

LILIAN COTA CRUZ

**PROLIFERAÇÃO, MORTE CELULAR E AÇÃO ENZIMÁTICA NO INTESTINO MÉDIO
DE ABELHAS (HYMENOPTERA, APIDAE) DURANTE A METAMORFOSE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

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

T

C957p
2012

Cruz, Lilian Cota, 1980-

Proliferação, morte celular e ação enzimática no intestino médio de abelhas (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose / Lilian Cota Cruz. – Viçosa, MG, 2012. vii, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Clóvis Andrade Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelha. 2. Morte celular. 3. Enzimas proteolíticas.
4. Intestinos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

LILIAN COTA CRUZ

**PROLIFERAÇÃO, MORTE CELULAR E AÇÃO ENZIMÁTICA NO INTESTINO
MÉDIO DE ABELHAS (HYMENOPTERA, APIDAE) DURANTE A METAMORFOSE**

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

APROVADA: 15 de agosto de 2012.

Prof. José Lino Neto

Prof. Leandro Licusi de Oliveira

Prof^a. Conceição Aparecida dos Santos

Dra. Maria do Carmo Queiroz Fialho

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Orientador)

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.
Muitas vezes basta ser: colo que acolhe,
braço que envolve , palavra que conforta,
silêncio que respeita, alegria que contagia,
lágrima que corre, olhar que acaricia,
desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais,
mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.
Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa por me acolher desde a graduação e proporcionar a minha formação. Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV pela oportunidade e condições de realização deste trabalho. À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa PDSE (Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior).

Ao meu orientador e amigo, Prof. Clóvis, pelo exemplo de educador. Sou inteiramente grata pelo apoio, otimismo, confiança e incentivo ao longo desses anos.

Ao coorientador, Prof. Serrão, por todo conhecimento, ajuda e generosidade. Obrigada por ter me proporcionado novas oportunidades que contribuíram muito para a minha formação.

Ao coorientador e grande amigo, prof. Vinícius, pela amizade e incentivo em todos os momentos. Por me mostrar que o mais importante na vida não são as coisas que você faz, e sim as pessoas que estão ao seu lado quando as realiza.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial aos professores Lino, Sérgio, Izabel, Adilson, Silvia, Gustavo e Sérgio de Paula.

Ao pessoal técnico e administrativo do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, em especial à Beth, pelo carinho e atenção. Aos funcionários do Apiário da UFV que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise pela estrutura, em especial a Carla, Patrícia e Gilmar pela atenção e cuidado.

Ao Centro de Investigaciones Biológicas-CIB/CSIC – Madri, Espanha, por me acolher e proporcionar o desenvolvimento de parte deste trabalho. Ao Dr. Félix Ortego, meu orientador durante o doutorado sanduíche. Agradeço ao privilégio de trabalhar em seu laboratório, pelo exemplo de profissionalismo, por toda dedicação e incentivo.

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho. Aos meus queridos pais pelo incentivo em todos os momentos da minha vida. Vocês são meus grandes exemplos de amor, generosidade, trabalho e determinação. Aos meus amados irmãos, Joanes e Hamilton, pelo carinho e amizade. A minha vó, tios e primos pelas alegrias e união. Ao Marcelo, por fazer parte da minha vida como meu grande amor, amigo, companheiro e família. Por cuidar tão bem de mim e pela compreensão nos momentos em que minha ausência foi necessária para a conclusão deste.

Aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural da UFV: Arlete, Claudinha, Fernandinho, Rômulo, Débora, Douglas pelo apoio, em especial a Dihego e Kenner, pela amizade, principalmente por fazerem do trabalho uma diversão. Agradeço ao Cilada`s Group: Sirlene, Katiane, Riviane, Silvia, Simone, Mariana, Luana, Sabrina, Luísa, Alípio e Dani pelas boas risadas e pelo apoio, em especial a Madu e Jane pelo companheirismo, incentivo e grande amizade. Ao grande amigo Alex, pela ajuda sempre!!!

Agradeço ainda aos meus amigos de Viçosa em especial a Elaine e também minhas irmãzinhas da república JD. Obrigada Cyn, Nanda, Van, e Débora pela paciência, carinho e amizade. A D. Maria por cuidar do JD todos esses anos.

Aos amigos do CSIC/CIB: Gabri, Miguel, Ángel, Nathalie, Amélia, Marisa, Rabeh, Carolina, Núria, Matías, Pathy, Bea e Óscar por toda ajuda e por me acolherem com tanto carinho durante minha estadia em Madri.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!!!

BIOGRAFIA

Lilian Cota Cruz, filha de José Silvestre da Cruz e de Maria da Conceição Cota Cruz, nasceu no dia 20 de novembro de 1980, na cidade de João Monlevade, Minas Gerais, Brasil.

Graduou-se como licenciada e bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Viçosa em maio de 2006. Durante a graduação iniciou as pesquisas na área de biologia celular e estrutural, tendo como foco a morfologia interna de insetos. Em 2006 iniciou o mestrado em Biologia Celular e Estrutural na UNICAMP, concluído em 2008.

Durante os anos de 2007 e 2008 atuou como professora substituta de Cito-histologia na Universidade Federal de Ouro Preto.

Em agosto de 2008 iniciou o doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2012. Parte da pesquisa foi desenvolvida durante doutorado sanduíche (PDSE- Capes) no Centro de Investigaciones Biológicas -CIB-CSIC (Madri-Espanha).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução Geral	01
1.1. Trato Gastrointestinal de Insetos.....	01
1.2. Abelhas sociais.....	04
1.3. Digestão em insetos.....	05
1.4. Metamorfose.....	07
1.3. Renovação do epitélio do intestino médio no período pré-embrionário.....	07
2. Objetivos	10
3. Referências Bibliográficas	11
4. Artigos	15
4.1. Proliferação e morte celular no intestino médio de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	16
4.2. Análise de proteases no intestino médio de larvas e adultos de operárias de <i>Apis mellifera</i>	38
5. Conclusões Gerais	61

RESUMO

CRUZ, Lilian Cota, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Proliferação, morte celular e ação enzimática no intestino médio de abelhas (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose.** Orientador: Clóvis Andrade Neves. Coorientadores: José Eduardo Serrão, Vinícius Albano Araújo, Gustavo Ferreira Martins e Sérgio Oliveira de Paula.

As abelhas são insetos holometábolos, pois apresentam metamorfose completa. Na metamorfose destes insetos, o trato gastrointestinal sofre modificações morfológicas e fisiológicas. Poucos estudos enfatizam os aspectos que envolvem a reconstituição do epitélio do intestino médio de abelhas durante a metamorfose. Os trabalhos que destacam a proliferação das células digestivas durante a metamorfose carecem de documentação das figuras de mitose. Pouco se sabe também sobre a mudança no perfil enzimático que ocorre em abelhas durante esse período. O genoma de *A. mellifera* foi recentemente sequenciado e diversos genes de serina-proteases identificados. No entanto, apenas uma enzima tipo tripsina foi purificada e caracterizada bioquimicamente em adulto de operária. O presente trabalho contribui para o conhecimento da biologia dos Hymenoptera, gerando dados que possam esclarecer aspectos da fisiologia digestiva durante a metamorfose dos insetos sociais. Comprovamos que o aumento do número de células e o restabelecimento dos ninhos de células regenerativas no final da metamorfose é uma consequência das divisões celulares na pupa de olho preto. A proliferação que ocorre neste estágio desempenha um importante papel na renovação das células digestivas das abelhas adultas. Observamos ainda que, durante a metamorfose, a morte das células epiteliais do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre por apoptose e é concomitante com autofagia. Além disso, observamos diferentes enzimas tipo tripsina no intestino médio de larvas e adultos de *A. mellifera*.

ABSTRACT

CRUZ, Lilian Cota, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, august, 2012. **Proliferation, cell death and enzyme activity in the midgut of bees (Hymenoptera, Apidae) during metamorphosis.** Adviser: Clóvis Andrade Neves. Co- Advisers: José Eduardo Serrão, Vinícius Albano Araújo, Gustavo Ferreira Martins and Sérgio Oliveira de Paula.

Bees are holometabolus insects, since they present complete metamorphosis. During the metamorphosis of the insects the gut is completely remodeled. Few studies emphasize aspects of the renewal of the epithelium of bee's midgut during metamorphosis. Studies that describe digestive cell proliferation are lacking in images of mitosis. Little is known also about the changing enzyme that occurs in bees during this period. The genome of *A. mellifera* has recently been sequenced and several serine proteases genes identified. However, only a trypsin-like enzyme was purified and biochemically characterized in adult workers. This research is a contribution to the understanding of Hymenoptera biology in relation to some aspects of digestive physiology during metamorphosis of social insects. We proved that increasing the number of cells and the restoration of regenerative cell nests at the end of metamorphosis is a consequence of cell divisions in the black eyed pupae. The proliferation that occurs at this stage plays an important role in the renewal of the digestive cells of adult bees. We also observed that, during metamorphosis, death of the midgut epithelial cells of *M. quadrifasciata anthidioides* occurs by apoptosis and is accompanied by autophagy. Furthermore, this study observed different trypsin-like enzymes in the midgut from larvae and adults of *A. mellifera*.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos apresentam capacidade adaptativa e reprodutora que lhes confere grande sucesso evolutivo. Dessa forma, ocupam os mais diversos ambientes. Parte desse sucesso adaptativo se deve à variedade estrutural e fisiológica do seu trato gastrointestinal, o que lhes permite utilizar ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Dow, 1986).

As abelhas têm importância econômica devido ao seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas e na produção de mel, cera e própolis, o que se observa principalmente em *Apis mellifera* e em outras abelhas eussociais. As abelhas sem ferrão – tribo Meliponini – se destacam pela especificidade como agentes polinizadores de diversas espécies vegetais nativas (Kerr et al., 1996). A espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier,) é bastante comum, possuindo ampla distribuição no território brasileiro, concentrando-se principalmente nos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica das regiões Sul, Sudeste e parte do Nordeste (Lima-Verde e Freitas, 2002).

1.1 Trato gastrointestinal de insetos

O trato gastrointestinal dos insetos é dividido em três regiões anatômicas com base em suas origens embriológicas: intestinos anterior (estomodeu) e posterior (proctodeu) de origem ectodérmica e intestino médio (ventrículo) de origem endodérmica (Cruz-Landim, 1985; Chapman, 1998; Neves et al., 2003).

Em insetos, a organização do trato digestivo geralmente mostra-se constante. Entretanto, variações morfológicas ocorrem em diferentes grupos de insetos e essas variações também estão relacionadas aos hábitos alimentares (Caetano, 1984).

No intestino anterior ocorre o armazenamento e, algumas vezes, a fragmentação do alimento, já no intestino médio ocorre a digestão química e a absorção do alimento. Este local é o sítio primário de produção das enzimas digestivas

nos insetos. O intestino posterior conduz o alimento não digerido para o exterior e participa do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo (Chapman, 1998).

O intestino anterior e o posterior, por serem de origem ectodérmica, são revestidos internamente por uma cutícula denominada íntima. Esta cutícula é produzida pelas células epiteliais destas regiões e é substituída a cada muda. O intestino anterior é subdividido em faringe, esôfago, papo e proventrículo. No intestino médio não existe a camada íntima. No entanto, na maioria dos insetos, está presente uma delicada película, denominada membrana peritrófica, uma camada acelular rica em quitina e proteínas aposta à borda estriada do epitélio (Chapman, 1998; Marques-Silva et al., 2005). A válvula pilórica separa o intestino médio do intestino posterior, o qual é subdividido em piloro, íleo e reto, terminando no ânus (Chapman, 1998). A parede do intestino anterior é formada por um epitélio de células baixas com poucas organelas e possuem contatos reforçados por desmossomos septados, repousando sobre uma tênue membrana basal. Este epitélio é envolto por músculos estriados geralmente dispostos em uma camada circular interna e uma longitudinal externa (Cruz-Landim, 2009). As subdivisões do intestino anterior apresentam funções especializadas. A faringe é geralmente dilatada e está relacionada à ingestão de alimentos, em insetos sugadores sua musculatura é bem desenvolvida. O esôfago é curto e apresenta na sua porção posterior uma dilatação chamada papo cuja função é armazenar o alimento ingerido. No proventrículo ocorre a passagem de alimentos do papo para o intestino médio (Serrão, 2001; Cruz-Landim, 2009). A complexidade estrutural do proventrículo está relacionada diretamente com os hábitos alimentares. Insetos que se alimentam de líquido apresentam um simples esfíncter na entrada do intestino médio, já em abelhas, ele é bem desenvolvido e sua região anterior (bulbo) tem função importante na produção de mel (Chapman, 1998).

O intestino posterior apresenta epitélio formado por células mais altas (exceto no reto) e cutícula mais fina e permeável que a do intestino anterior; o que permite a

absorção de certos nutrientes e água. No piloro geralmente originam-se os túbulos de Malpighi, sendo que na maioria dos insetos o íleo (intestino fino) apresenta-se como um tubo indiferenciado formado por células cúbicas, revestido internamente pela íntima e externamente por uma camada circular de fibras musculares (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 2009). O reto é geralmente dilatado com uma parede fina e papilas retais envolvidas na reabsorção de água, íons e, algumas vezes, aminoácidos (Chapman, 1998).

O intestino médio nas abelhas possui um formato tubular, seu limite anterior é a válvula cardíaca e posterior, o piloro. É envolto por fibras musculares finas dispostas em duas camadas: uma interna circular, que origina as pregas do intestino médio, e outra, externa longitudinal (Neves, 2002; Cruz et al., 2007). O epitélio é formado por três tipos celulares: as células digestivas ou principais, as células regenerativas e as células endócrinas (Neves et al., 2003; Cruz-Landim, 2009). As células digestivas são cilíndricas e apresentam microvilosidades em sua porção apical. Na região basolateral observa-se inúmeras pregas e invaginações. Possuem retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, além de muitas mitocôndrias nas invaginações basais. Na região média observa-se um núcleo oval com dois ou três nucléolos e, no citoplasma, poucas mitocôndrias. Neste local são formados grânulos de secreção que se concentram na porção apical (Cruz-Landim et al., 1996; Neves et al., 2003). As células digestivas são responsáveis pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos (Terra, 1990; Ferreira e Cruz-Landim, 2005).

Entre as células digestivas da maioria dos insetos encontram-se pequenas células regenerativas que podem se apresentar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares, fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Billingsley et al., 1996; Martins et al., 2005). Esses conjuntos de células indiferenciadas se apoiam na lâmina basal e não alcançam a luz

intestinal. O núcleo, relativamente volumoso apresenta cromatina dispersa e nucléolo evidente. O citoplasma é pobre em organelas, com exceção de mitocôndrias que embora numerosas, são pequenas e apresentam poucas cristas, características típicas de células indiferenciadas. Apresentam também ribossomos livres e polirribossomos, além de extensos perfis de retículo endoplasmático rugoso e glicogênio (Neves et al., 2003; Cruz-Landim, 1999).

1.2 Abelhas sociais

Larvas de insetos holometábolos diferem dos adultos na fisiologia e anatomia do corpo. As abelhas sociais adultas apresentam castas bem definidas: as rainhas, responsáveis pela deposição de ovos, as operárias, que realizam a maior parte das tarefas da colônia, e os zangões, responsáveis por fertilizar as rainhas (Giannini et al., 1988; Michener, 2000; Ferreira e Cruz-Landim, 2005). As operárias possuem polietismo, e as diferentes tarefas que realizam são executadas em uma sequência específica, de acordo com a idade ou seu estágio fisiológico. Operárias jovens geralmente alimentam a cria e são chamadas nutridoras, enquanto as mais velhas, que deixam o ninho para coleta de alimentos, são as forrageiras (Hebling et al., 1964; Ferreira e Cruz-Landim, 2005).

Cada uma das funções exercidas pelos membros da colônia requerem gastos energéticos diferentes. Tal circunstancia gera diferentes necessidades nutricionais entre classes de indivíduos e também no mesmo indivíduo ao longo da sua idade (Ferreira e Cruz-Landim, 2005). Larvas e rainhas necessitam de uma dieta altamente proteica e se alimentam de geleia real, produzida pelas operárias nutridoras. Portanto, as nutridoras consomem grande quantidade de pólen para a produção da geléia real. Entretanto, operárias forrageiras alimentam-se preferencialmente de néctar ou mel, pois realizam atividades externas da colônia e requerem uma dieta muito energética (Serrão e Cruz-Landim, 1995; Neves et al., 2003; Ferreira e Cruz-Landim, 2005).

O intestino médio de *Apis mellifera* é remodelado durante a metamorfose e, conseqüentemente, podem ocorrer mudanças no perfil enzimático (Cruz-Landim e Cavalcante, 2003).

1.3 Digestão em Insetos

A digestão é o processo pelo qual moléculas de alimento são quebradas em moléculas menores e que são absorvidas pelas células digestivas. Este processo é controlado pelas enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 2012).

Peptidases são enzimas que clivam ligações peptídicas e incluem as endopeptidases e exopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica. Endopeptidases atuam, preferencialmente, nas regiões internas da cadeia polipeptídica. As exopeptidases incluem enzimas que removem aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) de uma cadeia peptídica (Terra e Ferreira, 2012).

A digestão nos insetos é dividida em três fases: digestão inicial, intermediária e final. As fases e as enzimas associadas a cada uma delas são separadas espacialmente e temporalmente, devido à presença da membrana peritrófica e do fluxo de fluidos no interior do intestino (Terra e Ferreira, 2012).

Na digestão inicial ocorre hidrólise de moléculas poliméricas dos alimentos (proteínas, carboidratos e lipídeos) em moléculas oligoméricas pela ação de hidrolases como as amilases e endopeptidases. Durante a digestão intermediária, os oligômeros resultantes da digestão inicial são ainda clivados por carboidrases e exopeptidases. Os produtos resultantes são dímeros, tais como a maltose e dipeptídeos derivados que, na digestão final são clivados em monômeros pela dímero-hidrolases, exemplificados pela maltase e dipeptidases (Terra e Ferreira, 2005). A digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico; enquanto as digestões intermediária e final ocorrem

no espaço ectoperitrófico e células do intestino médio, respectivamente (Lehane, 1997).

As proteases são agrupadas de acordo com o aminoácido catalítico principal nas subclasses: serina, cisteína aspartil e metaloproteinases, que podem diferir na especificidade da proteína alvo (substrato). Dentre essas, as endopeptidases são as que ocorrem no intestino médio de quase todas as ordens de insetos (Terra e Ferreira, 2012). Serino-proteinases apresentam um resíduo de serina e de histidina no seu sítio ativo (Terra e Ferreira 2012).

O perfil proteolítico intestinal de grande parte dos insetos esta baseado nas endopeptidases do tipo tripsina, quimotripsina e elastases (Terra e Ferreira, 2012) e também na exopeptidase leucina-aminopeptidases (Ortego et al., 1996) .

Leucina aminopeptidases (LAP) catalisam a hidrólise de resíduos de leucina na extremidade N-terminal de peptídeos e proteínas. Quimotripsinas clivam, preferencialmente, cadeias de proteínas no lado carboxila de aminoácidos aromáticos. Elastases possuem atividade bem similar às quimotripsinas, clivam ligações peptídicas na extremidade carboxila de aminoácidos aromáticos não carregados.

As tripsinas são consideradas as proteases digestivas mais importantes da maioria dos insetos (Terra e Ferreira, 1994). Essa enzima cliva, preferencialmente, cadeias de proteínas no lado carboxila dos aminoácidos básicos como arginina e lisina. Estudos moleculares realizados em algumas espécies de insetos têm mostrado a existência de uma família diversa de tripsinas (Días-Mendoza et al., 2005). Muitas delas já foram purificadas (Terra e Ferreira, 1994) e apresentam massa molecular entre 20 e 35 kDa e atividade ótima em pH alcalino entre 8 e 9. As sequências completas de tripsinas são caracterizadas por um peptídeo sinal de ativação, seguido pela sequência correspondente à forma ativa da tripsina, que inclui um N-terminal conservado, formado por resíduos de IVGG (Barrett et al., 1998).

Purificação e caracterização de tripsinas podem fornecer informações valiosas sobre o seu papel na digestão proteolítica de abelhas.

1.4 Metamorfose

O ciclo vital das abelhas, assim como outros insetos holometábolos, processa-se em quatro fases: embrião, larva, pupa e adulto. As mudanças ocorridas no tubo digestivo durante a metamorfose estão, em parte, ligadas a alterações na alimentação, a qual, em geral, difere entre larva e adulto (Gama e Cruz-Landim, 1984). Essa transição ocorre durante um estágio do ciclo de vida denominado pupal (Cruz-Landim, 2009). O avanço no desenvolvimento das pupas é acompanhado por transformações morfológicas e fisiológicas. Durante este período, a abelha passa por estágios que podem ser identificados através da cor dos olhos. Iniciam-se com a pupa de olhos brancos e prossegue como pupa de olhos rosa, pupa de olhos marrom e finalmente pupa de olhos pretos. A partir daí, inicia-se o escurecimento da cutícula e, quando esta se completa, o adulto ou imago emerge.

1.5 Renovação do epitélio do intestino médio no período pós-embrionário

Durante a metamorfose, o epitélio digestivo dos insetos sofre rápidas mudanças, com contínua produção e destruição de células (Uwo et al., 2002; Corley e Lavine, 2006; Tettamanti, 2007; Hakim et al., 2010; Nardi et al., 2010). Há então, um delicado balanço entre a taxa de geração e diferenciação de novas células e perdas de outras (Illa-Bochaca e Montuenga, 2006).

De acordo com Potten (1998) a produção de novas células depende de células regenerativas com capacidade de se dividir várias vezes dando origem a um ou mais tipos de células diferenciadas. Estas células foram denominadas células-tronco por Baldwin e Hakim (1991) em *Manduca sexta*. De acordo com Hakim et al. (2010) células-tronco são células que podem se auto-renovar através de divisões celulares e

diferenciar em um tipo de célula madura; suposto precursor celular do intestino médio adulto, na larva de *D. melanogaster*. Segundo Corley e Lavine (2006), insetos possuem células-tronco tanto na fase embrionária quanto na adulta.

Durante a metamorfose das abelhas, divisões nas células regenerativas raramente foram encontradas (Neves, 2002).

Em Hymenoptera, as mudanças no intestino médio começam na pré-pupa com a degeneração do epitélio larval, restando somente a membrana basal e as células regenerativas. Ao mesmo tempo, algumas células regenerativas proliferam, espalham-se pela membrana basal e constroem o novo epitélio. (Cruz-Landim et al., 1970; Gama e Cruz-Landim, 1984; Neves et al., 2002; Martins et al., 2005).

Cruz-Landim e Silva de Moraes (2000) afirmaram que não ocorrem mitoses em células regenerativas de Hymenoptera adulto. Desta forma, espera-se o número de células regenerativas no momento da emergência seja definido durante a pupação (Cruz-Landim e Silva de Moraes, 2000). Entretanto, mesmo durante a metamorfose o número de células observadas em mitose não parece ser suficiente para explicar o grande incremento que ocorre no número de ninhos durante a fase final da metamorfose (Neves et al., 2002; Martins et al., 2005; Cruz et al., 2011).

Quando se olha para um organismo maduro sabe-se que é produto de uma série de divisões celulares e eventos de diferenciação. O que é igualmente importante é que ele é também o produto de uma série altamente regulamentada de morte celular. Isso é claramente demonstrado na metamorfose de insetos holometábolos, no qual o tecido larval sofre uma morte cuidadosamente orquestrada para dar lugar ao tecido adulto (Buszczak e Segraves, 2000).

Vários estudos foram realizados em tecidos de insetos, focalizando o processo de morte celular programada, a qual tem gerado muitas controvérsias quanto a sua classificação, já que as características típicas de apoptose, estabelecidas em

vertebrados, não estão incondicionalmente presentes nas células de insetos (Ferreira, 2010).

Vários trabalhos têm focado a remodelação do intestino médio de insetos (Cruz-Landim e Silva-de-Moraes, 2000; Neves, 2002; Neves et al., 2003; Zudaire et al., 2004; Rost, 2006; Martins et al., 2005). Entretanto, ainda permanecem incertos os aspectos que envolvem a reconstituição do epitélio do intestino médio de abelhas durante a metamorfose.

2.OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste em esclarecer aspectos da renovação do epitélio do intestino médio durante a metamorfose dos insetos sociais e verificar se há mudança no perfil proteolítico durante a ontogênese. Com isso, pretendemos detectar a proliferação e morte celular das células do intestino médio durante a metamorfose em *Melipona quadrifasciata anthidioides* e purificar enzimas tipo tripsina de larva e adulto de *Apis mellifera*.

Os objetivos específicos consistiram em:

1. Investigar a ocorrência de mitose durante a metamorfose do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*.
2. Avaliar e comparar quantitativamente a morte e a reposição celular durante o remodelamento do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*.
3. Analisar aspectos ultraestruturais da morte celular.
4. Purificar e caracterizar enzimas tipo tripsina do intestino médio de larvas e adultos de *Apis mellifera*.
5. Comparar o perfil proteolítico de larvas e adultos de *Apis mellifera*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldwin KM, Hakim RS (1991) Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue and Cell*, 23: 411-422.
- Barret AJ, Rawlings, ND, Woessner JF (1998) *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press.
- Billingsley PF, Lehane MJ (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, MJ & Billingsley PF (ed) *Biology of the insect midgut*. Chapman and Hall, London. pp 31-54.
- Buszczak M, Segraves WA (2000) Insect metamorphosis: Out with the old, in with the new. *Current Biology*, 10: 830-833.
- Caetano FH (1984) Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae). *Papéis Avulso de Zoologia*, 35: 257-305.
- Chapman RF (1998) *The insects - structure and function*. 4ª ed. Cambridge Press, Cambridge.
- Corley LS, Lavine MD (2006) A review of insect stem cell types. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17: 510-517.
- Cruz LC, Araújo VA, Dolder H, Neves CA (2007) Midgut ultrastructure of queens and foraging workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 50: 1117-1125.
- Cruz LC, Araújo VA, Dolder H, Araújo APA, Serrão JE, Neves CA (2011) Morphometry of the Midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier) (Hymenoptera: Apidae) during Metamorphosis. *Neotropical Entomology*, 40: 677- 681.
- Cruz-Landim C (1985) Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp*, 44: 28-41.
- Cruz-Landim C (1999) Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology*, 34(3): 597-603.
- Cruz-Landim C (2009) *Abelhas: Morfologia e função de sistemas*. 1ª ed Unesp.
- Cruz-Landim C, Cavalcante VM (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Sciences*, 20: 1099-1107.
- Cruz-Landim C, Mello MLS (1970) Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.IV. Development of the digestive tract. *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha*, 27: 229-263.
- Cruz-Landim C, Silva-de-Moraes RLM (2000) Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro, pp 48.

- Cruz-Landim C, Silva-de-Moraes RLM, Serrão JE (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal Computational Biology*, 1: 29-40.
- Díaz-Mendoza M, Ortego F, García de Lacoba M, Magaña C, de la Pozaa M, Farinós GP, Castañera P, Hernández-Crespo P (2005) Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1005-1020.
- Dow JAT (1986) Insect midgut function. *Advances Insect Physiology*, 19: 187-328.
- Ferreira RAC (2010) Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (latreille, 1807) (hymenoptera, apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico. Rio Claro,SP. Tese de Mestrado. Instituto de Biociências – Unesp.
- Ferreira FC, Cruz-Landim C (2005) Comparative study of midgut morphology and digestive parameters in workers, queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Naturalia (Rio Claro)*, 28-30: 39-48.
- Gama V, Cruz-Landim C (1984) Morfologia do tubo digestivo de *Camponotus (Myrmothix) rufipes* (Fabricius, 1975) (Hymenoptera, Formicidae) durante a metamorfose. *Naturalia*, 9: 43-55.
- Giannini KM, Bego LR (1988) Labor division among workers of *Melipona compressipes fasciculata* with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia Série Zoológica*, 85: 109-114.
- Hakim RS, Baldwin K, Smagge G (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 55: 593-608.
- Hebling NJ, Kerr WE, Kerr FS (1964) Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotricha* Moure. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 16: 115-127.
- Illa-Bochaca I, Montuenga LM (2006) The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2215-2223.
- Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) Abelha urucu – Biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú, Belo Horizonte.
- Lehane, MJ (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42: 525-50.
- Lima-Verde LW, Freitas BM (2002) Occurrence and biogeographic aspects of *Melipona quinquefasciata* in NE Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, 62(3): 479-486.

- Marques-Silva S, Serrão JE, Mezêncio JM (2005) Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. *Acta Histochemica*, 107: 23-30.
- Martins GF, Neves CA, Campos LO, Serrão JE (2005) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2): 161-168.
- Michener CD (2000) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press: Baltimore.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA (2010) Stem cells of the beetle midgut epithelium. *Journal of Insect Physiology*, 56: 296-303.
- Neves CA, Serrão JE, Gitirana LB (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41: 443-459.
- Ortego F, Novillo C, Castañera P (1996) Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 33: 163-180.
- Potten CS (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 353: 821-830.
- Rost MM (2006) Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Structure & Development*, 35: 69-76.
- Serrão JE (2001) A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). *Micron*, 32: 379-385.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) Scanning electronic microscopy of the proventriculus in stingless bees (Apidae: Meliponinae) with a comparison of necrophagous and feeding pollen workers. *Naturalia*, 20: 207-212.
- Terra WR (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review Entomological*, 35: 181-200.
- Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 109: 1-62.
- Terra W R, Ferreira C (2012) Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert LI *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, 1^a ed., 365-418.
- Tettamanti G, Crimaldi A, Casartelli M, Ambrosetti E, Ponti B, Congiu T, Ferrrese R, Rivas-Pena ML, Pennacchio F, Eguileor M (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Research*, 330: 441-449.

Uwo MF, Ui-Tei K, Park P, Takeda M (2002) Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, 308: 319–331.

Zudaire E, Simpson SJ, Illa I, Montuenga LM (2004) Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 2255-2265.

4. ARTIGOS

4.1 Proliferação e morte celular no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Artigo submetido à revista Apidologie

4.2. Análise de proteases no intestino médio de larvas e adultos de operárias de *Apis mellifera*

Proliferação e morte celular no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Resumo. Os insetos holometábolos apresentam metamorfose bem definida, caracterizada por uma série de mudanças morfofisiológicas entre o período larval e o adulto. Durante esse período, o epitélio digestivo sofre alterações que incluem produção e destruição de células. Pouco se sabe, porém, como se dá este processo. Com o objetivo de elucidar o mecanismo de renovação do intestino médio de abelhas durante o desenvolvimento pós-embrionário, avaliamos e comparamos quantitativamente a proliferação e morte celular no remodelamento do epitélio do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* durante a metamorfose até a fase adulta. Utilizamos anticorpo anti-fosfohistona H3 para marcação de células mitóticas. Para identificação de células em processo de morte celular, usamos kit de marcação de células apoptóticas (Apo-TRACE®). Analisamos também aspectos ultraestruturais da morte celular. Pré-pupa e pupa de olho rosa apresentaram maior número de células mitóticas. Menor quantidade foi observada em pupa de olho branco seguida por pupa de olho preto. Nenhuma marcação foi observada no adulto. A maior quantidade de células apoptóticas foi vista em pupas de olho rosa. Em pré-pupa e pupa de olho branco, poucas foram marcadas. Em pupa de olho preto e adulto, não se observou morte celular. A maior taxa proliferativa e apoptótica foi vista no estágio pupa de olho rosa. O aumento no número de células e o restabelecimento dos ninhos de células regenerativas no final da metamorfose é uma consequência das divisões celulares na pupa de olho preto, já que nesse estágio ocorrem divisões celulares e não ocorre apoptose. Observamos ainda que, durante a metamorfose, a morte das células epiteliais do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre por apoptose e é concomitante com autofagia.

INTRODUÇÃO

Os insetos holometábolos apresentam metamorfose bem definida, caracterizada por uma série de mudanças morfofisiológicas entre o período larval e o adulto. A metamorfose implica em drásticas mudanças na organização larval, incluindo a substituição de vários tecidos. Ela envolve processos regulatórios chave incluindo morte celular programada, proliferação e diferenciação celular (Illa-Bochaca e Montuenga, 2006).

Nas abelhas, as mudanças no tubo digestivo estão, em parte, ligadas a alterações na alimentação, a qual é diferente entre larva e adulto (Gama e Cruz-Landim, 1984). O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, médio e posterior (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 2009). O epitélio do intestino médio das abelhas possui três tipos de células: células digestivas que sintetizam enzimas e absorvem nutrientes, células endócrinas que produzem hormônios e as células regenerativas (Serrão e Cruz-Landim, 1996; Neves, 2002; Martins et al., 2006).

Durante a metamorfose o epitélio digestivo dos insetos sofre rápidas mudanças com contínua produção e destruição de células (Uwo et al., 2002; Corley e Lavine, 2006; Tettamanti et al., 2007; Hakim et al., 2010; Nardi et al., 2010). Na larva, as células digestivas do epitélio intestinal morrem e a reorganização deste epitélio ocorre pelas células regenerativas presentes entre as células digestivas larvais (Neves, 2002; Martins et al. 2006). A produção de novas células depende de células regenerativas com capacidade de se dividir várias vezes e dar origem a um ou mais tipos de células diferenciadas. Tais células são denominadas por alguns autores como células-tronco (Baldwin e Hakim, 1991; Illa- Bochaca e Montuenga, 2006; Corley e Lavine, 2006; Hakim et al., 2010).

Cruz-Landim e Silva-de-Moraes (2000) afirmaram que, embora seja comum a ocorrência de mitoses em células regenerativas em adultos de vários grupos de

insetos, isto não ocorre em Hymenoptera. Desta forma, espera-se que o número de células regenerativas no momento da emergência seja definido durante a pupação (Cruz-Landim e Silva-de-Moraes, 2000). Entretanto, mesmo durante a metamorfose o número de células observadas em mitose não parece ser suficiente para explicar o grande incremento que ocorre no número de ninhos de células regenerativas durante o período final da metamorfose (Neves et al., 2003; Martins et al., 2006; Cruz et al., 2011).

Alguns trabalhos têm focado seus objetivos em descobrir qual o mecanismo de renovação do intestino de abelhas durante a metamorfose (Neves, 2002; Cruz-Landim e Cavalcante, 2003; Martins et al., 2006; Cruz et al., 2011). Sabe-se que o método clássico de contagem de figuras mitóticas em cortes histológicos corados rotineiramente tende a subestimar a verdadeira fração proliferativa dos tecidos (Neves, 2002). Dentre as técnicas utilizadas para se estimar o índice mitótico de determinados tecidos destaca-se a técnica de imunomarcagem da fosfohistona-H3. Esta técnica utiliza um anticorpo altamente específico para a histona-H3 fosforilada na extremidade amino, no sítio ocupado pela serina 10. A fosforilação da histona-H3 está espacialmente e temporalmente correlacionada a condensação cromossômica e ocorre quase que exclusivamente durante a mitose (Hendzel et al., 1997). A marcação na serina 10 da histona-H3 fosforilada ocorre inicialmente durante a prófase, atinge o máximo durante a metáfase, diminuindo na anáfase e é completamente perdida durante a telófase (Hendzel et al., 1997).

No remodelamento do epitélio intestinal durante a metamorfose há também uma série altamente regulada de morte celular. Vários estudos foram realizados em tecidos de insetos, focalizando o processo de morte celular programada, a qual tem gerado muitas controvérsias quanto a sua classificação, já que as características típicas de apoptose, estabelecidas em vertebrados, não estão incondicionalmente presentes nas células de insetos (Ferreira, 2010). Os processos de apoptose,

autofagia e morte celular por necrose têm sido observados em tecidos de insetos (Rost, 2006; Tettamanti et al., 2007; Rost-Roszkowska, 2008; Santos et al., 2009). Várias técnicas têm sido utilizadas para estudar a morte celular, mas os aspectos morfológicos deste processo podem ser mais bem visualizados por microscopia eletrônica de transmissão. No entanto, para uma análise quantitativa, essas células podem ser marcadas com “kit” de marcação de células apoptóticas - Apo-TRACE (Sigma). A molécula de Apo-TRACE responde a alterações no potencial da membrana plasmática e alteração na distribuição dos fosfolípidios, característicos de células apoptóticas. Ela atravessa seletivamente a membrana de células apoptóticas desde as fases iniciais do processo de morte e se acumula no citoplasma (Aloya et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar quantitativamente a morte e a reposição celular do intestino médio durante a metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas

Foram utilizados intestino médio de abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* em diferentes estágios do desenvolvimento: pré-pupa, pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho preto e adulto, sendo quatro indivíduos de cada um dos estágios, utilizados para cada uma das técnicas apresentadas. Todos os exemplares foram retirados de colônias mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil.

Imunofluorescência – Fosfohistona-H3

Os indivíduos foram imobilizados a frio, em seguida, dissecados sob esteriomicroscópio e as regiões anterior, média e posterior do intestino médio foram

removidas e transferidas para solução de Zamboni (Stefanini et al. 1967) por 30 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato de sódio e tween 20 a 1% (PBST) durante 5 minutos cada, a 37°C. A seguir foram incubadas por 10 minutos em albumina sérica bovina 0,1% (BSA) à temperatura ambiente. Após uma lavagem em PBST durante 5 minutos, as amostras foram neutralizadas com soro normal de cabra (1:30) em PBST, por 10 minutos. Depois foram lavadas por 3 vezes em PBST e incubadas com anti-fosfohistona-H3 (Cell Signaling) obtida em coelho na diluição de 1:100 durante 2 horas em temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram novamente lavadas por 3 vezes em PBST; em seguida incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Sigma) 1:500 por duas horas em temperatura ambiente e depois lavados em PBST, por 5 minutos. Os intestinos médios foram contracorados por 30 minutos com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 100 ng/ml) usado para detectar o núcleo. No controle negativo, anti-fosfohistona-H3 foi omitida e as amostras foram tratadas com PBS contendo BSA. A região do proventrículo foi utilizada para controle positivo. As amostras foram montadas entre lâmina e lamínula com sacarose 50% e examinadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX-60).

Apoptose

Os indivíduos foram imobilizados a frio, em seguida, dissecados sob estereomicroscópio e as regiões do intestino médio foram removidas e incubadas em solução de Apo-TRACE® (Sigma) 5 ul/1 ml durante 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) e fixadas por 1 hora à temperatura ambiente em solução de Zamboni (Stefanini et al., 1967). Após essa etapa, foram lavadas em PBS e contracoradas com iodeto de propídeo 0,5% por 30 minutos. Em seguida, lavadas com PBS e montadas com sacarose 50% e examinadas no microscópio confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta.

Microscopia eletrônica de transmissão

Indivíduos de *M. quadrifasciata anthidioides* foram imobilizados a frio por cinco minutos, em seguida, dissecados sob estereomicroscópio tendo seu trato digestivo removido em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,2 M de sacarose. A seguir, o intestino médio foi dividido nas porções anterior, média e posterior e transferido para glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), ácido pícrico 0.2% e 0,2 M de sacarose por duas horas. Em seguida, os fragmentos do intestino médio foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por duas horas. Depois de lavadas duas vezes no tampão, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70%-100%) e embebidas em solução de resina LR White e álcool 70% (2:1) por uma hora e em resina pura também por uma hora. Posteriormente, as amostras foram embebidas novamente em resina pura e deixadas por 16 horas em temperatura ambiente, seguindo-se da polimerização em cápsulas de gelatina (Eletron Microscopy Sciences) a 60 °C por 24 horas.

Seções ultrafinas, obtidas em ultramicrotomo com navalha de diamante, foram colocadas em grades de cobre e contrastadas por 20 minutos com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo por oito minutos. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Quantificação de células em proliferação e morte

Foram usados quatro exemplares de cada estágio do desenvolvimento. O intestino médio foi dividido em três regiões: anterior, médio e posterior. Para cada região, cinco áreas de 0,18 mm² foram aleatoriamente selecionadas. A contagem de células marcadas com fosfohistona-H3 foi realizada usando o programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). O mesmo procedimento foi feito para quantificar as células Apo-TRACE[®] positivas.

Análises estatísticas

Análise total

Foi realizada análises do número de mitoses encontradas no intestino inteiro e essas foram comparadas entre os estágios. O mesmo procedimento foi feito para contagem de células em morte celular. Os resultados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) one way de Kruskal-Wallis com subseqüentes comparações pelo teste de Dunn.

Análise das regiões

Para comparar o número de mitoses e o número de células apoptóticas entre as três regiões do intestino médio de cada um dos estágios, os resultados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) one way de Kruskal-Wallis.

Para comparação entre os estágios concomitantemente com as respectivas regiões foi feita a ANOVA.

Proliferação x Apoptose

Foi utilizado test T para comparação entre número de mitoses e apoptoses encontradas no intestino inteiro em cada estágio do desenvolvimento.

RESULTADOS

Divisões celulares

Os resultados mostraram muitas células fosfohistona positivas (Fig.1A-D). Não houve diferença significativa no número mitoses entre os estágios pré-pupa e pupa de olho rosa (Fig. 2). Esses estágios apresentaram o maior número de mitoses, seguidas por pupa de olho branco, sendo que em pupa de olho preto foi observado o menor número. Já no adulto nenhuma marcação foi observada.

Comparando o número de células em divisão entre as diferentes regiões do intestino médio em cada dos estágios do desenvolvimento pupal, apenas nas pupas de olhos pretos foram observadas diferenças significativas entre as regiões. A região anterior foi a que apresentou maior número de células em proliferação.

Apoptose

Foi observada morte celular em alguns estágios do desenvolvimento pupal (Fig. 3A-D). Pupa de olho rosa apresentou maior número de células apoptóticas. Pré-pupa e pupa de olho branco apresentaram menor número. Entre esses dois estágios, não houve diferença significativa. Em pupa de olho preto, assim como no adulto, não foi observado nenhuma célula em processo de morte (Fig. 4).

Ao comparar o número de células em morte celular entre as regiões do intestino médio de cada estágio do desenvolvimento, observou que a região anterior de pupa de olho branco apresentou maior número. Entre as regiões dos demais estágios de desenvolvimento não houve diferença.

Proliferação x Apoptose

Não houve diferença significativa entre o número mitoses e número de células em morte celular no estágio pré-pupa e no de pupa de olho rosa. Em pupa de olho

branco, observou-se mais proliferação que morte. Em pupa de olho preto foi observado proliferação, mas não morte celular (Fig. 5).

Sinais ultraestruturais característicos da apoptose tais como alterações na forma do núcleo e sua desintegração em fragmentos circundados por envoltório nuclear (Fig. 6A-C), bem como alterações morfológicas das mitocôndrias (Fig. 6B), foram observadas. Em pupa de olho rosa foi comum a presença de vacúolos autofágicos delimitados por dupla membrana (Fig. 6D); características típicas de autofagia.

DISCUSSÃO

A renovação do epitélio do intestino médio em insetos tem sido amplamente descrita (Baldwin e Hakim, 1991; Jiang et al., 1997; Uwo et al., 2002; Tettamanti et al., 2007) e vários pesquisadores têm focado a reorganização do intestino médio de abelhas durante a metamorfose (Neves et al., 2003; Cruz-Landim e Cavalcante, 2003; Martins et al., 2006). Cruz et al. (2011) demonstraram, por dados morfométricos, a necessidade da formação de novas células digestivas para suprir o aumento do intestino médio durante a metamorfose, entretanto o número de mitoses observado era muito inferior ao esperado.

No presente estudo, a detecção por imunofluorescência de fosfohistona-H3 mostrou-se uma ferramenta útil para avaliar e quantificar a proliferação celular de células de inseto, em particular do sistema digestivo. Além disso, a marcação de células apoptóticas pelo Apo-TRACE[®] auxilia na quantificação de células em processo de morte celular.

No início da metamorfose, durante o estágio pré-pupal, ocorre eliminação de células larvais juntamente com crescimento e diferenciação de estruturas da pupa (Neves, 2002, Martins et al., 2006). Nossos resultados mostraram em pré-pupa alta taxa de células proliferativas e apoptóticas, sem diferença significativa entre elas. Esse

estágio é o início da metamorfose, transição na qual a larva se transformará em adulto, por isso é de se esperar uma maior reorganização celular.

No estágio pupa de olho branco não foram observadas muitas células mitóticas. No entanto, essas estão em maior número que as células em morte celular. Segundo Cruz-Landim (2009) a primeira transformação do intestino médio já se encontra completa nesse estágio do desenvolvimento. Corroborando com resultados do presente estudo, Cruz et al (2011) observaram, nessa mesma espécie, que o aumento do volume total do intestino é acompanhado pelo aumento do volume celular. Assim, nesse estágio não há necessidade de grande incremento da proliferação celular, já que apenas o aumento do volume das células, juntamente com a baixa taxa de morte celular, parece ser suficiente para suprir o aumento do intestino médio.

Foi no estágio pupa de olho rosa que se observou drástica transformação. De acordo com nossas análises, esse estágio apresentou grande número de células em proliferação e apoptóticas. Segundo Cruz-Landim e Mello (1970), uma nova transformação começa no intestino médio durante esse período. Essa transformação coincide com a elevação da taxa de ecdisteróide observada por Pinto et al. (2002) em *Melipona quadrifasciata*. Aumento da taxa de proliferação celular em uma variedade de tecidos de insetos tem sido correlacionado com elevação do ecdisteróide (Champlin e Truman, 1998). Foi visto em cultura de células que concentrações em determinado limiar desse hormônio estimulam a proliferação. No entanto, concentrações acima desse limiar induzem a apoptose (Champlin e Truman, 1998).

Cruz et al. (2011) notaram, em pupa de olho preto, aumento do volume total do intestino médio sem que houvesse aumento do volume celular, o que sugere um aumento do número de células. Além disso, neste período, notaram o surgimento dos ninhos de células regenerativas, no entanto mitose não foi detectada. Neste trabalho, detectamos, nesse estágio, células mitóticas e nenhuma célula apoptótica. Sendo assim, o aumento do número de células e surgimento dos ninhos se deve à maior taxa

proliferativa que ocorre nesse estágio e coincide com ápice de ecdisteróide detectado por Pinto et al. (2002).

Nos exemplares adultos já não foram mais detectadas proliferação celular nem apoptose, sugerindo que não haja necessidade de grandes reposições celulares. A ausência de proliferação e morte celular coincide com a queda da taxa de ecdisteróide que ocorre depois do estágio pupa de olho preto Pinto et al. (2002).

Segundo Martins et al (2006), não ocorre proliferação de células regenerativas durante a metamorfose. Esses autores sugeriram que as células regenerativas da larva seriam suficientes para promover a renovação do epitélio do intestino médio durante a metamorfose. No entanto, no presente trabalho observamos muitas células em divisão no epitélio intestinal em pupas de olho rosa e de olho preto.

Sugerimos, com base em nossos estudos, que no estágio pupa de olho preto ocorra restabelecimento dos ninhos de células regenerativas fornecendo novas células regenerativas para o restante do período pupal e, conseqüentemente, para abelhas adultas.

Segundo Ward (2007) a apoptose tem um papel importante no desenvolvimento, manutenção e senescência do organismo. Apoptose é um dos mecanismos utilizados pelos organismos para a remoção de células danificadas durante os processos naturais de envelhecimento dos tecidos. Sendo assim, seria esperado encontrar indicações da ocorrência de apoptose no intestino médio do indivíduo adulto; mas tal processo não foi observado.

A morte celular pode ser classificada em três tipos de acordo com suas características morfológicas: apoptose, autofagia e necrose (Ferreira, 2010). Segundo Denton et al. (2009) durante a pupação em *Drosophila* a autofagia é o principal regulador da morte celular. Em protura a degeneração começa na forma de autofagia e finaliza de modo apoptótico (Rost-Roszkowska et al., 2010). De acordo com as

observações ultraestruturais, durante a metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides*, tanto os processos de apoptose quanto os de autofagia podem estar presentes.

Apoptose e autofagia podem ser consideradas como morte celular programada enquanto a necrose seria uma morte celular patológica e não programada geneticamente (Ward, 2007; Ferreira, 2010). Contudo, estudos recentes mostraram que há uma regulação fisiológica em células necróticas e que a necrose não ocorre somente em situações patológicas, mas é também um componente de alguns processos fisiológicos (Ferreira, 2010). Podemos supor então, que no decorrer da fase adulta de *M. quadrifasciata anthidioides* a necrose seja o fenômeno responsável pela senescência do organismo. Talvez esse tipo de morte celular não permita que a molécula de apo-TRACE[®] entre na célula e seja observada a marcação. Outra hipótese pode ser a de que, pelo fato de termos analisado apenas operárias coletadas diretamente da colônia, essas ainda seriam jovens e ainda não apresentariam células intestinais em senescência, não apresentando indícios de morte celular como observado durante a metamorfose. Sendo assim, na metamorfose, a morte das células epiteliais do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* é atribuída a eventos de apoptose concomitantes com autofagia e talvez necrose.

O aumento do número de células epiteliais e o restabelecimento dos ninhos de células regenerativas no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* ao final da metamorfose, ocorre em consequência das divisões celulares e ausência de apoptose nas pupas de olhos pretos. A hiperplasia das células epiteliais, na ausência de processos degenerativos, permite a formação da cobertura epitelial do intestino médio que se diferenciará no adulto; bem como a formação de um “pool” de reserva que são os ninhos de células regenerativas.

Figuras

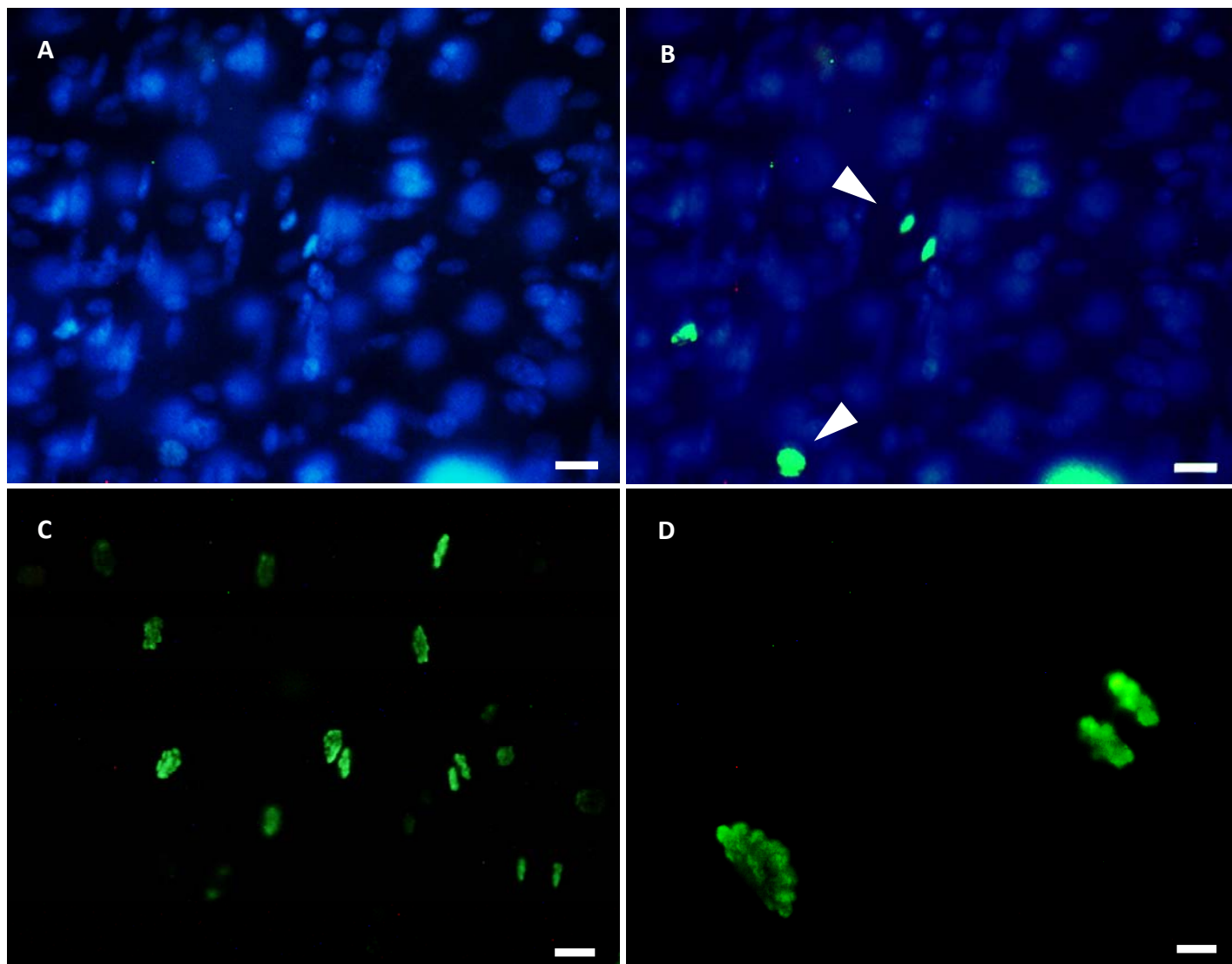


Figura 1: Fotomicrografias do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. A: montagem total da região anterior de pupa de olho branco corado com DAPI. B: sobreposição da mesma região (A) com anti-fosfohistona-H3 com FITC (cabeça de seta). C: Núcleos marcados com anti-fosfohistona- H3 - FITC em pupa de olho rosa. D: Detalhes de células em mitose marcadas com anti-fosfohistona-H3 – FITC. Barras = 10 μ m (A-C) e 4 μ m (D).

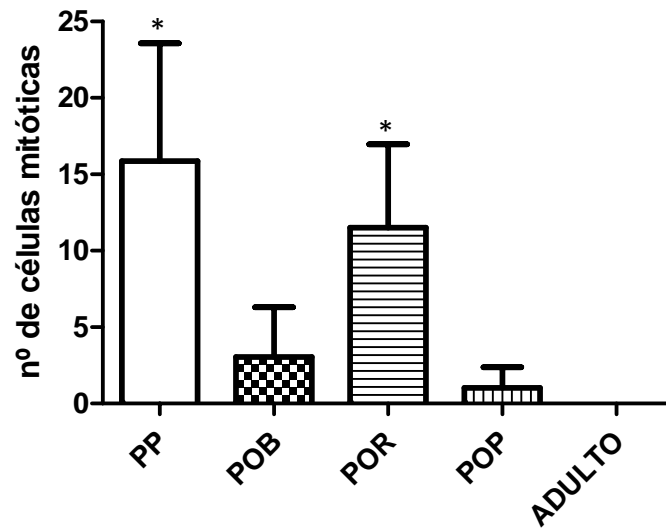


Figura 2. Análise de variância (ANOVA), relacionando as fases de desenvolvimento e o número de células em mitose no epitélio do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. PP = pré-pupa; POB = pupa de olho branco; POR = pupa de olho rosa; POP = pupa de olho preto. (*) Sem diferença significativa.

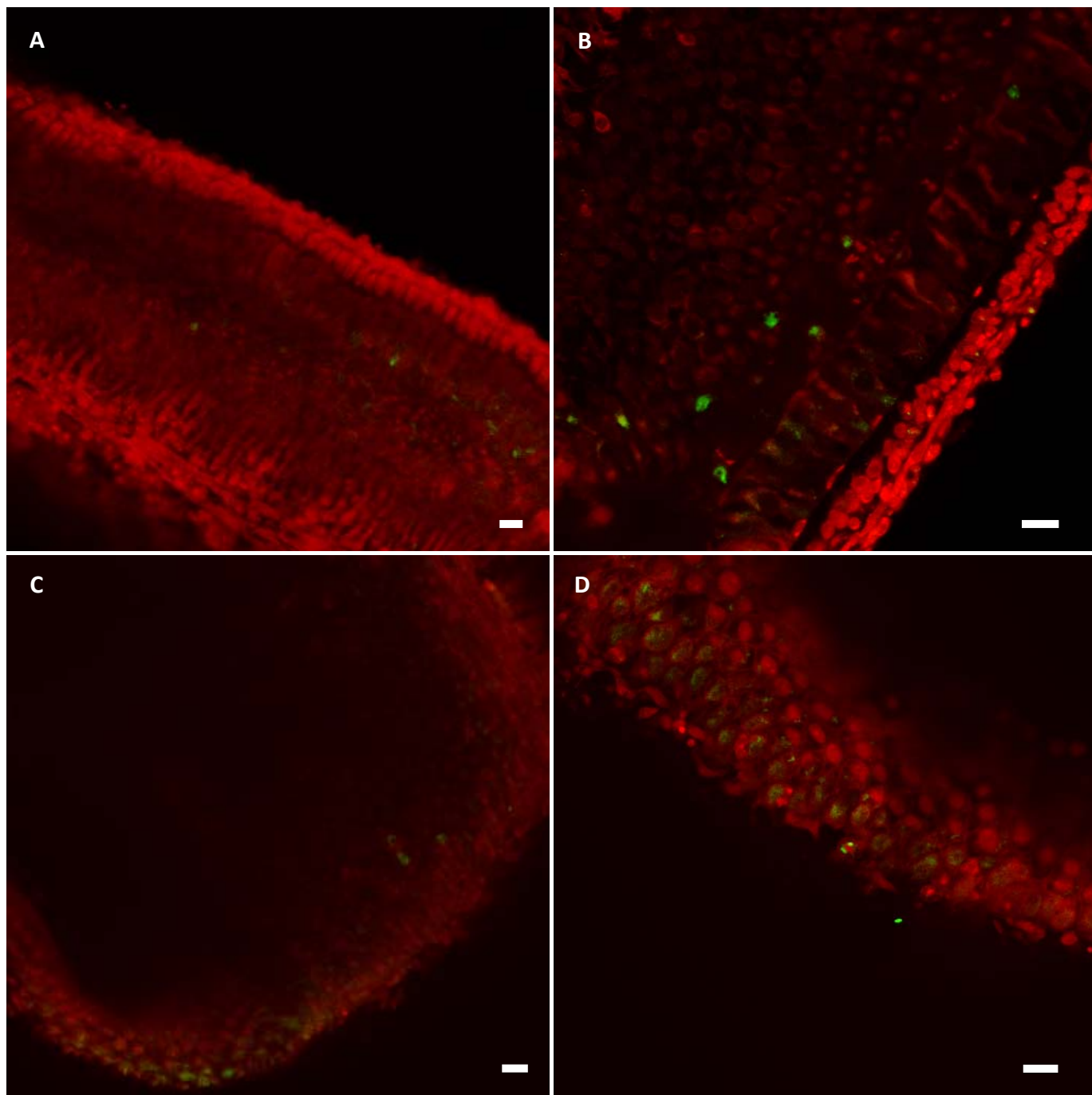


Figura 3: Células em morte celular do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* marcadas pelo Apo-TRACE[®] (verde). Núcleos corados pelo Iodeto de Propídeo (vermelho). **A-B.** Pré-pupa. **C-D.** Pupa de olho rosa. Barras = 20 μ m

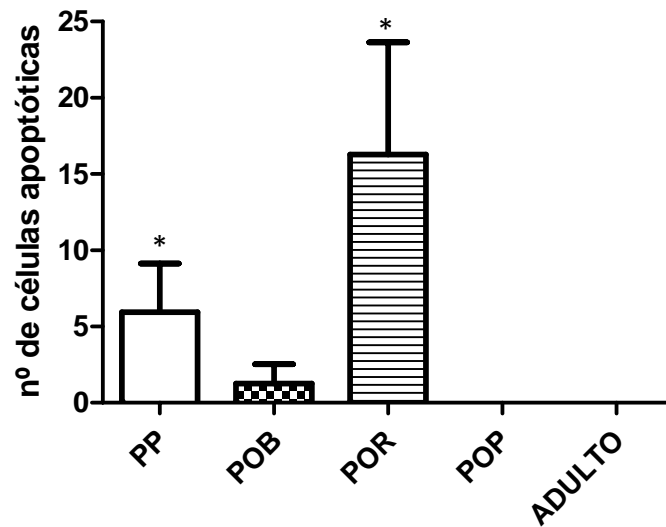


Figura 4. Análise de variância (ANOVA), relacionando as fases de desenvolvimento e número de células apoptóticas no epitélio do intestino médio *M. quadrifasciata anthidioides*. PP = pré-pupa; POB = pupa de olho branco; POB = pupa de olho rosa; POP = pupa de olho preto. (*) Sem diferença significativa.

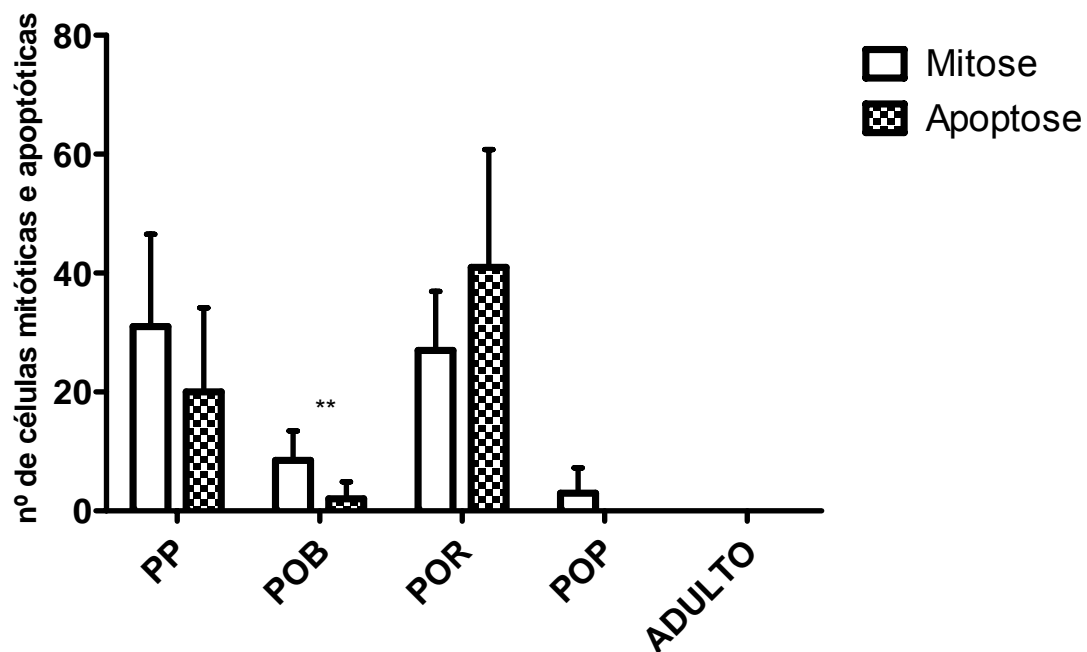


Figura 5. Análise de variância (ANOVA), relacionando o número de células mitóticas e apoptóticas no intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. PP = pré-pupa; POB = pupa de olho branco; POR = pupa de olho rosa; POP = pupa de olho preto. (**) Diferença significativa.

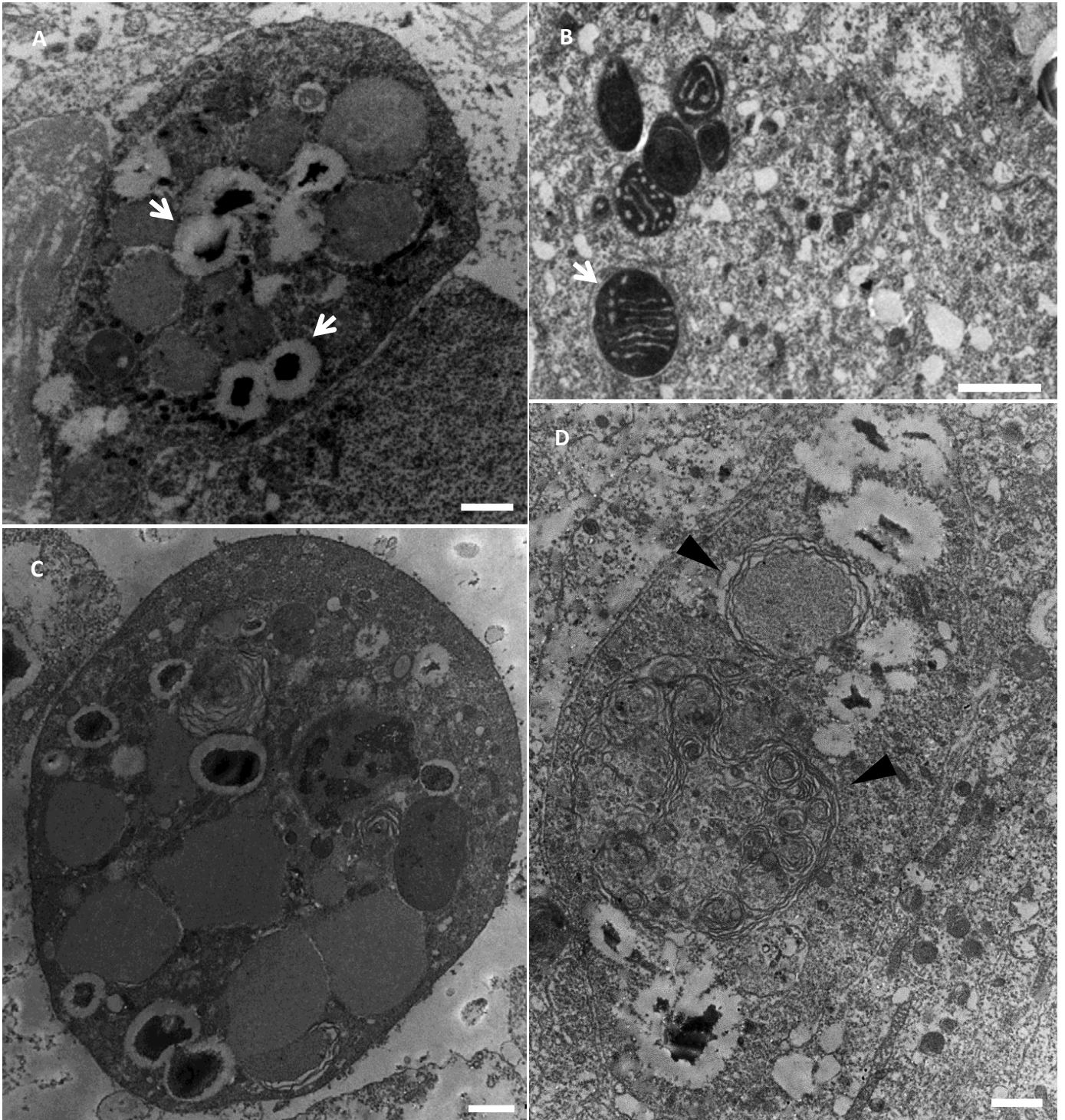


Figura 6: Morte celular no intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. **A.** Em pré-pupa nota-se fragmentação nuclear (seta) de uma célula apoptótica. **B.** Pupa de olho branco com mitocôndrias (seta) membranosas também característico da apoptose. **C-D.** Em pupa de olho rosa nota-se fragmentação nuclear característico da apoptose e também a presença de corpos multilamelares característico da autofagia (cabeça de seta). Barras = 2 μ m (A, C e D) e 5 μ m (B)

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Este trabalho teve apoio financeiro da Capes.

Referências Bibliográficas

- Aloya R, Shirvan A, Grimberg H, Reshef A, Levin G, Kidron D, Cohen A, Ziv I (2006) Molecular imaging of cell death in vivo by a novel small molecule probe. *Apoptosis*, 11: 2089-2101.
- Baldwin KM, Hakim RS (1991) Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue and Cell*, 23: 411-422.
- Champlin DT, Truman, JW (1998) Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe formation in the moth *Manduca sexta*. *Development*, 125: 269-277.
- Chapman RF (1998) The insects - structure and function. 4^a ed. Cambridge Press, Cambridge.
- Corley LS, Lavine MD (2006) A review of insect stem cell types. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17: 510-517.
- Cruz LC, Araújo VA, Dolder H, Araújo APA, Serrão JE, Neves CA (2011) Morphometry of the Midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier) (Hymenoptera: Apidae) during Metamorphosis. *Neotropical Entomology*, 40: 677-681.
- Cruz-Landim C (2009) Abelhas: Morfologia e função de sistemas. 1^a ed Unesp.
- Cruz-Landim C, Cavalcante VM (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Sciences*, 20: 1099-1107.
- Cruz-Landim C, Mello MLS (1970) Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.IV. Development of the digestive tract. *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha*, 27: 229-263.
- Cruz-Landim C, Silva-de-Moraes RLM (2000) Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro, pp 48.
- Cruz-Landim C, Silva-de-Moraes RLM, Serrão JE (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal Computational Biology*, 1: 29-40.
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S (2009) Autophagy, not Apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, 19: 1741-1746.
- Ferreira RAC, Malaspina O (2009) Avaliação da toxicidade de doses sub-letais de fipronil e ácido bórico em adultos de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807)(Hymenoptera, Apidae). *O Biológico*, 71: 178-178.
- Gama V, Cruz-Landim C (1984) Morfologia do tubo digestivo de *Camponotus (Myrmothix) rufipes* (Fabricius, 1975) (Hymenoptera, Formicidae) durante a metamorfose. *Naturalia*, 9: 43-55.

- Gilbert SF (2006) *Developmental Biology* 8^a ed. Sinauer, USA
- Hakim RS, Baldwin K, Smagghe G (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 55: 593-608.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6): 348-60.
- Illa-Bochaca I, Montuenga LM (2006) The regenerative niche of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2215-2223.
- Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS (1997) Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, 124: 4673-4683.
- Martins GF, Neves CA, Campos LO, Serrão JE (2006) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2): 161-168.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA (2010) Stem cells of the beetle midgut epithelium. *Journal of Insect Physiology*, 56: 296-303.
- Neves CA, Serrão JE, Gitirana LB (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41: 443-459.
- Pinto LZ, Hartfelder K, Gentile Bitondi MM, Simões ZLP (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of Insect Physiology*, 48: 783-790
- Rost MM (2006) Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Structure & Development*, 35: 69-76.
- Rost-Roszkowska MM (2008) Ultrastructural Changes in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) during degeneration and regeneration. *Annals of the Entomological Society of America*, 101: 151-158.
- Rost-Roszkowska MM, Machidab R, Fukuib M (2010) The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue and Cell*. 42: 24-31.
- Santos CG, Neves CA, Zanuncio JC, Serrão JE (2009) Postembryonic development of rectal pads in bees (Hymenoptera, Apidae). *The Anatomical Record*, 292: 1602-1611.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1996) Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios*, 88: 161-171.

- Stefanini, M, De Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174.
- Tettamanti G, Crimaldi A, Casartelli M, Ambrosetti E, Ponti B, Congiu T, Ferrrese R, Rivas-Pena ML, Pennacchio F, Eguileor M (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Research*, 330: 441-449.
- Uwo MF, Ui-Tei K, Park P, Takeda M (2002) Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, 308:319-331.
- Ward KN (2007) Study of cellular proliferation and apoptosis in short- and long-lived Honey Bees, *Apis mellifera*. Tese de mestrado. University of North Carolina at Greensboro.

Análise de proteases no intestino médio de larvas e adultos de operárias de *Apis mellifera*

Resumo. Diferentes proteases do tipo tripsina foram purificadas do intestino médio de *Apis mellifera* por cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose 6B: Duas tripsinas em larvas de último instar (TL-1 e TL-2) e uma em adultos (TA-1). Atividades específicas das tripsinas larvais foram TL-1: 168,9 e TL-2: 244,8 nmol/min/mg. Ambas apresentaram maior atividade específica que a TA-1 de adultos: 55,9 nmol/min/mg. Através de espectrometria de massa, as tripsinas larvais foram identificadas como *tripsina-1 like* e *tripsina-1*. Este estudo demonstrou pela primeira vez essas tripsinas purificadas e ativas em *A. mellifera*. Em adulto foi purificada *tripsina-3* de *A. mellifera*. Neste trabalho observamos mudanças no padrão enzimático durante a ontogênese de *A. mellifera*. O fato é que não somente o intestino de abelhas sofre uma profunda remodelação morfológica durante a ontogênese, como também o padrão de secreção enzimática modifica durante a sua metamorfose.

Palavras chaves: protease digestiva - *Apis mellifera* - tripsina - larva - adulto.

INTRODUÇÃO

Larvas e adultos de insetos holometábolos diferem na anatomia e fisiologia do corpo. O intestino médio de *Apis mellifera* é remodelado durante a metamorfose e, conseqüentemente, podem ocorrer mudanças no perfil enzimático (Cruz-Landim e Cavalcante, 2003). As abelhas sociais apresentam castas bem definidas: as rainhas, responsáveis pela deposição de ovos, as operárias responsáveis pela maior parte das tarefas da colônia, e os zangões, responsáveis por fertilizar as rainhas (Giannini et al., 1988; Ferreira e Cruz-Landim, 2005). Operárias jovens geralmente alimentam a cria e são chamadas nutridoras, enquanto as mais velhas, que deixam o ninho para coleta de alimentos, são as forrageiras (Hebling et al., 1964; Ferreira e Cruz-Landim, 2005). Cada uma das funções exercidas pelos membros da colmeia requer gasto de energia diferente. Isto gera diferentes necessidades nutricionais entre classes de indivíduos bem como diferente função para um mesmo indivíduo ao longo de sua vida (Ferreira e Cruz-Landim, 2005).

Larvas e rainhas necessitam de uma dieta altamente proteica e se alimentam de geleia real produzida pelas operárias nutridoras. Operárias nutridoras consomem grande quantidade de pólen para a produção da geleia real. Entretanto, operárias forrageiras alimentam-se preferencialmente de néctar ou mel, pois realizam atividades externas da colônia e requerem uma dieta que responda a sua alta demanda energética (Serrão e Cruz-Landim, 1995; Ferreira e Cruz-Landim, 2005).

Tem sido relatado que a abelha melífera, *Apis mellifera*, depende de serina-proteases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases para a digestão de proteínas (Giebel et al, 1971; Dahlmann et al, 1978; Burgess et al, 1996; Del Lama et al., 2001). Altos níveis de consumo de proteína e atividade proteolítica digestiva foram registrados em larvas e operárias nutridoras. Entretanto, em abelhas forrageiras o consumo de proteína e atividade proteolítica cai consideravelmente (Dahlmann et al, 1978; Grogan e Hunt, 1980; Moritz e Crailsheim, 1987; Crailsheim e Stolberg, 1989;

Ferreira e Cruz-Landim, 2005). Além disso, a atividade proteolítica é dependente da quantidade de proteína consumida, sendo maior em operárias alimentadas com dietas de pólen ou artificial que contem mais proteínas do que restritas a sacarose (Jimenez e Gilliam, 1989; Crailsheim e Stolberg, 1989).

Diferentes enzimas tipo tripsina e quimotripsina têm sido parcialmente identificadas a partir do intestino médio de larvas e adultos de *A. mellifera* (Giebel et al., 1971; Dahlmann et al., 1978) e a ingestão de inibidores de protease por abelhas, induziu novas formas de proteases (Girard et al., 1998; Pham-Delegue et al., 2000). Além disso, o genoma de *A. mellifera* foi recentemente sequenciado e cerca de 50 genes de serina-proteases diferentes foram identificados. Entre $1,0 \times 10^4$ genes previstos no genoma de *A. mellifera*, os genes de serina-proteases formam uma grande família (Zou et al., 2006). No entanto, apenas uma enzima tipo tripsina foi purificada e caracterizada bioquimicamente em adulto de operárias.

O objetivo deste estudo foi caracterizar proteases digestivas e purificar enzimas tipo tripsina de *A. mellifera*, comparando o perfil de larvas e adultos de operárias para determinar se ocorre mudança no padrão enzimático durante a ontogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Larvas de último instar e operárias adultas de *Apis mellifera* foram coletadas em um apiário localizado em Bustarviejo, Madri – Espanha.

Preparação do extrato enzimático

Intestinos médios foram extraídos de larvas de último instar e adultos de operárias. A membrana peritrófica e o lúmen foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0.1 M, 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5 (Tampão A) na proporção de 5

intestinos/ml solução. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4° C, e o sobrenadante mantido a -20° C até os ensaios.

Ensaio enzimáticos

Foram realizados ensaios enzimáticos para determinar atividades do tipo tripsina, quimotripsina, elastase e leucina aminopeptidase presentes no extrato digestivo e nas distintas frações obtidas durante o processo de purificação, baseados na metodologia descrita por Ortego et al. (1996). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e brancos, que consistia apenas em substrato e tampão, para considerar a degradação espontânea dos substratos.

Os ensaios foram realizados utilizando 20 µl do extrato digestivo; 0,25 mM N- α -benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA) em 5% DMSO para enzima tipo tripsina; 0,25 mM N-succinil-alanil-alanina-prolina-fenilalanina p-nitroanilida (SA₂PPpNA) em 5% DMSO para quimotripsina; e 0,25 mM N-succinil-alanina-alanina-alanina p-nitroanilida (SA₃pNA) em 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) para elastase; e 1,0 mM leucina p-nitroanilida (LpNA) em 10% de Metanol (MeOH) para leucina aminopeptidases.

As incubações foram realizadas a 30° C em períodos de tempo diferentes, e as taxas iniciais de hidrólise foram calculadas. Todas as reações enzimáticas foram paralisadas pela adição de 0,1 ml de ácido acético 30%. A concentração de p-nitroanilina resultante foi estimada pela medida da absorbância a 410 nm. Todos os ensaios foram realizados em condições tais que a atividade era proporcional à concentração de proteína e o tempo. A atividade foi medida em nmol de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína. Proteínas totais do extrato do intestino médio foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando soro albumina bovina como padrão.

A determinação do pH ótimo foi feita utilizando os seguintes sistemas tampão a

uma concentração de 0,1 M: Tris-HCl (pH 6,5 a 9,0), glicina-NaOH (pH 9,0 a 10,5). As atividades enzimáticas nos respectivos valores de pH foram determinadas, como descrito acima, para os substratos BApNA, SA₂PPpNA e SA₃pNA. Para o substrato LpNA foi utilizado tampão Tris-HCl (pH 6,5 a 8,0).

Purificação da tripsina

Purificação da tripsina foi realizada como descrito por Novillo et al. (1999). O extrato digestivo bruto (20 mL, a partir de 100 intestinos médios) foi aplicado (8 alíquotas de 2,5 ml) em coluna Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Bioscience) para remover compostos de baixo peso molecular e equilibrar o extrato com o tampão A. O extrato enzimático foi então fracionado por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna com 5 ml benzamidina-Sepharose 6B (Pharmacia Biotech, Suécia), equilibrada com o tampão A, a 4° C. Primeiramente, a coluna foi lavada com 5 ml de tampão A para remover todas as proteínas não ligadas especificamente. Este procedimento foi repetido cinco vezes. As tripsinas retidas na coluna foram eluídas com concentrações crescentes de benzamidina dissolvida em tampão A (15 ml de cada solução de 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1M para larvas; e 1, 5, 10 e 500 mM de benzamidina para adultos). Os eluentes foram recolhidos em frações de 5 ml. As frações foram armazenadas a -80° C, juntamente com benzamidina para evitar a auto-degradação da tripsina. Posteriormente, cada uma das frações foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25, em alíquotas de 2,5 ml, para remover a benzamidina. A partir dessas frações purificadas, foram determinadas atividades tipo tripsina, quimotripsina e elastase, realizada eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE) e foi feito sequenciamento do N-terminal.

Ensaio com inibidores

As atividades hidrolíticas das enzimas purificadas foram analisadas na presença dos seguintes inibidores específicos de protease: Os inibidores de serina protease específicos: inibidor de tripsina da soja tipo Bowman-Birk (SBBI) e inibidor de tripsina de soja (STI); inibidores de tripsina: Na- α -tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TLCK), benzamidina; inibidores de quimotripsina: quimostatina e Na- α -tosil-L-lisina clorometilcetona (TPCK). Inibidores foram pré-incubados a 30° C juntamente com as enzimas diluídas em tampão durante 15 minutos, antes da adição de substrato. Todos os inibidores foram diluídos em 20 μ L de NaCl 0,15 M, exceto TPCK e quimostatina que foram diluídos em 4 μ L de DMSO.

SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada em sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, CA, EUA) de acordo com Laemmli (1970). A composição do gel separador foi de 12% (p/v) de poliacrilamida. As amostras foram misturadas em tampão de amostra (1:1) contendo 0,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w / v) de SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 1% (p/v) de azul de bromofenol e aquecidas durante 4 min em banho-maria termostaticado (95 ° C). A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 200 V durante 60 minutos. Marcadores Precision plus Protein dual color (BIO-RAD) foram utilizados como padrões para determinação do peso molecular aparente das enzimas purificadas. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com Rabilloud et al. (1988).

Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa

A focalização isoeétrica foi realizada em tiras (pH 3-10 NL, 7 cm) (Bio-Rad). A segunda dimensão foi executada em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com SYPRO (BIO-RAD).

Spots das tripsinas purificadas foram cortados manualmente a partir de géis 2D e digeridos com tripsina. As amostras foram analisadas por espectrometria de massa pelo serviço de Proteômica e Genômica, do CSIC/CIB (Madri, Espanha), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Velos (Thermo Scientific) dotado de uma fonte de ionização nano (Proxeon) conectada on-line a um nano-HPLC Easy-LC (Proxeon). Os resultados foram analisados usando Sequest como um motor de busca. O banco de dados utilizado foi NCBI nr.

O peso molecular das enzimas tipo tripsina foi estimado por regressão linear correlacionando logaritmo de padrões de pesos moleculares e migração destes em gel 2D.

Sequência N-terminal

A sequência de aminoácidos do N-terminal das proteínas purificadas foi analisada pelo Serviço de Química de Proteínas do CIB-CSIC (Madrid, Espanha), utilizando sistema de sequenciamento de proteína Procise 494 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

RESULTADOS

Caracterização das atividades proteolíticas no extrato digestivo bruto

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica no extrato bruto do intestino médio de operárias adultas está resumido na Figura 1. Hidrólise ótima pela tripsina no substrato BApNA ocorreu em pH 7,5-10. Quimotripsina foi caracterizada utilizando SA₂PPpNA como substrato e apresentou atividade ótima entre pH 7,5-8,0 e 10.

Atividade de leucina-aminopeptidase contra o substrato específico LpNa foi máxima nos pH 6,5-7,5. A hidrólise do SA₃pNA, do substrato elastase, foi a mais baixa.

Em extrato de larvas e adultos a atividade específica dos substratos BApNA, SA₂PPpNA, SA₃pNA e LpNa foi calculada em pH 7,5 (Tabela 1).

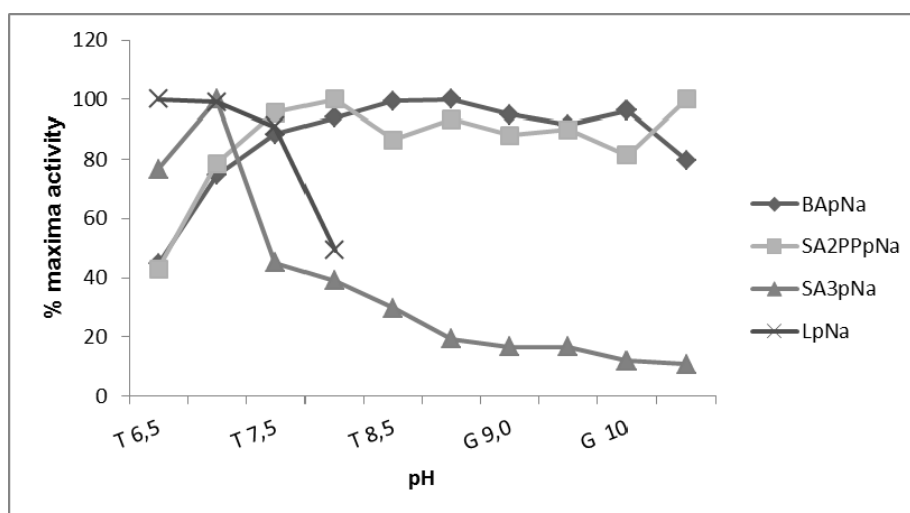


Figura 1: Efeito do pH sobre a taxa de hidrólise dos substratos de tripsina (BApNA), de quimotripsina (SA₂PPpNA), de elastase (SA₃pNA) e de leucina-aminopeptidase (LpNA) no extrato do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera*.

Tabela 1: Atividade específica das proteases do intestino médio de larvas e adultos de *A. mellifera* em pH ótimo contra substratos específicos

Enzima	Substrato	pH	Larva	Adulto
			Atividade específica*	
Tripsina	BApNA	7,5	389,14 ± 0,01	5,5 ± 0,02
Quimotripsina	SA ₂ PPpNA	7,5	668.89 ± 0,02	442,2 ± 0,02
Elastase	SA ₃ pNA	7,5	6.93 ± 0,02	44,1 ± 0,02
Leucina aminopeptidase	LpNA	7,5	699.19 ± 0,05	0,17 ± 0,01

* Atividade específica em nmoles Abs 410 nm/min/mg de proteína. Média ± erro padrão

Diversidade das tripsinas purificadas a partir de extratos do intestino médio de larvas e operárias adultas

Larva

Usando gradiente de benzamidina, dois picos com atividade tipo tripsina foram obtidos (Fig. 2). O primeiro, eluído com benzamidina 10 mM, foi chamado de tripsina larval-I (TL-1). O segundo pico, eluído com benzamidina 50-100 mM, designado como tripsina larval-II (TL-2). Em todas as frações, nenhuma atividade tipo quimotripsina ou leucina-aminopeptidase foi detectada. Apenas TL-2 apresentou uma única banda em SDS-PAGE (Fig. 3). Atividades específicas das tripsinas, usando substrato BApNA, foram $168,9 \pm 39,8$ e $244,8 \pm 33$ nmol/min/mg para TL-1 e TL-2, respectivamente.

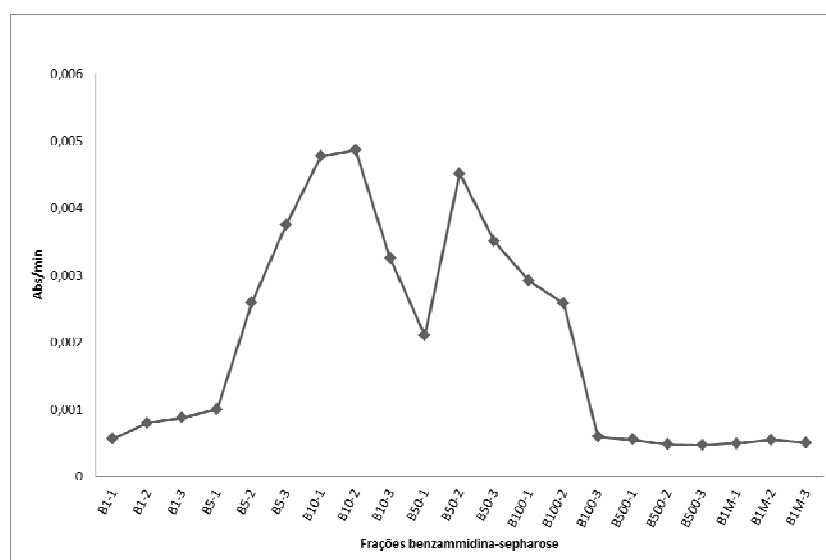


Figura 2: Purificação das tripsinas digestivas do lúmen do intestino médio de larvas de *A. mellifera* por cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose. Atividade de tripsina foi testada usando BApNA como substrato. A eluição das proteínas retidas foi realizada utilizando gradiente de benzamidina 1, 5, 10, 50, 500 e 1000 mM.

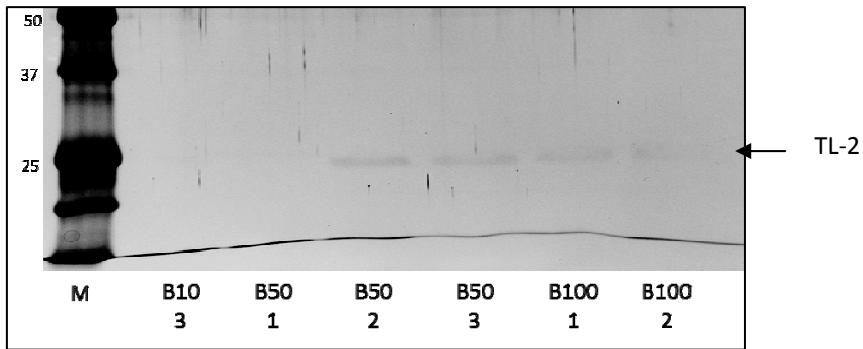


Figura 3: SDS-PAGE da Tripsina Larval -II (TL-2) purificada. Frações eluídas com benzamidina 50 mM (B-50) e 100 mM (B-100) e marcador de peso molecular (M).

Adultos

Um único pico de atividade do tipo tripsina foi obtido a partir de operária adulta (TA-1) (Fig. 4). No entanto, essa fração também apresentou atividade tipo quimotripsina.

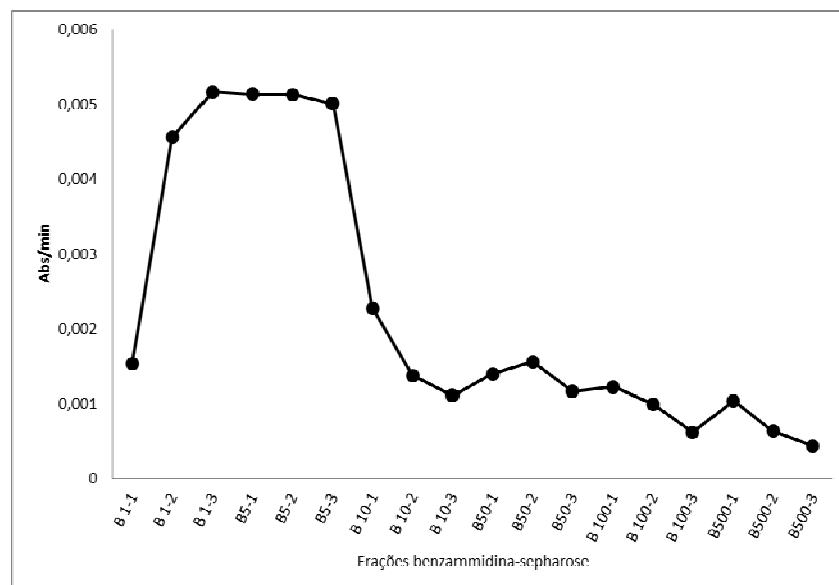


Figura 4: Isolamento da tripsina digestiva a partir de extratos do lúmen do intestino médio de operárias adultas de *A. mellifera* por cromatografia de afinidade Benzamidina-Sepharose. Atividade de tripsina foi testada usando BApNA como substrato. A eluição das proteínas retidas foi realizada utilizando gradiente de benzamidina 1, 5, 10 e 500 mM.

O pico com atividade tripsina e quimotripsina correspondeu a uma única banda de proteína no gel SDS-PAGE (Fig. 5).

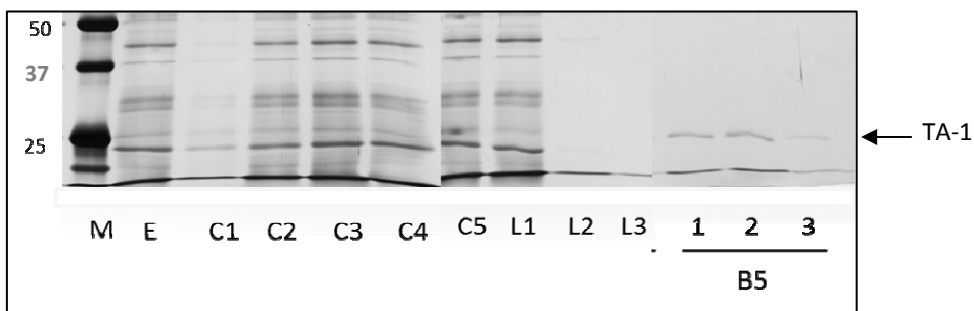


Figura 5: SDS-PAGE da tripsina de adulto (TA-1) purificada. Extrato bruto (E), proteínas não retidas (C), Frações dos lavados (L), tripsina purificada correspondente a eluição com 5 benzamida mM (B-5) e marcador de peso molecular (M).

A massa molecular estimada da tripsina purificada de adulto *A. mellifera* foi de 21,4 kDa. Atividade específica usando substrato BApNA foi $55,9 \pm 10$ nmol/min/mg. A fração também apresentou atividade tipo quimotripsina de $43,8 \pm 1$ nmol/min/mg, usando SA₂PPpNa como substrato.

Susceptibilidade aos inibidores

Tripsinas purificadas das larvas (TL-1 e TL-2) e dos adultos (TA-1) foram expostas a inibidores de tripsina a fim de comparar sua sensibilidade. Em larvas, utilizando BApNA como substrato, ambas as enzimas tipo tripsina foram fortemente inibidas por benzamida, SBBI e STI. TL-2 foi mais sensível ao TLCK. Resultados semelhantes foram observados em adultos (Fig. 6).

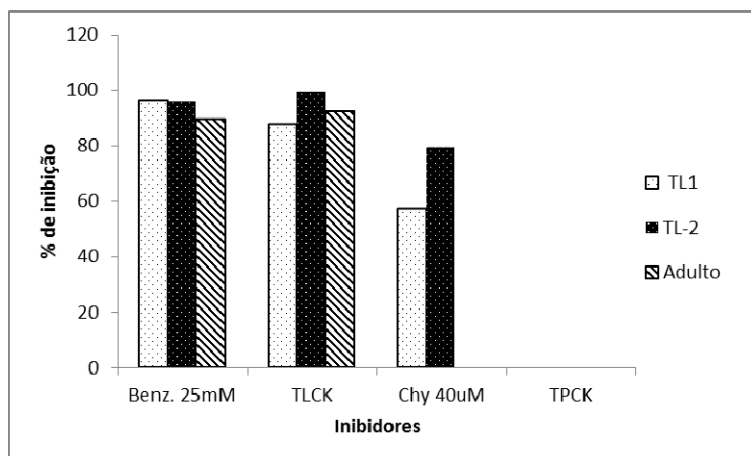


Figura 6: Efeito de diferentes inibidores sobre as tripsinas purificadas de larva e adulto de *A. mellifera* usando BApNA como substrato em pH 7,5.

Como na proteína purificada dos adultos observou-se também atividade quimotripsina, além da atividade de tripsina, TA-1 foi testada contra inibidores específicos de tripsina e quimotripsina (Fig. 7). Esta foi muito susceptível aos inibidores: SBBI, STI benzamidina e TLCK e não sensível aos inibidores de quimotripsina: quimostatina e TPCK. No entanto, usando substrato SA₂ppNa, TA-1 foi parcialmente inibida por benzamidina e TLCK também por quimostatina e TPCK.

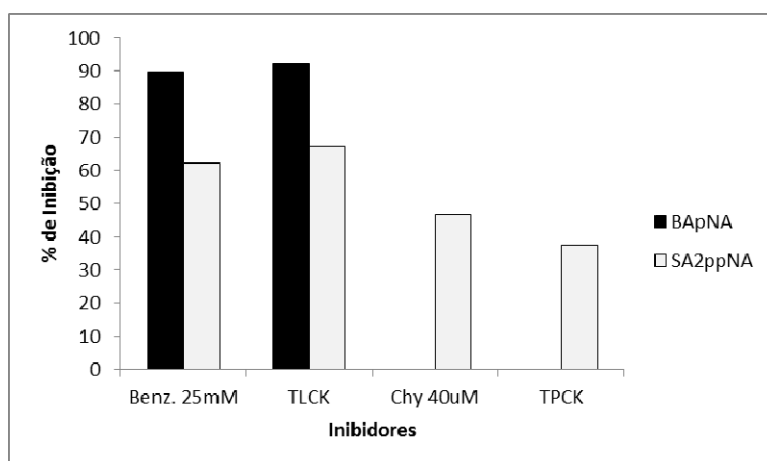


Figura 7: Efeito de diferentes inibidores sobre a tripsina purificada de operárias adultas de *A. mellifera* usando BApNA e SA₂ppNa como substrato em pH 7,5.

Eletroforese em gel 2D e análise por espectrometria de massa

Larva

TL-1 foi analisada em gel de eletroforese bidimensional e dois spots foram visualizados (Fig. 8A): TL1-1 e TL1-2 com pI 6,5, peso molecular 15 kDa. Na tripsina larval 2, dois spots foram identificados (Fig. 8B): TL2-1 com pI 5,4, 25 kDa e TL2-2 pI 6,5 e 15 kDa.

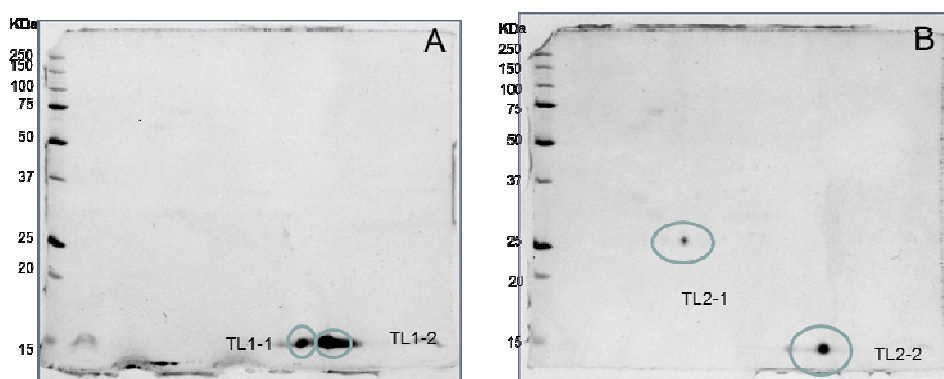


Figura 8: Imagens do gel 2D das tripsinas purificadas em larvas de *A. mellifera*. Dois spots foram identificados na Tripsina Larval-1 (A) e dois em Tripsina Larval-2 (B).

Os spots foram analisados por espectrometria de massa. TL1-1, TL1-2 e TL2-2 foram identificadas como *tripsina-1 like* [*Apis mellifera*]. TL2-1 foi identificada como *tripsina-1* [*Apis mellifera*]. Ambas proteases foram purificadas pela primeira vez em abelhas.

Adulto

Eletroforese bidimensional de TA-1 apresentou dois spots: TA1-1, pI 8,8 e TA1-2 pI 9,5 (Fig. 9). Ambas apresentaram peso molecular de 26,3 kDa. Os resultados foram analisados em banco de dados. Os peptídeos dos spots foram identificados por espectrometria de massa.

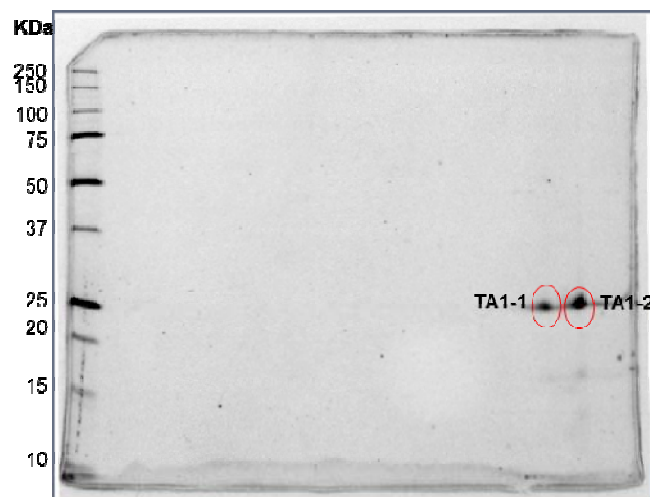


Figura 9: Gel 2D da tripsina purificada de operária adulta de *A. mellifera*. Dois spots foram identificados como TA1-1 e TA1-2.

Em TA1-1: Foi identificada tripsina-3 [*Apis mellifera*] com sete peptídeos. Também foi encontrada quimotripsina-1 [*A. mellifera*]. Neste caso, identificou-se um único peptídeo o que sugere que esta proteína não foi principal na amostra. Em TA1-2 também foi identificada tripsina-3 [*A. mellifera*] com sete peptídeos. A análise dos dados mostrou que TA1-1 e TA1-2 são provavelmente a mesma tripsina-3.

Sequência N-terminal

Larva

As sequências N-terminais das proteínas isoladas a partir das larvas e dos adultos foram determinadas (Tabela 2). As sequências de TL-1 e TA-1 apresentaram o resíduo IVGG conservado, confirmando tratar-se de enzimas do tipo tripsina. O N-terminal da TL-2 não pôde ser sequenciado devido à quantidade insuficiente de proteína. A busca de homologia na base de dados SWISS-PROT indicou tripsina-3 [*Apis mellifera*].

	Tripsina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Larva	TL-1	I	V	G	G	E	A	-	-	-	-
Adulto	TA-1	I	V	G	G	T	A	A	D	I	Q

Tabela 2: sequências N-terminal das proteases digestivas tipo tripsina isoladas a partir de larvas e adultos de *A. mellifera*.

DISCUSSÃO

A maior parte da digestão em Hymenoptera ocorre no espaço endoperitrófico (Terra e Ferreira, 2012). Nosso estudo foi feito utilizando a membrana peritrófica e seu conteúdo ao invés do intestino médio total (incluindo os tecidos). Consequentemente, utilizou-se o conteúdo luminal como fonte para a purificação de proteinases digestivas do tipo tripsina. Observamos atividade tripsina, quimotripsina, elastase e leucina-aminopeptidase no extrato digestivo de larvas e adultos. Todas as proteases identificadas nas larvas tiveram maior atividade específica quando comparada às do adulto. Nos adultos, enzimas do tipo tripsina e quimotripsina apresentaram atividade ótima em pH alcalino. Corroborando com o encontrado por Moritz et al. (1989).

Giebel et al. (1971) observou em *Apis mellifera*, atividades tipo quimotripsina e tripsina em adultos, mas estas não foram detectadas em larvas. Tripsina e leucina-aminoptidase de larvas de *A. mellifera* são semelhantes às larvas de *Scaptotrigona bipunctata* (Meliponini) (Schumaker et al., 1993). A enzima elastase apresentou baixa atividade específica, tanto em larvas quanto em adultos, porém novos estudos são necessários para avaliar a extensão dessa enzima no intestino de insetos e a sua importância na digestão, como também sugerido por Terra e Ferreira (2012).

A escolha metodológica baseia-se no fato de que os protocolos de purificação de enzimas tipo tripsina de insetos descritos na literatura normalmente envolvem uma ou ambas as etapas cromatográficas de afinidade e de troca iônica. A escolha das etapas varia em função das características das amostras. Por exemplo, a combinação de cromatografias de troca-aniônica não pôde ser empregada na purificação de tripsinas de *Musca domestica* (Diptera) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) (Jordão et al., 1996; Lopes et al., 2006) como foi para tripsinas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) e *Periplaneta americana* (Blattodea) (Cristofolletti et al., 2001; Lopes e Terra, 2003) devido à ocorrência de autólise. A cromatografia de afinidade foi, portanto, empregada como alternativa apresentando resultados satisfatórios. Neste trabalho também se optou pela cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose 6B e esta metodologia mostrou-se eficiente na separação da enzima tipo tripsina, resultando na observação de duas tripsinas em larvas e uma tripsina em adultos de operárias de *A. mellifera*.

Em ensaios com proteases purificadas das larvas contra substratos específicos, observou-se atividade apenas para BApNA. Os picos de atividade foram observados em frações equivalentes a 10 mM (TL-1) e 50 mM de benzamidina (TL-2). Atividade específica da tripsina em TL-1-1 foi $168,9 \pm 39,8$ e TL-2 foi $244,8 \pm 33$ nmol/min/mg. A atividade enzimática da tripsina das larvas também foi testada na presença de inibidores. Como esperado, utilizando BApNA como substrato, as

enzimas foram suscetíveis à SBBI, benzamidina, STI e TLCK, reforçando a sua classificação como enzima tipo tripsina. Estas frações foram aplicadas em SDS-PAGE e apenas TL-2 apresentou uma única banda. No gel 2D foram visualizados dois spots em ambas as proteínas purificadas das larvas. Em TL2-1 foi identificado *trypsin-1* [*Apis mellifera*]. Em TL1-1, TL1-2 e TL2-2, identificadas a mesma *trypsin-1 like* [*Apis mellifera*]. Ambas foram purificadas e caracterizadas pela primeira vez em *A. mellifera*.

Apenas foi possível obter N-terminal da TL-1 que foi IVGGEA, que confirmou a classificação de enzima do tipo tripsina.

Em ensaios realizados com enzima purificada de operárias adultas, a fração correspondente a benzamidina 5 mM (TA-1), mostrou, além de atividade para BApNA ($55,9 \pm 10$ nmol/min/mg), uma elevada atividade para SA₂PPpNA ($43,8 \pm 1$ nmol/min/mg). Nos ensaios com inibidores, usando substrato BApNA, a enzima foi sensível aos inibidores da SBBI, STI, TLCK e benzamidina e não foi inibida pela quimostatina e TPCK, confirmando atividade do tipo tripsina. Proteases inibidas por TLCK também foram demonstradas por Giebel et al. (1971) e o mesmo não ocorreu para TPCK. Usando substrato SA₂PPpNA, a enzima foi parcialmente inibida por quimostatina e TPCK. A atividade da proteína purificada contra substrato SA₂ppNA pode ser uma forte indicação da presença de quimotripsina. SDS-PAGE de AT-1 resultou em uma única banda. No gel 2D, TA-1 apresentou dois spots (TA1-1 e TA1-2), ambos com pesos moleculares de 26,3 kDa e pontos isoelétricos: TA1-1: 8,8 e TA1-2: 9,5. Ambos apresentaram ponto isoelétrico mais alcalino do que as enzimas purificadas em larvas. Proteinases tipo tripsina mais alcalinas também foram purificadas a partir de *Choristoneura fumiferana*: pI = 10,3 (Milne e Kaplan, 1993) e *Bombyx mori*: pI = 11,0 (Eguchi e Kuriyama, 1985). Na análise por espectrometria de massa, foi identificada em TA1-2 *Tripsina-3* [*Apis mellifera*]. Em TA1-1, a maioria dos peptídeos foi identificada como *Tripsina-3* [*Apis mellifera*] e apenas um peptídeo de *quimotripsina-1* [*Apis mellifera*]. Isto demonstra que a quimotripsina não foi a principal

enzima da amostra. Keil-Dlouha (1971) relatou hidrólise do substrato SA₂PPpNA pela tripsina. Esse autor afirmou que a hidrólise poderia ter sido causada pela tripsina em si ou pelos seus próprios fragmentos, isto é, produtos da autólise com especificidade alterada por mudanças na conformação. A sequência N-terminal de AT-1 foi IVGGTAADIQ. Uma busca por homologia foi realizada com a sequência N-terminal da tripsina purificada no GenBank e coincidiu com tripsina-3 de *Apis mellifera*, ID: TRYP-APISMS, número de acesso: P83348. Esta busca por homologias também revelou que a protease apresenta grande semelhança com tripsina de abelha do gênero *Bombus*, bem como outros Hymenoptera e alguns Diptera.

Tripsina-like de *A. mellifera* foi descrita por Giebel et al. (1971) isolada por filtração em gel com peso molecular de 21 kDa. Esta mesma tripsina não foi observada na larva.

Vários trabalhos comparativos sugerem que o perfil das endopeptidases do intestino médio de operárias de abelhas melíferas é diferente entre larvas e adultos (Giebel et al., 1971; Dahlmann et al., 1977; Zerbo et al., 2001). Neste trabalho purificamos diferentes tripsinas entre larvas e adultos.

Terra e Ferreira (1994) relataram que a ocorrência de diferentes enzimas digestivas de insetos geralmente está associada à composição química da dieta ingerida. Entretanto, Elpidina et al. (2005) observaram que proteinases digestivas são expressas de forma distinta em larvas e adultos do Coleoptera *Tenebrio molitor*, os quais possuem uma dieta proteica semelhante as abelhas. Isso sugere que larvas e adultos expressam diferentes enzimas em decorrência da diferentes fases do desenvolvimento. O trabalho de Jimenez (1989) também sugere que a atividade da tripsina parece ser independente da época e quantidade de pólen consumido e está mais relacionada a idade das abelhas.

Neste trabalho observamos mudanças no padrão enzimático durante a ontogênese de *A. mellifera*. O fato é que não somente o intestino de abelhas sofre

uma profunda remodelação morfológica durante a ontogênese, como também o padrão de secreção enzimática modifica durante a sua metamorfose.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Pablo de la Quintana por fornecer as abelhas, Carolina Navas Jiménez e Nuria Arranz de Pablo pela ajuda nas coletas, aos serviços do CIB-CSIC, Madri: “Química de proteínas” pelo sequenciamento, e “Proteômica e Genômica” pela espectrometria de massa. Este trabalho teve apoio financeiro do PDSE (Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior) / Capes processo: 4850-11-4.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Burgess EPJ, Malone LA, Christeller JT (1996) Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 42: 823-828.
- Crailsheim K, Stolberg E (1989) Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 35: 595-602.
- Cristofolletti PT, Ribeiro AF, Terra WR (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 47: 43-155.
- Cruz-Landim C, Cavalcante VM (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Sciences*, 20:1099-1107.
- Dahlmann B, Jany KD, Pfeleiderer G (1978) The midgut endopeptidases of the honey bee (*Apis mellifica*): comparison of the enzymes in different ontogenic stages. *Insect Biochemistry*, 8: 203-211.
- Del Lama MA, Bezerra RM, Soares AEE (2001) Genetic, ontogenetic, and tissue-specific variation of aminopeptidases of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 32: 25-35.
- Eguchi M, Kuriyama K (1985) Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from midgut tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biochemistry*, 97:1437-1445.
- Elpidina EN, Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B (2005) A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*, 87: 771–779.
- Ferreira FC, Cruz-Landim C (2005) Comparative study of midgut morphology and digestive parameters in workers, queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Naturalia (Rio Claro)*, 28-30: 39-48.
- Giannini KM, Bego LR (1988) Labor division among workers of *Melipona compressipes fasciculata* with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia. Série Zoologia*, 85: 109-114.
- Giebel W, Zwilling R, Pfeleiderer G (1971) The evolution of endopeptidases XII. The proteolytic enzymes of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 38B: 197-210.
- Girard C, Picard-Nizou AL, Grallien E, Zaccomer B, Jouanin L, Pham-Delegue MH (1998) Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic Research*, 7: 239-246.

- Grogan DE, Hunt JH (1980) Age-correlated changes in midgut protease activity of the honey-bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Experientia*, 36: 1347-1348.
- Hebling NJ, Kerr WE, Kerr FS (1964) Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona* (*Scaptotrigona*) *xanthotricha* Moure. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 16: 115-127.
- Jimenez DR, Gilliam M (1989) Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin activity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 20: 287-303.
- Jordão BP, Terra WR, Ribeiro AF, Lehane MJ, Ferreira C (1996) Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 337-346.
- Keil-Dlouha V (1971) Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS letters*, 16: 291-295.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lopes AR, Juliano MA, Marana SR, Terra WR (2006) Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in the catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36:130-140.
- Lopes AR, Terra WR (2003) Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 407-415.
- Michener CD (2000) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press: Baltimore.
- Milne R, Kaplan H (1993) Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 663-673.
- Moritz B, Crailsheim K (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33: 923-931.
- Novillo C, Castañera P, Ortego F (1999) Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 177-184.
- Ortego F, Novillo C, Castañera P (1996) Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 33: 163-180.
- Pham-Delegue MH, Girard C, LeMetayer M, PicardNizou AL, Hennequet C, Pons O, Jouanin L (2000) Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 21-29.
- Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electroforesis*, 9: 288-291.

- Schumaker TTS, Cristofolletti PT, Terra WR (1993) Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie*, 24: 3-17.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera. Apidae, Meliponinae). *Cytobios*, 83: 229–235.
- Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 109: 1-62.
- Terra WR, Ferreira C (2012) Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert LI *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier 1^a ed., 365-418.
- Zerbo AC, Silva de Moraes RLM, Brochetto-Braga MR (2001) Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129: 139-147.
- Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang H (2006) Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Molecular Biology*, 15 (5): 603–614.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O aumento no número de células e o restabelecimento dos ninhos de células regenerativas no final da metamorfose é uma consequência das divisões celulares na pupa de olho preto, já que nesse estágio ocorrem divisões celulares e não ocorre apoptose;
- Durante a metamorfose, a morte das células epiteliais do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre por apoptose e é concomitante com autofagia;
- Proteases do tipo tripsina foram purificadas do intestino médio de operária de *Apis mellifera* por cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose 6B: Duas em larva de último instar (*tripsina-1* e *tripsina-1 like*) e uma em adulto (*tripsina-3*).