

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO DE MIOSINA-V E CaMKII NO CÉREBRO DA
ABELHA *Apis mellifera*:**

**COMPARAÇÃO ENTRE ZANGÃO, RAINHA E
OPERÁRIAS**

Claudia Tavares dos Santos

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DE MIOSINA-V E CaMKII NO CÉREBRO DA
ABELHA *Apis mellifera*:

COMPARAÇÃO ENTRE ZANGÃO E RAINHA

Claudia Tavares dos Santos

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DE MIOSINA-V E CaMKII NO CÉREBRO DA
ABELHA *Apis mellifera*:**

**COMPARAÇÃO ENTRE ZANGÃO, RAINHA E
OPERÁRIAS**

Claudia Tavares dos Santos

Aprovado pela Banca Examinadora em: 15/1/07 Nota: 10,00



Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola



Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, 15 de Jan de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DE MIOSINA-V E CaMKII NO CÉREBRO DA
ABELHA *Apis mellifera*:**

**COMPARAÇÃO ENTRE ZANGÃO, RAINHA E
OPERÁRIAS**

Claudia Tavares dos Santos

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola
Instituto de Ciências Biológicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em ___/___/___

Prof^a Dr^a Vera Lúcia Brites

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é foi minha força nas horas difíceis e a razão de todas as horas felizes da minha vida.

Aos meus pais Pedro Roberto dos Santos e Regina Maura Tavares dos Santos, meus verdadeiros amigos e incentivadores, que lutaram tanto para realizar meus sonhos.

Ao meu irmão Felipe, que sempre me apoiou e torceu por mim.

Ao meu namorado Norival, pelo amor, cumplicidade e amizade, que sempre esteve comigo, que soube compreender meus momentos de nervosismo e me faz tão feliz.

À Luciana, minha mestre e amiga, que foi fundamental na minha formação, me orientou, me ensinou muitas coisas e confiou em mim.

Ao Prof. Foued, por me receber em seu laboratório, por acreditar em mim e me ajudar a voar mais alto.

Ao Prof. Milton, por me ajudar nas bolsas de IC e muitas vezes me ceder materiais de seu laboratório.

Ao Prof. Marcelo Emílio Beletti, por disponibilizar seu laboratório e equipamentos, sendo tão atencioso.

Ao Prof. Wilson Felipe Pereira, pela autorização para a utilização de seu laboratório.

Ao Prof. Norberto Cairasco e doutorandos Maira Licia e Gabriel Arisi, da USP, por me receber em seu laboratório e me dar várias dicas na histoquímica.

Ao grupo de abelhas do Labibi, Ana Clara, Letícia, Lyvia, Simone e Renata, pelo compartilhamento de aprendizado em nossas reuniões de segunda e pelas reuniões femininas que foram tão importantes para nosso convívio.

À FAPEMIG, pelas bolsas de Iniciação Científica.

Ao Apiário Girassol, por ceder as abelhas.

À todos os amigos do Labibi, que sempre foram atenciosos e me ajudaram, cada um do seu jeito, a realizar esse trabalho.

Obrigada!

Claudia Tavares dos Santos

RESUMO

As abelhas são himenópteros sociais e vivem em colônias permanentes com indivíduos divididos em três castas: rainha, zangão e operárias. A miosina-V é um motor molecular que realiza importantes processos celulares. A CaMKII é conhecida por ser central na coordenação e execução de transdução de sinal mediado por cálcio. O presente trabalho visou analisar a expressão de miosina-V e CaMKII no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias *Apis mellifera*, visando um estudo comparativo dos polipeptídios no cérebro desses indivíduos além de correlacionar esses dados com a morfologia e a localização de zinco. Ensaio bioquímico foram realizados com homogeneizado dos cérebros das abelhas *Apis mellifera* por *Western blot* e eletroforese, e análises histológicas por H.E., impregnação metálica, Nissl e histoquímica. Os resultados mostram a diferença de expressão de miosina-V e CaMKII no cérebro das abelhas, sua localização coincidente com processos sinápticos e a relação entre determinados polipeptídios com as castas e comportamento. Nossos dados também mostram as diferenças morfológicas relacionadas à casta e comportamento e apontam a utilização de técnicas histológicas e histoquímica como importantes ferramentas em estudos comparativos.

Palavras chave: cérebro, abelha, miosina-V, CaMKII.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
<i>Abelha Apis mellifera</i>	1
Histoquímica e morfologia	6
Miosina-V	8
CaMKII	9
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
Coleta de material biológico	12
Dissecação	12
Estudo morfológico	12
Estudo histoquímico	14
Estudo bioquímico	14
RESULTADOS	18
FIGURAS	23
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

INTRODUÇÃO

Abelha *Apis mellifera*

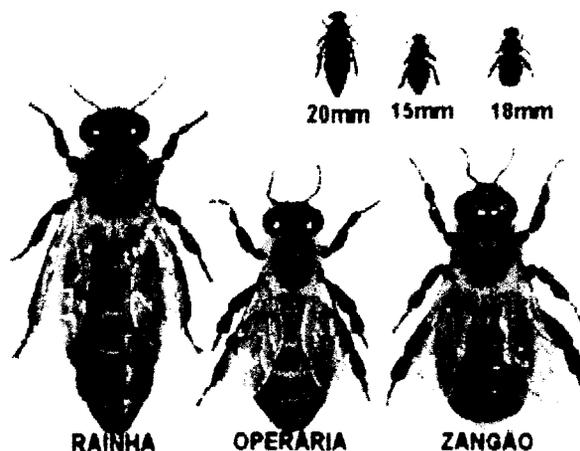
Castas

A abelha *Apis mellifera* é um inseto social e sua colônia é composta de uma rainha, zangões e operárias (Winston, 1979). As primeiras abelhas *Apis mellifera* européias foram introduzidas no Brasil em 1839 pelo Padre Antônio Carneiro. As africanizadas foram trazidas em 1956 pelo Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, sendo uma das espécies de abelha mais conhecida e estudada, principalmente por sua grande importância econômica. Delas são extraídos o mel, a cera, a geléia real, a própolis e outros subprodutos (Camargo e Stort, 1973).

Na colônia, a rainha tem a função de pôr ovos, através de um ferrão modificado em ovopositor e produzir uma substância que inibe a reprodução das operárias, o feromônio (Winston, 1987). Esse feromônio é produzido por uma glândula mandibular, é composto de ácidos aromáticos (Winston e Slessor, 1992) e pode atuar na inibição da biossíntese de hormônio juvenil e do desenvolvimento comportamental (Kaatz *et al.*, 1992), retardando a ontogenia do forrageamento das operárias e regulando a divisão de trabalho (Robinson *et al.*, 1998).

Estes insetos sociais apresentam polifenismo ou formas morfológicas alternativas de fêmeas acompanhadas por diferenças fisiológicas e comportamentais, onde rainhas e operárias são formas alternativas da fêmea adulta (Evans e Wheeler, 2001). Em certos aspectos, as castas nas abelhas representam uma forma de polimorfismo relacionado à reprodução, pelo fato de que operárias são funcionalmente, e até anatomicamente estéreis, criando a prole dos membros dominantes da colônia (Hartfelder, 2000).

Cada colônia apresenta somente uma rainha e caso esta deixe de realizar suas funções, um dos ovos irá receber um tratamento especial, através da alimentação exclusiva de geléia real, produzindo uma nova rainha para a colônia (Winston, 1987). Com relação ao zangão, sabe-se que possui um tempo de vida variando entre 20 e 40 dias (Fukuda e Ohtani, 1977), e que tem a única função de fecundar a rainha. Para isso, exhibe intensa adaptação comportamental e morfológica (Michener, 1944). Seus olhos e antenas são especializados para ver e perseguir-la, sendo que a maioria dos seus órgãos internos é arranjada de maneira especial para permitir um vôo mais rápido de modo que possa alcançar a rainha durante o vôo nupcial e injetar seu esperma (Winston, 1987). Além disso, não participa da divisão de trabalho da colônia (Giray e Robinson, 1996).



O sistema social das abelhas é caracterizado pela divisão de trabalho entre as abelhas operárias, um processo baseado na idade, mas altamente regulado. As operárias realizam tarefas definidas em resposta a programas genéticos pré-estabelecidos que podem ser adaptados a qualquer momento às mudanças nas necessidades da colônia. Vários sistemas fisiológicos estão envolvidos no controle do comportamento. A produção de vitelogenina, uma proteína envolvida na reprodução que é expressa pelas operárias jovens se correlaciona com a estratégia de forrageamento da colônia (Amdam *et al.*, 2004). Fatores neuronais também regulam a divisão de trabalho. *Amfor*, um gene que codifica a proteína quinase dependente de GMPc, está envolvido na regulação do forrageamento (Robinson *et al.*, 2005). Apesar disso, uma correlação entre a expressão do gene e o comportamento social não qualifica esse gene como “social”. De fato, o sistema efetor do GMPc é conhecido por controlar a alimentação em insetos solitários. Assim, vias de sinalização conservadas podem ser adaptadas para novas exigências em um sistema social (Menzel *et al.*, 2006).

As operárias podem ser divididas conforme a função exercida dentro da colônia, com expectativa de vida de 12 a 130 dias, dependendo da localização geográfica, estação do ano e do genótipo (Winston, 1979). Nos primeiros dias de vida, só executam serviços de faxina e, quando as glândulas que produzem geléia real já estão desenvolvidas, trabalham como nutrizas (operárias nutridoras), alimentando as larvas. Quando começam a produzir cera, estão aptas a assumir tarefas como a construção dos favos e, por último, quando desenvolvem as glândulas de veneno e do cheiro, as operárias exercem funções de guarda, sinalização e forrageamento (operárias campeiras) (Winston, 1987). Em paralelo com essa mudança de papel dependente da idade, mudanças fisiológicas ocorrem em certos órgãos das operárias (Winston, 1987).

A abelha *Apis mellifera* é um valioso organismo a ser estudado por sua importância econômica: para a agropecuária, para a área da saúde e para as ciências biológicas. Estudos

com *A. mellifera* tem valor agregado e representam um passo inicial para a compreensão de processos biológicos fundamentais tais como: desenvolvimento ontogenético, formação de casta, aprendizagem e memória, envelhecimento, transporte e motilidade celular, biossinalização e outros (Huang, 2003). Seu genoma já foi revelado (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) trazendo informações importantes sobre esses indivíduos que contribuem em grande escala na apicultura e são de grande relevância para a economia e para a ecologia devido ao seu papel como polinizadores (Nunes *et al.*, 2004).

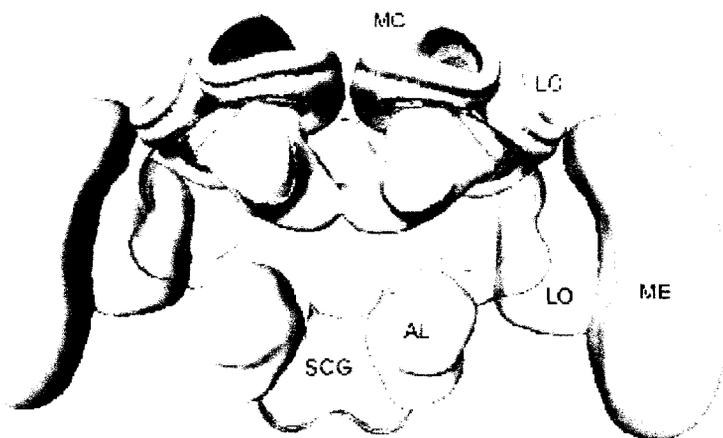
Sistema nervoso

As abelhas garantiram seu sucesso adaptativo por possuírem um sistema sensorial eficiente, baseado em um sistema nervoso composto por cérebro e cordão nervoso ventral (Oleskevick e Clements, 1997). Essa eficiente simplicidade faz com que elas sejam consideradas um modelo neurobiológico para estudos de aprendizagem e memória comportamental aos níveis celular e molecular (Giurfa *et al.*, 2001). Seu cérebro é dividido em três regiões: protocérebro na região anterior, compreendido pelos lobos ópticos e os corpos de cogumelo; o deutocérebro formado pelos lobos antenais; e o tritocérebro, abaixo do deutocérebro, aparecendo reduzido no adulto (Snodgrass, 1956).

As abelhas com sua capacidade de aprendizagem e um sistema nervoso tão simples, são um bom modelo para estudos dos mecanismos básicos da formação e evocação de memória. A abelha pode formar uma memória olfatória duradoura com a aprendizagem de uma simples trilha (Menzel, 1990). Podem memorizar uma via através de labirintos e aprender a discriminar entre padrões visuais (Menzel, 2001).

O sistema nervoso dos insetos, como nos vertebrados, possui neurônios em um sistema nervoso central, dentro do qual passam nervos sensoriais e a partir do qual são enviados sinais sensoriais e motores. Além disso, ambos, insetos e vertebrados, têm um sistema nervoso visceral especializado associado a seus órgãos internos. Embora insetos e vertebrados apresentem seus cérebros contidos em cápsulas, o cordão nervoso do vertebrado é dorsal, enquanto o do inseto é ventral (Robinson *et al.*, 1997).

No protocérebro localizam-se estruturas bilaterais e especializadas denominadas *mushroom bodies*, *corpora pedunculata* ou corpos de cogumelo. Elas recebem informações de diferentes áreas do cérebro, como do lobo antenal e do lobo óptico, e são estruturas essenciais para a associação e integração das informações recebidas. Os estímulos chegam pelos cálices e são distribuídos pelos lobos alfa e beta, localizados no pedúnculo (Cayre, 1998).



Menzel *et al.*, 2006

O cérebro de uma abelha adulta possui, aproximadamente, um volume de 1 mm^3 com 960.000 neurônios dispersos nessa massa neural (Menzel e Giurfa, 2001). Dentre esses neurônios estão as células Kenyon que podem ser subdivididas em três tipos: compactadas internas, compactadas externas e não-compactadas. As compactadas internas têm um corpo celular muito pequeno e estão empacotadas na região central do cálice dos corpos de cogumelo, enquanto as não-compactadas estão dispersas no restante dos cálices. Já as compactadas externas têm um tamanho e aparência similar às compactadas internas, mas estão no lado externo dos cálices (Capaldi *et al.*, 1999).

Os corpos de cogumelo são os supostos sítios de armazenamento de memória nos cérebros de insetos (Hammer e Menzel 1995). Oleskevich e colaboradores em 1997 mostraram que a potenciação de longa duração da conexão monossináptica em cérebro de abelha é similar àquela que ocorre em vertebrados, reforçando a analogia entre os corpos de cogumelo de insetos e o hipocampo dos vertebrados, no que diz respeito à indução e consolidação de memórias. Cada corpo de cogumelo possui dois cálices que contêm neurônios intrínsecos, células Kenyon (aproximadamente 170.000 por hemisfério cerebral), arranjados de maneira altamente organizada (Oleskevich e Clements, 1997).

Os corpos de cogumelo do cérebro de uma abelha operária são relativamente maiores quando comparados com os de outros insetos não-sociais, sugerindo que essas estruturas desempenham alguma regulação na vida social (Dujardin, 1950). O aumento da complexidade estrutural dos corpos de cogumelo de abelhas pode estar relacionado com a variedade de sinais sensoriais que elas podem processar e a habilidade das operárias de executar funções tão diversas, associadas a transmissores químicos que operam em seu circuito sináptico (Kamikouchi, 2000).

Cada corpo de cogumelo consiste de duas subunidades, os cálices medial e lateral, fundidos em um pedúnculo e, posteriormente em dois lobos (alfa e beta). Cada cálice é subdividido em três regiões quanto à morfologia e o tipo de impulso aferente: lábio, recebe informações olfatórias pela projeção dos neurônios dos lobos antenais; colar, recebe impulsos vindos dos lobos ópticos; e basal, que recebe um misto de impulsos sensoriais olfatórios e visuais (Moobs, 1982).

O sistema ocelar da abelha compreende-se de ocelos e olhos compostos. A estrutura dos olhos compostos é formada de um grande número de unidades oculares denominadas omatídeos, cobertos externamente por uma córnea cuticular. O lobo óptico das abelhas é uma massa de fibras e células nervosas, presentes em três gânglios sinápticos internos: lâmina, medula e lóbula, nos quais existem receptores sinápticos específicos para as projeções de axônios enviados de fotorreceptores da retina. A retina é formada por elementos ópticos, células pigmentadas e fotorreceptores, arranjados em aproximadamente 4.000 omatídeos (Nässel *et al.*, 1986).

Os neurônios da medula terminam no colar do corpo de cogumelo, onde se agregam em cinco camadas que se alternam. A região basal do corpo de cogumelo recebe os neurônios terminais da medula. Já os neurônios da lóbula são mais proeminentes na região basal, onde terminam. Tanto a região basal, quanto o colar dos corpos de cogumelo recebem impulsos vindos dos gânglios sinápticos internos do lobo óptico (Ehmer e Gronenberg, 2002).

O lobo antenal possui neurônios receptores de estímulos olfatórios captados pelas antenas. Esses estímulos são distribuídos para o lobo óptico e corpos de cogumelo, os quais enviam o sinal para neurônios descendentes, que induzirão uma resposta comportamental tanto na região da cabeça, como no tórax e abdômen (Nässel, 1986).

No lobo antenal estão presentes 156 glomérulos, considerados regiões de sinapses (Nässel, 1986), envoltos por corpos celulares que possuem projeções de axônios vindas da antena mecanossensorial e de dendritos vindos dos neurônios motores (Kloppenburger, 1995). Essa estrutura corresponde ao bulbo olfatório em vertebrados (Lancet, 1986).

Comparando os glomérulos das operárias campeira e nutridora, observou-se que a primeira apresenta maior volume (Withers *et al.*, 1993). É possível que a função desempenhada pela abelha campeira na colônia justifique o aumento do volume glomerular (Sigg *et al.*, 1997). Além disso, a maturação anatômica do sistema nervoso da abelha e a demanda comportamental do sistema olfatório, influenciam o desenvolvimento do adulto (Ray e Ferneyhough, 1997).

Histoquímica e morfologia

O método histoquímico para metais pesados, descrito inicialmente por Timm, em 1958 (Danscher, 1984), também denominado de método do sulfeto de prata de Timm, tem sido extensivamente utilizado para a visualização de metais de transição e metais do grupo IIb, em secções de tecido (Danscher, *et al.*, 1987; Hauag, 1973; Santos, 1999). Entre os metais que podem ser detectados por esse método estão o cobre, o ferro, o zinco, o cobalto e o níquel, bem como metais tóxicos como mercúrio, cádmio, chumbo, arsênio, bismuto, tálio, ouro e prata (Danscher, 1981).

A revelação da técnica de Neo-Timm é realizada utilizando-se um banho contendo nitrato de prata. A prata reage com o zinco precipitado nos tecidos pelo sulfeto, formando um composto visível de coloração marrom, o qual pode variar sua tonalidade de acordo com a quantidade de zinco presente no tecido e com o tempo de exposição do tecido ao banho. O zinco precipitado nos tecidos, quando revelado pela histoquímica de Neo-Timm, assume uma coloração marrom, sendo sua intensidade diretamente proporcional à concentração do íon. Assim, regiões com grande concentração de zinco coram-se fortemente em marrom. Regiões de baixa concentração exibem coloração tênue (Féres, 2003).

O processo se baseia na transformação dos metais, presentes no tecido, em sulfetos de metais, utilizando-se uma solução de sulfeto de sódio. O sulfeto reage com os metais presentes no tecido e se depositam sob a forma de sulfetos de metais nas regiões de origem (Zimmer, 1974).

Os sulfetos de metais catalizam a redução de íons de prata presentes na solução de desenvolvimento físico através de uma molécula doadora de elétrons (molécula redutora). A prata reduzida liga-se aos sulfetos de metais e é capaz assim como eles, de catalizar a redução de mais íons prata para prata metálica. Assim, o processo pode continuar até que a densidade dos grânulos de prata se torne visível. Como a prata se deposita nos locais onde estão presentes os sulfetos, é muito provável que a visualização da prata corresponda aos locais do tecido onde os metais pesados podem ser encontrados (Danscher, 1981).

O doador de elétrons utilizado no método de Timm é a hidroquinona, pois ela apresenta uma velocidade de redução moderada a um pH relativamente baixo e também uma tendência para redução não-específica e auto-catalítica suprimida (Danscher, 1981).

A goma arábica é utilizada para prevenir que a prata seja imediatamente reduzida pela hidroquinona e, por isso, é utilizada no desenvolvimento físico para estabilizar a solução funcionando como um “colóide protetor”. Essa proteção parece estar associada à combinação

dos íons prata com os grupos polissacarídeos disponíveis nesse produto natural (Santos, 1999).

Sabe-se que as principais regiões do sistema nervoso são coradas pela histoquímica de metais pesados, preponderantemente na substância cinzenta. O tamanho, a distribuição intracelular e a densidade de empacotamento das partículas reveladas pelo método de Timm diferem entre as regiões e entre os tipos de neurônios dentro de cada região (Hauag, 1973). Embora as regiões do hipocampo que recebem as terminações das fibras musgosas sejam as áreas mais intensamente coradas no cérebro, também há marcação em terminais da amígdala, córtex e tálamo (Hamani *et al.*, 2005).

Essa técnica permite evidenciar a localização e as quantidades de metais pesados em vários sistemas, caracterizando-a como importante método para o estudo do sistema nervoso central. No entanto, não permite quantificar a concentração de um metal específico no tecido, devido à ocorrência de falso-positivos, como também não é específica para o zinco, provavelmente porque a desnaturação alcoólica das proteínas do tecido cause a liberação de cobre e outros metais, já que se usa como fixador o álcool etílico com ácido sulfúrico (Danscher *et al.*, 1997).

O método Neo-Timm (Mello *et al.*, 1993) é uma modificação do tradicional método de Timm (1958) a fim de aumentar a especificidade da marcação de zinco e promover, desta forma, uma melhor visualização do sistema de fibras musgosas em vertebrados (Babb *et al.*, 1991).

Com o uso da técnica modificada é possível visualizar os grânulos de sulfetos metálicos precipitados dentro da célula e localizados quase que totalmente nos campos terminais pré-sinápticos (Ikegaya *et al.*, 1997). As substâncias coráveis parecem estar associadas com áreas próximas às sinapses, talvez confinadas aos botões terminais, como demonstrado no hipocampo de vertebrado (Hauag, 1973), e com os botões sinápticos, estruturas pós-sinápticas ou processos gliais a eles associados (Zimmer, 1973). Além disso, os núcleos raramente são corados (Danscher, 1981).

O método de Nissl utiliza o cresil violeta, um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl (ou substância de Nissl). Esses corpúsculos são compostos, basicamente, por RNA. Dessa maneira, tal coloração serve como indicador da viabilidade neuronal, pois, quando da ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer (fenômeno conhecido por cromatólise) (Scorza, 2005).

Uma técnica comum para se investigar a morfologia celular no sistema nervoso é a impregnação por prata, a qual revela todas as células nervosas e seus prolongamentos contidos em uma secção. Assim, a forma dos corpos neuronais, bem como o número e tamanho dos prolongamentos que emergem dele podem ser visualizados (Peters, 2007).

Miosina-V

O citoesqueleto desempenha papel mecânico de suporte, estabelece e modifica a forma das células, além de ser responsável por movimentos celulares como contração, formação de pseudópodes e deslocamento intracelular de organelas, cromossomos, vesículas e grânulos diversos (Mermall *et al.*, 1998). O citoesqueleto compõem-se de microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.

As miosinas participam de vários eventos celulares, desde a contração muscular; passando pelo transporte de vesículas, organelas e RNAm; até ancoragem e estabilização de esteriocílios, entre outros (Mermall *et al.*, 1998). Miosinas da classe V são motores moleculares conservados evolutivamente, sendo encontradas em plantas, leveduras, nematóides e vertebrados, incluindo o ser humano (Reck-Peterson *et al.*, 2000).

A miosina-V é composta por duas cadeias pesadas idênticas formando um dímero que pode ser dividido em três módulos distintos (Cheney *et al.*, 1993). Começando pela região N-terminal, tem-se o domínio cabeça/pescoço, o segundo módulo contém o domínio cauda proximal/medial, e o terceiro, o domínio cauda distal/globular (Langford, 2002). A cabeça globular do domínio cabeça/pescoço contém sítios ligantes de ATP e actina, sendo considerado o domínio motor pela capacidade de quando ligado a actina, converter a energia liberada pela hidrólise do ATP em trabalho mecânico, movimentando-se. O domínio pescoço é considerado o domínio regulatório, e contém seis repetições de uma seqüência denominada “motivos IQ”, sítios de ligação de calmodulina e cadeias leves de 23 kDa e 17 kDa. O domínio cauda, região C-terminal, subdivide-se em três subdomínios: cauda proximal formada por segmentos curtos de alfa-hélice dupla (*coiled-coil*), que são responsáveis pela dimerização das duas cadeias pesadas; cauda medial, região de estrutura variável, contendo segmentos globulares alternados com segmentos em alfa-hélice duplos; cauda globular, região menos conservada entre os membros da classe V, cuja função é fazer a interação da miosina-V com outras proteínas, vesículas e organelas (Reck-Peterson *et al.*, 2000).

Estudos de imunolocalização e imunodeteção feitos em cérebro de *A. mellifera*, sondando formas larvais e adultas, mostram que a miosina-V, a DLC e sinaptotagmina, uma proteína integrante do conjunto protéico SNARE (que postula que toda vesícula de transporte

contém proteínas específicas em sua superfície) está presente em cérebro de abelha (Moraes, 2005). Neste estudo, mostrou-se que a miosina-V localiza-se preferencialmente nos lobos ópticos e corpos de cogumelo, reforçando as suposições de que estes sejam os centros de processamento de informação e memória das abelhas; resultado também apresentado por Passos-Lima (2001) e por Peixoto (2002). Em 2003, Silva e colaboradores, sondando fração enriquecida em sinaptossomas de cérebro de *A. mellifera*, observaram marcações para miosina-V, miosina-VI, sinaptofisina e clatrina em várias regiões. Porém, em análise imunohistoquímica, as células Kenyon dos corpos de cogumelo foram reconhecidas somente por miosina-V, sinaptofisina e clatrina. Sugerindo assim, a associação destas proteínas de vesícula com a miosina-V, em áreas relatadas como centros de integração sensorial.

Assim, as evidências publicadas até agora, sugerem que a miosina-V, através de seu domínio carboxi-terminal interage com uma gama de outras proteínas envolvidas em diversos processos celulares (Nascimento *et al.*, 1997). Estas observações sugerem, de fato, um papel geral e essencial para a miosina-V como um transportador de vesículas e organelas em terminais nervosos e no intrincado mecanismo de transmissão sináptica.

CaMKII

A CaMKII é conhecida como uma central de coordenação e execução de transdução de sinais mediados por cálcio. Os substratos fosforilados pela CaMKII estão implicados em importantes processos celulares e, principalmente, nas modificações dependentes de sinapses das funções neuronais que estão por trás de complexas respostas cognitivas e comportamentais, incluindo aprendizagem e memória. A CaMKII compreende uma família de enzimas com 28 isoformas similares que são derivadas de quatro genes (α , β , γ e δ), as subunidades α e β são as formas predominantes em cérebro (Lisman *et al.*, 2002). A holoenzima CaMKII tem uma arquitetura única, apresentando 12 domínios funcionais, divididos em dois grupos de seis, que consistem nas subunidades α e β . Cada subunidade contém um domínio catalítico, um regulatório e um associativo (Lisman *et al.*, 2002).

A regulação da atividade da CaMKII envolve um domínio auto-inibitório que atua como um pseudosubstrato no estado basal (ausência de cálcio/calmodulina), ocupando o sítio catalítico da quinase, inibindo sua ligação à outros substratos. Como a região ligante de calmodulina e o domínio auto-inibitório são sobrepostos, a ligação de calmodulina (que requer a presença de cálcio) é necessária para deslocar esse domínio e tornar a subunidade ativa. Através desta interação com uma seqüência alvo que sobrepõe o domínio catalítico, o

complexo cálcio/calmodulina atua liberando o bloqueio. Uma vez ativada, a CaMKII não só fosforila outras proteínas como demonstra também uma proeminente auto-fosforilação (Meyer *et al.*, 2000).

Estudos feitos através do isolamento de fragmentos de cDNA que codificam homólogos de CaMKII, os genes do receptor de IP3 e PKC analisaram a expressão de genes na transdução de sinal mediados por cálcio no cérebro de abelha. Verificaram através de hibridização *in situ*, que a CaMKII e o receptor IP3 se expressam preferencialmente nas células Kenyon, sugerindo assim a função do cálcio intracelular na transdução de sinal aumentando a atividade destas células, em comparação com outros tipos celulares encontrados em cérebro de abelha (Kamikouchi *et al.*, 1998, 2000).

A aprendizagem em abelhas pode ser comparada a dos vertebrados de muitas maneiras, portanto, as abelhas servem como modelo para se entender os níveis de complexidade das funções cognitivas e seus substratos neurais. As possibilidades apresentadas pelo avanço tecnológico aplicado a novas técnicas de estudo, podem esclarecer quais são as limitações específicas do cérebro de abelha quando comparado a cérebros maiores em termos de estrutura e fisiologia, revelando assim, um potencial ainda não explorado no mini cérebro deste inseto (Giurfa, 2003).

Tendo em vista a importância da abelha *Apis mellifera*, seu sistema nervoso, suas características sociais e a divisão de trabalho, casta e sexo, neste trabalho nós buscamos caracterizar a presença de miosina-V e CaMKII no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora, correlacionando com a presença de zinco nos terminais sinápticos e com a morfologia diferenciada de regiões específicas do cérebro.

OBJETIVOS

- ✓ Realizar estudo histológico do cérebro através da coloração H.E, Nissl e impregnação metálica;
- ✓ Determinar a distribuição de zinco através da histoquímica Neo-Timm no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora;
- ✓ Comparar o perfil protéico das proteínas do cérebro das abelhas rainha, zangão, pupa e operárias campeira e nutridora *Apis mellifera*;
- ✓ Analisar a expressão de miosina-V e CaMKII no homogeneizado dos cérebros das abelhas;
- ✓ Imunolocalizar a miosina-V e a CaMKII no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora;
- ✓ Analisar os dados bioquímicos e histológicos visando um estudo comparativo do cérebro das abelhas em relação à casta e ao comportamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material biológico

Neste trabalho, utilizamos abelhas zangão e rainha *Apis mellifera* que foram fornecidas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro e rainhas, zangões e operárias nutridoras e campeiras *A. mellifera*, fornecidas pelo Apiário Girassol Ltda, de Uberlândia-MG.

Dissecação

Inicialmente, as abelhas foram anestesiadas em gelo e, a seguir, fixadas em placa de Petri contendo parafina, com o auxílio de alfinetes entomológicos. Adicionou-se uma quantidade de tampão fosfato suficiente para cobrir o material, mantendo-o em condições fisiológicas e facilitando o processo de remoção do cérebro.

A remoção foi feita com auxílio de material adequado (pinças e tesoura oftalmológica). Os cérebros das abelhas foram dissecados no plano sagital mediano e imediatamente após a dissecação, o material foi imerso em nitrogênio líquido e armazenado em microtubos no ultrafreezer à -80°C ou imersos em solução fixadora.

Estudo morfológico

Hematoxilina e Eosina (H.E.) e contagem de células

A fixação dos tecidos foi feita segundo Mc Lean e Nakane (1974). Os cérebros foram mantidos em solução fixadora periodato-lisina-paraformaldeído contendo paraformaldeído 4% por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool etílico absoluto por 1 hora com três trocas a cada 20 minutos e 1 hora no xilol com duas trocas de 30 minutos. A seguir foram emblocados em parafina líquida permanecendo em moldura até a secagem. Cortes de 8 µm foram montados em lâmina pré-tratada com gelatina 0.2% e, posteriormente, desparafinizados em 3 banhos de xilol, o primeiro de 10 minutos, o segundo de 5 minutos e o terceiro de 30 segundos, e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (3 banhos no álcool etílico absoluto, um banho no 95%, um no 85% e um no 70%, 30 segundos cada), água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. As secções foram imersas em Hematoxilina-Harris por 15 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram imersos na

solução de Eosina por 12 segundos e enxaguados rapidamente em água destilada (aproximadamente 3 segundos). Os cortes passaram por uma bateria de álcool etílico (70%, 85%, 95% e 3 vezes 100%) e xilol 3 vezes por 30 segundos cada. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Entelan e lamínula.

A contagem de células foi realizada à partir da fotomicrografias do cérebro das abelhas *Apis mellifera* corados com H.E. utilizando-se o programa HLImage. O teste Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar se a amostra possuía distribuição normal. Para as amostras que apresentaram distribuição normal foi empregado o teste t e para as amostras que apresentaram distribuição não-normal foi aplicado o teste Wilcoxon para se comparar estatisticamente os resultados utilizando-se o programa S-plus.

Nissl (Klüver e Barrera, 1953)

Os tecidos foram fixados em solução de Carnoy (álcool etílico 60%, clorofórmio 30%, ácido acético glacial 10%) com sulfeto de sódio 1.2% por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool etílico absoluto por 1 hora com três trocas a cada 20 minutos e 1 hora no xilol com duas trocas de 30 minutos. Os tecidos foram emblocados em parafina líquida para serem cortados em micrótomo. Cortes de 8 µm foram montados em lâminas previamente tratadas com solução contendo gelatina 0.5% e bicromato de potássio 0.05%. As secções foram incubadas em solução contendo violeta de cresila, pH 3.9, por 40 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada por 1 minuto e desidratados em álcool em concentrações crescentes (50%, 70%, 100%), finalizando com incubação em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram montadas com Entelan e lamínula.

Impregnação metálica (Behmer *et al.*, 1986)

Após a dissecação dos cérebros, estes foram fixados em álcool absoluto acrescido de amônia, mantendo-os em imersão por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, os tecidos foram desidratados em álcool etílico absoluto por 1 hora com três trocas a cada 20 minutos e 1 hora no xilol com duas trocas de 30 minutos. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em parafina líquida à 56 °C por 30 minutos. A seguir foram colocados em formas plásticas contendo parafina líquida onde permaneceram *overnight*. Secções de 8 µm foram colocadas em lâminas previamente tratadas com cola 0.5%. As lâminas foram tratadas em solução de nitrato de prata 1.5% a 37°C no escuro por 05 dias. Foram feitos controles negativos com a omissão do nitrato de prata. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por duas horas. Os cortes foram tratados com solução contendo hidroquinona 2% em formalina 5% por

01 dia. Seguiu-se a desidratação em álcool (50%, 70%, 100%) por 5 minutos cada, clareamento em xilol (5 minutos) e montagem das lâminas com Entelan e lamínula.

Estudo histoquímico

Método histoquímico Neo-Timm

As lâminas foram previamente tratadas com solução contendo 0,5% gelatina e 0,05% bicromato de potássio. Os tecidos foram fixados em solução Carnoy (60% álcool etílico, 30% clorofórmio, 10% ácido acético glacial) com 1,2% sulfeto de sódio por 1 hora e 30 minutos, desidratados em álcool etílico 100% por 1 hora, imersos em xilol por 1 hora e incluídos em parafina.

Cortes de 8 μ m foram incubados em solução de desenvolvimento físico contendo 60% goma arábica, 10% tampão citrato, 30% hidroquinona e 0,5% nitrato de prata à temperatura ambiente. O tempo de incubação foi de 2 horas. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados em álcool etílico 50%, 70% e 100%, 5 minutos cada, imersos em xilol por 5 minutos e as lâminas foram montadas com Entelan e lamínula.

Estudo bioquímico

Homogeneização do tecido

Os microtubos contendo o cérebro do indivíduo foi retirado do ultrafreezer à -80°C e, imediatamente, colocados em nitrogênio líquido até o momento da homogeneização. Os cérebros das abelhas foram homogeneizados em gelo, em tampão de extração de miosina-V (Cheney *et al.*, 1993) contendo 40 mM HEPES pH 7,7, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM benzamida, 0,1 M aprotinina e 0,1 mM PMSF, utilizando-se um homogeneizador potter-Elvehjen.

Para as amostras utilizadas no perfil protéico acrescentou-se um volume de 500 μ L de tampão de homogeneização em cada microtubo e homogeneizou-se por dois minutos, sendo duas séries de um minuto no gelo.

Dosagem de proteína

A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada utilizando-se como padrão a concentração protéica de BSA (Bradford, 1976). As determinações foram feitas em duplicatas ou triplicatas e a absorbância medida em espectrofotômetro a 595 nm.

Fez-se uma curva padrão de BSA (0.1 mg/mL) em concentrações crescentes variando de 2 a 20 µg. A concentração final de proteína total em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão, obtida utilizando-se o programa EXCEL (Microsoft Office 97).

Pontos	Água (µL)	BSA (µL)	Bradford (mL)	Tampão de homogeneização (µL)
Branco	195	0	3	5
2	175	20	3	5
4	155	40	3	5
8	115	80	3	5
12	75	120	3	5
16	35	160	3	5
20	0	195	3	5

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

O sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973) foi utilizado, com. géis gradiente de acrilamida de 5 a 22% e no empilhamento de 3%. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0.7%, tampão de separação 360 mM pH 6.8 (Tris-base 45.38%, 6N HCl 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6.8 (Tris-base 15.32% e HCl 12N 10%), SDS 0.12%, acrilamida/bisacrilamida (30:1.6) a 3%, TEMED 0.006% e PSA 0.150%.

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

Western blot (Towbin et al., 1979)

As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de de nitrocelulose 0.45 µm em corrente constante de 100 mA por 2 horas, utilizando-se tampão eletroblot (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina e metanol 40%). Após a transferência,

as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 0.5% (Ponceau 0.2% em ácido tricloroacético 3%) por quinze minutos e descoradas com água destilada.

Imunodeteccção

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% e PBS-T) por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS-T, 3 vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário anti-miosina-Va (sonda para o domínio cabeça) e anti- α -CaMKII, diluído em PBS-T a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Essa incubação foi feita *overnight* à temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram lavadas em PBS-T, 3 vezes de 5 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo conjugado com peroxidase, diluído em PBS-T por 4 horas. A reatividade dos anticorpos foi detectada por quimioluminescência, seguindo o protocolo ECL.

Imunohistoquímica

Os cérebros das abelhas *Apis mellifera* foram fixados em solução fixadora periodato-lisina-paraformaldeído contendo paraformaldeído 4% segundo o protocolo de McLean e Nakane (1974) por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool etílico absoluto por 1 hora com três trocas a cada 20 minutos e 1 hora no xilol com duas trocas de 30 minutos. A seguir, foram incubados em parafina líquida à 56°C na estufa por 30 minutos e incluídos em formas plásticas permanecendo *overnight* para secar.

Cortes de 5 μm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com gelatina 0.2%. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas com 1 banho de xilol por 10 minutos e banhos em álcool etílico 100%, 70%, 50% por 5 minutos cada. Em seguida foram colocadas em água destilada por 5 minutos.

Após a hidratação, as secções foram submetidas ao bloqueio com água oxigenada 4,5% em solução de tampão fosfato pH 7.4, por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida lavadas com água destilada. As lâminas foram incubadas em couplin plástico com 10 mM tampão citrato pH 6.0 (10 mM ácido cítrico) e submetidos à recuperação antigênica através do método de aquecimento numa panela à vapor por 15 minutos.

As secções foram incubadas com tampão Tris-glicina por 30 minutos em câmara úmida e à temperatura ambiente. Em seguida, foram bloqueadas com tampão B (20 mM fosfato de sódio, pH 7.4 contendo 0.4 M NaCl e Triton X-100 0.3%) acrescido de leite desnatado 5% por 4 horas. Após o bloqueio, as secções foram incubadas com o anticorpo primário anti-miosina-Va (sonda para o domínio cabeça) e anti- α -CaMKII *overnight*, à

temperatura ambiente. Foram feitos controles negativos com a omissão dos anticorpos primários, permanecendo a solução bloqueio nos corte.

As secções foram lavadas com tampão B por 1 hora e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo conjugados com peroxidase por 45 minutos à temperatura ambiente e em câmara úmida. Após a incubação, as secções foram lavadas com tampão B por 1 hora.

A revelação da peroxidase foi feita utilizando-se o Kit DAB (Sigma Chemical). A reação foi interrompida com água após 12 minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina Harris por, aproximadamente, 3 segundos e, posteriormente, lavando-se em água corrente por 10 minutos. As lâminas foram desidratadas em álcool etílico 50%, 70% e 100% por 5 minutos cada e em xilol, também 5 minutos. As lâminas foram montadas com Entelan (Merck) e lamínula.

RESULTADOS

Estudo morfológico do cérebro das abelhas *Apis mellifera* por H.E.

A análise morfológica revelou o mesmo padrão de distribuição das regiões constituintes nos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora (fig. 01).

As regiões constituintes do lobo óptico foram mostradas em corte histológico (fig. 01 A, D, G, I). Os corpos de neurônios monopolares, se localizaram na lâmina de forma ordenada e compactada. Na medula e na lóbula, a distribuição dos neurônios, assim como na lâmina, encontrou-se homogênea e ordenada. No zangão e rainha, nota-se maior número de omatídeos na retina, em comparação com as operárias.

Nos corpos de cogumelo (fig. 01 B, E, H, K) foi possível distinguir as células Kenyon compactadas internas, não compactadas e compactadas externas. Além dessas, as regiões do cálice (lábio, colar e basal) e o pedúnculo também foram identificados. Nos lobos antenais (fig. 01 C, F, I, L), foi possível distinguir os interneurônios glomerulares e os glomérulos.

A contagem de células foi analisada pelo programa S-plus empregando-se os testes t e Wilcoxon. Foram analisadas a área, o perímetro e o número de células dos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo. Devido ao pequeno número de amostras não foi possível obter resultados significantes ($p < 0.05$), somente a área do lobo óptico apresentou distribuição normal (tabela 01).

Estudo morfológico do cérebro da abelha *Apis mellifera* por coloração de Nissl

A análise por coloração de Nissl mostrou o mesmo padrão de localização dos corpos neuronais (corados em azul), porém revelou diferenças no tamanho, quantidade e arranjo dos corpos de neurônios nas abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora (fig. 02).

Nos lobos ópticos (fig. 02 A, D, G) observou-se a retina, camada fenestrada, lâmina, quiasma externo, medula, quiasma interno e lóbula, exceto em rainha, pois os cortes estavam lesionados. Pôde-se observar que a retina da rainha apresentou-se mais espessa (fig. 02 A).

Nos corpos de cogumelo (fig. 02 B, E, H), as células Kenyon compactadas internas apresentaram-se, visualmente, bem mais numerosas na rainha (Fig. 02 B) e nutridora (fig. 02 H) do que nas operárias (fig. 02 E), além das células Kenyon não compactadas que se mostraram maiores e mais arredondadas.

Os interneurônios glomerulares foram observados no lobo antenal (fig. 02 C, F, I), envolvendo os glomérulos não corados. Em operária campeira (fig. 02 F), os interneurônios

estavam mais dispersos e degradados, comparado com nutridora (fig. 02 I). Na rainha (fig. 02 C) os interneurônios apresentaram-se, visualmente, mais abundantes, maiores e mais globulares.

Estudo morfológico do cérebro das abelhas *Apis mellifera* por coloração pela prata

A análise histológica da secção horizontal do cérebro de rainha, zangão e operárias campeira e nutridora, impregnados com prata (fig. 03), revelou componentes do tecido como os corpos de cogumelo, lobo óptico e lobo antenal, evidenciando nas neurópilas as neurofibrilas.

Com essa metodologia foi possível visualizar as regiões do lobo óptico bem definidas, como a retina, a lâmina, o quiasma externo, a medula, o quiasma interno e a lóbula, que também impregnaram-se diferencialmente (fig. 03 A, D, G). Na lâmina observaram-se os corpos neuronais monopolares localizados na camada fenestrada e outros corpos de neurônios em negro. A região do quiasma externo revelou as neurofibrilas evidentes que se condensam na medula e lóbula.

Apesar das estruturas analisadas comparativamente entre as castas mostrarem que não há diferença morfológica entre elas, em zangão (fig. 03A) nota-se uma retina maior no lobo óptico, comparado com as operárias.

No corpo de cogumelo foi possível identificar as regiões do cálice (fig. 03 B, E, H). Na operária campeira (fig. 03E) observou-se a presença das células Kenyon e fibras do cálice espaçadas comparando-se com a mesma região na operária nutridora (fig. 03 H) e zangão (fig. 03 B). Nos lobos antenais foi possível visualizar os glomérulos e nervo antenal nas abelhas rainha, campeira e nutridora (fig. 03 C, F, I).

Estudo morfológico-funcional do cérebro das abelhas *Apis mellifera* por método histoquímico Neo-Timm

Os dados histoquímicos mostraram que o zinco está localizado nas fibras dos lobos ópticos das abelhas rainha e operárias campeira e nutridora (fig. 04), e nos lobos óptico, antenais e corpos de cogumelo do cérebro dos zangões (fig. 05) *Apis mellifera* e não nos corpos neuronais.

A marcação pela técnica de Neo-Timm é mais forte nas regiões que coincidem com as fibras dos neurônios, podendo ser evidenciado quando comparado com as fotomicrografias de Nissl, onde há apenas a marcação dos corpos neuronais (fig. 05 A e B).

Nas regiões constituintes do lobo óptico nota-se a localização do zinco nas fibras longas das células da camada fenestrada e a ausência de coloração dos corpos celulares no quiasma externo no lobo óptico em todas as abelhas. É possível visualizar a impregnação nas fibras centrifugais presentes na medula.

Os corpos de cogumelo mostraram o mesmo padrão de distribuição de zinco no cálice (lábio, colar e basal) e no pedúnculo, e a sua ausência nas células Kenyon (fig. 05 C). No lobo antenal, nota-se a localização de zinco nos campos terminais das fibras nos glomérulos (fig. 05 D).

Não se obteve lâminas que contivessem marcação nos lobos antenais e corpos de cogumelo das abelhas rainha e operárias campeira e nutridora.

Diferenças no perfil de proteínas no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

Através da análise do perfil eletroforético do homogeneizado de cérebro observou-se a presença de polipeptídios que migraram na mesma posição e outros que se expressaram diferencialmente quanto ao sexo (zangão e rainha), desenvolvimento (pupa) e comportamento (operárias campeira e nutridora) de *A. mellifera*, com a massa molecular relativa (Mr) variando de 190 a 14 kDa, aproximadamente.

Na figura 06 A observa-se que os polipeptídios de Mr 73, 45, 36, 28, 27, 18, 17, 15 e 14 kDa estão presentes nas duas castas. Algumas bandas se destacaram por apresentarem grande concentração, com as Mrs aproximando 36 a 30 kDa, estando mais evidente em zangão e nutridora, e a de 29 kDa mais expressa em zangão.

Os polipeptídios de Mr aproximada 73, 46, e 38 kDa estão expressos somente em pupa, rainha e zangão, respectivamente. Já os polipeptídios de 28 e 18 kDa não foram detectados em pupa.

Detecção de miosina-V no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

A fim de determinar a presença de miosina-V no cérebro de abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora *Apis mellifera*, as amostras de homogeneizado do cérebro das castas e comportamento foram aplicadas em SDS-PAGE (fig. 06 A) e as amostras analisadas em *Western blot* (fig. 06 B).

Por *Western blot* imunodetectou-se um polipeptídio de Mr 190 kDa, correspondente a cadeia pesada da miosina-V nas amostras de cérebro das abelhas operária campeira, tanto para o sobrenadante com 30 cérebros, quanto para os homogeneizados de um cérebro de campeira,

rainha e zangão, em que a miosina-V está diferencialmente expressa. Porém, para o homogeneizado de um cérebro de operária nutridora a miosina-V foi fracamente detectada.

Detecção de CaMKII no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

Na análise de CaMKII (fig. 06 C) observou-se a marcação de um polipeptídio que migra com Mr de 60 kDa, aproximadamente, correspondente à sua subunidade alfa.

Os polipeptídios de, aproximadamente, 49, 42.7, 25.5 e 23 kDa também foram detectados com o anticorpo anti- α -CaMKII. Na amostra de homogeneizado de 30 cérebros de abelha operária campeira foram marcadas bandas de 60, 49, 25.5 e 23 kDa.

Indivíduos de operária campeira e nutridora tiveram o mesmo padrão de imunomarcação nos polipeptídios de 60, 49, 42.7, 25.5 e 23 kDa, porém, em campeira a marcação foi mais intensa; em indivíduos de rainha e zangão 49, 42.7, 25.5 e 23 kDa; e em pupa, 25.5 e 23 kDa, podendo representar uma degradação da subunidade de 60 kDa.

Imunolocalização de miosina-V no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

A análise imunohistoquímica revelou a presença da miosina-V no cérebro das abelhas *A. mellifera* rainha, zangão, campeira e nutridora nos lobos óptico, antenal e corpos de cogumelo.

Houve marcação em todas as regiões do lobo óptico como a retina, a camada fenestrada, a lâmina, o quiasma externo, a medula, o quiasma interno e a lóbula (fig. 07). A camada fenestrada foi o local onde a marcação foi mais intensa em todos os indivíduos.

Os corpos de cogumelo (fig. 08) apresentaram a marcação da miosina-V mais fortemente na região do cálice e nas células Kenyon, já nos lobos antenais (fig. 09) observou-se a reatividade de miosina-V nos glomérulos.

Os corpos de cogumelo de zangão e lobos antenais de nutridora e zangão não foram fotografados, pois não houve marcação. No controle com a omissão do anticorpo não se detectou nenhum tipo de marcação.

Imunolocalização de CaMKII no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

Na análise imunohistoquímica do cérebro das abelhas utilizando-se anticorpo anti-CaMKII observou-se a imunomarcação dos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo, para rainha, zangão e operárias.

Os lobos ópticos (fig. 10) foram marcados em todas as regiões, porém a reatividade foi maior na camada fenestrada. Nos corpos de cogumelo (fig. 11) a reatividade foi mais intensa

no cálice e nas células Kenyon. Já nos lobos antenais (fig. 12) a marcação foi predominante nos glomérulos.

FIGURAS

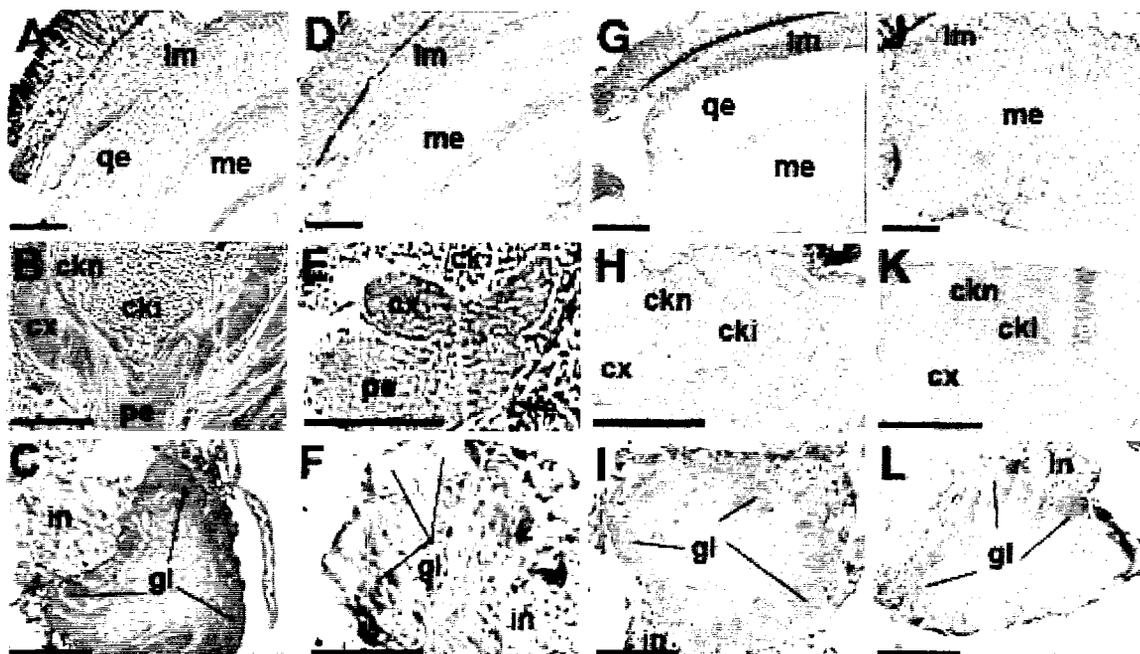


Figura 01: Fotomicrografias dos lobos ópticos, corpos de cogumelo e lobos antenais das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* corados com H.E.

A-C: rainha; D-F: zangão; G-I: campeira; J-L: nutridora

A, D, G, J: lobos ópticos; B, E, H, K: corpos de cogumelo; C, F, I, L: lobos antenais

(lm) lâmina; (me) medula; (ck) células Kenyon; (cki) células Kenyon compactadas internas; (ckn) células Kenyon não compactadas; (cke) células Kenyon compactadas externas; cx (cálice); (pe) pedúnculo; (in) interneurônios; (gl) glomérulos.

(Bar=100 μ m)

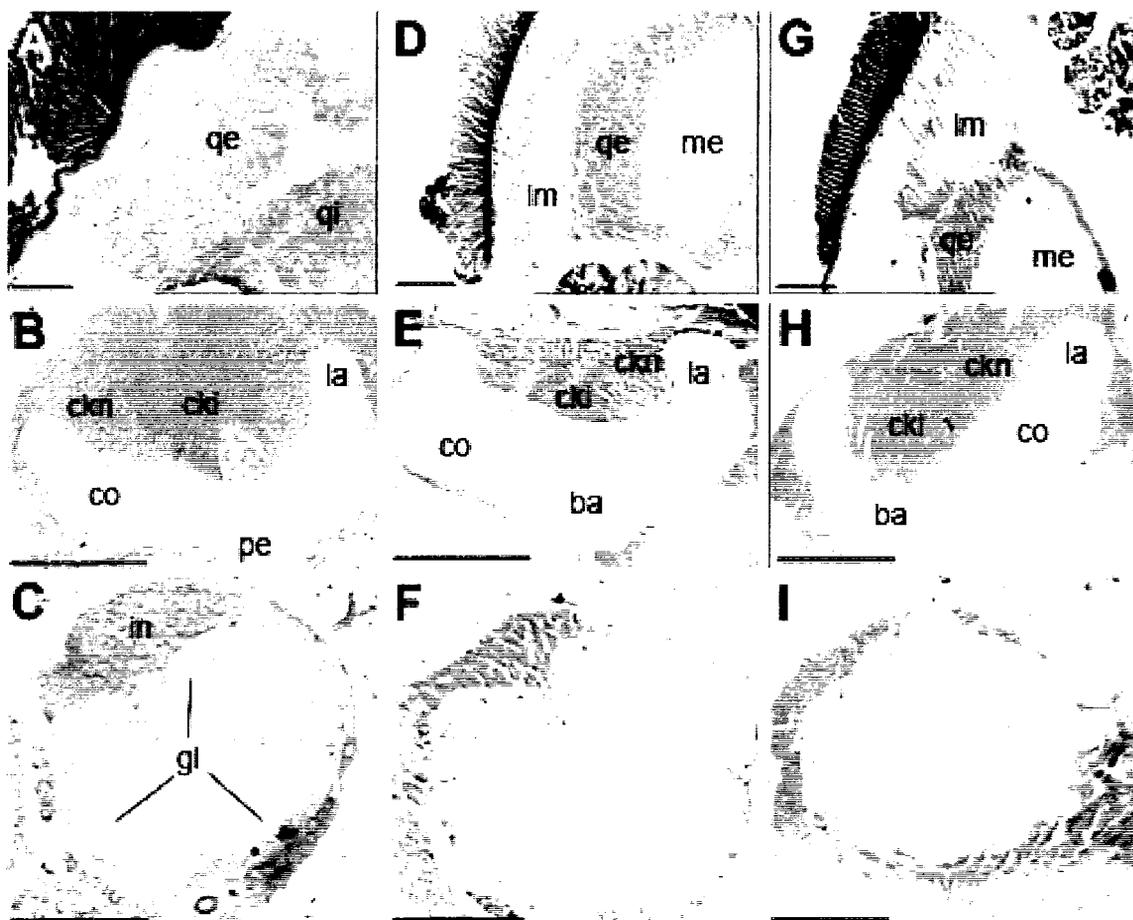


Figura 02: Fotomicrografias dos lobos ópticos, corpos de cogumelo e lobos antenais das abelhas rainha, campeira e nutridora *Apis mellifera* corados com Nissl.

A-C: rainha; D-F: campeira; G-I: nutridora

A, D, G: lobos ópticos; B, E, H: corpos de cogumelo; C, F, I: lobos antenais

(lm) lâmina; (me) medula; (qe) quiasma externo; (qi) quiasma interno (cki) células Kenyon compactadas internas; (ckn) células Kenyon não compactadas; (pe) pedúnculo; (la) lábio; (co) colar; (ba) basal; (in) interneurônios; (gl) glomérulos.

(Bar=100µm)

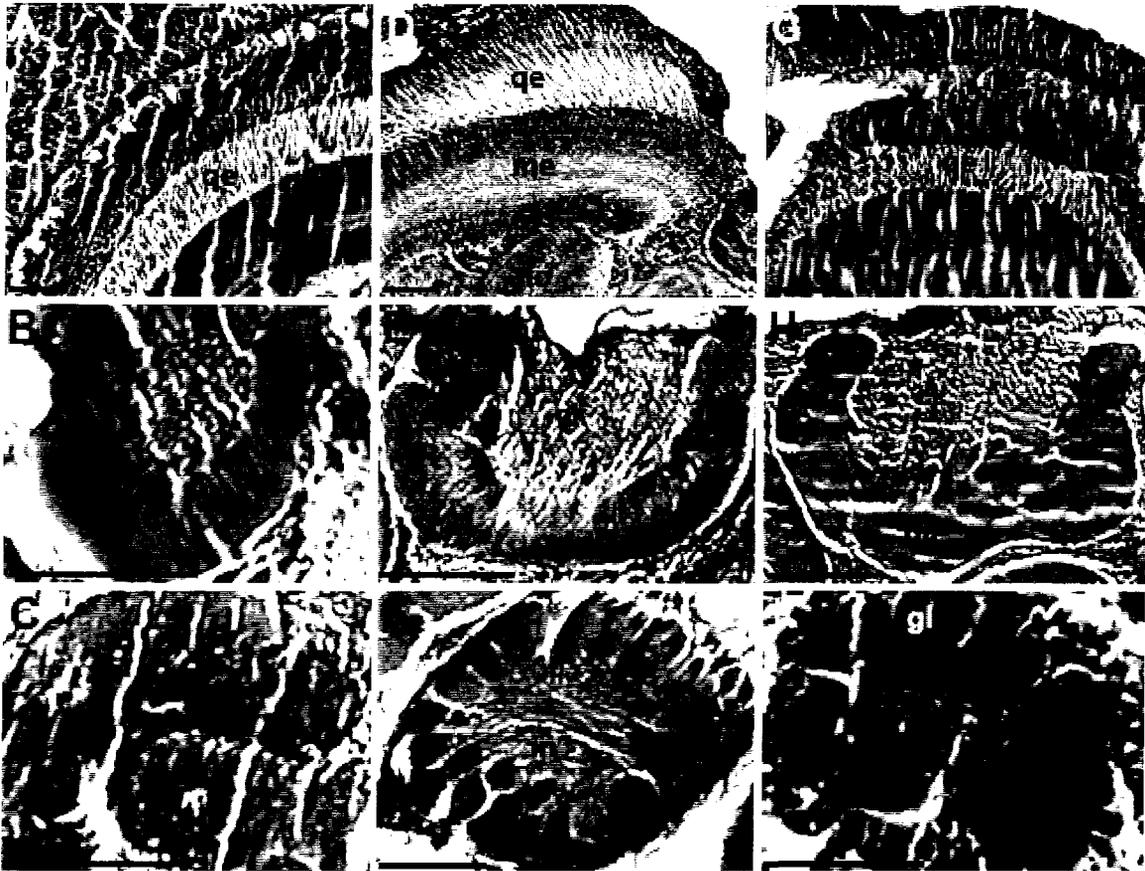


Figura 03: Fotomicrografias dos lobos ópticos, corpos de cogumelo e lobos antenais das abelhas *Apis mellifera* corados com impregnação metálica.

A-C: zangão; D-F: campeira; G-H: nutridora; I: rainha

A, D, G: lobos ópticos; B, E, H: corpos de cogumelo; C, F, I: lobos antenais

(lm) lâmina; (me) medula; (qe) quiasma externo; (lo) lóbula; (ck) células Kenyon; (la) lábio; (co) colar; (ba) basal; (in) interneurônios; (gl) glomérulos.

(Bar=100µm)

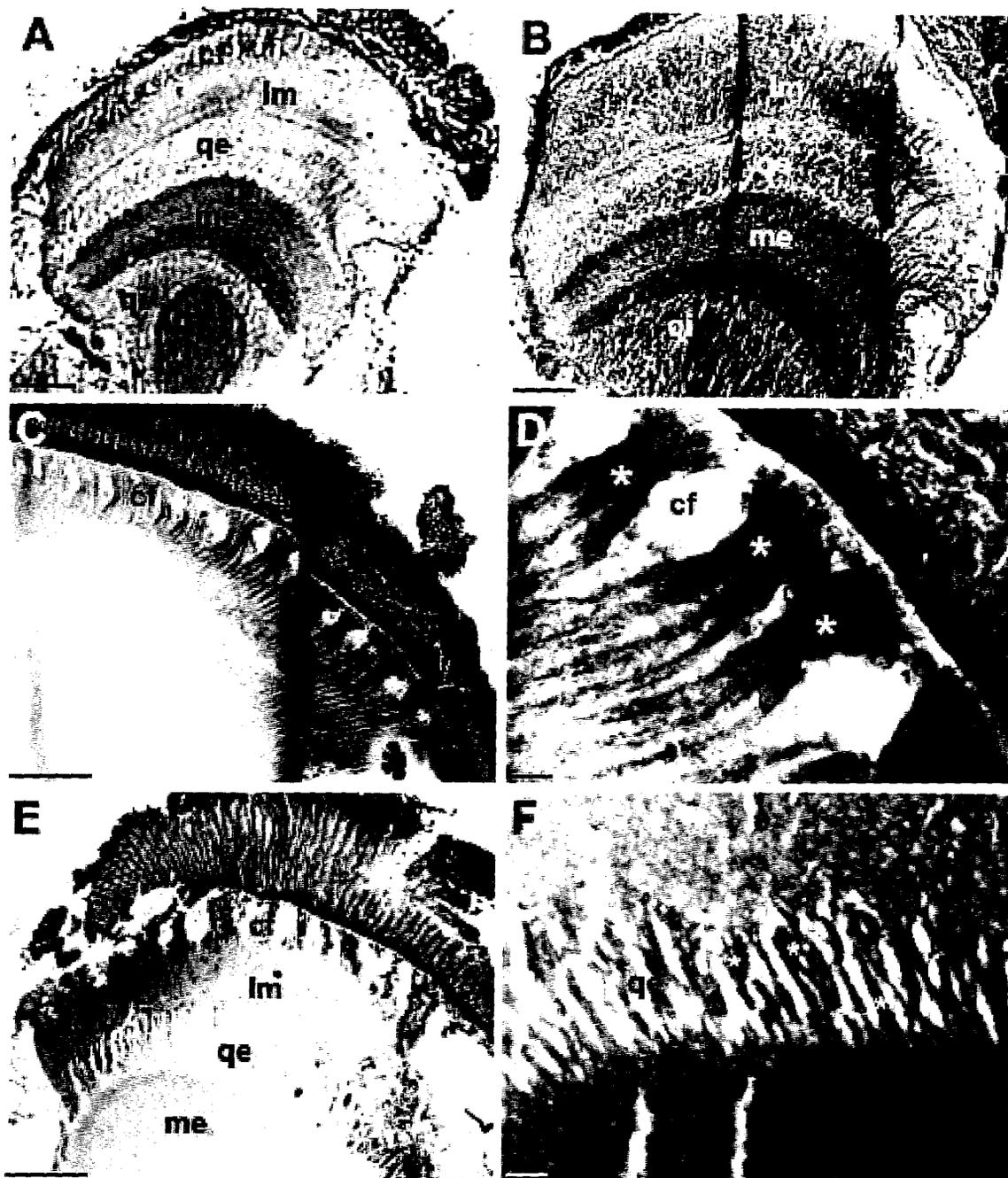


Figura 04: Fotomicrografias dos lobos ópticos das abelhas rainha, campeira e nutridora *Apis mellifera* mostrando o mesmo padrão de marcação de zinco nas neurofibrilas.

(A,B) rainha; (C,D) campeira; (E,F) nutridora

(lm) lâmina; (cf) camada fenestrada; (qe) quiasma externo; (me) medula; (qi) quiasma interno, (lo) lóbula
(Bar= 100µm) A, B, C, E; (Bar=10 µm) D, F; (*) fibras

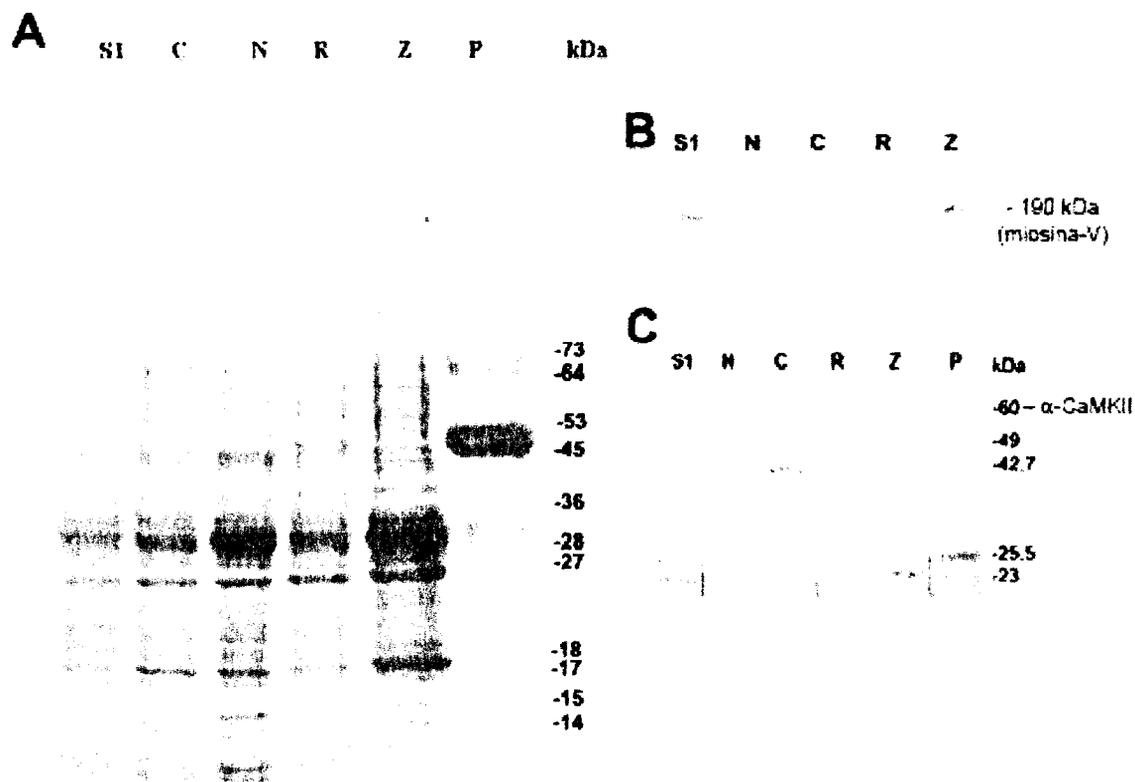


Figura 06: Comparação do perfil eletroforético do cérebro das abelhas *Apis mellifera* e imunodeteccção de miosina-V e CaMKII

A: Perfil eletroforético (SDS-PAGE 5-16%) das amostras de homogeneizado de 30 cérebros (S1) de operária campeira, um (C) indivíduo de operária campeira, operária nutridora (N), rainha (R), zangão (Z) e pupa (P) com 20 μ g por poço mostrando as bandas diferenciais e coincidentes.

B: Identificação de miosina-V em imunoblot de amostra de homogeneizado de cérebro da abelha *Apis mellifera*.

C: Western blot com imunodeteccção de CaMKII de amostras de homogeneizado de cérebro.

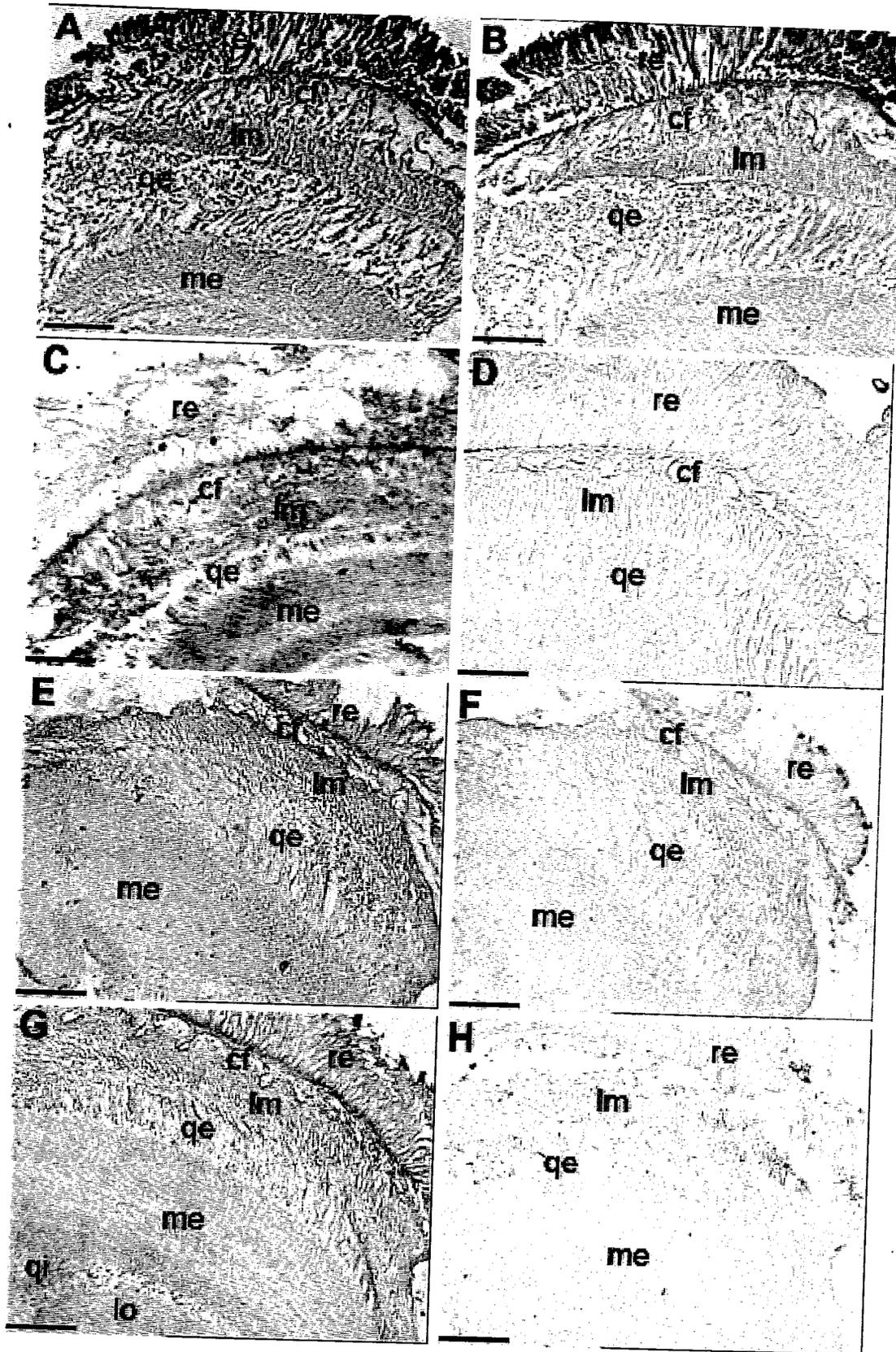


Figura 10: Imunohistoquímica dos lobos ópticos do cérebro das abelhas *Apis mellifera* rainha (A), zangão (C), campeira (E) e nutridora (G) mostrando a localização da CaMKII e os controles com a omissão do anticorpo de rainha (B), zangão (D), campeira (F) e nutridora (H) (Bar=100 μ m)

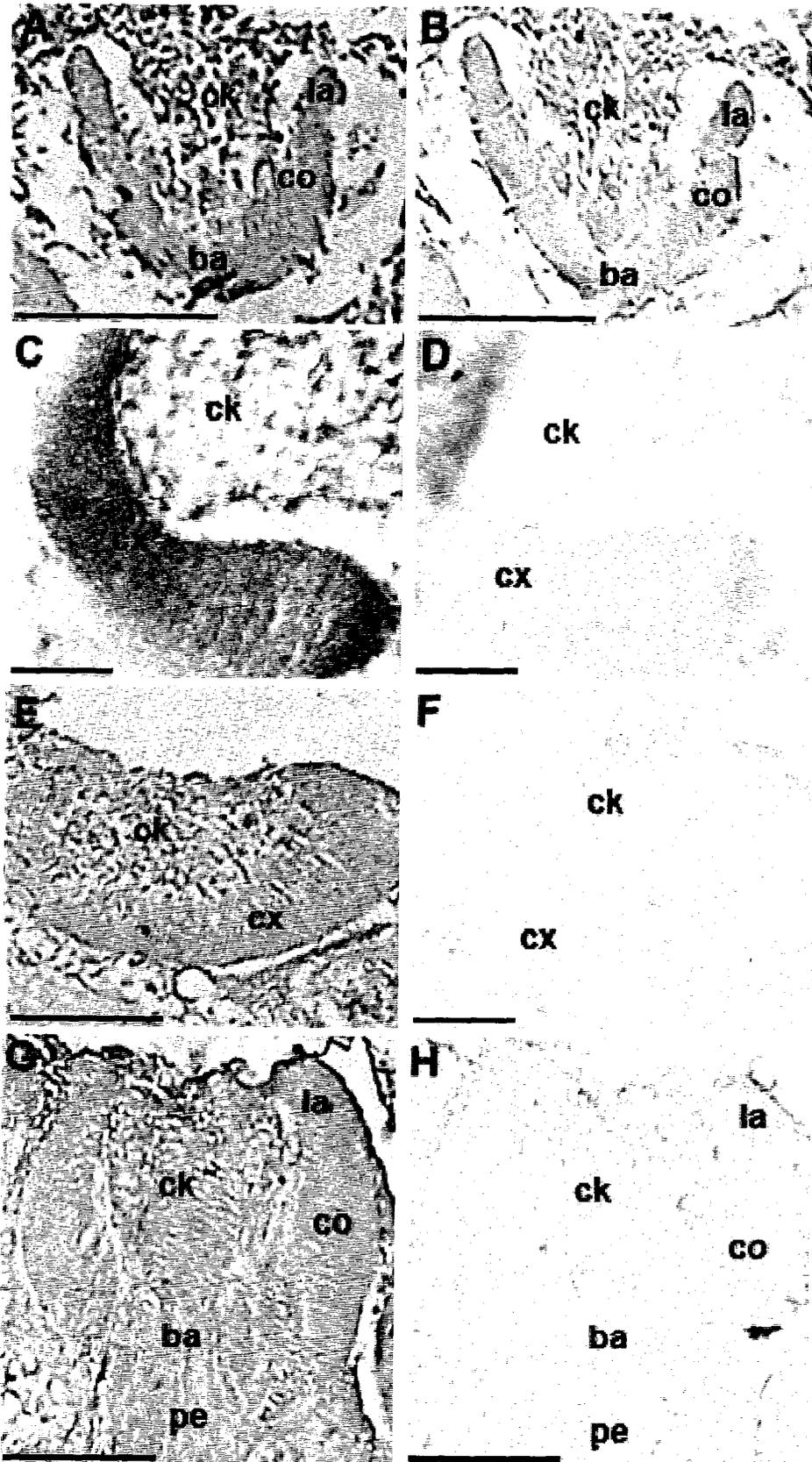


Figura 11: Imunohistoquímica dos corpos de cogumelo do cérebro das abelhas *Apis mellifera* rainha(A), zangão (C), campeira (E) e nutridora (G) mostrando a localização da CaMKII e os controles com a omissão do anticorpo de rainha (B), zangão (D), campeira (F) e nutridora (H) (Bar=100 μ m) A, B, E,G, H; (Bar=30 μ m) C, D, F.

Tabela 01: Média das áreas em μm dos lobo ópticos das abelhas *Apis mellifera*

	Rainha	Zangão	Campeira	Nutridora
LO	15175.19 ^a	10575.53 ^b	14107.33 ^{a,b}	13782.81 ^{a,b}

DISCUSSÃO

Estudo morfológico das regiões do cérebro da abelha *Apis mellifera* por H.E.

A análise morfológica das imagens revelou o mesmo padrão de localização dos corpos neuronais nos lobos ópticos, corpos de cogumelo e lobos antenais das abelhas rainha, zangão, operárias campeira e nutridora. As regiões constituintes do lobo óptico no cérebro, para as abelhas rainha, zangão e operárias, revelaram os corpos de neurônio monopolares, que se localizam na lâmina de forma ordenada e no quiasma externo, onde se observa um aglomerado de células neuronais. Nässel e colaboradores (1986) estudaram a organização dos neurônios laminares e observaram que existem 10 tipos de neurônios que conectam a lâmina à medula, e apenas um tipo conecta aquela região à lóbula. A medula é formada por aproximadamente 60 tipos de neurônios, em que neurônios colunares conectam a medula à lóbula e neurônios tangenciais projetam-se para focos do lobo óptico. Apesar de ser constatado que existe uma variedade de tipos de neurônios, a coloração não possibilitou essa distinção.

Nos corpos de cogumelo foi possível distinguir as células Kenyon compactadas e não compactadas, além das regiões do cálice (lábio, colar e basal) e o pedúnculo. As células Kenyon aparecem preenchendo o corpo de cogumelo das operárias campeira e nutridora num mesmo padrão. Porém, analisando a morfologia e aspecto das células, observaram-se alterações podendo estar relacionadas com o estágio e envelhecimento, como mostrado por Cruz-Landim e Mello (1981) para a abelha *Scaptotrigona postica*, em que abelhas nutridoras apresentam células maiores, e em abelhas campeiras o tamanho das células diminui e passam a apresentar sinais de degradação.

As diferenças entre os corpos de cogumelo entre rainha, zangão e operárias devem estar relacionadas aos diferentes comportamentos e estímulos. Dados de Farris e colaboradores (2001) confirmam que o aumento no volume das neurópilas dos corpos de cogumelo têm determinantes relacionados tanto com a idade quanto com a experiência e comportamento.

Os lobos antenais apresentaram-se organizados em glomérulos circundados por interneurônios e o nervo óptico. Esses dados confirmam dados de microscopia realizados por Brandt e colaboradores (2005).

A análise da área, do perímetro e do número de células nos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo das abelhas *Apis mellifera* rainha, zangão e operárias campeira e nutridora não apresentou diferenças estatísticas. Os resultados não apresentaram diferenças

estatísticas, pois apresentaram $p > 0.05$ devido ao número de amostras ter sido insuficiente para que pudéssemos aplicar o teste t, portanto, novas contagens deverão ser feitas para que se possa avaliar com mais certeza a relação entre área, perímetro e número de células nas regiões do cérebro das abelhas fazendo uma comparação entre as diferentes castas e comportamento.

Estudo morfológico no cérebro das abelhas *Apis mellifera* por coloração pela prata

As características gerais observadas no cérebro da abelha *A. mellifera* utilizando a impregnação metálica, no que se refere à constituição anatômica e morfológica, concordam com as observações descritas para *A. mellifera* por Snodgrass (1956).

A impregnação metálica diferenciada nos lobos ópticos evidenciou a composição das neurópilas: lâmina, quiasma externo, medula, quiasma interno e lóbula no cérebro das abelhas. Esses dados coincidem com os já descritos por Strausfeld e Nässel (1980) no cérebro de *Calliphora erythrocephala* e *Musca domestica* utilizando impregnação com prata.

Os prolongamentos de neurônios foram observados na região do cálice dos corpos de cogumelo conforme a diferença de coloração, comparada com a marcação dos corpos de neurônio, além de distinguir as diferentes regiões do cálice. Utilizando impregnação metálica, outros estudiosos mostraram a morfologia do cérebro da abelha, em diferentes âmbitos. Por exemplo, Coss e colaboradores (1980) realizando uma coloração rápida de Golgi quantificaram a morfologia das espículas dendríticas no cálice dos corpos de cogumelo no cérebro de *A. mellifera*. Para o estudo do desenvolvimento dos dendritos das células Kenyon na região do colar dos corpos de cogumelo, Farris e colaboradores (2001) também utilizaram o protocolo de coloração de Golgi, com modificações. Isso indica que a impregnação metálica utilizada neste trabalho é eficiente no estudo morfológico do cérebro da abelha com relação à distribuição de fibras e corpos de neurônio.

Portanto, usando a técnica de impregnação metálica, proposta em 1903 por Cajal para estudos de degeneração e regeneração do sistema nervoso de vertebrado, sendo adaptada para o cérebro de inseto, foi possível visualizar os corpos neuronais e identificar as regiões onde se localizam as neurofibrilas no cérebro da abelha *A. mellifera*, sendo o primeiro relato usando essa técnica em abelhas zangão e operária nutridora, sendo que Calábria e colaboradores (2005) utilizaram-a em operária campeira.

Além disso, a utilização das técnicas histológicas básicas H.E. e impregnação metálica possibilitou a confirmação das diferenças morfológicas relacionadas à casta e ao

comportamento e sugere a utilização dessa metodologia como importante ferramenta em estudos comparativos.

Distribuição dos corpos de neurônios e zinco

A análise morfológica dos cérebros revelou o mesmo padrão de localização dos corpos neuronais e de distribuição do zinco nos lobos ópticos das abelhas rainha, zangão, operária campeira e operária nutridora.

A coloração por Nissl foi útil na visualização da morfologia dos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo de rainha, campeira e nutridora. Já em zangão somente foi possível a visualização dos lobos ópticos.

A análise morfológica dos cortes histológicos de cérebro de zangões *Apis mellifera* revelou um mesmo padrão de distribuição do zinco nos corpos de cogumelo e nos lobos ópticos já observados para abelhas operárias por Calábria (2004).

Os dados histoquímicos obtidos mostraram que não houve marcação nos corpos neuronais. Esse resultado confirma a validade do método no sistema nervoso de abelha, pois em vertebrados a histoquímica Neo-Timm promove uma melhor visualização de fibras musgosas (Babb *et al.*, 1991), identificando a presença de traços metálicos em axônios glutamatérgicos, mas não em corpos celulares (Frederickson *et al.*, 2000).

A localização do zinco nas fibras longas da camada fenestrada no lobo óptico possibilitou a visualização das fibras centrifugais na medula, sugerindo que essa neurópila esteja relacionada com processos pré-sinápticos. Nässel *et al.* (1986) e Meyer *et al.* (1986) mostraram a imunorreatividade dos neurônios da lâmina à serotonina, ao GABA e à catecolamina.

Nos corpos de cogumelo observou-se marcação de zinco no cálice e no pedúnculo, mas não nos corpos das células Kenyon. Isso é justificado pela transição de impulsos que os cálices recebem vindos do lobo antenal (olfatório) através do trato anteno-glomerular, e vindos da lóbula e da medula (visual) via o trato óptico (Moobs, 1982). Estudos mostram evidências de que os corpos de cogumelo equivalem ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem espacial (Capaldi *et al.*, 1999), onde o zinco é especialmente abundante (Zimmer, 1973).

As diferenças de marcação entre as castas e comportamentos da abelha *Apis mellifera*, que ocasionaram diferentes graus de marcação desde uma coloração muito enegrecida, passando para tonalidades de marrom, amarelo e até a falta de marcação em um mesmo tempo, pode ter sido um artefato ou consequência das diferentes concentrações de zinco em

diferentes regiões do cérebro e também pelas diferenças comportamentais e fisiológicas desses cérebros. Estudo comparativo da distribuição de zinco no cérebro de ratos neonatais (5 dias), jovem (5 semanas) e envelhecido (48-73) semanas mostra que o zinco está mais expresso no cérebro do rato neonatal (Sawashita *et al.*, 1997). Para o estágio neonatal, o zinco está mais presente no cerebelo, enquanto para o estágio adulto, no telencéfalo, especialmente no sistema límbico. Altas concentrações no sistema límbico estão associadas com a função (emoção, memória e aprendizagem) (Scott *et al.*, 1997).

É a primeira vez que a técnica Neo-timm é utilizada no cérebro de zangões *Apis mellifera*. Esse estudo mostrou que essa técnica é válida para a investigação da distribuição de zinco, que se sabe está envolvido em muitos processos catalíticos, estruturais e regulatórios, bem como no papel da neurotransmissão sináptica.

Diferenças no perfil de proteínas no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

A análise do perfil protéico do cérebro da abelha permitiu a identificação de polipeptídios casta-, desenvolvimento- e comportamento- específicos para as abelhas rainha, zangão, pupa e operárias campeira e nutridora, *A. mellifera*. Alguns polipeptídios apresentaram Mr coincidentes, enquanto que outros apresentaram-se diferencialmente expressos. A heterogeneidade nas diferentes castas e a ocorrência de diferença no perfil dos polipeptídios podem indicar que eles sejam sexo-específicos. Vários genes já identificados em abelhas são responsáveis pela diferenciação na expressão gênica, sendo que sete locus caracterizando a evolução e a função do grupo (Evans e Wheeler, 1998).

Evans e Wheeler (2000) mostraram a expressão diferencial de alguns genes como, citocromo oxidase I (60 kDa), dineína (12 kDa), hexamerina II (70 e 90 kDa) e ATP sintase (270 kDa), entre as castas. Kamikouchi *et al.* (2004) identificaram dois candidatos proteínas/genes envolvidos em casta e/ou sexo específicos do processamento olfatório de abelhas, diferencialmente expressos em operária, rainha e zangão. Com a conclusão do genoma observou-se que vários genes são expressos diferentemente entre as castas. A recente conclusão do genoma da abelha mostrou que, por exemplo, rainhas e campeira apresentam diferentes padrões de expressão do gene para oxidorreductases (mais expressos em larvas de rainhas) e hidrolases (mais expressos em larvas de operárias) (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Takeuchi e colaboradores (2003) mostraram a diferença na expressão de genes entre castas e sexos. Nossos resultados também sugerem que existe essa diferença para polipeptídios.

Em pupa, uma banda expressa de Mr entre 53 e 45 kDa está bem expressa, indicando um espectro de polipeptídios. Setti e Boneti (2001) identificaram em *Melipona scutellaris*, nas fases de pupa de rainha e de operária, proteínas de Mr 10.1 e 67 kDa presentes em grande concentração em todos os estágios do desenvolvimento de pupa, caracterizando-as como proteínas necessárias à manutenção do organismo e dos estágios como tal.

Oliveira-Junior (1999) analisando a expressão gênica na divisão de trabalho em *A. mellifera* detectou fragmentos diferenciados de acordo com a idade e a atividade da abelha na colônia, e outras que se expressão independente da idade e da experiência do indivíduo.

Detecção de miosina-V no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

Para investigar a expressão de miosina-V utilizou-se um anticorpo policlonal gerado contra a cadeia pesada de miosina-V que reconhece um polipeptídio de 190 kDa (Espreáfico *et al.*, 1992). Este anticorpo foi produzido a partir de proteínas recombinantes de um biblioteca de cDNA de cérebro de galinha que contêm domínios específicos da miosina-V. Estudos utilizando este anticorpo mostram a expressão de miosina-V no cérebro de galinha (Espíndola *et al.*, 2000); no gânglio da raiz dorsal de embrião de galinha (Suter *et al.*, 2000) e nas células neuronais e gliais de cérebro de rato (Espreáfico *et al.*, 1992).

Neste trabalho, verificamos que o anticorpo citado foi útil na identificação da miosina-V no homogeneizado de cérebro de operárias campeira e nutridora, como também de rainha e zangão, sugerindo que os epítomos reconhecidos por este anticorpo para miosina-V de vertebrado estão conservados em himenópteros. Os dados apresentados concordam com os resultados de Coletto (1999) e de Passos-Lima (2001) que identificaram no cérebro de abelha *Melipona scutellaris* e *Apis mellifera* a miosina-V utilizando o mesmo anticorpo. Além disso, Colleto (1999) mostrou que o anticorpo reconhece a miosina-V em homogeneizado do sistema nervoso de *M. scutellaris* e Calábria (2004) revelou a distribuição desta proteína em cortes de cérebro de operária campeira *A. mellifera*.

O resultado diferencial de miosina-V no cérebro das abelhas indica que provavelmente este motor molecular se expressa conforme o comportamento desempenhado na colônia, apesar de que, não foi investigado se a miosina-V seria alvo de regulação diferencial nessas condições. No entanto, Calábria (2004) revelou a expressão não diferencial dessa proteína entre operárias campeira e nutridora; e Passos-Lima (2001) mostrou padrão diferencial de expressão entre operária campeira e rainha.

É a primeira vez que a miosina-V é mostrada expressa no cérebro de zangão. Nesse trabalho, a identificação comparada entre as diferentes castas complementa estudos anteriores,

e abre perspectivas para estudos futuros de regulação utilizando este motor molecular e suas proteínas associadas. Peixoto (2002) e Silva (2003) mostraram que as propriedades bioquímicas, como solubilidade em ATP, co-sedimentação com actina, imunoprecipitação com NaCl e associação com membranas e sinaptossoma, da miosina-V de cérebro de galinha foram também conservadas na abelha operária campeira *A. mellifera*.

Detecção de CaMKII no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

Para o estudo da expressão da proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII) foi utilizado um anticorpo monoclonal gerado contra a subunidade α da CaMKII, que reconhece um polipeptídeo de 60 kDa. Por sua participação em mecanismos básicos de memória em vários organismos como também na sua ação na fosforilação da miosina-V, buscou-se identificar a presença da CaMKII em frações de cérebro de abelha *A. mellifera*.

Em tecido nervoso de abelha, Hartfelder e colaboradores (1991) identificaram duas subunidades da CaMKII de 52 e 60 kDa. Apesar desses dados o anticorpo dirigido contra a subunidade α da CaMKII reconheceu cinco polipeptídeos diferentes em cérebro de abelha. Esses dados podem indicar uma degradação da proteína ou de reação cruzada com polipeptídeos inespecíficos.

Imunolocalização de miosina-V e CaMKII no cérebro das abelhas *Apis mellifera*

A análise imunohistoquímica mostrou a localização da miosina-V nos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo, evidenciando, assim, sua ampla distribuição no cérebro da abelha *Apis mellifera*.

No lobo óptico houve intensa marcação de miosina-V na retina e nas neurópilas, regiões onde se evidenciou impregnação de prata, devido à presença de células nervosas fotossensíveis, e localização de zinco nas fibras longas das células da retínula e nas fibras centrifugais da medula, sugerindo que essa neurópila esteja relacionada com processos sinápticos.

A localização da CaMKII no cérebro da abelha *Apis mellifera* também foi ampla em todas as neurópilas. Assim como na miosina-V, a CaMKII foi imunodetectada preferencialmente nas regiões de conexão sináptica. Dados de Karcher e colaboradores (2001) mostraram que a CaMKII regula a atividade da miosina-V através de sua fosforilação no seu domínio C-terminal, uma parte do motor que está envolvida com o transporte de vesículas em *Xenopus*. Acreditamos que a localização de miosina-V e CaMKII coincidam devido à sua relação de fosforilação e ativação.

A relação existente entre as localizações de miosina-V, CaMKII, neurofibrila e zinco pode estar relacionada aos sítios de conexões sinápticas envolvendo neurotransmissores como o glutamato, assim como ocorre em vertebrados.

CONCLUSÕES

- ✓ A coloração H.E. e a impregnação metálica mostraram-se importantes ferramentas para a análise morfológica do cérebro, servindo como base para o estudo dos resultados de imunohistoquímica e histoquímica;
- ✓ A coloração de Nissl possibilitou a discriminação dos corpos neuronais e da observação da sua morfologia, podendo ser utilizada em associação com outros tipos de colorações sob forma de contra-coloração ou em estudos morfológicos isolados, servindo como base para o estudo dos resultados de histoquímica;
- ✓ O perfil eletroforético das proteínas do cérebro das abelhas rainha, zangão, pupa e operárias campeira e nutridora *Apis mellifera* mostrou polipeptídios diferencialmente expressos dependendo da casta e do comportamento da abelha;
- ✓ A imunomarcção de miosina-V e CaMKII por Western blot revelou que ambas proteínas estão expressas no cérebro das abelhas rainha, zangão e operárias campeira e nutridora;
- ✓ A análise imunohistoquímica revelou que a miosina-V e a CaMKII estão presentes no cérebro das abelhas *Apis mellifera* nos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo apresentando uma localização coincidente com zinco e processos sinápticos;
- ✓ Foi a primeira vez que foi realizada a imunohistoquímica utilizando-se anticorpos anti-miosina-V (sonda para o domínio cabeça) e anti- α -CaMKII e a técnica de Neo-Timm em cérebro de zangões. Estudos comparativos como esse devem servir como base para estudos posteriores de análise de proteínas e de morfologia do cérebro das abelhas *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS

AMDAM, G.V.; NORBERG, K.; FONDRK, M.K.; PAGE, R.E. Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 31, p. 11350-11355, 2004.

BABB, T. L., KUPFER, W.R.; PRETORIUS, J. K.; CRANDAL, P. H.; LEVESQUE, M. F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, p. 351-363, 1991.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de Técnica para Histologia Normal e Patológica**, Ed. Edart São Paulo Livraria e Editora, São Paulo, p. 132, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CAJAL, S. R. Sobre un sencillo proceder de impregnación de las fibrilas interiores del protoplasma nervioso. **Archivos Latinos de Medicina y Biología**, v. 1, p. 3-8, 1903.

CALÁBRIA, L. K. **Análises bioquímica e morfológica do cérebro da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) com enfoque na miosina-V**, Dissertação (Monografia em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2004.

CALÁBRIA, L. K.; TEIXEIRA, R. R.; MORAES, V. R. A.; SANTOS, A. A. D.; ESPINDOLA, F. S. The patterns in neurofibrils through metallic impregnation the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux**, 2005 (*enviado*).

CAMARGO, J. M. F.; STORT, A. C. **A abelha: *Apis mellifera* Linnaeus**. São Paulo: EDART, p. 80, 1973.

CAPALDI, E. A.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. **Annu. Ver. Psychol.**, v. 50, p. 651-682, 1999.

CAYRE, M. Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. **Cell Tissue Res.**, v. 291, p. 537-547, 1998.

CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E.; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 75, p. 13-23, 1993.

COLLETO, A. **Identificação de miosina-V e anatomia interna dos sistemas reprodutor e nervoso de *Mellipona scutellaris***, Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 1999.

COSS, R. G.; BRANDON, J. G.; GLOBUS, A. Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. **Brain Research**, v. 192, p. 49-59, 1980.

CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, R. A. **Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae): Aspectos histológicos e histoquímicos**. Ed. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia; Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo, 1981.

DANSCHER, G.; JUHL, S.; STOLTENBERG, M.; KRUNDERUP, B.; SCHRODER, H. D.; ANDREASEN, A. J. Autometallographic silver enhancement of zinc sulfide crystals created in cryostat sections from human brain biopsies: a new technique that makes it feasible to demonstrate zinc ions in tissue sections from biopsies and early autopsy material. **Histochem. Cytochem.**, v. 45, p. 1503-1510, 1997.

DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals: A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. **Histochemistry**, v. 71, p. 1-16, 1981.

DANSCHER, G. Autometallography: a new technique for light microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). **Histochemistry**, v. 81, p. 331-335, 1984.

DANSCHER, G.; NORGAARD, R. O. J.; BAATRUP, E. Autometallography: Tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. **Histochemistry**, v. 86, p. 465-469, 1987.

DUJARDIN, F. Mémoire sur le système nerveux des insectes. **Ann. Sci. Nat. Zool.**, v. 14, p. 195-206, 1850.

EHMER, B.; GRONENBERG, W. Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (*Apis mellifera*). **J. Comp. Neurol.**, v. 451, p. 362-373, 2002.

ESPÍNDOLA, F. S.; SUTE, D. M.; PARTATA, L. B. E.; CAO, T.; WOLENSKI, J. S.; CHENEY, R. E.; KING, S. M.; MOOSEKER, M. S. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: camodulin, myosin-II essential light chains, and 8 kDa dynein light chain/PIN. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 47, p. 269-281, 2000.

ESPREAFIGO, E. M.; CHENEY, R. E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A. A. C.; DE CAMILLI, P. V.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. **Journal Cell Biology**, v. 119, p. 1541-1557, 1992.

EVANS, J. D.; WHEELER, D. E. Expression profiles during honeybee caste determination. **Genome Biology**, v. 2, p. 1-6, 2000.

EVANS, J. D.; WHEELER, D. E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 5575-5580, 1998.

EVANS, J. D.; WHEELER, D. E. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. **Bioessays**, v. 23, p. 62-68, 2001.

EVANS, L. L.; LEE, A. J.; BRIDGMAN, P. C.; MOOSEKER, M. S. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 2055-2066, 1998.

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Experience- and age- related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 6395-6404, 2001.

FÉRES, M.C. L. C.; GARCIA-CAIRASCO N. Descrição anatômica da presença do íon zinco nos núcleos cocleares. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, n. 2, 2003.

FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D.; FREDERICKSON, C. J.; THOMPSON, R. B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1471-1483, 2000.

FUKUDA, H.; OHTANI, T. Survival and life span of drone honey bees. **Res. Pop. Ecol.**, v. 19, p. 51-68, 1977.

GIRAY, T.; ROBINSON, G. E. Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 11718-11722, 1996.

GIURFA, M.; ZHANG, S.; JENETT, A.; MENZEL, R.; SRINIVASAN, M. V. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. **Nature**, v. 410, p. 930-933, 2001.

GIURFA, M. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, p. 726-735, 2003.

HAMANI, C.; DE PAULO, I.; MELLO, L.E.A.M. Neo-Timm staining in the thalamus of chronically epileptic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1677-1682, 2005.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Learning and memory in the honeybee. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 1617-1630, 1995.

HARTFELDER, K.; MÜLLER, L.; MENZEL, R. Ca^{2+} /Calmodulin and Ca^{2+} /Phospholipid-dependent protein kinase in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. **Insect Biochem.**, v. 21, n. 5, p. 479-489, 1991.

HARTFELDER, K. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 157-177, 2000.

HAUAG, F. M. S. Heavy metals in the brain. A light microscope study of the rat with Timm's sulphite silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**. v. 43, p. 1-71, 1973.

HUANG, Z. Y. (2003) *Ciberbee*. Disponível em <<http://www.cyberbee.com>>. Acesso em: 22 fev. 2006.

IKEGAYA, Y.; YOSHIDA, M. G.; FREDERICKSON, C. J. Epileptic activity prevents synapse formation of hippocampal mossy fibers via L-type calcium channel activation in vitro. **J. Pharm. Experim. Therap.**, v. 280, p. 471-476, 1997.

KAATZ, H. H.; HILDEBRANDT, H.; ENGELS, W. Primer effect of queen pheromone biosynthesis in adult worker honey bees. **J. Comp. Physiol.**, v. 162, p. 588-592, 1992.

KAMIKOUSHI, A.; TAKEUCHI, H.; SAWATA, M.; OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-triphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 242, n. 1, p. 181-6, 1998.

KAMIKOUSHI, A.; TAKEUCHI, H.; SAWATA, M.; NATORI, S.; KUBO, T. Concentrated expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. **J. Comp. Neurol.**, v. 417, n. 4, p. 501-10, 2000.

KAMIKOUSHI, A.; MORIOKA, M.; KUBO, T. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. **Zoological Sci.**, v. 21, p. 53-62, 2004.

KARCHER, R. L.; ROLAND, J. T.; ZAPPACOSTA, F.; HUDDLESTON, M. J.; ANNAN, R. S.; CARR, S. A.; GELFAND, V. I. Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Science**, v. 293, p. 1317-20, 2001.

KLOPPENBURG, P. Anatomy of the antennal motoneurons un the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). **J. Comp. Neurol.**, v. 363, n. 333-343, 1995.

KLÜVER, H.; BARRERA, E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. **J. Meuropathology and Experimental Neurology**, v. 12, p. 400-403, 1953.

LAEMMILI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v. 80, p. 575-579, 1973.

LANCET, D. Vertebrate olfactory reception. **A. Rev. Neurosci.**, v. 9, p. 329-355, 1986.

LANGFORD, G. M. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. **Traffic**, v. 3, n. 12, p. 859-65, 2002.

LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 175-190, 2002.

MCLEAN, I. W.; NAKANE, P. K. Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy. **J. Histochemistry and Cytochemistry**, v. 2, p. 1077-1083, 1974.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; BABB, T. L.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; TAN, A. M.; FINCH, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, p. 985-995, 1993.

MENZEL, R.; GIURFA, M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. **Trends Cogn. Sci.**, v. 5, p. 62-71, 2001.

MENZEL, R.; LEBoulLE, G.; EINSENHARDT, D. Small Brains, Bright Minds. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 237-239, 2006.

MENZEL, R. **Learning, memory and "cognition" in honeybees**. Neurobiology of comparative cognition (ed. R. P. Kesner and D. S. Olton), p. 237-292. Erlbaum Inc., Hillsdale, NJ, 1990.

MERMALL, V.; POST, P. L.; MOOSEKER, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science**, v. 279, p. 527-533, 1998.

MEYER, E. P.; MATUTE, C.; STRIT, P.; NASSEL, D. R. Insect optic lobe neurons identifiable with monoclonal antibodies to GABA. **Histochemistry**, v. 84, p. 207-216, 1986.

MEYER, T.; SHEN, K. In and out of the postsynaptic region: signalling proteins on the move. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 238-44, 2000.

MICHENER, M. H. Comparative external morphology, phylogeny and a classification of the bees (Hymenoptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 82, p. 151-326, 1944.

MOOBS, P. G. The brain of honeybee *Apis mellifera* L. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Phil. Trans. R. Soc. London Biol.**, v. 298, p. 309-354, 1982.

MORAES, V. R. A. **Imunodeteção no cérebro de abelha *Apis mellifera* de proteínas associadas a vesículas sinápticas, miosina-V e Ca^{+2} /calmodulina quinase II (CaMK II)**, Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2005.

NASCIMENTO, A. A. C.; AMARAL, R. G.; BIZARIO, J. C. S.; LARSON, R. E.; ESPREAFICO, E. M. Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild type cell line for *dilute* gene. **Mol. Biol. Cell.**, v. 8, n. 10, p. 1971-88, 1997.

NÄSSEL, D. R.; HELGEE, A.; SIVASUBRAMANIAN, P. Development of axon paths of motoneurons after removal of target muscles in holometabolous insect. **Brain Res.**, v. 391, p. 211-219, 1986.

NUNES, F. M.; VALENTE, V.; SOUSA, J. F.; CUNHA, M. A.; PINHEIRO, D. G.; MAIA, R. M.; ARAUJO, D. D.; COSTA, M. C.; MARTINS, W. K.; CARVALHO, A. F.; MONESI, N.; NASCIMENTO, A. M.; PEIXOTO, P. M.; SILVA, M. F.; RAMOS, R. G.; REIS, L. F.; DIAS-NETO, E.; SOUZA, S. J.; SIMPSON, A. J.; ZAGO, M. A.; SOARES, A. E.; BITONDI, M. M.; ESPREAFICO, M. E.; ESPINDOLA, F. S.; PACO-LARSON, M. L.; SIMOES, Z. L.; HARTFELDER, K.; SILVA JR., W. A. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. **MC Genomics** v. 5, 2004. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/84>. Acesso em: 10 jan. 2007.

OLESKEVICH, S.; CLEMENTS, J. D.; SRINIVASAN, M. V. J. Long-term synaptic plasticity in the honeybee. **J. Neurophysiol.**, v. 78, p. 528-32, 1997.

OLIVEIRA-JÚNIOR, W. P. **Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) por DDT-PCR**, Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 1999.

PASSOS-LIMA, A. B. **Análise bioquímica e imunohistoquímica de dineína, miosina-V e VI no cérebro das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris***, Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2001.

PEIXOTO, P. M. V. **Localização de miosina-V e cadeia leve de dineína em diferentes regiões do cérebro de *Apis mellifera***, Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2002.

PETERS, A. Golgi, Cajal, and the fine structure of the nervous system. **Brain Res. Rev.** 2007. Disponível em <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 16 jan. 2007.

RAY, S.; FERNEYHOUGH, B. The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. **Neuroreport.**, v. 8, p 789-793, 1997.

RECK-PETERSON, S. L.; PROVANCE, D. W.; MOOSEKER, M. S.; MERCER, J. A. Class V myosins. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1, p. 36-51, 2000.

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

ROBINSON, G. E.; WINSTON, M. L.; HUANG, Z.; PANKIW, T. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. **J. Insect Physiol.**, v. 44, p. 685-692, 1998.

ROBINSON, G. E.; GROZINGER, C. M.; WHITFIELD, C. M. Sociogenomics: social life in molecular terms. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 257-270, 2005.

SANTOS, A. M. G. Histoquímica de Metais Pesados. Coloração de Timm. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. Editora Plêiade, São Paulo, p. 65-104, 1999.

SAWASHITA, J; TAKEDA, A.; OKADA, S. Change of zinc distribution in rat brain with increasing age. **Dev. Brain Res.**, v. 102, p. 295-298, 1997.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; CYSNEIROS, R. M.; SCORZA, C. A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E. A Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v. 63, n. 2-A, p. 283-288, 2005.

SCOTT, S. K.; YOUNG, A. W.; CALDER, A. J. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdale lesions. **Nature**, v. 385, p. 254-257, 1997.

SETTI, E. A. C.; BONETTI, A. M. Estudo do padrão protéico em *Mellipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae). **Revista Eletrônica Horizonte Científico, Uberlândia**, 2001. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br>. Acesso em: 25 ago. 2005.

SIGG, D.; THOMPSON, C. M.; MERCER, A. R. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera*. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 7148-7156, 1997.

SILVA, M. F. R. **Cérebro e sistema sensorial de *Apis mellifera*. Localização de miosina VI e preparação de uma fração enriquecida e sinaptossomas**, Tese (Doutorado em genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia/MG, 2003.

SNODGRASS, R. E. Anatomy of the honey bee. **Comstock Publ. Ass. N. Y., USA**, 1956.

STRAUSFELD, N. J.; NÄSSEL, D. R. **Neuroarchitecture of brain regions that subserv compound eyes in crustacea and insects**. Ed. Springer, Berlin, 1980.

SUTER, D. M.; ESPINDOLA, F. S.; LIN, C. H.; FORSCHER, P.; MOOSEKER, M. S. Localization of conventional myosins V and VI in neuronal growth cones. **J. Neurobiol.**, v. 42, n. 3, p. 370-82, 2000.

TAKEUCHI, H., YASUDA, A., YASUDA-KAMATANI, Y., KUBO, T., NAKAJIMA, T. Identification of a tachykinin-related neuropeptide from the honeybee brain using direct MALDI-TOF MS and its gene expression in worker, queen and drone heads. **Insect Molecular Biology** v. 12, n. 3, p. 291-298, 2003.

TIMM, F. Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. **Dtsch. Z. Gesamte. Gerichtl. Med.**, v. 46, p. 706-711, 1958.

THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, vol. 443, 931-949, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

WINSTON, M. L. Intra-colony demography and reproductive rate of the Africanized honeybee in South America. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 4, p. 279-292, 1979.

WINSTON, M. L.; SLESSOR, K. N. The essence of royalty: honey bee queen pheromone. **Sci. Am.**, v. 80, p. 374-385, 1992.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honeybee**, Ed. Harvard Univ. Press, Cambridge, 1987.

WITHERS, G. S.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**, v. 364, p. 238-240, 1993.

ZIMMER, J. Changes in the Timm sulfide silver staining pattern of the rat hippocampus and fascia dentata following early postnatal deafferentation. **Brain Res.**, v. 64, p. 313-326, 1973.

ZIMMER, J. Long term synaptic reorganization in rat fascia dentata deafferented at adolescent and adult stages: observations with the Timm method. **Brain Res.**, v. 76, p. 336-342, 1974.