; MALASPINA, O. Expression of the Fos protein in the brain of the *Apis mellifera* forager, 2009. (enviado para Journal of Insect Physiology)

ORDWAY,J.M.; FENSTER,S.D.; RUAN,H.; CURRAN,T. A transcriptome map of cellular transformation by the fos oncogene. **Molecular Cancer**.4: 1-13, 2005.

PERKINS,K.K.; DAILEY,G.M.; TJIAN,R. Novel Jun and Fos related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. **The EMBO Journal**. 7(13): 4265-4273,1988.

PIRANI,J.R.; CORTOPASSI- LAURINO,M. Flores e abelhas em São Paulo, Edusp/ Fapesp, São Paulo, 192p,1993.

PRADO,P.T.C.; DEL BEL,E.A. *c-fos*, Um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina**. Ribeirão Preto,31:424-433,1998.

RAUSCHER,F.; SAMBUCETTI,L.C.; CURRAN,T.; DISTEL,R.J. Common DNA-binding site for Fos proteins complexes and transcription factor AP-1. **Cell**. 52:471-480,1988.

RENUCCI,M.; TIRARD,A.; CHARPIN,P.; AUGIER,R.; STRAMBI,A.. c-Fos-related antigens in the central nervous system of an insect, *Acheta domesticus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 45: 139-148, 2000.

- RIBBANDS,C.R. Changes in the behaviour of honey-bees following their recovery from anaesthesia. **Journal of Experimental Biology**.27(3-4):302-10, 1950.
- RIBI,W.; SENDEN,T.; SAKELLARIOU,A.; LIMAYE,A.; ZHANG,S.. Imaging honey bee brain anatomy with micro-X-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**. 171: 93-97, 2008.
- ROAT,T.C.. Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos. Projeto de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro. 183p, 2008.
- ROBERTSON,H.M.; KENT,L.B.. Evolution of the gene lineage encoding the carbon dioxide receptor in insects. **Journal of Insect Science**. 9: 1-12, 2009.
- SAGAR, S.M.; SHARP, F.R.; CURRAN, T. Expression of *c-fos* protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. **Science**. 249:1328-1331, 1988.
- SEELEY,T.D.. Atmospheric carbon dioxide regulation in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. **Journal Insect Physiology**. 20: 2301-2305, 1974.
- SELDEEN,K.L.; MCDONALD,C.B.; DEEGAN,B.J.; FAROOQ,A.. Thermodynamic analysis of the heterodimerization of leucine zippers of Jun and Fos transcription factors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 375: 534-538, 2008.
- SETOYAMA,C.; FRUNZIO,R.; LIAIR,G.; MUDRYI,M.; De CROMBRUGGLE,B. Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**.83:3213-3217, 1986.
- SHENG,M.; GREENBERG,M.E. The regulation and function of c-Fos and other immediate early gene in the nervous system. **Neuronal**.4:477-485, 1990.
- STANGE,G.. Sensory and behaviour responses of terrestrial invertebrates to biogenic carbon dioxide gradients. In **Advances Bioclimatology**. 4: 223-253, 1996.
- STANGE,G. and STOWE, S.. Carbon-dioxide sensing structures in terrestrial arthropods. **Microscopy Research and Technique**. 47:416–27, 1999.
- SOARES,H.M.. **Avaliação dos efeitos do imidaclopride, sobre o sistema nervoso de *Apis mellifera* africanizada, através da expressão da proteína Fos**. Projeto de iniciação científica FAPESP - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.27p.
- TOMA,D.P.; BLOCH,G.; MOORE,D.; ROBINSON,G.E.. Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. **PNAS**. 97: 6914-6919, 2000.

TULINOVA,E.V.; SVARNIK,O.E.; ALEXANDROV,Y.I.. Effects of aging on learning-induced c-Fos expression and neuron density in the rat brain. **International Journal of Psychophysiology**. 69: 242-275, 2008.

WANG,F.; JAYAS,D.S.; WHITE,N.D.G.; FILEDS,P.. Combined effect of carbon monoxide mixed with carbon dioxide in air on the mortality of stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**. 01-07, 2009.

WEEKS, J.C. Steroid hormones, dendritic remodeling and neuronal death: insights from insect metamorphosis. **Brain Behavior Evolution**.54:51-60, 1999.

ZARS,T.. Behavioral functions of the insect mushroom bodies. **Neurobiology of Behaviour**. 10: 790-795, 2000.

Cynthia Renata de Oliveira Jacob
(Aluna)

Dra Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
(Co- Orientadora)

Prfº Dr Osmar Malaspina
(Orientador)