

DOUGLAS ELIAS SANTOS

TRANSFORMAÇÕES DO CORPO GORDUROSO DURANTE A METAMORFOSE

DE *Melipona quadrifasciata* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Santos, Douglas Elias, 1986-
S237t Transformações do corpo gorduroso durante a
2013 metamorfose de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera:
Apidae) / Douglas Elias Santos. – Viçosa, MG, 2013.
v, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.32-37.

1. *Melipona quadrifasciata*. 2. Inseto - Metamorfose.
3. Abelha - Fisiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22.ed. 595.799

DOUGLAS ELIAS SANTOS

TRANSFORMAÇÕES DO CORPO GORDUROSO DURANTE A METAMORFOSE

DE Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA: APIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de agosto de 2013.

Gustavo Ferreira Martins

Weyder Cristiano Santana

José Eduardo Serrão
(Orientador)

“Verbum caro factum est”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a causa final de Sócrates, ao ser em ato puro de Aristóteles, ao princípio norteador da cosmologia antrópica imaterial, atemporal, oniciente e unipresente, que se revela pelo seu mistério junto a humanidade. Traduzido em verdade porém esquecido pelo pecado original, a qual o homem padece sem perceber. Agradeço a Este que vulgam ser Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural por ter estruturado o curso ao qual realizei.

A CAPES pelo fomento da bolsa.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pela orientação e profissionalismo durante todos estes anos.

Aos professores Gustavo e Weyder por participarem da banca examinadora.

Ao Dihego pela amizade e ajuda imprescindível nas análises moleculares.

A minha família, suporte e alicerce Wilma Aparecida e João Alceminho e ao meu braço direito, meu irmão, Denis Júnio.

Ao Ministério Universidades Renovadas por ser a minha segunda família em Viçosa.

A Karina Carneiro Castro pelo profissionalismo e competência.

Aos amigos de laboratório Milton, Wagner, Kenner, Marcelo, Madu, Debora, Pollyanna, Luisa, Waléria, Glenda, Aline, Alice, Helen, Monteiro, Mary e Jamile.

Aos amigos da república: Maurício, José Campos, Robert e Isaias.

Aos inúmeros amigos da biologia.

A cada olhar e sorriso que cultivei em Viçosa.

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract	vi
1. Introdução	1
2. Objetivo.....	8
3. Material e Métodos	9
3.1. Animais	9
3.2. Imunofluorescência	9
3.3. Extração e quantificação de proteínas	10
3.4. Gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE)	10
3.5. <i>Western blotting</i>	10
3.6. Detecção de fragmentação do DNA	11
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	12
3.8. <i>Primers</i>	12
3.9. Extração de RNA.....	13
3.10. Confecção de cDNA	14
3.11. Sequenciamento	15
3.12. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	15
4. Resultados.....	16
5. discussão	25
6. Referências Bibliográficas	32
Apêndices.....	38

RESUMO

SANTOS, Douglas Elias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Transformações do corpo gorduroso durante a metamorfose de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Dihego de Oliveira Azevedo e Maria do Carmo Queiroz Fialho.

A abelha *Melipona quadrifasciata* possui aproximadamente cinco dias de desenvolvimento embrionário, 15 dias de estágio larval e 18 dias de estágio pupal. É durante esse período tecidos e órgãos sofrem profundas modificações. O corpo gorduroso é um órgão contituido basicamente por trofócitos e enócitos, sendo, os primeiros, fonte energia durante a metamorfose. Há dois mecanismos sugeridos para destino das células do corpo gorduroso durante a metamorfose: um no qual há a completa renovação celular após destruição do corpo gorduroso larval e outro no qual o corpo gorduroso larval sofre dissociação de suas células que são realocadas para formar o corpo gorduroso do inseto adulto. O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis mecanismos de morte celular programada das células do corpo gorduroso de *M. quadrifasciata* durante a metamorfose. Para a identificação de apoptose, larvas pós defecantes, pupas de olho branco, olho rosa, olho marrom e olho preto tiveram o corpo gorduroso dissecado e submetido a imunodeteccção de caspase-3 clivada, verificação da integridade do DNA, análise ultraestrutural, deteccção de autofagia por RT-PCR para o gene *Atg1*. Os resultados mostram ocorrência de pouca apoptose, pois há poucas células caspase 3 clivada positivas e ausência de DNA fragmentado. Associado a isso, há alta atividade metabólica das células do corpo gorduroso evidenciada pelo aumento na quantidade de mitocôndrias e de ribossomos livres no citoplasma bem como a presença de núcleo com cromatina descondensada ao longo do desenvolvimento. As células do corpo gorduroso de larvas pós-defecantes de *M. quadrifasciata* expressam maior quantidade de mRNA *Atg1* que as pupas. Esses resultados sugerem que as células do corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata* sofrem pouca morte celular por apoptose durante o processo de metamorfose, porém com indícios de aumento de autofagia durante a fase larval que precede a metamorfose.

ABSTRACT

SANTOS, Douglas Elias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2013. **Modifications in the fat body during the metamorphosis of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Dihego de Oliveira Azevedo e Maria do Carmo Queiroz Fialho.

The development of the bee *Melipona quadrifasciata* comprises five days of embryonic development, 15 days of larval stage and 18 days of pupal stage. In this period several tissues and organs undergo changes. The fat body is an organ composed basically trophocytes, which supply energy during insect metamorphosis. During metamorphosis the fate of fat body can be different: they can be renewed after destruction of the larval and they can be recycled and relocated to form the fat body of the adult insect. The aim of this study was to identify the occurrence of programmed cell death in the fat body cells during metamorphosis of *M. quadrifasciata*. Post-defecating larvae, white-, pink-, brown- and black-eye pupae had the fat body dissected and subjected to immunodetection for cleaved caspase-3, DNA integrity, ultrastructural analysis, detection of autophagy by means of RT-PCR for the gene *Atg1*. Few apoptotic cells were seen in the fat body of *M. quadrifasciata* because there are fewer cleaved caspase-3 positive cells and absence of fragmented DNA. So corroborating, under electron microscope these cells showed an increasing in the number of mitochondria and free ribosomes in the cytoplasm as well as the presence of nucleus with decondensed chromatin throughout metamorphosis. The fat body cells of post-defecating larvae of *M. quadrifasciata* express higher amounts of *Atg1* mRNA than pupae. These results suggest that there are few fat body cells of *M. quadrifasciata* that undergo cell death by apoptosis during the process of metamorphosis, but with evidence of increased autophagy during post-defecating larvae stage.

1. INTRODUÇÃO

Das espécies de plantas da caatinga e pantanal 30% e até 90% em alguns remanescentes da Mata Atlântica e algumas partes da Amazônia, necessitam dos meliponínios para a polinização e frutificação (Kerr *et al.*, 2001). Apesar disso, os meliponíneos estão sofrendo forte redução populacional decorrente de desmatamento, queimadas, ação destrutiva causada por meleiros e o uso indiscriminado de inseticidas (Kerr, 1997). Dentre os meliponini, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (1836) tem distribuição geográfica dos estados de Pernambuco ao Rio Grande do Sul (Silveira *et al.*, 2002). Devido à importância ecológica e econômica e o real risco de extinção que vem sofrendo os Meliponini, estudos envolvendo *M. quadrifasciata* são fundamentais para o entendimento de sua biologia e conservação.

O tempo desenvolvimento para o *M. quadrifasciata* é de aproximadamente 38 dias, sendo cinco dias de desenvolvimento embrionário, 15 dias de estágio larval e 18 dias de estágio pupal (Rossini, 1989). É durante o desenvolvimento pós-embrionário, especificamente durante a metamorfose, que os tecidos e órgãos internos sofrem profundas modificações para desempenhar suas funções no inseto adulto (Chapman, 2013).

O corpo gorduroso das abelhas é um órgão que preenche a cavidade abdominal, sendo constituído basicamente por trofócitos, enócitos e urócitos (Figura 1) (Cruz-Landim, 2009). É dividido em duas regiões: a camada perivisceral, localizada ao redor dos demais órgãos, e a camada pariental, localizada próximo ao tegumento do inseto (Chapman, 2013, Cruz-Landim, 2009). Esse órgão se origina do mesoderma, formando os trofócitos na fase embrionária através do aumento no número de células e diferenciação destas. Em *M. quadrifasciata* os trofócitos constituem grande parte do tecido, apresentam-se em aglomerados celulares, permanecendo aproximadamente

esféricos e rodeados por uma lamina basal própria (Cruz-Landim, 1983). Nas larvas de último estágio grânulos de urato começam a se acumular em alguns trofócitos dando origem aos urócitos (Cruz-Landim, 2009). Porém, esse mesmo órgão pode conter células de origem ectodérmica como os enócitos, sendo que a proporção de células de trofócitos e enócitos varia de acordo com a fase de vida que o inseto se encontra (Oliveira & Cruz-Landim, 2003).

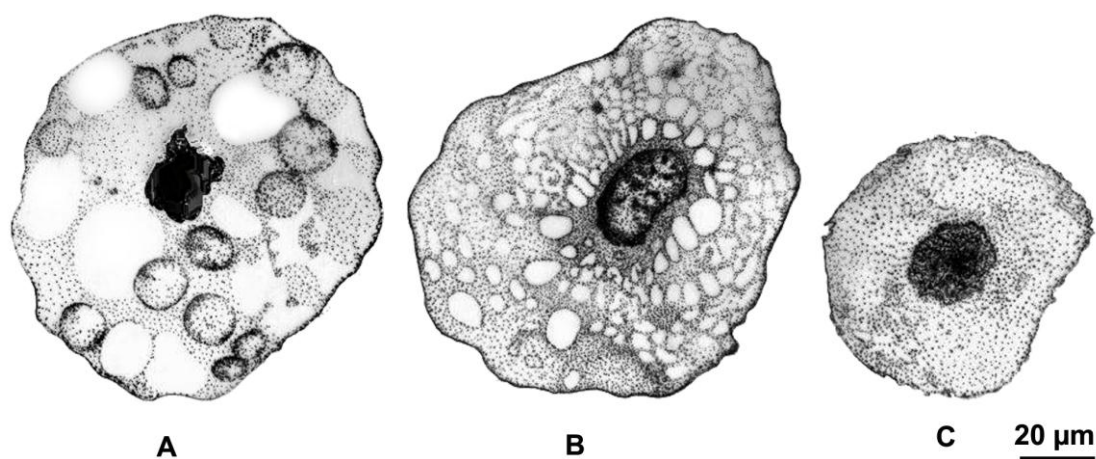


Figura 1. Representação esquemática do trofócito (A), do urócito (B) e enócito (C) do corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata*.

Durante a fase larval das abelhas, o corpo gorduroso tem como função primordial acumular reservas, as quais serão mobilizadas para obter energia durante a fase de pupa, onde ocorre a metamorfose (Cruz-Landim, 2009). Primeiramente os trofócitos de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* armazenam lipídeos, seguido de glicogênio e finalmente glânulos protéicos em larvas tardias (Cruz-Landim, 1983). É devido a isso que há o aumento do peso das larvas de operárias de *M. quadrifasciata anthidioides* durante o desenvolvimento pós-embrionário (Cruz-Landim, 1983). Os trofócitos das larvas de rainhas e machos acumulam mais reservas do quem em operárias, em função da alimentação que recebem (Cruz-Landim, 2009).

No intestino dos insetos, os lipídeos provenientes da dieta larval são digeridos, convertidos em diacilglicerol e exportados para a hemolinfa. Apolipoproteínas capturam o diacilglicerol, que por sua vez é hidrolisado e entregue ao corpo gorduroso armazenando-o sob a forma de triacilglicerol (Liu *et al.*, 2009). Os carboidratos, por sua vez, são digeridos e convertidos para trealose que é então exportada para hemolinfa e convertida em glicose (Liu *et al.*, 2009). A glicose é subsequentemente entregue ao corpo gorduroso através de transportadores específicos de membrana (Becker *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 2009). No corpo gorduroso, a glicose é armazenada sob a forma de glicogênio, que pode ser mobilizado para trealose na hemolinfa para utilização (Van der Horst, 2003). Os aminoácidos provenientes da digestão, são liberados na hemolinfa e capturados via diversos transportadores de membrana nos trofócitos (Liu *et al.*, 2009).

Em abelhas adultas os trofócitos ainda armazenam lipídeos, proteínas e glicogênio, porém, atuam no metabolismo intermediário, defesa imunológica, desintoxicação e produção de proteínas da hemolinfa, como vitelogenina (Pan *et al.*, 1969, Chapman, 2013). Além disso, este órgão é alvo de vários hormônios importantes como neurohormônios, hormônio juvenil e ecdisteroides (Keeley, 1985). Em *M. quadrifasciata anthidioides*, por exemplo, o hormônio juvenil III e ecdisterona (20-HE) influência diretamente na mobilização de reservas dos trofócitos de rainhas virgens e nutridoras (Paes-De-Oliveira *et al.*, 2013). Através do processo de absorção e liberação de substâncias na hemolinfa, os trofócitos regulam a composição do meio circulante do inseto, atendendo as necessidades metabólicas imediatas (Oliveira & Cruz-Landim, 2003).

As transformações do corpo gorduroso durante a metamorfose tem sido melhor estudadas em *Diptera* e *Lepidoptera*. Em *Drosophila*, por exemplo, após a dissociação, as células do corpo gorduroso persistem independentemente mas são progressivamente

histolisadas. Em Lepdóptera as células do corpo gorduroso parietal são destruídas na lagarta, mas as células do corpo gorduroso perivisceral persistem no adulto (Chapman, 2013) No entanto, sabe-se que em *Apis mellifera*, as células do corpo gorduroso de larvas de operárias sofrem modificações bioquímicas no decorrer da metamorfose, tendo a fosfatase ácida como candidata a agir no processos de degradação de proteínas e lipídeos bem como na desintegração celular (Poiani & da Cruz-Landim, 2012). Além disso, durante a metamorfose de *M. quadrifasciata*, os trofócitos sofreriam histólise, liberando grande quantidade de glóbulos contendo material de reserva na hemolinfa (Cruz-Landim & Mello, 1966, Cruz-Landim, 1983). Micrografias eletrônica de transmissão apontam para significativa presença de trofócitos rompidos na pupação, bem como evidências de reabsorção deste material por outros trofócitos. Esse processo prossegue durante toda a pupação até que ao fim da metamorfose restam poucos trofócitos em relação ao número de células no estágio larval (Cruz-Landim & Mello, 1966, Cruz-Landim, 2009). Supostamente esta redução do número de células estaria relacionado a processos de morte celular programada.

As células do corpo gorduroso podem sofrer mudanças químicas ou outras mudanças que causariam a destruição de parte das células larvais, mas permitindo ainda o desenvolvimento de células adultas a partir de remanescentes do corpo gorduroso larval (Oertel, 1930).

A morte celular programada é um processo evolutivamente conservado que possui importante papel no desenvolvimento animal e na homeostase tecidual, removendo células e tecidos de animais multicelulares (Jacobson *et al.*, 1997, Fuchs & Steller, 2011). Segundo o comitê de nomenclatura de morte celular (Galluzzi *et al.*, 2012) são reconhecidos 13 tipos de mortes celulares classificadas molecularmente de acordo com a via de regulação intracelular e sinalizadores extracelulares. Desse modo

temos anoiquia, autofagia, apoptose dependente e independente de caspase, cornificação, entose, apoptose extrínseca por receptores de morte, apoptose extrínseca por receptores dependentes de netrina, catástrofe mitótica, necroptose, netose, partanatos e piropitose. Dessas, os eventos apoptóticos, necróticos e de autofagia são os mais comumente encontrados nos animais (Galluzzi *et al.*, 2012).

Apesar da diversidade de mecanismos moleculares de morte celular programada, grande parte deles envolvem a participação de proteínas-chave denominadas caspases (Fuchs & Steller, 2011). Caspases são proteases que possuem cisteína em seu sítio ativo e clivam seus substratos produzindo um resíduo de ácido aspártico, sendo necessária a participação delas em uma cascata proteolítica intracelular para dar início ao evento apoptótico (Kumar, 2007, Alberts *et al.*, 2008). Em princípio são produzidas como zimógenos imaturos, denominadas prócaspases, requerendo proteólise específica para ativação (Khan & James, 1998). Em *Drosophila melanogaster* as principais caspases efetoras são a DrICE e a Dcp-1 (Figura 2). Essas são ativadas por outra caspase denominada Dronc, que por sua vez é regulada por um inibidor apoptótico e pelo complexo Ark (Fuchs & Steller, 2011). Nos insetos, estudos revelam que o processo apoptótico envolve sete caspases, similares as caspases efetoras de mamíferos (Kumar, 2007). A DrICE é a principal proteína efetora do processo apoptótico nos insetos, que apresenta aumento de atividade durante o processo de pupação (Kaneko *et al.*, 2011). A DrICE é um heterotetrâmero que consiste de dois heterodímeros arranjados anti-paralelamente, cada um formado por subunidades de 21 kDa (p21) e 12 kDa (p12) (Meier *et al.*, 2000).

Além da apoptose, há a autofagia que é um processo conservado associada a degradação de proteínas ou organelas citoplasmáticas no interior de lisossomos, cujos produtos são reciclados para a síntese de macromoléculas ou na geração de energia

(Chang & Neufeld, 2010). Três tipos de autofagia foram descritas: i) macroautofagia, que ocorre quando proteínas solúveis e organelas são degradadas em lisossomos; ii) microautofagia, que é considerada constitutiva e responsável pela renovação intracelular; e iii) autofagia mediada por chaperonas, descrita apenas em mamíferos, sendo responsável pela degradação seletiva de algumas proteínas solúveis no citossol (McPhee & Baehrecke, 2009, Koga & Cuervo, 2011). Durante a autofagia, componentes citosólicos são sequestrados por vesículas com dupla membrana, denominadas autofagossomos, que se fundem aos lisossomos (McPhee & Baehrecke, 2009). Em todos os eucariotos a autofagia é induzida via complexo Autophagy-related gene 1 (*Atg1*) (Zirin & Perrimon, 2010). Este complexo tem como principal fator a proteína quinase *Atg1* que constitui o alvo central de regulação negativa da via TOR no direcionamento da formação dos autofagossomos em insetos e leveduras (Figura 3) (He & Klionsky, 2009). Homólogos da subunidade protéica do complexo *Atg1* são encontrados em *Saccharomyce cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* com nomenclatura de *Atg1*, em *Caenorhabditis elegans* correspondente a proteína Ucn-51 e em *Homo sapiens* correspondente as proteínas ULK1 e ULK2, que revela alta conservação filogenética deste gene (Mizushima, 2010).

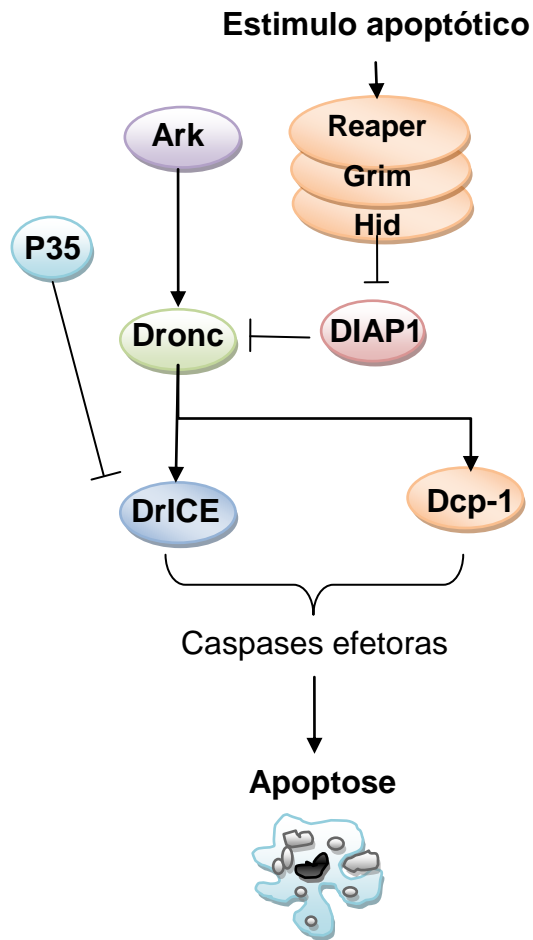


Figura 2. Rota de sinalização apoptótica em *Drosophila melanogaster* com os principais mecanismos de regulação (Fuchs & Steller, 2011).

Insulina/Fatores de crescimento

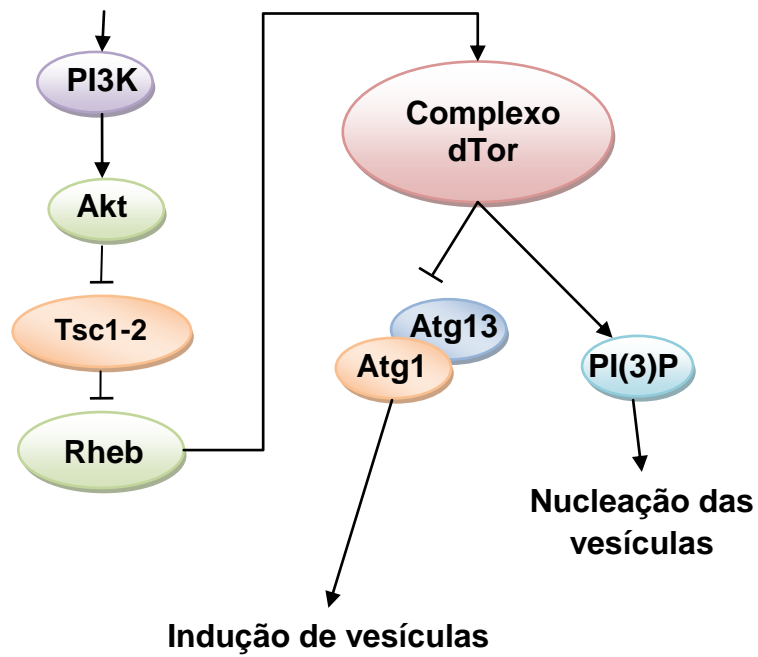


Figura 3. Representação esquemática dos principais mecanismos de regulação da maquinaria autofágica de *Drosophila melanogaster* e levedura (He & Klionsky, 2009).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis mecanismos de morte celular programada das células do corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata* durante a metamorfose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Larvas pós defecantes (LPD), pupas de olho branco (OB), pupas de olho rosa (OR), pupas de olho marrom (OM) e pupas de olho preto (OP), que caracterizam diferentes períodos do desenvolvimento pupal de *M. quadrifasciata*, foram coletadas diretamente de favos de cria de três colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'N; 42°52'E).

3.2. Imunofluorescência

Quinze indivíduos em cada estágio de desenvolvimento foram coletados aleatoriamente das três colônias *M. quadrifasciata*, crio-anestesiados a -5°C e dissecados sob esteriomicroscópio para a retirada do corpo gorduroso. Em seguida o corpo gorduroso foi transferido para paraformaldeído 4% por 16 h a 4°C . Posteriormente as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M (PBS) e embebidas em Tissue Freezing Medium™ (Jung), seccionadas a 14 μm em criostato Leica CM1850™. As Secções foram colocadas em lâminas cobertas com poli-L-lisina (Sigma™), hidratadas com PBS e Tween-20 a 1% (PBST) por duas h, lavadas com PBS e incubadas em anticorpo anti-caspase 3 clivada produzida em coelho (Trevigen, #2305-PC-100) 1:500 em PBS contendo BSA 0,1% por 16 h a 4°C . A seguir as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário Ig-G de coelho FITC-conjugado (Sigma™) diluído 1:100 em PBS contendo BSA 0,1% por uma hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS e contra-corados com iodeto de propídeo (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por cinco min. Após nova lavagem em PBS as amostras foram montadas com sacarose 50% e examinados no microscópio confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta™.

O controle negativo foi realizado pela omissão de incubação em o anticorpo anti-caspase 3 clivada, seguido do mesmos procedimentos descritos acima.

3.3. Extração e quantificação de proteínas

Três abelhas de cada fase de desenvolvimento de cada colônia de *M. quadrifasciata* foram crio-anestesiadas e dissecadas sob esteriomicroscópio para a retirada do corpo gorduroso e colocadas em 100 µL de coquetel inibidor de protease (Sigma™; # P2714-1BTL). As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 18680 g, descartado o *pellet* e coletado o sobrenadante. A quantificação proteica foi realizada pelo método de (Bradford, 1976), no qual foi realizada uma curva padrão com albumina de soro bovino com três repetições para cada amostra. A leitura dos dados foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm e as análises realizadas pelas absorbâncias obtidas.

3.4. Gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE)

A separação eletroforética de proteínas por peso molecular foi realizada conforme Laemmli (1970), utilizando 30 µg de proteínas das amostras de cada fase de desenvolvimento. O procedimento foi realizado em equipamento Mini Protean II™ (Bio Rad®), em gel de poliacrilamida 12% (SDS 10%, 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 e Acrilamida/Bis-acrilamida 30%), a 200V por 50 min. A coloração do gel foi realizada em solução corante comassie Blue G250 (Comassie Blue G250, Acido acético 10% e Etanol 50%). O gel foi analisado em software AlphaEasyFC™.

3.5. Western blotting

A técnica de *western blotting* foi realizada com a incubação do gel de SDS-PAGE (realizado como descrita acima) por 20 min em tampão de transferência (Tris base 0.58%, glicina 0.28%, SDS 0.037%, metanol 20%) seguida de transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose (0,2mm de tamanho

dos poros) a 30v por um período de 24h, a 4°C. A membrana foi posteriormente incubada com leite em pó a 5% em Tampão TBS 0,1M, pH 8,0, contendo 0,1% de Tween-20 (TBST) para o bloqueio de marcações inespecíficas. Em seguida a membrana foi lavada em TBST e incubada com anticorpo anti-caspase 3 clivada 1:500 por 4 h. Controle negativo foi demonstrado incubando-se a membrana de nitrocelulose em soro normal de coelho 1:500, seguindo de incubação com anticorpo secundário anti IgG com peroxidase conjugada por 2h a 25 °C. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo anti Ig-G conjugada com peroxidase por 2h a 25°C. A peroxidase foi revelada utilizando solução diaminobenzidina a 0,001%, 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 10 µL H₂O₂ 30% e 250 µL cloreto de níquel a 0,3% por um período de 30 min sob proteção de luz.

3.6. Detecção de fragmentação do DNA

O DNA total foi extraído do corpo gorduroso de LPD, OB, OR, OM e OP. O órgão foi dissecado e macerado em nitrogênio líquido, seguido de incubação em tampão de extração de DNA (Tris-HCl pH8 100mM, EDTA 25mM, NaCl 100mM, SDS 1%), e posteriormente em proteinase K por 3 h a 65°C para a degradação das proteínas. A seguir foi acrescentado solução fenol:clorofórmio (1:1), centrifugação a 18620 g por 8 min. O sobrenadante foi coletado e incubado com 10 µL RNase 1 µg/mL a 37°C por 1 hora. Às amostras foram acrescentadas isopropanol seguido de armazenamento a -20°C por 24 h para a precipitação do DNA. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 18620 g por 30 min, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Em seguida as amostras de DNA foram re-suspendidas em tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). Para a verificação da integridade do material genético, alíquotas de 4 µL de cada amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídeo, a 80 v por 3 h. O gel foi

fotografado em transiluminador Ultra-Violeta com a utilização do software Alpha Innotech Corp® e analisado em software AlphaEasyFC™.

A cada 72 h, indivíduos a partir dos estágio larval pós defecante até pupa de olho branco, foram coletados e submetidos a extração de DNA com o objetivo de acompanhar mais detalhadamente a integridade do material genético do órgão do corpo gorduroso durante o processo de metamorfose.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Três abelhas de cada fase de desenvolvimento tiveram o corpo gorduroso dissecado e transferido para glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,1 contendo sacarose a 0,3M, mantido por 2 h. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio, pós fixadas por 2 h em tetróxido de ósmio 2% em cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,1 e desidratado em série etanólica crescente. As amostras foram embebidas em LR-White resin™ e, depois da polimerização, seccionadas a 80-90 nm, e contrastadas com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo. Os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109™.

3.8. Primers

Todos os *primers* para PCR e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram desenhados a partir do gene *autofagy 1 (Atg1)* de *Apis mellifera* na plataforma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e adquiridos comercialmente da empresa Invitrogen®. Para PCR foi desenvolvidos dois *primers* Atg1-4 e Atg1-8, com produto de amplificação de 779bp e 633bp. Enquanto para o RT-qPCR foi desenvolvido os *primers* qPCR Atg1-4 e qPCR Atg1-8, com transcrito de 147pb e 128pb, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para PCR (Atg1-4 e Atg1-8) e qPCR (qPCR Atg1-4 e qPCR Atg1-8).

<i>Primers</i> para o gene <i>Atg1</i>	Foward (5'-3')	Reverse (3'-5')
Atg1-4	GCTCCATTTCAAGCTCACACG	AGTGGCGAGGAT GCACTAT
Atg1-8	AACGTCTCCATTACGGCG	CCTGTCTGATGAAGAAGCCCTA
qPCR Atg1-4	AGAGAGGCAGTGAGTCCACC	TATTGGTTGCGAGCGAGGAA
qPCR Atg1-8	GCACTGCTGCAACAAGAAGAA	ACTGGCAGTTGGCTGTAACC

Os *primers* Atg1-4 e Atg1-8, bem como para os *primers* qPCR Atg1-4 e qPCR Atg1-8 foram submetidos a PCR simples, com o mRNA de larvas pós defecantes em diferentes temperaturas de anelamento (55°C;57,4°C;60,3°C;63,2°C;65,8°C), de modo a otimizar a especificidade dos *primers* ao gene *Atg-1* (Apêndices A1; A2).

3.9. Extração de RNA

Cinco abelhas de cada fase de desenvolvimento tiveram o corpo gorduroso dissecado e transferido para tubos contendo 200 µL RNAlater™ (Ambion®), seco em papel de filtro, transferido para 500 µL de Tri-reagente™ (Sigma®), homogeneizados e incubados a 5 min em temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 100 µL de clorofórmio e agitado em vortex por 5 min. O mesmo foi deixado incubado por 10 min a temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 12000 g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para 250 µL de 2-propanol sob agitação, incubada por 10 min em gelo e centrifugada a 12000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2 vezes com 500 µL de etanol 75%, seguido de agitação e centrifugação a 12000 g por 5 min. O etanol foi descartado e o precipitado seco ao ar e

ressuspendido em 20 μL de água ultra-pura a 60°C por 15 min. O RNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop™, a 260 nm de absorbância.

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, sendo utilizados 3 μL de cada amostra de RNA homogeneizado com 4,5 μL de tampão de amostra (Glicerol 50%, Azul de Bromofenol 0,125%, Xileno Cianol 0,125%, Tampão Tris-base EDTA 1mM, pH8,0). e 0,5 μL de GelRed™ (Biotium®). A voltagem foi regulada por 80 V e a corrida estendeu-se por 4 h, seguido de captura de imagem em câmara de radiação ultravioleta.

3.10. Confeção de cDNA

Para confecção do cDNA fita simples (ss cDNA), aliquotas contendo 400 ng de RNA foram misturados a 2 μL dos *primers* SMART IV 12 μM e CDSIII 12 μM (Invitrogen®) e 4 μL de mistura de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) a 10 mM cada. Os tubos contendo as amostras foram aquecidos a 70°C por 5 min, seguido de rápida incubação em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 segundos, seguidos da adição de 2 μL 10X Reverse Transcriptase buffer (New England BioLabs®), 1 μL de inibidor de RNase (New England BioLabs®) e 1 μL de 1 μL enzima M-MuLV™ Transcriptase Reversa (New England BioLabs®) e de água ultra-pura até completar 20 μL . As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, seguido de inativação da enzima por 15 min a 72°C.

O cDNA dupla fita (ds cDNA) foi confeccionado por LD-PCR utilizando 4 μL de ss cDNA, 0,25 μL de enzima Taq polimerase (GoTaq™ Promega®), 10 μL GoTaq® Reaction Buffer contendo 1,5mM MgCl_2 (Promega®), 1 μL de mistura de dNTPs 10 mM, 1 μL de primer CDSIII 12 μM (Clontech®), 1 μL de primer SMART IV 12 μM (Invitrogen®) e água ultra-pura até completar 50 μL cada. A reação de PCR envolveu

desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 31 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 68 °C por 6 min. O cDNA obtido foi dosado por espectrofotômetro Nanodrop™ a 260 nm.

3.11. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare®, Freiburg, Germany), sendo utilizados 100 a 150 ng de cDNA, 0,5 µM do oligonucleotídeo M13F/M13R, 2,0 µL de DYEnamic™ ET Dye Terminator Sequencing Pre-mix em volume final de 5 µL. As condições de PCR foram 95°C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 2 min repetidas 35 vezes. Em seguida, o cDNA foi precipitado pela adição de 27,5 µL de etanol e acetato de amônio para concentração final de 0,75 M. Após 10 min a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 min a 2400 g. O cDNA foi então lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugado a 2400 g por 10 min e deixado secar por 10 min. Após a precipitação, o cDNA foi ressuspendido em 5 µL de Loading Buffer™ (GE Healthcare®). A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 de 48 capilares (GE Healthcare®)

As sequências obtidas foram comparadas com sequências contidas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> utilizando o algoritmo BLASTn, RefSeqRNA, *Apis mellifera*.

3.12. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A reação de qPCR foi realizada em três indivíduos de cada fase de desenvolvimento de cada colônia de *M. quadrifasciata*, utilizando o kit de quantificação por fluorescência GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega®), *primers* para o gene *Atg1* e

o gene de referência *rp49* de *A. mellifera* (Tabela 1). As reações foram realizadas em triplicata, utilizando 10 µL do kit GoTaq™ qPCR Master Mix, 1,6 µL de solução de *primers* a 10 µM, 4µL de cDNA contendo 200 ng de ds cDNA e água ultra-pura para um total de 20 µL. A reação de PCR envolveu desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento e alongamento a 60 °C por 1 minuto, e curva de dissociação a 60-95 °C.

Inicialmente, uma curva padrão para os genes *Atg1* e *rp49* foram obtidas pela relação do $\text{Log}_2[\text{cDNA}]$ de diferentes concentrações de cDNA (400, 200, 100, 50, 25 e 0 ng) e seus respectivos valores de Ct. A equação obtida para cada gene foi utilizada para calcular a quantidade do amplificado nas diferentes amostras. Os valores obtidos para o gene *Atg1* foram divididos pelos valores obtidos para o gene *rp49* de modo a normalizar os resultados. As diferenças nos níveis de expressão obtidos entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com 5% de significância.

4. RESULTADOS

As análises de imunofluorescência para detecção de células em apoptose no corpo gorduroso de *M. quadrifasciata*, com o anticorpo anti-caspase 3, mostraram a ocorrência de poucas células apoptóticas nas fases de pupa de OB, OR, OM e OP (Figura 4), as quais não foram observadas na larva pós-defecante.

O perfil eletroforético das proteínas extraídas do corpo gorduroso de *M. quadrifasciata* foi semelhante em todas as fases de pupas analisadas, com proteínas variando de 39 a 100 kDa (Figura 5A). A análise por *western blotting* do perfil proteico do corpo gorduroso de *M. quadrifasciata* identificou reação positiva para caspase-3 clivada em proteínas com 100 e 56 kDa nas diferentes fases do desenvolvimento de *M.*

quadrifasciata (Figura 5B). Entretanto, o controle negativo também demonstrou reação positiva para as das mesmas proteínas (Figura 5C).

A análise da integridade do DNA das células do corpo gorduroso das diferentes fases de desenvolvimento de *M. quadrifasciata*, revelou uma única banda de alto peso molecular, sem evidência de fragmentação do DNA (Figura 6A). O mesmo resultado foi encontrado nas análises das fases de transição de larva para pupa a cada 72 h (Figura 6B).

A análise ultraestrutural dos trofócitos do corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *M. quadrifasciata*, não evidenciou a presença de células com características de apoptose ou autofagia. Nas larvas os trofócitos apresentaram poucas mitocôndrias com cristas irregulares, algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, grande quantidade de grânulos de reserva e núcleo com cromatina descondensada (Figuras 7-A, B). Em OB pode se notar grânulos em processo de mobilização de suas reservas, no qual é possível observar a presença de vacúolos com regiões com ausência de material localizado bem como vesículas próximo a eles (Figura 7C). Durante a fase de OR de *M. quadrifasciata* os trofócitos apresentaram muitas mitocôndrias pequenas de formato esférico e alongado, com cristas regulares e uniformemente espalhadas a longo do citoplasma (Figura 7D). Em OM, além de mitocôndrias, houve aumento na quantidade de ribossomos livres (Figura 7E, F). Trofócitos das OP de *M. quadrifasciata* mostraram quantidade maior de mitocôndrias no citoplasma perinuclear (Figura 7G).

Os primers Atg1-4 e Atg1-8 desenvolvidos a partir do gene *Atg1* de *A. mellifera* amplificaram o ssDNA provenientes de larvas pós defecantes de *M. quadrifasciata* gerando transcritos de 799 pb e 699 pb, respectivamente (Figura 8, Apêndice A2).

O sequenciamento do produto do *primer* Atg1-4 revelou 98% de identidade em relação ao gene *Atg1* de *A. melífera* (Figura 9).

As células do corpo gorduroso de LPD expressam maior quantidade de mRNA *Atg1* quando comparado com o corpo gorduroso das diferentes fases de pupa de *M. quadrifasciata*. A expressão do mRNA *Atg1* nas larvas foi duas vezes maior que em OB e OM (Figura 10), não apresentando diferença significativa durante os estágios de pupa (Apêndice A3).

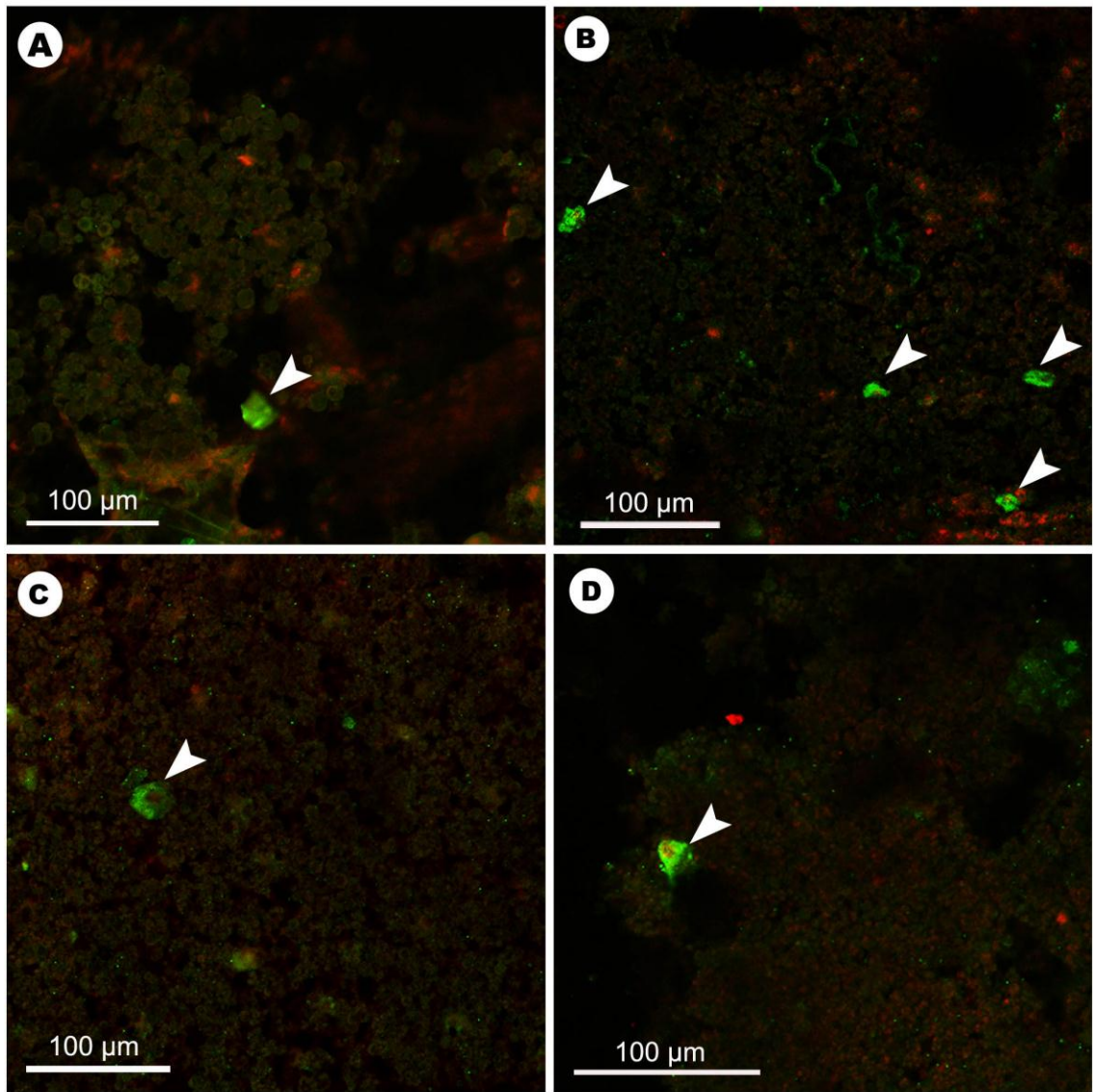


Figura 4. Imunofluorescência em crio-seções do corpo gorduroso de operárias de *Melipona quadrifasciata* em diferentes fases do desenvolvimento, mostrando a ocorrência de poucas células apoptóticas (pontas de seta) positivas para anti-caspase 3 clivada. Pupa de olho branco (A); pupa de olho rosa (B), pupa de olho marrom (C); pupa de olho preto (D). Núcleos em vermelho.

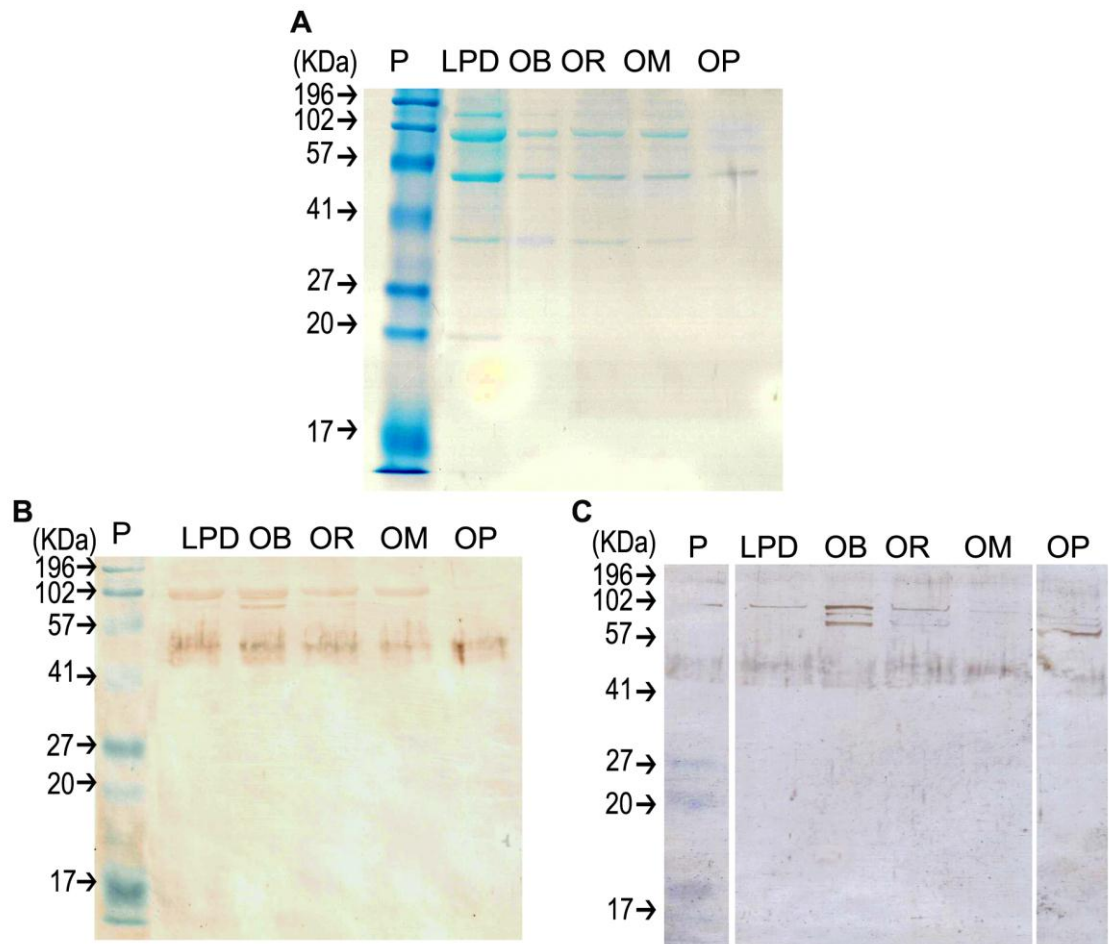


Figura 5. (A) SDS-PAGE das proteínas extraídas do corpo gorduroso de diferentes fases de desenvolvimento de operárias de *Melipona quadrifasciata*. (B) Western blotting para detecção de caspase-3 clivada no do corpo gorduroso em diferentes fases do desenvolvimento de operárias de *M. quadrifasciata* mostrando reação positiva para proteínas de 102 e 56 kDa, as quais são evidenciadas no controle negativo (C). Padrão de peso molecular (P), larva pós defecante (LPD), pupa de olho branco (OB), Pupa de olho rosa (OR), pupa de olho marrom (OM), pupa de olho preto (OP).

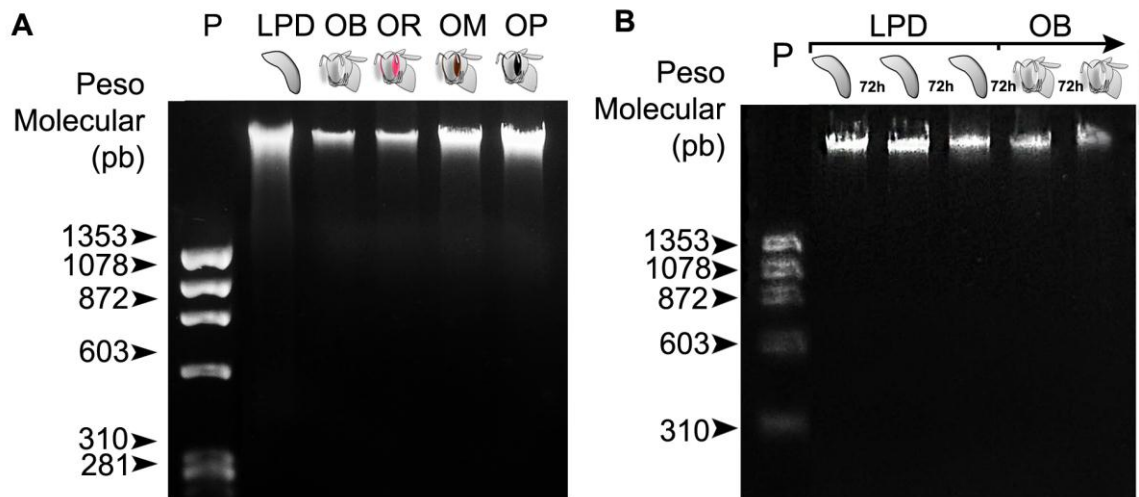


Figura 6. Verificação da integridade do DNA das células do corpo gorduroso de operárias de *Melipona quadrifasciata*. Note a ausência de fragmentação do DNA nos seis estágios de desenvolvimento (A) e nas fases de transição de larva para pupa com 72 h de diferença entre estas (B). Padrão (P), larva pós defecante (LPD), pupa de olho branco (OB), pupa de olho rosa (OR), pupa de olho marrom (OM), pupa de olho preto (OP).

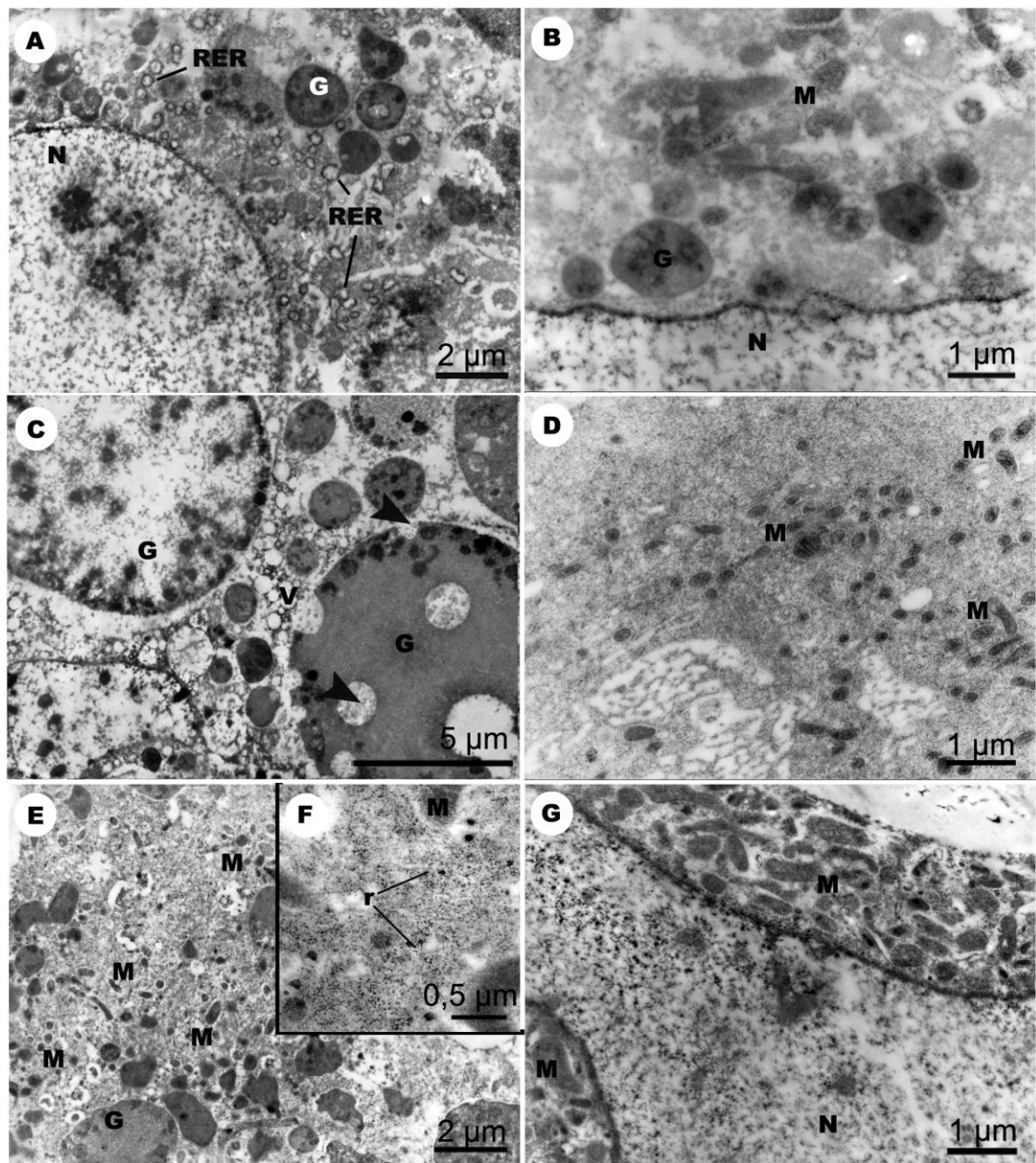


Figura 7. Micrografias eletrônicas de transmissão de trofócitos do corpo gorduroso de larvas e pupas de operárias de *Melipona quadrifasciata*. A) LPD mostrando cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER), grânulos de reserva (G) e núcleo com cromatina descondensada (N). B) LPD mostrando mitocôndrias com cristas tubulares e grânulos de reserva próximos ao núcleo (N). C) OB mostrando grânulos em processo de mobilização de suas reservas (setas), diferentes grânulos de reserva (G), vesículas de transporte (V). D) OR mostrando de mitocôndrias. E) pupa de olho marrom contendo grânulos de reserva (G) e grande quantidade mitocondrial (M). F) OM mostrando grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma (r). G) OP mostrando alta concentração mitocondrial próximo a região nuclear (M) e núcleo com cromatina descondensada (N).

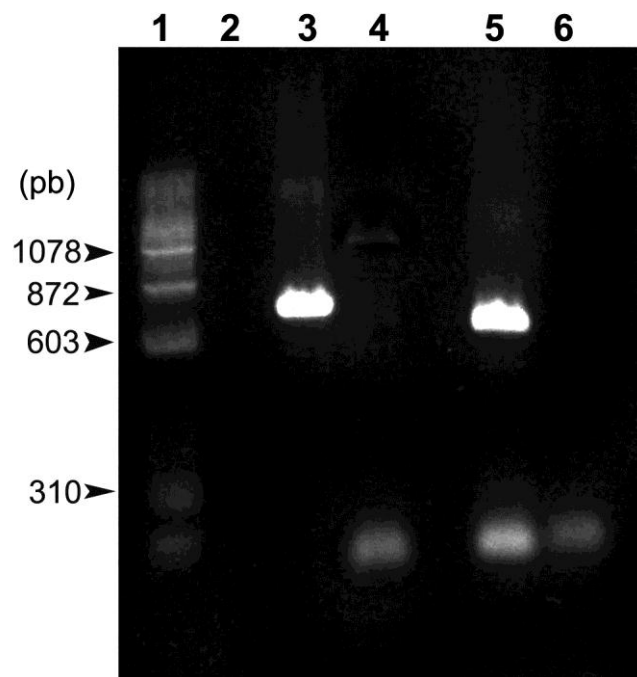


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produto de amplificação por PCR dos *primers* Atg1-4 e Atg1-8 em larvas pós defecantes de *Melipona quadrifasciata*, 1) Padrão com peso molecular em pb, 2) controle negativo sem *primers*, 3) produto de amplificação do primer Atg1-4 com 799 pb, 4) controle negativo sem cDNA + primer Atg1-4, 5) produto de amplificação do primer Atg1-8 com 699 pb, 6) controle negativo sem cDNA + primer Atg1-8.

<i>Melipona quadrifasciata</i>	8	tttatgaaacca ATGCAAATCTTGAGACCCAAAATTACCACCTGGAACCTCACCTGAATT	67
<i>Apis mellifera</i>	1062	TTTATGAAAAAATGCAAATCTTG-GACCTAAAATT-CCTCCTGGAACCTCACCTGAACT	1119
<i>Melipona quadrifasciata</i>	68	ATCAGATCTTTTAATGGGCTTGTTAAGACGTAATAGCTAGAGATCGTATAGCCTTTTCGAT	127
<i>Apis mellifera</i>	1120	ATCAGATCTCTTAATGGGTTTATTAAGACGTAAT-GCTAGAGATCGTATGCCCTTT-GAT	1177
<i>Melipona quadrifasciata</i>	128	GAATTCCTTCGGGCATACCTATTCCTTCAAGGTTCCAGGGAAAGCCCAAGTCCTGTTCCCT	187
<i>Apis mellifera</i>	1178	GAATT-TTTTGGACAT-CCT-TTCCTTCAAGGTTCTAGAGAAAATCCCAGTCAGTTCCT	1234
<i>Melipona quadrifasciata</i>	188	GCTGAACTTCCTGCTTCCAGGAACACTAGCGATTCAAGATGGGAGCTACAGCTGTTCAC	247
<i>Apis mellifera</i>	1235	GCTGAACTCCCTGCTTCCAGGAACATTAACAATTCAAGA-AGGAACTACA---GTTAT	1290
<i>Melipona quadrifasciata</i>	248	AAGATTAGAACCAGAAACTACTAGTCCGTGTTCCAGTCTGAAAGATGACTTTAGTACTTG	307
<i>Apis mellifera</i>	1291	AAGATCAGAACCAGAAACAACACTAGTCCGTGTTCTAGTCTGAAAGATGACTTT-GTGCTTG	1349
<i>Melipona quadrifasciata</i>	308	TGCCAAGTGATCTACAGCAGTGACACAGACAATAACTAATACGC-A-AA-TAAAGTAT	364
<i>Apis mellifera</i>	1350	TACCAAGTGATCT-CAGTAGTGACACAGACAATAATCTAATACACAACAAGTAAAGTAT	1408
<i>Melipona quadrifasciata</i>	365	GTCAAACAACTAGCAGAGAAGCAGTGAGTACCACCAGCACCATGCTTCCTTCCCATTTTC	424
<i>Apis mellifera</i>	1409	ATTAAACAAGCTAGTAGAGAGGCAGTGAGT-CCACCAGCACCATGTTTCTTCTTATTTTC	1467
<i>Melipona quadrifasciata</i>	425	GGAACCAATTCCTGTTCCGCTCTCAAAGAAGTATTGCACAACCATCATCTCCTTACTAA	484
<i>Apis mellifera</i>	1468	GGAGCCAATTCCTGTTCCATCACAAAGAAGTATTGCACAACCATCATCTCCTTACTAA	1527
<i>Melipona quadrifasciata</i>	485	TGTAAGATCAGGAAGTAGTGTGTTCTCGCTCTCAACCTATAAGTATGAAACGCAGATG	544
<i>Apis mellifera</i>	1528	TATAAGATCAGGAAGCAGTGTGTTCTCGCTCGCAACCAATAAGCATGAAACGCAG-TG	1586
<i>Melipona quadrifasciata</i>	545	TGGATACGCATAGGAGTCATGCTCCTGACATTGGCTCTCTTAGTCCACCTAGTGTTC AAT	604
<i>Apis mellifera</i>	1587	TGGATACTCATAGAAGTCATGCTCCTGATATTGGCTCTCTTAGTCCACCTAGTGTTC AAT	1646
<i>Melipona quadrifasciata</i>	605	TATGTTATATGGTACAACCACCCAGTANGAGATTAAGTGAAACACCTCCACCGACCA AAT	664
<i>Apis mellifera</i>	1647	T-TGTAAT-TGGTACA-CCACCCAGTAGAAGATTGAGTGAAACACCTCCACCG-CCA AAT	1702
<i>Melipona quadrifasciata</i>	665	ACATAGGCAAGTTAAGTCTGTTGCAAGGCATTACATACCTCCAGTGGGACGGTCTCCA	724
<i>Apis mellifera</i>	1703	ACAT-GGCAAGTTA-GTCTGTTGCAAGGCATTACACACTTCGAGTGGAACG-TCTCCA	1759
<i>Melipona quadrifasciata</i>	725	TTACGGCGTTCGACTGGAACATA-TA-TGCATCCTC	758
<i>Apis mellifera</i>	1760	TTACGGCGTTCAACTGGAA-ATAATAGTGCATCCTC	1794

Figura 9. Alinhamento realizado com o resultado do sequenciamento do produto do primer Atg1-4 revela 98% de identidade em relação gene *Atg 1* de *Apis mellifera*.

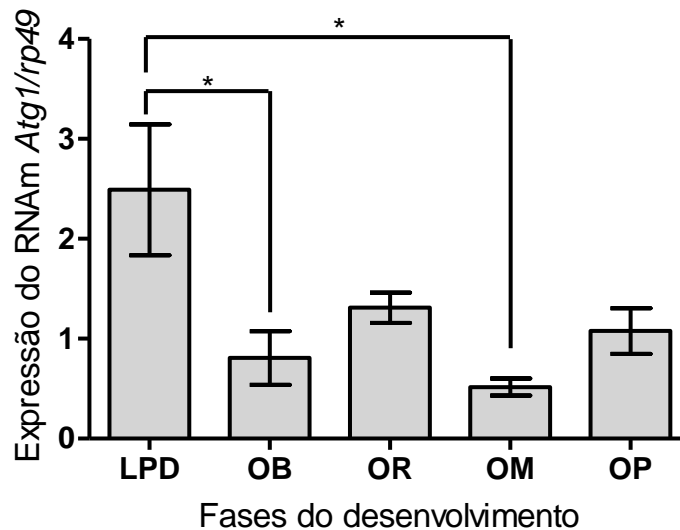


Figura 10. Expressão relativa do gene *Atg1* no corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata* durante as diferentes fases do desenvolvimento mostrando que a expressão para *Atg1* na larva pós-defecante (LPD) é significativamente maior que em pupas de olho branco (OB) e olho marrom (OM), as quais não diferem das pupas de olho rosa (OR) e olho preto (OP). * Diferente estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5. DISCUSSÃO

A presença de caspase-3 clivada em algumas células do corpo gorduroso de pupas de olho branco, olho rosa, olho marrom e olho preto de *M. quadrifasciata* indica morte celular por apoptose nessas poucas células. O anticorpo anti-caspase-3 clivada foi desenvolvido contra a sequência carboxiterminal da subunidade p18 da caspase-3 clivada de mamíferos (Srinivasan *et al.*, 1998). No entanto, esse mesmo anticorpo apresenta reação altamente específica, para a subunidade p21 da Drice ativada em *D. melanogaster*, não se ligando a Drice inativa (Yu *et al.*, 2002). Apesar da caspase dcp-1 ser funcionalmente redundante à caspase Drice em algumas células, a molécula Drice constitui a principal molécula efetora do processo apoptótico em *D. melanogaster*, homóloga a caspase-3 efetora dos mamíferos (Hay & Guo, 2006, Kumar, 2007, Xu *et*

al., 2006). Essa molécula atua como caspase final efetora da morte celular programada das células do corpo gorduroso de *D. melanogaster* (Liu *et al.*, 2009). Em *Bombyx mori* (Lepidoptera) esse mesmo anticorpo foi eficaz na identificação da caspase 3 clivada nas células do corpo gorduroso (Kaneko *et al.*, 2011). Conclui-se que o referente anticorpo também foi eficaz na identificação de morte celular por apoptose nas células do corpo gorduroso da abelha *M. quadrifasciata*.

A ausência de apoptose no estágio de larva pós-defecante de *M. quadrifasciata* revela a importância do corpo gorduroso para a futura pupação. O corpo gorduroso possui função principal durante a fase larval de armazenar reservas energéticas que serão utilizadas durante a metamorfose (Cruz-Landim, 2009). Durante a fase larval de *M. quadrifasciata* os trofócitos quintuplicam o diâmetro, alcançando o volume máximo durante o estágio de pós-defecação (Cruz-Landim, 1983). Segundo Cruz-Landim & Mello (1966) e Cruz-Landim (1983), em abelhas, durante a mudança do último estágio larval para pupa, as células se dissociam e muitos trofócitos se rompem, liberando seus constituintes armazenados. Entretanto, os resultados aqui obtidos para *M. quadrifasciata* contradizem essas observações, uma vez que não foram encontrados trofócitos rompidos nas fases pupais. A ocorrência de células rompidas e com seus constituintes liberados somente foram observados em testes preliminares de ajuste da osmolaridade do fixador utilizado para microscopia eletrônica (dados não mostrados), sendo portanto possível indicar que o rompimento de células do corpo gorduroso durante a pupação é um artefato de preparação da amostra.

A presença de poucas células positivas para caspase-3 clivada no corpo gorduroso de *M. quadrifasciata* aponta para a presença de apoptose como um processo não generalizado no desenvolvimento do órgão. Esta afirmação é reforçada pela ausência de fragmentação do DNA e ausência da detecção de caspase-3 clivada por

western blotting. Embora a análise por *western blotting* tenha evidenciado duas proteínas positivas para o anticorpo anti-caspase 3 clivada, as mesmas foram no controle negativo, semelhante à marcações inespecíficas informadas pelo fabricante do anticorpo. Similarmente, durante o desenvolvimento das larvas de quinto instar do lepidóptero *Manduca sexta* não há evidências substanciais de morte celular por apoptose nas células de corpo gorduroso, apesar da fragmentação do DNA encontrada (Muller *et al.*, 2004). Por outro lado, em *B. mori* a maioria das células do corpo gorduroso de larvas sofrem morte celular por apoptose de um a dois dias após a pupação (Kaneko *et al.*, 2011). Em *D. melanogaster* imediatamente após a pupação células do corpo gorduroso se desassociam individualmente do órgão de origem, persistindo através do desenvolvimento, podendo ser eventualmente removidas por apoptose em estágios de não alimentação do adulto (Aguila *et al.*, 2007, Nelliot *et al.*, 2006). Desse modo, a presença de morte celular por apoptose sugere ser constitutiva.

O aumento mitocondrial e de ribossomos livres no citoplasma bem como a permanência de núcleo com cromatina descondensada ao decorrer do desenvolvimento pupal de *M. quadrifasciata* sugere a presença de alta atividade metabólica das células do corpo gorduroso. Durante a preparação para muda nos insetos holometábolos há síntese de RNA com aumento do número de ribossomos, proliferação do retículo endoplasmático e mitocôndria (Oliveira & Cruz-Landim, 2003). Além disso, o transcriptoma de células do corpo gorduroso da *Melipona scutellaris* revelou expressivo aumento do material genético transcrito de componentes mitocondriais (de Sousa *et al.*, 2013). Portanto, o aumento na quantidade de mitocôndrias nos períodos finais da pupação sugerem uma preparação dos trofócitos para a alta atividade metabólica deste órgão nas abelhas adultas.

A presença de alta similaridade do gene *Atg1* entre *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* revela significativa conservação da maquinaria autofágica nessas duas espécies. Em *D. melanogaster* esse gene é responsável juntamente com o produto do gene *Atg13* pela indução de vesículas autofágicas, após a inibição do complexo mTOR pela insulina (Zirin & Perrimon, 2010).

As células do corpo gorduroso de LPD de *M. quadrifasciata* expressam maior quantidade de mRNA *Atg1* que as pupas, o que sugere maior ocorrência de processos autofágicos nessa fase do desenvolvimento. Em *D. melanogaster* células do corpo gorduroso gradualmente se tornam esféricas, destacando-se uma das outras, quando então o processo autofágico progressivamente aumenta até a pupação (Rusten *et al.*, 2004). Além disso, nessa mesma espécie as células do corpo gorduroso sofrem rápida indução autofágica quando as moscas-da-fruta são submetidas ao jejum (Scott *et al.*, 2004). O interessante é que o a maior quantidade de mRNA *Atg1* coincide com o momento em que a larva de *M. quadrifasciata* cessa o processo de alimentação. No entanto, é durante esta fase que grande parte das reservas energéticas é utilizada para a diferenciação dos demais tecidos e órgãos dos adultos (Cruz-Landim & Mello, 1966).

Apesar da expressão do gene *Atg1* em todas as fases do desenvolvimento não há como afirmar se ele está atuando na rota de morte celular ou na homeostase celular. O envolvimento da autofagia na morte celular programada é considerado controverso. Este processo tem sido estudado sob duas perspectivas: autofagia como mecanismo de proteção a morte celular e autofagia como mecanismo de morte celular (Koga & Cuervo, 2011). No entanto, há muitas evidências que suportam a função protetiva da autofagia contra a morte celular (Koga & Cuervo, 2011, Boya *et al.*, 2005). Em células do corpo gorduroso de *D. melanogaster* a autofagia é necessariamente uma resposta adaptativa a privação de nutrientes e outras formas de estresses celulares, sendo que a

ausência do processo autofágico aumenta a susceptibilidade à morte quando células enfrentam estresse (McPhee & Baehrecke, 2009, Rusten *et al.*, 2004). Koga & Cuervo (2011) e Kroemer & Levine (2008), ressaltam que a mera presença morfológica de autofagossomos é insuficiente para distinguir morte celular com autofagia de morte celular por autofagia. Deste modo, muitos autores sugerem o termo “morte celular com autofagia” para descrever as condições em que as células se encontram (Koga & Cuervo, 2011).

Os resultados deste trabalho mostram que não há expressiva destruição do corpo gorduroso durante o desenvolvimento pós-embrionário de *M. quadrifasciata* nem a presença de histólise celular como sugerido por Cruz-Landim (1983). Esse fato sugere um modelo de desenvolvimento no qual há baixa taxa de destruição das células do corpo gorduroso por apoptose com remodelação intracelular das células sobreviventes, dando origem as células do corpo gorduroso do indivíduo adulto (Figura 11). Supostamente, a apoptose encontrada nas células do corpo gorduroso seria constitutiva. Em jovens adultos de *M. quadrifasciata*, assim como em *D. melanogaster*, as células sobreviventes sofreriam morte celular durante o período de privação de alimento do inseto jovem (Silveira *et al.*, 2002). Por outro lado, o modelo de destruição celular com recolonização do mesmo órgão ocorre em *B. mori*, onde o corpo gorduroso sofre alta destruição celular e simultaneamente células progenitoras do corpo gorduroso do indivíduo adulto são progressivamente geradas durante o processo de metamorfose pupal (Liu *et al.*, 2009).

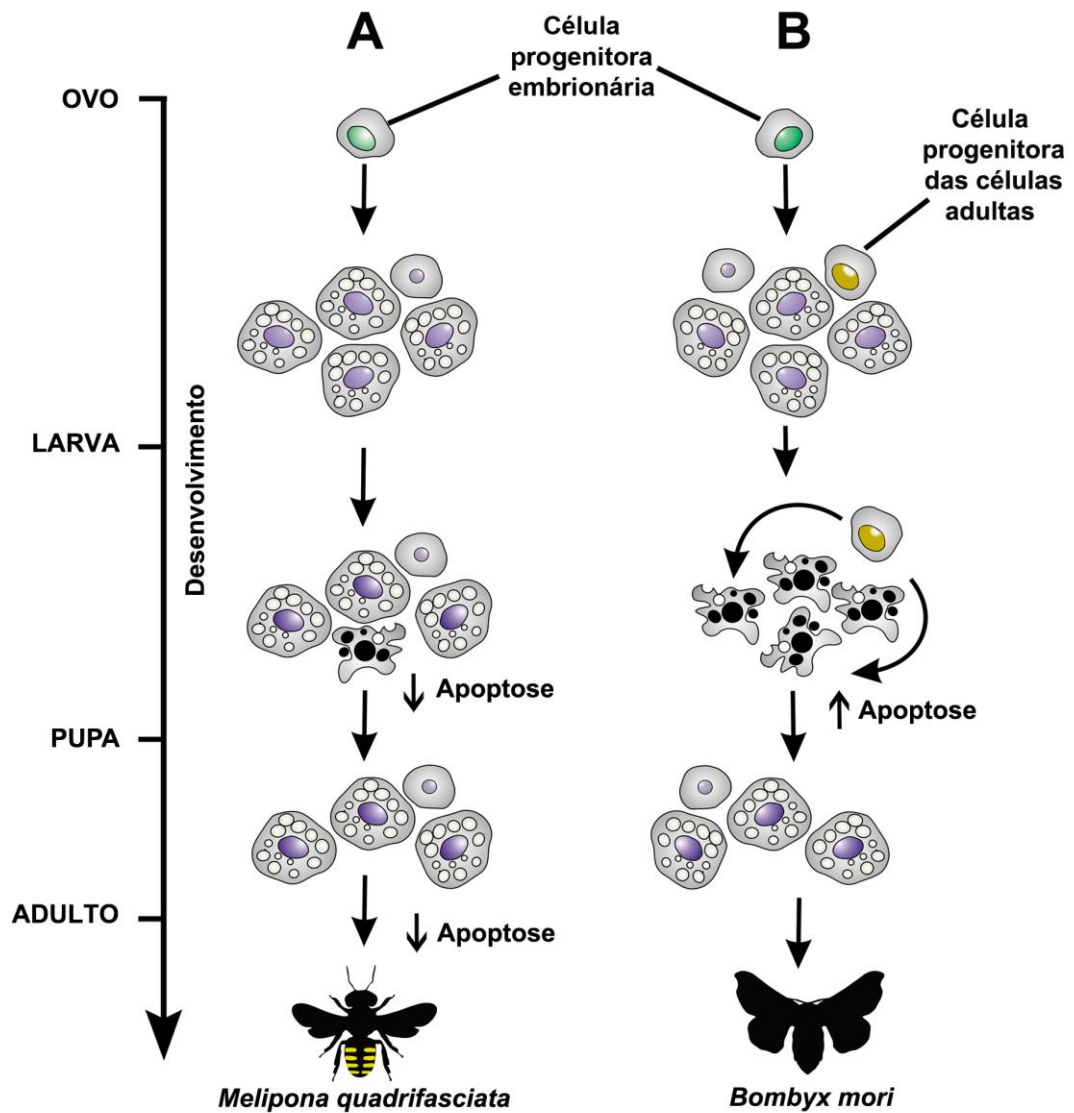


Figura 11. Comparação dos resultados para o desenvolvimento pós-embriônico do corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata* com o lepdóptera *Bombyx mori*. Em A encontra-se o modelo de *M. quadrifasciata* no qual há baixa incidência de morte celular programada por apoptose e ausência de histólise durante a metamorfose. As células sobreviventes sofreriam processo de renovação das organelas intracelulares por autofagia, o que culminaria na remodelação tecidual do corpo gorduroso. No modelo B ocorre alta incidência de morte celular programada por apoptose e as células progenitoras surgiriam e se multiplicariam, dando origem as células do corpo gorduroso encontradas no Lepdóptera adulto, como ocorre em *B. mori* (Kaneko *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2009).

Em conclusão, as células do corpo gorduroso de *Melipona quadrifasciata* sofrem pouca morte celular por apoptose durante o processo de metamorfose, porém com indícios de aumento de autofagia durante a fase larval que precede a metamorfose, embora não possa ser elucidado se o produto do gene *Atg1* atuará na morte ou remodelação celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILA, J. R.; SUSZKO, J.; GIBBS, A. G.; HOSHIZAKI, D. K. (2007). The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**, v.210, p.956-963.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2008). **Molecular biology of the cell**, New York:, Garland Science p.1268.
- BECKER, A.; SCHLODER, P.; STEELE, J. E.; WEGENER, G. (1996). The regulation of trehalose metabolism in insects. **Experientia**, v.52, p.433-439.
- BOYA, P.; GONZALEZ-POLO, R. A.; CASARES, N.; PERFETTINI, J. L.; DESSEN, P.; LAROCLETTE, N.; METIVIER, D.; MELEY, D.; SOUQUERE, S.; YOSHIMORI, T.; PIERRON, G.; CODOGNO, P.; KROEMER, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, p.1025-1040.
- BRADFORD, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254.
- CHANG, Y. Y.; NEUFELD, T. P. (2010). Autophagy takes flight in *Drosophila*. **Febs Letters**, v.584, p.1342-1349.
- CHAPMAN, R. F. (2013). **The Insect: Structure and Function**, Cambridge, University Press p.403.
- CRUZ-LANDIM, C. (1983). O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae). **Naturalia**, v.8, p.7-23.
- CRUZ-LANDIM, C. (2009). **Abelhas: morfologia e função de sistemas**, São Paulo, Editora Unesp p.407.
- CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, M. L. S. (1966). Transformacoes pós-embrionarias em *Melipona Quadrifasciata Anthidioides* Lep (Hym Apoidea) .I. Modificacoes nos

corpo Gorduroso e enócito durante as fase larval e pupação. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v.38, p.475-.

DE SOUSA, C. S.; SERRAO, J. E.; BONETTI, A. M.; AMARAL, I. M. R.; KERR, W. E.; MARANHÃO, A. Q.; UEIRA-VIEIRA, C. (2013). Insights into the *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) fat body transcriptome. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, p.292-297.

FUCHS, Y.; STELLER, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v.147, p.742-758.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.107-120.

HAY, B. A.; GUO, M. (2006). Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, p.623-650.

HE, C. C.; KLIONSKY, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v.43, p.67-93.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88, p.347-354.

KANEKO, Y.; YASANGA, T.; SUZUKI, M.; SAKURAI, S. (2011). Larval fat body cells die during the early pupal stage in the frame of metamorphosis

- remodelation in *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v.57, p.1715-1722.
- KEELEY, L. L. (1985). Physiology and biochemistry of the fat body. *In*: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I. (eds.) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press p.211–248.
- KERR, W. E. (1997). Native bees: a neglected issue in the conservation of genetic resources. **Ethics and Equity in Plant Genetic Resources**, p.60-61.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; DA SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia**, v.12, p.20-41.
- KHAN, A. R.; JAMES, M. N. G. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Science**, v.7, p.815-836.
- KOGA, H.; CUERVO, A. M. (2011). Autophagy - The liason between the lysosomal system and cell death. *In*: REED, C. J. & GREEN, D. R. (eds.) **Apoptosis: Physiology and Pathology**. New Yotk: Cambrigde University Press.
- KROEMER, G.; LEVINE, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.1004-1010.
- KUMAR, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v.14, p.32-43.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–685.
- LIU, Y.; LIU, H. H.; LIU, S. M.; WANG, S.; JIANG, R. J.; LI, S. (2009). Hormonal and Nutritional Regulation of Insect Fat Body Development and Function. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.71, p.16-30.

- MCPHEE, C. K.; BAEHRECKE, E. H. (2009). Autophagy in *Drosophila melanogaster*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v.1793, p.1452-1460.
- MEIER, P.; SILKE, J.; LEEVERS, S. J.; EVAN, G. I. (2000). The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. **Embo Journal**, v.19, p.598-611.
- MIZUSHIMA, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.22, p.132-139.
- MULLER, F.; ADORI, C.; SASS, M. (2004). Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). **European Journal of Cell Biology**, v.83, p.67-78.
- NELLIOT, A.; BOND, N.; HOSHIZAKI, D. K. (2006). Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. **Genesis**, v.44, p.396-400.
- OERTEL, E. (1930). Metamorphosis in the honeybee. **Journal of Morphology and Physiology**, v.50, p.295-339.
- OLIVEIRA, V. T. P.; CRUZ-LANDIM, C. (2003). Morphology and function of insect fat body cells: A Review. **Biociências**, v.11, p.195-205.
- PAES-DE-OLIVEIRA, V. T.; BERGER, B.; POIANI, S. B.; SIMOES, Z. L. P.; DA CRUZ-LANDIM, C. (2013). Effects of Treatment of the Fat Body Trophocytes of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Nurse Workers and Virgin Queens in Culture by Juvenile Hormone III and Ecdysterone (20-HE). **Microscopy Research and Technique**, v.76, p.20-27.
- PAN, M. L.; BELL, W. J.; TELFER, W. H. (1969). Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. **Science**, v.165, p.393-&.
- POIANI, S. B.; DA CRUZ-LANDIM, C. (2012). Stored products and presence of acid phosphatase in fat body cells at pre-pupal worker stage of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v.43, p.475-478.

- ROSSINI, A. S. (1989). **Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos corpora allata de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. Master science Dissertation, UNESP.
- RUSTEN, T. E.; LINDMO, K.; JUHASZ, G.; SASS, M.; SEGLEN, P. O.; BRECH, A.; STENMARK, H. (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. **Developmental Cell**, v.7, p.179-192.
- SCOTT, R. C.; SCHULDINER, O.; NEUFELD, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. **Developmental Cell**, v.7, p.167-178.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. (2002). **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**, Minas Gerais, Brasil, Editora Composição e Arte p.253.
- SRINIVASAN, A.; ROTH, K. A.; SAYERS, R. O.; SHINDLER, K. S.; WONG, A. N.; FRITZ, L. C.; TOMASELLI, K. J. (1998). In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. **Cell Death and Differentiation**, v.5, p.1004-1016.
- VAN DER HORST, D. J. (2003). Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.136, p.217-226.
- XU, D.; WANG, Y.; WILLECKE, R.; CHEN, Z.; DING, D.; BERGMANN, A. (2006). The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p.1697-1706.

YU, S. Y.; YOO, S. J.; YANG, L. H.; ZAPATA, C.; SRINIVASAN, A.; HAY, B. A.;
BAKER, N. E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator
caspases in the developing *Drosophila* eye. **Development**, v.129, p.3269-3278.

ZIRIN, J.; PERRIMON, N. (2010). *Drosophila* as a model system to study autophagy.
Seminars in Immunopathology, v.32, p.363-372.

APÊNDICE A1

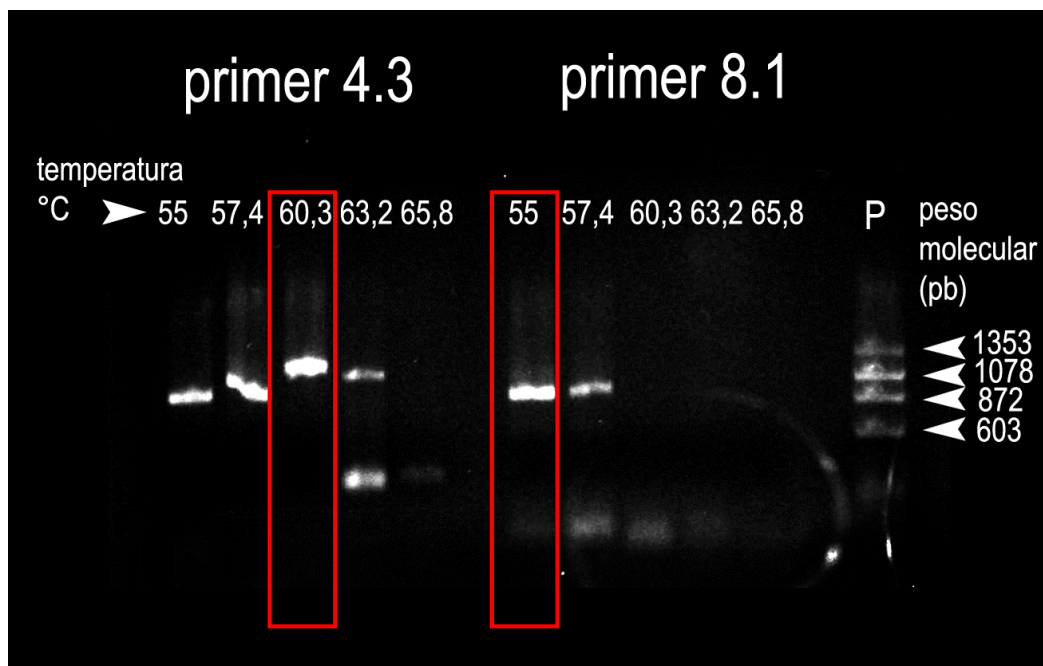


Figura A1. Perfil eletroforético da temperatura de anelamento dos *primers* 4 e 8 para o gene *Atg-1*. As temperaturas de anelamento escolhidas para cada primer então demarcadas pelo retângulo (60,3°C para o primer 4 e 55°C para o primer 8).

APÊNDICE A2

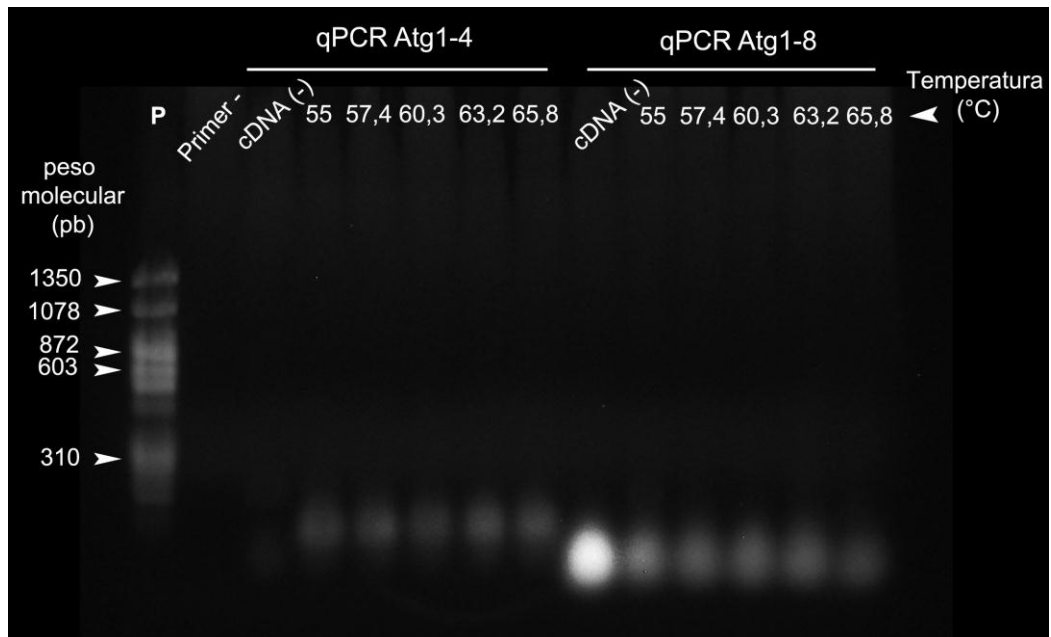


Figura A2. Perfil eletroforético dos testes para temperatura de anelamento dos *primers* qPCR Atg1-4 e qPCR Atg1-8 para o gene *Atg-1*.

APÊNDICE A3

Tabela A1. Teste estatístico ANOVA realizado com os produtos de amplificação gênica para o gene *Atg1*.

ANOVA	SS	df	MS		
Tratamento	6,915	4	1,729		
Resíduo	3,487	10	0,3487		
Total	10,40	14			

Teste Tukey	Diferença entre médias	q	Significacia P < 0.05	Intervalo de confiança (95%)
LPD vs OB	1,683	4,938	Yes	0.09674 a 3.270
LPD vs OR	1,180	3,461	No	-0.4066 a 2.767
LPD vs OM	1,973	5,788	Yes	0.3867 a 3.560
LPD vs OP	1,413	4,146	No	-0.1733 a 3.000
OB vs OR	-0,5033	1,476	No	-2.090 a 1.083
OB vs OM	0,2900	0,8507	No	-1.297 a 1.877
OB vs OP	-0,2700	0,7920	No	-1.857 a 1.317
OR vs OM	0,7933	2,327	No	-0.7933 a 2.380
OR vs OP	0,2333	0,6844	No	-1.353 a 1.820
OM vs OP	-0,5600	1,643	No	-2.147 a 1.027