



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



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

**CONTROLES DO DESENVOLVIMENTO OVARIANO EM
ABELHAS AFRICANIZADAS ADULTAS, *APIS MELLIFERA*
LINNÉ, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE)**

BRUNO BERGER

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 - 2009



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



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

**CONTROLES DO DESENVOLVIMENTO OVARIANO EM
ABELHAS AFRICANIZADAS ADULTAS, *APIS MELLIFERA*
LINNÉ, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE)**

BRUNO BERGER

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

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus 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 - 2009

595.799 Berger, Bruno
B496c Controles do desenvolvimento ovariano em abelhas
africanizadas adultas, *Apis mellifera* Linné, 1758
(Hymenoptera, Apidae) / Bruno Berger. - Rio Claro : [s.n.],
2009
121 f. : il., gráfs., tabs., fots., mapas

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

1. Abelha. 2. Morfologia. 3. Morte celular. 4. Narcose. 5.
Gás carbônico. 6. Ultra-estrutura. 7. Fêmeas. I. Título.

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

AOS MEUS PAIS....

Dedico esta tese.

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 05/53999-9).

À Profa. Dra. Carmina da Cruz Landim, pela orientação, amizade, apoio e também pelas broncas, não sei se conseguiria chegar até aqui sem a ajuda e orientação da senhora.

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

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

Ao Antonio Sérgio Pascon, pela coleta das abelhas.

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

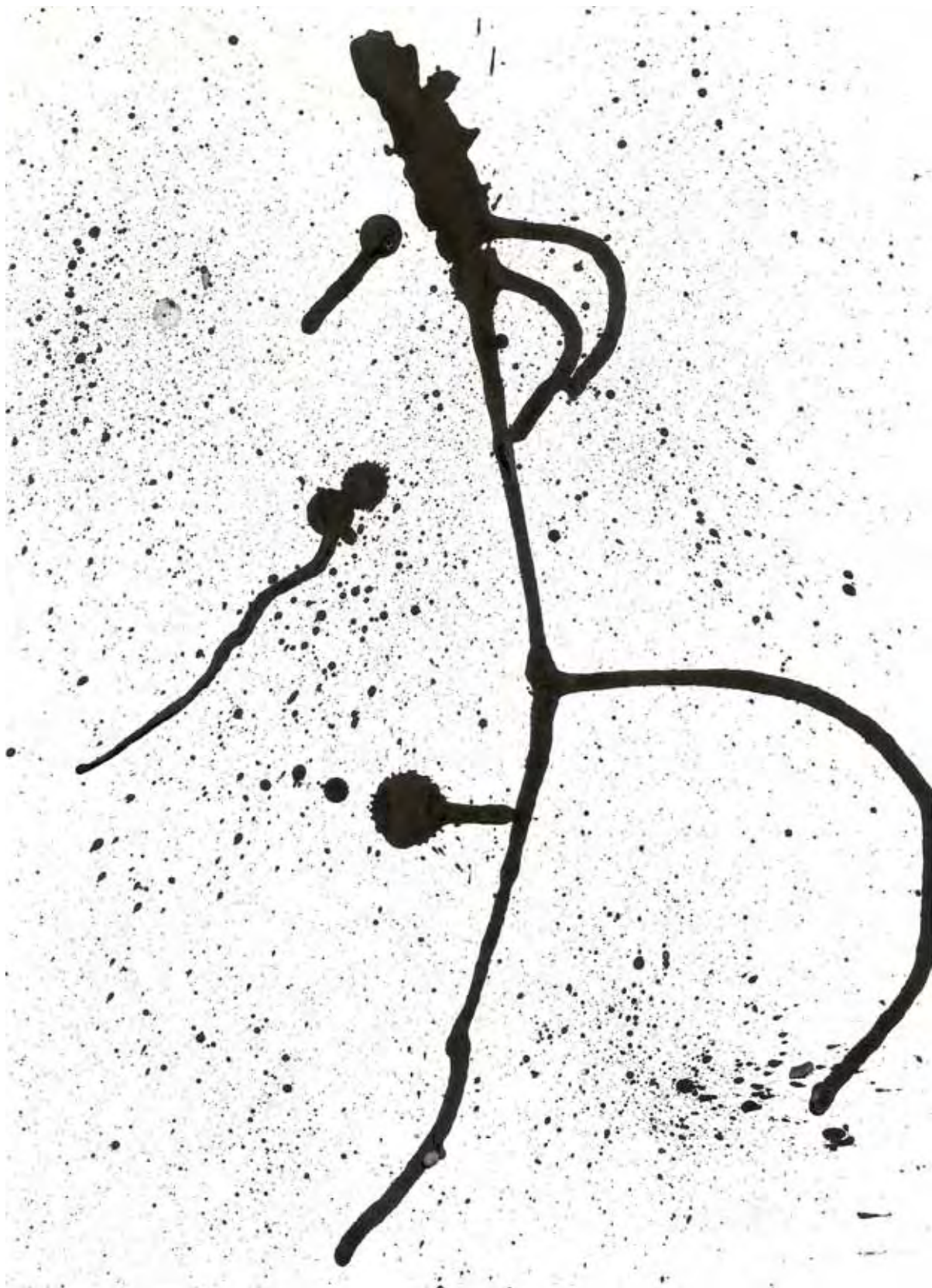
À todos os funcionários do Departamento de Biologia, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca pela ajuda concedida.

Aos meus companheiros de orientação, Silvana e Thaisa, por tornar o meu trabalho muito mais divertido. Obrigado pela ajuda e amizade durante estes anos!

Ao pessoal do Grupo Incômodo de Teatro, em especial ao Adriano, Elder, Erika e Nathalie, e ao Núcleo de Artes Cênicas do SESI de Rio Claro, Cláudia e Jaime, pela força e incentivo, sem o apoio e força de vocês eu não daria conta do doutorado.

Ao Tiago pelo companheirismo e amizade.

E por último agradeço a Deus, que me guiou por estes anos até aqui e que continuará iluminando meu caminho.



“Grandes realizações só são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos.”

Lao-Tzu



“Isso de querer ser exatamente o que a gente é, ainda vai nos levar além.”

Paulo Leminski

RESUMO

Os ovários das rainhas diferem dos de operárias de *Apis mellifera* quanto ao número e comprimento dos ovariíolos. Tanto o número, como o comprimento destes, é muito maior na rainha que nas operárias. No entanto, em ambos os casos os ovários são funcionais, isto é, capazes de produzir óvulos maduros. Apesar disso, operárias e rainhas diferem muito quanto à fertilidade e aos mecanismos controladores/estimuladores da vitelogênese, ou seja, da maturação dos óvulos. Em condições normais da colônia, nas rainhas a vitelogênese é desencadeada pelo acasalamento e nas operárias, pela ausência da rainha ou do recebimento de informações sobre sua presença na colônia. Passada a ocasião própria para o acasalamento no caso da rainha, e em idade avançada das operárias, os ovários entram em degeneração. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar como se comporta o desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias mantidas fora dos condicionamentos da colônia e o efeito do tratamento destas com CO₂, prática corrente na apicultura. Para tanto, operárias e rainhas foram mantidas aprisionadas em caixas com candy e água durante 15 dias e seguida a seqüência de desenvolvimento de seus ovários. O efeito do não acasalamento na época própria e do tratamento com CO₂ foi feito estudando a morfologia do desenvolvimento da ovogênese, usando TUNEL e reação de fosfatase acida para caracterizar possíveis alterações celulares. As células do filamento terminal apresentaram-se empilhadas em fila única. Na transição para o germário as células tornam-se piramidais com a base apoiada sobre a lâmina própria e o ápice voltado para o centro do ovariolo. São encontradas células esféricas, provavelmente ovogônias. No germário estão presentes células somáticas e germinativas, sendo da linhagem germinativa, os cistoblastos, os cistócitos, os ovócitos e as futuras células nutridoras e as somáticas representadas pelas células pré-foliculares. Até o quinto dia o desenvolvimento do ovário prossegue normalmente e as mortes celulares são raras. Por volta dos dez dias, aparecem indícios de desorganização com grande incidência de células edemaciadas e com características de morte celular apoptótica ou autofágica. A morte celular parece atingir principalmente as células nutridoras, mas ocorre morte também nas células somáticas e alterações são vistas nos ovócitos. Os resultados mostraram que até aos quinto dias de idade a narcose com CO₂ não provoca mudanças no desenvolvimento ovariano, entretanto aos dez dias de idade os ovariíolos de rainhas tratadas mostram uma diminuição na taxa de mortes celulares quando comparados ao controle. Este efeito, porém, não perdura e aos 15 dias não há diferença nas taxas de morte celular entre o tratamento e o controle. Nas

operárias, embora em alguns ovário tenha sido possível observar início de diferenciação do ovócito no germário já em recém-emergidas, a maior parte apresenta nos ovários o germário, constituído basicamente de cistos em que o ovócito ainda é indistinto. A exposição ao CO₂, além de aumentar a degeneração ovarial, causa inibição do desenvolvimento ovariano. Em conclusão pode-se dizer que a temporalidade de desenvolvimento ovariano e o efeito da narcose são diferentes entre as castas.

Palavras Chave: Morte Celular. Narcose. Gás Carbônico. Ultra-estrutura. Fêmeas.

ABSTRACT

The ovaries of queens and workers of *Apis mellifera* differs in number and length of the ovarioles. Length and number of ovarioles are larger in queen than in workers. However, in both cases, the ovaries are functional, i.e., it is able of produce mature eggs. Despite of that, workers and queens differ very in fertility and mechanisms of controlling/inducing vitellogenesis. In colony conditions, queen's vitellogenesis is triggered by the matting and in workers by the absence of the queen or of the receipt of information about its presence in the colony. After the age proper to mate or in workers advanced age, the ovaries enter in degeneration. The objective of the present work was the evaluating of the ovary development in queens and workers maintained caged outside of the colony conditionings and the effect of the narcosis with CO₂, practice current in the beekeeping. Newly emerged queens and workers were caged with candy and water during 15 days. For the queens the effect of the mate delay and CO₂ narcosis were studied using TUNEL and acid fosfatase reaction to evaluate cell damages. The cells of the terminal filament appear as rows of one single cell, with a rectangular shape, poor in organelles and with a big central nucleus. In the transition for the germarium the cells present a pyramidal form with their base widened resting on tunica propria and the apex directed to center of the ovariole. Below the region of transition to the germarium are spherical cells, probably the oogonia. In the germarium are found somatic (pre-follicular cells) and germinative (cystoblasts, the cystocists, the oocytes and the future nurse cells) cells. The queen's ovaries develop normally until the mating age, 5 days old queens. About the 10 days, the virgin queen beginning to presents an ovariolar disorganization with big incidence of injured cells with characteristics of apoptosis and autofagic death. The cell death seems to reach mainly the nurses cells, but death occurs also in the somatic cells and alterations in the oocyte are also observed. The results showed that up to the five days, the CO₂ narcosis do not provoke changes in the ovarian development, however the 10 days old treated queens show a diminution in the rate of cell death. This effect, however, does not persist and 15 days old queens present no difference in the rates of cellular death from the control. Although in some ovaries of newly-emerged workers was possible to observe beginning of oocyte differentiation in the germarium, the majority presents the germarium, basically constituted of undifferentiated cysts. The CO₂ exposition, increases ovariolar degeneration causing inhibition of ovarian development. In conclusion can be said that ovarian development and the effect of narcosis are different in the castes

Keywords: Cell death. Narcosis. Carbon dioxide. Ultrastructure. Female.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As Abelhas, Características Sociais e Reprodutivas.....	1
1.2 Controle Natural Da Diferenciação Dos Ovários.....	2
1.3 Indução Artificial Do Desenvolvimento Do Ovário.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Material.....	11
3.1.1. Obtenção e Manutenção das Rainhas.....	11
3.1.2. Obtenção e Manutenção das Operárias.....	11
3.2. Métodos.....	11
3.2.1. Exposição ao CO ₂	11
3.2.2. Preparação do material para Microscopia de Luz (ML).....	12
3.2.3. Preparação do Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	13
3.2.4. Teste Citoquímico para Detecção de Fosfatase Ácida (MET).....	13
3.2.5. Análise das Divisões Celulares Através da Imunomarcagem da Histona H3-fosforilada.....	14
3.2.6. Processamento do material para Técnica Imunocitoquímica: TUNEL (TdT-FragELtm DNA Fragmentation Detection Kit (cat. nº QIA33)).....	14
4. Resultados.....	16
4.1. Desenvolvimento dos Ovários em Rainhas Recém-emergidas Mantidas Fora da Colônia.....	16
4.1.1. Organização geral dos ovários.....	16
4.1.2. Ultra-estrutura do filamento terminal.....	17
4.1.3. Ultra-estrutura do desenvolvimento do germário.....	17
4.1.4. Características da morte celular observada.....	18
4.2. Efeito da Narcose com CO₂ Sobre o Desenvolvimento e Organização Ovariana de Rainhas Mantidas Fora da Colônia.....	19
4.2.1. Efeito sobre o filamento terminal.....	19
4.2.2. Alterações em células do germário.....	20
4.3. Reação TUNEL e Fosfatase Ácida.....	21

4.4. Divisões Celulares nos Ovários.....	23
4.5. Desenvolvimento de Operárias Mantidas Fora da Colônia.....	63
4.5.1. Organização geral dos ovários das operárias.....	63
4.5.2. Filamento terminal.....	63
4.5.3. Germário.....	64
4.6. Efeito do CO₂ no Desenvolvimento Ovariano de Operárias.....	64
5. DISCUSSÃO.....	82
5.1. Efeito da Retirada da Colônia.....	83
5.2. Efeito da ação do CO ₂	86
5.3. Atividade Fosfatásica.....	88
5.4. Divisões celulares.....	90
5.5. Aspectos de Morte Celular.....	92
5.6. Controle do Desenvolvimento do Ovário nas Operárias.....	94
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
8. ANEXOS.....	120

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Abelhas, Características Sociais e Reprodutivas

As abelhas apresentam vários níveis de sociabilidade. Há espécies desde solitárias a altamente sociais e entre os extremos, uma gama considerável de níveis intermediários. As espécies que apresentam a mais sofisticada organização social são aquelas que se estruturam em sociedades perenes, ou colônias, nas quais há sobreposição de gerações e cooperação entre os indivíduos da colônia. Esse padrão de sociabilidade é exibido pelas abelhas chamadas eussociais (WILSON, 1976). Entre estas há duas categorias: eussociais primitivas (como *Bombus*) e altamente eussociais ou eussociais avançadas como espécies do gênero *Apis* e meliponíneos, as abelhas neotropicais sem ferrão.

Ao longo da evolução, a vantagem de viver em um grupo social levou algumas espécies a uma diferenciação morfológica, fisiológica e comportamental entre as fêmeas da colônia, originando as castas, as quais compreendem grupos de indivíduos do mesmo sexo especializados na execução de tarefas diferentes (WILSON, 1976), no caso uma divisão entre o trabalho reprodutivo e o de manutenção do ninho. Essa especialização pode ser drástica o bastante para diferenciar os indivíduos também geneticamente, como no gênero *Melipona* (KERR, 1962; HARTFELDER et al, 2006).

Em *Apis mellifera*, as fêmeas, distinguem-se em duas classes, ou castas: 1) uma classe reprodutiva, a rainha e 2) uma classe geralmente inativa ou pouco ativa reprodutivamente, as operárias. As rainhas são fêmeas férteis responsáveis quase que exclusivamente pela produção de todos os indivíduos da colônia e as operárias, fêmeas semi-férteis, responsáveis por todas as demais funções: construção, manutenção e defesa da colônia, assim como pela coleta de alimento e cuidado com a prole (FREE, 1980).

As castas das espécies eussociais avançadas, além de representarem indivíduos especializados na realização de tarefas específicas, agrupam indivíduos com morfologia e fisiologia diferenciadas. Uma das características morfofisiológicas mais distintiva entre operárias e rainhas das espécies eussociais avançadas é o desenvolvimento ovariano. As rainhas possuem os ovários mais desenvolvidos, enquanto que as operárias possuem ovários menos desenvolvidos e genitália atrofiada e não se acasalam (SNODGRASS, 1956; WILSON, 1976).

As operárias são consideradas inférteis e não estéreis (SAKAGAMI et al., 1963), uma vez que possuem potencialidade para a produção de ovos haplóides que por partenogênese

podem originar machos. De fato, em algumas espécies, como em *Bombus terrestris*, em certas fases e condições da colônia, operárias disputam com a rainha a produção de machos (DUCHATEAU & VELTHUIS, 1989). Mesmo em *Apis mellifera* presume-se que em toda colônia haja uma porcentagem de operárias poedeiras (PUHLERMANN, 1956). Porém, em *Apis mellifera* a maioria, senão todos os ovos postos pelas operárias são eliminados por outras operárias, designadas “operárias fiscalizadoras” (RATNIEKS, 1995).

1.2 Controle Natural Da Diferenciação Dos Ovários

O controle do desenvolvimento e da diferenciação dos ovários das castas em *A. mellifera* ocorre principalmente na fase larval e é exercido pelas próprias operárias (MICHENER, 1974; RACHINSKY et al., 1990, REGINATO & CRUZ-LANDIM, 2001, CRUZ-LANDIM et al., 2006) através da alimentação diferencial das larvas, a partir do segundo ou terceiro dia de vida larval (RIBBANDS, 1953), mas também ocorre na vida adulta, sendo este último exercido pela rainha (BUTLER, 1954, CRUZ-LANDIM et al., 2006).

As larvas de futuras rainhas recebem como alimento a geléia real, a qual influencia o desenvolvimento de uma glândula endócrina chamada *corpora allata*, aumentando o seu tamanho na rainha e, conseqüentemente, a produção do hormônio Juvenil (HJ); seu principal produto de secreção (DIXON & MOSER, 1972; RACHINSKY et. al., 1990). O HJ influencia a diferenciação celular, dirigindo o desenvolvimento pós-embrionário da larva na direção da formação de rainhas (BEETSMA, 1979). O elevado título de HJ na hemolinfa de larvas de rainhas no começo do período de metamorfose previne a indução de morte celular nos ovários, o que faz com que as rainhas desenvolvam seus ovários plenamente (SCHMIDT-CAPELLA & HARTFELDER, 1998, ANTONIALLI JR. & CRUZ-LANDIM, 2009). As larvas de operárias possuem tanto os *corpora allata* como título de HJ na hemolinfa menores do que as larvas de rainha (RACHINSKY, 1990; RACHINSKY & HARTFELDER, 1991; RACHINSKY & ENGELS, 1995), fazendo com que no início do período de metamorfose aumente a ocorrência de morte celular (REGINATO & CRUZ-LANDIM, 1998; 2001; 2002, ANTONIALLI JR & CRUZ-LANDIM, 2006), levando a um desenvolvimento ovariano deficiente.

Portanto, durante a fase larval a diferenciação das castas, a qual tem como uma das principais características o extremo desenvolvimento do ovário nas rainhas e a semi-castração das operárias, resulta de diferenças na nutrição das larvas, a qual se reflete em taxas

hormonais. A produção de rainhas, ou indivíduos com ovário muito desenvolvido está, portanto, sob controle das operárias, embora em resposta às condições da colônia. Então, a diferença entre rainhas e operárias, no momento da emergência do adulto, no que se refere aos ovários está no número de ovários e portanto, no potencial para produzir ovos.

A vitelogênese ocorre na adulta, e esta apresenta outros tipos de controle, tanto nas rainhas como nas operárias.

Nas rainhas africanizadas de *A. mellifera* há um padrão de desenvolvimento ovariano bastante específico, o qual se divide em dois períodos: pré-vitelogênico ou antes do acasalamento (BERGER & ABDALLA, 2005; TANAKA & HARTFELDER, 2004) e vitelogênico, após o acasalamento (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2002; BERGER & ABDALLA, 2005). Segundo BERGER & ABDALLA (2005) o padrão inicial da ovogênese no período pré-vitelogênico é bastante definido. Ao emergir, as rainhas possuem longos e finos ovários, os quais apresentam células germinativas e somáticas indiferenciadas. Por volta dos três dias de idade, essas células vão se diferenciando, as germinativas sofrem várias divisões mitóticas com citocinese incompleta, originando grupos de células que ficam unidas umas as outras, os chamados cistócitos e em certa altura formam estruturas que lembram rosetas.

As mitoses prosseguem até que seja alcançado no cisto o número de células característico da espécie, que em *A. mellifera* é 48 (ENGELS, 1968). A partir desse estágio, as mitoses cessam e um dos cistócitos que compõem a roseta se diferenciara no ovócito e os demais em células nutridoras.

O estágio inicial de diferenciação dessas células é reconhecido visivelmente pela presença de uma organização formada pelo ovócito central ocupando quase a totalidade da largura do ovário, ligado a duas fileiras de células bem menores, divergindo em direção oposta, as futuras células nutridoras, em diferenciação. Este estágio morfológico das células germinativas não é considerado pelos autores como folículo pré-vitelogênico, uma vez que não houve ainda a formação do folículo, no qual há o envolvimento por células foliculares e a separação das câmaras ovocítica e nutridora, nem diferenciação completa das células nutridoras, como também não há diferenciação das células pré-foliculares para formarem as células foliculares que envolvem as câmaras foliculares (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2006). As células pré-foliculares encontram-se ainda dispostas entre as células germinativas em diferenciação (TANAKA & HARTFELDER, 2004). Se a rainha mantém-se virgem, o desenvolvimento ovariano, segundo BERGER & ABDALLA (2005), pára nesse último estágio. Segundo PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2002) e TANAKA & HARTFELDER

(2004) os estágios iniciais da ovogênese vão um pouco além dos descritos por BERGER & ABDALLA (2005), mostrando haver nas rainhas virgens formação de primórdios de folículos. Porém em ambos os casos não é observada a diferenciação e divisão nítida das câmaras nutridora e ovocítica ou ainda não há formação completa do folículo pelo revestimento e diferenciação das células foliculares, ou mais precisamente, a diferenciação de um vitelário no ovário.

Depois de formados os folículos, em que células nutridoras e ovócito ficam alojados em câmaras separadas envolvidas por células foliculares, caracteriza-se a fase pré-vitelogênica do desenvolvimento do ovócito. Nesta fase, as células nutridoras sintetizam e transferem para o ovócito, principalmente RNA. A fase vitelogênica que vem a seguir caracteriza-se pela captação da hemolinfa e deposição no ovócito, da vitelogenina e outros produtos que constituirão o vitelo.

Alguns autores consideram como estágio pré-vitelogênico todas as ocorrências da ovogênese que precedem o início da deposição de vitelo no ovócito (TANAKA & HARTFELDER, 2004; BERGER & ABDALLA, 2005). Neste caso pode dizer-se que o estágio pré-vitelogênico em *A. mellifera* independe de qualquer estímulo (TANAKA & HARTFELDER, 2004; BERGER & ABDALLA, 2005), porém parece ser “desligado” nos estágios iniciais da fase pré-folicular, quando a rainha atinge a idade de acasalamento e mantém-se virgem (BERGER & ABDALLA 2005). Isto pode explicar o porquê das rainhas virgens de *A. mellifera*, raramente ovipositarem e o porquê das fecundadas levarem algum tempo para começarem a produzir ovos, uma vez que devem prosseguir o desenvolvimento ovarioar a partir de estágios iniciais da ovogênese, até a formação das câmaras nutridoras e ovocíticas e começo da vitelogênese, ocorrências que somente terão lugar após o acasalamento (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2002; BERGER & ABDALLA, 2005).

Se a rainha mantém-se virgem após o período próprio para o acasalamento, o que ocorre por volta do 6º dia após a emergência, por volta dos dez dias de idade, observa-se uma degeneração e reabsorção do conteúdo ovarioar e presença de muitas células com núcleos picnóticos, indicativo de morte celular, nos ovaríolos (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2002). Essa situação se agrava aos 15 dias de idade e se mantém aos 18 dias (BERGER & ABDALLA, 2005). Porém, havendo o acasalamento a rainha inicia a fase vitelogênica e o desenvolvimento geral dos ovários é ativado (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2002; BERGER & ABDALLA, 2005). As rainhas virgens que passaram do período de acasalamento não diferem estatisticamente quanto ao número de células germinativas em cada ovaríolo, mas diferem quanto ao número de células com núcleos picnóticos (BERGER &

ABDALLA, 2005). Como a maioria das células com núcleos picnóticos é visualizada dentro dos ovários e raramente na membrana peritoneal, BERGER & ABDALLA (2005) especulam que a incidência de morte celular ocorre principalmente nas futuras células nutridoras, sugerindo que são estas células que regulam o desenvolvimento inicial do folículo. Através da análise morfológica com microscopia de luz, verifica-se que as células com núcleos picnóticos geralmente estão próximas de ovócitos intactos. Pode-se reconhecê-las, pois geralmente uma das duas fileiras de células ligadas ao ovócito é a que apresenta células com picnose nuclear. Nos germários de rainhas tratadas com CO₂, geralmente ocorrem células com núcleos picnóticos somente na câmara nutridora, no caso dos folículos pré-vitelogênicos (BERGER & ABDALLA, 2005).

Como, porquê e o que faz os ovários de *A. mellifera* serem ativados após o acasalamento são perguntas totalmente abertas e ainda sem perspectiva de resposta totalmente esclarecedora. Assim como o fato dos ovários degenerarem após o período propício para o acasalamento se a rainha mantém-se virgem.

Em *Drosophila melanogaster* a vitelogênese e o desenvolvimento ovariano é ativado por peptídeos sexuais transmitidos às fêmeas pelos machos, que estimulam a síntese de hormônio juvenil (HJ) pelos *corpora allata* das fêmeas (FAN et al., 1999). No caso de *A. mellifera*, na glândula de muco de machos maduros (8 dias de idade) três peptídeos principais foram encontrados (COLONELLO & HARTFELDER, 2003). Sabendo-se que o conteúdo da glândula de muco compõe o sêmen introduzido na fêmea pela cópula, tais peptídeos foram apontados como candidatos a ativadores da vitelogênese nas fêmeas (COLONELLO & HARTFELDER, 2003), como ocorre em *D. melanogaster*, mas não existem experimentos comprobatórios.

O controle do desenvolvimento e da diferenciação ovariana nas castas femininas das abelhas é um ponto chave para a manutenção da estabilidade social dentro da colônia, evitando conflitos que seriam originados caso ambas as castas pudessem reproduzir-se livremente (WILSON, 1976). Mesmo assim, resquícios desses conflitos podem ser vistos na oofagia, seja esta exercida pela rainha (meliponíneos) ou por operárias (*A. mellifera*).

Vários fatores e condições podem influenciar o desenvolvimento do ovário das operárias, até mesmo características próprias da espécie. O desenvolvimento ovariano das operárias em *A. mellifera* ocorre mais freqüentemente na ausência da rainha, e na ausência de cria jovem (PAGE & ERICKSON, 1988). A manutenção do “altruísmo” das operárias com relação à rainha e suas filhas, não se baseia somente nas relações genéticas ou sociobiológicas como postulado por HAMILTON (1964). Ao longo da evolução, a rainha desenvolveu

mecanismos de controle ou dominância sobre as operárias adultas. Um desses mecanismos de controle permite a manutenção dos aspectos morfológicos e genéticos da casta dominada. Ou seja, apesar das castas possuírem o mesmo genoma, o desenvolvimento de certos órgãos e glândulas, é controlado pela casta dominante, no caso a rainha (BUTLER & SIMPSON, 1958) através de feromônios produzidos em suas glândulas mandibulares (RIBBANDS, 1953), principalmente o ácido (E)-9-oxodecenoico (9-ODA) que age especificamente sobre o sistema endócrino (KAATZ, 1992) inibindo o desenvolvimento ovariano das operárias jovens (BUTLER, 1954; PAIN, 1955; BUTLER & SIMPSON, 1965; VELTHUIS, 1970). Porém, operárias mais velhas, campeiras, que exercem funções externas à colônia e possuem títulos de HJ na hemolinfa mais altos (HARTFELDER, 2000-revisão), podem apresentar seus ovários em estágios mais desenvolvidos (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003). A produção de ovos pelas operárias, ou seja, a vitelogênese em seus ovários apresenta controles diferentes dos das rainhas, nos quais a presença do hormônio juvenil mantém relação antagônica à produção de vitelogenina, uma proteína da qual depende a vitelogênese (HARTFELDER et al. 2002; GUIDUGLI et al, 2005). Como os títulos do hormônio juvenil sobem quando as operárias de *Apis mellifera* passam das tarefas intra-coloniais para as externas e correspondentemente as taxas de expressão da vitelogenina baixam, é possível que nas operárias funcione um sistema de regulação da produção de ovos que atue pela repressão da síntese de vitelogenina pelo hormônio juvenil e vice-versa (AMDAM & OMHOLT, 2002; GUIDUGLI et al. 2005).

Na ausência da rainha, em colônias órfãs, as operárias desenvolvem precocemente e com mais frequência os seus ovários (MAURIZIO, 1954), chegando mesmo a ovipositar (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003), quando podem ser reconhecidas como falsas rainhas.

O tamanho populacional da colônia também influencia o desenvolvimento ovariano das operárias de *A. mellifera* (GROOT & VOOGD, 1954) por interferir na distribuição da substância de rainha entre os co-habitantes da colônia.

Não só as características da espécie ou das inter-relações coloniais interferem no desenvolvimento ovariano, como também o ambiente externo. Nas operárias adultas de *A. mellifera*, a temperatura e a estação do ano parecem atuar no desenvolvimento ovariano. Operárias de colônias mantidas em estufa com temperatura controlada (simulando o verão durante o inverno), apresentaram os ovários significativamente mais desenvolvidos do que as operárias de colônias mantidas na natureza (PAIN & VERGÉ, 1950; TARANOV, 1961). PAIN (1955) notou ainda que a maior porcentagem de operárias com ovários desenvolvidos ocorre durante a primavera. Neste último caso, a explicação para o maior desenvolvimento

ovariano pode residir no fato de que nessa época do ano aumenta a frequência de operárias com atividade de campo, as quais permanecendo fora da colônia por mais tempo, ficam menos susceptíveis ao efeito inibitório da “substância de rainha”. Por outro lado o maior aporte de nutrientes à colônia, principalmente de pólen, tem também ação importante (BITONDI & SIMÕES, 1996). O mesmo acontece em colônias super-populosas, onde o efeito inibitório da rainha é menos prevalecente sobre as operárias (GROOT & VOOGD, 1954).

Em condições normais, operárias de *A. mellifera* chegam ao máximo do seu desenvolvimento ovariano entre 12-14 dias após a emergência (KROPACOVÁ et al., 1968), porém MAURIZIO (1954) demonstrou que em colônias sem rainha e cria, as operárias atingem o máximo de seu desenvolvimento ovariano entre os 28 e 42 dias de vida adulta. Esses dados estão de acordo com os de PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2003), as quais demonstraram que operárias de colônias sem rainhas, desenvolvem seus ovários a partir dos 30 dias de idade. KUWABARA (1947) observou que em colônias órfãs as larvas de operárias são alimentadas mais frequentemente e as operárias apresentam maior número de ovariolos do que as de colônias normais. Além disso, HAYDAK (1943, 1970) demonstrou que larvas de rainhas subnutridas desenvolviam-se em adultos com características intermediárias entre as duas castas. PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2003) também notaram que operárias de colônias órfãs ou com ausência de cria desenvolvem seus ovários com mais frequência que as operárias na presença da rainha.

A vitelogênese, ou seja, a fase final de amadurecimento dos ovócitos no ovário faz-se pela captação por estes da vitelogenina (vg), uma proteína precursora de vitelo produzida no corpo gorduroso das abelhas e depois eliminada para a hemolinfa (ENGELS et al. 1990). A vitelogenina está presente na hemolinfa das operárias, porém nas nutridoras de colônias com rainha e cria jovem os precursores dessa proteína são “desviados” para compor a secreção da glândula hipofaríngea, cujo produto faz parte da assim chamada “geléia real”.

1.3 Indução Artificial Do Desenvolvimento Do Ovário

Em *A. mellifera*, duas exposições sucessivas ao gás carbônico (CO₂) aceleravam a oviposição em rainhas recentemente acasaladas e induz rainhas virgens a ovipositarem (MACKENSEN, 1947). O CO₂ exerce uma função similar aos estímulos recebidos com o acasalamento, o qual provocaria liberação de neuro-hormônios que agiriam na fisiologia reprodutiva da abelha (HERMANN 1969).

ENGELS & RAMAMURTY (1976) verificaram que, de fato, a ovogênese pode ser induzida pela administração de CO₂ e que a vitelogênese (síntese de vitelogenina) é mantida em rainhas virgens alactomizadas, portanto, mesmo com a ausência dos *corpora allata*.

O mesmo efeito do CO₂ foi estudado em *Bombus terrestris* (TASEI, 1994), indicando que talvez o HJ não seja o principal fator que estimula o desenvolvimento ovariano ou seja, a vitelogênese, podendo agir nesse processo outros hormônios como a ecdisona (HAGEDORN et al., 1975), na hipótese de que os títulos remanescentes de HJ na hemolinfa após a extirpação dos *corpora allata* não sejam suficientes para estimular a vitelogênese. HARTFELDER et al. (2002) verificou que os ecdisteróides regulam a produção de ovos nas operárias de *A. mellifera* e *S. postica*.

Os dados obtidos por BERGER et al. (2005) confirmaram os resultados dos autores anteriores e, ainda, demonstraram que o CO₂, além de acelerar os estágios iniciais da ovogênese em rainhas de *A. mellifera* tem propriedades conservativas do tecido ovariano, diminuindo o número de células com núcleos picnóticos e degeneração do tecido ovarioles, mesmo se a rainha mantém-se virgem após o período de acasalamento.

O efeito ativador do CO₂ em rainhas é evidenciado pela formação precoce de folículos ovarianos quase completos, com divisão das câmaras nutridora e ovocítica, além da diferenciação das células foliculares já em começo de recobrimento das câmaras, num período no qual os ovaríolos das rainhas não tratadas ainda contêm em sua maior parte rosetas de cistócitos ou poucos primórdios de folículos. Porém, o fato inusitado foi sua ação conservativa no tecido ovarioles (BERGER et al. 2005). Rainhas virgens não tratadas e que já passavam muito do período próprio de acasalamento, tratadas com CO₂ apresentaram ovaríolos íntegros, com pouca incidência de células com núcleos picnóticos.

Nos ovários de operárias a narcose com CO₂ inibe o desenvolvimento ovariano (FYG, 1950; BIEDERMANN, 1964; KOPRACOVÁ et al., 1968, HARRIS & HARBO, 1990). RIBBANDS (1950) e SKOWRONEK & JAYCOX (1974) verificaram que ao expor operárias de *A. mellifera* a uma atmosfera saturada de CO₂ por dois minutos, alterações comportamentais como a aquisição do hábito de campeira ocorreram precocemente e que as taxas de coleta de pólen e a expectativa de vida das operárias diminuiriam significativamente em relação ao grupo controle não narcotizado.

Aplicações de CO₂ em operárias recém emergidas além de diminuir a expectativa de vida, inibem o desenvolvimento da glândula hipofaríngea (SKOWRONEK & JAYCOX, 1974) e das glândulas de cera (RIBBANDS, 1950; SKOWRONEK & JAYCOX, 1974). Esses últimos dados parecem confirmar a hipótese de KENN DAVEY (informação pessoal)

de que o CO₂ e o HJ são efetores com receptores homólogos nos *corpora allata*. O CO₂ estaria, portanto, mimetizando uma elevação ideal de HJ, o que provocaria a modulação das proteínas precursoras de vg, dirigindo-as para a síntese de vg pelo corpo gorduroso. Porém, essa hipótese é difícil de ser confirmada, pois o CO₂ diminui o consumo de pólen pelas operárias, ocasionando, uma diminuição do desenvolvimento ovariano dessas abelhas (RIBBANDS, 1950) uma vez que a síntese de vg está diretamente ligada ao consumo de pólen (BITONDI & SIMÕES, 1996). O efeito negativo do CO₂ sobre as operárias parece dar-se em todo o seu organismo, uma vez que prejudica a sua nutrição, ou seja, a ingestão de elementos essenciais para seu metabolismo e desenvolvimento geral. Por isso, operárias tratadas com CO₂ apresentam uma taxa de mortalidade alta e precoce (BERGER & ABDALLA, 2004; EBADI *et al.* 1980)

Estudos realizados por KOYWIWATTRAKUL *et al.* (2005) mostraram que o CO₂ reduz a expressão dos genes de vitelogenina e transferrina quando comparado ao grupo não tratado sugerindo que estes genes podem estar envolvidos na regulação da esterilidade em operárias de *A. mellifera*. Estes mesmos autores também sugerem que existe uma ligação entre a exposição ao CO₂ e a síntese de vitelogenina e a ativação casta específica em abelhas sugerindo que a vg seja um fator condicionalmente nos controles que regulam a atividade ovariana em operárias.

O efeito danoso do CO₂ também é conhecido para outros insetos, diminui o crescimento larval em *Heliothis sp* (EDWARDS, 1968), reduz a fecundidade em *Blatella germanica* (BROOKS, 1965) e em *Drosophila melanogaster* (PERON *et al.*, 1972). Aplicações de CO₂ em rainhas virgens ao contrário do que ocorre nas operárias, estimulam a vitelogênese e a oviposição (MACKENSEN, 1947; ENGELS *et al.*, 1976). Em *A. mellifera* o tratamento diminui a atratividade da rainha (PAIN *et al.*, 1967) e segundo SKOWRONEK (1979), apesar das rainhas tratadas terem o desenvolvimento ovariano e a atividade de oviposição inicialmente acelerados, em longo prazo, perdem em eficiência com relação às rainhas não tratadas da mesma idade.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de observar em que medida os controles naturais e artificiais do desenvolvimento ovariano nas castas são alterados pela retirada destas do contexto colonial, ou seja, tentar isolar o desenvolvimento ovariano do efeito de grupo, e entender em que medida o desenvolvimento ovariano pode ser independente do contexto social e como a narcose atua neste caso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizadas rainhas e operárias de *Apis mellifera* L. africanizada.

3.1.1. Obtenção e Manutenção das Rainhas

As rainhas foram produzidas artificialmente no apiário do Departamento de Biologia, UNESP (Rio Claro, SP) pelo método de DOOLITTLE (1899) e após a emergência, mantidas individualmente com seis operárias nutridoras em caixas de madeira de 5x5x2cm com candy (mistura de mel e açúcar de confeitiro). As operárias foram trocadas a cada dois dias. As caixas foram mantidas em condições de temperatura e umidade do ambiente. Essas rainhas serão o grupo controle.

3.1.2. Obtenção e Manutenção das Operárias

Operárias recém emergidas foram coletadas no Apiário do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro. As abelhas foram mantidas em 8 caixas de madeira de 15x15x7 cm (50 operárias em cada caixa, mais uma rainha virgem), com candy e água a vontade, em estufa, a uma temperatura constante de 32°C e umidade relativa igual a 70%.

3.2. Métodos

3.2.1. Exposição ao CO₂

Para a análise da influência do CO₂ no desenvolvimento de ovários das rainhas virgens, rainhas mantidas nas mesmas condições descritas acima no item 3.1.1, foram expostas à atmosfera do gás por 1 minuto nos 1º, 3º, 5º e 10º dias de vida adulta e foram analisadas com 3, 5, 10 e 15 dias de vida adulta. A submissão das rainhas à narcose e as idades em que estas foram analisadas estão detalhadas na tabela abaixo:

NARCOSE				ANÁLISE			
Recém emergida	3 dias	5 dias	10 dias	3 dias	5 dias	10 dias	15 dias
X				X			
X	X				X		
X	X	X				X	
X	X	X	X				X

Para a análise da influência do CO₂ no desenvolvimento de ovários de operárias, estas, foram mantidas nas condições descritas no item 3.1.2 e expostas à atmosfera do gás por 30 segundos nos 1º, 3º, 5º e 10º dias de vida adulta e foram analisadas com 5, 10 e 15 dias de vida adulta. A submissão das operárias à narcose e as idades em que estas foram analisadas estão detalhadas na tabela abaixo:

NARCOSE				ANÁLISE		
Recém emergida	3 dias	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias	15 dias
X	X			X		
X	X	X			X	
X	X	X	X			X

3.2.2. Preparação do material para Microscopia de Luz (ML)

Os ovários de três indivíduos de cada grupo, tanto de rainhas como operárias foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 por pelo menos 24 h. Em seguida, desidratados em série alcoólica de concentração crescente (70-95%). Após a desidratação, o material foi embebido por 24 horas em historesina Leica, sendo incluídos na mesma resina acrescida de catalisador. Secções histológicas obtidas em um micrótomo Leica RM 2145 de 5µm foram coradas com Azul de Toluidina 1% e Hematoxilina

e Eosina (HE), montados em bálsamo do Canadá, seguindo os procedimentos usuais e observadas com um fotomicroscópio Zeiss.

3.2.3. Preparação do Material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os ovários de três indivíduos de cada grupo, tanto de rainhas como operárias foram dissecados e fixados em Glutaraldeído 2% contendo 4% de Paraformaldeído em tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 (Karnovsky). Em seguida, lavados no tampão por 15 minutos e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 0,5% contendo 0,8% ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 durante 1 hora. Lavados novamente com o tampão em dois banhos de 15 minutos e incubados por 3 horas em solução aquosa de ácido tânico a 0,15% durante 3 horas. Após a incubação o material foi lavado em álcool 10% por 10 minutos e deixado em solução alcoólica de acetato de uranila a 1% por duas horas. Em seguida, desidratado em série de acetona de concentração crescente (70-100%), 5 minutos cada banho, embebido e incluído em resina Epon-Araldite.

Os cortes ultra-finos obtidos em ultramicrotomo foram recolhidos com telinhas e contrastados com acetato de uranila por 90 minutos e citrato de chumbo por 20 minutos, examinados e fotografados com microscópio eletrônico de transmissão (MET), PHILIPS.

3.2.4. Teste Citoquímico para Detecção de Fosfatase Ácida (MET)

Os ovários de três rainhas de cada grupo foram dissecados e fixados diretamente em Karnovsky a 4 °C, pH 7,2 durante 1h. A seguir lavados rapidamente em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,8 e incubados por 45 min. a 37 °C em meio contendo: p-nitrofenil fosfato (10mg), tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,8 (10ml) e acetato de chumbo (10mg). Após a incubação, os ovários foram lavados em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 30 min. e pós-fixados em tetróxido de ósmio, segundo formulação de Millonig (Tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH 7,2) por 1h a 4 °C. Após, os ovários seguiram a rotina de preparação para MET como descrito acima. O controle consistiu em ovários incubados em meio sem o substrato (p-nitrofenil fosfato) para fosfatase ácida.

3.2.5. Análise das Divisões Celulares Através da Imunomarcação da Histona H3-fosforilada

Foram retirados os ovários de 3 indivíduos de cada grupo, armazenados em tubos tipo Eppendorf e fixados por 3 dias em paraformaldeído 4% em PBS (10mM, pH=7,5). Os ovários foram lavados no mesmo tampão para retirada do excesso de fixador, sendo três lavagens de 10 minutos cada, para subsequente permeabilização em PBST (0,1% Triton-100 em PBS 10mM, pH=7,5) por 1 hora à temperatura ambiente e lavagem em tampão (3 vezes de 5 minutos). A seguir, os ovários foram incubados por 1 hora, em solução de BSA a 1% (preparada no mesmo tampão) e por mais uma hora, em temperatura ambiente, em 20µL em solução de BSA contendo os anticorpos para marcação de mitose (anticorpo policlonal IgG anti-fosfo-histona H3, produzido em coelho na diluição de 1:100 em 1% BSA preparado em PBS 10mM, pH=7,5). Após esta etapa, foram lavados, por 3 vezes de 5 minutos em tampão, incubados durante a noite, a 4°C, em 20µL da solução contendo o anticorpo secundário IgG conjugado com fluoresceína, produzido em cabra (CY3 – Sigma C-2306) na diluição de 1:100 (em 1% BSA preparado em PBS 10mM, pH=7,5) e lavados por 3 vezes de 15 minutos.

Foram feitas montagens totais em meio contendo 90% Glicerol, 0,1% de azida sódica e 3% n-propilgalato, em PBS 10mM, pH=7,5 e as preparações analisadas em microscópio confocal Leica TCS-SP2-SE com o laser para excitação do CY3 sendo o HeNe543 e a janela de detecção de 550-700 nm.

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

3.2.6. Processamento do material para Técnica Imunocitoquímica: TUNEL (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (cat. nº QIA33)).

Os ovários de rainhas com 10 e 15 dias do grupo controle e tratado com CO₂ foram dissecados diretamente em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Em seguida os ovários foram desidratados em série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, dois banhos em 100%), cada banho com duração de 20 minutos. Posteriormente foram transferidos para xilol (2 banhos de 20 minutos) para diafanização. A embebição do material

para inclusão ocorreu em paraplast líquida em estufa à 60°C, durante 1 hora seguida de uma troca de uma 1 hora e posterior inclusão.

As secções histológicas foram feitas com 08µm, estendidas sobre lâminas histológicas previamente preparadas com polilisina, e secas em estufa por 24h, à temperatura de 37°C. A remoção da paraplast foi realizada, utilizando 2 trocas de xilol de puro (10 minutos cada), seguida de 1 troca de xilol + álcool (2:1), 1 troca de xilol + álcool (1:2) e 3 trocas de álcool absoluto, de 5 minutos cada.

Os cortes obtidos pela preparação acima foram processados segundo o protocolo descrito pelo fabricante (Calbiochem), para detecção imunocitoquímica de quebras no DNA, utilizando-se o Kit *TdT-FragELtm DNA Fragmentation Detection Kit* (cat. nº QIA33).

4. RESULTADOS

Conforme consta dos objetivos o propósito deste trabalho foi o de verificar como se desenvolvem os ovários das rainhas de *A. mellifera* fora do controle da colônia e o efeito do tratamento com CO₂, prática usual para acelerar o início da postura de rainhas fecundadas natural ou artificialmente introduzidas em colônias órfãs.

4.1. Desenvolvimento dos Ovários em Rainhas Recém-emergidas Mantidas Confinadas Fora da Colônia

4.1.1. Organização geral dos ovaríolos

Rainhas recém emergidas foram confinadas em caixas, conforme descrito em material e métodos e assim mantidas até quinze dias, na presença de 6 operárias nutridoras e candy a vontade.

Nestas rainhas, os ovaríolos apresentam além do pedicelo, apenas um germário basal e um longo filamento terminal apical.

Cada ovaríolo é constituído por um cordão de células germinativas e células somáticas, revestido por uma membrana peritoneal (FIG. 1A). A membrana peritoneal é formada por uma bainha de células musculares do tipo visceral e ramificações traqueais (FIG. 1B). As células funcionais do ovaríolo que preenchem seu interior estão separadas da membrana peritoneal pela túnica própria, uma membrana basal muito compacta e espessa (FIG. 1A, B). Em análises ultra-estruturais, a túnica própria apresenta um aspecto homogêneo, porém a sua espessura varia de acordo com a fase em que se encontra o ovário.

4.1.2. Filamento terminal

O filamento terminal dos ovaríolos consiste de uma continuação da membrana peritoneal, contendo no interior, na maior parte de sua extensão, pilhas de células poliédricas que em secção longitudinal se apresentam como filas de uma única célula de formato retangular, pobres em organelas, com um grande núcleo central com um grande nucléolo (FIG. 2A). Na transição para o germário as células do filamento terminal adquirem forma piramidal com a base alargada assentada sobre a túnica própria e o ápice afilando-se para o centro do ovaríolo (FIG. 2B). Estas células apresentam-se pobres em retículo endoplasmático,

mas ricas em mitocôndrias, Golgi, microtúbulos e glicogênio em forma de partículas. No ápice do germário, logo abaixo da zona de transição com o filamento terminal, encontram-se agrupamentos de células esféricas, provavelmente, ovogônias, com grande núcleo central, contendo um ou dois nucléolos, e escasso citoplasma contendo principalmente mitocôndrias (FIG. 2C).

O filamento terminal é a parte mais longa do ovárioolo das rainhas recém emergidas. O seu aspecto permaneceu o mesmo durante todo o período estudado, porém a sua extensão mostrou-se variável. Em rainhas com até 3 dias, a maior parte do ovárioolo é constituída pelo filamento terminal (FIG. 3A) e logo depois da emergência, o germário começa a crescer e nas rainhas com 5 dias já ocupa a maior parte do ovárioolo em detrimento do filamento terminal que aparece mais curto (FIG. 3B).

4.1.3. Desenvolvimento do germário

No germário encontram-se células germinativas e somáticas. As células somáticas são as pré-foliculares e as germinativas são as ovogônias primárias e secundárias. Primárias enquanto células tronco e secundárias no momento em que entram na fase de proliferação. Nesta última fase, nos insetos, são chamadas cistoblastos (FIG. 4A). A proliferação dos cistoblastos dá origem a cistos em que as células, resultantes das sucessivas mitoses, agora denominadas cistócitos, ficam interligadas por pontes citoplasmáticas resultantes de citocineses incompletas (FIG. 4B).

Os cistos são limitados por células somáticas e a partir de um determinado número de divisões as pontes celulares entre os cistócitos colocam-se no centro do cisto formando as estruturas em roseta (FIG. 5A,B, 6A). As ponte intercelulares formam canais que se mantêm abertos devido a um reforço de microfilamentos (FIG. 5B, 6A,B). Além dos reforços de microfilamentos, feixes de filamentos grossos cruzam as pontes (FIG. 6B). A formação das rosetas inicia-se na porção basal do germário. No centro destas rosetas encontra-se o fusoma, uma região especializada na periferia da qual, encontram-se complexos de Golgi, e mitocôndrias (FIG. 6A). A região central do fusoma é ocupada por retículo endoplasmático liso e um citossol contendo um filtro de microfilamentos (FIG. 6A).

A morfologia e tamanho do germário variaram de acordo com a idade da rainha. O início da fase de proliferação dos cistoblastos em rainhas de *A. mellifera* é muito precoce, pois as recém-emergidas já apresentam, cistócitos e naquelas com 3 dias já estavam presentes

rosetas (FIG. 3A). Em rainhas recém-emergidas, o germário ocupa uma pequena porção na região basal do ovaríolo (FIG. 3A) enquanto em rainhas com 5 dias ou mais, ocupa quase 2/3 do comprimento deste (FIG. 3B).

À medida que a idade da rainha avançou as rosetas passaram a ser vistas em partes cada vez mais altas do ovaríolo e na base iniciou-se a diferenciação de ovócitos dentre os cystócitos (FIG. 3B, 7A). Os ovócitos apresentam-se como células bem maiores que as restantes do cisto, com núcleo grande com cromatina muito dispersa e citoplasma volumoso, mas pobre em organelas (FIG. 7B). A principal característica distintiva do ovócito, além de seu tamanho, é a presença de complexos sinaptonêmicos no núcleo, indicando o pareamento dos cromossomos homólogos, característico da prófase da meiose I, e grânulos eletrondensos, provavelmente contendo RNA, dispersos no nucleoplasma (FIG. 7B). O ovócito permanece ligado ao restante dos cystócitos por pontes intercelulares (FIG. 7C).

Ovócitos diferenciáveis pelo tamanho celular já puderam ser observados na base dos ovaríolos de rainhas com 5 dias. A sua presença aumentou nas idades subseqüentes. Ovócitos diferenciados passam a ser observados em regiões cada vez mais altas dos ovaríolos, sendo que os em fase mais avançada de diferenciação encontravam-se sempre na região mais basal.

A diferenciação das células funcionais do ovaríolo nas rainhas confinadas prosseguiu até a formação de pré-folículos, ou de um pré-vitelário. Nas rainhas com 10 dias observou-se a diferenciação entre ovócito e células nutridoras com bastante nitidez (FIG. 7A), assim como se tornaram mais distintas as células pré-foliculares.

Mortes celulares ocorreram desde a rainha recém-emergida. No entanto, em rainhas entre 3 e 5 dias, a presença de morte celular aconteceu, raramente de forma isolada em alguns pontos dos ovaríolos (FIG. 8A), sugerindo um aumento em suas taxas em rainhas com 15 dias de idade (FIG. 8B).

4.1.4. Características da morte celular observada

As células que se apresentam em estado de morte celular possuem características que as distinguem nitidamente das não afetadas, mas estas características são bastante variáveis, caracterizando tipos diferentes de morte celular. Os primeiros sinais de alterações celulares são representados por figuras mielínicas que aparecem no citoplasma como um sinal de ocorrência de autofagia (FIG. 9A) Além da presença das figuras mielínicas, edema e

fragmentação do retículo endoplasmático resultando fragmentos de membranas distribuídas de maneira desorganizada no citoplasma ou em enovelamento das membranas, são também visíveis (FIG. 9B, C). Estas estruturas representam aspectos precoces de alterações celulares.

Outro aspecto freqüentemente observado foi a compactação da cromatina (FIG. 10A, D), com desorganização do envoltório nuclear resultando em falhas na sua estrutura e irregularidade em seu contorno (FIG. 10B) e concomitante condensação do citoplasma e retração celular (FIG. 10A). Células nestas condições aumentaram em número a partir dos 10 dias de idade da rainha. Estas células com características de morte apoptótica, são freqüentemente observadas no interior de outras células (FIG. 10A,B), possivelmente células somáticas que as fagocitaram. A degradação destas células prossegue até que é observada completa degradação do conteúdo nuclear e as organelas deixam de ser reconhecidas (FIG. 10B).

Em rainhas com 15 dias, extensas regiões dos ovários aparecem inteiramente tomadas por células em estado de morte (FIG. 10D). Como as células em processo de morte são fagocitadas por outras células, suas vizinhas, a sua digestão se dá no interior do ovário, com a túnica própria e a membrana peritoneal intactos separando-as da hemolinfa.

4.2. Efeito da Narcose com CO₂ Sobre o Desenvolvimento e Organização Ovariana de Rainhas mantidas Fora da Colônia

Comparando os resultados obtidos com aqueles apresentados anteriormente, os quais constituem o controle do experimento verifica-se que a narcose com CO₂ não alterou a organização e morfologia geral do ovário. Mas, algumas mudanças puderam ser observadas nas células dos vários segmentos ovariais, nas diferentes idades das rainhas.

4.2.1. Efeito sobre o filamento terminal

Ao longo de todo o período, as células do filamento terminal dos ovários de rainhas tratadas com CO₂ permaneceram com a mesma ultra-estrutura das rainhas não submetidas à narcose. Mesmo a relação entre este e o germário parece não foi alterada.

4.2.2. Alterações em células do germário

A morfologia e o tamanho do germário variou de acordo com a idade das rainhas estudadas e não foram afetados pelo tratamento com CO₂. Quanto ao efeito sobre as células da linhagem germinativa este só se tornou evidente nas rainhas com 10 e 15 dias.

Aos cinco dias de idade as rainhas tratadas com CO₂ continuaram a apresentar a constituição do seu germário muito semelhante àquela do controle, com a presença de rosetas originadas a partir da citocinese incompleta dos cistócitos (FIG.12A). Nestes, no entanto observou-se a presença de um elevado número de mitocôndrias, o qual é aparentemente maior que no controle, de complexos de Golgi mais desenvolvidos e alguns vacúolos autofágicos (FIG 12B). A presença dos vacúolos autofágicos, no entanto, parece não comprometer a integridade celular e resultar somente da reciclagem de organelas. Nos ovócitos já diferenciados, estão presentes lamelas anuladas (FIG.12C), cujo significado parece obscuro, mas que pode representar formação de mais retículo endoplasmático, como mostra a foto (FIG.12C).

Aos 10 dias de idade as rainhas mantêm a mesma organização do germário como foi descrito para as rainhas com 5 dias (FIG. 13A), o que já é uma diferença, pois no grupo não tratado ocorre uma incidência muito elevada de células com características de morte celular. No entanto, quando a morte celular está presente, o tipo de alteração é o mesmo verificado no controle como a compactação da cromatina e a vacuolização do citoplasma. Devido ao diminuto número de células atingidas, permanece no grupo tratado, uma maior integridade no tecido do ovário (FIG. 13B). Nesta idade também se percebe com bastante nitidez a diferenciação entre células nutridoras e ovocíticas, e tornam-se mais distintas as células pré-foliculares distribuídas entre estas dando a impressão do ovário encontrar-se em fases mais avançadas do desenvolvimento.

Quando atingem 15 dias após a emergência, as rainhas virgens submetidas ao tratamento possuem um germário já bem diferenciado com formação até de folículos em que a câmara nutridora com células grandes de com formato hexagonal e ricas em mitocôndrias e complexo de Golgi, e câmara ovocítica são bem distintas e envolvidas por células foliculares (FIG.14A). No entanto a narcose, nesta idade já não tem o efeito protetor verificado aos 10 dias. O tecido ovariano apresenta um alto grau de desorganização e uma alta incidência de células que se apresentam em processo de morte celular (FIG. 14B). As características de morte celular são bem definidas e semelhantes às observadas no controle, ou seja, compactação da cromatina nuclear e do citoplasma, vacuolização do citoplasma, e fagocitose

das células afetadas por células vizinhas (FIG. 14C). Embora há regiões ovariolares totalmente desorganizadas é também possível observar locais onde o tecido ovarioelar mantém a sua integridade (FIG. 14D). Embora a morte celular incida mais sobre as células nutridoras encontraram-se também alguns poucos ovócitos e células somáticas afetadas como ocorre no controle.

4.3. Reação TUNEL e Fosfatase Ácida

Conforme já descrito as características das células afetadas são variadas e ora indicam a ocorrência de apoptose, ora de morte autofágica e em alguns casos até de necrose. Em vista disso procurou-se definir que tipo de morte estaria ocorrendo usando-se a reação de TUNEL, indicativa de apoptose e pesquisando a presença de atividade de fosfatase ácida, indicativa de autofagia.

Morte celular foi observada durante todo o desenvolvimento ovariano das rainhas, sendo que a sua ocorrência aumentou em indivíduos com 10 e 15 dias, tanto no grupo controle como no grupo tratado com CO₂.

Em todos os indivíduos e idades analisados, rainhas virgens com 10 e 15 dias de idade tratados ou não com CO₂ (FIG. 15A, B, C), apresentaram um elevado número de células apoptóticas em toda a extensão do germário, indicadas pelos núcleos de coloração castanha. Devido à má qualidade das preparações com a inclusão dos ovários em paraplast, não foi possível observar grandes segmentos dos ovaríolos, desta forma não é possível afirmar se o tratamento com CO₂ alterou ou não as taxas de morte celular nos ovários.

Na maioria das preparações nota-se uma tendência para o agrupamento dos núcleos marcados, intercalados com regiões onde estes não estão presentes e que parece serem constituídas de células maiores.

Como observado anteriormente com outras técnicas, não foram encontradas mortes celulares no filamento terminal e nem na porção de transição entre o filamento terminal e o germário.

A fosfatase ácida é uma enzima hidrolítica com várias funções na célula, mas com presença marcante na digestão intracelular, ou seja de componentes exógenos ou endógenos. A sua presença é portanto esperada quando a autofagia celular é desencadeada.

A localização da atividade de fosfatase ácida foi feita em preparações para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os resultados revelaram-se diferentes do esperado, visto que a atividade da enzima não foi detectada nas células com características de morte autofágica, mas em células aparentemente saudáveis.

Em rainhas de todas as idades, tanto nos ovários das rainhas narcotizadas com CO₂ como nos das não narcotizadas foi possível observar atividade de fosfatase ácida sob a forma de depósitos eletrondensos de chumbo indicativos da atividade da enzima em células dos ovários, tanto germinativas como somáticas e inesperadamente muito intensa na túnica própria, embora de maneira descontínua.

Células dos ovários de rainhas não tratadas com cinco dias apresentaram reação positiva para esta enzima em pequenos pontos e de forma esparsa no citoplasma e em maior escala nos nucléolos das células germinativas (FIG. 16A). Nas rainhas tratadas foi possível observar uma alta atividade da fosfatase ácida em alguns núcleos chegando até a tomar conta de toda a cromatina nuclear, mas nenhuma atividade nos nucléolos. (FIG. 16B e C) O citoplasma das células que apresentaram atividade fosfatásica no núcleo apresentou-se com aparência normal.

Aos dez dias de idade, os ovários das rainhas não tratadas apresentam reação positiva para fosfatase ácida em algumas células somáticas pré-foliculares (FIG. 17A). Ocorreu marcação para esta enzima no núcleo mas, não no nucléolo, ou, se ocorria no nucléolo, a sua intensidade era bem baixa quando comparada a da cromatina (FIG. 17B). Também foi possível observar a presença de atividade desta enzima de forma esparsa no citoplasma das células germinativas (FIG. 17A). Dentro do mesmo ovário há uma variação muito grande na marcação, pois estavam presentes células marcadas, pouco marcadas e não marcadas.

Nos ovários das rainhas tratadas com CO₂ com dez dias de idade a marcação para a fosfatase se deu da mesma maneira que no grupo não tratado (FIG. 17C), talvez com maior intensidade na cromatina, como já foi verificado aos 5 dias.

Quando as rainhas atingiram 15 dias, os ovários das não tratadas com CO₂ apresentaram muitas células com características de morte celular e marcação para fosfatase ácida na cromatina do núcleo e em pontos isolados do citoplasma (FIG. 18 A e B), mas a marcação não correspondia às células afetadas pela morte.

No grupo com a mesma idade submetido ao tratamento com CO₂ verificou-se o mesmo tipo de marcação, com núcleos marcados (FIG. 18C) e nucléolos não e também de forma bem esparsa no citoplasma (FIG. 18D). Com 15 dias parece ter ocorrido um aumento na reação para fosfatase ácida no interior do ovário, tanto para o grupo controle como para o grupo experimental com muitos núcleos apresentando fortes depósitos de chumbo.

Durante todo o período estudado a túnica própria foi intensamente marcada com precipitado de chumbo decorrente da ação da fosfatase ácida (FIG. 16C, 17A, 17B, 18C), mas o curioso é que a marcação não se dá por igual em toda a extensão e toda vez em que este tipo de marcação é observada ela começa e termina de forma abrupta (FIG. 17B).

4.4. Divisões Celulares nos Ovários

Assim como se procurou observar a maneira como ocorriam e o tipo de mortes celulares nos ovários das rainhas em confinamento, procurou-se também observar onde e como ocorriam divisões celulares.

É claro que divisões celulares, principalmente mitoses, ocorrem durante o desenvolvimento dos ovários porque seus produtos aparecem no aumento do número de cistócitos nos cistos e no aumento do número de cistos, mas figuras mitóticas ou são observadas muito raramente ou não são observadas. Existem alguns recursos para identificar células que estão passando pelo ciclo mitótico mesmo que as fases em que os cromossomos já se individualizaram não sejam visíveis e a Imunomarcação da histona H3 foi a técnica utilizada para verificação da presença de células em divisão nos ovários de *A. mellifera*.

A fosforilação da histona H3 que ocorre quase que exclusivamente na serina 10, está espacial e temporalmente correlacionada à condensação cromossômica. Para a sua detecção utiliza-se um anticorpo altamente específico para a histona H3 fosforilada no grupo amino terminal, no sítio ocupado pela serina 10.

A fosforilação da histona H3 inicia-se durante a prófase, alcançando o máximo durante a metáfase, diminui na anáfase e desaparece durante a telófase (GURLEY et al.1978; PAULSON e TAYLOR 1982).

Em alguns ovariolos foram detectados núcleos isolados marcados pelo anticorpo anti-fosfo-H3 no filamento terminal e germário. Nos ovários de rainhas recém-emergidas foram observadas divisões celulares no filamento terminal e no germário (FIG. 19A, B). As divisões celulares apresentaram-se como núcleos, aparentemente na prófase, corados em vermelho pela fluoresceína conjugada ao anticorpo secundário CY3 que se liga ao anticorpo policlonal IgG anti-fosfo-histona H3 ligado à histona H3 fosforilada.

Com 10 dias de idade ambos os grupos, tratados e não tratados, mostram nos ovariolos células em divisão em pontos isolados do germário (FIG. 19E, F, G, H).

Já aos cinco e 15 dias de idade, tanto no grupo que foi submetido ao tratamento com gás carbônico como no grupo que não foi, não foram verificadas divisões celulares (FIG. 19C, D).

Figura 1- Micrografias com microscopia eletrônica de transmissão (MET) vendo-se o aspecto geral de um ovário de rainha de *Apis mellifera*. A- corte oblíquo de um ovário na região do germário vendo-se a membrana peritoneal (mp), a túnica própria (tp) e células germinativas (cg) e somáticas (cs). B- detalhe da parede do ovário vendo-se na membrana peritoneal ramos traqueais (tr) e células musculares (cm). r- roseta de citócitos, ov- ovócito, cs- célula somática, gl- glicogênio.

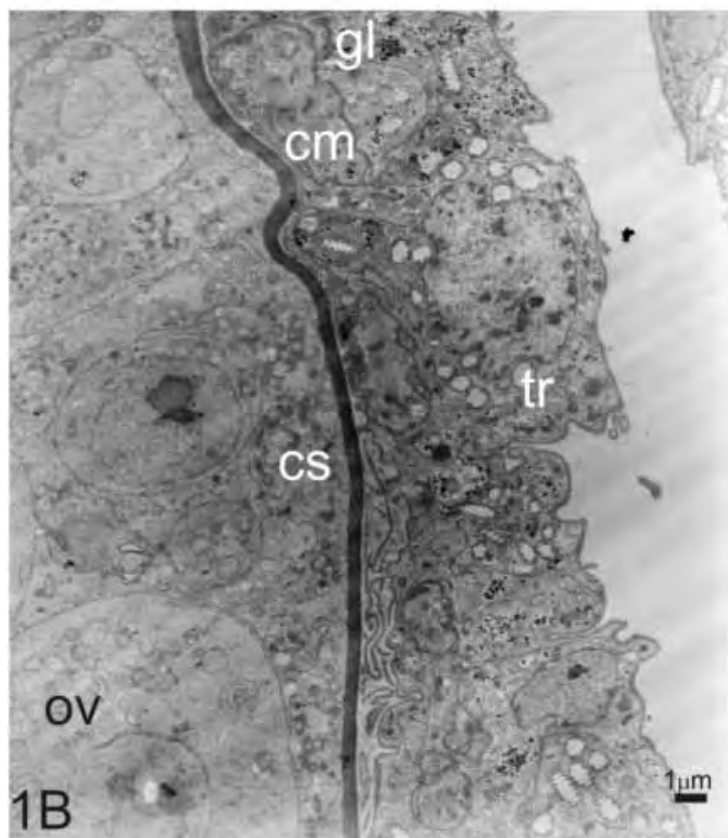
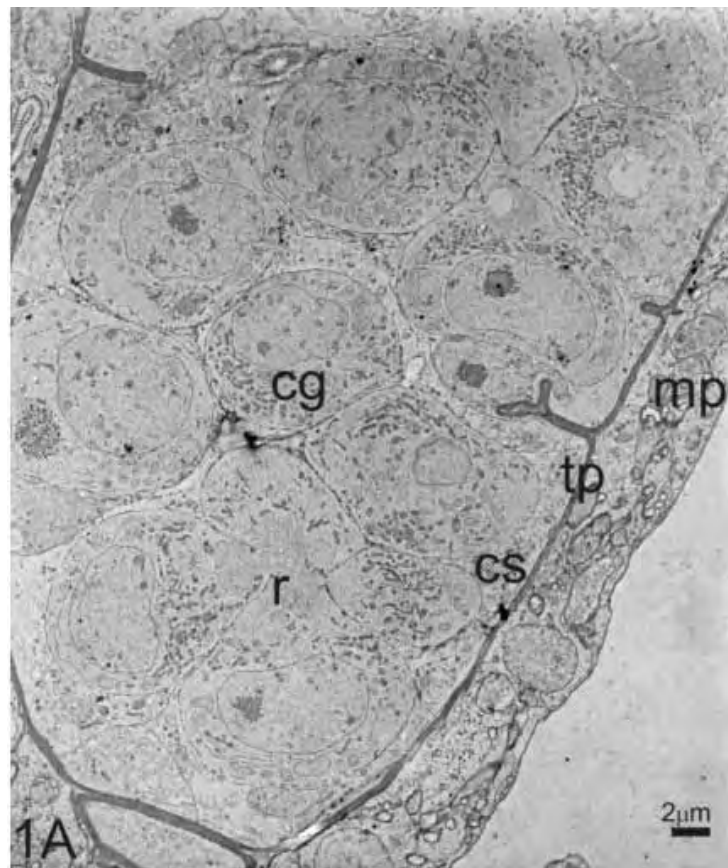


Figura 2- MET da região apical do ovaríolo. A- Filamento terminal vendo-se as pilhas de células retangulares com núcleo (n) contendo grande nucléolo (nu) e citoplasma pobre em organelas. B- Transição entre o filamento terminal (ft) e germário (g). Notar a mudança de forma nas células. C- Agrupamento de ovogônias (ovg) na proximidade da transição do filamento terminal para o germário. tp- túnica própria.

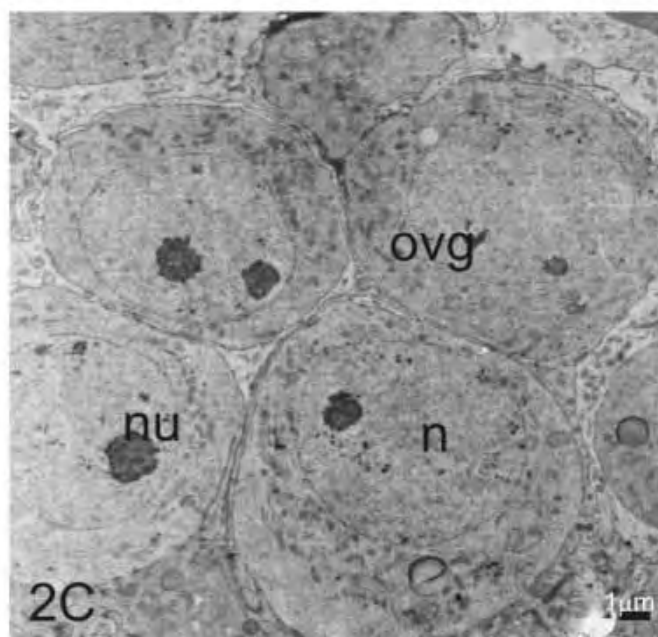
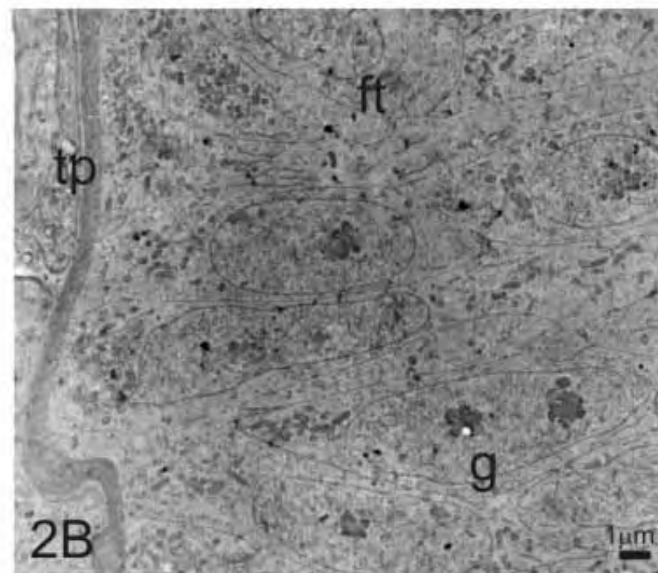
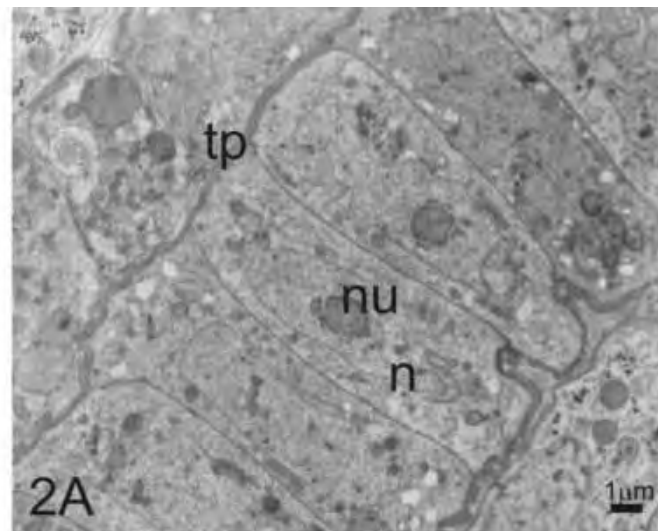


Figura 3- Fotomicrografia (FM) de ovários corados com Azul de toluidina. A- ovário de rainha com 3 dias vendo-se o filamento terminal (ft) proporcionalmente mais longo que o germário (g). B- crescimento do germário (g) em rainha virgem com 5 dias de idade. ov- ovócito, r- roseta de cistócitos, mp- membrana peritoneal

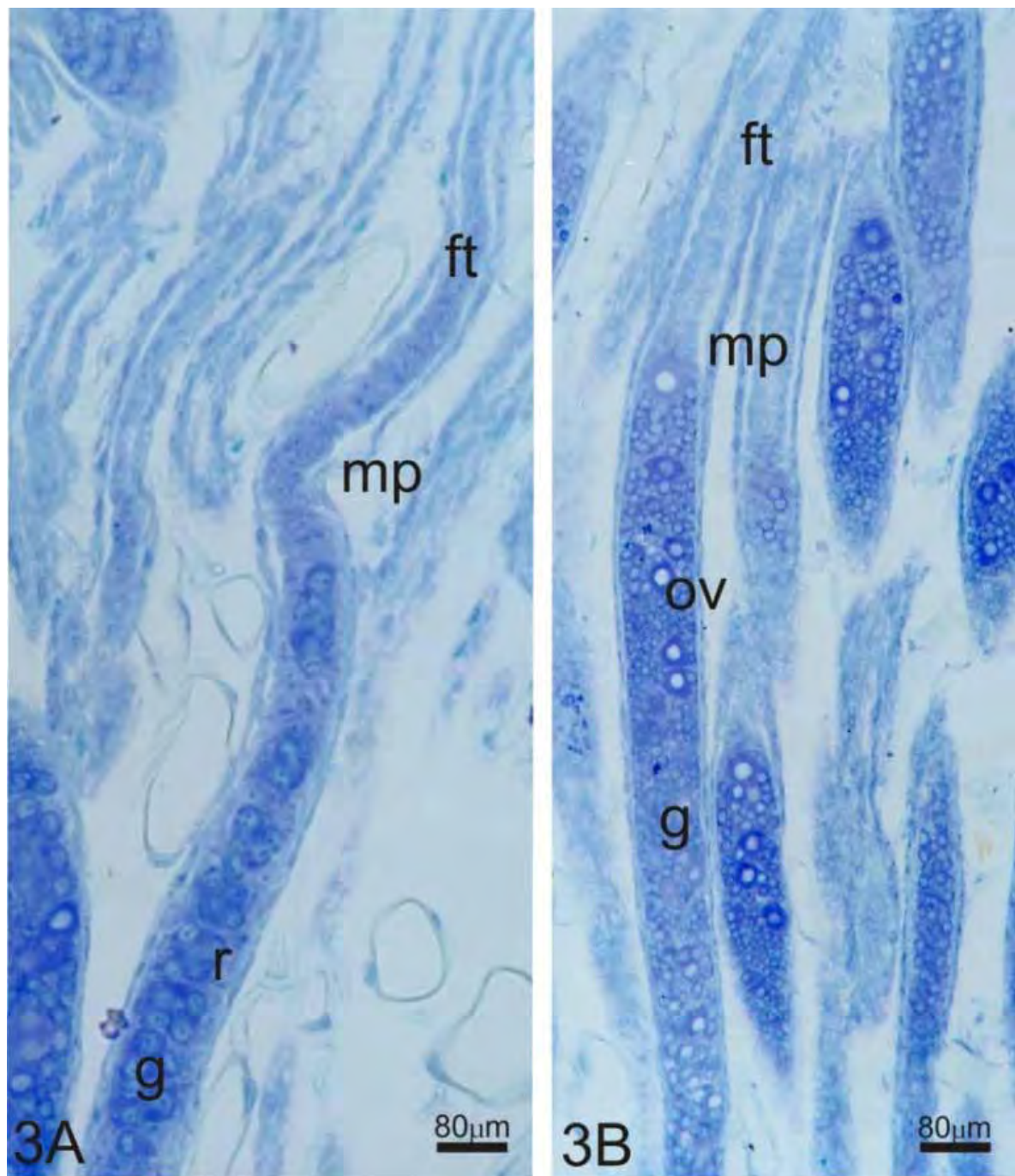


Figura 4- MET de células germinativas. A- Provável cistoblasto, vendo-se o núcleo (n) com cromatina dispersa e nucléolo (nu) e citoplasma pobre em organelas, mostrando essencialmente mitocôndrias (mt). B- cistócitos interligados por pontes citoplasmáticas (setas), mostrando grande núcleo (n) com nucléolo (nu) e pouco citoplasma.

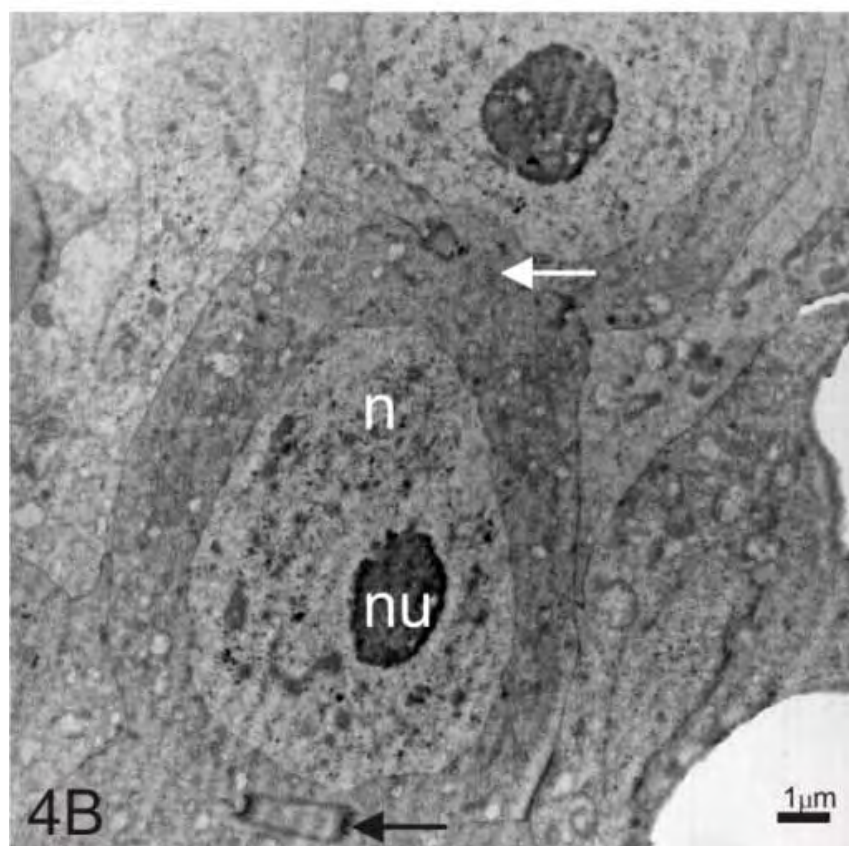
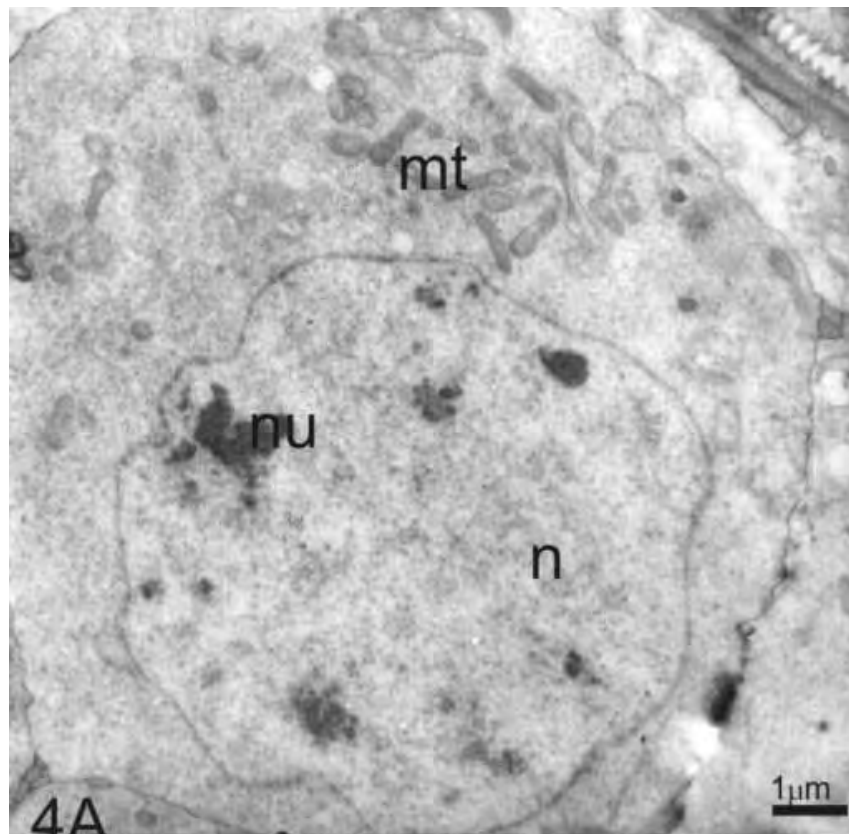


Figura 5- Rosetas de cistócitos visto em A vistas com microscopia de luz e em B com MET. Mostra a presença de reforços de microfilamentos na ponte (ponta de seta). f- fusoma, n- núcleo, nu- nucléolo.

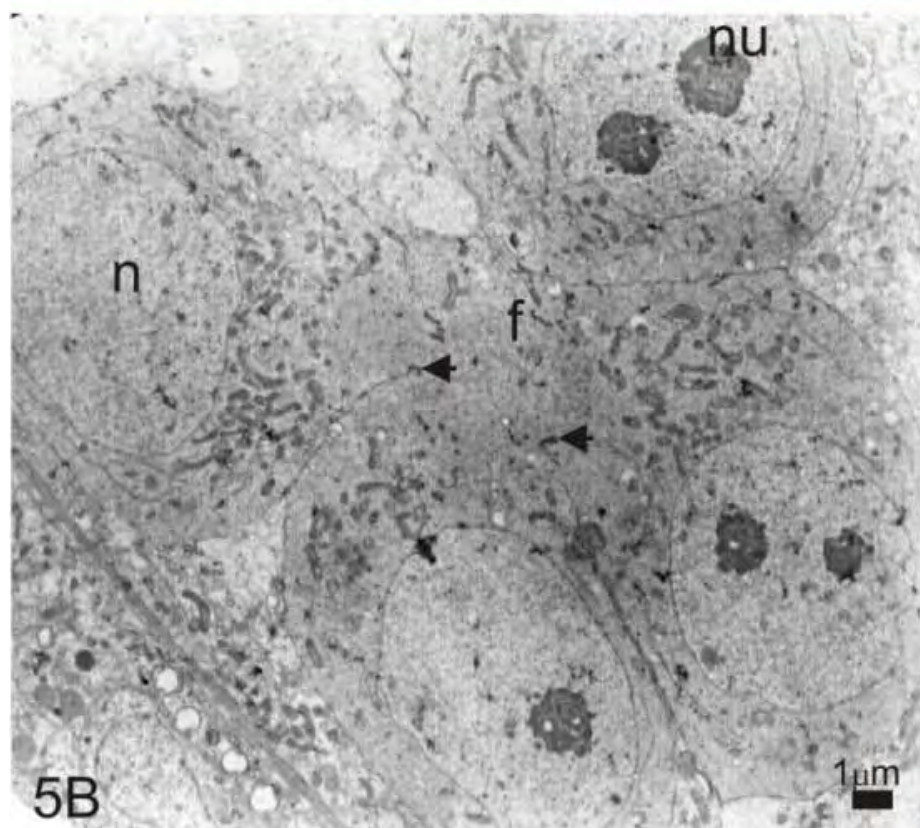
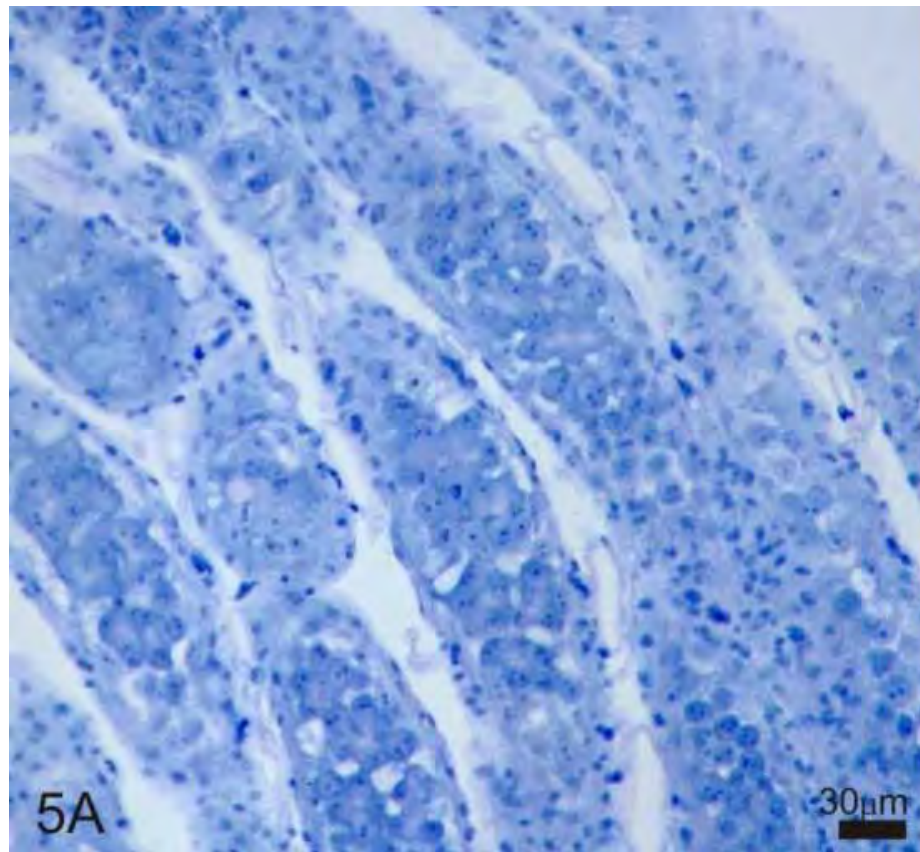


Figura 6- A- MET de Roseta de cistócitos. Notar ainda no fusoma (f) presença de reticulo endoplasmático liso (rl) e ao seu redor complexo de Golgi (g) e mitocôndrias (mt),. B- Detalhe de uma ponte intercelular atentando para os reforços de actina que mantém as pontes intercelulares abertas (ponta seta) e filamentos grossos (seta) atravessando a ponte. n- núcleo, nu- nucléolo.

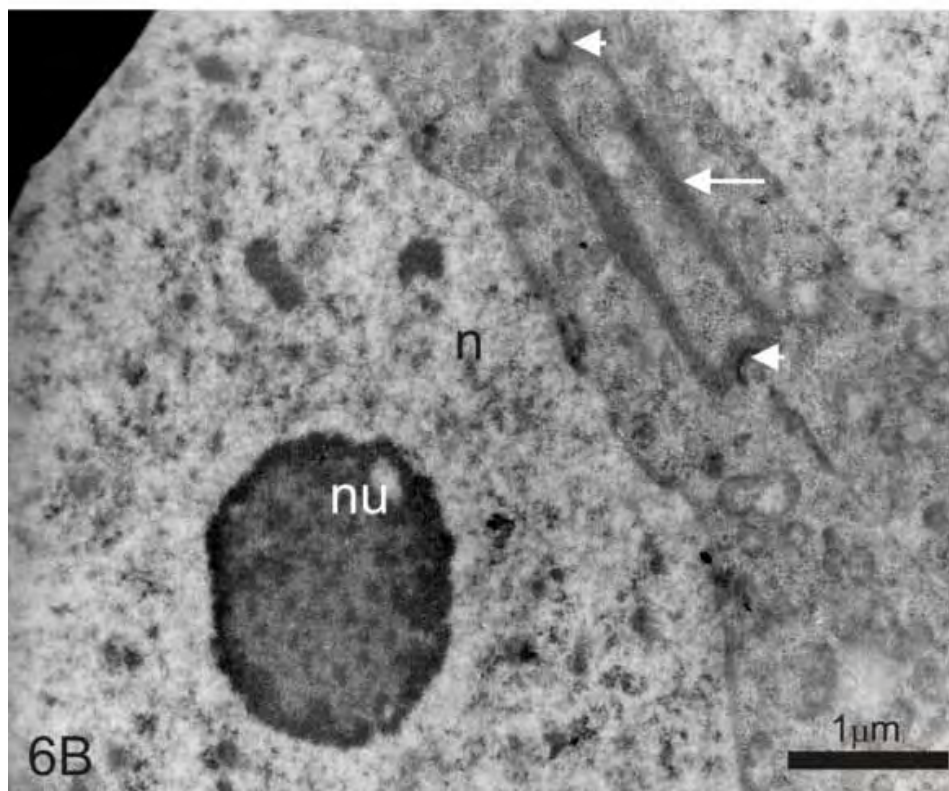
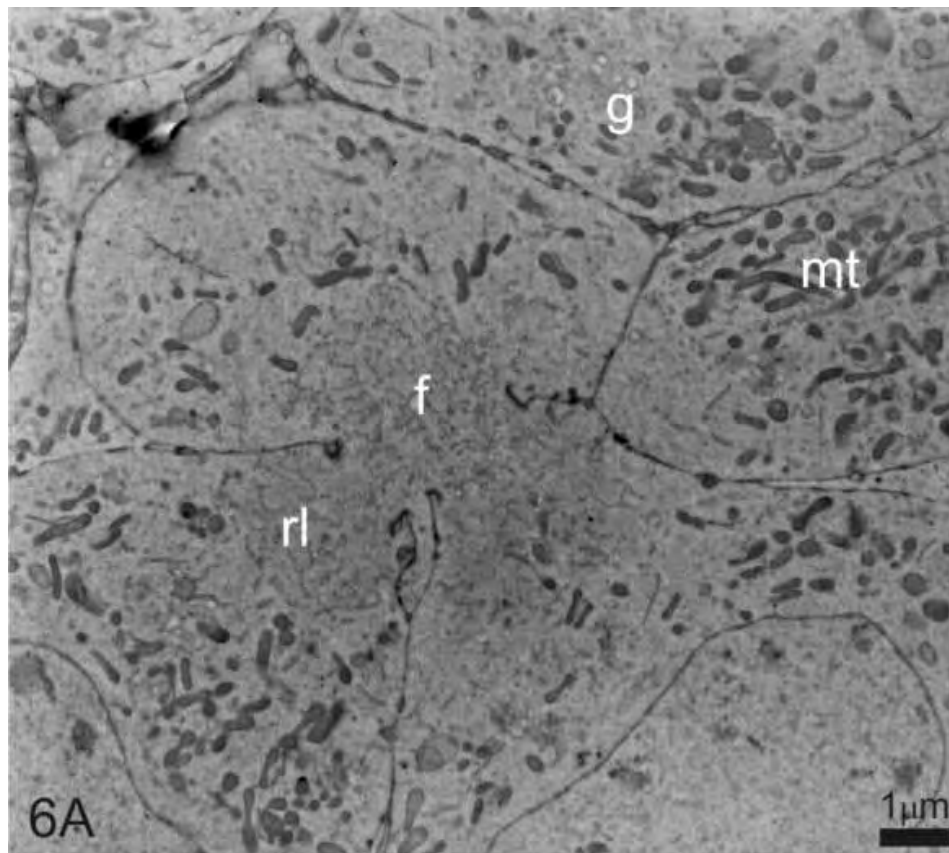


Figura 7- Diferenciação do ovócito entre os cystócitos. A- FM vendo-se os ovócitos (ov) e as futuras células nutridoras (cn) em rainhas com 10 dias. B- MET de ovócito vendo-se complexos sinaptonêmicos (cs) e grãos de RNA (setas) no núcleo (n) e mitocôndrias (mt) no citoplasma. C- Pontes citoplasmáticas (p) entre ovócitos (ov) diferenciado e cystócitos (ci), futuras células nutridoras.

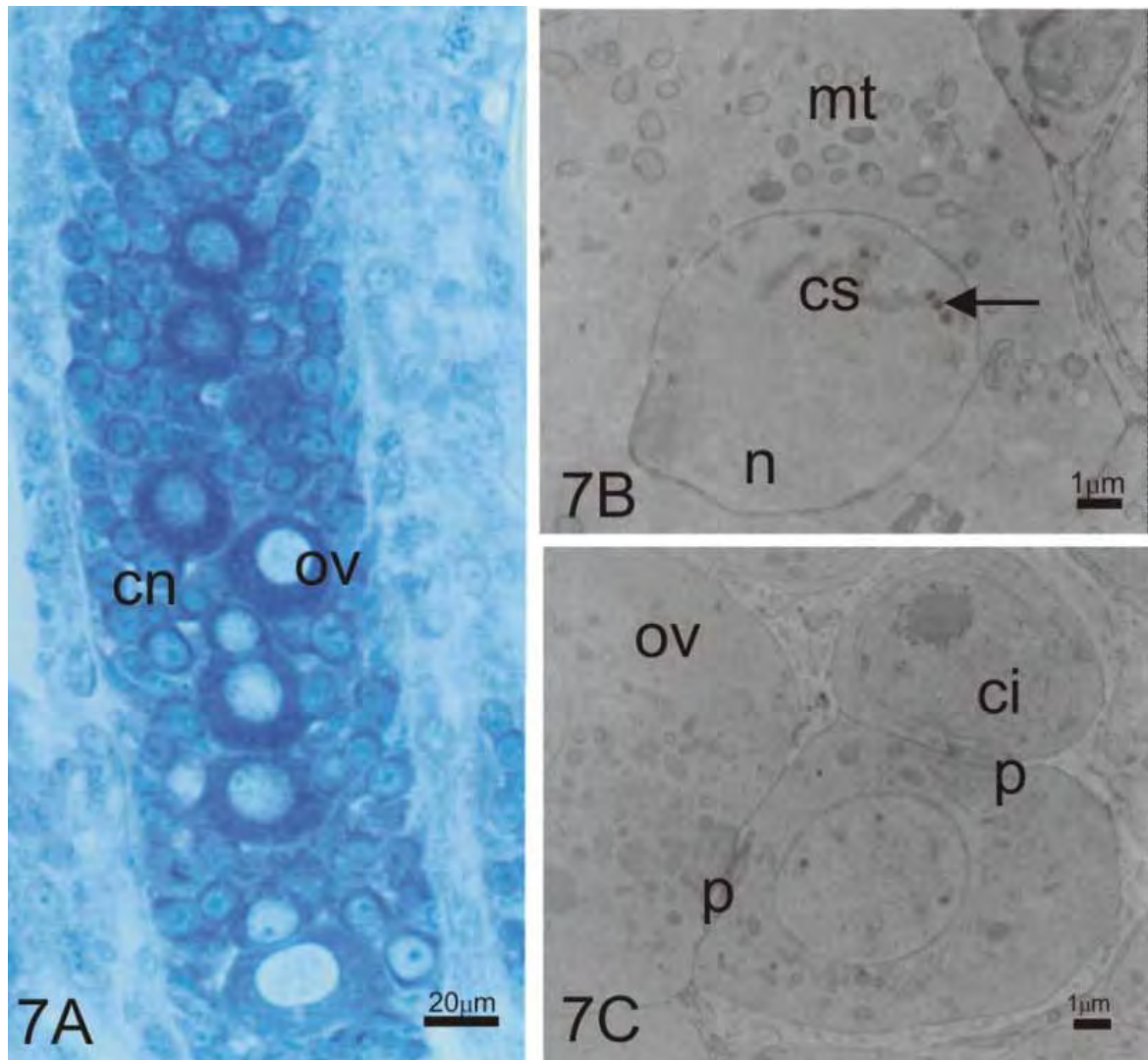


Figura 8- Fotomicrografia de ovários mostrando morte celular (setas). A- rainha com 5 dias. B- rainha com 15 dias, notar o aumento da incidência de morte celular nesta última. tp – túnica própria

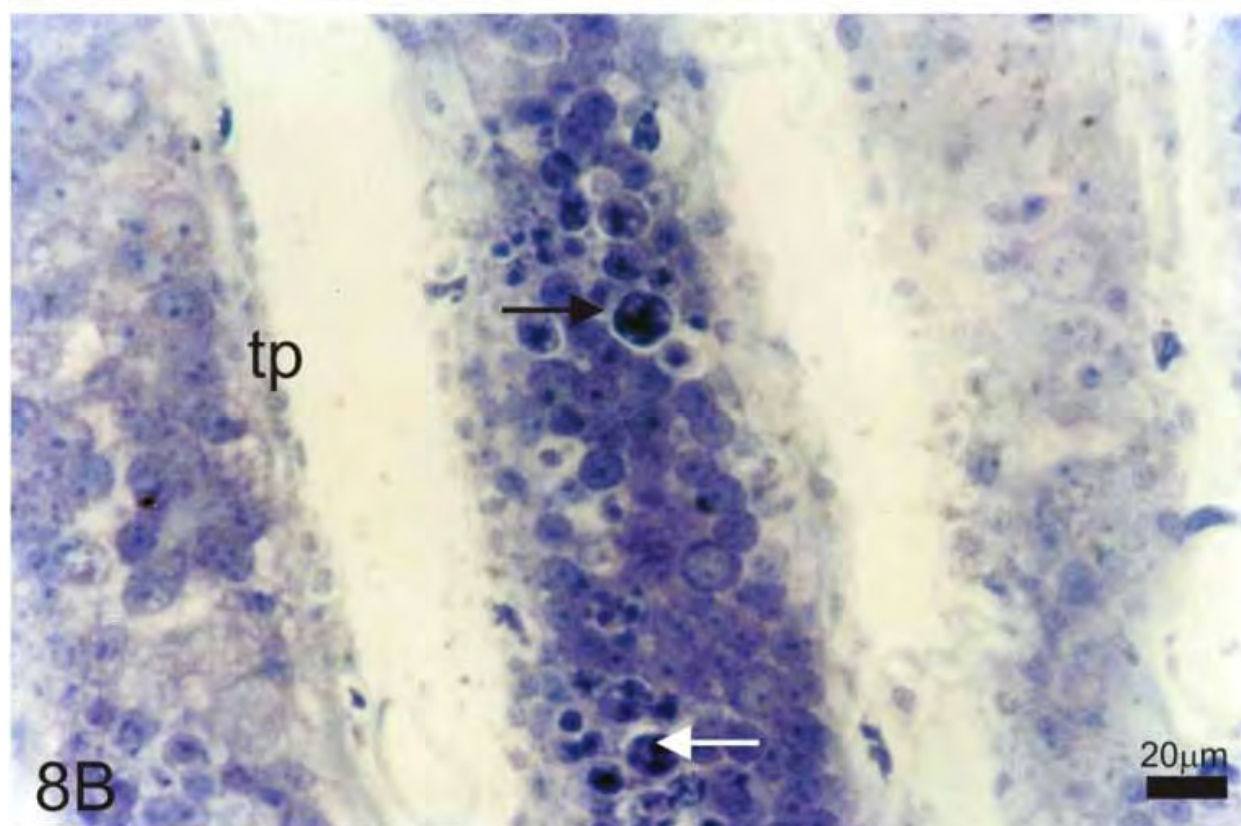
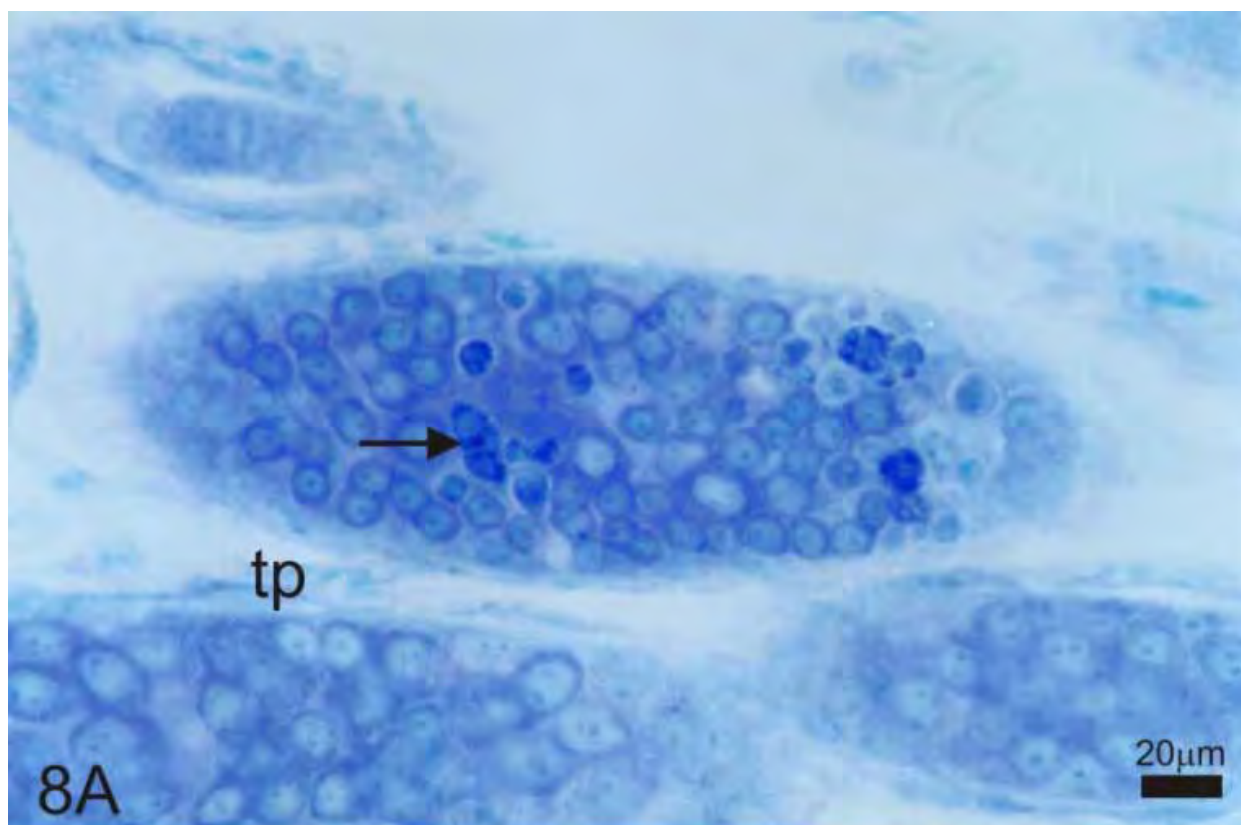


Figura 9- Diferentes aspectos da desorganização celular no citoplasma de células ovarianas vistas em MET. Em A é possível observar a presença figuras mielínicas em vacúolos autofágicos (va) em rainhas com 5 dias. Em B e C ovariíolos de rainhas com 10 dias, observando-se desorganização das membranas do retículo endoplasmático (m). cg- complexo de Golgi, mt- mitocôndria, n- núcleo.

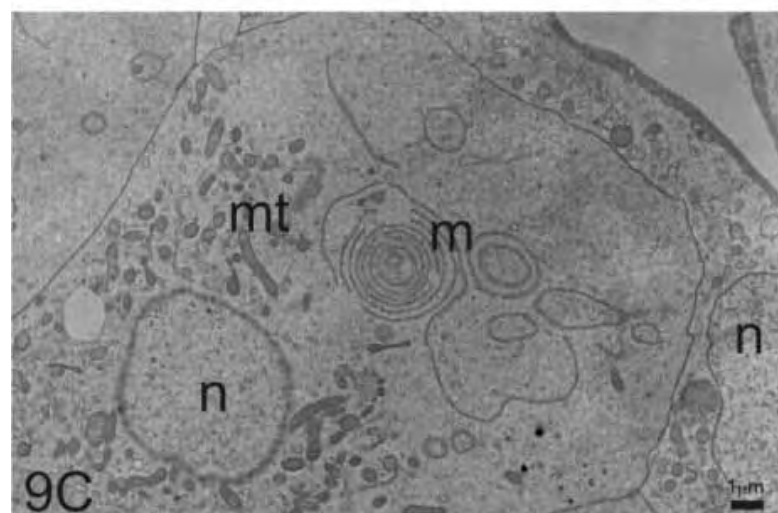
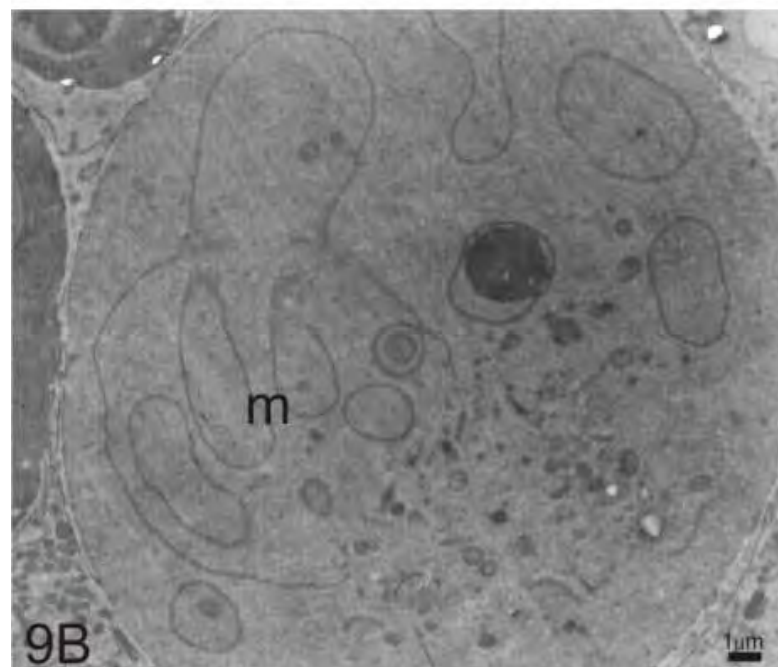
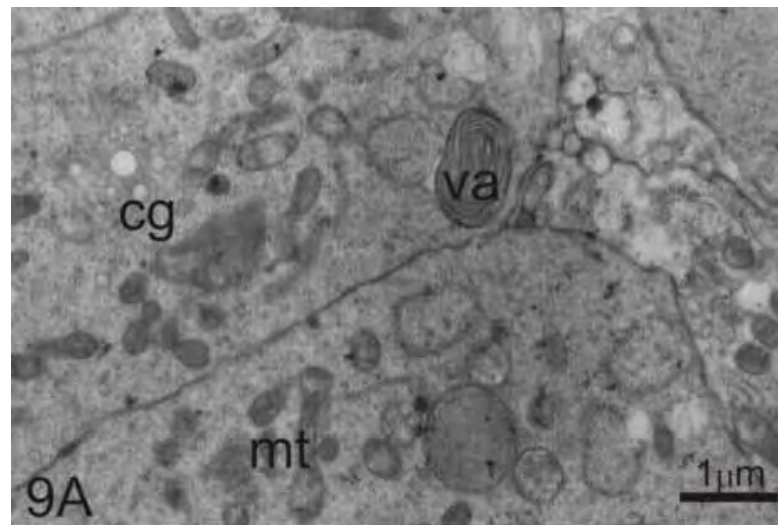


Figura 10- MET mostrando as alterações celulares com condensação e fagocitose por células vizinhas. Em A e C observa-se células germinativas sendo fagocitadas por células do ovário (f). Em B é observado desorganização nuclear com compactação da cromatina (seta). Notar irregularidades no contorno nuclear (ponta de seta). D- Aspecto da desorganização geral do tecido ovariano. n- núcleo, c- citoplasma

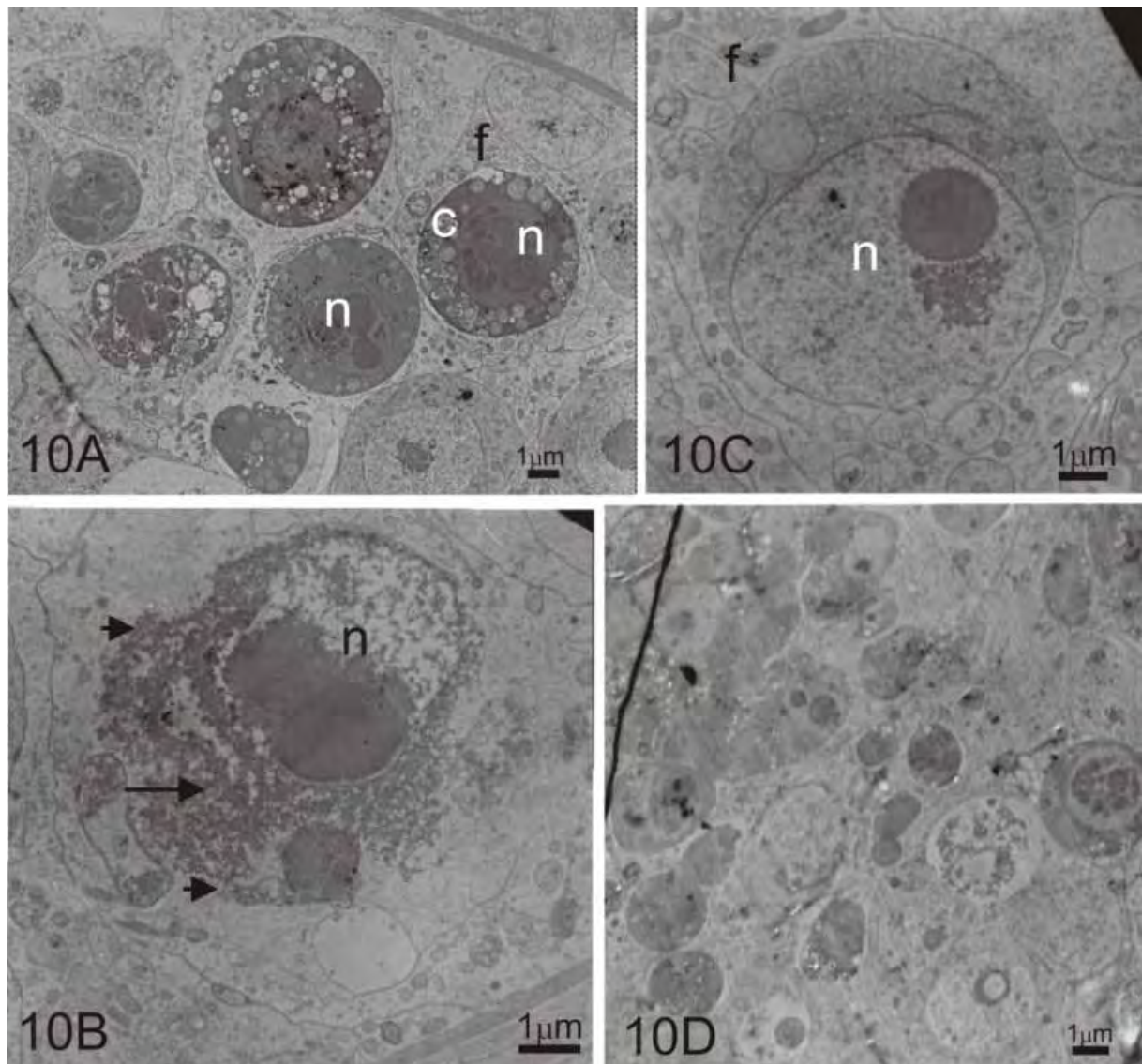


Figura 11: Ovários de rainhas de *A. mellifera* com três dias tratadas com CO₂. A) Vista geral de um ovaríolo mostrando na região basal ovócito (oo) e células nutridoras (cn) já diferenciadas .HE. B) MET de ovócito (oo) recém-diferenciado. C) Ponte (elipse) entre cistócitos (ci). n= núcleo, nu= nucléolo, asterisco= microfilamentos de reforços da ponte, rel= retículo endoplasmático liso, m= mitocôndrias.

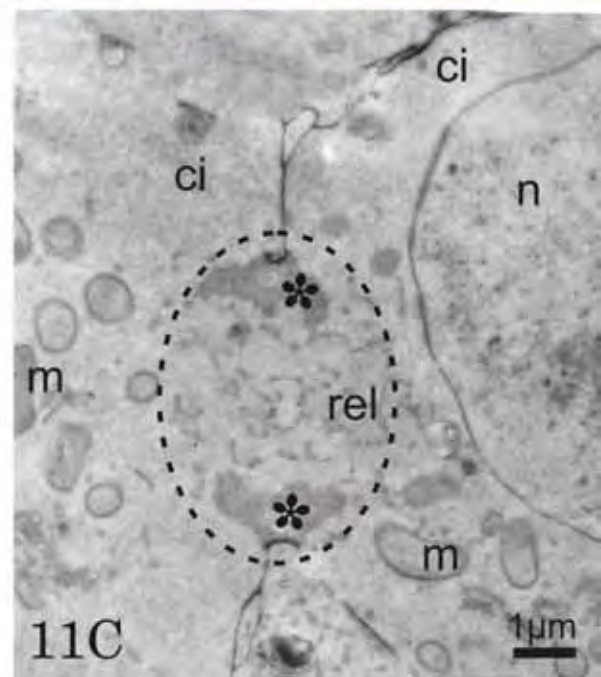
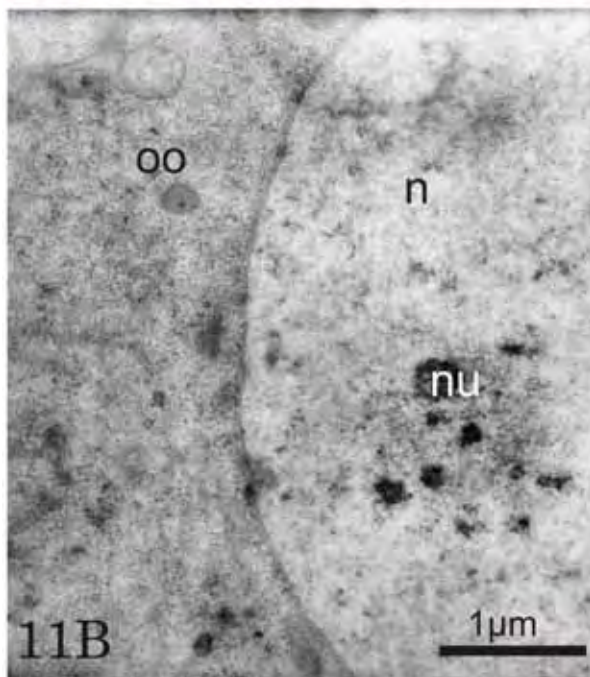
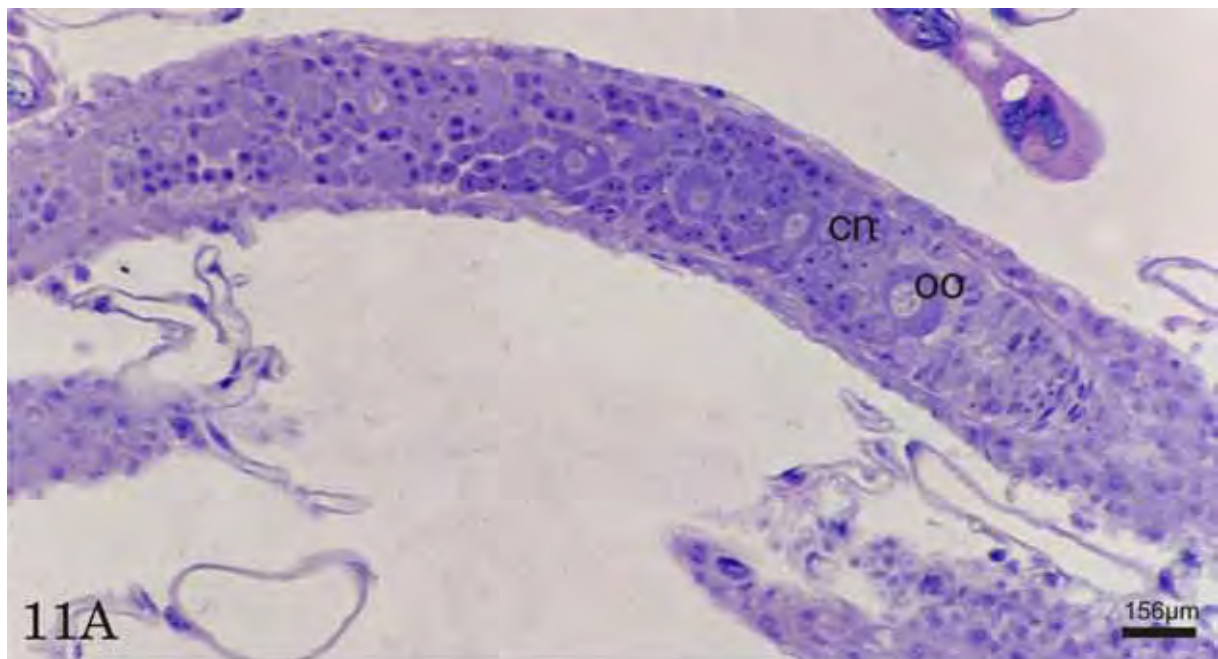


Figura 12: MET de células ovarianas de rainhas com 5 dias tratadas com CO₂. A) Roseta de cistócitos (ci) íntegros, ligados pelo fusoma (f). B) Vacúolos autofágicos (va) no citoplasma dos cistócitos. C) Lamelas anuladas (la) no citoplasma do ovócito. n= núcleo, nu= nucléolo, m= mitocôndrias, reg= retículo endoplasmático granular.

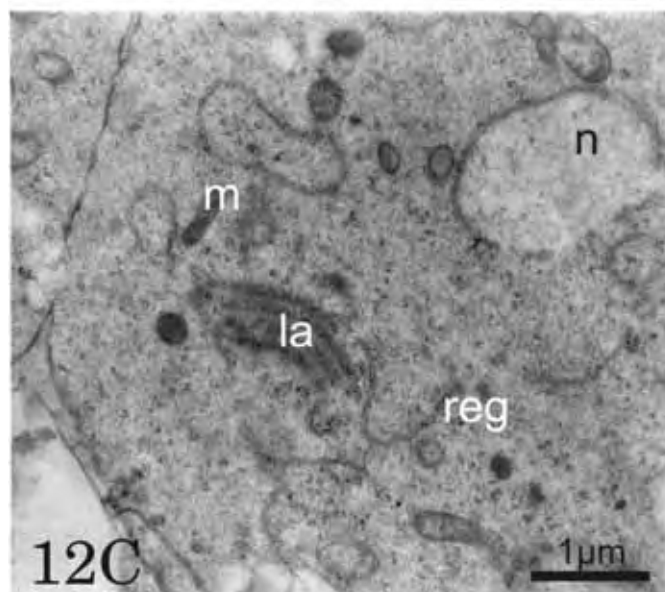
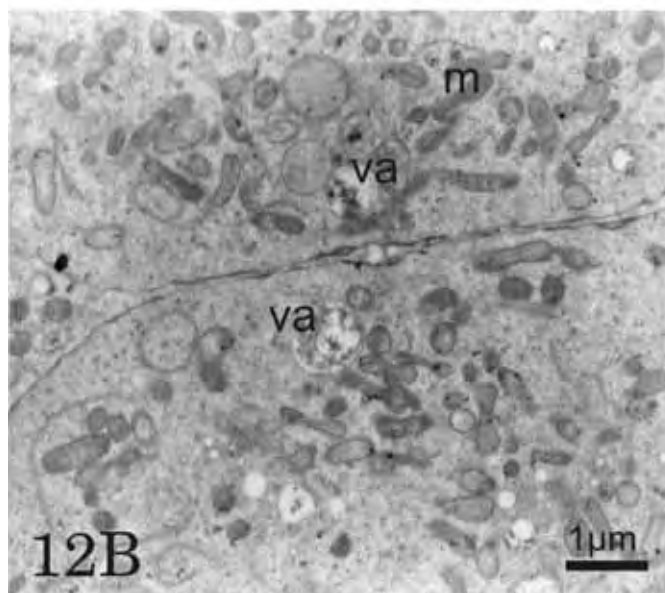
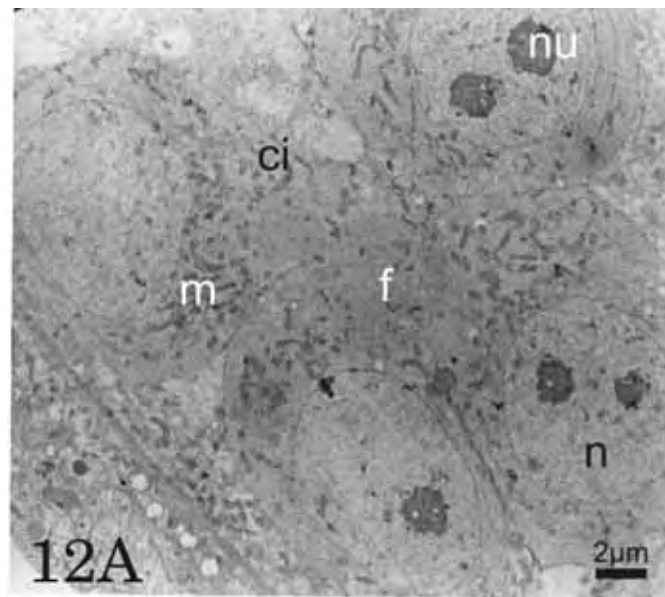


Figura 13: Ovários de rainhas virgens de *A. mellifera* com 10 dias tratadas com CO₂. A) MET de ovócito (OO) e cistócito (CI) íntegros, ligados por pontes (P). B) ML de ovário mostrando poucas regiões desorganizadas nos ovaríolos (setas). Azul de toluidina. cn= células nutridoras, n= núcleo, nu= nucléolo, m= mitocôndrias.

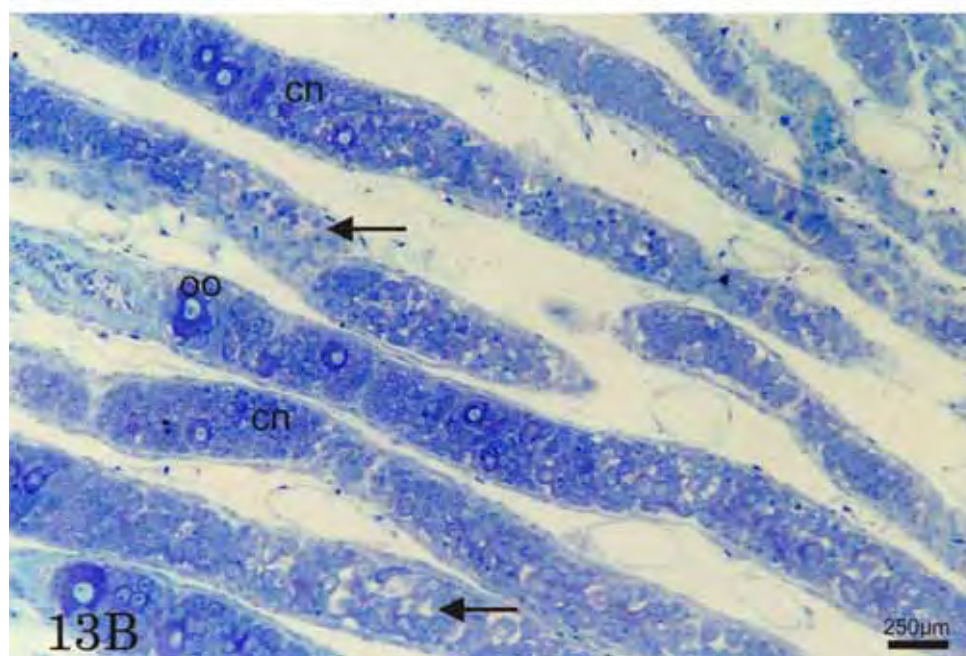
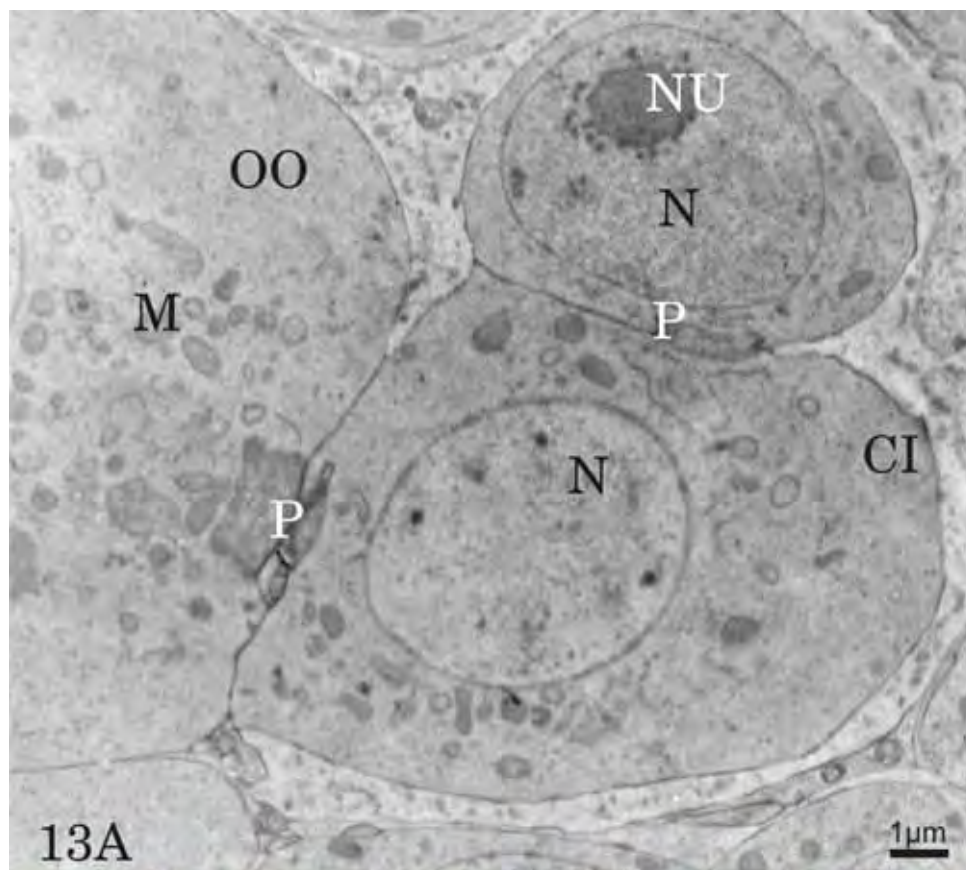


Figura 14: MET de ovários de rainhas virgens com 15 dias tratadas com CO₂. A) células nutridoras (cn) de um folículo recém diferenciado vendo-se os núcleos (n) grandes com cromatina (cr) dispersa e nucléolos (nu) evidentes. Notar o citoplasma rico em mitocôndrias (m) e as células foliculares (cf) ao redor. B) Região do ovário mostrando várias fases de morte celular dos citócitos (setas) juntamente com citócitos (ci) íntegros e desorganização das células somáticas (cs) intersticiais. C) Célula em avançado processo de morte (cm), fagocitada por célula somática (cs). D) Região intacta do ovário. n= núcleo, nu= nucléolo.

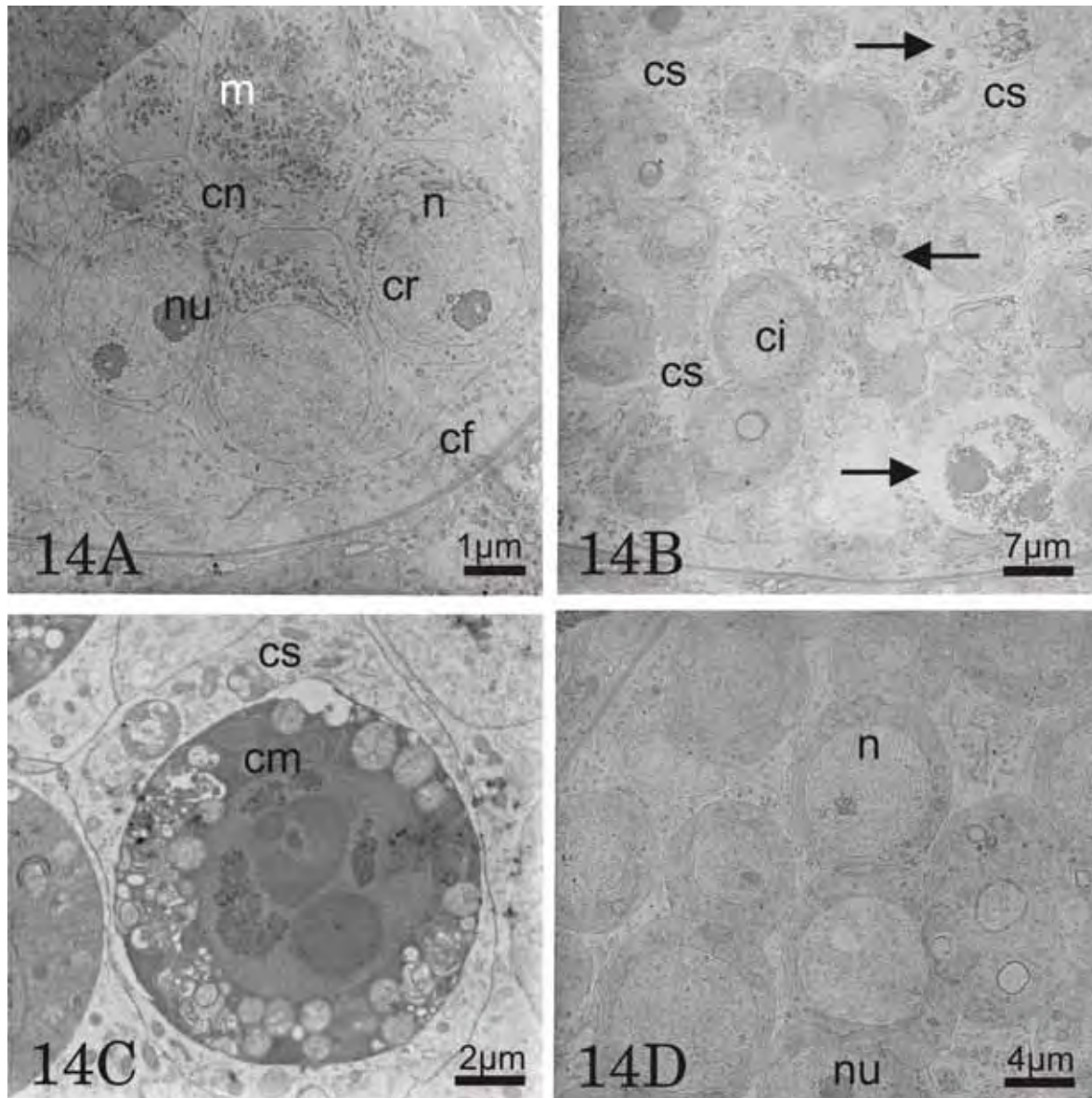


Figura 15: Fotomicrografias de ovários de abelhas virgens preparados para análise de morte celular através da técnica TUNEL, mostrando, em castanho, núcleos de células apoptóticas. A- Ovariolo de rainha de 10 dias de idade. B- Ovariolo de rainha com 15 dias. C- Ovariolo de rainha com 15 dias tratada com CO₂. Notar que os núcleos ocorrem com tendência para agrupamentos intercalados com regiões com células maiores, provavelmente ovócitos já diferenciados.

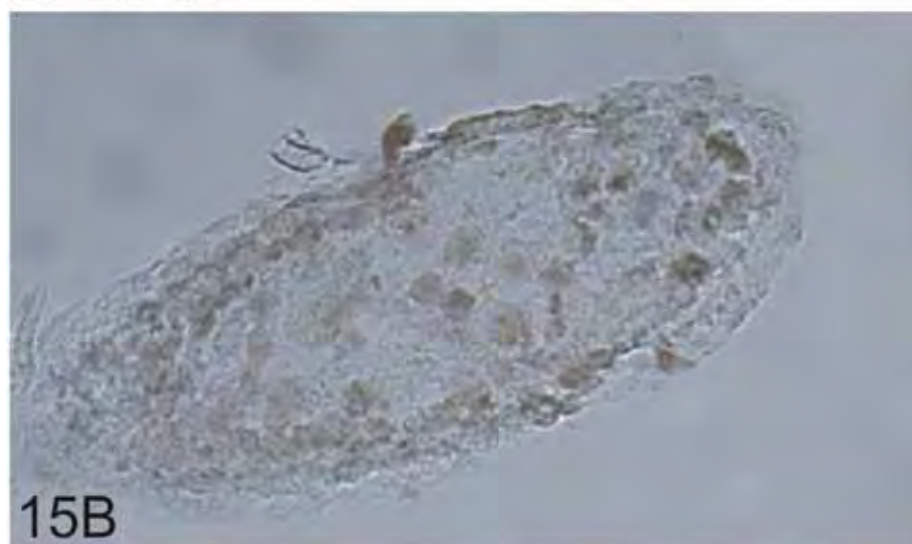
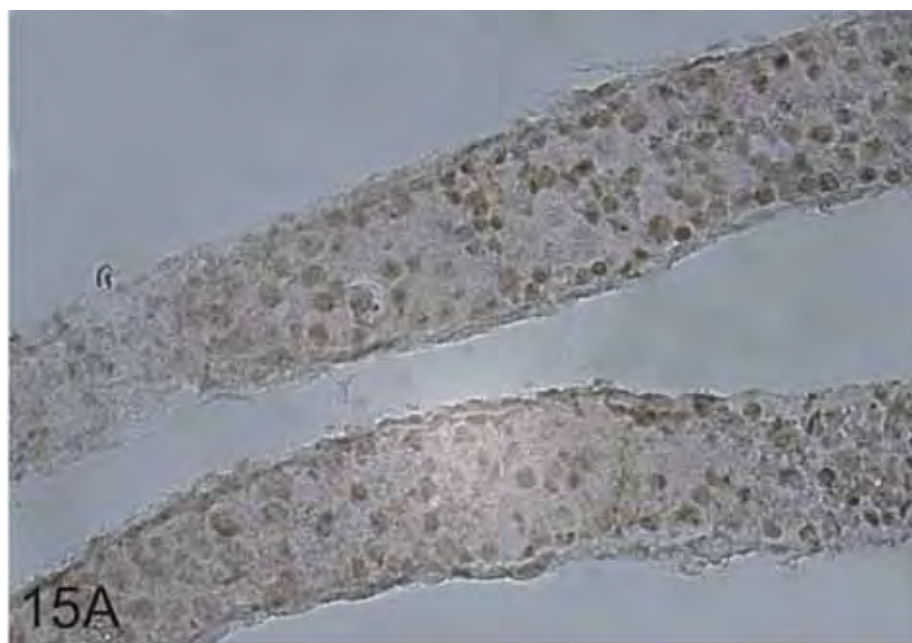


Figura 16: MET de reação para fosfatase ácida em ovários de rainhas com cinco dias. A) Região positiva (setas) nos nucléolos (nu) de cistócitos no grupo controle. p= ponte B) Reação fortemente positiva na cromatina nuclear (n) do grupo experimental. C) Reação positiva (setas) em certas regiões da cromatina (cr), esparsa no citoplasma de cistócito (ci) e na parte interna (*) da túnica própria (tp) do grupo tratado com narcose. oo- ovócito.

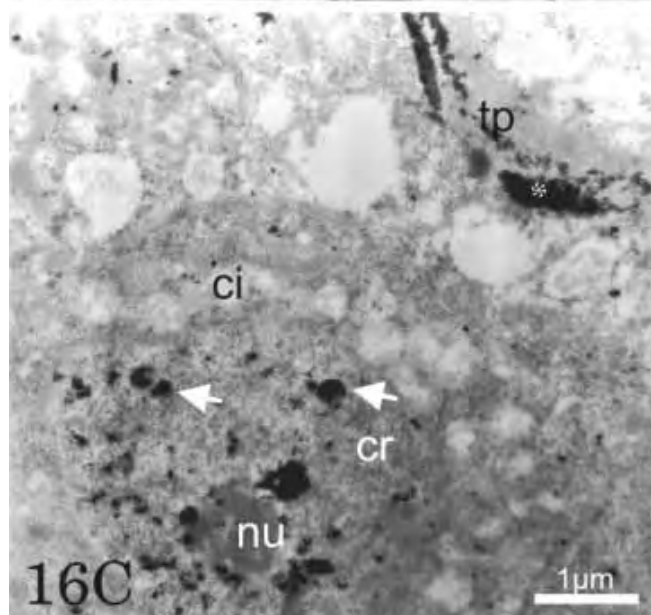
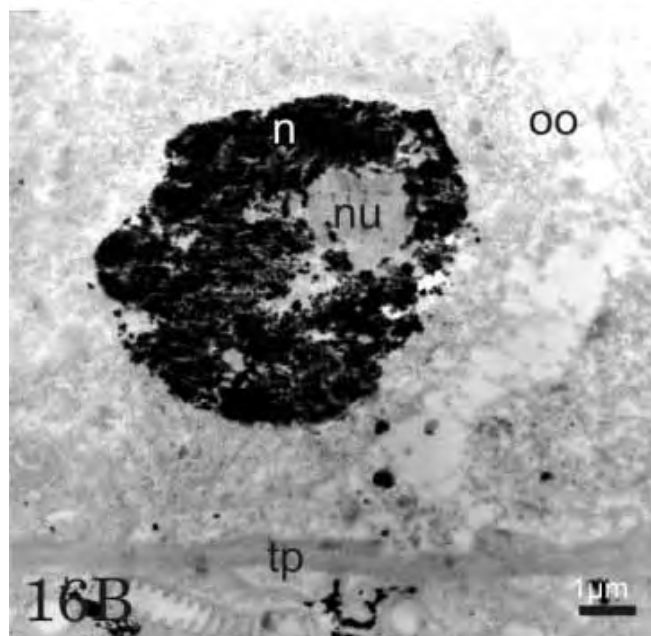
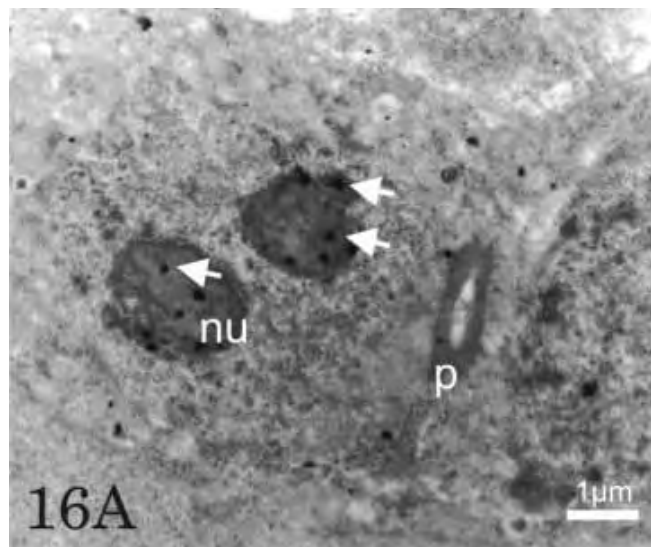


Figura 17: MET da reação para fosfatase ácida em ovários de rainhas virgens com 10 dias. A) Controle mostrando reação positiva intensa (*) na túnica própria (tp), nas células pré-foliculares (setas brancas) e esparsa no citoplasma (setas pretas) de células nutridoras (cn). cpf= células pré-foliculares. B) Região desorganizada do ovaríolo com reação positiva descontínua na túnica própria (tp), na cromatina (cr) nuclear do cistócito (ci) alterado e de célula na membrana peritoneal (mpe). Notar que a reação positiva na túnica própria (tp) se interrompe abruptamente (ponta de setas).C) Região desorganizada do ovaríolo mostrando reação positiva na cromatina de cistócitos (ci) e esparsa no citoplasma (setas).

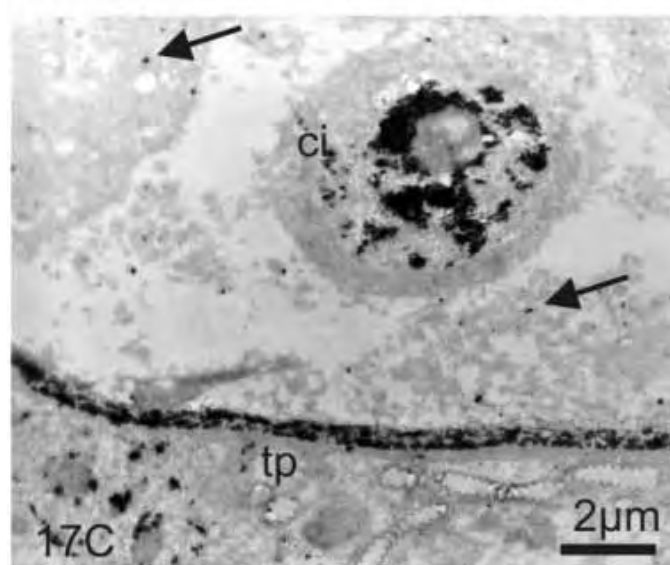
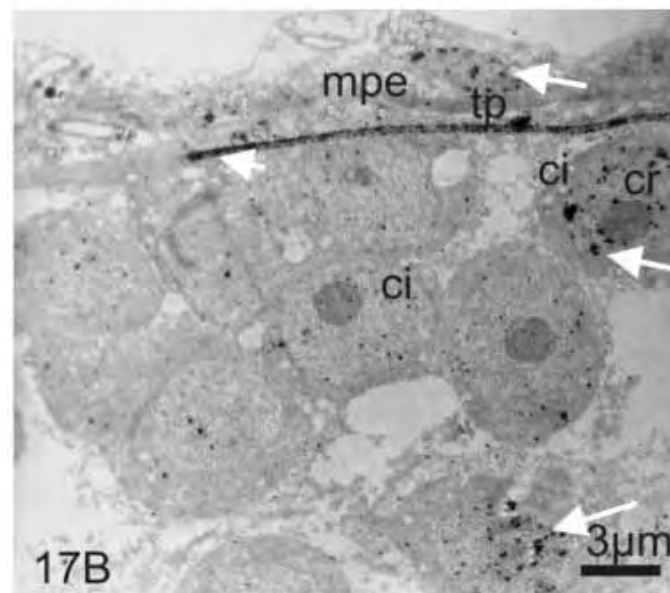
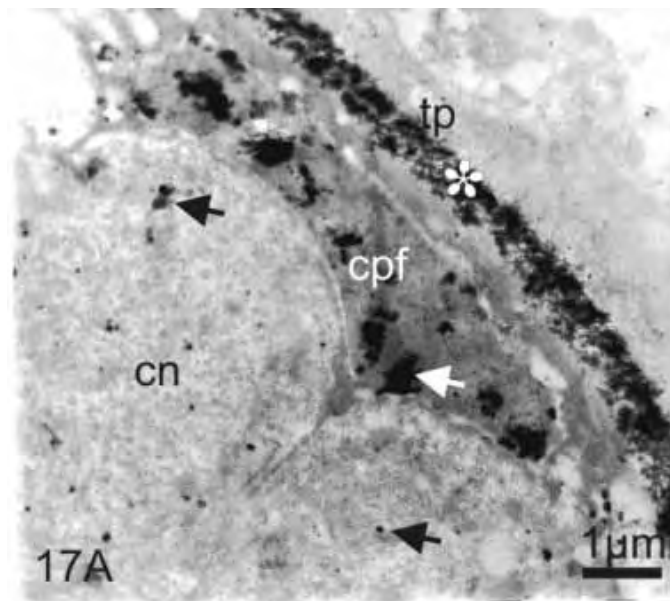


Figura 18: MET de reação para fosfatase em ovários de rainhas virgens com 15 dias. A) e B) mostram rainhas não tratadas indicando reação positiva para fosfatase (setas) em células em processo de morte (A) e na cromatina de cistócitos íntegros (ci). C) e D) Células de ovários de rainhas narcotizadas mostrando em C reação positiva na cromatina (setas) e na túnica própria (tp) e em D em alguns pontos do citoplasma (setas brancas). n- núcleo, nu- nucléolo.

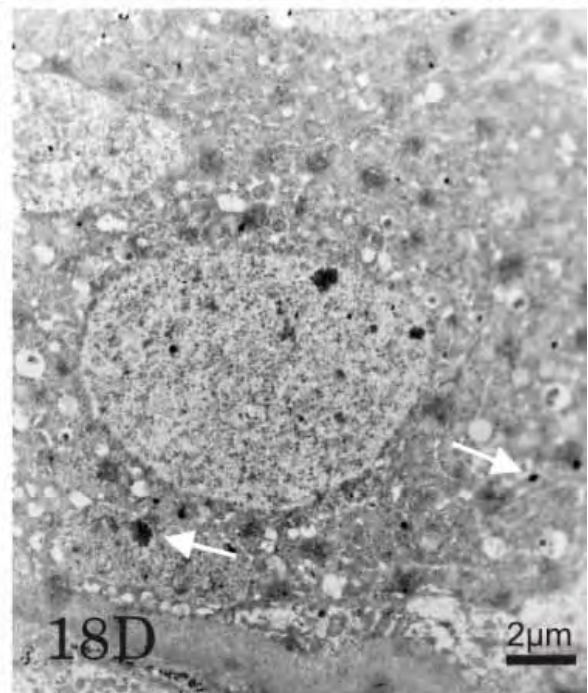
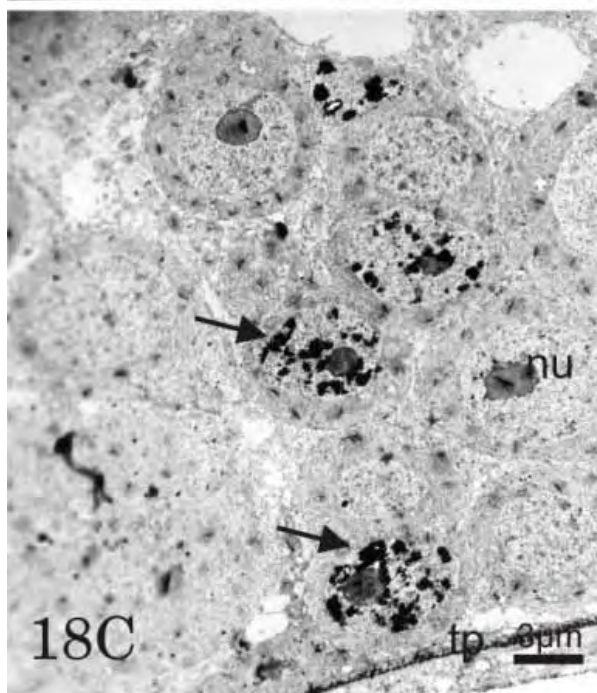
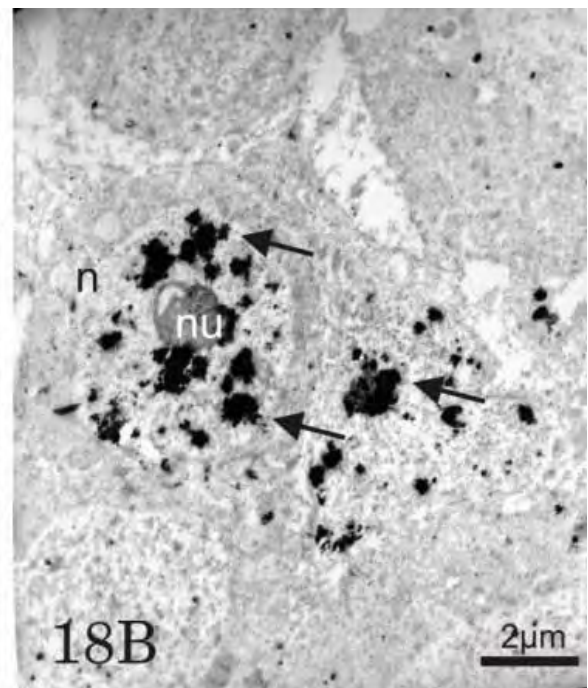
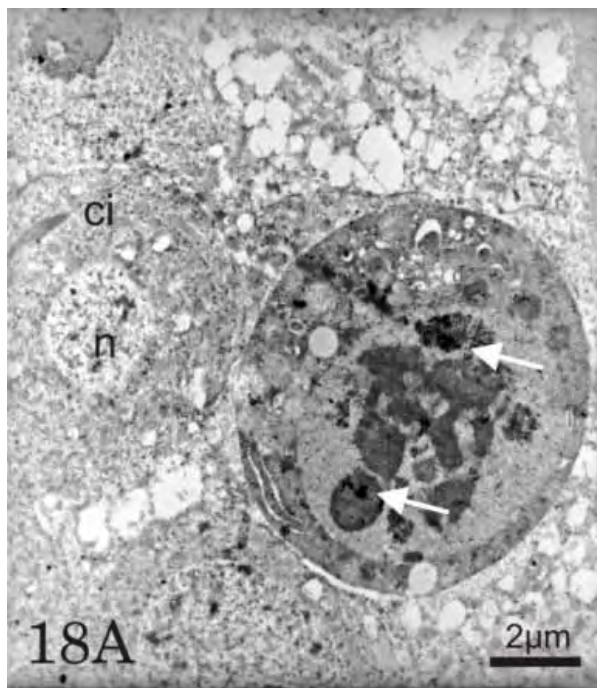
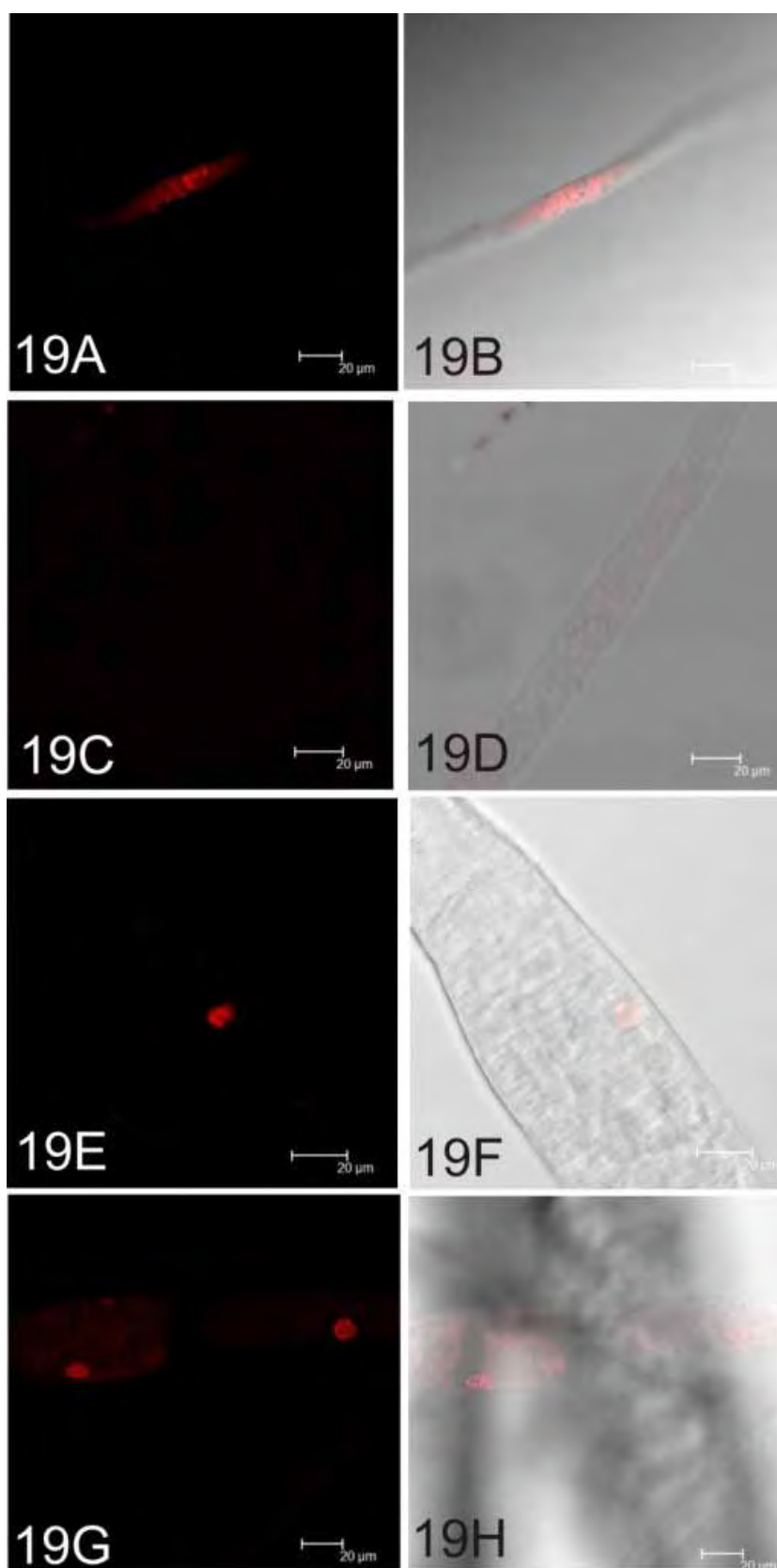


Figura 19: Fotomicrografias de ovários de rainhas preparados para análise de divisão celular através da Imunomarcagem da histona H3-fosforilada. Nas figuras A, C, E e G. Observa-se marcação para Histona H3-fosforilada sob a forma de núcleos corados em vermelho. Em B, D, F e H mostra-se sobreposição das imagens citadas anteriormente sobre micrografias de contraste de fase para localização das regiões onde do ovário onde ocorreu a marcação. A e B- Filamento terminal de rainha recém emergida. C e D- Ovários de rainhas de cinco dias mostrando ausência de marcação no germário. E e F, Germário de rainha com 10 dias de idade. G e H- Germário de rainha com 10 dias de idade tratadas com CO₂.



4.5. Desenvolvimento dos Ovários de Operárias Mantidas Fora da Colônia

4.5.1. Organização geral dos ovários das operárias

As operárias recém-emergidas foram mantidas em caixas pequenas contendo uma rainha virgem, candy e água. Durante todo o tempo do experimento não se verificou o desenvolvimento que, em condições normais na colônia, se observa no ovário das operárias. No entanto como os experimentos foram realizados em condições padronizadas, o desenvolvimento dos ovários no grupo não submetido ao tratamento com CO₂ foi tido como padrão para comparação com o tratado.

Ao contrário das rainhas, as operárias possuem ovários com número reduzido de ovariólos, mas o padrão organizacional é o mesmo em ambas as castas. No presente caso, em que os ovários se mantiveram sem se desenvolver os ovariólos, encontravam-se envolvidos por uma densa rede de traquéias e por corpo gorduroso. Devido a isso e por possuírem um número muito reduzido de ovariólos, é difícil dissecar os ovários de operárias nesta fase de desenvolvimento.

Nas operárias de *A. mellifera* os ovariólos apresentam-se diferenciados longitudinalmente da base para o ápice em germário e filamento terminal.

4.5.2. Filamento Terminal

Assim como em rainhas o filamento terminal de operárias consiste de uma continuação da membrana peritoneal contendo células de secção quadrada a retangular, em corte longitudinal do ovariolo, formando pilhas de uma única célula na extremidade mais distal (FIG. 20) e na transição para o germário filas duplas de células com base alargada e afilando-se para o centro do filamento. Na região proximal do filamento terminal, na transição para o germário, em corte transversal, as células se dispõem de forma radial apoiadas sobre a túnica própria tendendo a formar uma luz central.

O tamanho do filamento terminal de operárias, quando comparado ao de rainhas é menor e parece manter tamanho estável durante todo o desenvolvimento ovariano das operárias, diferentemente do que ocorre em rainhas onde o tamanho do filamento terminal decresce à medida que as rainhas avançam em idade.

As células do filamento terminal apresentam-se pobres em retículo endoplasmático, mas bastante ricas em mitocôndrias, apresentando um grande núcleo central com um ou dois nucléolos (FIG. 20).

4.5.3. Germário

Embora em alguns ovários tenha sido possível observar início de diferenciação do ovócito no germário já em operárias recém-emergidas, com a presença de dois conjuntos simétricos bilaterais de cistócitos a ele ligados (FIG. 21A), na maior parte as operárias apresentaram nos ovários o germário, constituído basicamente de cistos em que o ovócito ainda é indistinto (FIG. 21B). A organização dos cistos é basicamente a mesma descrita para as rainhas, mas na fase de roseta o fusoma apresenta-se com a região central aparentemente reduzida, devido a uma maior compressão dos cistócitos no interior do cisto (FIG. 21D).

Aos cinco dias de idade, os ovários das operárias controle permaneceram com um longo germário, porém no seu interior houve um aumento no número de células germinativas em diferenciação representado por um aumento das rosetas de cistócitos e abundância de ovócitos já diferenciados. Os ovócitos apresentam-se como células de tamanho maior que as restantes do cisto com um grande núcleo central com cromatina dispersa, e no citoplasma presença de poucas organelas agrupadas em pequenas regiões do citossol (FIG. 21C).

Com 10 dias após emergência, as operárias controle apresentam longos ovários com diferentes níveis de desenvolvimento. Alguns com muitas rosetas de cistócitos (FIG. 22A) enquanto em outros grande incidência de morte celular e de desorganização tecidual (FIG. 22B). Foi só a partir dos 10 dias de idade que se observou a presença de células em processo de morte no interior do germário.

Quando atingem 15 dias de idade, as operárias controle apresentam ovários em degeneração completamente desorganizados sendo possível observar um alto número de células com núcleos picnóticos. Em alguns casos o grau de degeneração é tamanho que só é possível observar a membrana peritoneal (FIG. 22C). Nesta mesma idade, nas regiões intactas dos ovários é possível observar o início de formação de folículos com o surgimento de traves transversais dividindo a câmara ovocítica da nutridora, ou seja, o início da diferenciação do vitelário (FIG. 22D).

As células que se apresentam no processo de morte celular possuem características bem marcantes de apoptose. São observadas nítidas alterações celulares como compactação da

cromatina e irregularidade no contorno nuclear (FIG. 23A). No citoplasma ocorre condensação do seu conteúdo e surgimento de sinais de digestão celular (FIG. 23 A, B).

Em relação ao núcleo, é possível observar a formação de vacúolos no nucleoplasma (FIG 24A), e alças no envoltório nuclear através da dissociação das membranas internas e externas do envelope nuclear, conhecidas como “blebs” ou bolhas (FIG 24B).

4.6. Efeito do CO₂ no Desenvolvimento Ovariano de Operárias

As operárias que foram submetidas à atmosfera de CO₂ logo após a sua emergência e no terceiro dia, tiveram seus ovários analisados no quinto dia; para as tratadas no 1º, 3º, e 5º dias, no 10º dia, e as tratadas no 1º, 3º, 5º e 10º dia, no 15º dia após a emergência do indivíduo.

As operárias que foram submetidas ao tratamento com CO₂ analisadas aos cinco dias de idade apresentaram longos ovariíolos com germários bem desenvolvidos, porém sem a formação de rosetas ou pouca diferenciação das células germinativas (FIG. 25). Em relação ao grupo não tratado da mesma idade, os ovariíolos parecem estar menos diferenciados, visto que nesta idade, no controle já é possível observar a presença de rosetas de cystócitos.

Aos 15 dias de idade, os ovários das operárias apresentaram ovariíolos em diferentes estágios de conservação. Em algumas regiões verifica-se um tecido bem conservado embora com pouca ou nenhuma diferenciação (FIG. 26A, B), outras partes apresentam-se completamente desorganizados com uma grande quantidade de células edemaciadas, em processo de morte celular, e tecido vacuolizado, tornando-se difícil identificar os tipos celulares (FIG. 26C, D). De um modo geral o CO₂, assim como em rainhas, parece alterar a quantidade de mitocôndrias no citoplasma das células do germário das operárias (FIG. 27 A). Além do aumento no número de mitocôndrias, as operárias tratadas possuem organelas como o complexo de Golgi (FIG. 27 A, C) de melhor visualização e desorganização das membranas do retículo (FIG. 27B). Os processos de morte celular também são verificados em células foliculares (FIG. 27D).

Figura 20- Micrografia de filamento terminal de operária controle com 5 dias de idade mostrando a organização das células empilhadas formando uma fileira única. mt - mitocôndria, n- núcleo, nu- nucléolo, mp- membrana peritoneal, tp- túnica própria.

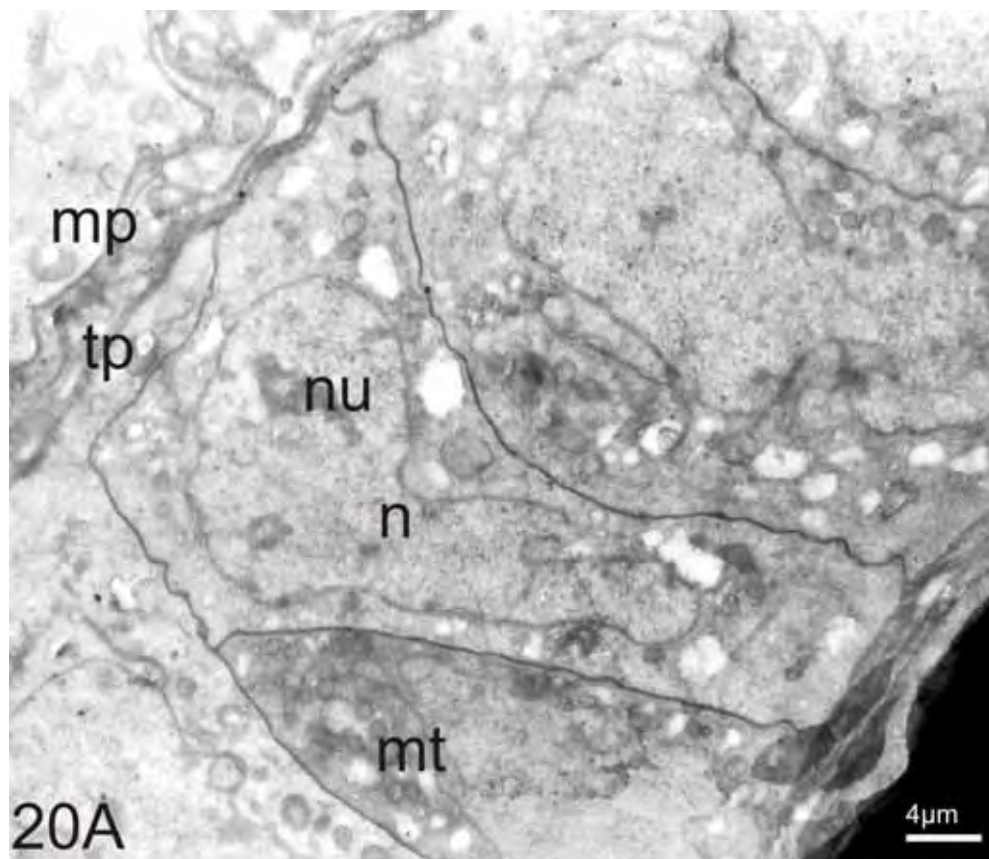


Figura 21- A e B Micrografia de ovário de operária recém-emergida corado com azul de toluidina, mostrando em A diferentes níveis de diferenciação dos ovaríolos. Em B observam-se células indiferenciadas. mp- membrana peritoneal, cn- células pré-nutridoras, ov- ovócito, ci- células indiferenciadas, tr- traquéia. C e D micrografias eletrônicas de transmissão de operárias de 5 dias mostrando em C a região do fusoma e em D ovócito com grande núcleo (n) e poucas organelas concentradas em pequena região do citoplasma. mt- mitocôndrias, n- núcleo, nu- nucléolo

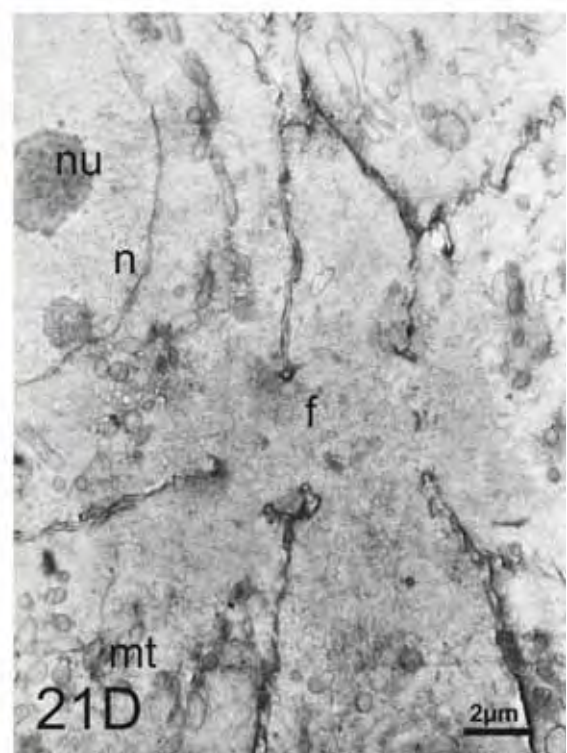
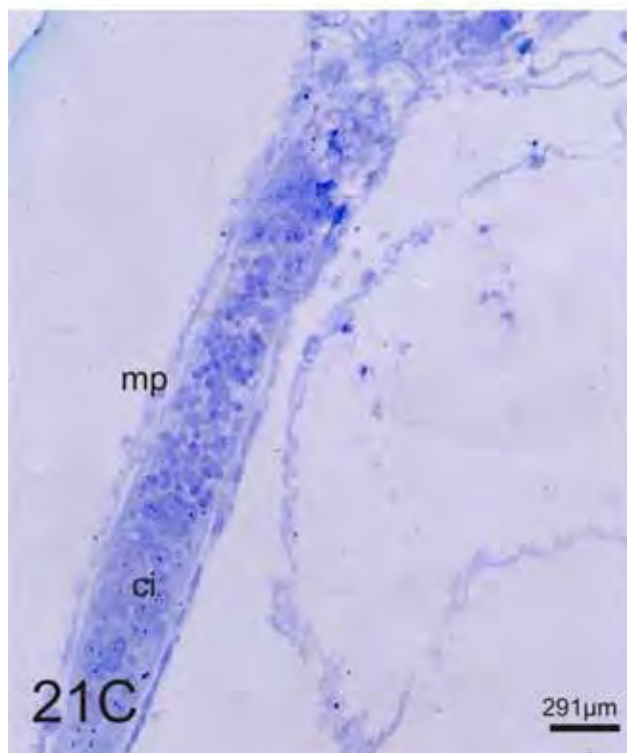
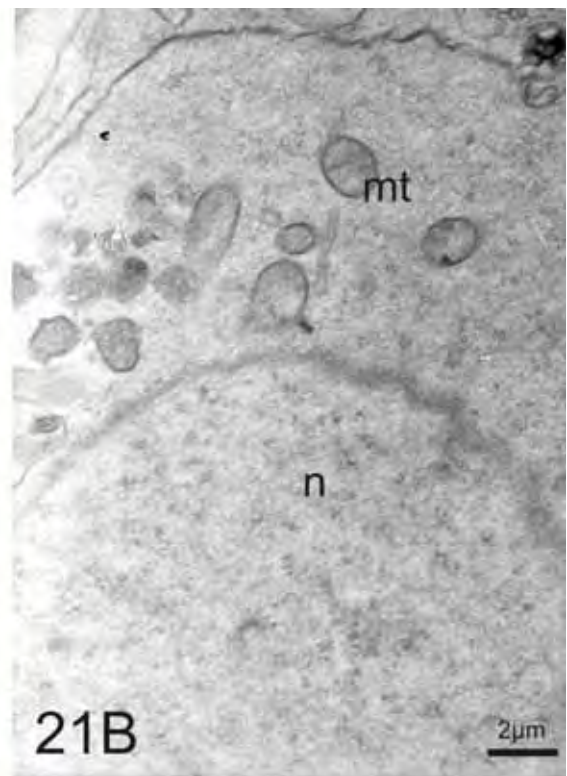
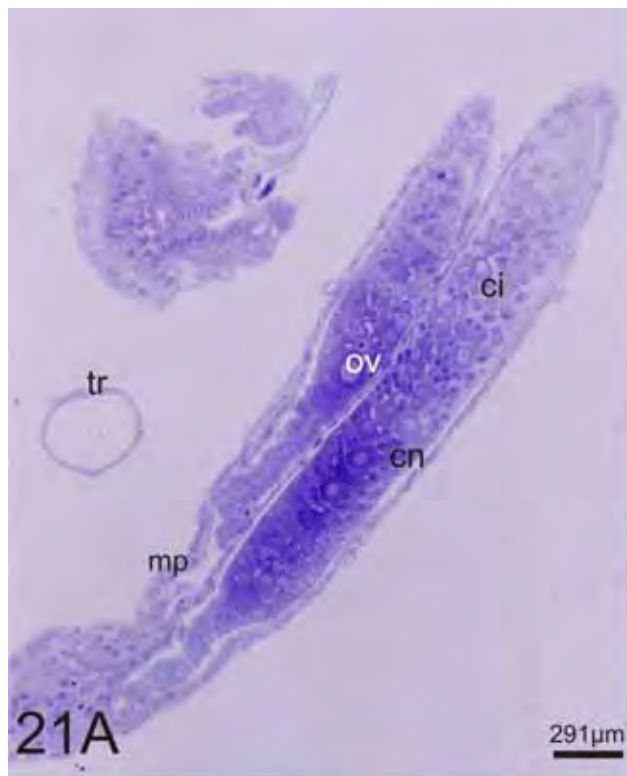


Figura 22- A e B Micrografias de ovários de operárias mostrando diferentes graus de degeneração ovarial. Em A, observam-se ovários bem conservados enquanto que em B verifica-se completa desorganização ovarial. ov- ovócito, cn- célula nutridora, mp- membrana peritoneal, asterisco – degeneração do tecido. C- ovário de operária de 15 dias completamente desorganizado. D- Ovário de operária de 15 dias mostrando diferenciação de câmara nutridora (cn) e ovocítica (ov) e formação de traves transversais entre elas. tp- túnica própria.

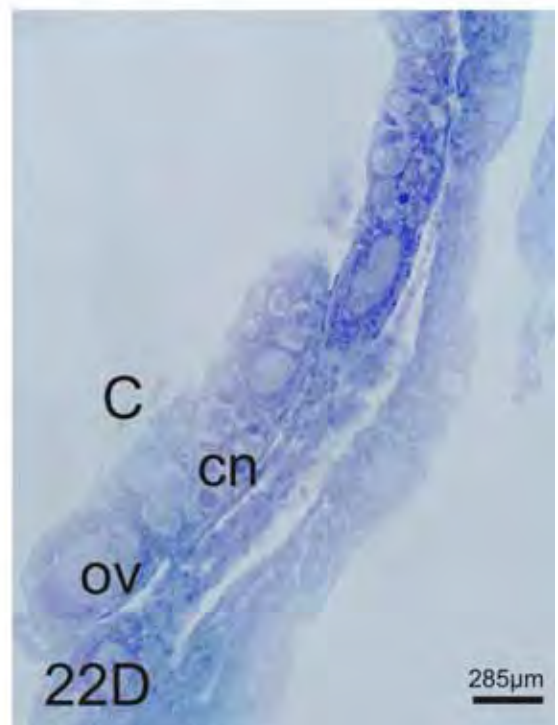
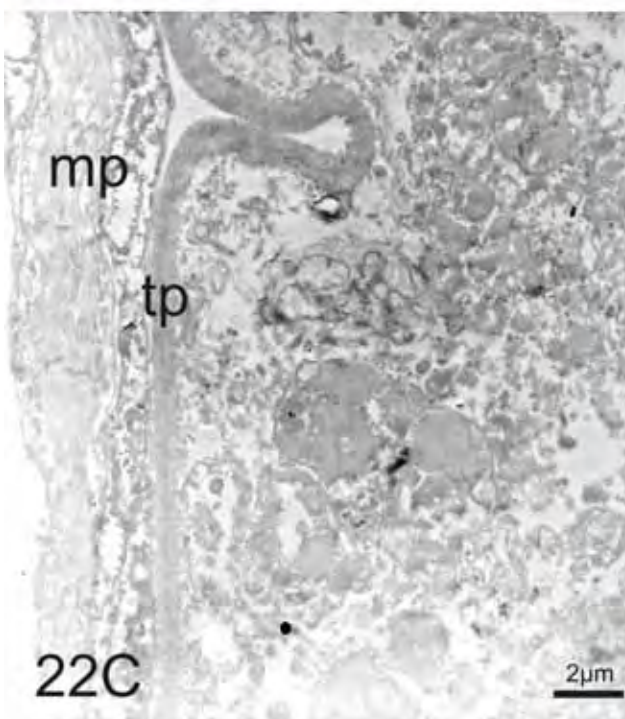
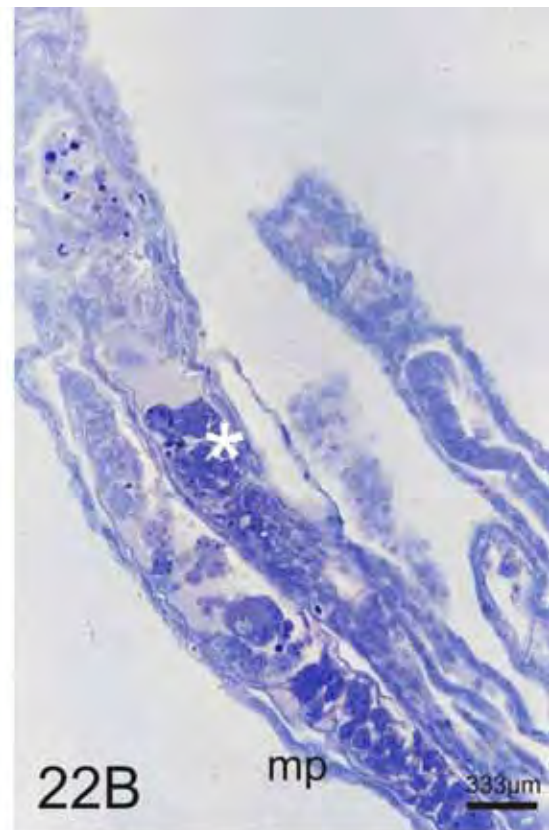
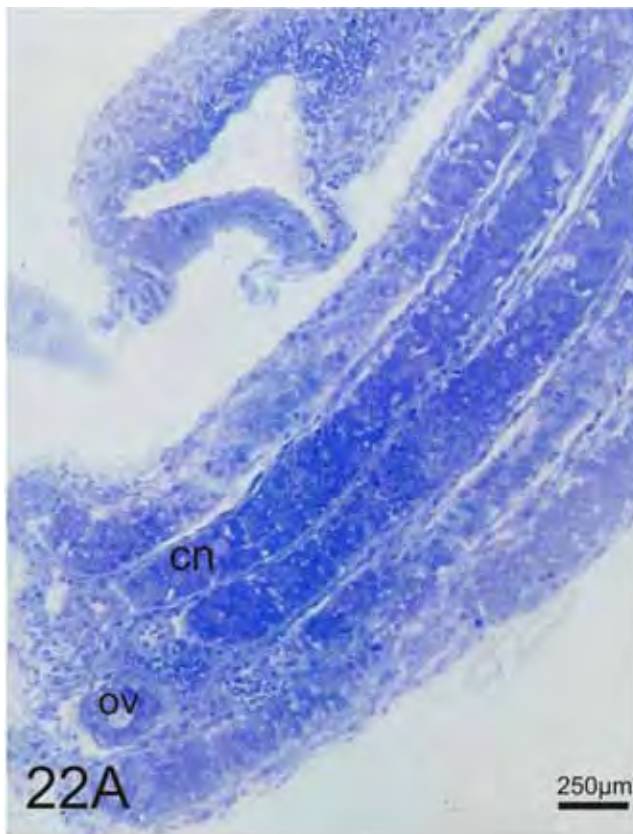


Figura 23 Micrografias mostrando diferentes aspectos de morte celular. Em A observa-se compactação da cromatina e desorganização do citoplasma. tp- túnica própria, mp- membrana peritoneal. B e C- Compactação do citoplasma e célula injuriada sendo fagocitada por célula vizinha.

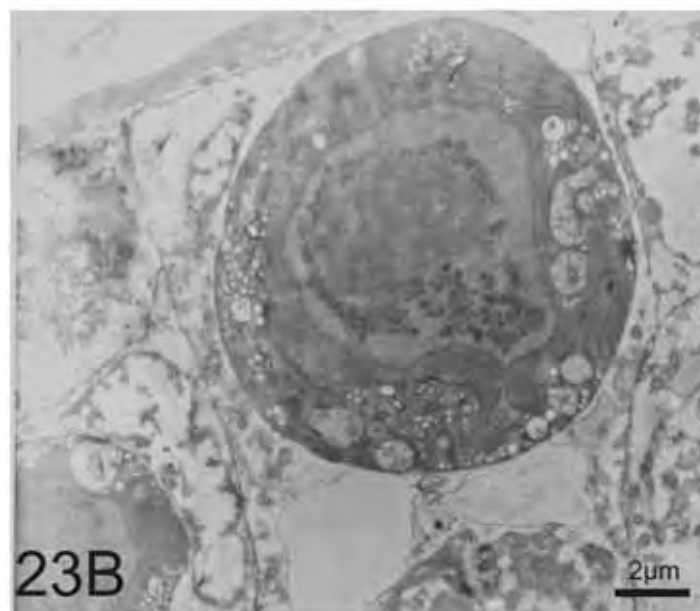
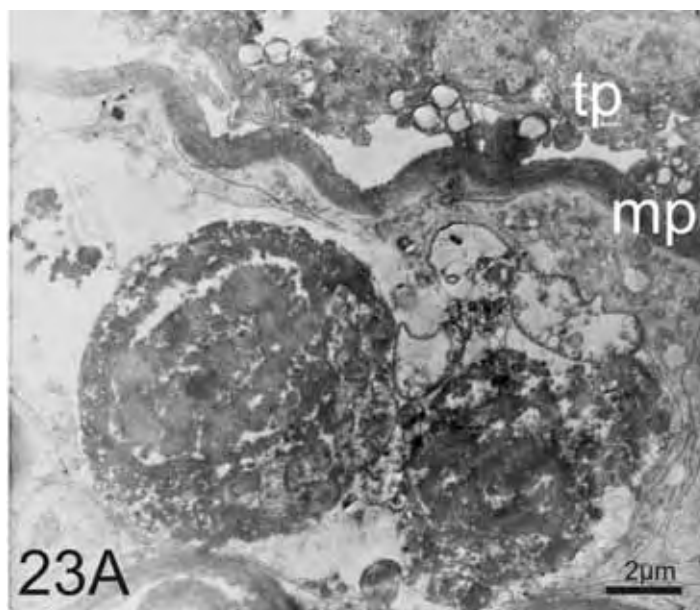


Figura 24 Micrografias de transmissão. Em A observa-se o surgimento de vacúolos (v) no interior do núcleo (n). nu- nucléolo. Em B é possível observar a formação de alças no envoltório nuclear através da dissociação das membranas internas e externas do núcleo (setas).

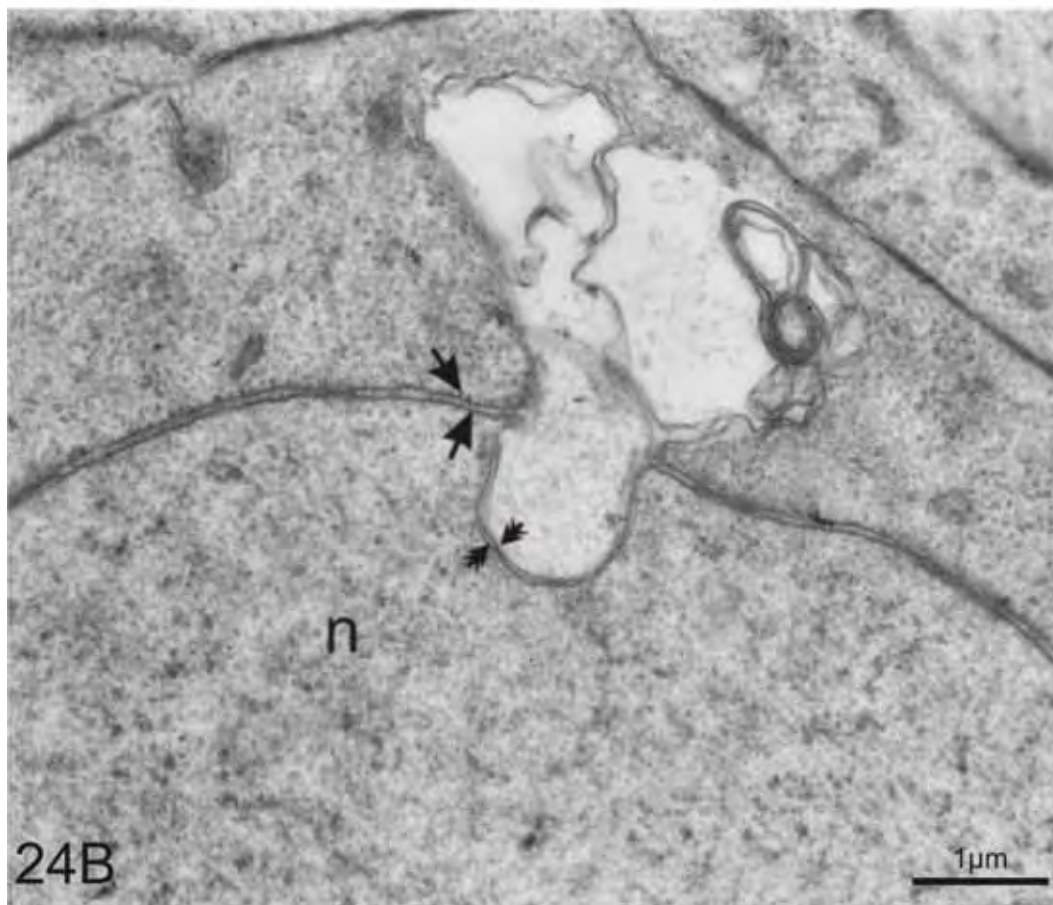
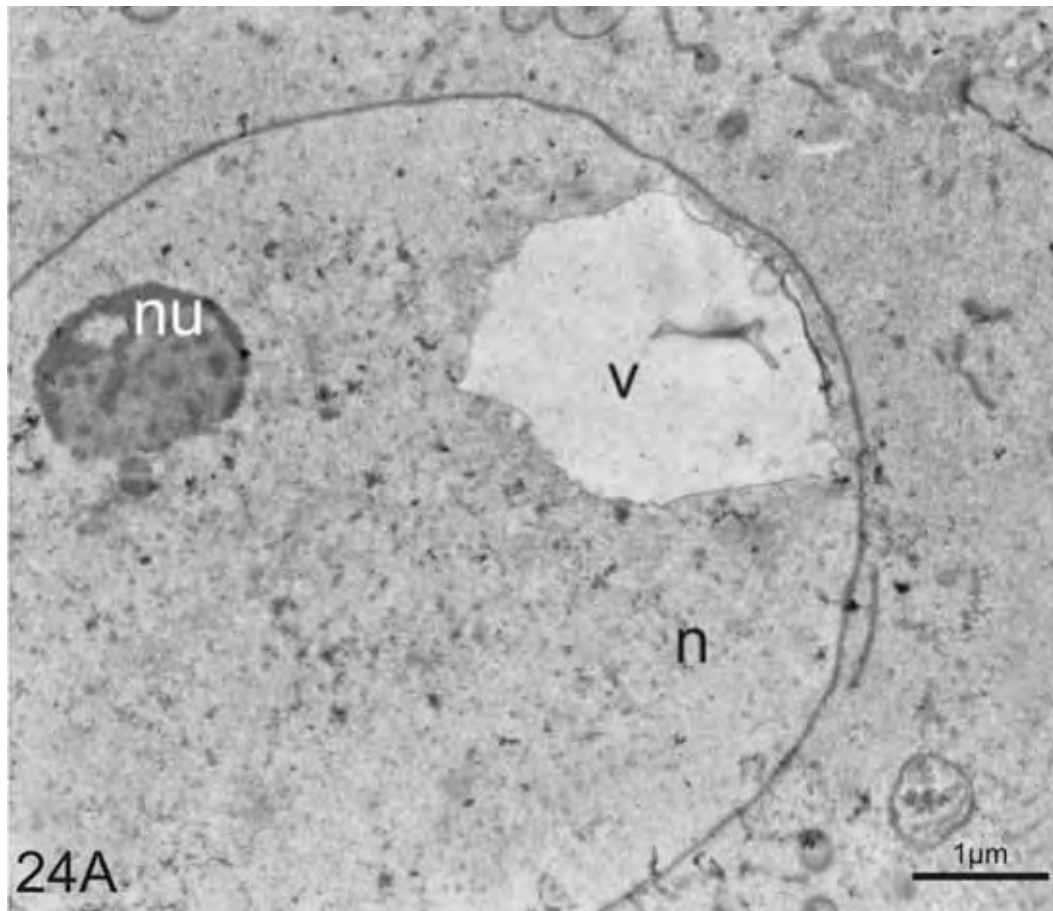


Figura 25 Micrografia de luz de ovaríolo de operária de 5 dias de idade tratada com CO₂. Notar que as células presentes em seu interior estão menos diferenciadas que em operárias da mesma idade do grupo não tratado. cn- células nutridoras, ov- ovócito, tr- traquéia. tp- túnica própria.

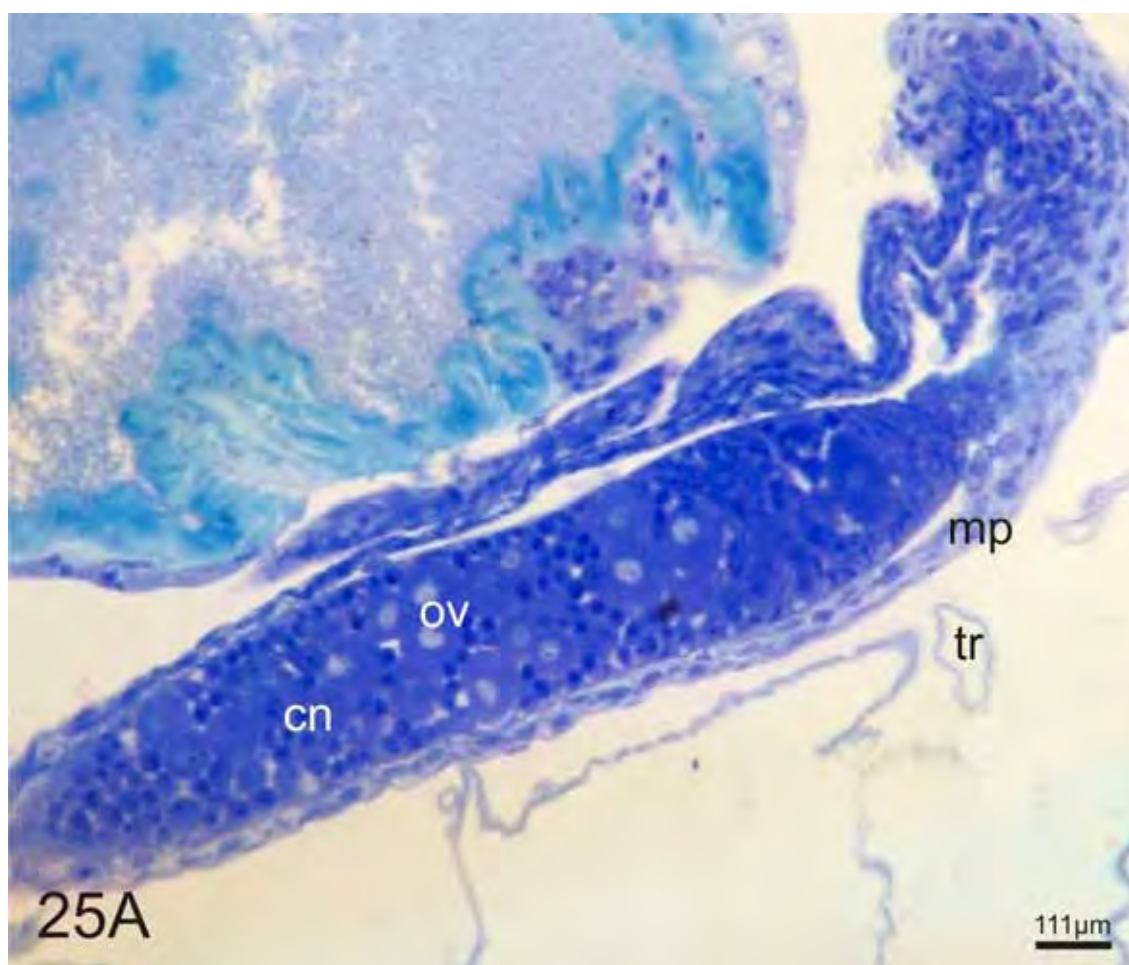


Figura 26 Micrografias de ovários de operárias de 15 dias tratadas com CO₂. Em A observa-se um ovário íntegro, sem sinais de degeneração tecidual tp, túnica própria, ci- células indiferenciadas. B micrografia de transmissão mostrando ovário de operária de 15 dias tratada com CO₂, sem muitos sinais de dano ao tecido. mp- membrana peritoneal, tp- túnica própria, mt- mitocôndria, n- núcleo, nu- nucléolo. C e D- Micrografia mostrando desorganização do tecido. tp- túnica própria, mp- membrana peritoneal.

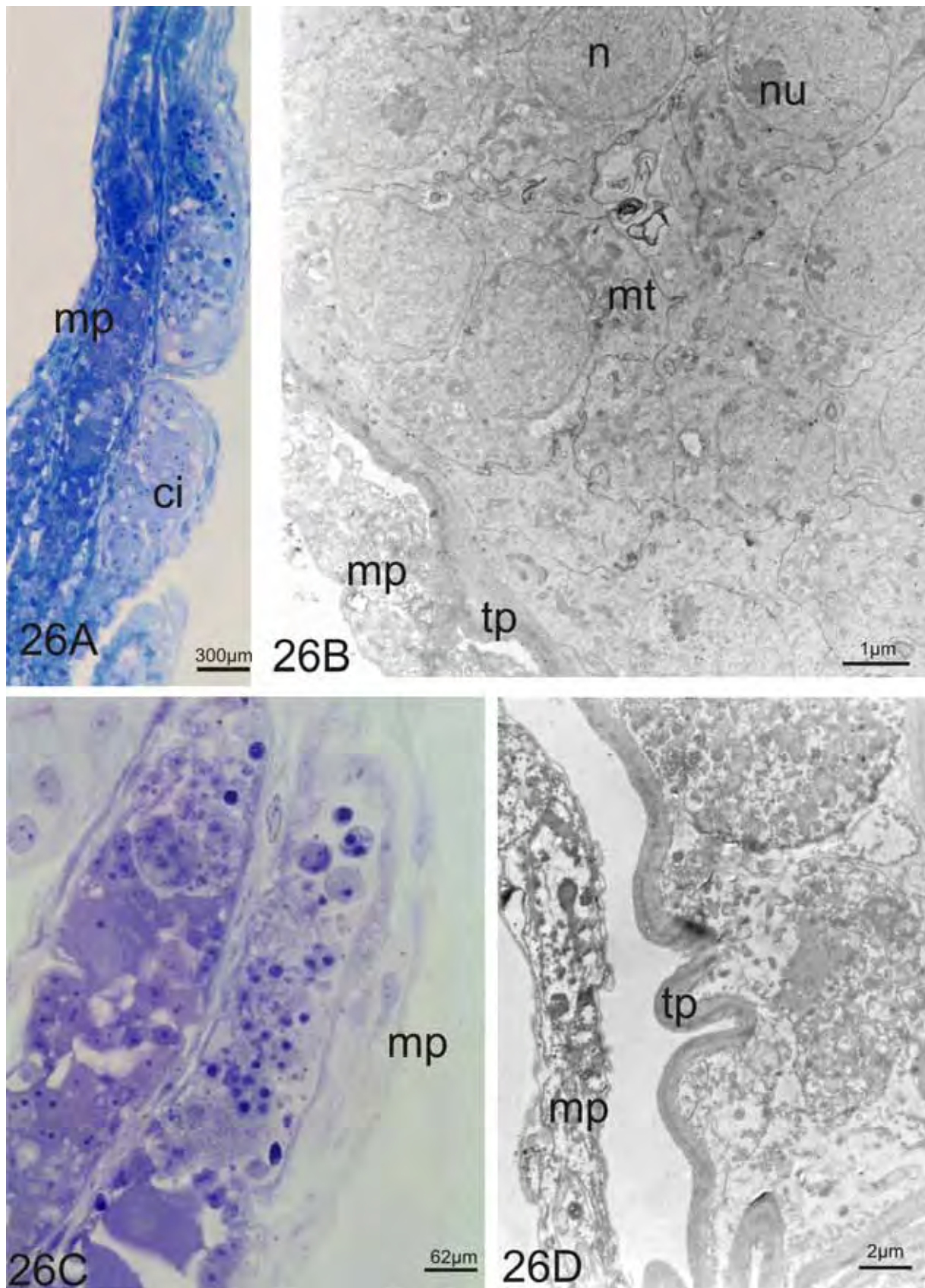
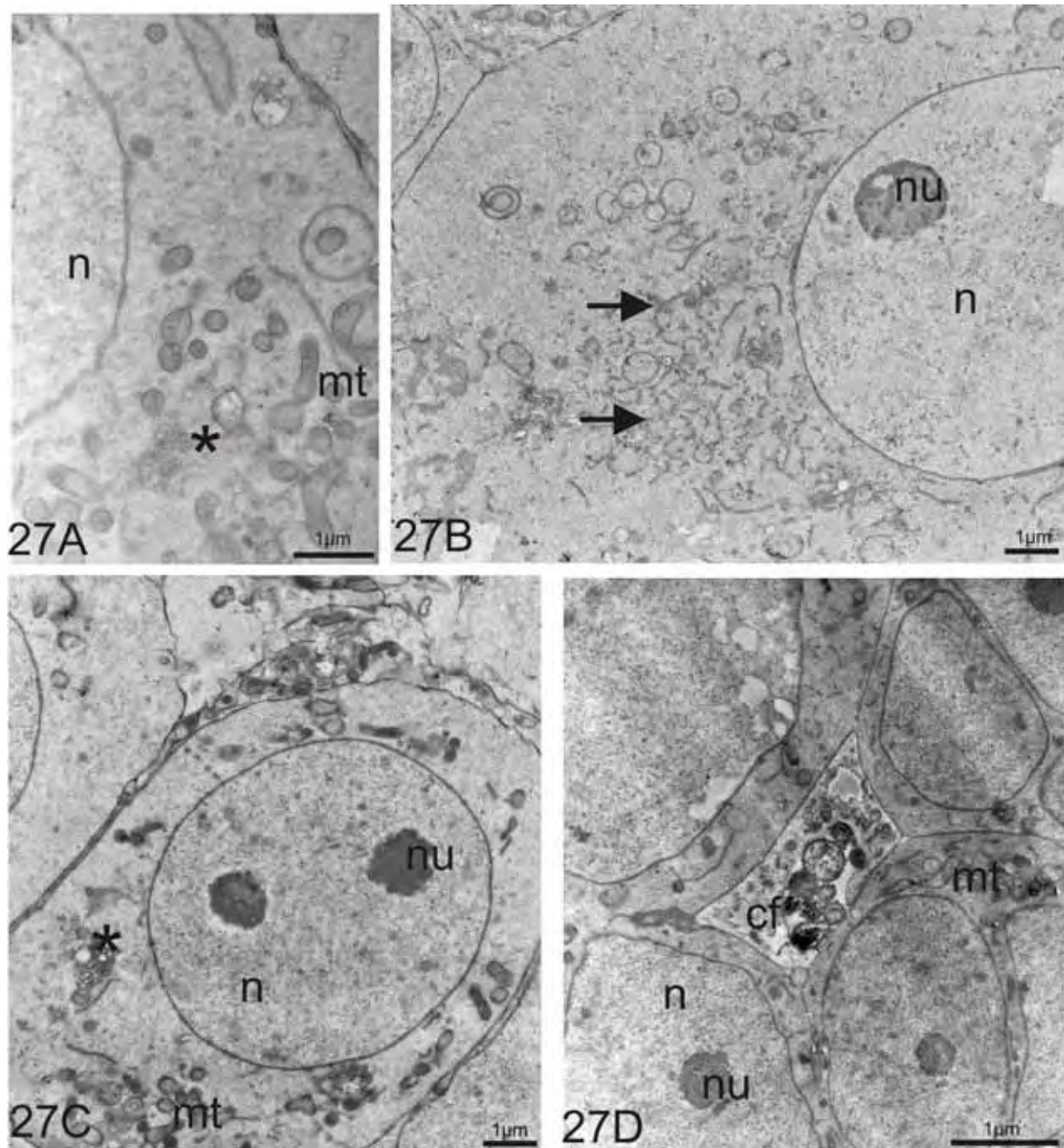


Figura 27 A e D mostram um aumento no numero de mitocôndrias (mt) no citoplasma assim como uma melhor visualização do complexo de Golgi (asterisco). N- núcleo, nu- nucléolo. B mostra desorganização de membranas do retículo (setas). Em D Observa-se morte de uma célula folicular.



5. DISCUSSÃO

As unidades funcionais dos ovários dos insetos são os ovariólos. Os ovários de operárias e rainhas diferem entre outras coisas quanto ao número destas unidades, o qual é reduzido nas operárias. Essa diferença deve-se ao controle exercido por hormônios sobre a diferenciação dos ovários nos imaturos, cujos títulos são diferentes nas castas devido às diferenças alimentares entre elas (RACHINSKY, 1990; RACHINSKY & HARTFELDER, 1991; RACHINSKY & ENGELS, 1995 REGINATO & CRUZ-LANDIM, 1998; 2001; 2002, ANTONIALLI JR & CRUZ-LANDIM, 2006).

Por ocasião da emergência os adultos, tanto as rainhas como as operárias, têm os ovariólos longitudinalmente diferenciados, do ápice para a base, em um filamento terminal, um germário e um pedicelo, pelo qual se liga ao oviduto lateral (SNODGRASS, 1956). A diferença entre elas passa a ser agora, além do número de ovariólos, já estabelecido na fase imatura o comprimento destes, os quais são muito mais longos nas rainhas.

Apesar dessas diferenças os ovários das duas castas são funcionais, ou seja, são capazes de realizar todas as etapas da ovogênese até a produção de óvulos prontos para serem fecundados, embora a fecundação nunca ocorra no caso das operárias, por estas possuírem genitália atrofiada (SNODGRASS, 1956; WILSON, 1976).

No entanto o amadurecimento de ovócitos no ovário, a vitelogênese ocorre em condições ambientais e fisiológicas diferentes para as rainhas e operárias, ou seja, o controle da produção de ovos é diferente entre as castas.

Enquanto na rainha é o acasalamento e o retorno para a colônia que estimula a vitelogênese, nas operárias é a ausência da rainha ou da chegada do sinal inibidor produzido por sua presença.

Então a questão que se coloca é de que maneira agiriam esses controles nessas classes de indivíduos. Dadas as condições sob as quais se organizam as colônias, é perceptível a presença de dois tipos de controles, agindo de maneira diferente sobre as rainhas e as operárias, um controle interno, que diz respeito à fisiologia das castas e outro externo que resulta das interações entre as castas e das condições gerais do meio (RIBBANDS, 1953; BUTLER, 1954; PAIN, 1955; BUTLER & SIMPSON, 1958; BUTLER & SIMPSON, 1965; CRUZ-LANDIM et al, 2006; HAMILTON, 1964; PAGE & ERICKSON, 1988; VELTHUIS, 1970; KAATZ, 1992; HARTFELDER, 2000-revisão; PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003).

Além dos controles naturais, internos e externos existe ainda a possibilidade de manipulação artificial, a qual é freqüentemente usada em *A. mellifera* com a finalidade de otimizar as condições de criação para fins comerciais.

Uma das práticas bastante usuais no manejo apícola é produzir rainhas para venda ainda virgens ou depois de fecundadas artificialmente. As rainhas assim produzidas geralmente são colocadas em pequenas caixas com algumas operárias para serem mandadas para o seu destino. No caso das rainhas serem vendidas depois de fecundadas e isto ter sido feito artificialmente, a inseminação artificial requer sua anestesia com gás carbônico (MACKENSEN, 1947). Outra prática vigente entre os apicultores é o tratamento de rainhas fecundadas com o gás para acelerar o início da postura (MACKENSEN, 1947; ENGELS et al. 1976; HERMANN, 1969; ENGELS & RAMAMURTY, 1976; TASEI, 1994 JASNOUSEK, 1987). Então duas questões aparecem: o efeito da manutenção da rainha fora da colônia e o efeito da narcose com CO₂ sobre o desenvolvimento do ovário. Foram estas as situações estudadas no presente trabalho.

5.1. Efeito da Retirada da Colônia

O ambiente colonial é de fundamental importância para o desenvolvimento do ovário dos adultos, seja da rainha ou da operária e o desenvolvimento adequado do ovário da rainha é crucial para o seu desempenho numa sociedade matriarcal como a de *A. mellifera*. Torna-se, portanto importante entender como se comporta o desenvolvimento do ovário desta espécie frente às manipulações usuais na prática apícola.

A rainha de *A. mellifera* já emerge com um germário diferenciado, na base do ovaríolo, embora curto, no qual estão presentes cistócitos em proliferação. Tanto é assim que em ovaríolos de rainhas com três dias já se encontram cistos em rosetas e nas de cinco dias já estão presentes ovócitos diferenciados das futuras células nutridoras (BERGER et al. 2005 BERGER & ABDALLA, 2005; BERGER & CRUZ-LANDIM, 2009, PATRICIO & CRUZ-LANDIM, 2002).

Em condições naturais a rainha sai para o vôo nupcial, durante o qual se acasalará por volta dos 6-8 dias de vida adulta, quando no germário, a ovogênese já avançou até que o ciclo de mitoses esteja terminado, pelo menos em alguns cistos, e um dos cistócitos esteja pronto para iniciar a meiose, isto é, transformar-se num ovócito primário (ZACARO, 1993).

Quanto ao controle inerente da casta, notou-se que embora as rainhas tenham emergido com apenas cistoblastos no germário, rapidamente estes se multiplicaram, originando cistos e

diferenciaram-se em ovócitos, de tal maneira que aos cinco dias, idade de acasalamento, já se encontravam no ovário um número considerável de ovócitos I e futuras células nutridoras diferenciadas, faltando apenas o estímulo do acasalamento para que um vitelário se diferenciasse e os ovócitos iniciassem a maturação. Essa ocorrência está de acordo com o fato de a rainha iniciar a postura poucos dias após o retorno do vôo nupcial. No caso das operárias, no presente trabalho não se observou diferença em relação à rainha quanto ao desenvolvimento da ovogênese no ovário. Aos cinco dias estas também apresentavam cistos com ovócitos diferenciados.

Apesar da opinião de alguns autores (COBEY, 2007) de que o ambiente colonial é imprescindível para o desenvolvimento inicial do ovário das rainhas os resultados do presente trabalho mostraram que mesmo as rainhas mantidas fora da colônia em caixas de 5x5x2cm, com apenas seis operárias e disponibilidade de apenas candy como alimento desenvolveram os ovários até esse ponto sem que se notasse morte celular ou outras alterações. Neste caso, é possível afirmar que a retirada da rainha da colônia não interferiu no progresso da ovogênese até esse ponto. Sabe-se que uma alimentação protéica é essencial para a vitelogênese (BITONDI & SIMÕES, 1996), mas não se sabe em que medida é também importante para as fases prévias da ovogênese. Na colônia as rainhas são alimentadas pelas operárias e provavelmente também no confinamento a que foram submetidas. O alimento que estas fornecem à rainha, conhecido como geléia real, é um produto das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (MICHENER, 1974), é produzido pelas operárias nutridoras, as quais precisam de alimentação protéica para que o desenvolvimento ocorra. Embora nas caixas de aprisionamento tenha sido colocado apenas candy como alimento, o fato das operárias terem sido trocadas a cada dois dias, deve ter garantido alimentação adequada para as rainhas. Neste caso pode-se descartar a influência da alimentação sobre o desenvolvimento do ovário das rainhas nas condições estudadas. Além disso, é possível que a energia necessária para a ovogênese que ocorre logo após a emergência ainda seja feita à custa das reservas obtidas durante a fase larval e não consumidas totalmente durante a pupação.

Contudo a seqüência do desenvolvimento ovariano observada neste trabalho difere dos resultados obtidos por PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2002) e TANAKA & HARTFELDER (2004). De acordo com os resultados de PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2002) nos ovariolos de rainhas virgens, os cistócitos aparecem apenas aos quatro dias de vida. Também não foi observado por nós, como descrito por estes autores, a formação de folículos pré-vitelogênicos, mesmo em rainhas com mais de 10 dias de idade, considerando-se

como um folículo pré-vitelogênico uma estrutura contendo as câmaras ovocítica com um ovócito I pré-vitelogênico e nutridora já envolvidas pelas células foliculares.

No entanto, em qualquer dos casos, ficou claro que, ultrapassada a idade com que a rainha devia ter se acasalado e isto não tendo acontecido, começa a degradação do ovário.

É certo que o acasalamento é um dos fatores que desencadeia o amadurecimento dos ovários conforme observado em vários insetos. Com o sêmen, são introduzidos nas fêmeas compostos com essa propriedade (FAN et al., 1999; SHOREY et al., 1968; WEBSTER & CARDE, 1984; COFFELT & VICK, 1987; RAINA et al., 1994; GIEBULTOWICZ et al., 1991; FOSTER, 1993; RAFAELI & GILEADI, 1995A; ANDO et al., 1996). Contudo para as abelhas não existem estudos similares, apenas a sugestão de que a secreção da glândula de muco possa conter tais compostos (COLONELLO & HARTFELDER, 2003).

No entanto, a falta de acasalamento como causa da degeneração é comparável à reabsorção de ovócitos observada em insetos quando não há condições para postura. No caso de não ser fecundada a função principal da rainha que é a produção de operárias para manutenção da colônia estaria prejudicada e não valeria a pena investir na produção de ovos, como no caso de não haver local para postura. Daí a degeneração do ovário.

No entanto, são muitas as variáveis envolvidas quando o confinamento da rainha é feito como no presente caso. Por exemplo, ao analisar os resultados percebe-se que a possibilidade de que a degeneração seja causada em idades mais avançadas, por deficiência alimentar não pode ser de todo afastada. Se for considerado que o desenvolvimento inicial do ovário ainda esteja ocorrendo à custa das reservas acumuladas durante a fase larval e não consumidas totalmente durante a pupação, as quais estariam agora esgotadas, a rainha estaria dependente da alimentação fornecida pela operária. Estas poderiam se desinteressar de alimentá-la ao perceber que esta permanece virgem, ou terem perdido a possibilidade de fazê-lo devido ao tempo decorrido com alimentação sem proteínas. O que torna essas ocorrências possíveis é saber-se que o estado reprodutivo da rainha pode ser percebido pelas operárias pelos hidrocarbonetos de superfície e que as operárias para desenvolverem suas glândula hipofaríngeas, produtoras da geléia real fornecida à rainha precisam de alimentação protéica (HAYDAK, 1970).

Como estas possibilidades só apareceram ao final do trabalho, quando não havia mais tempo para testá-las ficam como sugestão para futuras explorações a respeito dos controles do desenvolvimento dos ovários nas condições de confinamento fora da colônia. Como conclusão para o momento, os resultados obtidos permitem afirmar que a manutenção das rainhas confinadas nas condições descritas, por 6 a 8 dias não prejudica o desenvolvimento

ovariano, mas que além desse tempo alterações drásticas causadas por morte celular intensiva se faz presente.

A morte celular verificada parece atingir mais a linhagem germinativa e nesta, as futuras células nutridoras como já observado por BERGER et al (2005) e BERGER & ABDALLA (2005). A indicação para esta dedução está no fato das células marcadas pelo TUNEL como indicativo de morte celular se encontrarem agrupadas e no caso da MET o fato de serem as células menores, possíveis células nutridoras, as afetadas, aparecendo os ovócitos diferenciados, na maioria das vezes intactos.

As células somáticas, pré-foliculares, exercem o papel de células fagocitárias e em alguns casos também morrem. No entanto, parece que não por apoptose, mas por morte autofágica. As diferenças no tipo de morte possivelmente estão ligadas a diferenças na fisiologia destes tipos celulares. Dada a origem embrionária (mesodérmica) para as células somáticas) e a função de sustentação, estas devem dispor de um arsenal de enzimas histolíticas que pode ser mobilizado conforme os estímulos recebidos para digerir as células fagocitadas ou para sua própria destruição. É estranho neste caso que a reação para fosfatase ácida não tenha identificado essas enzimas.

5.2. Efeito da ação do CO₂

O efeito do CO₂ no aceleração da oviposição, na morfologia e na síntese de vitelogenina já foram demonstrados para *A. mellifera* e outras espécies de abelhas (ENGELS et al. 1976; HERMANN, 1969; ENGELS & RAMAMURTY, 1976; TASEI, 1994, BERGER et al. 2005). Porém não se observou diretamente esse efeito sobre as células ovarianas, no que tange a mudança na sua morfologia, principalmente em nível ultra-estrutural.

Segundo os estudos de BERGER et al. (2005), em que os ovários foram examinados com ML, o efeito do CO₂ em rainhas virgens de *A. mellifera* pode ser dividido em dois tipos: 1) Nas rainhas virgens antes da fase de acasalamento (até 3 dias de idade), a aplicação do CO₂ provoca um aceleração do desenvolvimento ovarioles, aumentando a área do germário com ovócitos e células nutridoras organizadas em fileiras duplas simétricas, estágio este só visto em rainhas virgens de 5 dias de vida não tratadas. 2) Nas rainhas com 10 dias não tratadas, certas regiões dos ovaríolos apresentam-se desorganizadas e com células com núcleos picnóticos, porém rainhas virgens com a mesma idade tratadas com CO₂ além de não apresentarem células com picnose, estas apresentam nítida formação de pré-folículos, apresentando início da divisão das câmaras nutridoras e ovocíticas.

Os resultados presentes com MET, no entanto, parecem indicar que até os cinco dias de idade a narcose não provoca mudanças no desenvolvimento ovariano. Não pôde ser detectado o aceleração no desenvolvimento do germário, conforme visto com ML. No entanto, os ovários das rainhas com 10 dias de idade, sob narcose, mostram nitidamente uma diminuição na taxa de mortes celulares quando comparados ao controle. Este efeito, porém, não perdura, visto que aos 15 dias parece não haver diferença nas taxas de mortes celulares entre o tratamento e o controle.

As diferenças encontradas quanto ao efeito do tratamento com CO₂ em relação ao anteriormente registrado podem ser apenas aparentes. Quando se examinam os ovários com ML tem-se uma visão geral de todo o órgão em que as diferenças podem ser melhor observadas. Com MET o campo de observação fica restrito a pequenas regiões dos ovários e mesmo com os menores aumentos que este tipo de microscópio oferece e percorrendo extensamente o corte e examinado vários blocos, não se obtém a mesma visão, visto que se usam nas preparações diminutos fragmentos do órgão e não o órgão inteiro. Esta característica da técnica pode concorrer para que se tenha a impressão de que não há diferença entre o experimento e o controle até os cinco dias de idade. Além disso, deve ser levado em conta que o que se procura com os estudos ultra-estruturais são mudanças na morfologia celular. Desta forma o foco das observações recai sobre o efeito do tratamento sobre os vários tipos celulares que constituem o ovário, principalmente sobre alterações deletérias e neste aspecto, sim, parece não ter havido diferença entre ovários de rainhas com 3 e 5 dias.

BERGER et al. (2005) relatam que o efeito do CO₂ parece ser limitado pela idade e pelo estado de virgindade da rainha, pois aos 15 e 18 dias, as rainhas virgens apresentam ovários com regiões altamente desorganizadas e grande incidência de células com núcleos picnóticos, além de o desenvolvimento parar no início da formação dos folículos. A relação entre o efeito da narcose e a idade da rainha certamente está relacionado com o momento da aplicação do tratamento. Quando o tratamento é feito na emergência e com 3 dias após este, os ovários encontram-se em processo de preparação para o acasalamento e o que se verifica com a ML é um efeito acelerador dessa preparação. Quando o tratamento continua aos cinco dias e o ovário já está pronto para o acasalamento a narcose não mostra efeito ultra-estrutural. O efeito do CO₂ parece apenas atuar até os 10 dias de idade mantendo dessa forma a integridade do tecido ovariano, visto que os ovários analisados das rainhas do grupo experimental e do controle aparentam ter a mesma taxa de morte celular.

Não se sabe ao certo como o CO₂ funciona no organismo da abelha. Presume-se que o CO₂ provoque a liberação de neuro-hormônios, os quais ativariam o desenvolvimento

ovariano (HERMANN, 1969). Segundo ENGELS et al. (1976) rainhas submetidas a atmosferas de CO₂ tiveram um aumento nos níveis de Vg na hemolinfa, mas este efeito somente se torna definitivo no metabolismo da vitelogenina quando estas rainhas são introduzidas em colônias. Estes mesmos autores afirmam que em rainhas jovens a administração de CO₂ se assemelha a alguns estímulos acasalatórios responsáveis pelo desencadeamento da atividade normal de oviposição. Provavelmente a fertilidade de rainhas está relacionada com os títulos de hormônio juvenil na hemolinfa (ENGELS, 1973), assim como demonstrado em abelhas do grupo Halictidae (BELL 1973). A produção do HJ pelos *corpora allata* geralmente é controlada por células neurosecretoras da *pars intercerebralis* (ENGELMANN, 1970), e ambos os sistemas são afetados pelo CO₂ tanto em rainhas como em operárias (BIEDERMANN, 1964, HERMANN, 1969), corroborando a possibilidade de o efeito dar-se por via hormonal.

Os resultados mostraram que em ambos os casos depois de certo tempo, além da fase de acasalamento ocorre grande incidência de morte celular, a qual se apresentou morfológicamente como apoptose ou como morte autofágica. Enquanto na morte apoptótica não está presente atividade da fosfatase ácida. Esta se dá na morte autofágica, então a procura por essa atividade foi feita com a finalidade de caracterizar a que tipo de morte as células ovarianas estavam submetidas.

5.3. Atividade Fosfatásica

Sabe-se que nas células existem vários tipos de fosfatases e que estas enzimas são importantes em vários eventos celulares, desde hidrólises simples até o funcionamento de vias importantes de sinalização das reações celulares, através da desfosforilação de quinases celulares específicas dessas vias. Quanto à sinalização celular, as candidatas mais prováveis para esta função são as fosfatases alcalinas, enquanto as ácidas atuam mais nas hidrólises celulares intravacuolares ou extracelulares. Portanto, a enzima hidrolítica fosfatase ácida tem sido muito usada como indicadora de atividade lítica nas células. Livre no citoplasma ela é indicadora de autólise celular (SKELTON e BOWEN, 1987).

As fosfatases ácidas, nas células, encontram-se inicialmente segregadas em lisossomos, cujo pH é impróprio para a sua ação, e geralmente exercem sua função como hidrolases no interior do compartimento endossômico. Assim esperava-se encontrar sua ação nos vacúolos autofágicos e heterofágicos, o que não foi verificado, ou pelo menos não na medida esperada.

Com MET foi possível visualizar a atividade da fosfatase ácida no interior do citoplasma de forma esparsa e em pontos isolados, no interior de vacúolos assim como em nucléolos e na cromatina nuclear tanto de células germinativas como somáticas.

A atividade esparsa no citoplasma das células ovarianas pode ser conectada ao comportamento de células com o processo de morte autofágica, pois indicaria que a enzima deixou de estar segregada no interior de vesículas (lisossomos). A atividade no interior de vacúolos poderia também ser conectada a processo autofágico de morte celular ou a digestão de resíduos fagocitados, mas a incidência é tão pequena que não parece ser o caso. Parece antes se tratar de atividade metabólica normal da célula.

Há muitos relatos sobre a atividade de fosfatase ácida no núcleo, porém a sua função ainda permanece desconhecida. A presença de fosfatase ácida no núcleo tem sido explicada como um acúmulo de fosfato inorgânico, como um artefato devido a um depósito não específico de chumbo, ou pela difusão de produtos citoplasmáticos para o núcleo durante o processamento do material (BARKA e ANDERSON, 1962, WHASITAM e SATO, 1976). Entretanto, há alguns argumentos que confirmam a atividade intranuclear da fosfatase ácida sob certas condições. Métodos que eliminam o artefato da acumulação de chumbo diminuem, mas não eliminam a marcação nuclear (BARKA e ANDERSON, 1962; POUX, 1967; PFEIFER et al., 1974). Entretanto, reações positivas também foram encontradas em núcleos isolados (DEITOUR et al. 1981) e a eliminação de fosfatos inorgânicos através da fixação com glutaraldeído (TANDLER e SOLARI, 1969) elimina a possibilidade da reação dever-se a produtos de difusão do citoplasma e a fosfatos inorgânicos respectivamente.

Existe uma considerável heterogeneidade na presença e distribuição da fosfatase ácida nas células do ovário. Isso pode refletir diferenças no estado funcional do núcleo. De acordo com DELTOUR et al. (1981) foi descrita uma elevada atividade desta enzima em células com altos índices metabólicos como as de células de raízes de plantas durante a germinação. AZEREDO-OLIVEIRA (1982) e OLIVEIRA (1997) também encontraram marcação para fosfatase ácida em núcleos de células de insetos, sendo que este último autor sugere que a fosfatase ácida se encontre ativa durante a transcrição de rRNA no centro fibrilar do nucléolo. Outra possível explicação para a presença de atividade fosfatásica na cromatina nuclear é que a fosfatase ácida esteja degradando proteínas nucleares que funcionam na expressão gênica, desfosforilando quinases intracelulares que atuam na expressão gênica (REGINATO, 1998). Segundo CRUZ-LANDIM et al (2002) há uma relação entre a intensidade da reação e os níveis de transcrição da cromatina. As células dos ovários se encontram em grande atividade de transcrição o que nos leva a concluir que em nossos resultados isso também pode ser

possível, uma vez que ocorreu grande marcação para fosfatase ácida nos núcleos das células germinativas. No entanto, é necessário buscar explicações para a positividade em alguns casos encontram-se predominantemente na cromatina e em outros predominantemente no nucléolo. Talvez isso esteja associado, no último caso, à produção de rRNA, a qual parece acontecer durante o processo de morte celular (CAVALCANTE, 1998).

Outro ponto que merece atenção é a presença de intensa marcação da atividade da fosfatase ácida na túnica própria dos ovários. A fosfatase ácida como já descrito anteriormente também serve para sinalização, assim a fosfatase ácida acumulada na membrana acelar do ovário pode representar elementos sinalizadores. É sabido que a túnica própria se constitui numa membrana seletiva que regula a passagem de material da hemolinfa para o interior dos ovários. A mesma positividade observada aqui foi encontrada por PAES-DE-OLIVEIRA (2005) estudando o trânsito de material da hemolinfa para os ovários em *Melipona quadrifasciata* durante a vitelogenese.

Em conclusão pode ser dito que o tratamento com o CO₂ não alterou o padrão de modificações celulares que ocorrem no ovário durante os processos de degeneração celular e que a atividade da fosfatase ácida não está diretamente ligada a esses processos.

5.4. Divisões celulares

Outro ponto pouco claro na atividade ovariana é como e onde ocorrem as divisões celulares mitóticas. Que mitoses ocorrem está evidente no aumento do número de células nos cistos presentes no germário. No entanto, nunca ou muito raramente são vistas figuras mitóticas. Ora, nas rainhas que chegam a por 2.000 ou mais ovos por dia, é evidente que as mitoses ocorrem em larga escala. Neste sentido tentou-se localizar essas divisões por método imunocitoquímico.

As células eucariontes possuem mecanismos para condensar e descondensar a cromatina. A condensação da cromatina é particularmente observada durante a divisão e morte celular do tipo apoptose, ao passo que descondensação da cromatina ocorre durante a replicação, reparação, recombinação e transcrição do DNA. A histona H3 está entre as numerosas proteínas que controlam o nível de condensação do DNA. A fosforilação da Ser10 nas caudas da histona H3 foi estudada extensamente em muitos organismos como fungos (*Aspergillus nidulans*), vermes (*Caenorhabditis elegans*), e moscas (*Drosophila melanogaster*), sugerindo que a histona H3 é fosforilada durante a condensação da cromatina

em todos os organismos eucariontes (KASZAS & CANDE, 2000; SPELIOTES et al., 2000; WEI et al., 1998). A sua função pós-transcricional é amplamente discutida (DE LA BARRE et al., 2000; DE SOUZA et al., 2000; HENDZEL et al., 1997; HSU et al., 2000; KASZAS & CANDE, 2000; VAN HOOSER et al., 1998; WEI et al., 1998; WEI et al., 1999) e o desenvolvimento de um anticorpo específico permitiu estudos “in vivo” deste acontecimento (HENDZEL et al., 1997), mostrando haver uma correlação forte entre a fosforilação da Ser10 e condensação de cromossoma durante divisão celular (HENDZEL et al., 1997; VAN HOOSER et al., 1998).

No presente estudo a marcação para histona H3 fosforilada ocorreu no filamento terminal e no germário de rainhas recém-emergidas e rainhas tratadas e não tratadas de 5 e 10 dias, mostrando que nesses indivíduos ocorreu divisão celular durante todo o período estudado tanto no grupo controle quanto no grupo submetido à narcose com CO₂. O número de células em divisão foi maior no filamento terminal que no germário, onde estas foram raras. Esperava-se evidenciar com o auxílio desta ferramenta um número maior de divisões celulares no germário, visto que sabidamente a ovogônia secundária ou cistoblasto passa por uma sucessão de mitoses antes que o ovócito se diferencie dentre as células resultantes, mas curiosamente, apesar das divisões estarem ocorrendo como pode ser observado pelo aumento do número de células nos cistos, figuras correspondentes às fases da mitose não são observadas, seja com microscopia de luz, eletrônica, ou com a marcação da histona H3. PAULCKE (1901) já havia declarado nunca ter observado figuras mitóticas em suas preparações histológicas de ovários apesar da imensa produção de ovos (SEELEY, 1978). GUTZEIT et al. (1993), quando realizaram preparações com DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride) também foram incapazes de observar os cistócito se dividindo.

Uma das explicações possíveis para que as divisões celulares não tenham sido observadas nos ovários pode ser o fato destas ocorrerem em sincronia (TANAKA e HARTFELDER 2004) nos cistos e num período de tempo fora daquele em que o estudo foi efetuado, por exemplo, durante a noite visto que sempre realizamos esta atividade entre as 10 e as 16 horas. A ocorrência de divisão celular obedeceria, então a um ritmo circadiano, o que é compatível com o comportamento rítmico de oviposição (ALLEN, 1960). Mas, para que esta hipótese do ciclo circadiano seja aceita é necessário que novas análises sejam feitas e os ovários sejam fixados em diferentes períodos do dia.

Dos presentes resultados não é possível dizer se a narcose com CO₂ estimula ou não o processo de divisão celular, visto que divisões celulares foram dificilmente encontradas no material.

Precisa, ainda ser lembrado que a condensação da cromatina também ocorre durante a morte celular por apoptose (WYLLIE, 1980). Esta ocorrência fez com que se especulasse se a fosforilação da histona também acontecia neste caso e poderia originar erro na interpretação dos resultados desse tratamento. Verificou-se que em algumas situações, dependendo do agente indutor da apoptose, como quando há intoxicação por gliotoxina pode sim haver correlação entre a fosforilação da Ser10 da histona H3 e a morte celular por apoptose (WARING et al., 1997). Contudo durante a mitose várias proteínas, como a p34^{cdc2} são fosforiladas e seus resíduos revelados pela ação do anticorpo monoclonal MPM-2. Durante a apoptose, na maioria dos casos a condensação da cromatina ocorre na ausência da atividade da proteína p34^{cdc2}, desta maneira não se observa a atividade do epítipo MPM-2 já que a condensação da cromatina não é dependente da fosforização das histonas H1 e H3 (YOSHIDA et al., 1997). Esses resultados sugerem que a condensação da cromatina pode ocorrer sem a fosforilação da Ser10 da histona H3 e que a condensação da cromatina durante o processo de morte celular e a fosforilação nem sempre estão relacionadas.

De qualquer maneira, como os locais onde se verificaram as divisões celulares e as apoptoses são distintos, tendo as divisões ocorrido de preferência no filamento terminal e no germário só foram encontradas em pontos isolados, enquanto a marcação com TUNEL aparece amplamente distribuída nesta segmento, no presente caso não há possibilidade de ter havido confusão.

5.5. Aspectos de Morte Celular

Mortes celulares são fenômenos normais durante o desenvolvimento de qualquer órgão e no ovário, estão presentes nos ovários desde rainhas recém-emergidas de maneira esporádica, mas, conforme verificado neste trabalho sua taxa aumenta alcançando o máximo aos 15 dias de idade em rainhas que não se acasalaram. As células afetadas pela morte celular parecem ser da linhagem germinativa. As indicações para isto referem-se à sua localização na região central do ovário e a sua forma. Quanto à possibilidade de serem principalmente aqueles células precursoras das células nutridoras, conforme proposto por BERGER & ABDALLA (2005), a única confirmação obtida no presente estudo refere-se ao seu tamanho. Nas rainhas virgens com 15 dias, apesar de existirem regiões dos ovários extensivamente afetadas por mortes celulares, há outras em que o aspecto das células é normal, nas quais se encontram ovócitos diferenciados das futuras células nutridoras. Nestas regiões não se observou morte nessas células precursoras das nutridoras. Por outro lado, nas regiões mais

afetadas, não se observou nenhum ovócito intacto. Portanto, com os dados presentes não é possível determinar se a morte do ovócito é ou não determinada pela morte das células nutridoras, uma das questões formuladas como objetivo do presente trabalho.

Embora a maior parte das células em processo de morte apresentem algumas características morfológicas de morte apoptótica, tais como condensação citoplasmática e nuclear e fagocitose por células vizinhas, não foram observados outros aspectos considerados típicos desse tipo de morte celular. Por outro lado a presença de figuras mielínicas em algumas células e edema celular, verificados principalmente em rainhas antes da idade de acasalamento, mostram que as mortes celulares podem não ser de um único tipo.

Morte celular autofágica, na qual a presença de vacúolos autofágicos e figuras mielínicas é característica, foi descrita para os insetos por LOCKSHIN (1985) e é uma das modalidades presentes. Por outro lado, recentemente os autores estão chegando há conclusão que há uma gama de mecanismos de morte celular que nem sempre podem ser bem definidos ou delimitados (LOCKSHIN, 2006). Uma dessas modalidades está sendo denominada necro-apoptose, a qual pode no presente caso estar representada pelas células edemadas observadas.

O método utilizado para a caracterização do tipo de morte celular (TdT-FragELtm DNA Fragmentation Detection Kit) permite o reconhecimento de núcleos das células apoptóticas. Neste ensaio a desoxinucleotídeo terminal transferase (TdT) se une a extremidade 3'-OH dos fragmentos de DNA originados no processo de apoptose e catalisa a adição de biotina marcada. Os nucleotídeos biotinilados são detectados usando-se peroxidase conjugada com estreptavidina de cavalo (HRP). Em seguida, o DAB (Diaminobenzidina) reage com a amostra marcada gerando um substrato colorido castanho insolúvel no local da fragmentação do DNA.

Em estudos com ovários de *Drosophila melanogaster* foram observados eventos de morte celular em dois momentos distintos: 1) nas células germinativas do germário durante a ovogênese, em resposta a condições ambientais e 2) no estágio final da ovogênese quando as células nutridoras transferem todo o seu conteúdo citoplasmático para o ovócito (FOLEY & COOLEY, 1998; NEZIS et al, 2002) sendo que o mesmo também ocorre em *Apis mellifera* (CRUZ-LANDIM et al, 2006).

A organização social de abelhas, vespas e formigas depende da monopolização das funções reprodutivas pela rainha, trazendo desta maneira conseqüências que são observadas na morfologia dos ovários de rainhas e operárias. O papel da morte celular no desenvolvimento ovariano larval e de adultos é mais conhecido para abelhas do que para os outros grupos citados (TANAKA & HARTFELDER, 2004, REGINATO & CRUZ-LANDIM,

2001; 2002, PATRICIO & CRUZ-LANDIM, 2002; SCHIMIDT-CAPELLA & HARTFELDER, 1998). Durante o desenvolvimento larval as operárias perdem mais de 90% dos seus ovários, este processo de morte celular está intimamente ligado aos baixos títulos de HJ que induzem alterações nos filamentos de actina das células germinativas. Os filamentos de actina desempenham um papel maior no controle da morte celular nos ovários de adultos (TANAKA & HARTFELDER, 2004), onde se encontra um elevado número de células com núcleos picnóticos e núcleos marcados pela reação TUNEL, sugerindo que o mesmo mecanismo possa regular tanto o processo de morte celular na modelagem dos ovários de larvas durante a diferenciação das castas como em adultos durante a atividade reprodutiva (TANAKA et al, 2006; CRUZ-LANDIM et al, 2006).

Apesar da reação TUNEL apresentar-se positiva nas células nutridoras de ovócitos em vitelogênese e referir-se ao processo envolvido na sua morte (CAVALIERE et al. 1998), em *D. melanogaster*, como sendo apoptose, este tipo de morte celular deve-se ao esgotamento da célula nutridora pela transferência de seu conteúdo citoplasmático para o ovócito e não pode ser rotulada como apoptose. Por outro lado, resultados anteriores, mostram que as mortes celulares que ocorrem nos ovários são de mais de um tipo visto encontrar-se em algumas células a presença de figuras mielínicas e edema citoplasmático, principalmente em rainhas antes da idade de acasalamento. A reação TUNEL parece não ser exclusiva para a apoptose, desde que em outros tipos de morte celular também pode ocorrer fragmentação do DNA, produzindo terminações livres onde pode ocorrer a reação pode se manifestar.

5.6. Desenvolvimento do Ovário nas Operárias

Todas as operárias analisadas apresentaram ovários com número reduzido de ovários muito finos envolvidos por uma densa rede de traquéias, compostos exclusivamente de germário e filamento terminal, apenas aos 15 dias, em algumas operárias controle, apareceu um esboço de vitelário. Operárias com o padrão morfológico observado enquadram-se no estágio I da classificação de desenvolvimento ovariano de SAKAGAMI *et al.* (1963) e PIMENTEL (1990). Desde o momento de sua emergência até os 15 dias de idade a presença da rainha junto com as operárias foi constante e poderia ter influenciado negativamente no desenvolvimento ovariano das operárias, uma vez que mesmo as rainhas sendo virgens, após a idade de acasalamento (ao redor dos cinco dias) já estão produzindo a substância da rainha (BUTLER & PATON, 1964), que por sua vez tem efeito inibidor sobre o desenvolvimento do ovário das operárias. Soma-se a isso, o pequeno espaço da caixa em que as operárias foram

mantidas em relação ao espaço da colônia o que também poderia ter contribuído para o fraco desenvolvimento do seu ovário no período estudado e, sobretudo a alimentação carente de proteínas, as quais são necessárias para o desenvolvimento dos ovários (BITONDI & SIMÕES, 1996).

Em condições naturais, na colônia, operárias ao redor dos 25 dias de idade começam a apresentar ovariolos mais calibrosos com leves constrições transversais indicativas do início da diferenciação do vitelário e após os 30 dias de idade essas constrições aumentam (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003). Portanto o aprisionamento nas condições do experimento parece não ter interferido na temporalidade do desenvolvimento ovariano das operárias.

O padrão seqüencial de desenvolvimento do ovário nas operárias foi muito semelhante ao padrão observado em rainhas virgens da mesma idade e do ponto de vista da degeneração e reabsorção ovarioelar, o controle para a realização dos experimentos do presente trabalho coincide com dados anteriormente obtidos. Em ambos os casos, operárias com cinco dias de idade apresentam germários com rosetas de cistócitos e cistócitos em começo de diferenciação folicular começando mais ou menos aos 13-14 dias a degeneração ovarioelar e atingindo o ponto máximo aos 20 dias de idade. Porém, os dados histológicos discordam dos de PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM (2003), quanto ao começo do aparecimento de folículos (primordiais) pré-vitelogênicos e quando a interpretação dos septos que aparecem na microscopia eletrônica de varredura. As constrições transversais que aparecem nos ovariolos aos 25 dias de idade (PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2003) podem estar representando folículos pré vitelogênicos degenerados.

Deve-se chamar a atenção para o fato do comprimento do filamento terminal do ovário das operárias, aparentemente manter-se estável mesmo com o avanço do desenvolvimento do germário, o que não se verifica na rainha. Se de fato o filamento terminal contém as células tronco das ovogônias, isto significa que embora curto, mantém por mais tempo o estoque de células potencialmente reprodutivas.

À exposição de operárias ao gás carbônico por dois minutos, tem se atribuído diminuição da expectativa de vida, alterações dos padrões comportamentais, inibição do desenvolvimento da glândula hipofaríngea e de cera (RIBBANDS, 1950; SKOWRONEK & JAYCOX, 1974) e dos ovários (FYG 1950; BIEDERMANN, 1964; KROPAVA, 1968). Não se sabe ao certo como o CO₂ age no metabolismo e quais os mecanismos que ativa para provocar tais efeitos. Segundo EBADI et al. (1980), nas operárias o CO₂ provoca diminuição da coleta de pólen, apesar de fazer com que elas exerçam a atividade de forrageamento mais

cedo, levando-as, com isso, a debilitação física e, conseqüentemente, injúria dos órgãos internos.

No que diz respeito ao ovário o CO₂ parece não ter o efeito positivo nos ovários de operárias como acontece em rainhas. Observou-se que a exposição ao CO₂ no primeiro e terceiro dias de vida das operárias, além do aumento na degeneração ovarial corroborando os dados da literatura mostra que o CO₂ causa inibição do desenvolvimento ovariano (FYG, 1950; BIERDERMANN, 1964; KOPACOVA et al, 1968; HARRIS & HARBO, 1990; BERGER et al, 2005). Os presentes resultados comprovam a diferença de resposta do sistema reprodutor das castas femininas das abelhas à exposição ao CO₂ (MACKENSEN, 1947; ENGELS et al., 1976). Enquanto que em rainhas o CO₂ acelera o desenvolvimento e preserva os ovários, nas operárias o efeito é justamente o oposto (BERGER et al, 2005).

Os efeitos da narcose em rainhas indicam que o tratamento desencadeia a regulação de genes que ativam o desenvolvimento ovariano. Isso é particularmente evidenciado pela vitelogenina que tem sua síntese drasticamente aumentada em rainhas submetidas ao CO₂ (ENGELS et al. 1976). Isso sugere que genes diretamente associados à ativação dos ovários em rainhas, como os da vitelogenina (vg), sejam fortes candidatos a genes associados na ativação dos ovários de operárias, mas agindo ao contrário.

Estudos realizados por KOYWIWATTRAKUL et al (2005) mostraram que operárias submetidas à narcose e analisadas 4 horas após o tratamento possuem as mesmas condições de desenvolvimento ovariano de operárias não tratadas. Após 48 horas da aplicação as operárias submetidas à narcose apresentaram ovários menos desenvolvidos que o grupo controle e 96 horas após o tratamento as diferenças foram maiores ainda, sendo que o grupo não exposto ao CO₂ apresentou índices maiores de desenvolvimento ovariano. Em relação aos genes codificadores de vitelogenina (vg) e transferina (TRF) tiveram uma diminuição no grupo tratado com CO₂ em relação ao grupo não tratado, sendo que a expressão desses dois genes é responsável pela ativação funcional dos ovários em operárias, como descrito por (ENGELS et al, 1976).

A vitelogenina é um pré-requisito para ativação dos ovários em abelhas (ENGELS et al., 1990), assim como de extrema importância para a produção de ovos, entretanto a vg também é utilizada nas glândulas hipofaríngeas na síntese de geléia real. A geléia real é produzida em sua maior parte por operárias nutridoras e é larvi-dependente. AMDAM et al (2003) especula que a chave para a adaptação à eussociabilidade em abelhas venha da utilização da vitelogenina, sendo que a primeira função desta proteína seria a de constituir o vitelo e a segunda, servir de alimento para as larvas. Dessa forma pode-se sugerir que há uma

forte ligação entre a exposição ao CO₂ e a síntese de vitelogenina e a ativação específica da ativação ovariolar nas diferentes castas, sendo que a vitelogenina pode ser considerada uma nova candidata a reguladora dos controles de esterilidade em operárias (KOYWIWATTRAKUL et al, 2005).

6. CONCLUSÕES

- 1- O confinamento de rainhas recém-emergidas, com seis operárias nutridoras, desde a emergência até os cinco dias não interfere no padrão de desenvolvimento ovariano.
- 2- A degeneração ovariana, que ocorre nas rainhas aprisionadas depois dessa idade, principalmente a partir dos 10 dias pode ser à falta do acasalamento e é equivalente à reabsorção de ovócitos observada em insetos quando não há condições para postura.
- 3- A narcose com CO₂ não provoca mudanças no desenvolvimento ovariano de rainhas até os cinco dias de idade, no entanto aos 10 dias o tratamento com narcose provoca uma diminuição nas taxas de morte celular, ou seja é preserva o ovário.
- 4- Dois tipos de morte celular ocorrem no ovário. Morte apoptótica evidenciada pela morfologia e pelo TUNEL e morte autofágica, as quais parecem ocorrer em células de linhagens diferentes. A morte apoptótica na linhagem germinativa a autofágica na somática.
- 5- Após diferenciado o cisto, o ovócito parece ser preservado da morte a qual ocorre nos cistócitos antes de sua diferenciação ou nas futuras células nutridoras depois da sua diferenciação.
- 6- A atividade da fosfatase ácida não mostrou relação consistente com a morte celular e parece relacionar-se mais com atividade metabólica normal da célula.
- 7- As taxas de divisão celular nos ovários das rainhas reveladas pelo método da Fosforilação da histona H3 foram baixas e incompatíveis com a taxa de produção de ovócitos por esta casta.

- 8- Do ponto de vista prático o aprisionamento das rainhas recém-emergidas fora da colônia por tempos reduzidos parece não afetar seu desempenho futuro em termos de fertilidade.
- 9- A narcose, neste mesmo contexto, pode ser negativa para esta performance em longo prazo.
- 10- O aprisionamento nas condições do experimento parece não interferir na temporalidade do desenvolvimento ovariano das operárias.
- 11- O CO₂ não tem efeito positivo nos ovários de operárias ao contrário, a exposição ao CO₂ aumenta a degeneração ovarial corroborando os dados da literatura de que o CO₂ causa inibição do desenvolvimento ovariano nesta casta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.D. 1960 The honeybee Queen and her attendants. **Anim. Behav.** 8:201-208.

AMDAM, G.V. & OMHOLT, S.W., 2002 The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. **J. Theor. Biol.** 216:209–228.

AMDAM, G.V., SIMÕES, Z.L., GUIDUGLI, K.R., NOERBERG, K. OHMHOLT, S.W. 2003 Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. **BMC Biotechnol.** 3(1):1.

ANDO, T., KASUGA, K., YAJIMA, Y., KATOAKA, H. AND SUZUKI, A., 1996. Termination of sex pheromone production in mated females of silkworm moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 31:207–218

ANTONIALLI JUNIOR, W. F. & CRUZ-LANDIM, C. 2006. Effect of topical application of juvenile hormone on the occurrence of cell death in the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). **Braz. J. Morph. Sci.**, 23: 377-383.

ANTONIALLI JR., W.F & CRUZ-LANDIM,C. 2009. Efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil sobre o desenvolvimento dos ovários de larvas de operárias de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 53(1):115-120.

ARMBRUSTER, L., LEVY,M., MATHIBU, M.N. & BAUTZ, A.M. 1986. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera Calliphoridae). **Comp. Biochem.**

Physiol., 84b:349-54.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1982. Estudo citoenzimológico em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. Master's thesis, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

BARKA, T. & ANDERSON, P.J. 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. **J. Histochem. Cytochem.** 10: 741-753.

BEETSMA, J. 1979. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World** 60(1):24-39.

BEIG, D. 1972. The production of males in queen right colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **J. Apicult. Res.**, 11:33-39

BELL, W. J. 1973 Factors controlling initiation of vitellogenesis in a primitively social bee, *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). **Insects Soc.** 20(3): 253-260.

BERGER, B. & ABDALLA, F.C. 2004. Honeybee worker longevity on differential diet and narcosis. **In VI Encontro sobre abelhas/ 8th IBRA International Conference on Tropical Bees**, Ribeirão Preto. 06-10/ setembro. Página 449.

BERGER, B. & ABDALLA, F.C. 2005. Programmed germ cell differentiation during ovary stages of oogenesis in caged virgin and fecundated queens of *Apis mellifera* Linné, 1758 (Hymenoptera, Apini). **Braz. J. Morphol. Sci.** 22(1):1-4.

BERGER, B. & CRUZ-LANDIM C. 2009. Effect of mating delay on cell death in honey bee's (*Apis mellifera* L.) virgin queens' ovary. **J. Apic. Res.** 48(1):60-66.

BERGER, B., ABDALLA, F. C & CRUZ-LANDIM, C. 2005. Effect of Narcosis with CO₂ on the Ovarian Development in Queens of *Apis mellifera* Linné, 1785 (Hymenoptera, Apini), **Sociobiology**. 45(2):261-270.

BIEDERMANN, M.Z. 1964. Neurosekretion bei arbeiterinnen und Königinnen von *Apis mellifera* L. unter natürlichen und experimentellen Bedingungen. **Z. Wiss. Zool.** 170:256-308.

BITONDI, M.M.G & SIMÕES, Z.L.P. 1996. The relationship between level of pollen in diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. **J Apic. Res.** 35: 27-36.

BOWEN, I.D., MORGAN, S.M. & MULLARKEY, K. 1993. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biol. Int. Rep.** 17: 13-33.

BOWEN, I.D., MULLARKEY, K. & MORGAN, S.M. 1996. Programmed cell death in the salivary glands of blow fly *Calliphora vomitoria*. **Microscop. Res. Tech.**, 34: 202-7.

BOWEN, I.D., WORRILL, N.A., WINTERS, C.A. & MULLARKEY, K. 1988. The use of backscattered electron imaging, X-ray microanalysis and X-ray microscopy in demonstrating physiological cell death. **Scan. Microsc.**, 2: 1453-62.

BROOKS, N.A. 1965. The effects of repeated anesthesia on the biology of *Blattella germanica* (L.). **Entomol. Exp. Appl.** 8:39-48.

BUTLER, C.G. & PATON, N.P. 1964. Inhibition of queen rearing by queen honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. **The Proc. Royal Ent. Soc. Lon.** A37.

BUTLER, C.G. & SIMPSON, J. 1958. The source of queen substance of the honeybee (*Apis mellifera*). **Proc. Roy. Entomol. Soc. London** 33: 120-122.

BUTLER, C.G. & SIMPSON, J. 1965. Pheromones of the honeybees (*Apis mellifera* L.). An olfactory pheromone from the Koschewnikow gland of the queen. **Vědecké Práce Výzkumných Ústavů Zemědělských Včelařského Dole**, 33-36.

BUTLER, C.G. 1954. The method and importance of the recognition by a colony of honeybees (*A. mellifera*) of the presence of its Queen. **Proc. Roy. Entomol. Soc. London** 104(2): 11-29.

CAVALCANTE, V.M. 1998. Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudos ultra-estruturais e citoquímicos. 134p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.

CAVALIERE, V. TADEI, C. & GARGIULO, G. 1998 Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of *Drosophila melanogaster*. **Dev. Genes Evol.** 208, 106-112

CHAPMAN, R.F. 1998. The insects: structure and function. Cambridge Univ. Press, U.K, 770pp

COBEY, S.W. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie** 38:390-410.

COFFELT, J.A. AND VICK, K.W., 1987. Sex pheromone of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae): influence of mating on pheromone titer and release rate. **Journal of Stored Products Research** 23:119–124

COLONELLO, N.A. & HARTFELDER, K. 2003 Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. **Apidologie** 34,257:267.

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

CRUZ-LANDIM, C. ; PATRICIO, K. & ANTONIALLI JUNIOR, W. F. 2006.. Cell death and ovarian development in highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): caste differentiation and worker egg lying. **Braz. J. Morphol Sci**, 23: 27-42.

DE LA BARRE, A.E.; GERSON, V.; GOUT, S.; CREAVER, M.; ALLIS, C.D. & DIMITOV, S. 2000. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. **EMBO J**. 19:379-391.

DEPRIESTER, W., VAN PEL-VERTKIL, E. & DE LEEUV, G. 1979. Demonstration of acid phosphatase activity induced by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Calliphora*. **Cell Tissue Res.** 200: 435-24.

DE SOUZA, C.P. OSMANI, A.H. WU, L.P. SPOTTS, J.I. & OSMANI, S.A. 2000. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. **Cell** 102: 293-302.

DELTOUR, R., FRANSOLETT, S. & LOPPE, R. 1981. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. **J. Cell Sci.** 47: 77-89.

DIMITRIADIS, V.K. & KASTRITSIS, C.D. 1985. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae - distribution of alkaline phosphatase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase, and glycogen. **Cytologia**, 50: 689-700.

DIXON, S.E. & MOSER, E. 1972. Duality in function in corpora allata of honeybee larvae. **Canadian Journal of Zoology**, 50: 593-595.

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

DUCHATEAU M. J., VELTHUIS H. H. W, 1988. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. **Behaviour** 107:186-207.

EBADI, R.; NORMAN, E.; GARY, N.E. & LORENZEN, K. 1980. Effects of carbon dioxide and low temperature narcosis on honey bee *Apis mellifera*. **Envir. Entomol.** 9(1): 144-147.

EDWARDS, L.J., 1868. Effects of carbon dioxide anaesthesia on the larval growth of the corn earworm. **J. Ecol. Entomol.** 61:990-992.

ENGELMANN, F. 1970. **The physiology of insect reproduction**. Pergaman Press, New York.

ENGELS, W. & RAMAMURTY, P.S. 1976. Initiation of oogenesis in allatectomised virgin honeybee queens by carbon dioxide treatment. **J. Insect Physiol.**, 22: 1427-1432.

ENGELS W, KAATZ H, ZILLIKENS A, SIMÕES ZLP, TRUBE A, BRAUN R, DITTRICH F. 1990. Honeybee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi M , Yamashita O , editors. **Advances in invertebrate reproduction** 5. 495-502.

ENGELS, W.; GONÇALVES L.S. & ENGELS, E. 1976. Effects of carbon dioxide on vitellogenin metabolism in unmated queen honeybees. **J. apic. Res.** 15:3-10.

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

ENGELS, W. 1968. Extraoocytäre kamponoten des eiwaschestums bei *Apis mellifera* L.(I. Trophocytäre RNS-zufuhr). **Insects Sociaux**, 15:271-288

- FAN, Y.L.; RAFAELI, A.; GILEADI, C.; KUBLI, E. & APPLEBAUM, S.W. 1999. *Drosophila melanogaster* sex peptide stimulates juvenile hormone synthesis and depresses sex pheromone production in *Helicoverpa armigera*. **J. Insect Pysiol.** 45, 127-133.
- FOLEY, K. & COOLEY, L. 1998. Apoptosis in the late stage of *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. **Development** 125:1070-1082.
- FREE, J. B., 1980. A organização das abelhas (*Apis*). São Paulo: Edusp, 78pp.
- FYG, W. 1950. Beobachtungen über die Wirkungen der Kohlensäure- Narcose auf Arbeitsbienen. **Schweiz. Bienenzeitung** 73:174-184.
- FOSTER, S.P., 1993. Neural inactivation of sex pheromone production in mated light brown apple moths, *Epiphyas postvittata* (Walker). **Journal of Insect Physiology** 39:267–273.
- GIEBULTOWICZ, J.M., RAINA, A.K., UEBEL, E.C. AND RIDGWAY, R.L., 1991. Two-step regulation of sex-pheromone decline in mated gypsy moth females. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 16:95–105
- GRECORC, A. & BOWEN, I.D. 1996. Scanning electron microscopy of the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. **Zb. Vet. Fak. Univ. Ljubljana**, 33(2): 237-44.
- GROOT, A.P. & VOOGD, S. 1954. On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifera* L.) **Experientia**. 10:384-385.

GUIDUGLI K.R., NASCIMENTO A.M., AMDAM G.V., BARCHUK A.R., OMHOLTD S, SIMOES Z.L.P. & HARTFELDER K. 2005 Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. **FEBS Lett.**;579(22):4961-4965.

GUTZEIT, H.O. ZISSLER, D. & FLEIG, R. 1993. Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of pre-vitellogenic ovarian follicles. **Roux's Arch. Dev. Biol.** 202:181-191.

HAGEDORN, H.J.; O' CONNOR, J.D.; FUCHS, M.S.; SAGE, B. SCHAELEGER, D.A. & BOHM, M.K. 1975. The ovary as a source of α -ecdysone in adult mosquitoes. **Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.** 72: 3255-3259.

HAMILTON, W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior, I and II. **J. Ther. Biol.** 7: 1-52.

HARRIS, J.W. & HARBO, J. 1990. Suppression of ovary development of worker honeybees by association with workers treated with carbon dioxide. **J. Apicul. Res.** 29(4): 187-193.

HARTFELDER, K., MAKERT, R.G., JUDICE, C.C., PEREIRA, A.G.G., SANTANA, W.C., DALLACQUA, R., BITONDI, M.M. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie.** 37:144-163

HARTFELDER K, BITONDI MM, SANTANA WC & SIMÕES ZLP. 2002 Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? **Insect Biochem Mol Biol.**;32(2):211-6.

HARTFELDER, K. 2000. Insect juvenile hormone: from status quo to high society. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33(22): 157-177.

HAYDAK, M.H. 1943. Larval food and the development of castes in the honeybee. *J. Econ. Ent.* 36(5):778-792.

HAYDAK, M.H. 1970 Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, 15: 143-156.

HENDZEL, M.J. WEI, Y. MANCINI, M.A. VAN HOOSER, A. RANALDI, T. BRINKLEY, B.R. BAZETT-JONES, D.P. & ALLIS, C.D. 1997 Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma** 106:348-360

HERRMANN, H. 1969. Die Neurohormonale Kontrolle der Paarungsflüge und der Eilegetätigkeit bei der Bienenkönigin. **Z. Bienenforsch.** 9:509-544.

HSU, J.Y. SUN, Z.W. LI, X. REUBEN, M. TATCHELL, K. BISHOP, D.K. GRUSHCOW, J.M. BRAME, C.J. CALDWELL, J.A. HUNT, D.F. LIN, R. SMITH, M.M. & ALLIS, C.D. 2000 Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ip11/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. **Cell** 102:279-291

JIMENEZ, D.R. & GILLIAM, M. 1990 Ultrastructure of the ventriculus of honeybee *Apis mellifera* (L): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell Tissue Res.** 261: 431-43.

JONES, H.E. & BOWEN, I.D. 1993. Acid phosphatase activity in the larval salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. **Cell Biol. Int.** 17: 305-15.

KAATZ, H.H. 1992. Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker bees. **J. Comp. Physiol.** 162: 588-592.

KASZAS, E. & CANDE, W.Z. 2000 Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatic cohesion during mitosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **J. Cell Sci.** 113:3217-3226.

KERR, W.E. 1962. Genetics of sex determination. **Ann. Rev. Entomol.** 7: 157-176.

KOEDAM, D., CONTRERA F.A.L. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1999. Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). **Insectes sociaux.** 46:387-391.

KROPACOVÁ, S.; HASEBACHOVA, H. & NOVAK, V. 1968. Development of honeybee ovaries as affected by narcosis and injection of certain substances. **Sborn. Vys. Zemed. V. Brne** 16:537-543.

KOYWIWATTRAKUL P, THOMPSON GJ, SITTIPRANEED S, OLDROYD BP, MALESZKA R. 2005. Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honey bees, *Apis mellifera*. **J Insect Sci.**;5:36.

KUWABARA, M. 1947. Ueber die Regulation im weisellosen Volke der Honigbiene besonders die Bestimmung des neuen. **Wisels. Jour. Fac. Sci.** 9(4):359-381.

LOCKSHIN, R.A., 1985. Programmed cell death. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (vol. 8). **Pergamon Press Oxford**.

LOCKSHIN, R.A., 2006. Cell death how far we have come. **VI International cell death symposium on the mechanism of cell death in cancer and aging**. Angra dos Reis. Página 15.

MACKENSEN, O. 1947. Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. **J. econ. Ent.** 40:344-349.

MAURIZIO, A. 1954. Pollernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) **Landwirtsch. Jahrb. Schweiz** 62:115-182.

MICHENER, C.D. 1974. **The social behavior of bees: a comparative study**. The Belknap Press of Havard Univ Cambridge, Mass., 404pp.

NEZIS, I.P. STRAVOPODIS, D.J. PAPASSIDERI, I. & MARGARITIS, L.H. 2002 Dynamic of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis. **Cell Tissue Res.** 307: 401-409.

OLIVEIRA, A.P.M.L. 1997. Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomídeos do gênero *Rhodnius*. Dissertação de Mestrado, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

PAES DE OLIVEIRA, V.T., 2005 Relação entre o corpo gorduroso e a vitelogênese em fêmeas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro

PAGE, R.E. & ERICKSON, E.H. 1988. Reproduction by worker honey bee (*Apis mellifera*). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 23: 117-126.

PAIN, J. & VERGE, J. 1950. Contribution à l'étude de l'ovaire des ouvrières d'abeille. *Apiculteur* 94(8) **Sect. Sci.**: 45-55.

PAIN, J. 1955. Physiologie du développement ovarien chez l'ouvrière d'abeille. **Abeille Érable** 24(1):12.

PAIN, J.; BARBIER, M. & ROGER, B. 1967. Dosages individuels des acides céto-9-décène-2-oïque et hydroxy-10 élécène-2-oïque dans les têtes des reines et des ouvrières d'abeilles. **Ann. Abeille** 10:45-52.

PATRÍCIO & CRUZ-LANDIM, 2006. . Ultrastructural aspects of the intercellular bridges between female bee germ cells. **Braz. J. Biol.**, 66(1): 309-315.

PATRÍCIO, K & CRUZ-LANDIM, C. 2002 Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Braz. J. Biol.**, 62(4^a): 641-649.

PATRÍCIO, K. & CRUZ-LANDIM, C. 2003. *Apis mellifera* (hymenoptera, Apini) ovary development in queens and workers from queenright and queenless colonies. *Sociobiology*, 42(3): 771-779.

PAULKE W. 1901. Ueber die Differenzierung der Zellelemente im Ovarium die Bienenkönigin (*Apis mellifica*). **Zool. Jahrb. Anat. Ontog.** 14: 177-202.

PERRON, J.M.; HUOT, L.; CORRIVANET, G.M. & CHIAULA, S.S., 1972. Effects of carbon dioxide on anaesthesia on *Drosophila melanogaster*. **J. Insect Physiol.**, 18:1869-1874.

PFEIFER, V., PEHLMANN, E. & WITSCHER, H. (1974). Kinetics of the accumulation of lead phosphate in acid phosphatase staining. **In: Electron Microscopy and Cytochemistry** 25-28.

PIMENTEL, M.A.L., 1990. **Influência da cria na atividade dos corpora allata e no desenvolvimento dos ovários de abelhas de *Apis mellifera* L. em condições experimentais.** Dissertação (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro. 124pp.

POUX, N. 1967. Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radriculaire de *Cucumis sativus* L. I. Activités phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme. **J. Microsc.** 6: 1043-1058.

PUHLERMANN, K. 1956. Was geht in einem weisellosen Volke vor? **Rhein. Bienenztg.** 107(6):154-157.

RACHINSKY, A. & ENGELS, W. 1995. Caste development in honeybees (*Apis mellifera*): juvenile hormone turns on ecdysteroids. **Naturwiss.**, 82:378-379.

RACHINSKY, A. & HARTFELDER, K. 1991. Differential production of juvenile hormone and its desoxy precursor by corpora allata of honeybees during a critical caste development. **Naturwis.**, 78:270-272.

RACHINSKY, A.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. & HARTFELDER, K. 1990. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last honey bee larvae. **Gen. Comp. Endocr.** 79:31-38.

RACHINSKY, A. 1990. Juvenilhormon und ectysteroide in der kastenentwicklung der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). Tübingen, Diss Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Eberhard Karls-Universität Tübingen.

RAFAELI, A. AND GILEADI, C., 1995. Factors affecting pheromone production in the stored product moth, *Plodia interpunctella*: a preliminary study. **Journal of Stored Products Research** 31:243–247

RAINA, A.K., KINGAN, T.G. AND GIEBULTOWICZ, J.M., 1994. Mating-induced loss of sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantria dispar*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 25:317–327

RATNIEKS, F.L.M. 1995. Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honeybee. **J. Apic. Res.** 34: 31-14.

REGINATO, R.D. & CRUZ-LANDIM, C. 1998. Desenvolvimento ovariano em larvas de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **In Anais do Terceiro Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 122-127.

REGINATO, R.D. & CRUZ-LANDIM, C. 2001. Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. **Inv Develop.**, 39:127-134.

REGINATO, R.D. & CRUZ-LANDIM, C. 2002. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honeybee. **Cell Biol Intern.** 26:343-351.

REGINATO, R.D., 1998. Diferenciação dos ovários em rainhas e operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, apidae): aspectos ultra-estruturais e citoquímicos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.

RIBBANDS, C.R. 1950. Changes in behavior of honey bees following their recovery from anesthesia. **J. Exp. Biol.**, 27:302-10.

RIBBANDS, C.R. 1953. The behavior and social life of honeybees. Bee Res. Ass., London, 352pp.

SAKAGAMI, S.F; BEIG, D.; ZUCCHI, R. & AKAHIRA, Y. 1963. Occurrence of ovary-development workers in queenright colonies of stingless bees. **Rev Bras. Biol.** 23:115-129.

SCHMIDT-CAPELLA, L.C. & HARTFELDER, K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **J. Insect Physiol.** 44: 385-391.

SEELEY, T.D. 1978 Life history strategy of the honeybee *Apis mellifera*. **Oecologia** 32: 109-118.

SHOREY, H.H., MCFARLAND, S.U. AND GASTON, L.K., 1968. Sex pheromones of noctuid moths XIII. Changes in pheromone quantity as related to reproductive age and mating history in females in seven species of Noctuidae (Lepidoptera). **Annals of the Entomological Society of America** 61:372–376

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

SKOWRONEK, W. & JAYCOX, E.R. 1974. Effect of carbon dioxide on worker honey bees. **Pszczel. Zes. Nauk.**, 18:107-119.

SKOWRONEK, W. 1979. Effect of carbon dioxide anaesthesia on the productivity of honey bee queens. **Pszczelnice Zesz. Nauk.** 23:89-96.

SNODGRASS, R.E. 1956 **Anatomy of the honey bee**. Comstock Publ. Ass. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.

SPELIOTES, E.K. UREN, A. VAUX, D. & HORVITZ, H.R. 2000 The surviving-like *C. elegans* BIR-1 proteins acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. **Mol. Cell.** 6:211-223.

TANAKA E.D. & HARTFELDER, K. 2004 The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. **Arthrop Struct Dev** 33(4):431-442

TANAKA, E.D. SCHMIDT-CAPELLA, I.C. & HARTFELDER, K. 2006 Cell death in the germline – mechanisms and consequences for reproductive plasticity in social bees. **Braz. J. Morphol. Sci.** 23(1):15-26.

TANDLER, C.J. AND SOLARI, A.J. 1969. Nucleolar orthophosphate ions. Electron microscope and diffraction studies. **J.Cell Biol.** 41: 91-108.

TARANOV, G.F. 1961. **Biology of the bee colony**. Moskva: Sel'khozgiz.

TASEI, J.N. 1994. Effect of different narcosis procedures on initiating oviposition of prediapausing *Bombus terrestris* queens. **Entomol. Exp. Appl.** 72: 273-279.

VAN HOOSER, A. GOODRICH, D.W. ALLIS, C.D. BRINKLEY, B.R. & MANCINI, M.A. 1998 Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. **J. Cell Sci.** 111:3497-3506.

VELTHUIS, H.H.W. 1970. Queen substance from the abdomen of the honey bee queen. **Physiologie** 70: 21-22.

WARING, P. KHAN, T. & SJAARDA, A. 1997 Apoptosis induced by glioxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. **J. Biol. Chem.** 272, 17929-17936.

WEBSTER, R.P. & CARDE, R.T., 1984. The effects of mating, exogenous juvenile hormone and a juvenile hormone analogue on pheromone titer, calling and oviposition in the omnivorous leaf roller moth (*Platynota stultana*). **Journal of Insect Physiology** 30:113-118

WEI, Y. MIZZEN, C.A. COOK, R.G. GOROVSKY, M.A. & ALLIS, C.D. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:7480-7484.

WASHITAM, I. & SATO, S. (1976). On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. **Protoplasma** 89: 157-170.

WILSON, E.O. 1976. **The insect societies**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge. 548pp.

WYLLIE, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature** 284:555-556.

YOSHIDA, M. USUI, T. TSUJIMURA, K. INAGAKI, M BEPPU, T & HORINOCHI, S. 1997. Biochemical differences between staurosporine-induced apoptosis and premature mitosis. **Exp. Cell Res.** 232:255-239.

ZACARRO A.A. 1993 Comportamento dos complexos sinaptonêmicos durante a espermatogênese e ovogênese de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado, IBRC- UNESP.

Rio Claro 30 de julho de 2009

Bruno Berger
Discente

Carmina da Cruz Landim
Docente

8. ANEXOS