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

**ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL E CITOQUÍMICO DA
RELAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO DA
MUSCULATURA DO VÔO E A DEMANDA ENERGÉTICA
DOS COLONIZADORES DE COLÔNIAS DE ABELHAS
EUSSOCIAIS**

FERNANDA FERNANDEZ-WINCKLER

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

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2008

595.799 Winckler, Fernanda Fernandez
W762e Estudo ultra-estrutural e citoquímico da relação entre o desenvolvimento da musculatura do vôo e a demanda por vôo dos componentes de colônias de abelhas eussociais /
Fernanda Fernandez Winckler. – Rio Claro : [s.n.], 2008
101 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Abelha. 2. Himenoptero. 3. Apini. 4. Meliponini. 5.
Músculos indiretos. I. Título.

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

*À Maria Fernanda, ao meu marido Danilo, ao
meu Pai Nelo, à minha mãe Gláucia, às minhas irmãs
Roberta e Paula, que são a razão da minha vida,*

Dedico esta tese.

“Viver apenas um dia ou ouvir um bom ensinamento é melhor do que viver um século sem conhecer tal ensinamento.”

(Sakyamuni).

“A sabedoria é o melhor guia e a fé, a melhor companheira. Deve-se pois, fugir das trevas da ignorância e do sofrimento, deve-se procurar a luz da Iluminação”

(Sakyamuni).

“Somente o conhecimento não é suficiente. Somente quando o conhecimento alia-se a sabedoria é que uma pessoa pode atingir a vitória na vida. Sem sabedoria, não se pode distinguir as pessoas boas ou más”

(Daisaku Ikeda).

"A prisão não são as grades, e a liberdade não é a rua; existem homens presos na rua e livres na prisão. É uma questão de consciência."

(Ghandi)

Agradecimentos

Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo nº 04/15023-7).

À minha orientadora e amiga, Professora Doutora Carminda da Cruz-Landim, a quem devo meu progresso científico e aprendizado de como se deve fazer ciência, de quem vou guardar os preciosos ensinamentos pelo resto da vida. Você conquistou toda minha estima, respeito e admiração. Agradeço de forma muito especial por me orientar e lutar comigo para conseguirmos realizar nossos objetivos.

Agradeço também de modo muito especial à minha filha Maria Fernanda que é simplesmente a razão da minha vida e só através dela pude entender o real significado do amor incondicional. Obrigada por existir!

Ao meu amor Danilo pela compreensão, paciência e apoio nos momentos difíceis, por compartilhar comigo os momentos de alegria e realizações e, acima de tudo, pelo amor que vejo em seu olhar e que me faz mais feliz a cada dia. Eu te amo demais! Você sabe disso...

À minha mãe Gláucia, que sempre está ao meu lado, que torce por mim como ninguém, que me ampara e que me ensina a lutar muito por todos os meus sonhos, que é simplesmente tudo na minha vida. Meu eterno obrigado!!!

Ao meu pai Nelo pelo amor que tanto me dedica e tornou tudo possível sempre, que eu tenho certeza que está sempre presente em todos os momentos da minha vida. Dedico meu amor eterno!

Às minhas irmãs Robertoa e Paula, que estiveram sempre ao meu lado, pelo apoio e carinho durante todos estes anos... Sempre com uma palavra de carinho... Vocês são essenciais na minha vida...

Aos meus sogros, Josefina e Carlos e também à Terezinha,, por terem me recebido tão bem nesta “nova família”. À Daniela, ao Fernando e aos meus sobrinhos Gaby, Guilherme e Giulia.

Vou também agradecer de modo muito especial à uma criaturinha maravilhosa que por muitos anos nos trouxe as melhores alegrias...Nike, não tem como não lembrar de você também nesse momento tão importante pra mim !!!

À todos os meus amigos de pós-graduação e de orientação, companheiros de todas as horas, pela grande amizade construída durante todos estes anos, Thaísa, Silvana e Bruno e em especial às queridas amigas Giselly, Gislaine, Gabriela, Sandra, Débora e Karim, pela confiança, dedicação e atenção, pelo companheirismo e carinho, por dividirem comigo suas alegrias e tristezas e por saberem dar o verdadeiro significado à palavra amizade!!!. “Melhor do que fazer novos amigos é conservar os velhos pra sempre”.

Às minhas amigas inseparáveis, Adriana, Michele, Renata e Mariana, ...amo vocês !

Aos meus queridos amigos Marília e Du, Bruna e pequeno Enzo, pela amizade sincera sempre !

À todos os docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas e pelo carinho que sempre me transmitiram.

Ao Sérgio do Biotério, pela paciência e atenção por esses anos !

Aos técnicos de laboratório Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte pelos serviços técnicos prestados, além da grande amizade construída durante todos estes anos.

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

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

E às pessoas fantásticas que passaram em meu caminho nestes anos, que deixaram muitas coisas e àquelas que passaram rápido, mas que não deixaram de ser importantes. Meu muito obrigado!

ÍNDICE

1.RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	04
3. INTRODUÇÃO	07
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. MATERIAL.....	18
5.2.MÉTODOS.....	19
5.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ.....	19
5.2.2. MORFOMETRIA.....	20
5.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	20
5.2.4. FOSFATASE ÁCIDA.....	23
5.2.5. ADENOSINO-TRIFOSFATASE (ATPase).....	24
6. RESULTADOS.....	25
7. DISCUSSÃO	89
8. CONCLUSÕES.....	96
9.REFERÊNCIAS.....	100
10. ANEXOS.....	106

1. RESUMO

Apini e Meliponini são tribos compostas por espécies de abelhas classificadas como eussociais avançadas e, portanto, apresentam divisão de trabalho reprodutivo entre as castas femininas e complexas adaptações comportamentais, adquiridas durante a evolução pelas operárias, para desempenhar as tarefas relativas à manutenção da colônia. A capacidade de voar dos adultos destes insetos está intrinsecamente ligada à maioria de suas atividades como o vôo nupcial para o acasalamento no caso das rainhas e machos e a exploração de novo habitat, fontes de alimentos e estabelecimento de novos ninhos no caso das operárias. Tanto em *Apis mellifera*, quanto em *Scaptotrigona postica*, o vôo é realizado por músculos denominados músculos indiretos do vôo por não apresentarem ligação direta com as asas. A contração desses músculos produz mudanças de volume no tórax e indiretamente, o movimento das asas. O objetivo deste projeto foi realizar medidas das fibras desse músculo em cada indivíduo e em cada fase da vida, aplicando aos resultados teste estatístico apropriado para verificar possíveis diferenças de desenvolvimento que possam ser relacionadas à função muscular e comparar a ultra-estrutura e citoquímica da musculatura do vôo das castas femininas (rainhas e operárias) e machos em diferentes fases da vida, tendo em vista as diferenças comportamentais e fisiológicas entre as classes de indivíduos das duas espécies. O exame da musculatura do vôo, tanto com microscopia de luz como com microscopia eletrônica de varredura e transmissão, mostrou que o arranjo e a morfologia dos feixes musculares e das fibras que os compõe são similares nas duas espécies, no entanto os feixes musculares de *Apis mellifera* são formados por número maior de fibras. Medições das larguras das fibras mostraram diferenças estatisticamente significante entre as fases da vida dos componentes das colônias e entre as espécies. Da mesma forma o exame ultra-estrutural mostrou que as operárias de ambas as espécies emergem com a musculatura imatura e que o maior grau de desenvolvimento é observado nas operárias atuando na colônia como as nutridoras. Ao contrário do esperado, as operárias forrageiras, que voam para fora da colônia, apresentam sinais de degeneração muscular, caracterizados por degeneração mitocondrial e falhas nas miofibrilas. Também foi mostrado que as rainhas e os machos emergem com o músculo do vôo mais desenvolvido que as operárias e adquirem a maturidade muscular mais rapidamente. Isto está relacionado com a pouca

idade com que devem realizar o vôo nupcial. A citoquímica mostrou depósitos eletrondensos de chumbo, indicativos da atividade da fosfatase ácida em algumas regiões dos músculos de ambas as espécies. Os depósitos apareceram principalmente nas mitocôndrias, mas em alguns casos também no interior das miofibrilas entre os miofilamentos. Os controles que foram incubados em meio sem o substrato, não apresentaram nenhum depósito de chumbo. Para ATPase a reação foi positiva para todas as classes de indivíduos estudados manifestando-se nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático.

2. ABSTRACT

Apini and Meliponini are tribes composed of species of advanced eusocial bees and therefore present division of reproductive labor between females and complex behavioral adaptations, acquired during the evolution by workers, to attend the responsibilities for the maintenance of the colony. The ability of adults to fly is intrinsically linked to most of their activities as the nuptial flight for mating in the case of queens and males and exploitation of new habitat, sources of food and establishment of new nests in the case of workers. Both in *pis mellifera*, as in *Scaptotrigona postica*, the flight is accomplished by muscles called indirect flight muscles by not make a direct connection with the wings. The contraction of muscles produces changes in volume in the torax and indirectly, movement of the wings. The objective of this project was to perform measurements of muscle fibers from every individual in every stage of life, applying the appropriate statistical test to results in order determine possible differences in development that may be related to muscle function. Also compare the ultra-structure of and cytochemistry of workers, queens and males flight muscle at different stages of life, with the behavioral and physiological differences between the classes of individuals of the two species. The examination of the muscles of the flight, both with light microscopy, and with scanning and transmission electron microscopy, showed that the arrangement and morphology of the muscle fibers bundles arrangement is similar in the two species, however the muscle bundles of *pis mellifera* are formed by larger number of musclefibres. Measurements of the width of the fibers showed statistically significant differences between the life phases of the colonies components and between species. Similarly the ultra-structural examination showed that workers of both species emerge with immature muscle and that the greatest degree of development is observed in workers working in the colony as nurses. Contrary to expectations, the forager workers, flying out of the colony, show signs of muscle degeneration, characterized by mitochondrial degeneration and fails in miofibrils. It was also showed that the queens and males emerge with the flyght muscles better developed

than workers and attain total maturity faster. This is related to the early ages with these individuals fly to mate. The cytochemistry showed electron-dense deposits of lead, indicative of the activity of the acid phosphatase were found in some regions of the muscles of both species. The deposits appeared mainly in the mitochondria, but in some cases also within the miofibrilas, among miofilamentos. The controls that were incubated in half without the substrate, showed no deposit of lead. For the ATPase reaction was positive for all classes and phases of studied individuals, found in mitochondria and sarcoplasmatic reticulum.

3. INTRODUÇÃO

3.1. As abelhas

As abelhas eussociais são insetos holometábolos que em geral vivem em grandes colônias. Numa colônia, em condições normais, existe uma rainha, cerca de 5.000 a 100.000 operárias e de 0 a 400 zangões.

As colônias são constituídas por três classes de indivíduos adultos com funções específicas, entre os quais é dividido o trabalho colonial. A primeira divisão de trabalho refere-se às funções reprodutivas e a segunda à de manutenção da colônia: a rainha e os machos são responsáveis pela reprodução e as operárias pela manutenção da colônia.

A rainha é a fêmea fértil responsável pela postura dos ovos, dos quais os fecundados originam fêmeas, e os não fecundados, machos, por partenogênese. Os machos têm como função, quase que exclusiva, a fecundação da rainha. As tarefas das operárias incluem coleta de alimento, água e outros itens necessários à colônia, alimentação da cria, alimentação da rainha, construção dos alvéolos para a cria ou depósito de alimento e defesa da colônia. As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis.

A capacidade de voar dos adultos destes insetos está intrinsecamente ligada à maioria de suas atividades como o vôo nupcial para o acasalamento no caso das rainhas e no das operárias para realizarem as tarefas que lhe cabem fora do ninho, inclusive a procura de lugar para o estabelecimento de novos ninhos. Para os machos o vôo representa principalmente o deslocamento para os locais de congregação para o acasalamento, ou para a procura da rainha.

As operárias das abelhas eussociais realizam as tarefas de manutenção da colônia de acordo com a maturação fisiológica de seus órgãos o que corresponde a um padrão de divisão de trabalho conhecido como polietismo etário (HEBLING *et al.*, 1964; FREE, 1981; NOGUEIRA-NETO, 1997), cuja cronologia pode, no entanto, ser alterada pelas necessidades da colônia. Basicamente as tarefas desempenhadas pelas operárias podem ser divididas em dois conjuntos: as desempenhadas no interior da colônia que não necessitam do vôo e as desempenhadas fora da colônia, como o forrageio, que o requerem em larga escala. As tarefas intra-nidais são desempenhadas pelas operárias mais jovens e as externas pelas mais velhas. Geralmente a transição das atividades internas para as externas, numa colônia de *A. mellifera* com população de operárias com boa distribuição etária ocorre ao redor dos 25-30 dias. Uma das últimas tarefas desempenhadas dentro do ninho é a alimentação da cria, feita por operárias entre 18 e 25 dias, chamadas então de nutridoras.

Os machos imaturos permanecem no interior da colônia e não voam, enquanto os maduros a abandonam e, portanto, voam o que acontece aproximadamente 15 dias após a emergência. Da mesma forma as rainhas virgens levam certo tempo depois da emergência, que em *A. mellifera* fica entre 6 e 8 dias para abandonarem a colônia para realizarem o vôo nupcial (ADADE & CRUZ-LANDIM, 2004).

O vôo é, portanto, uma atividade que todos os tipos de indivíduos da colônia só realizam depois de passarem por em certo período de maturação pós-emergência, o qual é mais longo nas operárias.

Além das diferenças mencionadas, quanto à atividade do vôo, entre os indivíduos das colônias, existem diferenças comportamentais entre os Apini e

Meliponini que podem se refletir na organização da musculatura do vôo, especialmente quanto às rainhas e quanto à amplitude do raio de vôo das operárias.

Em *S. mellifera* as rainhas podem realizar, depois de certo tempo, outro vôo nupcial, ou saírem com um enxame para fundar uma nova colônia, portanto, devem manter a capacidade de vôo. Nos Meliponini a rainha depois de fecundada não abandona mais a colônia (IMPERATRIZ-FONSECA, 1998). Seu abdome aumenta muito devido ao desenvolvimento do ovário, já que a postura dos ovos deve ser bastante intensa não sendo possível, portanto abandonar o ninho. Nesta fase as rainhas são chamadas de rainhas poedeiras ou fisogástricas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Devido às limitações impostas pelo grande tamanho do abdome após o processo de acasalamento a rainha de *S. postica* só executa um vôo nupcial, no qual se acasala antes de retornar para a colônia ou fundar uma nova. A fundação de novas colônias, não se dá como em *S. mellifera* por enxameagem, mas é liderada por uma rainha virgem, acompanhada de algumas operárias. A rainha fecundada permanece na colônia, mas, embora a rainha dos meliponídeos não realize vôos externos depois de acasalada, movimentada muito as asas durante o processo de ovoposição. O acasalamento da rainha de *S. mellifera* se faz no vôo a cerca de 10 metros de altura e o dos Meliponini, geralmente no chão. Além disso, a capacidade de vôo das operárias de *S. mellifera*, isto é, a distância de vôo para a procura de alimento é maior que nos Meliponini.

3.2. O músculo

Os insetos foram os primeiros organismos a alcançarem a capacidade de voar, isto há mais de 450 milhões de anos atrás. O vôo, portanto, não é apenas utilizado para a locomoção, mas para diversas funções, como o acasalamento, captura de presas, defesa. Diversos fatores influenciaram no mecanismo de vôo nos insetos, dando origens aos mais diferentes tipos de mecanismos de vôo (HENKIN *et al.*, 2004).

O vôo nos insetos é alimentado por músculos estriados situados no tórax, na maioria dos dípteros e em algumas outras ordens, o músculo indireto do vôo pode ser considerado um dos mais poderosos músculos no reino animal (JOSEPHSON, 1993; JOSEPHSON *et al.*, 2000). Nesse tipo de músculo um pequeno aumento da tensão é seguido de um estiramento da fibra, isso mostra a habilidade do músculo trabalhar contra uma força (PRINGLE, 1965).

A musculatura do vôo das abelhas é constituída por dois pares de músculos assincrônicos torácicos: um dorso-ventral e outro antero-posterior. O vôo é realizado por esses músculos denominados músculos indiretos do vôo por não apresentarem ligação direta com as asas.

Em alguns insetos os músculos indiretos do vôo são auxiliados por músculos diretos do vôo que se inserem em placas e extensões internas do exoesqueleto de um lado e de outro na pleura e escleritos axilares das asas. No entanto, nas abelhas estes músculos estão ausentes, enquanto os músculos indiretos são muito desenvolvidos (GOODMAN, 2003).

Os músculos dorso-ventrais estão presos dorsalmente ao tegumento e ventralmente a um apódema enquanto que, os antero-posteriores estão presos às superfícies submediana posterior do primeiro fragma e submediana do mesoescutelo e á superfície anterior do segundo fragma (DALY, 1969). A contração desses músculos produz mudanças de volume no tórax e indiretamente o movimento das asas cuja articulação, com o exoesqueleto torácico, que se faz através de membranas articulares contendo resilina, uma proteína muito elástica (SNODGRASS, 1935; WIGGLESWORTH, 1964; KING *et al.*, 1996; CHAPMAN, 1998). Quando o feixe antero-posterior se contrai promove o encurtamento do tórax e o levantamento das asas. A contração do feixe dorso-ventral achata o tórax e promove o abaixamento das asas.

Os músculos do vôo têm também outras funções como produzir o zumbido das operárias que alerta para a realização das mais diversas tarefas, como a coleta de pólen e defesa da colônia (KING *et al.*, 1996).

Os músculos são constituídos por unidades menores, as fibras ou células musculares. A fibra esquelética dos insetos pode ter seu diâmetro variando de poucos micrômetros a mais de um mm e contêm inúmeros núcleos (SMYTH, 1985).

Os músculos do vôo das abelhas são descritos como tendo organização fibrilar, devido ao fato das miofibrilas estarem aleatoriamente intercaladas com núcleos. Encontram-se núcleos também no citossol ou sarcoplasma periférico.

Nas abelhas, o músculo do vôo é assincrônico porque não se contrai em sincronia com a chegada de impulsos nervosos. A manutenção do estado ativo de fibrilação é devido a uma sucessão de pulsos trazidos por nervos-motores, sendo a taxa de contração superior à taxa dos impulsos nervosos já que a frequência de batimentos é muito grande e seria impossível a manutenção desta frequência se cada impulso nervoso que atingisse o músculo a cada contração, exercesse o seu efeito e decaísse antes que o próximo impulso fosse transmitido (PRINGLE, 1976, SMYTH, 1985; MORTIZ & SOUTHWICK, 1992; QIU *et al.*, 2005; ROBERTS & ELEKONICH, 2005).

As fibras musculares são conectadas individualmente ao exoesqueleto através da ligação com tonifibrilas modificadas presentes nas células epidérmicas, sem a intervenção de tecidos conectivos, ou à apódemas cuticulares (os quais substituem o tendão de colágeno dos vertebrados), formados pela invaginação da cutícula do exoesqueleto, nos locais onde uma conexão flexível é requerida (SMYTH, 1985). As células epidérmicas, que na região da ligação dos músculos ao exoesqueleto são ricas em microtúbulos recebem o nome de "célula tendão". Nos contatos das fibras musculares com as células tendão as membranas plasmáticas de ambas as células são interdigitadas, aumentando a área do contato em aproximadamente dez vezes (CRUZ-LANDIM, 1970) e reforçadas por desmossomos.

A ultra-estrutura do músculo do vôo dos insetos, como em outros músculos estriados mostra uma organização constante e paralela dos miofilamentos nas miofibrilas e dos outros constituintes celulares, o que determina a subdivisão transversal da fibra numa sucessão de sarcômeros e define o padrão estriado. As miofibrilas são compostas por moléculas protéicas filamentosas, com propriedades contráteis: a miosina e a actina. O padrão repetitivo, de sarcômeros com 2 a 8µm de comprimento é uma consequência da disposição separada da actina e da miosina, as quais se alternam ao longo das miofibrilas (TAYLOR *et al.*, 1989).

O padrão das bandas nos sarcômeros dos músculos das abelhas se assemelha ao de outros animais. A banda A é caracterizada pela alta ordem molecular da

miosina, sendo, portanto, anisotrópica, enquanto a região isotrópica contendo actina é chamada banda I (SMITH, 1984; SMYTH, 1985). As bandas A e I estão presentes em todas as miofibrilas e ao longo de cada fibra, como empilhamento de moedas e tem localização paralela nas várias miofibrilas. Uma quebra fibrilar ocorre no meio da banda I onde aparece uma linha fina chamada linha Z. No centro de cada banda A usualmente também se encontra uma região de coloração clara, a zona H, resultado da interrupção da extensão dos miofilamentos de actina para o interior da banda A.

Além das miofibrilas responsáveis pelas características contráteis das fibras musculares, outras organelas apresentam-se de forma particular nessas células. Chamam atenção as mitocôndrias que são numerosas, volumosas, ricas em cristas e se dispõem entre as miofibrilas. O retículo sarcoplasmático é do tipo liso e seus túbulos envolvem cada miofibrila. A membrana plasmática tipicamente apresenta invaginações que formam túbulos que adentram a célula a quase 90° com a superfície, formando o sistema T. Esses tubos acoplam-se a tubos do retículo sarcoplasmático ao redor das miofibrilas formando díades, as quais têm localização característica em cada tipo muscular. O sarcoplasma apresenta ribossomos, polirribossomos, glicogênio e lipídios e ocupa o espaço deixado pelas mitocôndrias e pelo retículo entre as miofibrilas.

Devido às características especiais das células musculares, as organelas celulares receberam dos primeiros pesquisadores denominação própria. A partir da palavra “sarco” que significa carne ou músculo, a membrana plasmática foi denominada sarcolema, o retículo endoplasmático, retículo sarcoplasmático e o citossol, sarcoplasma. Essas denominações são freqüentemente encontradas na literatura.

3.3. Fosfatases nos músculos

As fosfatases ácidas são enzimas histolíticas intracelulares localizadas principalmente nos lisossomos e que exercem sua ação na digestão intracelular de componentes endógenos e exógenos. Entretanto, há uma enorme variedade de fosfatases ácidas, amplamente distribuídas nos tecidos animais (PEARSE, 1960; CHAYEN *et al.*, 1973), provavelmente agindo não somente na digestão intracelular

ligada a processos regressivos, mas também na diferenciação e na secreção celular (CRUZ-LANDIM *et al.*, 2000).

A fosfatase ácida tem sido muito usada como indicadora de atividade lítica nas células. As fosfatases ácidas, nas células, encontram-se inicialmente segregadas do citossol, no interior de lisossomos e exercem sua função, como hidrolases, no interior do compartimento endossômico. Livres no citoplasma são indicadoras de autólise celular (SKELTON & BOWEN, 1987). Portanto, a degeneração e morte celular foram associadas à presença de fosfatase ácida livre e em atividade no compartimento endossômico, em hemócitos e glândulas salivares de insetos (ARMBRUSTER *et al.*, 1996) e na glândula salivar de *Calliphora erythrocephala* (BOWEN, 1993).

Estudos sobre a diferenciação dos músculos do vôo durante a metamorfose da espécie *Melipona quadrifasciata* feitos por Giometti e Cruz-Landim (1990) acompanharam a degeneração de alguns músculos esqueléticos torácicos da larva. Nestes músculos, poucos lisossomas foram observados e não foi verificada a presença de fosfatase ácida nos músculos em reabsorção. Também não foi detectada claramente fagocitose dos fragmentos musculares pelos hemócitos locais durante a metamorfose e miogênese dos músculos do vôo, nem a presença de fosfatase ácida nessas células.

Os vários estudos feitos sobre o papel das enzimas hidrolíticas e dos lisossomos no metabolismo dos insetos, particularmente durante a metamorfose e envelhecimento celular (LOCKSHIN, 1969), utilizando microscopia de luz tem mostrado que a ação da fosfatase nem sempre está presente. Investigações mais recentes têm usado a localização ultra-estrutural das enzimas histolíticas para visualizar nas organelas as quais elas estão atuando, em vários tipos de abelhas (JIMENES & GILLIAM, 1990; CAVALCANTE, 2002; REGINATO & CRUZ-LANDIM, 2002).

A adenosinotribose (ATPase) por outro lado é uma fosfatase que atua liberando energia do ATP para várias atividades celulares que a requerem, inclusive para a contração muscular. O “timing” da contração na maioria dos músculos esqueléticos é controlado pelo “input” de nervo para músculo, o qual despolariza as membranas acionando a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático. O

aumento na concentração do Ca^{2+} entre a miofibrilas atua na contração inicial através de sua ação sobre a ATPase que constitui a parte pesada das moléculas de miosina. Entretanto, o músculo do vôo de vários insetos é diferente já que a contração é assíncrona, isto é, até certo ponto independe da chegada de um estímulo nervoso para que cada contração se realize, ou seja, um mesmo estímulo nervoso desencadeia uma série de contrações. Apesar disso a presença do Ca^{2+} ainda é bastante necessária (PRINGLE, 1965) pois sua ação na catálise do desdobramento do ATP é indispensável.

O cálcio sozinho não é suficiente para ativar o mecanismo de contração do músculo do vôo nos insetos. O mecanismo responsável por essa ativação também permite a manutenção do movimento durante o vôo (THORSON & WHITE, 1969, 1983; LUND *et al.*, 1987). Assim a expectativa é que a localização da atividade ATPásica possa fornecer informação sobre a contração deste tipo de músculo.

4. OBJETIVOS

Diante das informações anteriores, e dada a importância econômica das abelhas em questão para a agro-economia e para a preservação de várias espécies vegetais, principalmente sob o ponto de vista da polinização, mas também da produção de material alimentar ou medicamentos como mel, geléia real, própolis, etc., o presente estudo teve como objetivos principais:

- (a) Realizar medidas das fibras musculares em cada classe de indivíduo componente da colônia e em cada fase da sua vida, para verificar possíveis diferenças de desenvolvimento da musculatura do vôo, relacionáveis à função dos indivíduos da colônia;
- (b) Comparar a ultra-estrutura da musculatura do vôo das castas femininas (rainhas e operárias) e machos de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* em diferentes fases da vida, tendo em vista as diferenças entre as castas, sexos e espécies;
- (c) Utilizar testes citoquímicos que permitiam verificar variações na função e na integridade muscular, nas diferentes fases da vida dos indivíduos estudados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizadas operárias recém-emergidas, nutridoras e campeiras, rainhas virgens e fecundadas, machos recém-emergidos e maduros para o acasalamento de *Scaptotrigona postica* e *pis mellifera*. Os exemplares foram coletados nas colônias do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, São Paulo.

Os indivíduos recém-emergidos foram coletados no momento da emergência, isto é, ao saírem dos alvéolos de cria, e os demais segundo as tarefas que desempenham na colônia. Assim, operárias nutridoras foram capturadas enquanto alimentavam a cria (*pis mellifera*) ou abasteciam células de cria (*Scaptotrigona postica*) e campeiras quando retornando à colônia, as rainhas fecundadas quando estavam realizando postura e os machos maduros quando prontos para o acasalamento.

Os exemplares, depois de anestesiados por resfriamento, tiveram seus tórax separados do restante do corpo, seccionados em placa de Petri para exposição dos feixes musculares, contendo solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L; pH 7.2) para serem posteriormente submetidos às diferentes técnicas de estudo.

5.2. MÉTODOS

Os métodos de preparação do material destinaram-se sempre ao exame por microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

5.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ

A microscopia de luz visou principalmente preparar o material para exame da morfologia do músculo e para morfometria.

Os tórax separados do restante do corpo das abelhas foram fixados em Paraformaldeído 4% em tampão fosfato de Sódio 0,1M, pH 7,4 durante 24 horas. Posteriormente, as peças foram desidratadas em banhos de 15 minutos cada em série de etanol de 70 a 95% e transferidas para a histo-resina Leica para embebição, onde permaneceram por 24 horas. A inclusão foi realizada na mesma histo-resina contendo catalizador de polimerização e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C) foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145.

As secções com 4 µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, secadas em estufa à 37°C e coradas com Hematoxilina de Harris durante 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos para ocorrer a “viragem” do corante e, a seguir, coradas com Eosina aquosa durante 5 minutos. Após nova lavagem em água corrente para retirada do excesso do corante, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

5.2.2. MORFOMETRIA

A largura das fibras musculares foi medida, em cortes longitudinais do músculo utilizando o programa Leica Qwin. Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação das medidas das larguras das fibras. Em cada indivíduo foram medidas as larguras de cinco fibras musculares. Em cortes transversais das fibras foram medidos os diâmetros das miofibrilas. Foram tomadas medidas em três fibras e em cada uma delas mensuradas dez miofibrilas.

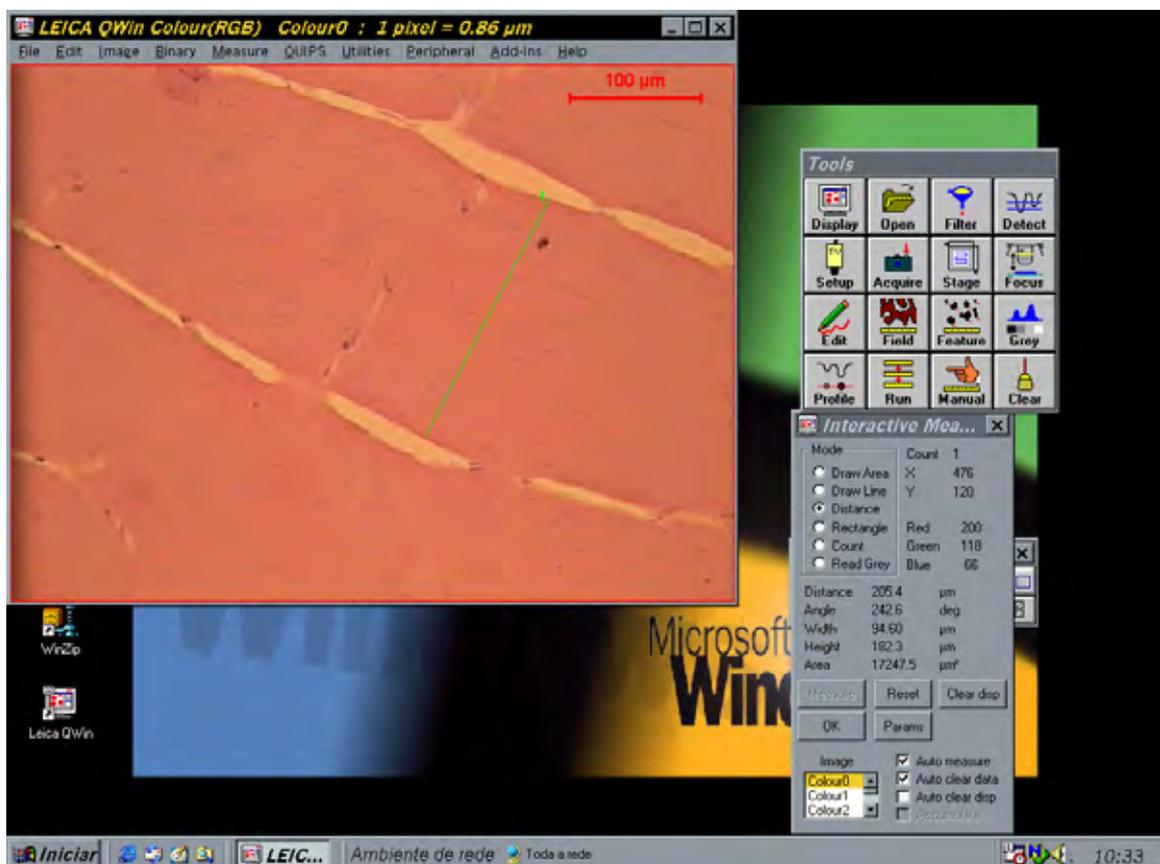


Figura 01 – Foto ilustrando como foram tomadas as medidas das larguras das fibras musculares.

5.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Foram feitas preparações de rotina e citoquímica para microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.). A microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) visou o estudo da disposição dos feixes musculares no tórax.

5.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)

Foram feitos vários cortes do tórax: longitudinais frontais, sagitais e transversais. O tórax assim cortado foi fixado em solução de Karnovsky (1965) por 24h e desidratado em concentrações crescentes de acetona (70-100%) por 5 minutos cada. O material foi levado ao ponto crítico para substituição da acetona por CO₂, colado em suporte de alumínio, onde recebeu banho de ouro, e posteriormente, foi examinado ao Microscópio Eletrônico de Varredura M.E.V. PHILIPS 505.

5.2.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)

Os feixes musculares foram dissecados e fixados em solução Karnovsky (1965) (Glutaraldeído 2%, Paraformaldeído 4% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,2) por duas horas. Depois de lavadas em tampão, duas vezes, as peças foram pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio 0,5% e Ferrocianeto de potássio 0.8% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,2. Em seguida à retirada do excesso de fixador através de lavagens no Tampão por 15 minutos, as amostras foram deixadas por 3 horas em uma solução aquosa de ácido tânico 0.15%. A contrastação foi realizada em bloco deixando o material durante a noite em acetato de uranila a 2% em álcool 10%.

A desidratação foi realizada em série crescente de acetonas (50% a 95%) e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material foi colocado em mistura de acetona e resina (1:1) onde permaneceu por 12 horas. O material foi incluído em resina pura contendo catalisador e colocado em estufa à

60°C por um período de 24 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo. As secções foram coletadas em grades de cobre e passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As grades foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS, onde se procedeu também a documentação fotográfica.

5.2.4. FOSFATASE ÁCIDA

Os feixes de músculo foram fixados em solução de Karnowsky a 4°C em pH 7,2 durante 1 hora. A seguir, passaram por três lavagens de 10 minutos cada em solução tampão Acetato de Sódio 0,1M, em pH 4,8.

Metade do material foi incubada durante 45 minutos a 37°C em meio contendo p-nitrofenilfosfato (10mg), Tampão Acetato de Sódio pH 4,8 (10ml) e Acetato de Chumbo (10mg). A outra metade (controle) foi incubada sem o substrato (p-nitrofenilfosfato). Logo em seguida o material foi lavado em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,2 por 30 minutos.

A pós-fixação foi realizada em Tetróxido de Ósmio 1% em solução Tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 durante 2 horas, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 10 minutos cada no tampão.

A desidratação e inclusão foram realizadas como descrito anteriormente. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo. As secções foram coletadas em grades de cobre e examinadas sem prévia contrastação para melhor verificação do resultado da reação. Algumas grades passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente para facilitar a obtenção do registro fotográfico.

5.2.5. ADENOSINOTRIFOSFATASE (ATPase)

Os músculos foram fixados em solução de Glutaraldeído 2% em Tampão Cacodilato de Sódio pH7,4 em geladeira por aproximadamente 24 horas. Em seguida, foram feitas três lavagens em Tampão Cacodilato de Sódio pH 7,4 com 7% de Sacarose por 15 minutos cada lavagem.

O material ficou estocado “overnight” a 4°C em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,4 com 7% de sacarose. Na seqüência foram lavadas cinco vezes em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 9,0 com 5% de sacarose.

Parte do material foi incubado durante 30 minutos a 37°C com agitação em meio contendo Trifosfato de Adenosina 1mM; Tampão Tris-Maleato 80mM pH 8,2 com 8% de Sacarose; solução de Cloreto de Cálcio 3mM e Citrato de Chumbo 3mM. A outra parte foi incubada em meio sem o trifosfato de Adenosina.

Após a incubação as peças foram lavadas duas vezes por 10 minutos cada em Tampão Tris-maleato 0,05M pH 9,0 com 5% de sacarose. Em seguida, lavados novamente por três vezes em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,4 com 7% de sacarose durante 10 minutos cada.

A pós-fixação foi realizada em Tetróxido de Ósmio 1% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 10 minutos cada no tampão.

Antes da desidratação, os músculos foram lavados em álcool 10% durante 15 minutos. A desidratação, inclusão e corte seguiu os mesmos procedimentos anteriores. As grades foram inicialmente observadas sem prévia contrastação e posteriormente contrastadas para fotografia.

6. RESULTADOS

6.1. Histologia

A anatomia e histologia geral do músculo do vôo de *Scaptotrigona postica* e *pis mellifera* é semelhante para ambas as espécies. Ambos os feixes, antero-posteriores e o dorso-ventrais, são formados por fibras musculares gigantes (Figura 2A). As fibras são multinucleadas, estriadas, apresentam secção aproximadamente circular e os numerosos núcleos encontram-se distribuídos aleatoriamente entre as miofibrilas e na periferia da fibra (Figura 2B). Uma membrana envoltória correspondente ao perímio, mas muito delicada e acelular está presente, em torno de cada feixe muscular, mas não há tecido conjuntivo do tipo presente nos vertebrados separando uma fibra da outra. As fibras ficam unidas entre si por ramificações traqueais e lamelas de substância intercelular amorfa. Os feixes antero-posteriores são constituídos por aproximadamente 4 dezenas de fibras musculares em *S. postica*. Esse número é maior em *. mellifera*, mas não foi contado.

Nos cortes longitudinais das fibras musculares de operárias recém-emergidas, visualizam-se as miofibrilas intercaladas com núcleos pequenos. Comparando-se fotos de fibras das duas espécies, *S. postica* (Figura 3A) e *. mellifera* (Figura 3B), no mesmo aumento do microscópio, é clara a diferença na largura, consideravelmente maior em *. mellifera*. A mesma diferença de largura pode ser

observada nas operárias nutridoras, quando comparadas sob mesmo aumento. Em *. mellifera* (Figura 4A) é tão grande que não é possível delimitar a fibra no campo da foto enquanto em *S. postica* (Figura 4B) é possível visualizar os limites das fibras, ilustrando a diferença de tamanho. Também nestas se observam os pequenos núcleos alongados entre as miofibrilas. Comparando estas figuras com as 3 A, B, que estão com o mesmo aumento, é possível perceber que as operárias nutridoras de ambas as espécies apresentam fibras musculares mais espessas que as operárias recém-emergidas.

Operárias campeiras também apresentam a mesma distribuição das miofibrilas com os núcleos intercalados entre elas e na periferia (Figura 5A). Os ramos traqueais, que unem as fibras aparecem como lacunas entre as miofibrilas devido à sua parede ser muito fina (Figura 5B).

Em aumentos maiores é possível visualizar as miofibrilas, tanto nos cortes longitudinais (Figura 6 A, D), onde se percebem nitidamente os sarcômeros, os quais são curtos, separados pelas linhas Z, como nos cortes transversais (Figura 6B), onde o sarcoplasma que preenche seus intervalos é perceptível. As mitocôndrias, muito numerosas, podem também ser observadas entre as miofibrilas (Figura 6C).

Nas rainhas e machos a organização dos músculos e das fibras musculares é em tudo semelhante às operárias. As miofibrilas são espessas e em cortes transversais das fibras são perfeitamente visíveis.

6.2. Morfometria

A orientação das peças para a obtenção de cortes perfeitamente transversais revelou-se tarefa muito difícil. Devido ao percurso diagonal dos feixes na maioria dos cortes as fibras apresentaram-se oblíquas. Por isso optou-se por fazer medidas das larguras das fibras ao invés do diâmetro. Fibras em cortes transversais, geralmente poucas por músculo, foram utilizadas para medidas das miofibrilas.

6.2.1. Operárias

Foram medidas as larguras das fibras dos feixes dorso-ventral da musculatura do vôo de operárias recém-emergidas, nutridoras e campeiras de *pis mellifera* e *Scaptotrigona postica* em cortes longitudinais. Os resultados mostraram que em operárias recém-emergidas de *pis mellifera* a média do diâmetro das fibras é 150µm e em *Scaptotrigona postica* a média do diâmetro é 120 µm. Nas nutridoras a média é de 181µm para *pis mellifera* e 180µm para *Scaptotrigona postica*, portanto o crescimento das fibras desta última espécie entre as fases é bem maior. Nas campeiras a média é 175µm e 170µm para *pis mellifera* e *Scaptotrigona postica*, respectivamente (Figura 8), mostrando que o decaimento em *S. postica* é também maior. O teste de Tukey mostrou que estes valores são, dentro das espécies, significativamente diferentes ao nível de 5%, sendo que as maiores larguras foram encontradas nas operárias nutridoras de ambas as espécies.

6.2.2. Rainhas

As larguras das fibras musculares do feixe dorso-ventral do músculo do vôo foram medidas em rainhas virgens recém-emergidas e fecundadas em postura de *. mellifera* e *S. postica*. A média da largura das fibras na rainha virgem de *S. postica* foi de 141µm (mais espessas que nas operárias) e na rainha fecundada da mesma espécie de 177µm (menos espessa que nas operárias) (Figura 7). Já nas rainhas virgens de *. mellifera* as fibras apresentaram média de 180 µm e a rainha fecundada de 190µm, tão espessas como as das operárias. O teste de Tukey mostrou que as diferenças são estatisticamente significativas ao nível de 5% entre as fases da vida das rainhas.

6.2.3. Machos

As fibras musculares dos machos recém-emergidos, sexualmente imaturos, de *A. mellifera* e *S. postica* apresentaram respectivamente larguras médias de 137µm e 120µm, enquanto nos já maduros para o acasalamento, as médias foram de 172µm e 142µm (Figura 7). Também neste caso o teste estatístico mostrou que a espessura das fibras é significativamente maior nos machos maduros em ambas as espécies.

6.2.4. Miofibrilas

O diâmetro das miofibrilas (Tabela 1) nas duas espécies apresentou crescimento das operárias recém-emergidas para as campeiras, sem que, contudo, as diferenças fossem significativas. As rainhas tendem a ter miofibrilas mais espessas em *A. mellifera*, mas o mesmo não se verifica em *S. postica*.

As rainhas fecundadas e os machos maduros também apresentaram miofibrilas mais espessas que os indivíduos recém-emergidos.

Figuras

Figura 02 – **A.** Corte transversal do feixe muscular (fm) dorso-ventral do músculo indireto do vôo de *Scaptotrigona postica*, vendo-se a disposição das fibras musculares (setas). Barra = 100µm **B.** Detalhe de corte transversal de uma fibra (fm) muscular feixe dorso-ventral do músculo indireto do vôo de *Pis mellifera*, vendo-se as miofibrilas intercaladas com os núcleos (setas). Barra = 20µm.

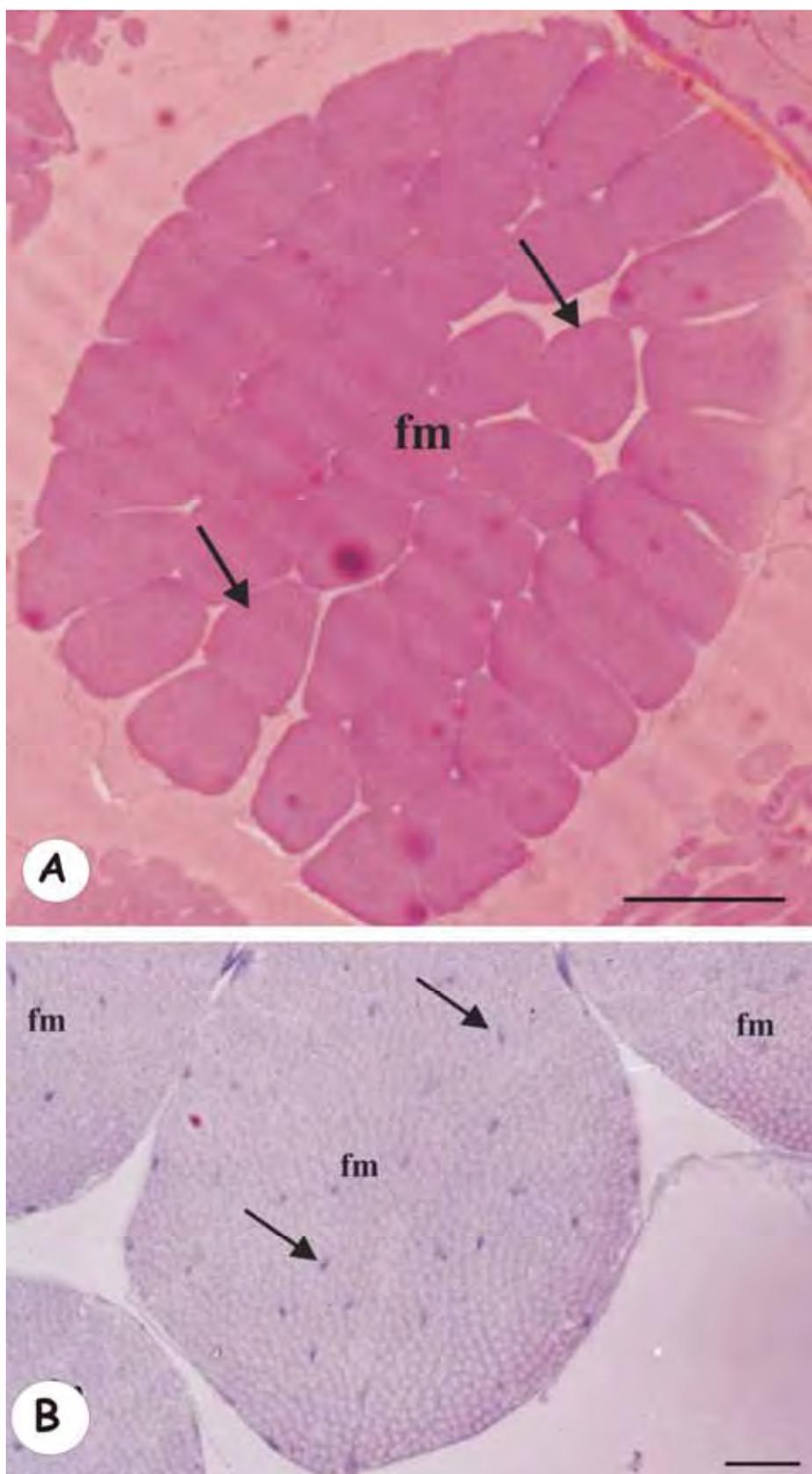


Figura 03 - Corte longitudinal de fibras do feixe muscular de operárias recém-emergidas, mostrando as fibras musculares. **A.** Fibra (Fm) de operária recém-emergida de *Scaptotrigona postica*. **B.** Fibra (Fm) muscular de operária recém-emergida de *Apis mellifera*. setas = núcleos; tr = traquéias. Barras = 20µm

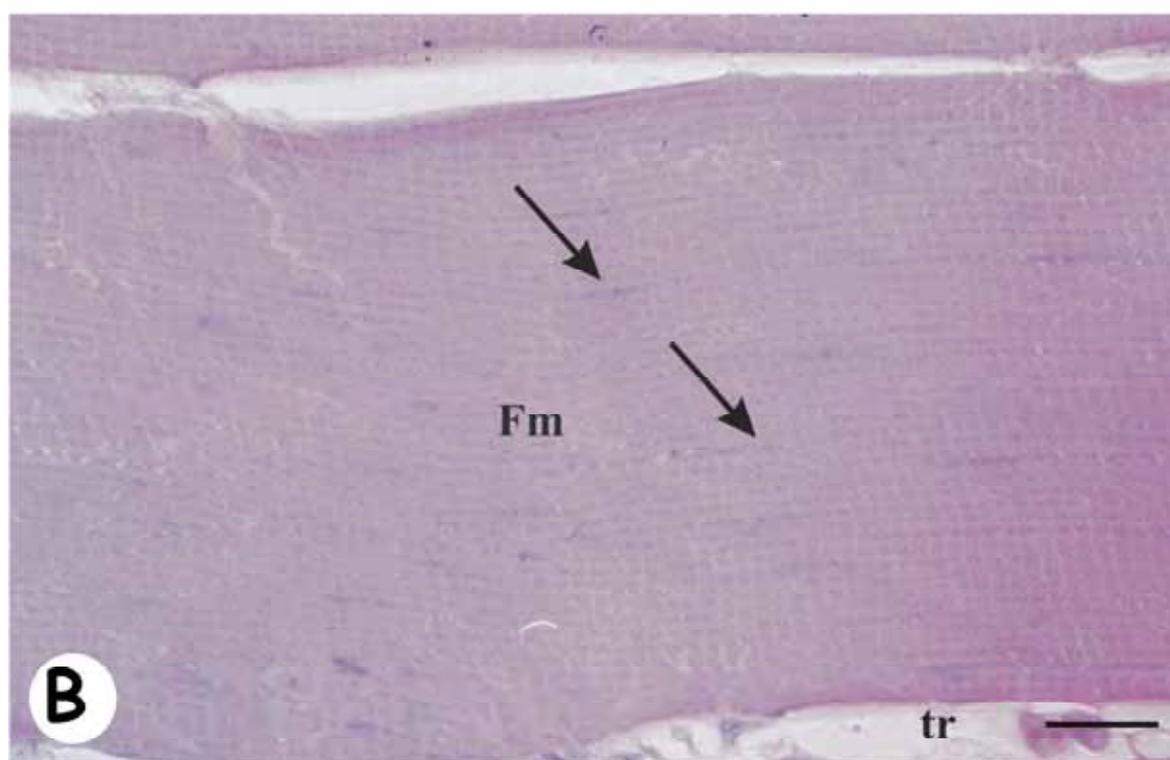
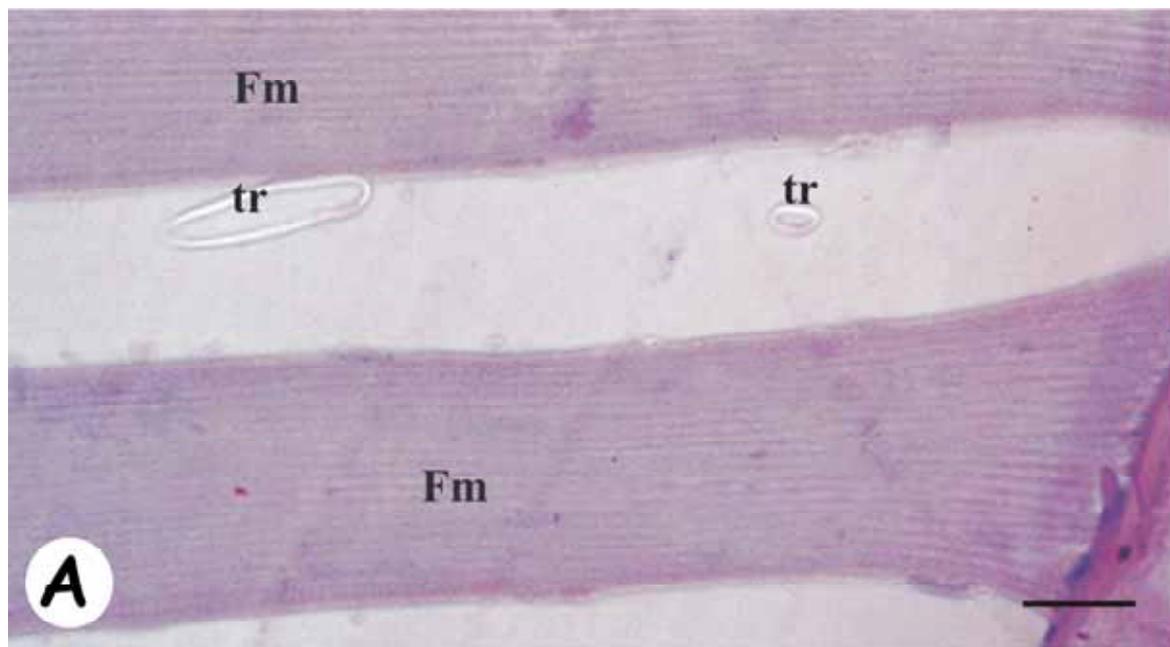


Figura 04 - Corte longitudinal das fibras musculares (Fm) de operárias nutridoras. **A.** Fibra muscular (Fm) de *Scaptotrigona postica* vendo-se as miofibrilas constituintes. **B.** Fibra muscular (Fm) de *pis mellifera*, vendo-se também as miofibrilas. Barras = 20 μ m.

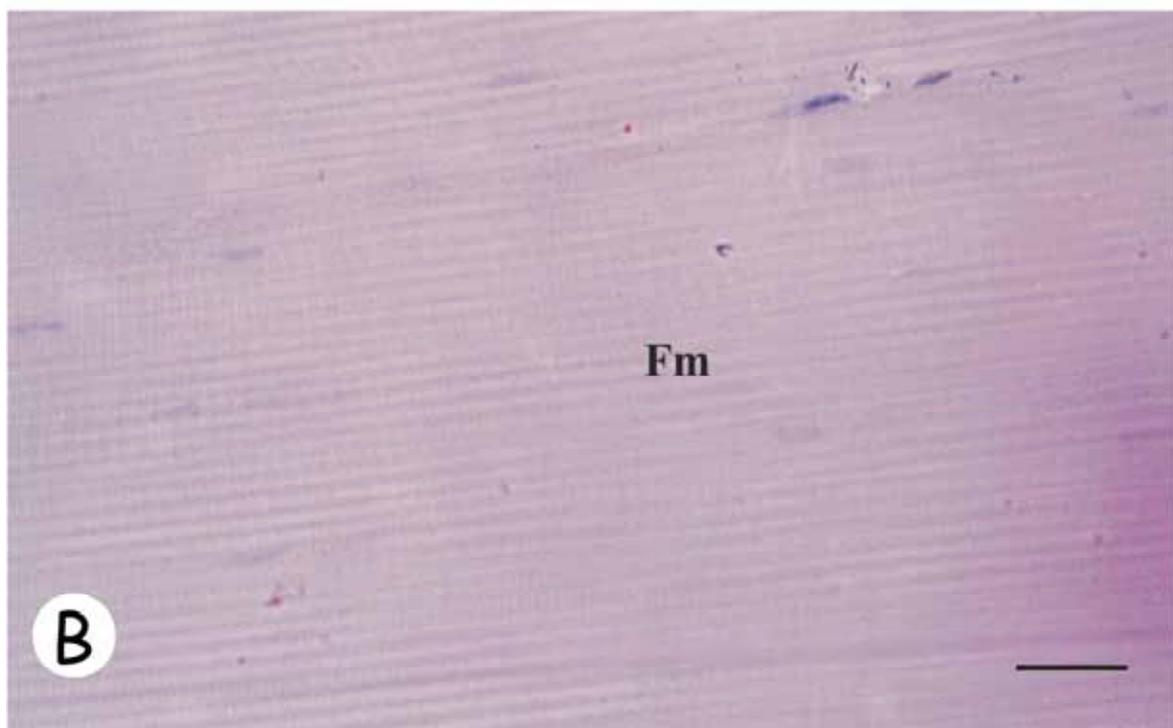
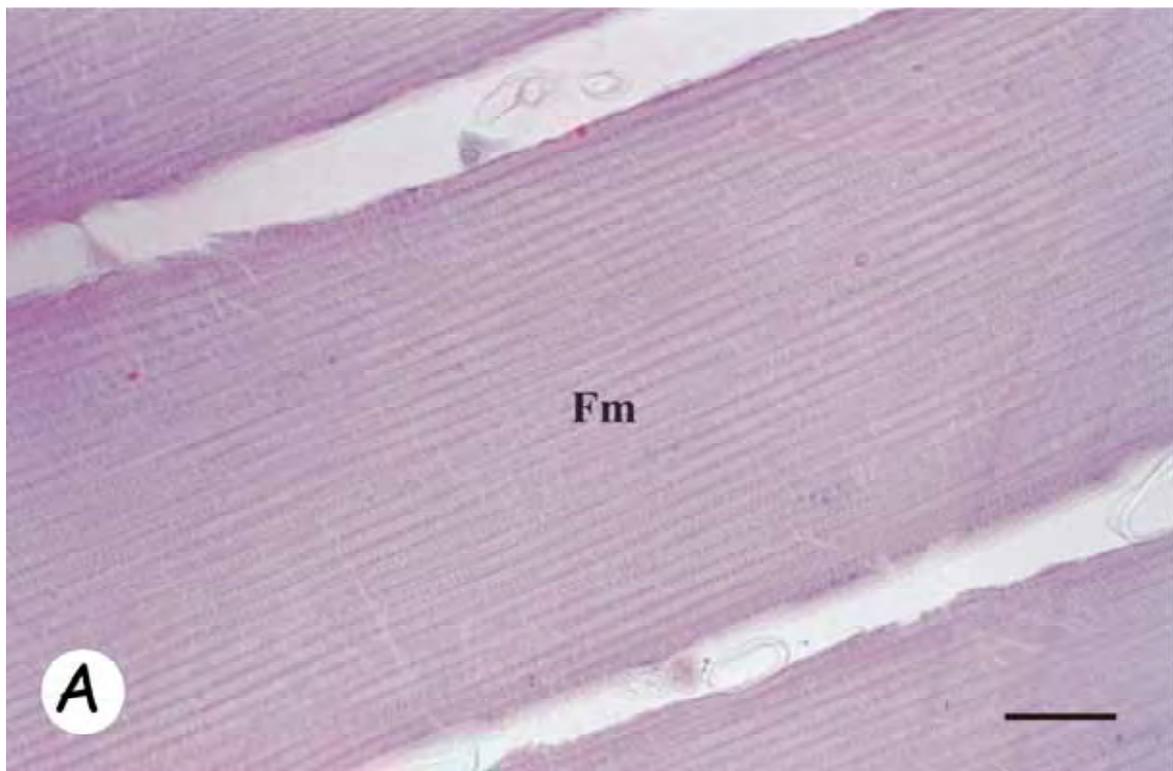


Figura 05 – Secção longitudinal das fibras musculares de operárias campeiras. **A.** Fibra muscular (fm) de *Scaptotrigona postica* com detalhes dos núcleos (setas). tr = traquéias. **B.** Fibras musculares (fm) de *Apis mellifera* notando-se as traquéias (tr) entre elas. Barras = 20 μ m

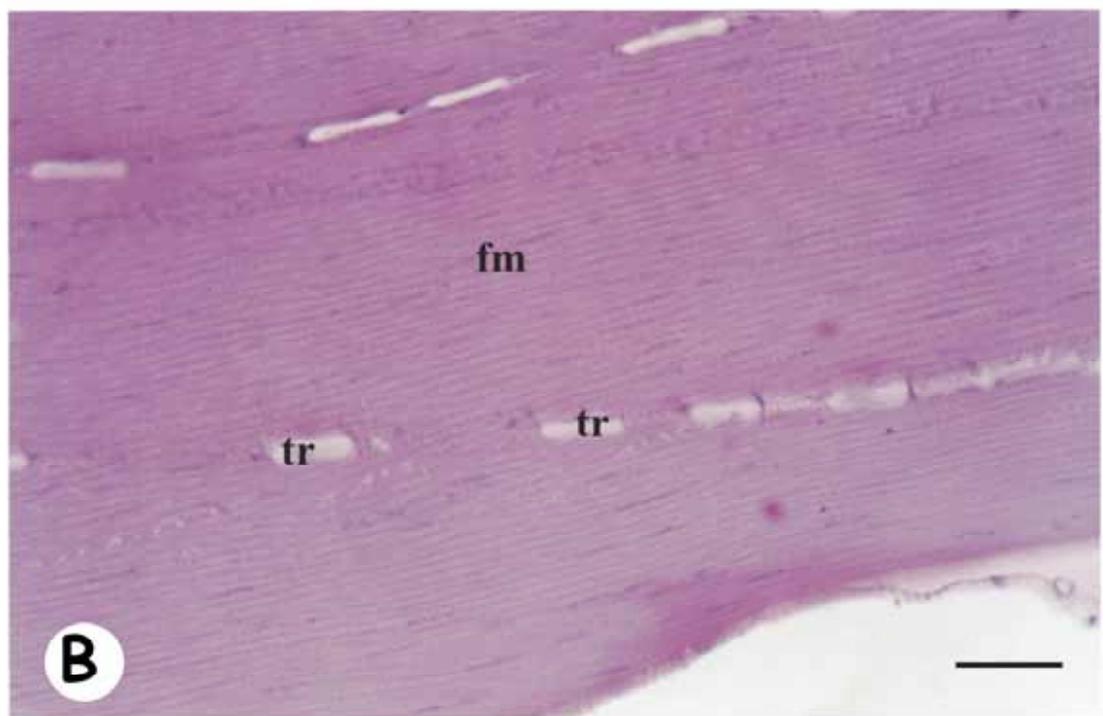
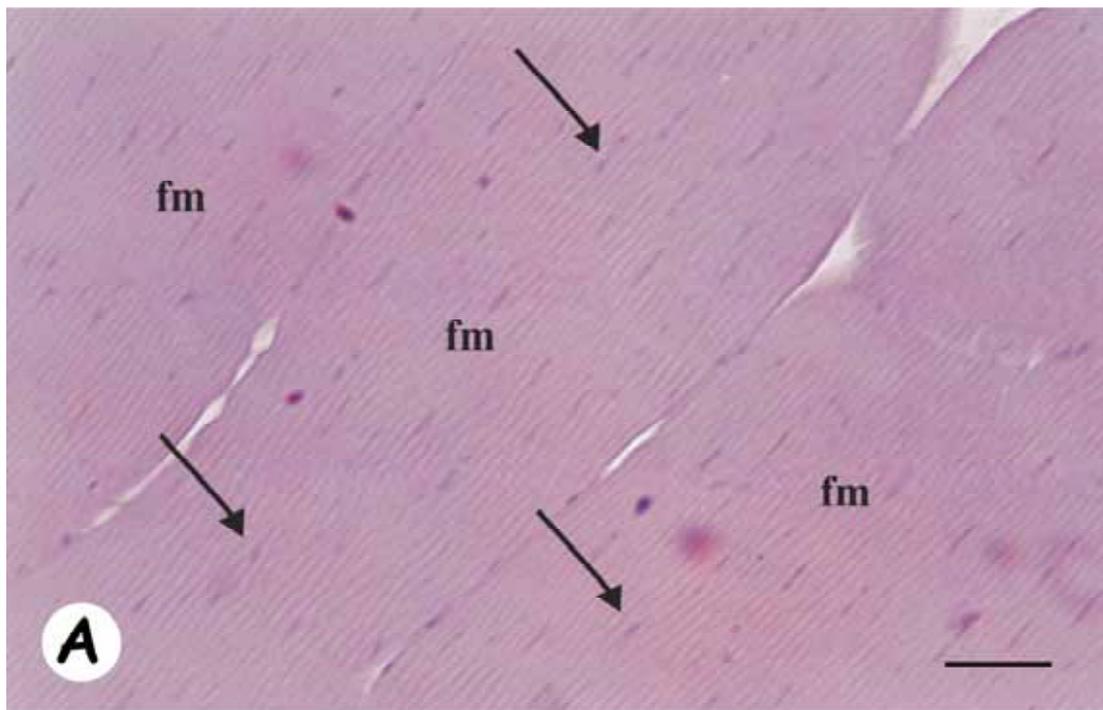


Figura 06 - Detalhe das miofibrilas de *Scaptotrigona postica*. **A.** Miofibrilas de operárias nutridoras (mf) intercaladas pelos núcleos (setas). Notam-se constituintes das miofibrilas e sarcoplasma. Barra = 10 μ m **B.** Corte transversal, vendo-se detalhes das miofibrilas e do sarcoplasma. Barra = 10 μ m. **C.** Corte longitudinal de uma fibra de operária nutridora mostrando mitocôndrias entre as miofibrilas (setas). Barra = 20 μ m. **D.** Corte longitudinal da miofibrila de operária campeira, onde se notam os núcleos (setas) intercalados e a estriação das miofibrilas. Barra = 20 μ m.

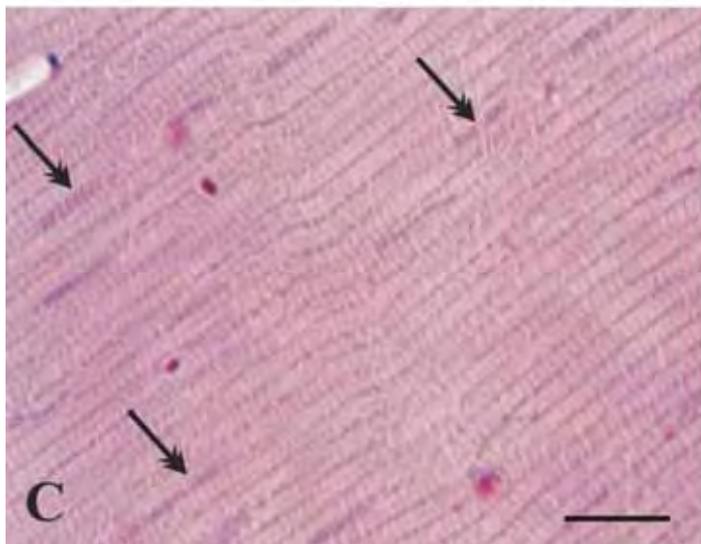
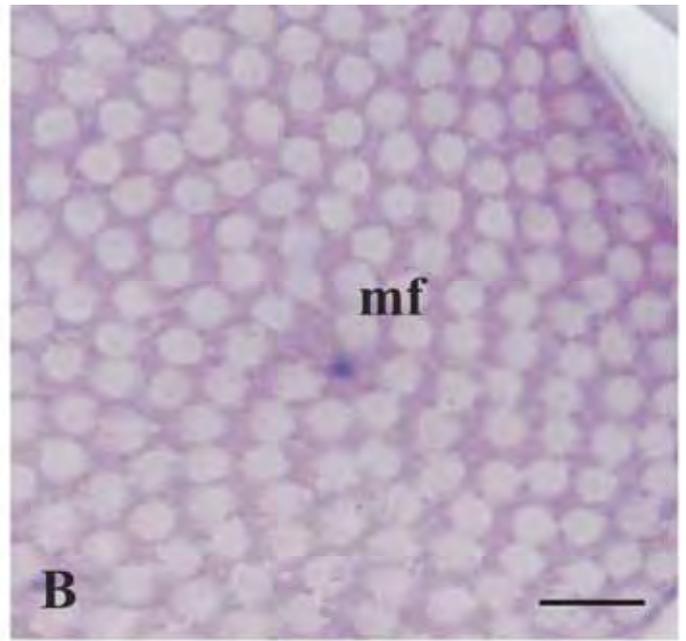
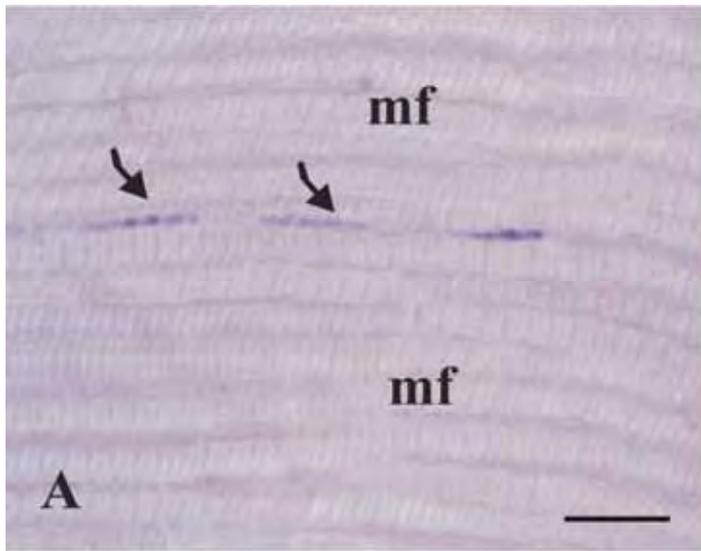


Figura 07 - Gráfico mostrando espessura média de fibras do feixe dorso-ventral da musculatura do vôo de operárias, rainhas e machos de *pis mellifera* e *Scaptotrigona postica* em diferentes fases da vida. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5%.

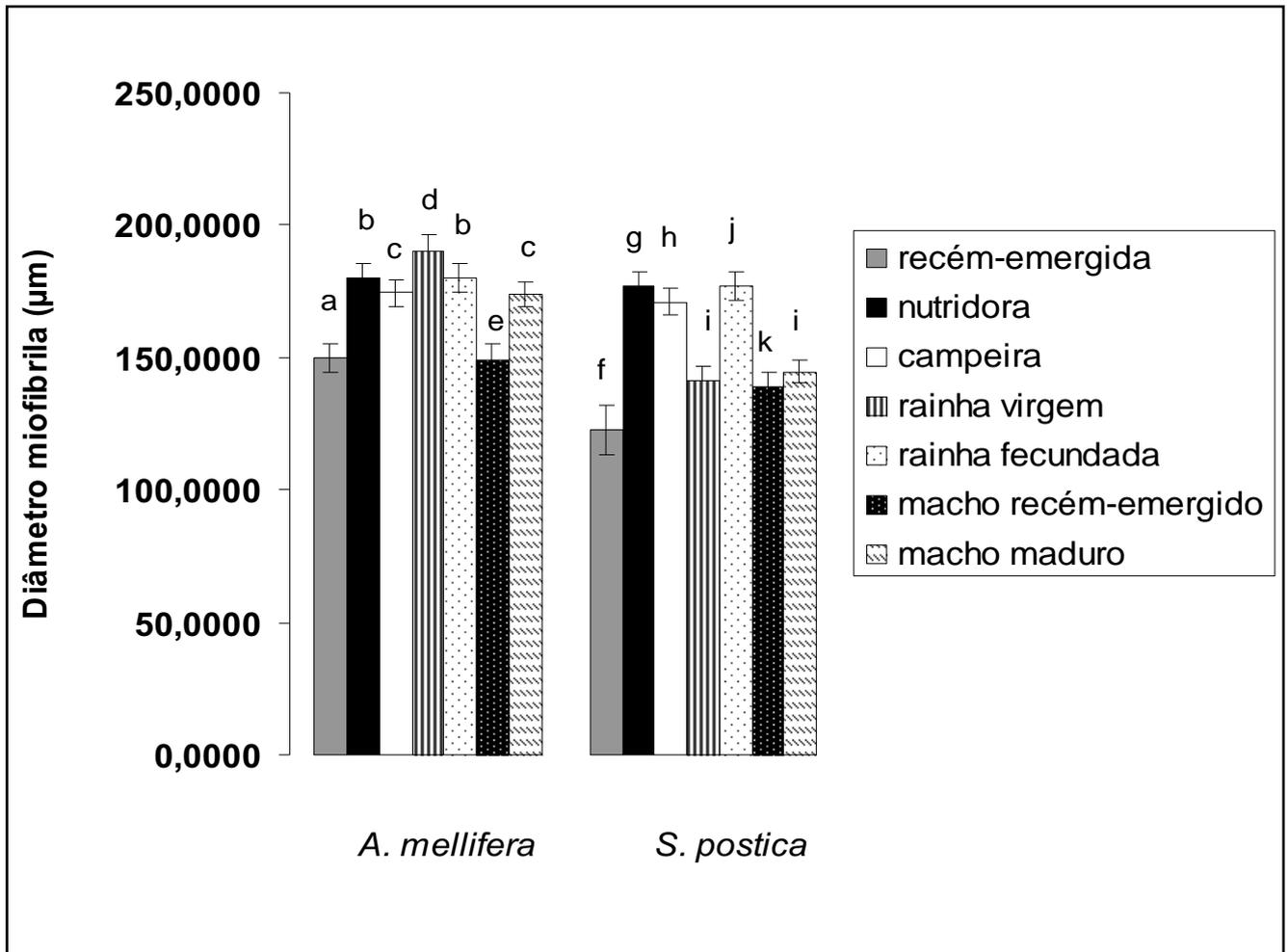


Tabela 01 - Média dos diâmetros das miofibrilas dos indivíduos com diferentes idades e exercendo diferentes funções nas colônias de *Scaptotrigona postica* e *pis mellifera*.

ESPECIES	FASE DA VIDA	DIÂMÉTRO
<i>. mellifera</i>	Operária recém-emergida	2.4 μ m
<i>. mellifera</i>	Operária nutridora	2.7 μ m
<i>. mellifera</i>	Operária campeira	2.9 μ m
<i>. mellifera</i>	Macho recém-emergido	3.1 μ m
<i>. mellifera</i>	Macho maduro	3.5 μ m
<i>. mellifera</i>	Rainha Virgem	3.0 μ m
<i>. mellifera</i>	Rainha Fecundada	3.2 μ m
<i>S. postica</i>	Operária recém-emergida	2.1 μ m
<i>S. postica</i>	Operária nutridora	2.3 μ m
<i>S. postica</i>	Operária campeira	2.6 μ m
<i>S. postica</i>	Macho recém-emergido	2.9 μ m
<i>S. postica</i>	Macho maduro	3.1 μ m
<i>S. postica</i>	Rainha Virgem	2.4 μ m
<i>S. postica</i>	Rainha Fecundada	2.7 μ m

6.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (M.E.V.)

O corte transversal do tórax (Figura 8A) mostra a disposição dos feixes musculares dorso-ventrais, os quais se fixam ao tegumento, que funciona como exoesqueleto, e não às asas. O corte longitudinal mostra a disposição do feixe antero-posterior e como ele se fixa posteriormente ao primeiro fragma e anteriormente ao escutelo (Figura 8B).

Tanto o feixe dorso-ventral como o ântero-posterior é formado por fibras gigantes, formadas por numerosas miofibrilas (Figura 8C) As fibras em cortes transversais apresentam secção circular tendendo a ser poligonais devido a sua compactação no feixe.

Nas figuras 8A e 8B vê-se bem a membrana acelular que envolve os feixes que correponderia ao perimísio.

Detalhamento do feixe muscular (Figura 8C) mostra as várias fibras componentes do feixe e ausência de tecido de preenchimento entre elas. Células intersticiais que aparecem na figura 8C são provavelmente hemócitos ou células do corpo gorduroso. O detalhamento de uma fibra permite ver as miofibrilas e alguns componentes que preenchem os espaços entre elas, provavelmente mitocôndrias (Figura 8D).

6.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (M.E.T.)

6.4.1. Aspectos ultra-estruturais gerais

As fibras do músculo do vôo das espécies estudadas são espessas e contêm numerosas miofibrilas com núcleos, mitocôndrias e pouco retículo endoplasmático intercalados. Os sarcômeros são curtos e quase totalmente ocupados pela banda A. A banda I é muito curta (Figura 9A, D). As mitocôndrias aparecem grandes e numerosas, contendo muitas cristas, às vezes enoveladas e com matriz elétron-densa (Figura 9B,C,D). Os núcleos são alongados, distribuem-se tanto entre as miofibrilas como na periferia das fibras e apresentam heterocromatina condensada em blocos (Figura 9A,B). O retículo endoplasmático liso encontra-se no sarcoplasma,

juntamente com ribossomos e glicogênio (Figura 9B,D) em quantidades variáveis e com distribuição que depende das idades. Ramos traqueais penetram por invaginações da membrana plasmática, por longas distâncias, para o interior da fibra (Figura 9A). Os miofilamentos, nas miofibrilas apresentam relação 1:6, ou seja, um filamento de miosina para 6 de actina (Figura 9C). O glicogênio apresenta-se em partículas do tipo β e é encontrado tanto no sarcoplasma (Figura 10 A,B) como entre os miofilamentos, na banda A (Figura 9D).

O músculo do vôo prende-se diretamente ao exoesqueleto (Figura 11A) através de células tendão, as quais são células epidérmicas modificadas (Figura 11B). Estas células estão firmemente ligadas à cutícula por reforços na membrana plasmática. A superfície de contato com a cutícula é aumentada pela penetração de “espículas” desta por invaginação da membrana plasmática apical das células. A superfície de contato com o músculo também é aumentada por interdigitações das membranas plasmáticas contactantes. O contato é reforçado por estruturas semelhantes à desmossomos.

Geralmente não se encontram terminações nervosas nesses músculos, ou estas são muito raras. Nas preparações da musculatura de operárias não foram vistas, e nas rainhas raramente.

6.4.2. Aspectos ultra-estruturais particulares

6.4.2.1. Operárias

O que mais chama a atenção no músculo do vôo das operárias recém-emergidas tanto de *Apis mellifera* (Fig. 12A, B) quanto em *Scaptotrigona postica* (Fig. 12C, D) são as mitocôndrias, as quais não estão ainda completamente desenvolvidas. Em *A. mellifera* apresentam-se maiores e esféricas (Figura 12A, B) e em *S. postica* são mais alongadas, pequenas e pobres em cristas (Figura 12C, D). No entanto, as miofibrilas também se apresentam mais delgadas em vista disso a quantidade de sarcoplasma e de retículo endoplasmático entre elas parece maior. A cromatina no núcleo apresenta-se dispersa e grânulos de glicogênio, principalmente em *S. postica* aparecem dispersos no sarcoplasma (Figura 12C).

Nas operárias nutridoras de *Scaptotrigona postica* (Figura 13A, B, C) é notável o aumento no tamanho das mitocôndrias em relação as operárias recém-emergidas, os quais por sua vez passaram a apresentar muitas cristas e matriz elétron-densa. As miofibrilas das operárias nutridoras também se apresentam mais desenvolvidas com aumento na sua espessura conforme mostrou a morfometria. Em consequência a quantidade de sarcoplasma e de retículo parece reduzida (Figura 13A, B, C). Nesta fase não se observa glicogênio nas fibras.

Nas operárias campeiras de *S. postica* (Figura 14A, B, D) o glicogênio aparece no sarcoplasma, na proximidade das mitocôndrias as quais são volumosas, e entre os miofilamentos (Figura 14A). Porém nesta fase da vida algumas mitocôndrias encontram-se em processo de degeneração (Figura 14A, B), mostrando matriz elétron-transparente e cristas desarranjadas. Os núcleos nesta fase apresentam massas esféricas, irregulares, de cromatina condensada (Figura 14 A, C).

Em *S. mellifera* verificam-se as mesmas alterações morfológicas entre as fases, embora o aumento de tamanho das mitocôndrias não pareça tão acentuado, visto que estes já são maiores nas operárias recém-emergidas. A degeneração mitocondrial nesta espécie também não é tão característica, mas algumas apresentam as cristas enveloadas no interior dando-lhe o aspecto de figuras mielínicas.

6.4.2.2. Rainhas Virgens

Nas rainhas “virgens” de *S. postica* e *S. mellifera* há muito glicogênio sob a forma de partículas β no sarcoplasma e entre as miofibrilas (Figuras 15 A, B). Estão presentes muitas mitocôndrias íntegras e volumosas e em algumas fibras as miofibrilas se apresentaram irregulares e com algumas falhas nos miofilamentos. Embora não seja comum a presença de terminações nervosas nas fibras do músculo do vôo de abelhas, em rainhas estas foram observadas com certa frequência (Figura 15C).

6.4.2.3. Rainhas Fecundadas

A ultra-estrutura da musculatura do vôo de *S. postica* e *A. mellifera* nas rainhas fecundadas revelou características semelhantes às rainhas virgens de ambas as espécies. No entanto, as rainhas fecundadas apresentam fibras com núcleos pequenos com cromatina condensada, as mitocôndrias muito volumosas, algumas com indícios de degeneração e o glicogênio é praticamente inexistente. Os miofilamentos também se apresentam irregulares evidenciando falhas nas miofibrilas. Nas rainhas fecundadas de *A. mellifera* a quantidade de mitocôndrias que se apresenta em processo degenerativo é menor e há proporcionalmente mais miofibrilas com miofilamentos bem preservados (Figura 16A, B). No entanto, as figuras mielínicas em na figura 16A correspondem a degeneração mitocondrial. O glicogênio que aparecia em grande quantidade nas rainhas virgens, não foi visto na musculatura das fecundadas.

6.4.2.4. Machos

Os machos recém emergidos, tanto de *A. mellifera* (Figura 17A) quanto de *S. postica* (Figura 17B) apresentam as miofibrilas ainda pouco desenvolvidas com algumas mitocôndrias esparsas no sarcoplasma, embora grandes, bem maiores que das operárias na mesma fase, mas menores que as das rainhas. Os machos maduros de *A. mellifera* (Figura 17C) e *S. postica* (Figura 17C) apresentam miofibrilas visivelmente mais desenvolvidas e mitocôndrias maiores. Em *A. mellifera* as mitocôndrias apresentaram sinais claros de degeneração, com forte desarranjo das cristas, já em *S. postica* as mitocôndrias não apresentaram desorganização mitocondrial. Não foi observada a presença de glicogênio em nenhuma fase. A cromatina nuclear nos machos maduros aparece muito condensada (Figura 17D).

Figuras

Figura 08 – M.E.V. da musculatura do Vôo de *pis mellifera*. **A.** Corte transversal do tórax mostrando a posição dos feixes dorso-ventrais (DV) e ântero-posterior (AP). es = escutelo. Barra = 1 mm. **B.** Corte sagital mostrando as fibras do músculo antero-posterior. me = membrana que envolve os feixe muscular; es = escutelo. Barra = 0,5 mm. **C.** Fibras musculares (fm) mostrando a interligação por finas ramificações traqueais (setas). ci = células intersticiais. Barra = 300 μm . **D.** Grande ampliação da fibra muscular cortada transversalmente, vendo-se as miofibrilas (mi) e prováveis mitocôndrias (setas simples) e retículo (setas duplas) entre elas. Barra = 10 μm .

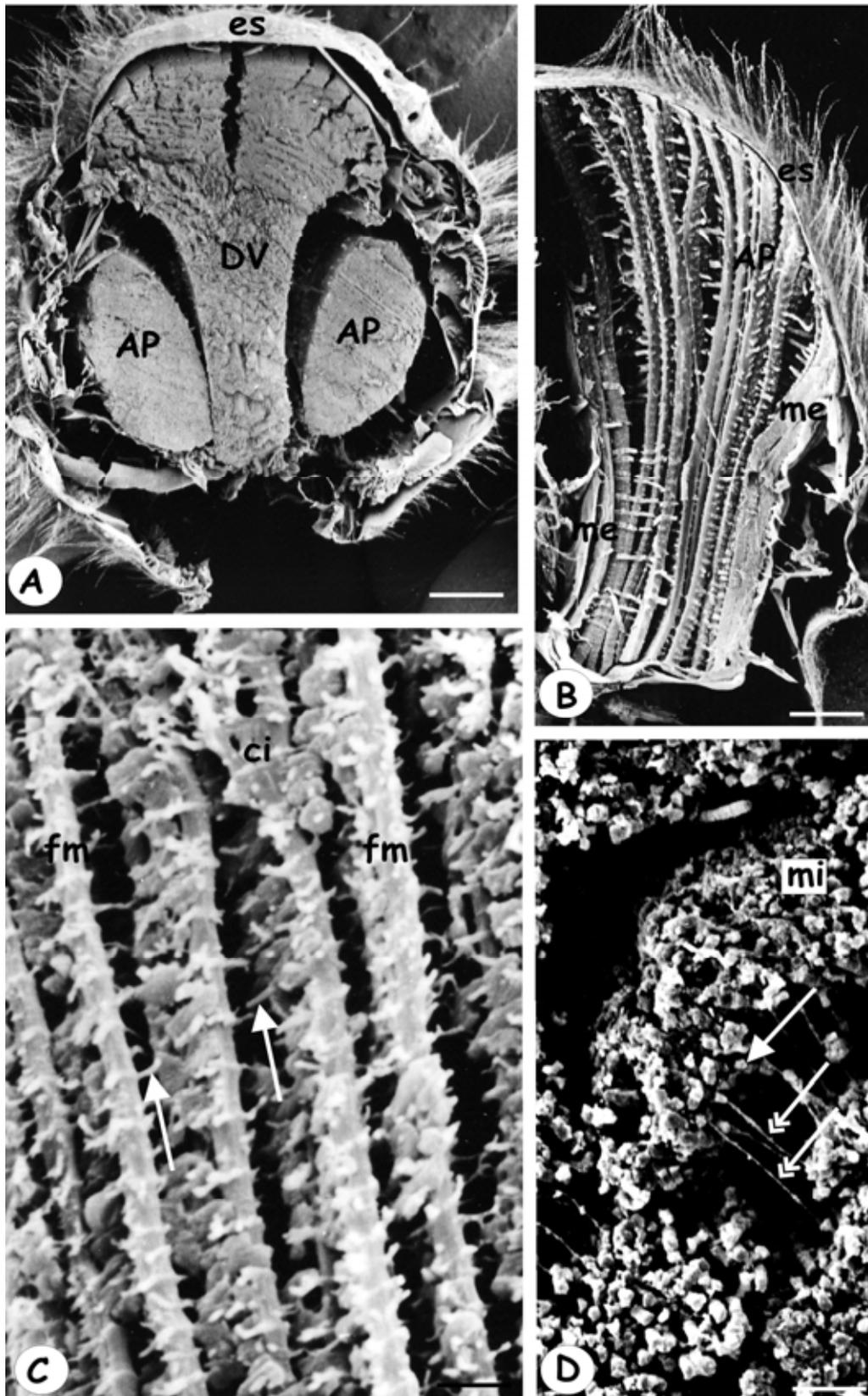


Figura 09 - M.E.T. mostrando aspectos gerais da musculatura do vôo de *pis mellifera* e *Scaptotrigona postica*. **A.** Corte longitudinal de fibra muscular vendo-se os sarcômeros curtos (sc), núcleo (n); mitocôndrias (m), traqueíola (tr) e vesículas do retículo sarcoplasmático (rel). mi = miofibrila. Barra = 1,6 μ m. **B.** Corte obliquo de fibra muscular vendo-se a disposição das mitocôndrias (m) e retículo (rel) como espaço claro ao redor das miofibrilas (mi). Barra = 1,3 μ m. **C.** Ampliação do corte transversal mostrando o arranjo hexagonal dos miofilamentos de actina em torno dos de miosina (setas). Notar díade (di) formada por uma vesícula do retículo sarcoplasmático e uma do sistema T. m = mitocôndria. Barra = 0,8 μ m. **D.** Corte longitudinal mostrando glicogênio entre os miofilamentos (seta simples) e no sarcoplasma (seta dupla). mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barra = 1,3 μ m.

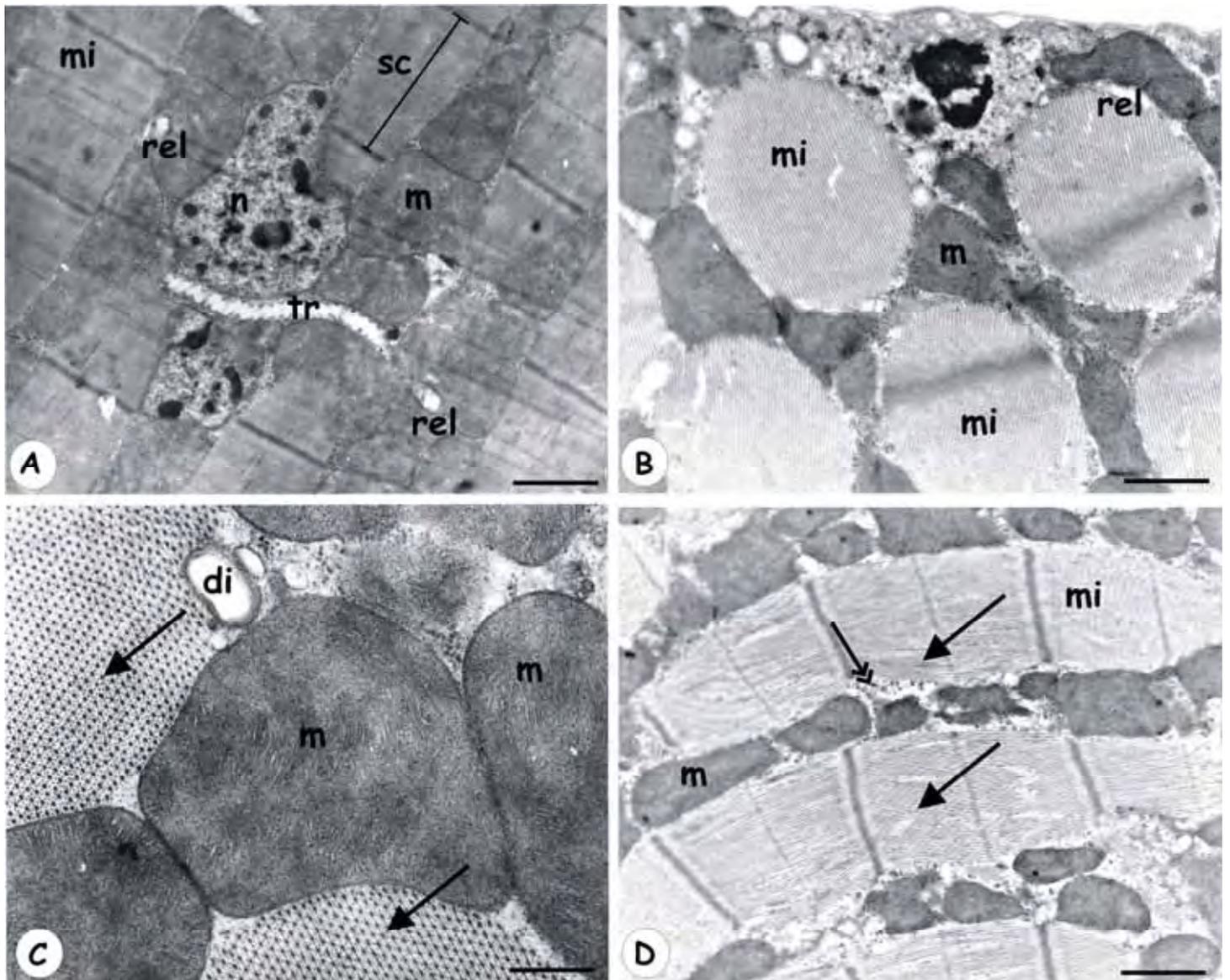


Figura 10 – M.E.T. do músculo do vôo de operária campeira em *Scaptotrigona postica*. **A.** Corte oblíquo das fibras musculares, mostrando glicogênio entre os miofilamentos (setas) e no sarcoplasma ao redor das mitocôndrias (gl). mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 0,6 μ m. **B.** Corte longitudinal da miofibrila (mi) mostrando glicogênio (gl) no sarcoplasma ao redor das mitocôndrias (m). Barra = 0,8 μ m

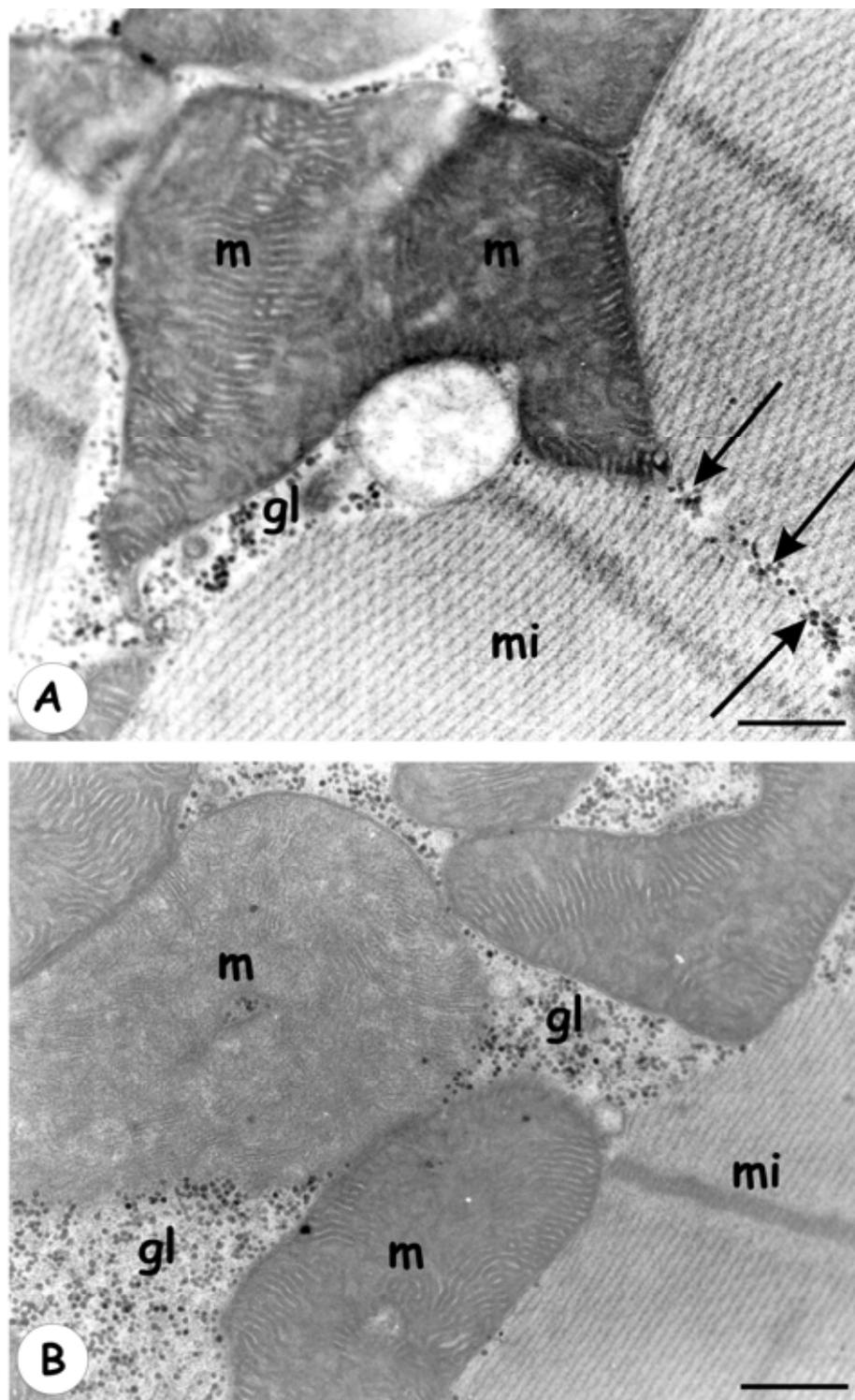


Figura 11 – Ligação do músculo ao exoesqueleto. **A.** M.E.V. mostrando que as fibras musculares (fm) prendem-se individualmente ao tegumento (t). Barra = 0,5mm. **B.** M.E.T. vendo-se a célula tendão (ct), nesta fase rica em glicogênio (gl). Notar espículas (e) de cutícula (c) penetrando através de invaginações da membrana plasmática apical e os reforços (setas) na membrana apical da célula tendão. Notar interdigitações das membranas da célula tendão e da fibra muscular (f) e a presença de desmosomos (d) nesses contatos. Barra = 1,3 μ m.

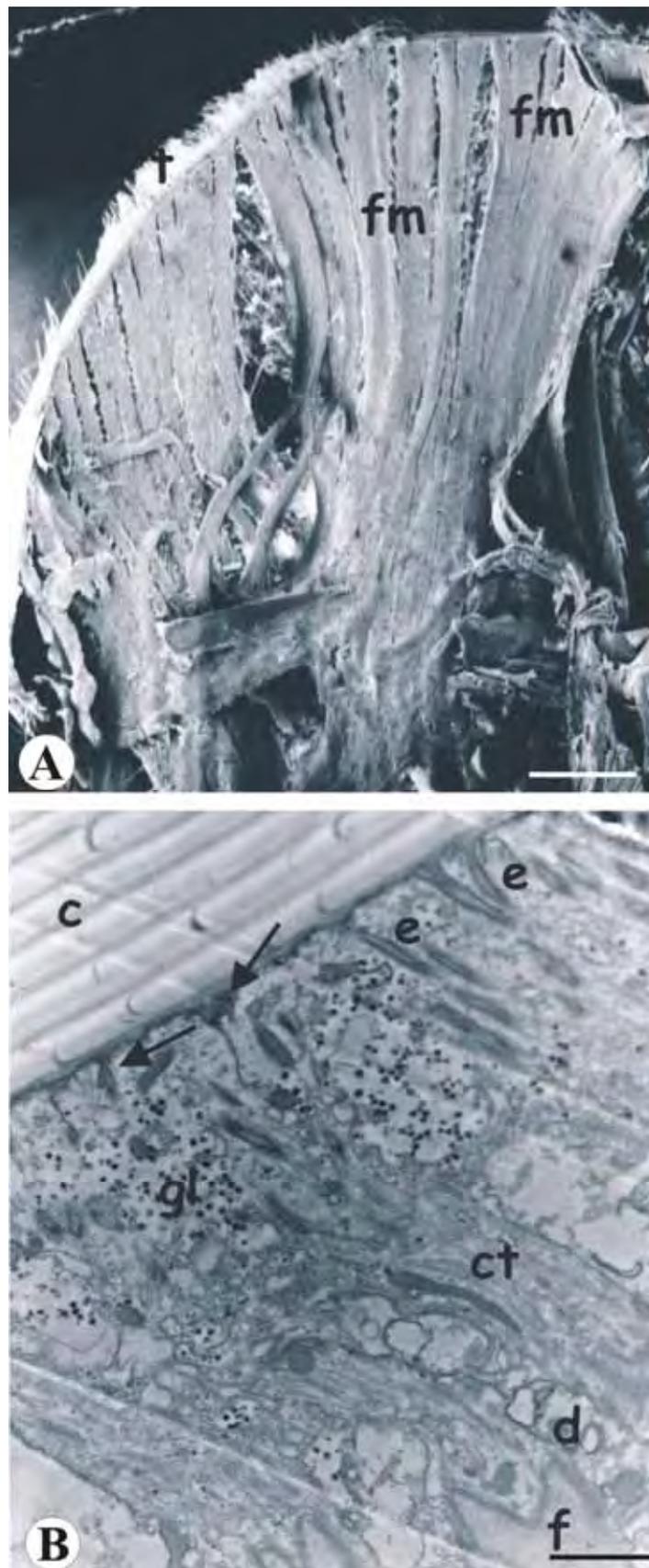


Figura 12 - M.E.T. do músculo do vôo de operárias recém-emergidas. **A e B.** Corte longitudinal e transversal, respectivamente da fibra muscular de *pis mellifera* vendo-se as mitocôndrias (m) pequenas e com poucas cristas e retículo endoplasmático liso (rel). mi = miofibrilas. Barra = 1,3 μ m, 1,2 μ m, respectivamente. **C e D.** Corte longitudinal e transversal, respectivamente de *Scaptotrigona postica*, vendo-se mitocôndrias pequenas (seta dupla) e alongadas, o núcleo (n) com cromatina dispersa e grande quantidade de sarcoplasma (sc). mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Notar as partículas de glicogênio (seta simples). Barra = 1,3 μ m, ambas

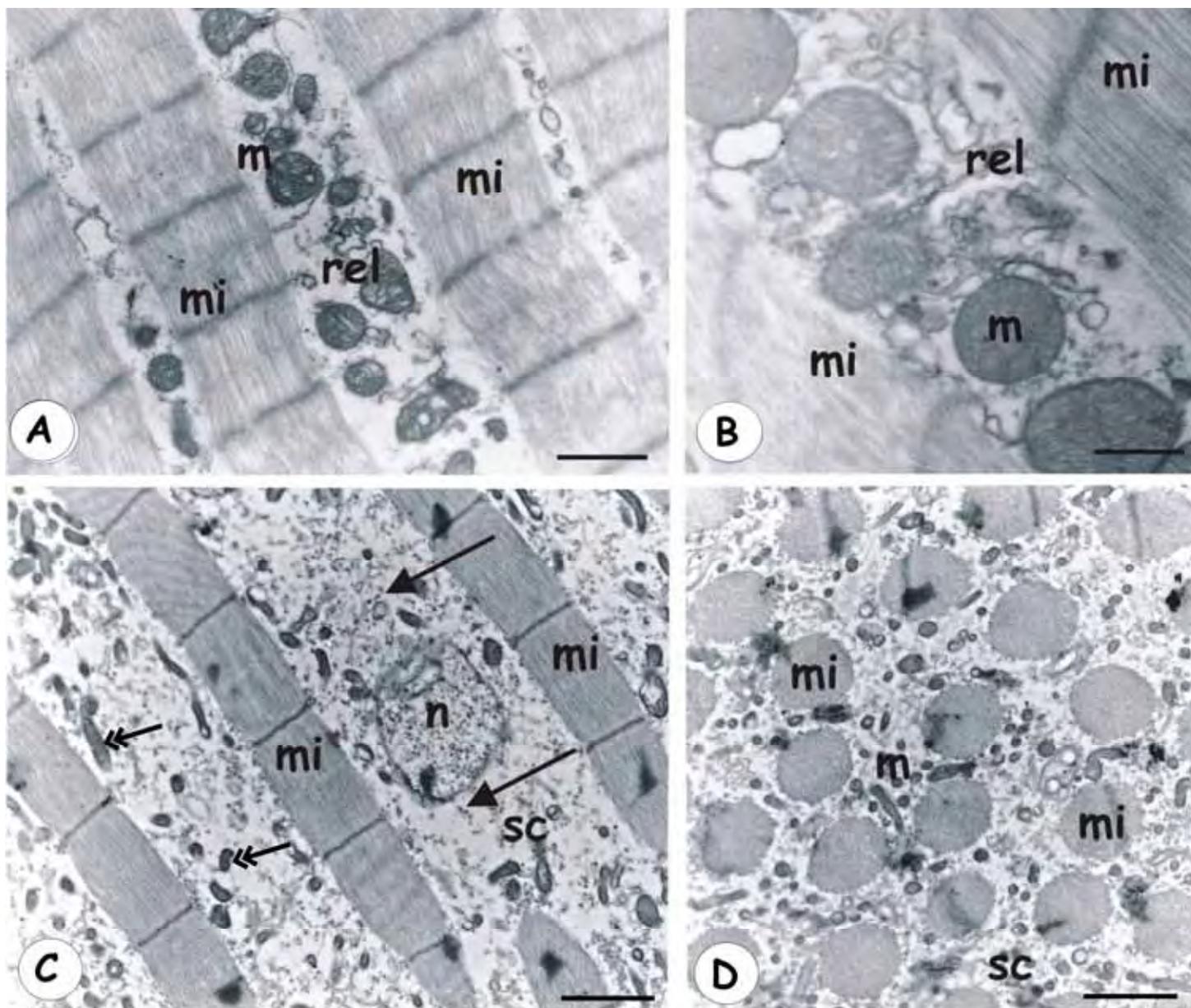


Figura 13 – M.E.T. da musculatura do vôo de operária nutridora. **A e B.** Fibras musculares de *Scaptotrigona postica* vendo-se as miofibrilas (mi) mais espessas e as mitocôndrias (m) grandes e com muitas cristas ocupando quase todo o sarcoplasma entre elas. tr = traqueíola; mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 1,6µm, 1,3µm, respectivamente. **C.** Corte longitudinal de *A. mellifera* vendo-se as miofibrilas (mi) bem estruturadas, mostrando sarcômeros (Sc) bem definidos e as mitocôndrias (m) também bem estruturadas. Notar a banda I (I) muito curta. Barra = 1,3µm.

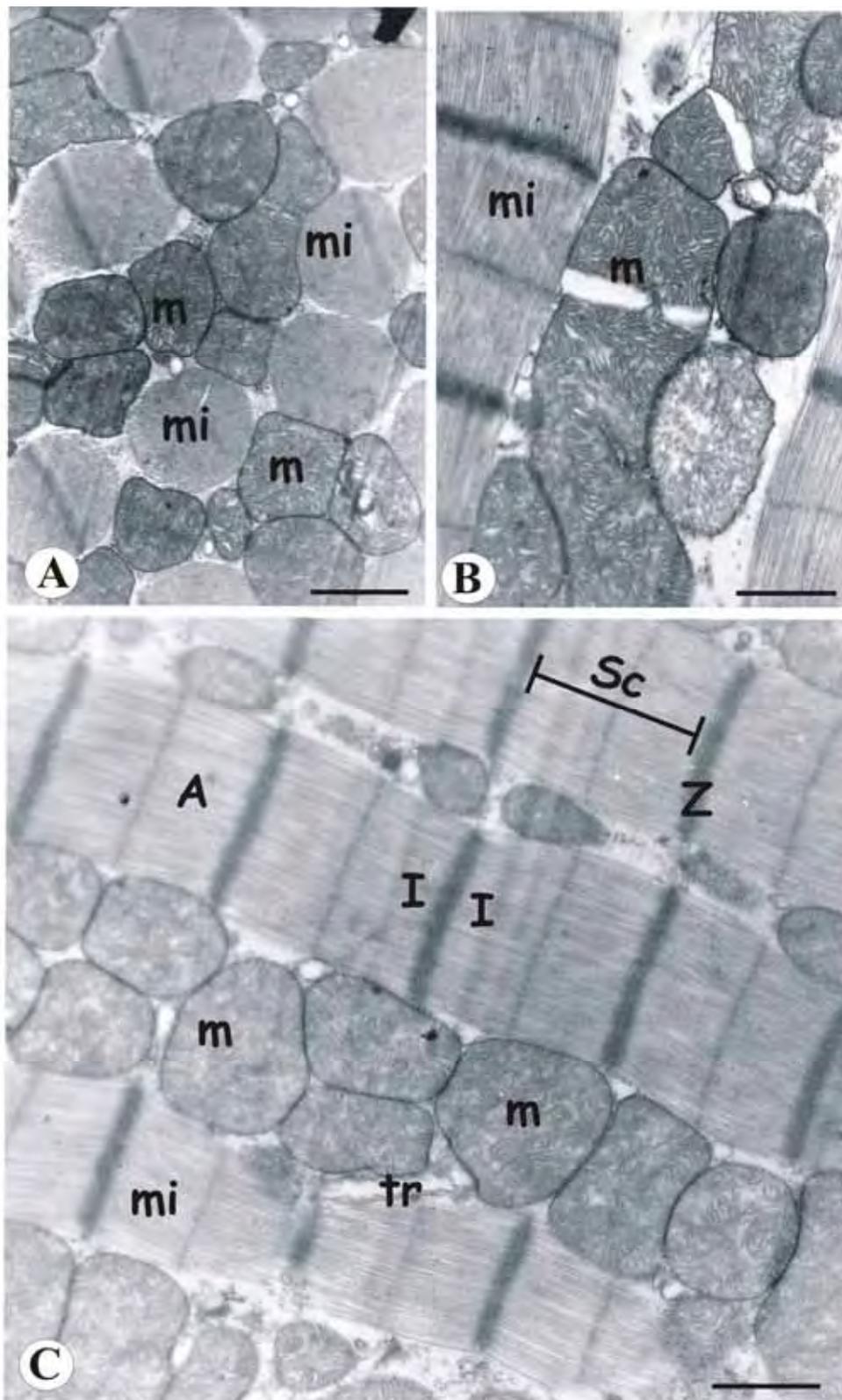


Figura 14 – M.E.T. do músculo do vôo de operária campeira *Scaptotrigona postica*. **A.** Mostrando sinais de degeneração mitocondrial (md) e núcleos (n) com cromatina (cr) muito condensada. Barra = 1,6 μ m. **B.** Notar mitocôndria degenerada (md) e normal (m). gl = glicogênio; Barra = 1,6 μ m. **C.** Corte transversal da fibra mostrando algumas falhas de miofilamentos nas miofibrilas (setas). n = núcleo; cr = cromatina condensada; m = mitocôndria. Barra = 0,7 μ m. **D.** Corte longitudinal, no qual é possível visualizar os depósitos de glicogênio (gl) e bem visível a Banda I (I). Barra = 1,3 μ m.

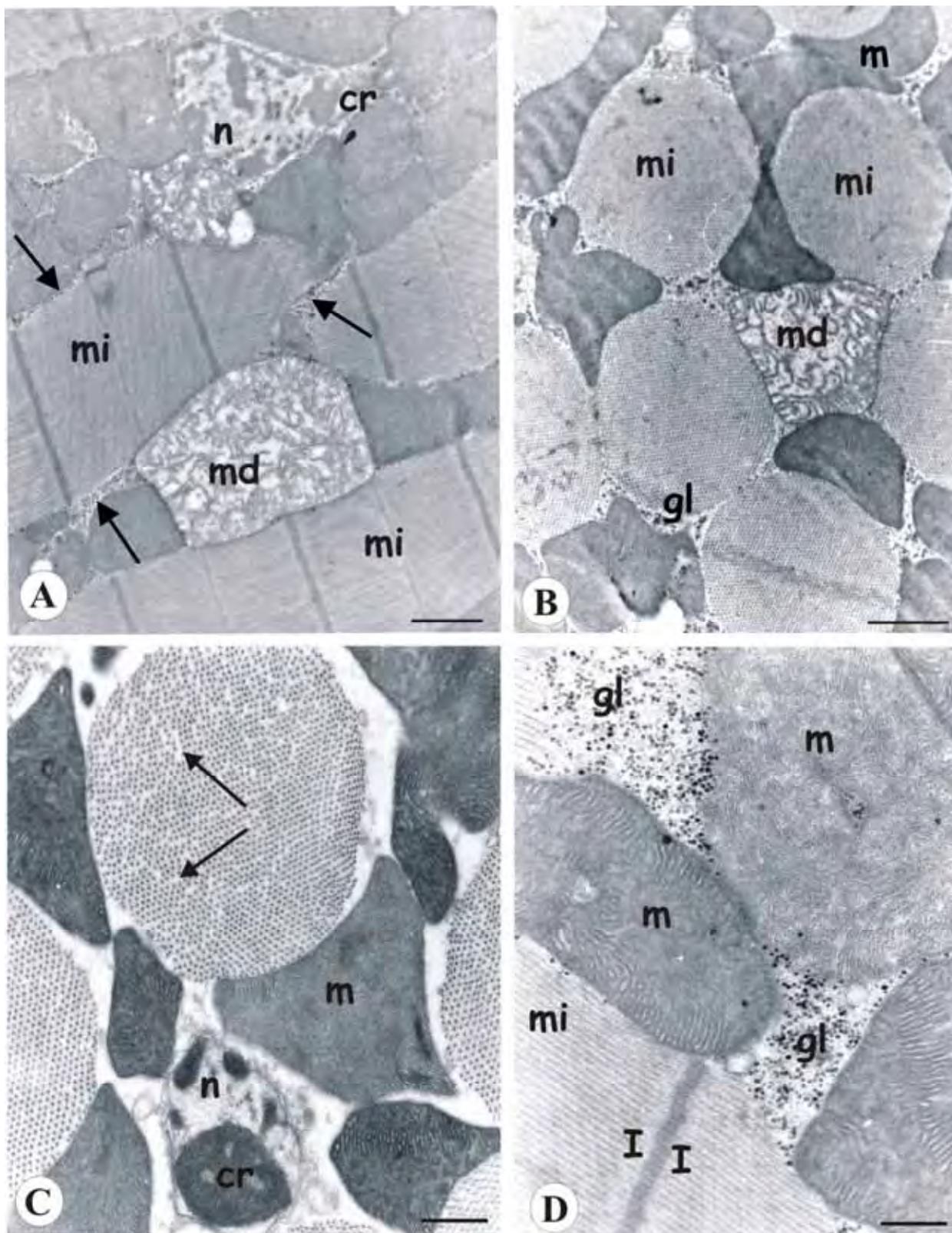


Figura 15 - M.E.T. de células musculares de rainhas virgens. **A.** Rainha virgem de *Scaptotrigona postica* mostrando mitocôndrias (m) pequenas e grande quantidade de glicogênio (seta dupla) no sarcoplasma e entre as miofibrilas. Barra = 1,3 μ m. **B.** e **C.** Rainha virgem de *Apis mellifera* vendo-se em **A** mitocôndria (m) já completamente desenvolvidas e pouco glicogênio (seta dupla) e em **C** falhas nas miofibrilas (setas) e inervação (ne) da fibra. Barra = 1,3 μ m, 1,6 μ m, respectivamente.

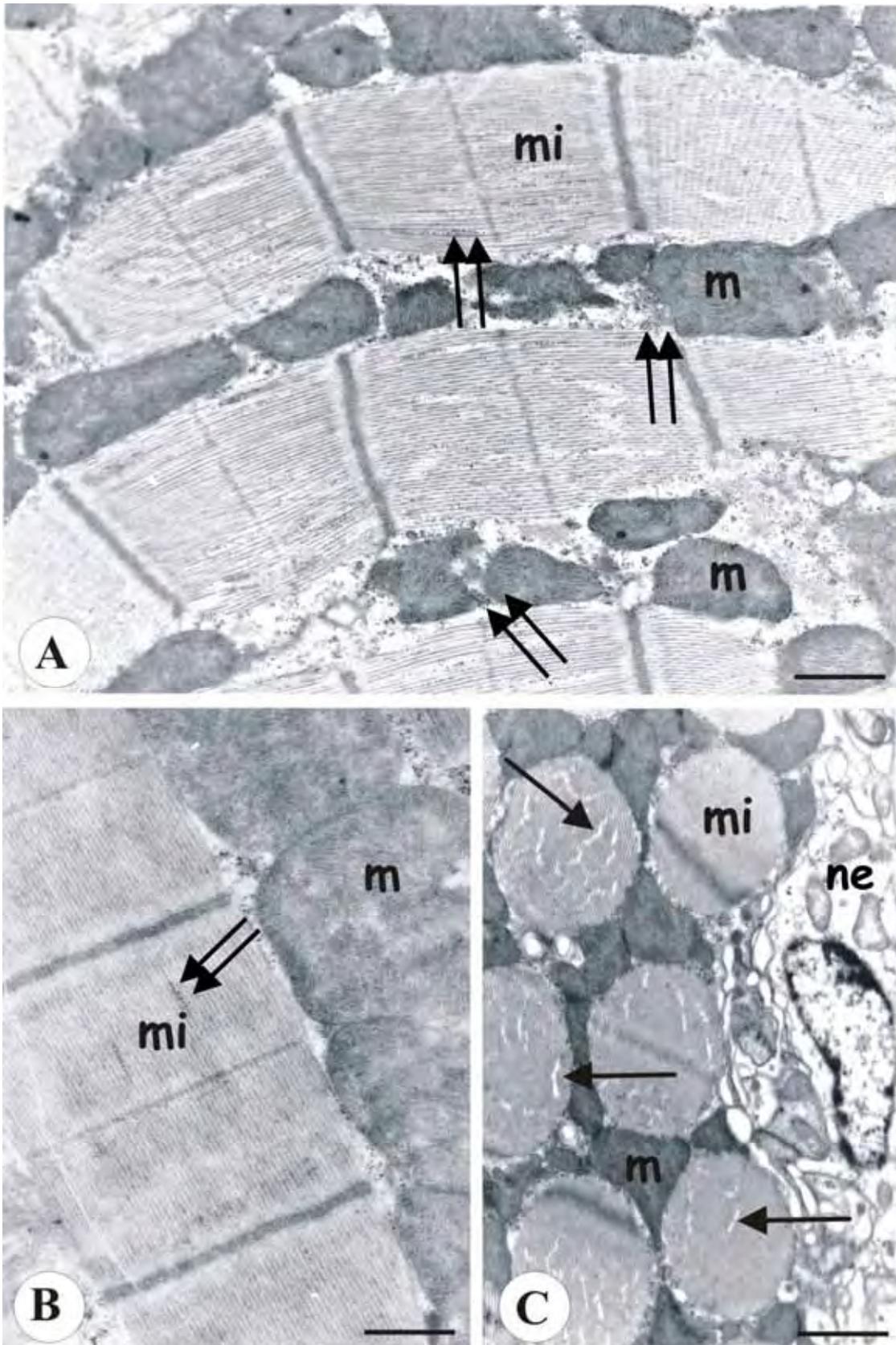


Figura 16 – M.E.T. de células musculares de rainhas fecundadas de *Scaptotrigona postica* (**A**) e *pis mellifera* (**B**). Notar em **A** a formação de figuras mielínicas (setas) a qual não corre em **B**. mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barras = 1,3 μ m.

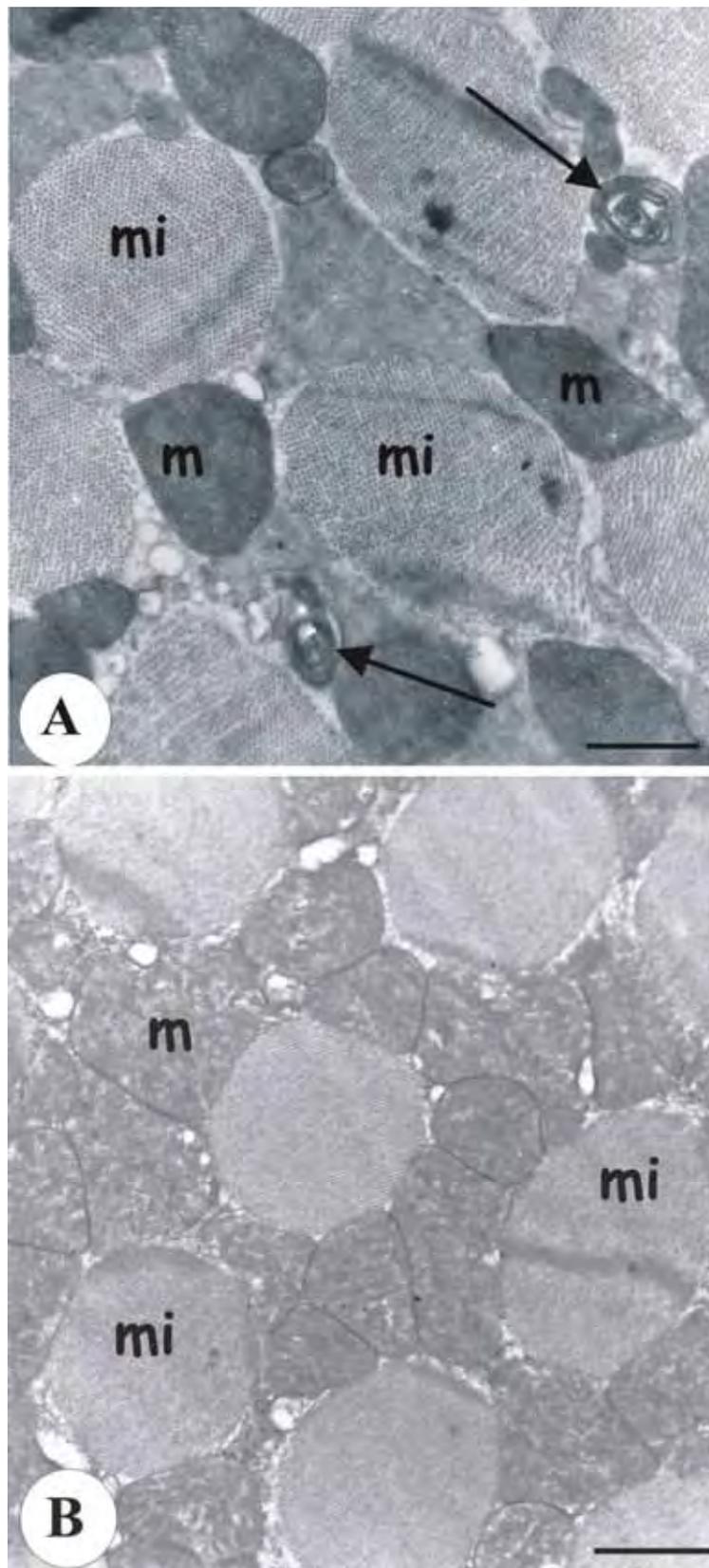
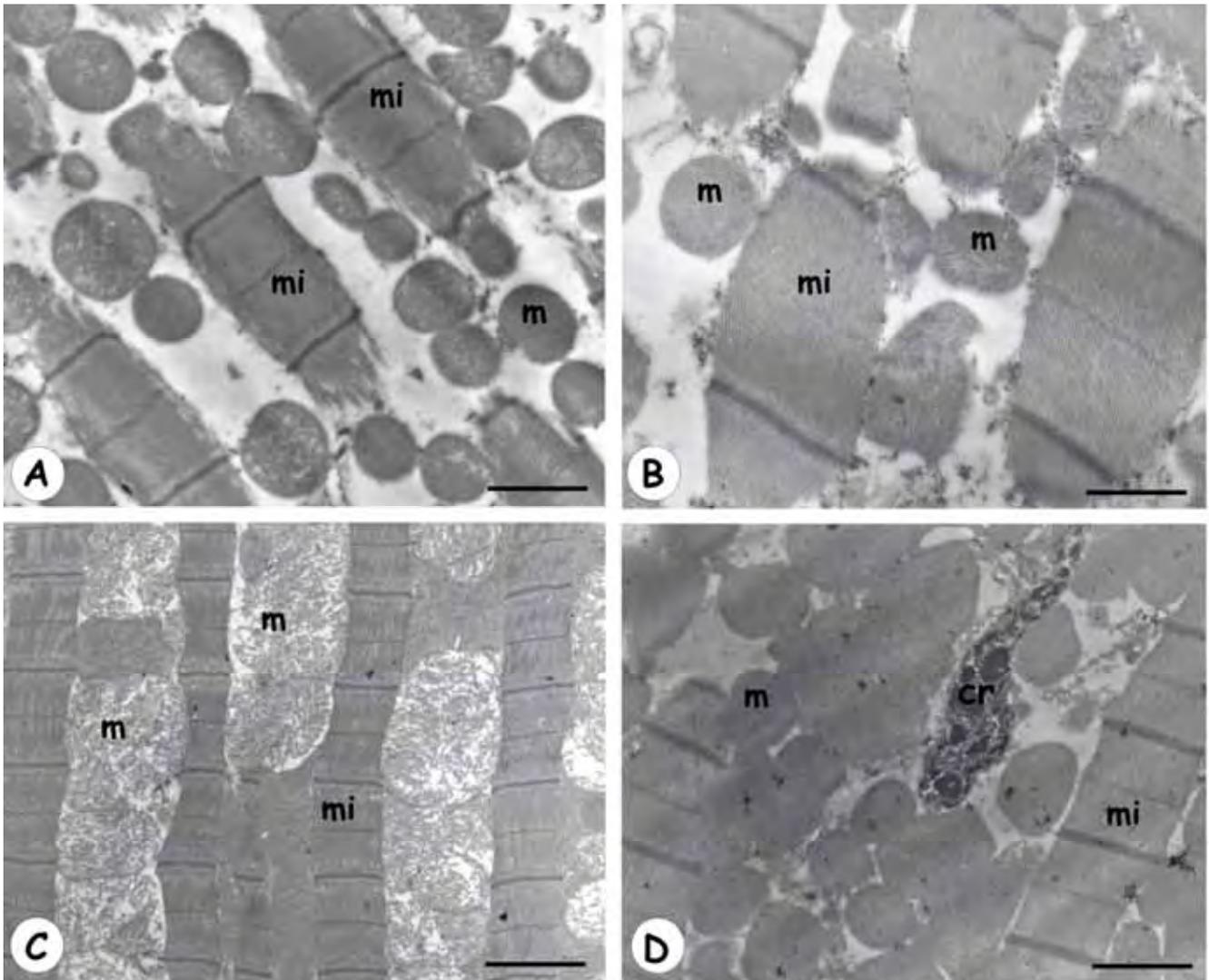


Figura 17 – M.E.T. de machos de *pis mellifera* e *Scaptotrigona postica*. **A.** Macho recém emergido de *pis mellifera* mostrando miofibrilas ainda pouco desenvolvidas (mi) com algumas mitocôndrias (m) esparsas. Barra = 1,2 μ m. **B.** Macho recém-emergido de *Scaptotrigona postica*, também com as miofibrilas (mi) pouco desenvolvidas e mitocôndrias (m) esparsas. Barra = 0,5 μ m. **C.** Macho maduro de *pis mellifera* com as miofibrilas (m) visivelmente mais desenvolvidas e mitocôndrias (m) maiores e também com sinais claros de degeneração. Barra = 1,5 μ m. **D.** Macho maduro de *Scaptotrigona postica*. As mitocôndrias estão em maior número e a miofibrila (m) mais desenvolvida. Cromatina (cr) muito condensada. Barra = 1,2 μ m.



6.5. CITOQUÍMICA

6.5.1 FOSFATASE ÁCIDA

Depósitos eletrôn-densos de chumbo, indicativos da atividade da fosfatase ácida foram encontrados em algumas regiões dos músculos de ambas as espécies. Os depósitos apareceram principalmente nas mitocôndrias, mas em alguns casos também no interior das miofibrilas, entre os miofilamentos. Os controles que foram incubados em meio sem o substrato, não apresentaram nenhum depósito de chumbo (conforme o esperado), mostrando que os depósitos negros observados, formaram-se por ação da atividade fosfatásica sobre o substrato fornecido, precipitando o chumbo.

Nas operárias recém-emergidas de ambas as espécies não foi constatada a presença de reação positiva. As operárias nutridoras de *A. mellifera* apresentaram reação positiva principalmente nas miofibrilas na altura da banda I (Figura 18A). Os músculos do controle não apresentaram nenhum tipo de marcação típica de atividade da fosfatase (Figura 18B) confirmando a natureza dos depósitos observados na figura 18A. Nas operárias campeiras a reação positiva, deu-se principalmente na banda A (Figura 19C), onde foi bem branda e nas mitocôndrias. O material controle não apresentou nenhuma marcação típica dessa reação (Figura 18D).

A musculatura dos machos recém-emergidos de ambas as espécies apresentou ausência de reação positiva (Figura 19A) e nos machos maduros de *A. mellifera* apareceram marcadas as mitocôndrias, bastante afetadas, e regiões próximas do sarcoplasma (Figura 19B). As miofibrilas (Figura 19C), e os espaços intercelulares (Figura 19D) apareceram marcados em machos maduros.

Nas rainhas virgens de *A. mellifera* não foi detectada reação positiva (Figura 20A), mas esta estava presente nas fecundadas, em postura. Nestas os depósitos de chumbo apareceram nas mitocôndrias (Figura 20B). Em rainhas virgens de *S. postica* também não foi verificada reação positiva (Figura 20C), enquanto nas rainhas fecundadas a marcação aparece nas miofibrilas (Figura 20D).

6.5.2.. Adenosinotriphosfatase (ATPase)

Nas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* reação positiva para ATPase aparece no retículo endoplasmático (Figura 21A). Em *S. postica* reação positiva fraca foi encontrada nas mitocôndrias, visível só quando o exame foi feito com grande aumento (Figura 21B).

As operárias nutridoras de ambas as espécies também apresentaram reação positiva com marcação no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (Figura 22A, B, C, D). Nas operárias nutridoras de *A. mellifera* apenas o retículo mostrou reação positiva (Figura 22A, B) e em *S. postica* o retículo e as mitocôndrias (Figura 22C, D).

Nas operárias campeiras de *S. postica* os grânulos elétrons densos correspondentes à reação ATPásica positiva aparecem principalmente nas mitocôndrias, mas também no retículo (Figura 23 A,B).

Nos machos maduros de *A. mellifera* e *S. postica* a reação para ATPase manifestou-se no retículo sarcoplasmático e nas mitocôndrias. Em *A. mellifera* a figura 24A mostra o que pode ser um canal do sistema T positivo e na figura 24B mostra o perfil do retículo sarcoplasmático também positivos, além de grânulos nas mitocôndrias. Em *S. postica* a reação positiva nas mitocôndrias apareceu difusa na matriz (Figura 24C) e no retículo endoplasmático ao redor das miofibrilas (Figura 24 D).

Nas rainhas fecundadas a reação no retículo sarcoplasmático foi vista em *A. mellifera* (Figura 25A) e em *S. postica* de maneira fraca (Figura 25C, D). Reação nas mitocôndrias só foi vista em *A. mellifera* onde aparece sob a forma de grânulo na matriz (Figura 25B)

Figuras

Figura 18 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da Musculatura do Vôo de *pis mellifera*. Reação para Fosfatase Ácida. **A.** Operárias nutridoras mostrando reação positiva (seta) nas miofibrilas na altura da Banda A. mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barra = 0,4 μ m. **B.** Operária nutridoras mostrando ausência de marcação positiva no controle. mi = miofibrilas. Barra = 0,6 μ m. **C.** Operárias campeiras vendo-se reação positiva nas mitocôndrias (seta simples) e nas miofibrilas (setas de ponta dupla). mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 1,5 μ m. **D.** Ausência de marcação positiva no controle. mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 1,5 μ m.

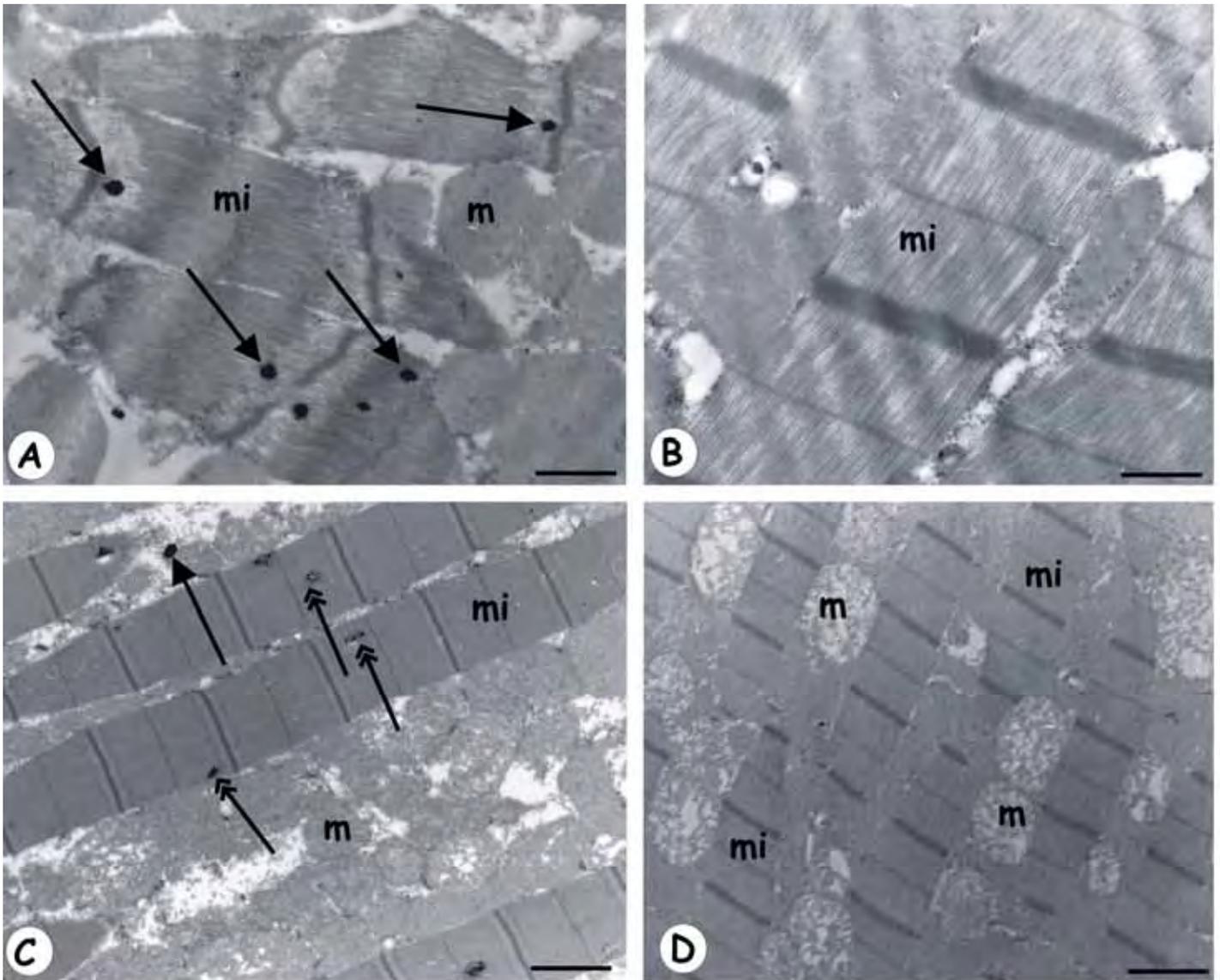


Figura 19 - Reação para Fosfatase Ácida na musculatura do vôo de *pis mellifera*. **A.** Macho recém-emergido mostrando ausência de reação. n = núcleo; mi = miofibrila. Barra = 0,4µm. **B.** Reação fortemente positiva nas mitocôndrias (m) e sarcoplasma adjacente (setas). Barra = 0,5 µm. **C.** Reação positiva em miofibrilas (seta) na região da banda A. mi = miofibrila. Barra = 0,5 µm **D.** Reação positiva no espaço intercelular (seta). mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barra = 0,7 µm.

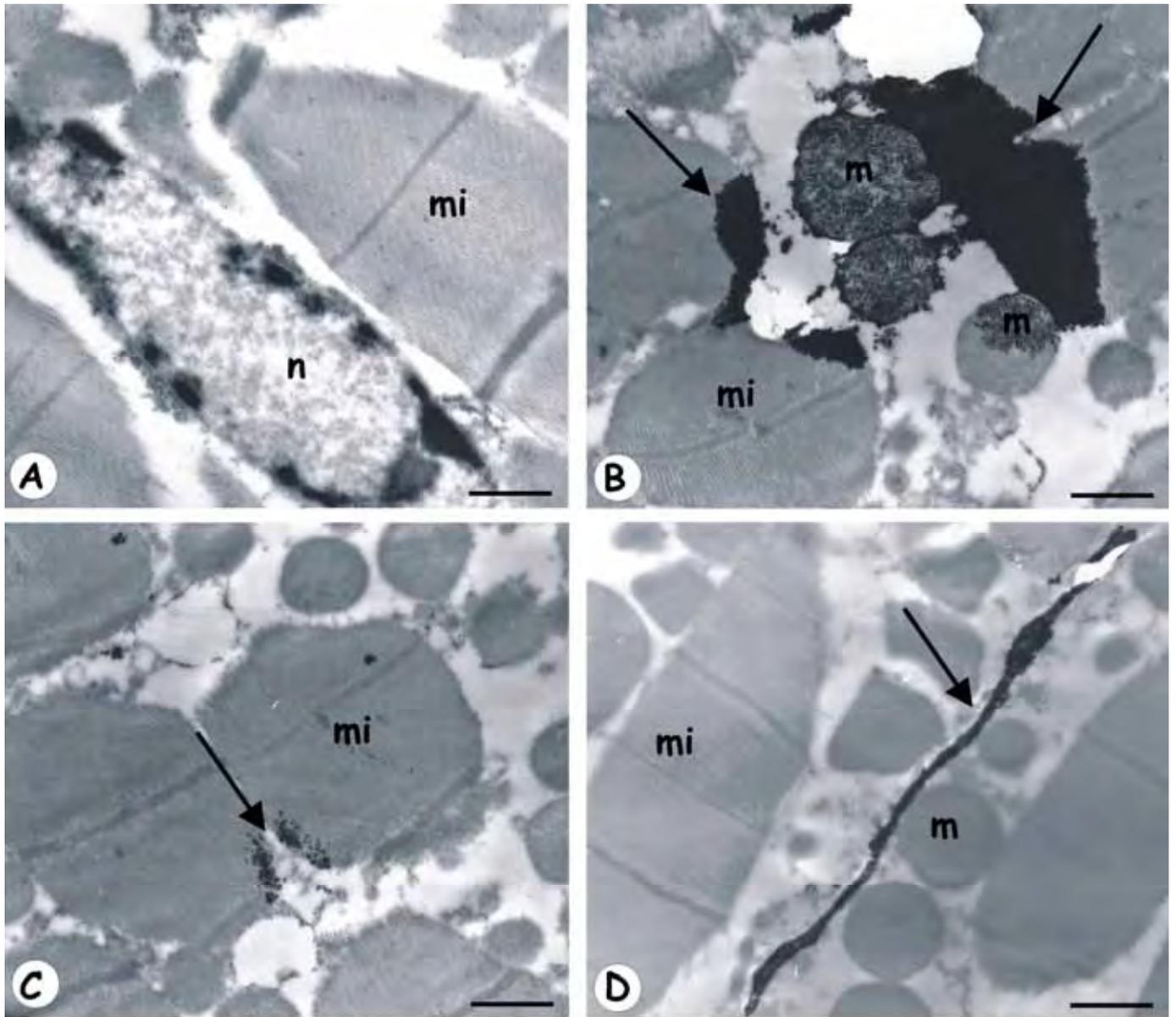


Figura 20 – Reação para Fosfatase Ácida na musculatura do vôo de rainhas.

A. Ausência de reação positiva para rainha virgem de *pis mellifera*. mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 0,5 μm . **B.** Rainha fecundada de *pis mellifera*, notar reação positiva fraca nas mitocôndrias (setas). mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barra = 0,7 μm . **C.** Rainha virgem de *Scaptotrigona postica*. Musculatura não mostra reação para enzima. mi = miofibrilas. Barra = 0,5 μm . **D.** Reação positiva em rainha fecundada de *Scaptotrigona postica* representadas pelas setas. mi = miofibrilas; n = núcleo. Barra = 0,4 μm .

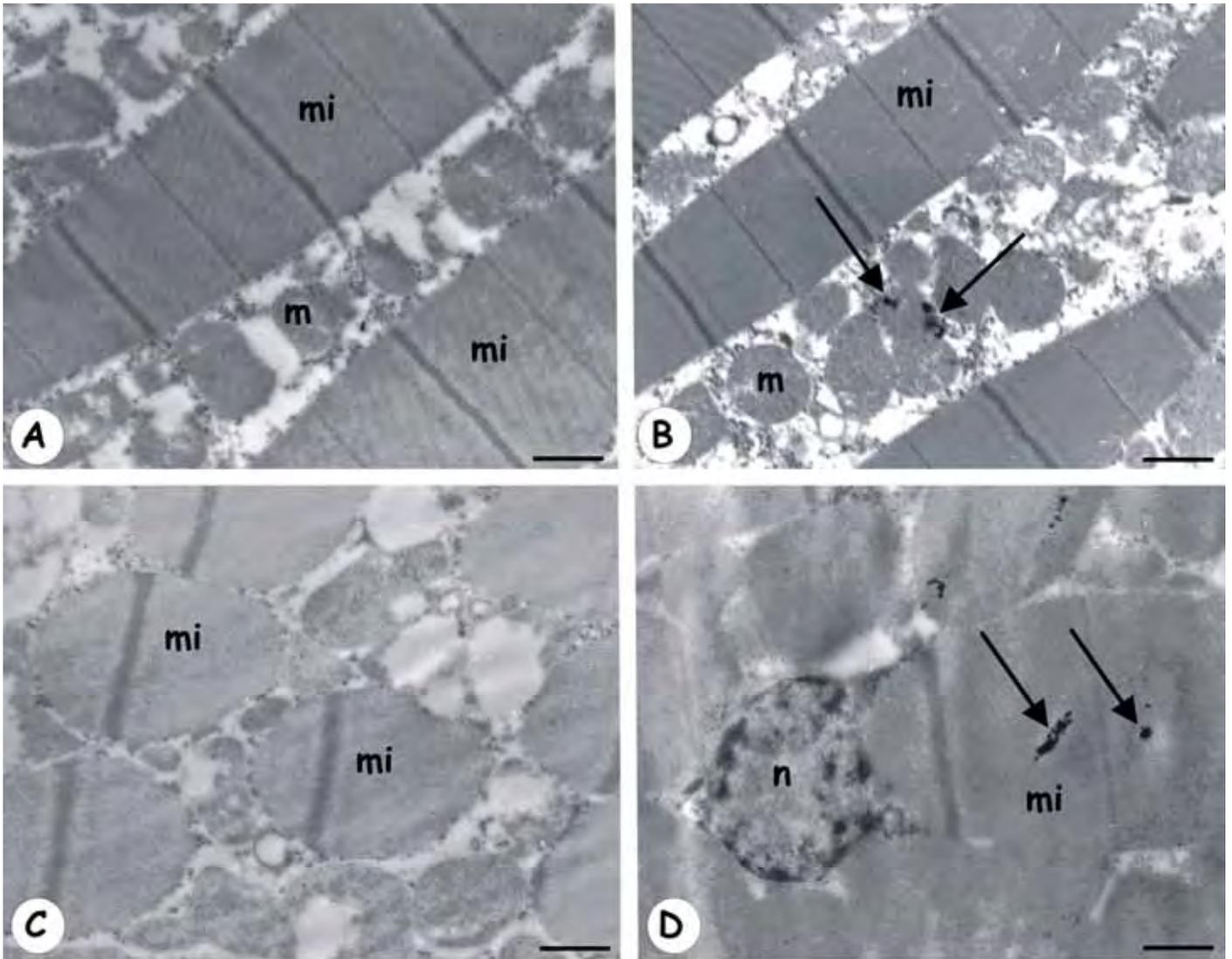


Figura 21 – Reação para ATPase na musculatura do vôo. **A.** Musculatura do vôo de operária recém-emergida de *pis mellifera* vendo-se reação positiva em vesícula do retículo (seta). mi = miofibrila. Barra = 0,5 μ m. **B.** Musculatura do vôo de operária recém-emergida de *Scaptotrigona postica* com marcação fraca nas mitocôndrias (setas) só visível com grande aumento. mi = miofibrila Barra = 0,10 μ m.

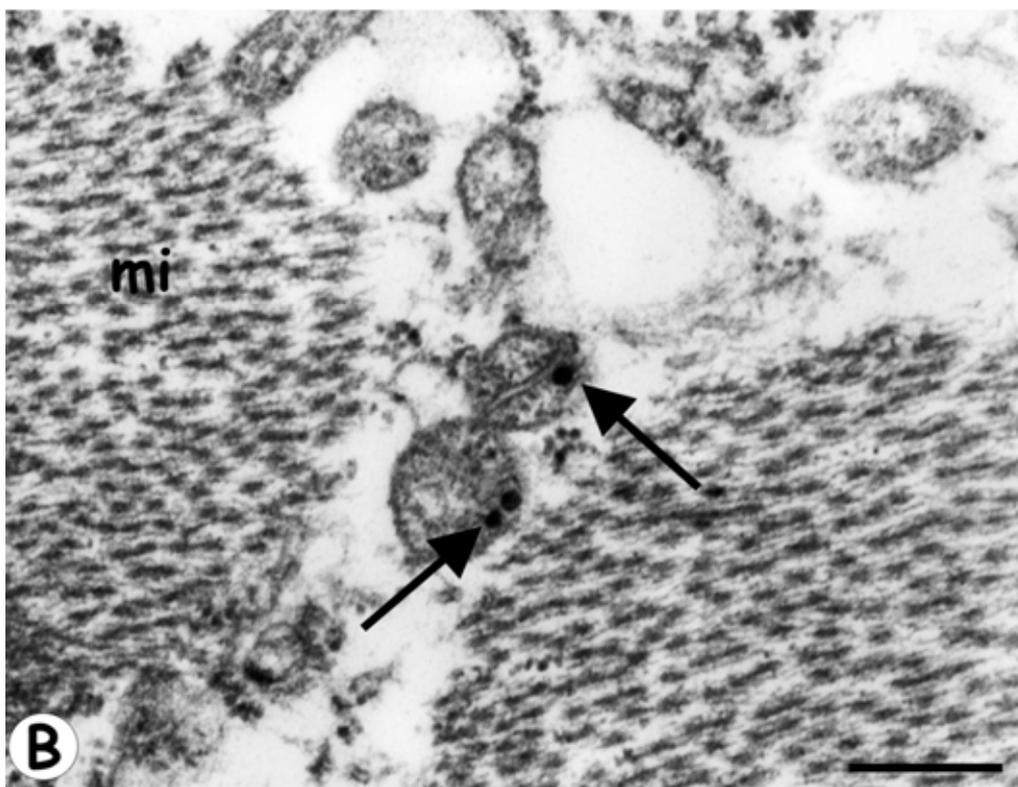
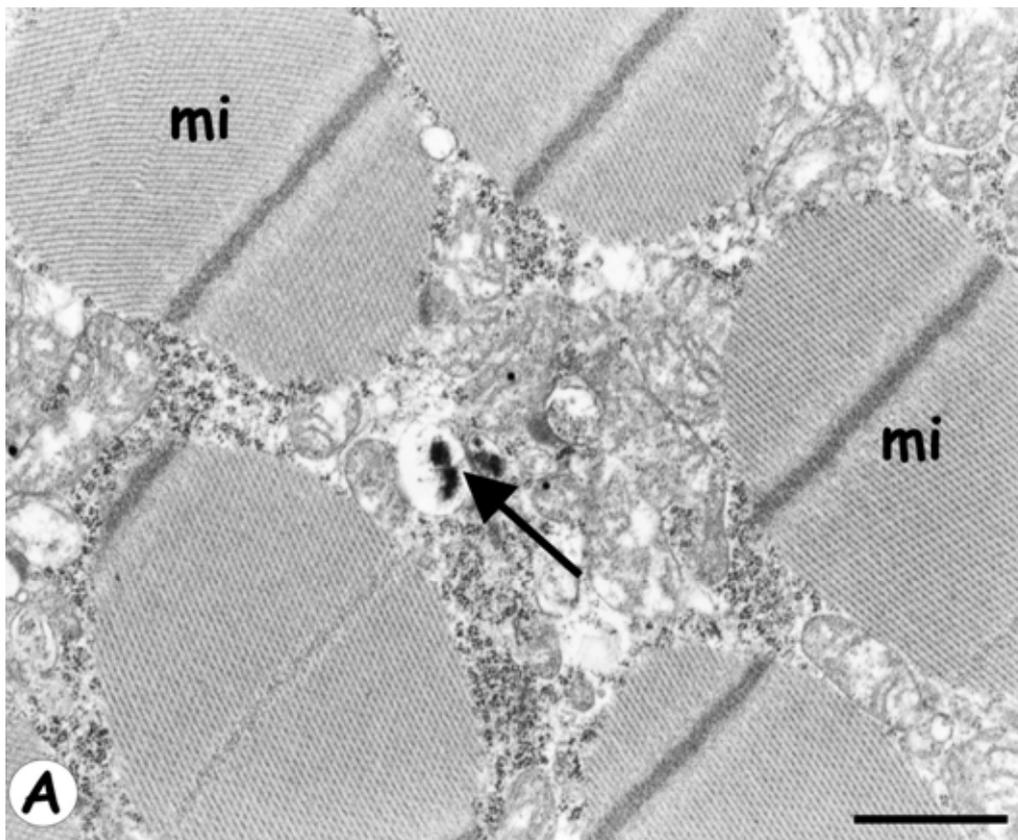


Figura 22 – Reação para ATPase na musculatura do vôo. **A.** e **B.** Operárias nutridoras *pis mellifera* vendo-se reação positiva no retículo (setas). mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barras = 0,5 μ m. **C.** e **D.** Operárias nutridoras de *Scaptotrigona postica*, vendo-se em **C** reação fraca nas mitocôndrias (setas) e em **D** reação no retículo (cabeça de seta) e mitocôndrias (seta). mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barras = 0,8 μ m.

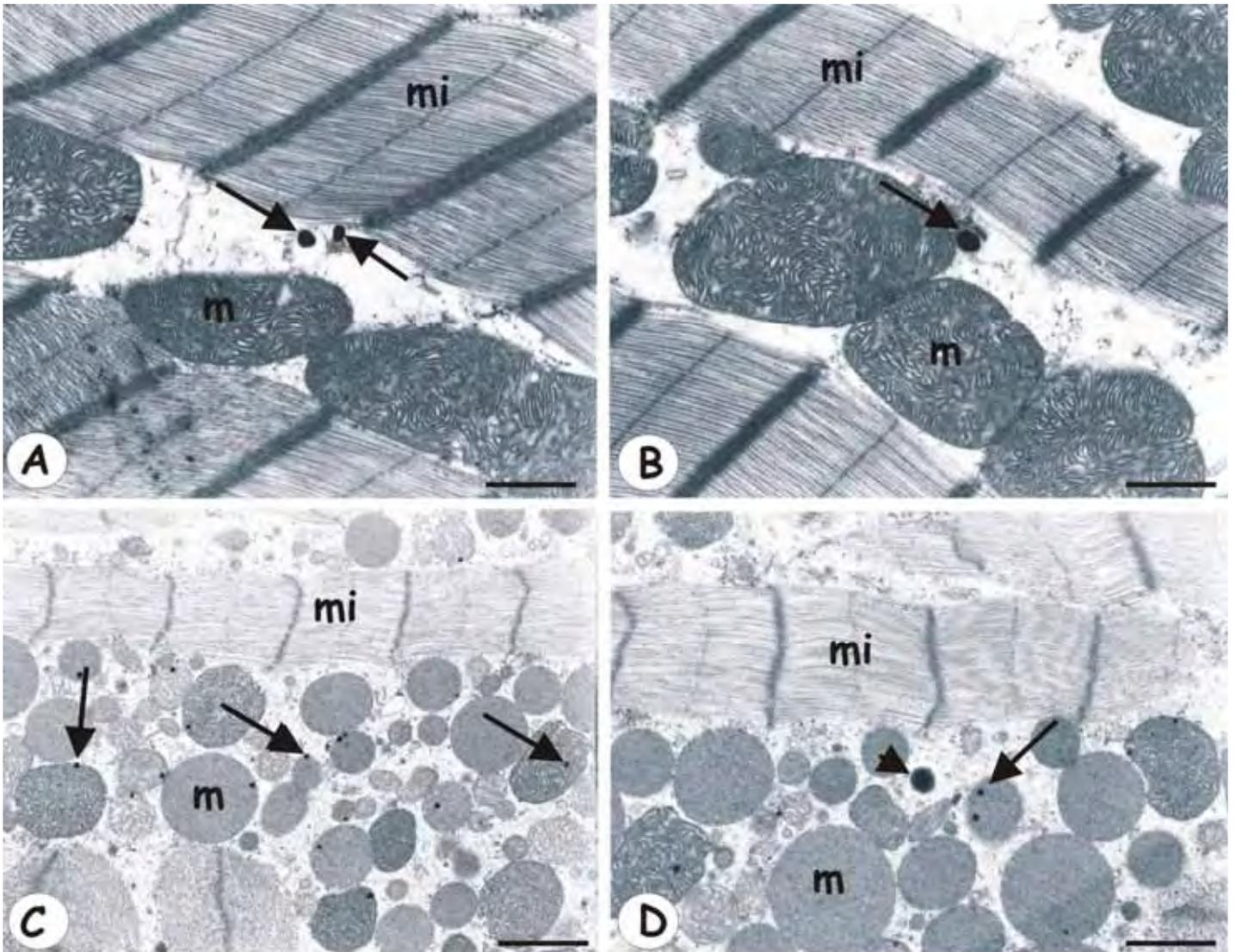


Figura 23 – Reação para ATPase na musculatura do vôo de operárias campeiras de *Scaptotrigona postica*. Vendo-se em **A** e **B** reação nas mitocôndrias (setas) e no retículo (cabeça de seta). mi = miofibrila; m = mitocôndria. Barras A = 0,8 μ m; Barra B = 0,6 μ m.

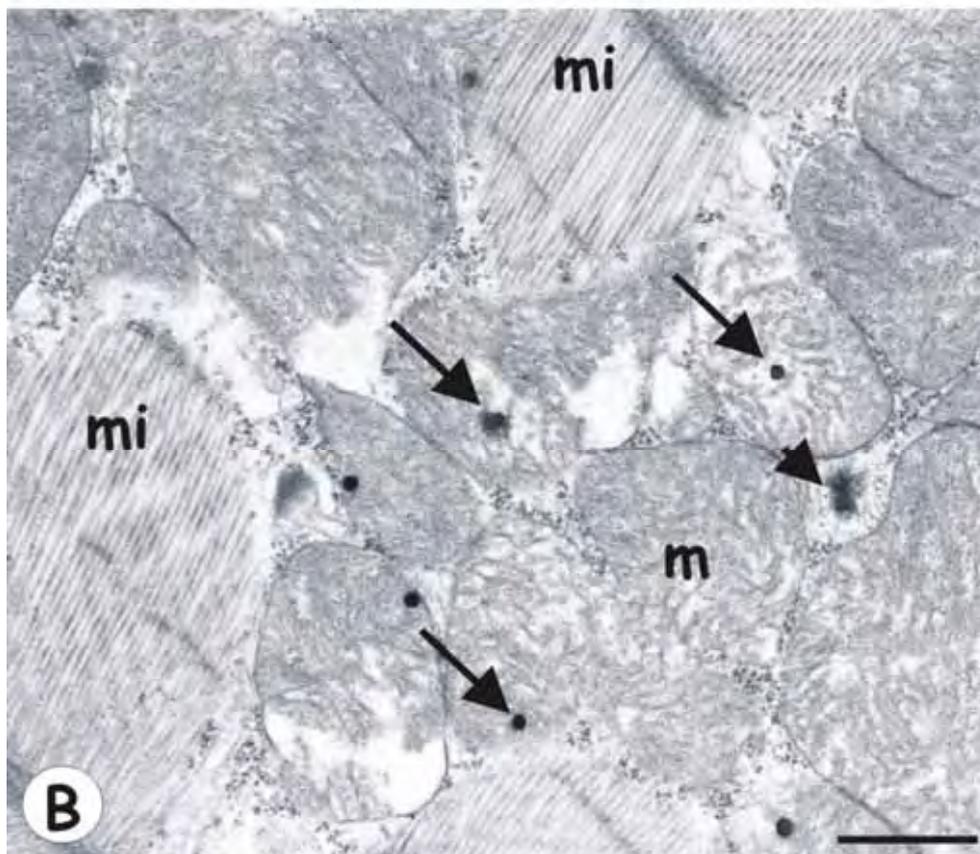
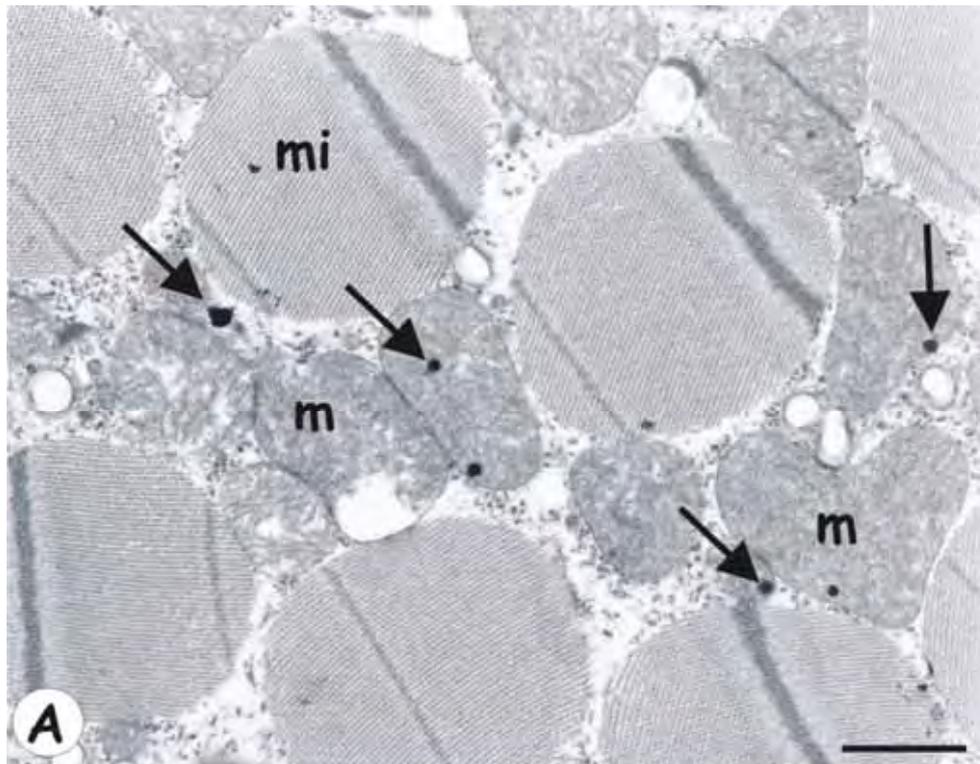


Figura 24 – **A e B.** Reação para ATPase em machos de *Apis mellifera*. **C e D.** Reação para ATPase em machos de *Scaptotrigona postica*. Notar reação positiva nos túbulos do sistema T (seta) em **A**. Em **B** a reação positiva aparece no retículo sarcoplasmático (setas) e mitocôndrias (seta dupla). Em **C** a positividade parece estar difusa na matriz mitocondrial (seta) e em **D** ao redor das miofibrilas, ou seja, no retículo sarcoplasmático (setas). mi = miofibrila; m = mitocôndria; tr = traquéia. Barras: **A** = 0,8µm; **B** = 0,8µm; **C** = 1,6 µm; **D** = 2,5µm.

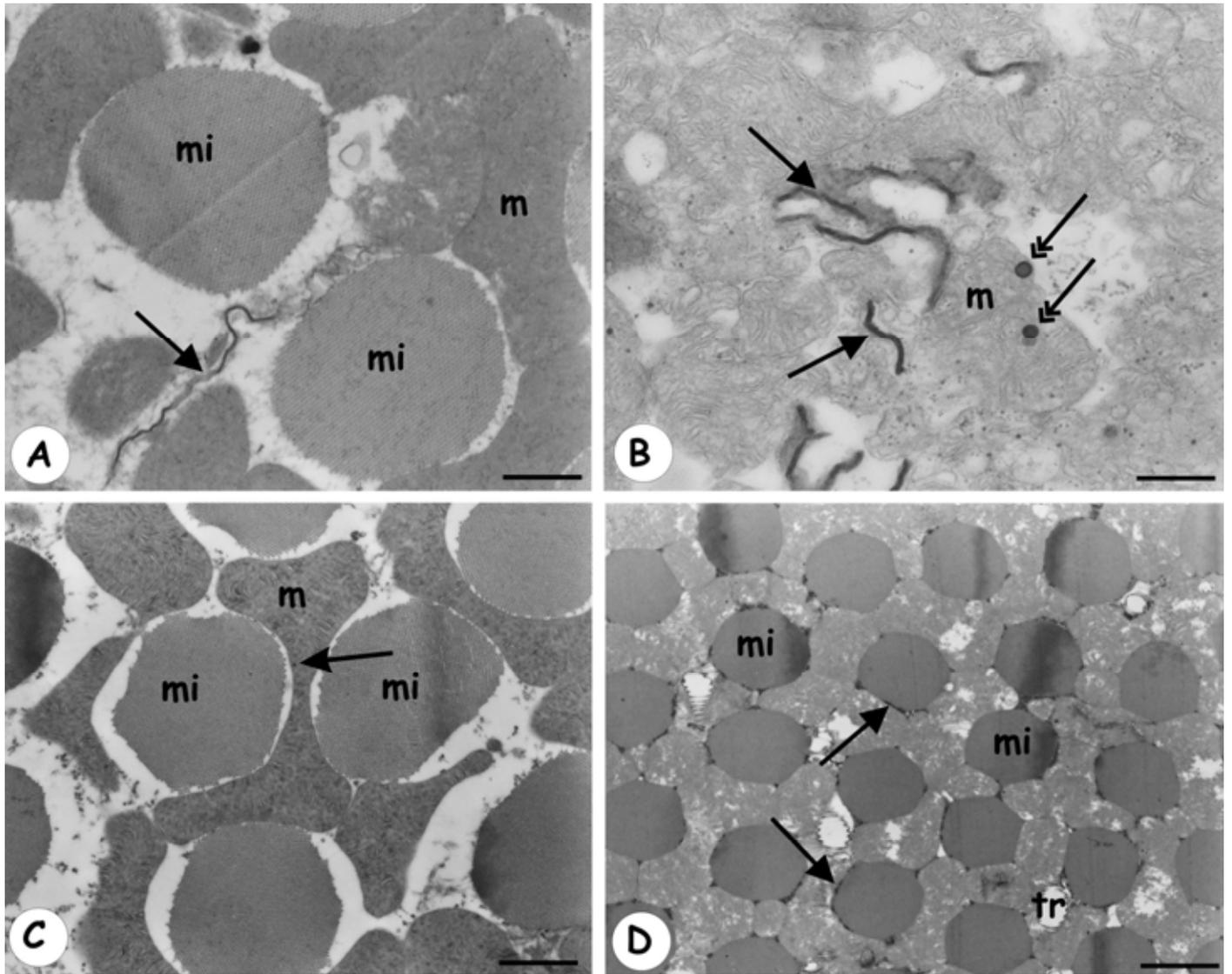
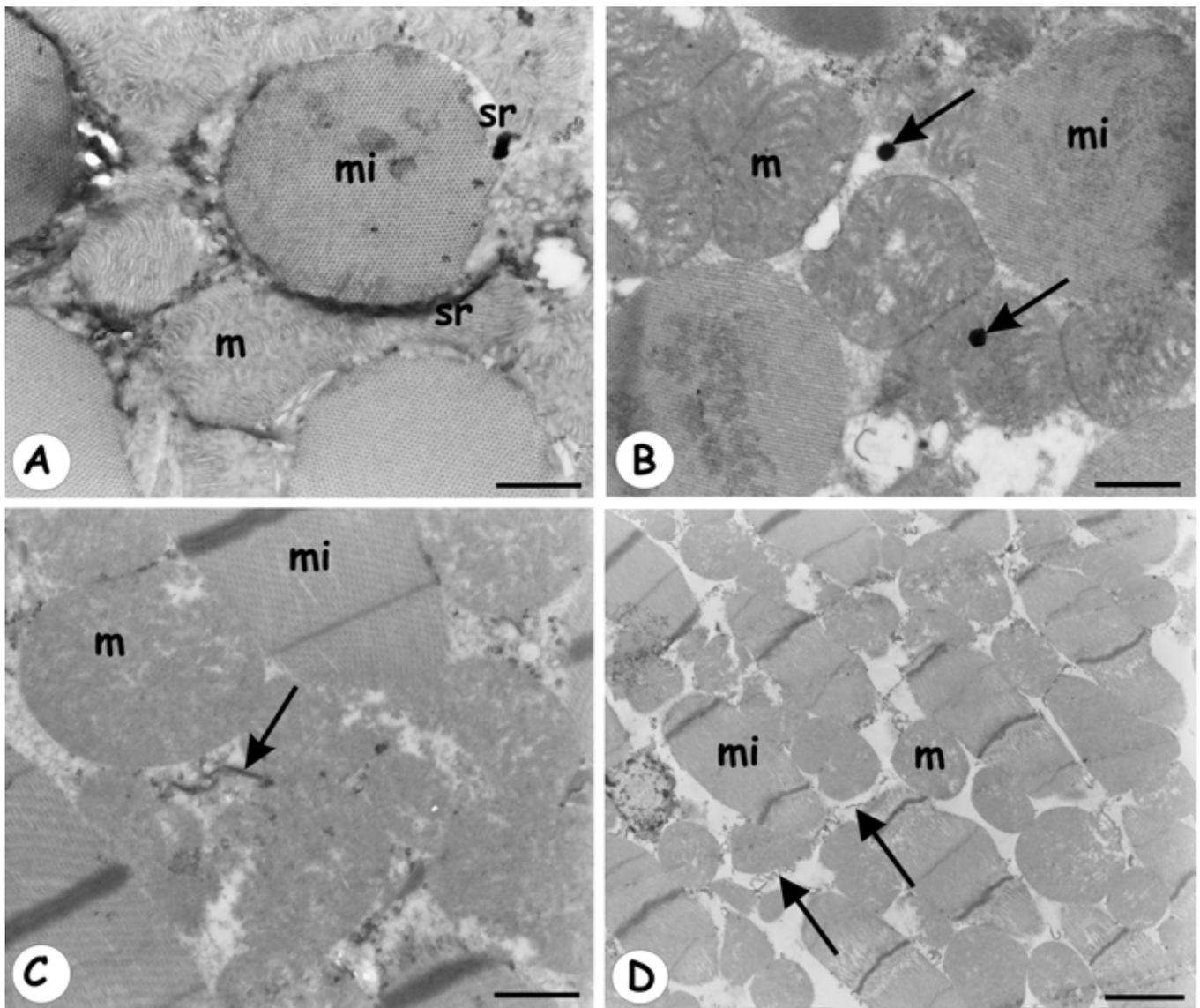


Figura 25 – Reação de ATPase nas rainhas fecundadas de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica*. **A e B.** Reação para ATPase em rainhas de *A. mellifera*. Em **A** reação positiva no retículo sarcoplasmático (sr). Em **B** a reação também aparece positiva no retículo sarcoplasmático (seta) e nas mitocôndrias (seta). **C e D.** Reação fraca no retículo sarcoplasmático (setas). mi = miofibrilas; m = mitocôndria. Barras: **A.** = 0,8µm; **B.** Barra = 0,5µm; **C.** Barra = 0,5µm; **D.** Barra = 0,25µm



7. DISCUSSÃO

7.1. Operárias

Nas abelhas, as operárias executam maior variedade de tarefas do que a rainha e machos, sendo assim distintas morfologicamente destes. No que diz respeito às operárias, estudos feitos em *S. mellifera* mostram que as tarefas realizadas na colônia, ou seja, divisão de trabalho entre elas obedece a uma seqüência de acordo com a idade do indivíduo (FREE, 1981; WINSTON, 1987), o politeísmo etário. Estudos realizados com várias espécies de meliponíneos, entre elas *S. postica* mostraram comportamento semelhante das operárias (HEBLING *et al.*, 1964; SIMÕES & BEGO, 1979). Relacionada a essas tarefas, as várias classes de indivíduos presentes nas colônias das abelhas eussociais e as diferentes fases da sua vida têm requerimentos de vôo diferentes em razão da idade e das funções que desempenham na colônia.

Quanto às operárias, são as campeiras ou forrageiras as que voam para fora da colônia. Passam a executar essa tarefa, em colônias com população equilibrada, ao redor dos 20-25 dias. As tarefas anteriores são realizadas no interior da colônia e não necessitam de vôo. A última tarefa realizada no interior do ninho é relacionada com a cria, desde o trabalho de construção dos alvéolos para a postura de ovos pela rainha, como alimentar as larvas em *S. mellifera*, ou aprovisionar os alvéolos com alimento para estas nos meliponíneos. Nesta fase as operárias recebem o nome de nutridoras. Está é também a fase em que as operárias se preparam fisiologicamente para as atividades fora da colônia e algumas trabalham como guardas ou fazem vôos

externos de reconhecimento. Então, é de se esperar uma musculatura mais desenvolvida, com muita oxigenação do que nas operárias recém-emergidas.

Os resultados de morfometria mostraram um aumento na largura da fibra muscular, demonstrando realmente um maior desenvolvimento nesta fase. Da mesma forma a ultra-estrutura mostrou um grande aumento no tamanho das mitocôndrias e no número de cristas. É nestas organelas que ocorrem as reações oxidativas que geram a energia necessária para a atividade muscular, o que explica seu crescimento. O aumento no número de cristas está também relacionado à produção de energia, visto que a cadeia de transporte de elétrons relacionada aos citocromos se localiza em suas membranas. Outra evidência da preparação da musculatura para sustentar o vôo das operárias campeiras, nesta fase que pode ser considerada de transição, é o acúmulo de glicogênio, o qual vai fornecer a glicose para a produção do ATP (trifosfato de adenosina) nas mitocôndrias.

Essa função do glicogênio justifica sua presença na proximidade das mitocôndrias e nas miofibrilas. A reação para adenosinotriposfatase apresentou positividade nas mitocôndrias geralmente sob a forma de grânulos na matriz. Neste caso pode representar uma reserva inativa. Somente nos machos maduros de *S. postica* a reação se apresentou difusa na matriz, condição mais condizente com o estado funcional da enzima.

Quando as operárias se tornam campeiras vão realizar trabalhos externos à colônia, e irão forragear para obtenção do néctar, pólen, portanto tarefas relacionadas diretamente com atividades para as quais o vôo é necessário. A morfometria mostrou tanto para *A. mellifera* como para *S. postica* que a espessura das fibras nesta fase é levemente menor, embora sem significado estatístico as miofibrilas sejam mais grossas. Além disso, a ultra-estrutura mostrou que a musculatura apresenta alguns aspectos de regressão. Como mitocôndrias com cristas desorganizadas e matriz elétron-transparente e falhas na estrutura das miofibrilas, aparentemente devido à perda de miofilamentos.

O inchamento das mitocôndrias e desarranjo das cristas pode ser sinal do colapso do potencial transmembrana que ocorre nos processos de degeneração e morte celular. Neste caso algumas mitocôndrias estariam perdendo a seletividade das trocas com o sarcoplasma o que afetaria sua função de produzir energia para as

funções celulares. Como dito anteriormente, as campeiras são indivíduos que estão em processo de envelhecimento e em tarefas nas quais ficam sujeitas a predação, por estarem fora do abrigo da colônia. A degeneração muscular pode ser vista como uma redução da taxa de investimento do organismo. Por outro lado, como esta musculatura está sendo intensamente utilizada, um desgaste é esperado o qual não seria mais recomposto devido à idade em que o indivíduo já se encontra.

Essa degeneração muscular, no entanto, parece depender pouco da atividade fosfatásica. A reação para esta enzima parece meio irregular, ora se apresentando nas miofibrilas ora nas mitocôndrias e na maior parte dos casos em fraca positividade. A morfologia mostra que mitocôndrias são as estruturas mais afetadas nas fibras musculares das operárias campeiras, portanto esperava-se aí a maior reação, o que não se verifica. No entanto se a inativação das mitocôndrias depende de alteração do potencial de sua membrana externa, explica-se a ausência ou fraca reatividade.

7.2. Rainhas

Em *S. postica* as rainhas virgens, recém-emergidas, não saem da colônia (SIMÕES & BEGO, 1979), e também não realizam nenhuma outra tarefa, podem permanecer na colônia sem sofrer hostilidades por tempos relativamente longos na presença da rainha mãe da colônia até que a substituam ou vão fundar novo ninho. Em *S. mellifera* a rainha virgem é a única rainha na colônia e num prazo de 6 a 8 dias deve sair para vôo nupcial. A musculatura das rainhas virgens é, portanto menos desenvolvida quando comparada com as rainhas fecundadas da mesma espécie como mostrou a morfometria e a ultra-estrutura. No entanto, sofre uma maturação rápida, talvez pelo fato de que a rainha já deve ter sua musculatura madura para o vôo nupcial por volta do 6º dia de vida adulta. Por esse mesmo motivo as rainhas recém-emergidas já têm mitocôndrias maiores e mais ricas em cristas que as operárias na mesma fase, as quais levam de 20 a 25 dias para sair da colônia. A necessidade maior de vôo pelas rainhas virgens faz com que as mitocôndrias e o diâmetro das miofibrilas aumentem mais rapidamente que nas operárias e que encontrem nesta fase depósitos de glicogênio no sarcoplasma e entre os miofilamentos.

Em concordância com a não degeneração da musculatura do vôo nas rainhas fecundadas está o fato de que estas apresentam também menos alterações mitocondriais que as operárias campeiras.

Em *S. mellifera* a rainha depois de fecundada ainda é capaz de voar e pode fazer mais de um vôo nupcial. Nos meliponídeos as rainhas depois de fecundadas não tornam a sair da colônia, isto é, não realizam mais vôos externos. Seu abdome fica grandemente desenvolvido, já que a postura dos ovos deve ser bastante intensa, impedindo o vôo. Nesta fase as rainhas são chamadas de rainhas poedeiras ou fisogástricas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Devido às limitações impostas pelo grande tamanho do abdome após o processo de acasalamento a rainha de *S. postica* só executa um vôo nupcial no qual se acasala antes de retornar para a colônia ou fundar uma nova. A fundação de novas colônias em *S. mellifera* dá-se por enxameagem, ou seja, a rainha mãe da colônia sai com um séquito de operárias á procura de novo local para se estabelecer. Nos meliponíneos as operárias preparam antecipadamente o núcleo que a rainha recém-fecundada ocupará.

Dadas essas circunstâncias esperava-se que a musculatura da rainha de *S. mellifera* fosse conservada íntegra na rainha fecundada, mas que na rainha fecundada de *S. postica* que permanece na colônia, a musculatura sofresse regressão. Pelo contrário, a regressão não ocorreu e a espessura das fibras aumentou. A explicação pode estar no fato de que embora a rainha dos meliponídeos não realize vôos externos depois de acasalada, movimenta muito as asas durante o processo de ovoposição (KERR, 1990). Este comportamento pode justificar a não degeneração muscular.

Nas rainhas de *S. mellifera* o diâmetro das fibras também é maior nas rainhas fecundadas do que nas rainhas virgens. Portanto, apesar do comportamento diferente em ambas as espécies, a musculatura comporta-se da mesma forma, não há sinais de degeneração.

A fosfatase ácida nas rainhas aparentemente diferente das operárias revelou-se com o papel de enzima histolítica, por estar ausente nos indivíduos jovens e presente nos com idade mais avançada com localização correspondente aos locais em que a ultra-estrutura mostrou alterações degenerativas, ou seja, nas mitocôndrias e

nas miofibrilas. As diferenças observadas com relação às idades e fases da vida das rainhas seriam então, relacionadas ao envelhecimento do músculo.

Nas rainhas das duas espécies, as diferenças estão relacionadas às idades e condições fisiológicas destas, além das diferenças da atividade muscular. Reação positiva só apareceu nas rainhas fecundadas, sendo que em *A. mellifera* foi vista nas mitocôndrias e em *S. postica* nas miofibrilas. Quanto à reação para ATPase manteve-se mais ou menos o mesmo padrão das operárias, apenas ficou mais nítida a reação positiva no retículo endoplasmático a qual apareceu preenchendo trechos deste e não sob a forma de grânulos como nas operárias.

7.3. Machos

Os machos recém-emergidos também apresentaram mitocôndrias maiores e com mais cristas do que as operárias nessa fase, apesar de em *A. mellifera* só estarem prontos para o vôo nupcial quando têm 12 a 15 dias de vida adulta. Os machos maduros não apresentam grandes diferenças ultra-estruturais quando comparados com os recém-emergidos.

O surpreendente foi o resultado da reação da fosfatase nos machos maduros pelo fato de a ultra-estrutura não ter mostrado alterações de sua musculatura. Contudo a reação positiva nos espaços intercelulares parece indicar que o próprio meio, ou seja, a hemolinfa está alterada.

Os melhores resultados para ATPase foram obtidos nos machos maduros para o acasalamento onde foi possível observá-la preenchendo o retículo sarcoplasmático entre as mitocôndrias ou ao redor dos miofibrilas e no sistema T. Nas mitocôndrias de *A. mellifera* continuou aparecendo sob a forma de grânulos, que foram considerados depósitos da enzima, mas em *S. postica* aparecem difusa na matriz, talvez sob a forma ativa.

Esperava-se que a reação para ATPase, ocorresse em todos indivíduos na banda A das miofibrilas que é onde essa enzima se encontra nos músculos e que fosse tanto mais intensa quanto maior a atividade muscular. A musculatura do vôo das abelhas apresenta taxas metabólicas altamente variáveis (HARRISON &

FEWELL, 2002) e muito provavelmente os presentes resultados refletem mais essa característica que a atividade muscular.

Em resumo: o fato do desenvolvimento da musculatura do vôo nas abelhas apresentar estreita relação com as atividades que as diferentes classes de indivíduos desempenham na colônia sugere que as mudanças nela ocorridas encontram-se sob os mesmos controles que determinam as mudanças de estado e de função desses indivíduos. As mudanças de função nas abelhas, principalmente nas operárias está em boa parte sob controle hormonal, frequentemente do hormônio juvenil. Alguns trabalhos mostraram a ação deste hormônio sobre a atividade de vôo dos machos (GIRAY & ROBINSON, 1996; TOZETTO *et al.*, 1997). Neste sentido é esperado que o desenvolvimento dessa musculatura sofra efeitos ambientais e das condições da colônia da mesma forma que todas as atividades desempenhadas pelas abelhas.

8. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1) A musculatura do vôo das abelhas eussociais, tanto em *pis mellifera* como em *Scaptotrigona postica* apresenta a mesma constituição, e é formada por dois pares de músculos torácicos, assincrônicos: um dorso-ventral e outro antero-posterior. O vôo é realizado por esses músculos denominado músculos indiretos do vôo. Quando o feixe antero-posterior se contrai promove o encurtamento do tórax e o levantamento das asas. A contração do feixe dorso-ventral achata o tórax e promove o abaixamento das asas.

2) O padrão anatômico e histológico geral do músculo do vôo de *Scaptotrigona postica* e *pis mellifera* é o mesmo para ambas as espécies. Ambos os feixes, antero-posterior e o dorso-ventral, são formados por fibras gigantes, que por sua vez contém numerosas miofibrilas e núcleos distribuídos aleatoriamente entre elas e na periferia da fibra, caracterizando a morfologia designada como fibrilar.

3) As operárias recém-emergidas, tanto de *pis mellifera* como de *Scaptotrigona postica* têm as fibras da musculatura do vôo com menor largura quando comparadas com as outras classes de operárias. Nas rainhas e machos verifica-se o mesmo mostrando que o músculo está ainda imaturo, fato confirmado pela ultra-estrutura.

4) A musculatura das operárias encontra-se mais desenvolvida nas nutridoras apresentando maior espessura das fibras musculares, revelando-se pronta para a necessidade do vôo da fase seguinte de campeira.

5) O músculo do vôo das rainhas e machos amadurece mais rápido que o das operárias caracterizando a necessidade de vôo mais precoces nesses indivíduos principalmente nas rainhas.

6) O músculo do vôo das operárias campeiras apresenta sinais de involução o que não acontece nas rainhas e nos machos, pelo menos de maneira tão acentuada. Neste caso também o fato está relacionado à função dos indivíduos. No caso especial do macho que morre após o acasalamento não há como observar degeneração.

7) Nas operárias campeiras bem como nas rainhas virgens há a presença de glicogênio nas fibras musculares mostrando que este carboidrato está disponível nas fases de maior demanda de energia.

8) A reação positiva para fosfatase parece ter significado diferente nas operárias onde parece ligada ao metabolismo muscular e nas rainhas onde parece denotar envelhecimento.

9) A reação para ATPase, quando positiva nas mitocôndrias e no retículo sob a forma de grânulos parece estar inativa. Quando preenchendo trechos do lúmen do retículo ou difusa na matriz mitocondrial pode estar ativa.

PERSPECTIVAS PARA NOVOS TRABALHOS

Os presentes resultados mostram que, como acontece com outros órgãos das abelhas, a fisiologia da musculatura do vôo adapta-se às funções que as classes de indivíduos desempenham nas espécies ou na sociedade. Isto faz desse tecido um modelo importante para o estudo de como o ambiente ou as mudanças de funções podem afetar os órgãos envolvidos em seu desempenho. Vários estudos realizados com as abelhas eussociais têm mostrado que a composição estacional das operárias na colônia pode afetar o desenvolvimento de glândulas exócrinas e até a expressão gênica no cérebro dessa casta. Seguindo essa linha de investigação seria interessante verificar como se comportaria a musculatura manipulando-se a distribuição etária das operárias de meia idade, ou todas as caméras.

Esses estudos poderiam ser feitos em nível ultra-estruturais ou de estudos da expressão proteica por eletroforese bidimensional.

9. REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; CRUZ-LANDIM, C. Diferenciação e envelhecimento do músculo do vôo em operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 379-384, 2004.

ARMBRUSTER, L.; LEVY, M.; MATHIBU, M.N.; BAUTZ, A.M. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Caliphora erythrocephala* (Diptera Calliphoridae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vancouver, v. 84, p. 349-54, 1986.

BOWEN, I. D.; MORGAN, S.M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Caliphora vomitoria*. **Cell Biology International**, Aberdeen, v. 17, n. 1, p. 13-33, 1993.

CAVALCANTE, V. M. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). Intranuclear acid phosphatase. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, p. 131-138, 2002.

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

CHAYEN, J.; BITENSKY, L.; BUTCHER, R.G. **Practical Histochemistry**. London: John Wiley, 1973. 111p.

CRUZ-LANDIM, C. Electron Microscope Observations on the Structure of the muscle insertions in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 30, n. 1, p. 531-537, 1970.

DALY, H. V. **Skeleto-muscular morphogenesis of the thorax and wings of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. University of California Press, California, 1969, 77p.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. Universidade de São Paulo 1981, 79p.

GIOMETTI, S.E.E.; CRUZ-LANDIM, C. Histólise dos músculos torácicos larvais durante a metamorfose e miogênese dos músculos do vôo em *Melipona quadriasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Melípona). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.50, n. 4, p. 983-1002, 1990.

GIRAY, T.; ROBINSON, G. E. Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. **The Proceedings of the National Academy of Science, USA**, Washinton, v. 93, p. 1118-1172, 1996.

GOODMAN, L. **Form and function in the honey bee**. IBRA, Cardiff, UK, 2003, 220p.

HARRISON, J. F.; FEWELL, J.H. Environmental and genetic influences on flight metabolic rates in honey bee, *pis mellifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vancouver, v.133, n. 2, p. 323-333, 2002.

HEBLING, N. L.; KERR, W. E.; KERR, F. S. Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotricha* Moure. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 16, n.15, p.115-127, 1964.

HENKIN, J.A.; MAUGHAN, D.W.; VIGOREAUX, J.O. Mutations that affect flightin expression in *Drosophila* alter the viscoelastic properties of flight muscle fiber. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Mariland, v. 286, p. 65-72, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MATOS, E. T.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H.; VELTHUIS, H H W. A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). **Insectes Sociaux: International Journal for the Study of Social Arthropods**, Leuven, v. 45, p. 231-233, 1998.

JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of honeybee *pis mellifera* (L): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, Nova York, v. 261, p. 431-443, 1990.

JOSEPHSON, R. K. Contraction dynamics and power output pf skeletal muscle. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 55, p. 527-546, 1993.

JOSEPHSON, R. K.; MALAMUD, J. G.; STOKES, D.R. Asynchronous muscle: a primer. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 203, p.2713-2722, 2000.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Nova York, v. 27, p.137A. 1965.

KERR, W.E. Why are workers in social Hymenoptera not males? **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.13, n.1, p.133-136, 1990.

KING, M. J.; BUCHAMANN, S. L.; SP ANGLER, H. Activity of asynchronous flight muscle from two bee families during sonication (Buzzing). **The Journal Experimental Biology**, Cambridge, v. 199, p. 2317-2321, 1996.

LOCKSHIN, R.A. Lysosomes in insects. In: DINGLE, J.T. *et al* (Ed). **Lysosomes in biology and pathology**. London: North Holland, 1969, 122p.

LUND, J; WEBB, M.R.; WHITE, D.C.S. Changes in the ATPase Activity of Insect Fibrillar Flight Muscle during Calcium and Strain Activation Probed by Phosphatase-Water Oxygen Exchange. **Journal of Biological Chemistry**, Mariland, v. 162, n.18, p. 8584-8590, 1987.

MORTIZ, R. F. A.; SOUTHWICK, E. E. **Bees as superorganisms**. Berlin: Springe Verlag, 1992, 178p..

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Chácaras e Quintais ed., São Paulo, 1997, 446p.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. Churchill: Edinburgh, 1985, 530p.

PRINGLE, J. W. S. **Locomotion: Flight**. In: ROCKSTEIN, M. Physiology of insecta. New York: Academic Press, v. 2, n. 6, p. 283-329, 1965.

QIU, F; BRENDEL, S.; CUNHA, P. M. F.; ASTOLA, N.; SONG, B.; FURLONG., F.M.E.; LEONARD, K.R.; BULLARD, B. Myofilin, a protein in the thick filaments of insect muscle. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, p. 1527-1536, 2005.

REGINATO, R.D.; CRUZ-LANDIM, C. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honeybee. **Cell Biology International**, Aberdeen, v.26, p.343-351, 2002.

ROBERTS, S.P.; ELEKONICH, M.M. Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *pis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, p. 4193-4198, 2005.

SIMÕES, D.; BEGO, L. R. Estudo da regulação social em *Scaptotrigona postica* Latreille em duas colônias (normal e com rainhas virgens), com especial referência ao politeísmo etário (Hym., Apidae, Meliponinae). **Boletim de Zoologia**, São Paulo, p. 89-98, 1979.

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

SMITH, D. S. **Structure of insect muscle**. In: KING, C. R., AKAI, H. *Insect ultrastructure*. New York: Plenum, v. 2, p. 111-146, 1984.

SMYTH, T. R. Muscle system. In: BLUM, M. S. **Fundamental of insect physiology**. Wiley-Interscience, p. 227-252, 1985.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill, 1935, 334p.

TAYLOR, K. A.; REEDY, M.C.; CÓRDOVA, L.; REEDY, M.D. Three-Dimensional Image Reconstruction of Insect Flight Muscle. **The Journal of Cell Biology**, Cambridge, v.109, p. 1085-1102, 1989.

THORSON, J.; WHITE, D.C.S. Distributed representations for actin-myosin interaction in the oscillatory contraction of muscle. **Biophysical Journal**, Mariland, v.9, p. 360-390, 1969.

THORSON, J.; WHITE, D.C.S. Role of cross-bridge distortion in the small-signal mechanical dynamics of insect and rabbit striated muscle. **Journal of Physiology**, London, v. 343, p.59-84, 1983.

TOZETTO, S. O; RACHINSKY, A.; ENGELS, W. Juvenile hormone promotes flight activity in drones (*pis mellifera carnica*) **Apidologie**, Versailles, v. 28, p. 77-84, 1997.

WIGGLESWORTH, V. B. The hormonal regulation of growth and reproduction of insects. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 2, p. 247-236, 1964.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey Bee**, pp. 89-109. Cambridge, Massachutes: Harvard University Press, p. 89-109, 1987.