Jéssica Martins Camargo

Ontogênese do ritmo de consumo de
oxigênio em operárias de *Melipona*
quadrifasciata (Hymenoptera; Meliponini):
a influência da luz

Ontogenesis of respiratory rhythms in *Melipona*
quadrifasciata workers: the light influence

São Paulo

2012

Jéssica Martins Camargo

Ontogênese do ritmo de consumo de
oxigênio em operárias de *Melipona*
quadrifasciata (Hymenoptera; Meliponini):
a influência da luz

Ontogenesis of respiratory rhythms in *Melipona*
quadrifasciata workers: the light influence

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Mirian
David Marques

São Paulo

2012

Camargo, Jéssica Martins

Ontogênese do Ritmo de Consumo de
Oxigênio em Operárias de *Melipona*
quadrifasciata (Hymenoptera; Meliponini):
a Influência da Luz

78 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

- 1- Cronobiologia
- 2- Abelhas sem ferrão
- 3- Respirometria

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia
Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr^a: Mirian David Marques.
Orientador(a)

Dedico a todos que acreditaram em mim, antes mesmo que eu pudesse fazer isso. Dedico a Deus, à minha família e aos meus amigos.

“Alice: Quanto tempo dura o eterno?
Coelho: Às vezes apenas um
segundo...”

Alice no País das Maravilhas
Lewis Carroll, 1865

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que cooperaram comigo durante este trajeto, acreditando num potencial que, muitas vezes, eu não podia ver.

Agradeço a Deus por ouvir as insistentes orações da minha família, em especial, às preces da minha mãe; que deve ter gasto toda a sua cota de pedidos comigo.

Agradeço à Prof^ª Mirian David Marques e ao Prof. José Guilherme Chauí Berlinck que me orientaram em muito mais que cronobiologia, respirometria e fisiologia; antes reafirmaram a importância da boa convivência, do respeito, da honestidade e da amizade na ciência e na vida.

Agradeço à Me. Cintia Etsuko Yamashita pelas discussões científicas, de resultados e por acreditar em mim. Você é uma amiga incrível!

Agradeço à Dr^a Tatiana Hideko Kawamoto por me acompanhar nos primeiros passos da respirometria de forma tão paciente. Taty, você se tornou uma amiga muito querida!

Agradeço ao Me. Tiago de Moraes Montanher pelos primeiros passos nas análises estatística e por me ensinar muitas coisas que não envolveram números.

Agradeço à Prof^ª Gisele Akemi Oda por me aceitar em sua sala, juntamente com as abelhas. Agradeço também pelas conversas científicas e pessoais.

Agradeço à Dr^a Denise de Araújo Alves por me ensinar a identificação correta do material biológico.

Agradeço aos professores Dr. José Eduardo P.W. Bicudo, Dr. Carlos Arturo Navas Iannini, Dr^a Silvia Cristina Ribeiro de Souza e à Dr^a Denise Loli pelos empréstimos de materiais, equipamentos e salas.

Agradeço à Patricia Tachinardi pelo auxílio com a utilização do programa *El Temps*.

Agradeço à Débora Siqueira Cosignani Tabal e ao Rodrigo Cantamessa por me ensinarem e me ajudarem a cuidar de nossas meninas, as abelhas.

Agradeço, de coração, aos meus amigos e familiares que me seguraram pela mão, mesmo eu, muitas vezes, estando ausente. Agradeço a vocês por me amarem tão

incondicionalmente! Por me darem colo, casa, chão, companhia, risadas, ombro, seja no Brasil ou fora dele. Obrigada em especial: Alê, Arnaldo, Carolzinha, Cintia, Cris, Fabizinha, Grandão (Vlad), Heidi, Ipedetes, Karlota, Lele, Maurete, Musgo, Ricardo, Soninha, Talita, Tati, Taty, Zé!!!! Obrigada mãe, pai, madrinha, padrinho, meus avós e a Laila! Família e amigos: AMO VOCÊS! Valeu mesmo!!! Vocês foram a base e o apoio crucial para que eu pudesse chegar até aqui! Ci, Lelê e Musgo, muito obrigada pela correção do texto!

Agradeço à Patricia Tachinardi, à Barbara Tomotani, ao Danilo Flôres, e ao Ivan Salles Santos pelas risadas, discussões científicas e por quase tornarem Pitt e Daan literatura infanto-juvenil. Ao pessoal do Muzoo, agradeço pelos almoços divertidos destes últimos tempos.

Agradeço aos integrantes da equipe de apoio do IB-USP (às secretarias de pós-graduação e da Fisiologia, aos técnicos, ao pessoal da manutenção e da limpeza) com os quais eu sempre pude contar e fui atendida com carinho. Em especial, agradeço à Gisele Ortoli e à Roseli Silva Santos pela paciência ímpar.

Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro.

Obrigada a todos que, pacientemente, leram e lerão essa dissertação. Vocês agora fazem parte de um pedacinho da minha história.

Índice

Agradecimentos	iv
Índice	vi
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
1 - Sistema Biológico	3
1.1– Abelhas eussociais	3
1.2– Colmeia de Meliponini	3
1.3– Castas e determinação de tarefas	4
2 - Ritmos biológicos	7
2.1– Importância dos ritmos biológicos	7
2.2– O que é um ritmo	7
2.3– Ritmos endógenos	8
2.4– Condição de livre curso	9
2.5– Mecanismos de sincronização	10
3 - Ritmos biológicos em abelhas	13
3.1– Ritmo de atividade de forrageiras	14
3.2– Ciclo Claro/Escuro como um importante agente arrastador em abelhas	16
3.3– Cronobiologia de Meliponini	16
4 - Padrão de consumo de Oxigênio como indicador indireto de ritmo de atividade.	17
Objetivos e justificativa	20
Materiais e métodos	22
1 - Sistema Biológico	22
Manutenção das Colônias	22
2 - Seleção dos grupos experimentais	23
2.1- Forrageiras	23
2.2- Nutrizes	23
3 - Respirometria	25
3.1- Acondicionamento dos animais – Câmaras metabólicas ou respirométricas	25
3.2- Técnica de respirometria intermitente	26
4 - Desenho experimental cronobiológico	29
4.1- Fase1: primeiras 24 horas anteriores aos experimentos de respirometria – tratamento dos animais experimentais	29
4.2- Fase2: primeiras 48 horas após o início da respirometria – condição ambiental	31
4.3- Fase3: de 48 a 144 horas após o início da respirometria	31
5 - Análises dos dados	31

5.1- Análise visual do perfil obtido na variação PPO2 ExpeData®	31
5.2- Médias de consumo e comparação entre os grupos experimentais	32
5.3- Detecção de frequências pela Transformada rápida de Fourier	32
5.4- Detecção de períodos relevantes por Periodogramas	34
5.5- “Respirogramas” como método visual de análise de ritmo	34
Resultados	37
1 - Problemas amostrais	37
2 - Observações dos efeitos das 24h anteriores à respirometria (Fase1) sobre os diferentes grupos experimentais	37
2.1- Taxa de mortalidade	37
2.2- Aumento de massa corpórea nas primeiras 24 horas	38
2.3- Comportamento no interior da câmara	38
3 - Análise visual do perfil obtido na variação da pressão parcial de oxigênio (Δ PPO2)	39
3.1- Fase2 – Primeiras 48h de respirometria: Efeito do ciclo claro/escuro sobre a Δ PPO2	42
3.2- Fase3 – Efeito da condição de livre curso sobre o perfil de Δ PPO2	44
4 - Médias de consumo de oxigênio e comparação entre os grupos experimentais	44
4.1- Fase2 – Efeito do ciclo claro/escuro sobre as médias de consumo de oxigênio nos diferentes grupos amostrados	45
4.2- Fase2 e Fase3 – Efeito das condições de livre curso sobre as médias de consumo de O ₂	47
5 - Detecção de frequências no consumo de oxigênio	48
5.1- Problemas metodológicos	48
5.2- Ritmos encontrados sob ciclo claro/escuro	50
5.3- Fase 3 (EE) – Detectando ritmos endógenos de consumo de oxigênio	54
6 – Respirogramas: obtendo informações dos padrões cronobiológicos	57
7 - Diferentes efeitos da respirometria sobre os diferentes grupos experimentais	62
Discussão	63
1 - Forrageiras	63
1.1- Eficiência do CE experimental como agente arrastador	63
1.2- Sincronização com a fotofase, mesmo sem arrastamento do ritmo.	66
1.3- Fase3 – Ritmo em condição de livre curso e sua expressão histórico dependente	67
2 - Nutrizes	67
2.1- Efeito tópico da luz	67
2.2- Efeito do retorno à colônia, sobre a expressão do ritmo	69
Conclusões	71
Referências bibliográficas	73

Resumo

As operárias de *Melipona quadrifasciata* exercem diferentes funções na colônia, segundo sua faixa etária. No interior da colônia, os indivíduos mais jovens, nutrízes, ficam localizados na região mais interna e aproximam-se progressivamente das regiões periféricas à medida que envelhecem. Os indivíduos mais velhos, forrageiras, saem da colônia diariamente. Ritmos biológicos estão presentes nas operárias de todas as idades, mas apenas os ritmos das forrageiras estão bem caracterizados.

Neste trabalho, o objetivo foi detectar mudanças no sistema temporal que ocorrem ao longo do desenvolvimento ontogenético de abelhas operárias. O ritmo monitorado foi aquele de consumo de O_2 , empregando um ciclo claro/escuro como agente sincronizador. O consumo de O_2 foi registrado em nutrízes com 24 horas de vida e em forrageiras, sendo que as nutrízes foram divididas em dois grupos: Nutri_BOD, indivíduos colocados em condições constantes de temperatura e iluminação assim que emergiam do favo, e NUTRI_Col, indivíduos devolvidos à colônia por 24 horas antes dos testes. O protocolo experimental foi dividido em três fases: Fase1, forrageiras e Nutriz_BOD eram mantidos em condição constante de iluminação e temperatura durante 24 horas. Nutriz_Col era devolvida a colônia de origem durante esse mesmo intervalo; Fase2, exposição a ciclo claro/escuro 12:12h durante 48 horas; Fase3, todos os indivíduos voltavam às condições ambientais constantes. Em Fase2 e Fase3 foram feitas as medidas de consumo de O_2 .

Os resultados da Fase2 não mostraram arrastamento, período significativo do ritmo difere de 24h. A média de consumo na fotofase apresenta diferença significativa da média de consumo na escotofase, para o grupo das forrageiras e Nutri_Col, sendo o consumo maior na fotofase. Ritmos em livre curso foram encontrados em todas as forrageiras e em 25% das nutrízes de ambos os grupos.

Os resultados indicam a existência de um processo de maturação do sistema circadiano, bem como na capacidade de lidar com a luz, que representa uma situação desfavorável à sobrevivência das nutrízes. Como os dois grupos de nutrízes apresentaram ritmos endógenos, o surgimento deles independe da influência da colônia. A colônia, porém, parece modular a velocidade do estabelecimento do ritmo e sua capacidade de sincronizar-se com o ciclo claro/escuro ambiental.

Abstract

The workers of the stingless bee, *Melipona quadrifasciata*, assume different tasks during their adult life. Newly emerged individuals – nurses – remain inside the nest, without contact with the external environment. As the workers mature, they migrate to more peripheral regions but only the oldest – foragers – leave the nest. Foragers have strong daily rhythms. Biological rhythms have already been detected in all the workers, but only the rhythms of foragers are well characterized.

This work aimed to detect changes in temporal biological system during post-embryonic development. For this, the rhythm of oxygen consumption was measured and light/dark cycle was used as the synchronizing agent.

Oxygen consumption was monitored in foragers and in nurses 24 hours after the emergence. The nurses were divided into two groups: 1-Nutri_BOD: the bees were kept in constant conditions of temperature and illumination. 2- NUTRI_Col: newly emerged workers were transferred back to the colony for 24 hours before the experiment. The experimental protocol was divided into three parts: 1- Forager and Nutriz_BOD were kept in constant conditions of illumination and temperature for 24 hours. Nutriz_Col were returned to the colony during the same interval. 2- Animals were exposed to a light/dark cycle, 12:12h, for 48 hours. 3- All the bees returned to constant conditions, for 4 days. Measurements of O₂ consumption were taken during the second and third parts of the experiment.

There was not entrainment of the individual's rhythms. The period was different from 24h. In foragers and Nutri_Col there were significant differences between the average consumption in the photophase and the average consumption in the scotophase. A free running rhythm was present in all foragers and in 25% of Nutri_Col and Nutri_BOD.

Results indicate the existence of a process of maturation running in the circadian system, and an increasing ability to respond to light. Presence of light is a non-permissive condition for the nurses' survival. Endogenous rhythms are present in both groups of nurses. The presence of the colony is not necessary to the development of the rhythm. However, the colony seems to modulate the rate of to the development and the ability to synchronize with the light/dark cycle.

Introdução

1 - Sistema Biológico

1.1– Abelhas eussociais

O comportamento eussocial nos insetos surgiu convergentemente em duas ordens: Isoptera e Hymenoptera. Esse comportamento é caracterizado pela sobreposição de pelo menos duas gerações (Oster e Wilson, 1978) e traduzido na divisão de tarefas entre os indivíduos.

Nos himenópteros, todas as formigas, algumas abelhas (Apoidea) e apenas algumas espécies de vespas são eussociais (Wilson, 1971). Na superfamília Apoidea, somente a família Apidae (subfamílias Apinae, Meliponinae e Bombinae) é eussocial (Nogueira-Neto, 1997). Meliponinae divide-se em duas tribos: Trigonini e Meliponini, sendo as principais diferenças entre elas relacionadas à biologia reprodutiva e às características de arquitetura do ninho. A espécie estudada neste trabalho, *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia) pertence à tribo Meliponini, que se distribui ao longo da costa brasileira, da Paraíba ao Rio Grande do Sul (Moure e Kerr, 1950). *M. quadrifasciata* compreende duas subespécies, uma restrita a regiões mais altas e frias da Mata Atlântica (*M. quadrifasciata quadrifasciata*) e, outra, a regiões de temperatura mais elevada (*M. quadrifasciata anthidioides*).

1.2– Colmeia de Meliponini

Nas abelhas sociais, as colmeias são estruturas complexas, cujas funções primárias são: estocagem de alimento e proteção física, térmica e antimicrobiana (Nogueira-Neto, 1997). A arquitetura e composição do ninho permitem ainda a maximização dos contatos sociais (Hepburn, 1998; Franck *et al.*, 2004).

A maioria das espécies de Meliponini constrói seus ninhos no interior de troncos ou em ramos de árvores ou, ainda, no solo (Michener, 1974; Sakagami, 1982). As regiões principais de um ninho são mostradas na Figura 1.

Figura 1- Esquema de ninho de meliponíneos. Destaque para a estrutura em L da entrada, feita de batume e barro, que impede a entrada da luz no interior do ninho. Retirado de Nogueira-Neto (1997).

Em todos os Meliponini, a entrada do ninho é rodeada por estruturas raiadas feitas de batume (mistura de barro e própolis). A presença de cerume (mistura de cera e própolis) e de batume está intimamente relacionada com a manutenção da temperatura no interior do ninho (Wille, 1983). O invólucro é formado por cerume disposto em estruturas lamelares concêntricas, ao redor dos favos de cria. Aparentemente esse material retém o calor gerado pelo próprio ninho (Roubik, 2006).

Os favos de cria são protegidos, térmica e fisicamente, à medida que ficam afastados da parede e ligados às demais áreas por pequenas passagens de cerume (Bennett, 1831, *apud* Nogueira-Neto, 1997). A estrutura dessa região, quando comparada àquela das regiões de estocagem de alimento, é mais uniforme. Como fica localizada distante da entrada e é muito protegida, esta região fica em local completamente escuro (Jones *et al.*, 2004).

Externamente ao favo de cria e ao invólucro, são encontrados potses ovóides na área mais externa da colmeia. Nestes potses são armazenados pólen e mel separadamente.

1.3– Castas e determinação de tarefas

As abelhas se dividem em casta reprodutiva e casta não reprodutiva. A casta reprodutiva é representada pelas rainhas e rainhas virgens. Na colônia de *M. quadrifasciata*, encontra-se apenas uma rainha, sendo que existe apenas um relato de poliginia na espécie (Alves *et al.*, 2010). As rainhas, após a fecundação ocorrida no voo nupcial, apresentam abdômen cerca de duas vezes maior que o tamanho inicial (rainhas

fisogástricas), fato associado com a intensa postura de ovos férteis. Estes ovos darão origem a machos, rainhas virgens e fêmeas estéreis. O aprovisionamento das células em que os ovos são depositados é do tipo em massa, em que todo alimento necessário ao desenvolvimento do indivíduo é depositado na célula antes da postura da rainha (Sakagami *et al.*, 1963).

As fêmeas estéreis, ou operárias, são responsáveis pelos cuidados com a rainha e cria, bem como pela manutenção das diferentes tarefas relacionadas à colmeia.

A eficiência na execução das diferentes tarefas é dependente de diferenciação/especialização dos indivíduos em sua função. Em abelhas, a especialização nas suas funções é dependente do estado de desenvolvimento do indivíduo. Um mesmo indivíduo executará diferentes tarefas na colônia ao longo da sua ontogenia. O sistema de divisão é conhecido como “polietismo temporal” ou “polietismo etário”, que resulta na formação de grupos de operárias identificadas por sua função e idade: nutrizes, construtoras e forrageiras.

A ocorrência do polietismo etário nas operárias está relacionada a transformações dos seguintes fatores ao longo da ontogênese do indivíduo: 1- dos níveis séricos de neurotransmissores e neuroaminas, tais como dopamina, octopamina e serotonina. (Schulz *et al.*, 1999); 2- da estrutura de áreas cerebrais, como os *corpora pedunculata* (Withers *et al.*, 1993); 3- do padrão da expressão gênica em algumas regiões cerebrais (Calderone e Page, 1988; Toma *et al.*, 2000; Witfield *et al.*, 2006); 4- na atividade endócrina (Sullivan *et al.*, 2000), que inclui mudanças nas taxas de hormônio juvenil, bem como no padrão de atividade e inatividade de determinadas glândulas; e 5- do metabolismo do indivíduo, sendo que indivíduos mais velhos apresentam taxas metabólicas mais altas (Allen, 1958; Bloch *et al.*, 2004)

Operárias recém-nascidas – **nutrizes** – cuidam da manutenção e construção dos favos e invólucro (Cepeda, 2006). Suas tarefas incluem a construção, o aprovisionamento e a operculação das células de cria, que ocorrem em sincronismo com a postura realizada pela rainha. Este processo foi denominado “Provisioning and Operculution Process” (POP) (Sakagami *et al.*, 1963) e ocorre na região central do favo de cria.

Na idade intermediária, as operárias são “**construtoras**” e passam a transitar entre as regiões de células de cria e dos potes, aproximando-se mais da entrada à medida que envelhecem. São responsáveis pela limpeza do ninho, reconstruções do invólucro,

construção de potes e recepção do néctar. É nesta fase da vida que suas glândulas de cera estão mais ativas, a exemplo do que acontece em *Apis mellifera* (Seeley, 1989).

Posteriormente, passam a guardar a entrada da colônia e por último, tornam-se **forrageiras**, as operárias mais velhas. Como os ninhos são bem vedados à luz, acredita-se que o contato com o ciclo ambiental de claro e escuro seja restrito às guardas da entrada e às forrageiras.

Desta forma é possível associar a arquitetura da colmeia com a distribuição de tarefas e idade da operária. Também a migração da operária, ao longo de seu desenvolvimento, para as regiões periféricas do ninho faz com que ela experimente uma transição progressiva de um microclima homogêneo (escuro constante e pequenas variações de temperatura) no interior do ninho, para as variações do ambiente externo.

Embora a componente etária seja importante, ela não é o único fator determinante na divisão de trabalho em uma colmeia de abelhas. A divisão de tarefas é capaz de responder a necessidades da colônia, garantindo que as funções vitais continuem sendo realizadas. Em *A. mellifera*, quando uma colônia é privada de suas forrageiras, as nutrízes tornam-se forrageiras sete vezes mais cedo que a média de tempo esperado para essa tarefa garantindo, desta forma, o suprimento alimentar da colmeia (Winston e Fergusson, 1985; Robinson, 1992). A reversão comportamental também foi descrita na mesma espécie, com a retirada de nutrízes da região dos favos de cria. Nestas condições experimentais, algumas forrageiras marcadas foram vistas voltando a cuidar da estrutura interna do ninho e deixando de realizar voos de forrageamento (Robinson, 1992).

Com base nesta constatação, foi sugerido que uma operária seria capaz de exercer qualquer atividade do ninho, se necessário, independente de sua idade. Para que isto fosse possível, entretanto, seria preciso que todo o aparato fisiológico do animal, incluindo os sistemas glandular e nervoso, estivesse pronto para responder rapidamente às informações geradas pela necessidade da colônia e/ou informações ambientais.

2 - Ritmos biológicos

2.1– Importância dos ritmos biológicos

Com raras exceções, todos os ambientes na Terra apresentam ciclos. O dia e a noite, as estações do ano, as fases lunares, as variações de maré (diárias e mensais) e as eras geológicas são alguns poucos exemplos de ciclos ambientais. Como o ambiente não é estático e apresenta ciclos previsíveis, os organismos vivos adquiriram, ao longo de sua evolução, funções oscilatórias que conferem adaptação a tal ambiente. A expressão cíclica de um determinado fenômeno biológico é chamada ritmo biológico.

É de fundamental importância para a sobrevivência de uma espécie que determinadas funções e comportamentos manifestem-se em momentos em que a situação ambiental é mais adequada para sua expressão (Marques *et al.*, 2003). A presença de ritmos biológicos já foi descrita em inúmeras espécies com diferentes graus de complexidade estrutural (de bactérias a mamíferos), em diversos níveis de organização, desde células a populações inteiras (Pittendrigh, 1993; Marques N. *et al.*, 2003; Paranjpe e Sharma, 2005).

A geração do ritmo biológico, por sua vez, pode ser uma resposta direta a um estímulo ambiental cíclico, ou envolver um sistema de temporização inerente ao próprio organismo, conhecido como relógio biológico.

2.2– O que é um ritmo

Eventos cíclicos, tais como os ritmos biológicos, podem ser caracterizados como eventos ondulatórios. Abaixo defini-se alguns de seus parâmetros utilizados neste trabalho (Figura 2):

Período: duração do evento completo, ou duração do ciclo. O inverso do período, ou ‘frequência’, é o número de vezes que o evento se repete por unidade de tempo. A frequência mais utilizada neste trabalho é de cerca de 1 evento a cada 24 horas, conhecida também como frequência circadiana.

Fase: momento determinado de um ciclo ou momento de referência.

Amplitude: medida da magnitude da variação da expressão do ritmo. A amplitude é obtida pela diferença entre os valores máximos (ou mínimos) e o valor médio da curva.

Figura 2- Representação de um ritmo e suas principais composições. P: período do ritmo. A: amplitude (positiva) do ritmo. f: fase.

Além destes parâmetros, em cronobiologia, outros conceitos e definições foram especialmente desenvolvidos, como:

Ritmos ultradianos: ritmos de alta frequência, com períodos menores que 18h.

Ritmo circadiano: ritmo com períodos entre 18h e 25h.

Ritmo diário: ritmo com período de 24 horas.

Ciclo CE: ciclo de claro e escuro.

Escotofase: fase de escuro de um ciclo CE.

Fotofase: fase de claro de um ciclo CE

Outro conceito importante é aquele que relaciona o ritmo biológico a um determinado ciclo ambiental. A diferença temporal entre uma determinada fase do ritmo biológico e uma determinada fase do ciclo ambiental é conhecida como “ângulo de fase”.

2.3– Ritmos endógenos

Apresentar a capacidade de medir o tempo internamente permite ao organismo antecipar-se, passando por modificações prévias de sua fisiologia e comportamento, preparando-se para as variações cíclicas de seu meio ambiente (Hastings *et al.*, 1991).

Essa capacidade de antecipação é conhecida em organismos com vários níveis de organização e complexidade.

Algumas características distinguem um ritmo endógeno de outros fenômenos cíclicos, que representam uma resposta direta a estímulos externos regulares. São elas:

1- Persistência do ritmo em condições ambientais constantes (condições de livre curso). Na condição de livre curso, o ritmo expressa um período diferente de 24 horas exatas; este é o “período em livre curso”, representado pela letra grega τ (tau) (Aschoff, 1960).

2- Possibilidade do ritmo endógeno ser sincronizado por um ciclo ambiental – denominado “*zeitgeber*” (neologismo alemão que significa “doador de tempo”) – ao qual a espécie é sensível (Aschoff, 1960).

3- Compensação de τ a variações da temperatura ambiente, característica que permite a manutenção do período mesmo sob amplas variações da temperatura (Pittendrigh, 1954).

2.4– Condição de livre curso

Sob condição experimental no laboratório, as informações cíclicas do ambiente podem ser eliminadas, criando um ambiente de condições constantes. Apesar de teoricamente fácil, eliminar todas as informações cíclicas que possam ser de alguma forma percebidas pelo organismo em estudo pode ser bastante dificultoso. A presença diária do pesquisador; a alimentação dos animais; a emissão de sinais intermitentes, entre outros, são exemplos de fatores que podem gerar informações periódicas.

Condição constante não é um padrão encontrado na natureza. Animais que sobrevivem em ambientes extremos e aparentemente constantes (como cavernas) também recebem informações periódicas do ambiente (entrada e saída de morcegos da caverna, por exemplo). Assim sendo, algumas condições de livre curso podem resultar na não expressão do ritmo biológico, ou em uma expressão diferente da habitualmente observada. Situações como estas são conhecidas como “condições não permissivas”. As modificações do ritmo em condições não permissivas podem ser resultantes de uma desorganização no sistema circadiano (Pittendrigh, 1960). Além dos padrões rítmicos, a artificialidade da condição de livre curso pode provocar alterações de expressão de funções fisiológicas e comportamentais.

Apesar das complicações geradas pela manutenção de organismos vivos em condições constantes, a experimentação nestas condições é a única que se conhece até hoje para comprovar a endogenicidade de um ritmo. A precaução a ser tomada é procurar os níveis de manutenção das variáveis ambientais mais adequados ao sistema biológico em estudo.

2.4.1- Período do ritmo em livre curso (τ)

Muitos organismos mantêm expressões auto-sustentadas de um ritmo, mesmo quando em condições de livre curso. Essa manutenção é garantida por um sistema inato, e não é aprendido ou adquirido, sendo característico da espécie (Dunlap *et al.*, 2004). A geração deste ritmo endógeno é atribuída a mecanismos genéticos e moleculares, com alças complexas de retroalimentação, tanto positivas quanto negativas, e capacidade de modulação deste sistema como um todo (Dunlap *et al.*, 2004).

O ritmo em condições de livre curso tem período ligeiramente diferente daqueles exibidos em condições naturais, este período endógeno do ritmo é conhecido como τ (tau) (Pittendrigh, 1960). O valor de τ é característico da espécie, entretanto mostra variações intra-específicas e interindividuais (Daan e Pittendrigh, 1976). Essas variações intraindividuais são vistas nas características conhecidas como instabilidade de τ (variação diária e de τ) e na labilidade deste período (variação gerada quando a condição de livre curso é iniciada após uma fase de sincronização).

Muitos fatores podem determinar o valor de τ , tais como condição de iluminação, temperatura ambiental, histórico do desenvolvimento do animal e condição em que o animal se encontrava antes de iniciar as condições de livre curso (Dunlap *et al.*, 2004; Pittendrigh e Daan, 1976).

2.5– Mecanismos de sincronização

A sincronização do ritmo endógeno com um determinado ciclo ambiental é uma característica importante do ritmo biológico, uma vez que ela impõe ao organismo o ajuste temporal, fixando o ângulo de fase do ritmo e, em consequência, igualando τ ao período do ciclo dia/noite (Pittendrigh, 1960). Dois processos principais são descritos por representarem mecanismos sincronizadores distintos: arrastamento e o mascaramento.

2.5.1- Arrastamento

Arrastamento é um mecanismo sincronização de um ritmo biológico e tem características bastante particulares (Aschoff, 1960). O mecanismo do arrastamento está baseado nas características anatômicas do sistema circadiano e em suas propriedades funcionais. O sistema circadiano é composto por diversos osciladores (geradores do ritmo endógeno), suas aferências e eferências (Pittendrigh, 1960). Nos insetos, os osciladores centrais estão localizados nos lobos ópticos e no protocérebro (Saunders, 2002). Eles recebem aferências provenientes dos olhos compostos e emitem eferências, responsáveis pela transmissão da informação rítmica a outros órgãos e sistemas.

O arrastamento é possível pela percepção de um ciclo ambiental – *zeitgeber* – pelas aferências do sistema circadiano. Os *zeitgebers* podem ser tanto ciclos geofísicos quanto ciclos biológicos, como disponibilidade de alimento, interações interespecíficas e intraespecíficas ou ciclos sociais (Sharma e Chandrashekar, 2005). A importância de um determinado ciclo ambiental como agente de sincronização depende do ritmo observado e da espécie em questão. Diversos *zeitgebers* podem agir no arrastamento de um mesmo ritmo, obedecendo a uma hierarquia (Pittendrigh, 1981).

No mecanismo de arrastamento ocorrem “pós-efeitos”, componentes relacionados à variação de tempo existente entre a ação do oscilador e a expressão do ritmo (Figura 3). Pós-efeito é um reflexo de um processo de arrastamento anterior; é uma tendência à manutenção da relação de fase que ritmo apresentava com o *zeitgeber* (Pittendrigh, 1981). A ocorrência do pós-efeito não é obrigatória; depende das características do ritmo observado, das condições experimentais e das características do *zeitgeber* (Pittendrigh e Daan, 1976a). Também não há um padrão, inter ou intra específico, de duração do pós-efeito. Na mesma espécie, há indivíduos cujos ritmos passam de um estado arrastado para outro ou entram em livre curso, mais rapidamente que outros (Pittendrigh e Daan, 1976a).

Da mesma forma que o ritmo mostra instabilidade e tendência a manter o estado anterior quando passa de uma situação de arrastamento para outra, ou então, do arrastamento para livre curso (pós-efeitos), também na situação inversa (ou seja, do livre curso para arrastamento) pode não ser observado o arrastamento imediato. Neste caso, a expressão do ritmo continua em aparente livre curso, caracterizando a presença de “transientes” (Page, 1985) (Figura 3). A ocorrência de transientes não é obrigatória e

sua duração varia muito entre indivíduos, ou no mesmo indivíduo sujeito a situações ambientais diferentes.

Figura 3- Atividade de uma barata registrada durante 69 dias, sendo os 14 primeiros dias em condições de claro/escuro (fases como na barra superior à direita), os 27 dias seguintes em escuro constante e os 28 dias restantes novamente em claro/escuro (fases como na barra inferior à direita). Notar a instabilidade do ritmo nos primeiros dias em livre curso – **pós-efeito** (barra vermelha). Na segunda exposição ao ciclo CE, o ritmo leva muitos dias – **transientes** (barra azul) – até ser arrastado novamente. Modificado de Page (1985).

2.5.2- Mascaramento

Mascaramento é o processo de sincronização que ocorre por respostas diretas a um estímulo ambiental, modificando instantaneamente a expressão do ritmo, sem participação do relógio biológico (Aschoff, 1960). O mascaramento age diretamente sobre a expressão do ritmo e não se mantém nos dias subsequentes e nem produz antecipação, persistindo o ajuste de fase apenas enquanto houver a ação do fator ambiental mascarador (Aschoff, 1988). Qualquer fator ambiental, cíclico ou não, pode provocar mascaramento e a resposta é instantânea.

Segundo Aschoff (1988), o mascaramento pode ser classificado quanto seu efeito modulador sobre o padrão rítmico e/ou quanto à origem do agente mascarador.

Quanto ao efeito na modulação do ritmo, classifica-se como **mascaramento positivo** quando há um aumento na amplitude de expressão. Em contrapartida, se há o achatamento e/ou redução desta amplitude do ritmo, tem-se o **mascaramento negativo**.

De acordo com a origem do agente mascarador, classifica-se o mascaramento como externo ou interno. **Mascaramento externo** é provocado por fatores ambientais, bióticos ou abióticos (Page, 1989). **Mascaramento interno** é resultado da ação de eventos ou processos do próprio sistema biológico, e é decorrência da interação de diferentes ritmos interligados dentro de um mesmo organismo (Page, 1989; Rotenberg *et al.*, 2003)

O mascaramento é um processo importante na adaptação temporal porque confere plasticidade ao ritmo biológico (Page, 1989), fazendo com que o organismo responda rapidamente a uma mudança ambiental.

3 - Ritmos biológicos em abelhas

Memória temporal e orientação compensada no tempo pelo sol são características temporais presentes no comportamento de abelhas conhecidas desde o início do século XX. Ambas foram detectadas em *A. mellifera* e estão relacionadas com a atividade de forrageiras no campo; a primeira permite às abelhas voltar a uma fonte de alimento no momento em que a fonte está disponível ou os recursos alimentares estão no estado mais favorável para a coleta (Forel, 1900 *apud* Saunders, 2002). A orientação compensada no tempo pelo sol, por sua vez, garante o mapeamento espacial das fontes, o retorno a elas e a volta à colônia em momentos diferentes do dia, independentemente da mudança da posição do sol (Santschi, 1911 *apud* Saunders, 2002).

A endogenicidade desses ritmos foi demonstrada em muitas situações experimentais diferentes (descritas em Saunders, 2002). Estes ritmos foram detectados em colônias, mas Spangler (1972) e Moore e Rankin (1985) realizaram experimentos com forrageiras isoladas, registrando a atividade locomotora em condição de livre curso, que também é rítmica e endógena.

Quanto aos *zeitgebers*, diversos estudos subsequentes com ritmo de atividade individual de forrageiras ou total da colônia de *A. mellifera*, mostraram que os ciclos de claro/escuro (Moore e Rankin, 1993) e o de disponibilidade de alimento (Frisch e Aschoff, 1987) agem como agentes arrastadores. Moore e Rankin (1993) sugeriram uma possível interação entre os ciclos claro/escuro e de temperatura, que atuariam sinergicamente. Esta possibilidade foi comprovada mais tarde por Fuchikawa e Shimizu (2007), que promoveram o arrastamento do ritmo de atividade de forrageiras de *A. cerana*, empregando pulsos de calor (27 a 37°C).

Além do ciclo de disponibilidade de alimento, ciclos bióticos, como aquele representado por interações físicas entre as operárias e o de liberação de feromônios, constituem-se em eficientes *zeitgebers* sociais (Southwick e Moritz, 1987; Moritz e Kryger, 1994). Em 1994, Frisch e Koeniger demonstraram a coincidência de fases do ritmo de atividade das forrageiras em uma colônia é dada pelas interações entre os indivíduos e é totalmente perdida quando eles ficam isolados. Além do arrastamento social entre operárias, há também um arrastamento social promovido pela rainha. A introdução de uma rainha em um grupo de operárias isoladas da colônia promove um deslocamento da fase do ritmo metabólico das operárias, o que resulta na sincronização de todo o grupo (Moritz e Sakofski, 1991).

3.1– Ritmo de atividade de forrageiras

Na maior parte das espécies de abelhas, as saídas para forrageamento estão restritas à fotofase. Nesta fase, as forrageiras realizam voos para coleta de material (água, pólen, barro, néctar), segundo a necessidade da colônia.

Ainda na fotofase, quando no interior do ninho, as forrageiras podem ser vistas manipulando o pólen e realizando trofalaxia. Segundo Crailsheim e colaboradores (1996), excluindo o forrageamento e considerando só a atividade no interior do ninho de *A. mellifera*, as forrageiras também exibem diferenças significativas entre o padrão de atividade durante o dia e durante a noite, sendo maior a atividade diurna.

Em laboratório, as forrageiras também mantêm a atividade restrita à fotofase. Em condições constantes, a locomoção exibe padrão circadiano, seja voando ou andando (Moore & Rankin, 1993). Durante a escotofase, as forrageiras agrupam-se e movimentam-se pouco. Estudos eletrofisiológicos realizados por Kaiser e Steiner-Kaiser (1983) mostraram a existência de sono em abelhas. Estudos de comportamento

ajudaram a caracterização, detalhando diferentes aspectos: imobilidade, redução do tônus muscular dos apêndices, extensão da probóscide, movimentos descontínuos na parte posterior do corpo, queda de temperatura corpórea, queda da taxa metabólica, bem como redução da excitabilidade visual (Kaiser e Steine-Kaiser, 1983; Kaiser, 1988; Moore e Rankin, 1993; Klein *et al.*, 2008). Klein e colaboradores (2008) encontraram distintos padrões de sono nas nutrízes e nas forrageiras (Figura 4), sendo que nas nutrízes, não se identifica um padrão diário de sono, nem associação a uma das fases do dia.

Figura 4- Porcentagem de abelhas dormindo e/ou imóveis, durante observações a cada 30 min, por 72 h. Área delimitada pela caixa cinza indica noite. Figura retirada de Klein *et al.* (2008).

Na Figura 4, percebe-se uma diminuição do número de abelhas imóveis/dormindo que antecede o acender das luzes. Em mariposas, grupo em que o sono ainda não foi estudado, há um aumento nas taxas metabólicas de cerca de 70 vezes (com relação ao repouso) nas fases que antecedem o voo (Bartholomew *et al.*, 1981). É de se prever que também nas abelhas ocorra um aumento equivalente nas taxas metabólicas no pré-voo. Já foi observado que, no campo, o forrageamento de *M. quadrifasciata* inicia-se antes do nascer do sol (Abreu, 2011). Para que o organismo esteja pronto para a atividade, é possível que uma antecipação semelhante à que ocorre em mariposas aconteça nas forrageiras também. .

3.2– Ciclo Claro/Escuro como um importante agente arrastador em abelhas

O ciclo de claro e escuro é o *zeitgeber* mais conhecido e estudado em cronobiologia, sendo o mais importante para a maior parte das espécies estudadas. Abelhas não são exceção. A atividade de forrageamento é conhecidamente arrastada pelo ciclo claro/escuro, sendo a atividade restrita à fotofase nas espécies diurnas.

Em experimentos de arrastamento do ritmo circadiano de atividade locomotora em forrageira de *A. mellifera*, Moore e Rankin (1993) propuseram que o claro/escuro seria o *zeitgeber* principal para esse ritmo. Os experimentos foram feitos em ciclos CE, em que a fase de claro tinha comprimentos diferentes, sempre mantendo o período de 24 horas. Os autores comprovaram que o fim da atividade estava correlacionado com o apagar das luzes, em praticamente todas as composições de claro/escuro, inclusive quando a fotofase era excessivamente longa, 20 horas. Observaram que a atividade aumentava mais tardiamente na fotofase, quando esta era proporcionalmente maior que a escotofase; e abruptamente reduzida, quando a luz era apagada.

No mesmo trabalho, os autores propõem um papel para a luz (ou a falta dela) que não é amplamente discutido na literatura atual, que seria aquele de importante agente mascarador da atividade (Moore e Rankin, 1993). Arrastando ou mascarando, a luz e o ciclo de iluminação atuariam de forma fundamental num processo de sincronização do ritmo com o meio externo para o grupo de forrageiras, que apresentam um ritmo circadiano bastante robusto.

3.3– Cronobiologia de Meliponini

Estudos feitos com ritmos biológicos de Meliponini, embora menos numerosos que aqueles com Apini, indicam semelhanças entre os dois grupos (Marques e Yamashita, 2008).

A comprovação da existência de um relógio biológico em Meliponini veio com estudos de atividade das forrageiras de *Scaptotrigona aff. depilis* (Bellusci e Marques, 2001) e de *Frieseomelitta varia* (Almeida, 2004), que mostraram ritmos circadianos bastante pronunciados em ambas as espécies. A manutenção do τ do ritmo de atividade de *F. varia* a 28°C e a 38°C demonstraram sua compensação a variações de temperatura (Almeida, 2004).

Outros ritmos circadianos em Meliponini foram obtidos com registros do POP, de duas espécies de *Frieseomelitta*. Esse processo apresenta um componente circadiano, caracterizado pela variação diária do número de células em estágio de construção pelas operárias (Teixeira, 2006). A oviposição também mostrou oscilações circadianas, em estudos com colônias de *F. varia* e *F. doederleini* mantidas em condições constantes. Em *F. varia*, as oviposições ocorrem ao longo do dia, mas a amplitude varia num padrão rítmico e circadiano, enquanto em *F. doederleini*, as oviposições são agrupadas, ocorrendo em uma fase específica (Bellusci, 2003). Outro dado interessante é que apesar do ambiente interno do ninho ser considerado praticamente constante (escuro constante e pequenas variações de temperatura), a informação das condições do ambiente externo parece chegar, de alguma forma, ao interior da colônia (Bellusci, 2003).

A temperatura no interior do ninho, regulada comportamentalmente pelas operárias, também apresenta um ciclo diário. Em 2004, Almeida demonstrou que no ninho de *F. varia*, os ciclos de temperatura e de umidade relativa permanecem em antifase com os respectivos ciclos ambientais. No mesmo trabalho, a autora comprovou a importância do ciclo térmico ambiental como *zeitgeber* do ritmo de atividade de forrageiras.

4 - Padrão de consumo de Oxigênio como indicador indireto de ritmo de atividade.

A manutenção do balanço energético é um processo fundamental em todos os sistemas vivos, exigindo troca constante de energia com o meio. A energia nos animais é em geral fornecida na forma de energia química, com a quebra de ligações com grande potencial de transferência energética. Um dos compostos que apresenta potencial de transferência adequado é a molécula de ATP. Ela é rica em ligações fosfato e a hidrólise de uma destas ligações é responsável pelo balanço energético positivo no interior de uma célula, durante um processo chamado “respiração celular”. A formação de ATP nos animais ocorre, em geral, por vias de fosforilação oxidativa – respiração aeróbica. Em insetos, as demandas de energia são quase que completamente supridas por este tipo de respiração (Chown e Nicolson, 2004).

A fosforilação oxidativa é realizada nas cristas mitocondriais e envolve um complexo protéico chamado de “cadeia de transporte de elétrons”. Esta cadeia é responsável pela geração de um gradiente de prótons. O gradiente é formado pela transferência de elétrons entre moléculas, seguindo um potencial de oxirredução. A transferência gera o que é conhecido como “força elétron-motriz”. O oxigênio é o aceptor final desta etapa, sendo reduzido a OH^+ . Posteriormente, OH^+ se junta a um próton e forma H_2O . A retirada de prótons (H^+) gera uma diferença potencial entre o meio externo e interno à mitocôndria, que por sua vez gera a força motriz protônica. A força motriz protônica proporciona energia para o funcionamento da enzima responsável pela transformação de ADP em ATP. Desta forma o oxigênio é um componente indispensável na fosforilação oxidativa, garantindo a formação da força protônica. O oxigênio é obtido por meio de trocas gasosas com o meio ambiente externo, na forma de O_2 .

As trocas gasosas de insetos não dependem do sistema circulatório, ocorrendo diretamente por difusão, através do sistema traqueal. O sistema traqueal consiste numa rede de tubos, as traquéias, que são invaginações do tegumento. O diâmetro das traqueias diminui à medida que se ramificam, formando uma extensa rede que se distribui por todo o corpo do inseto. Os ramos mais delgados, as traquéolas, aderem às paredes das células de destino e o O_2 do ar que transportam é difundido até as mitocôndrias das células.

A difusão entre ar e célula, tal como acontece nos insetos, é cerca de 10^6 vezes mais rápida do que o processo nos vertebrados, em que a difusão ocorre entre a água (do sangue) e a célula (Klowden, 2007). A extensão do sistema traqueal e a difusão rápida do O_2 permitem aos insetos altas taxas metabólicas.

Em atividades com altos gastos de energia, (por conseguinte de ATP), alguns insetos realizam movimentos abdominais que mecanicamente expandem as traqueias. Essa expansão, como ocorre durante o voo do gafanhoto *Schistocerca gregaria*, pode aumentar o aporte de O_2 cerca de sete vezes (Klowden, 2007)

As diferenças de influxo de O_2 em um mesmo indivíduo são fáceis de serem compreendidas se lembrarmos de que cada padrão de atividade exige uma quantidade de energia diferente e, portanto, uma necessidade diferenciada de consumo de O_2 pela mitocôndria. Durante o voo, o metabolismo do inseto é cerca de 100 vezes maior que as outras demandas metabólicas, graças ao grande consumo da musculatura de voo. Quando às abelhas, com o envelhecimento, tornam-se forrageiras, mudam de uma

função no interior do ninho (que não exige voo) para uma função dependente de voo (forrageamento). Se o padrão de atividade muda com o tempo, tanto ao longo do envelhecimento quanto ao longo do dia, é esperado que a taxa de consumo de O₂ também apresente modificações temporais em seu padrão de consumo pelo animal.

4.1– Medidas de consumo de oxigênio e ritmicidade em Meliponíneos

Em *M. quadrifasciata*, Teixeira *et al.* (2011) detectaram a presença de um ritmo circadiano no consumo de oxigênio de operárias de diversas idades. Neste trabalho ficou demonstrado que componentes circadianos estão presentes nas operárias desde as primeiras 24 horas após a emergência do adulto, contrariando dados obtidos por Stussi (1972) em *A. mellifera*. O autor havia proposto que os ritmos circadianos deveriam amadurecer posteriormente e expressar-se apenas nas forrageiras. Em *M. quadrifasciata*, a expressão do componente circadiano do ritmo respiratório torna-se mais robusta à medida que o indivíduo envelhece (Teixeira *et al.*, 2011). É importante ressaltar que frequências ultradianas estão também presentes no ritmo de consumo de O₂. Entretanto, estas frequências vão perdendo potência espectral (em relação à frequência circadiana) com o envelhecimento do indivíduo. A variação na importância dos componentes dos ritmos (ultradiano ou circadiano) foi associada ao papel exercido pelo indivíduo na colônia e a ciclos sociais, como o ciclo de oviposição pela rainha (Teixeira *et al.*, 2011).

Objetivos e justificativa

Tendo em vista:

- 1- O robusto padrão diário e circadiano encontrado no ritmo de consumo de O₂ nas forrageiras de *M. quadrifasciata* (Teixeira *et al.*, 2011);
- 2- O padrão rítmico circadiano de consumo de O₂ (Teixeira *et al.*, 2011), porém não visualizado sob condições naturais nas nutrizes desta espécie;
- 3- A plasticidade na divisão de tarefas, que pode acelerar ou retardar a mudança de função de nutriz à forrageira, segundo a necessidade da colmeia;
- 4- O ciclo luminoso ser um conhecido agente arrastador dos ritmos de forrageiras e as nutrizes não terem acesso à informação luminosa no interior do ninho:

O objetivo deste trabalho foi detectar mudanças ontogenéticas no sistema temporal de abelhas operárias adultas da espécie *M. quadrifasciata*, que se traduziriam em:

- A- Diferentes capacidades de resposta a um estímulo luminoso.
- B- Diferentes expressões de τ , nas diferentes idades.
- C- Diferentes mecanismos e/ou capacidade de sincronização.

Para atingir tal intento, medidas de consumo de O₂ foram selecionadas como uma maneira de medir indiretamente o padrão de atividade de *M. quadrifasciata*. A medida de consumo de O₂ tem como vantagem permitir separar fases de imobilidade daquelas de repouso ou sono. Uma abelha imóvel pode apresentar altos índices metabólicos por conta de atividade endócrina e/ou muscular intensa, comportamento esse associado à manutenção da temperatura interna da colônia. Desta maneira, a respirometria apresenta-se como uma ferramenta bastante confiável na mensuração de padrões de ritmicidade.

Para identificar a diferença no mecanismo de sincronização foi adotado o protocolo de Page *et al.* (1997), no qual o sistema biológico é exposto à condição de arrastamento que se pretende testar e depois colocado em condição de livre curso. Caso tenha havido arrastamento, sua existência será marcada pela presença de pós-efeitos.

Caso seja mascaramento, o ritmo em livre curso não apresentará fases organizadas de acordo com o padrão exibido durante a condição de claro/escuro.

Materiais e métodos

1 - Sistema Biológico

Manutenção das Colônias

O presente estudo utilizou três colônias da espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides*, Lepeletier 1836 (Apidae, Meliponini), provindas da região de Campinas, São Paulo. As colônias foram mantidas em laboratório do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, no *campus* da Cidade Universitária, desde junho de 2007.

Cada colônia foi mantida em caixa de madeira, fechada por tampa de vidro. O vidro era recoberto por filtro vermelho (Letravision LV207, PAF – 7 Esselte[®]), o qual permite a passagem de luz com cerca de 680 nm de comprimento. A luz neste comprimento de onda não é visível para a maioria das espécies de abelhas (Menzel *et al.*, 1989), permitindo observações do interior do ninho sem interferência da luz branca.

As colônias abriam-se independentemente no ambiente externo através de um tubo plástico transparente (1,5 cm de diâmetro), que, ligado ao orifício de entrada da colônia, atravessava a janela do laboratório. Desta forma, as abelhas tinham livre acesso ao meio externo (Figura 5).

Figura 5- Fotos das colônias experimentais em laboratório. 5.1- Vista superior da parte interna da colônia. A- Invólucro (recobre a região central do ninho). B- Região dos potes de alimentos. 5.2- Tubo de saída. C- Porção do tubo de saída entre a colônia (coberta pela folha de jornal) e a saída para o meio externo, marcada pelo triângulo branco. 5.3- Vista superior de parte do favo de cria, envolta parcialmente pelo invólucro. D- Favo de cria.

Suplementação alimentar era fornecida às colônias quinzenalmente e consistia em sacarose 50% e pólen de florada silvestre pulverizado, inserida no interior das colônias experimentais, na região dos potes de alimento. O pólen, proveniente de colmeia de *A. mellifera*, garante fonte protéica e é vendido comercialmente.

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados na primavera /verão de 2010 e 2011.

2 - Seleção dos grupos experimentais

Neste trabalho foram selecionados dois grupos específicos de operárias – forrageiras e nutrízes – selecionadas de acordo com a idade e com a atividade desempenhada na colônia.

2.1- Forrageiras

As forrageiras foram coletadas, entre 06h30min e 07h30min, quando chegavam à colônia transportando pólen nas corbículas. O horário da coleta foi determinado por experimentos piloto, nos quais se verificou uma maior quantidade de abelhas retornando à colônia com pólen neste intervalo do dia.

A idade do animal não pode ser utilizada como critério para recaptura de forrageiras. Muitas vezes, abelhas de mesma idade não eram vistas realizando a mesma tarefa na colônia, não sendo bem definido o intervalo de idade no qual ocorreu a troca de função. Havia também dificuldade de recaptura de abelhas marcadas (portanto com idade determinada), sendo o que o número de abelhas marcadas recapturadas (independente de sua função na colônia) era inferior ao necessário para a experimentação. Foram coletadas cinco abelhas deste grupo por colônia e utilizadas três abelhas/colônia/experimento.

2.2- Nutrízes

2.2.1- Captura e manutenção das nutrízes

As nutrízes foram obtidas diretamente de favos de cria mantidos sob condições ambientais controladas. Para tanto, um favo de cria foi retirado de cada colônia e

colocado em placa de Petri de vidro (16 cm de diâmetro), coberta por dupla camada de filtro vermelho e mantida em estufa a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a manutenção da umidade adequada, bem como para evitar o ataque de formigas, a placa de Petri era mantida sobre um recipiente contendo água.

Junto ao favo eram colocadas de três a cinco abelhas jovens, que auxiliam no processo de emergência e cuidam do favo. Essas abelhas foram marcadas para diferenciá-las daquelas que emergiam na placa.

Para a nutrição das abelhas foi fornecido um algodão embebido com cerca de 4 ml de solução de sacarose 50%, bem como pólen de *A. mellifera* triturado. O fornecimento de alimento e lavagem da placa de Petri foi feito diariamente.

Os processos de limpeza e marcação das abelhas foram feitos em horários distintos, sob iluminação vermelha, para evitar uma possível informação cíclica ao animal.

2.2.2- Marcação individual das nutrízes

No momento da manutenção do favo, o indivíduo recém-emergido ($\leq 24\text{h}$) era identificado por sexo sob estéreo-microscópio, de acordo com critérios de Camargo *et al.* (1967).

Somente as operárias recebiam placa numerada (Opalithplattchen[®]) no protórax (Figura 6). Das abelhas marcadas, 40% eram devolvidas à colônia de origem para posterior recaptura (vide item 5.1).

Figura 6- Marcação das abelhas nutrízes. 6.1- Aplicação da cola entre as asas. 6.2- Abelha marcada no protórax.

3 - Respirometria

Respirometria é um método indireto de medir troca de energia entre o animal e o ambiente, por meio da respiração. Essa técnica permite a medição da intensidade do metabolismo energético aeróbico por unidade de tempo (taxa metabólica).

Neste trabalho, a respirometria foi utilizada por apresentar vantagens sobre os métodos usuais de registro de locomoção, pois permite separar fases de imobilidade daquelas de repouso ou sono. Uma abelha imóvel pode apresentar altos índices metabólicos por conta de atividade endócrina e/ou muscular intensa (Heinrich, 1972).

Em *M. quadrifasciata* observam-se indivíduos que permanecem numa mesma posição, realizando movimentos intensos das asas. Este comportamento não é detectado pela maioria dos actógrafos (equipamentos registradores de atividade), mas é exibido frequentemente pelas operárias e está associado à regulação térmica da colônia.

Sob este panorama, as medidas de respirometria apresentaram-se como ferramentas mais adequadas para responder as perguntas deste trabalho.

3.1- Acondicionamento dos animais – Câmaras metabólicas ou respirométricas

Foram utilizadas câmaras acrílicas cilíndricas (volume 130 ml) (Figura 7). A câmara era revestida internamente por um pedaço de tela plástica (“tela mosquiteira”). O uso da tela foi a solução encontrada para evitar que as abelhas escorregassem sobre o acrílico úmido, o que fazia reduzir sua sobrevivência.

Figura 7- Câmaras utilizadas nos experimento. 7.1- Sem a tela plástica. 7.2- Com revestimento interno de tela plástica.

As câmaras e suas vedações foram testadas em recipientes com água, antes de cada experimento, sendo possíveis vazamentos fechados com cola para acrílico. Esse

procedimento era feito pelo menos 48 horas antes da introdução da abelha na câmara para evitar possíveis efeitos de componentes voláteis da cola.

Cada câmara acomodava somente um indivíduo. Para o fornecimento de alimento e manutenção da umidade, foi colocado um algodão estéril embebido com 4 ml de solução 50% de sacarose autoclavada. Essa fonte de alimento era mantida durante todo o experimento, não havendo trocas.

3.2- Técnica de respirometria intermitente

O tipo de respirometria adotada foi a respirometria intermitente, que é adequada para medidas em animais pequenos e com baixo consumo de oxigênio (Chauí-Berlinck e Bicudo, 2006).

Essa técnica combina procedimentos de respirometria aberta e fechada, em que o fluxo de ar não é contínuo e ocorre em intervalos pré-determinados. Esses tempos foram obtidos em experimentos piloto, nos quais se testou o tempo mínimo necessário para que a câmara fosse adequadamente lavada, retornando à linha de base após a queda de sinal. Os fluxos e tempos de fechamento das câmaras utilizados neste trabalho estão na Tabela 1.

Tabela 1- Tempos de abertura e fechamento do fluxo de ar, por grupo etário.

Grupo etário	Tempo de abertura (min)	Tempo de fechamento (min)	Fluxo de lavagem (ml/min)	Nº indivíduos amostrados/colônia
Nutriz	25	200	150	8
Forrageira	10	20	300	3

Previamente à realização das medidas é necessário estabelecer uma linha de base, que informa ao equipamento a pressão parcial de oxigênio (PPO_2) no ar do interior da câmara. Neste trabalho foi adotada a pressão encontrada normalmente na atmosfera ($PPO_2=20,95\%$).

Na fase aberta, iguala-se a PPO_2 do interior da câmara metabólica com aquela do ambiente, obtendo a linha de base para a câmara.

Na fase fechada, interrompe-se o fluxo de ar por um determinado intervalo de tempo (Tabela 1). Durante esta fase, o oxigênio da câmara é consumido pelo animal e há produção de gás carbônico, alterando as proporções relativas dos gases. Retorna-se à

fase aberta, com a volta do bombeamento de um fluxo de ar determinado, “lavando” o ambiente interno da câmara.

Em seguida, o ar que emerge da câmara é submetido a um desidratante (sulfato de cálcio anidro), a um absorvedor de CO₂ e novamente ao agente desidratante. Neste trabalho, a absorção de CO₂ foi feita com Ascarite II Sigma®, (hidróxido de sódio revestido com sílica, granulidade II). Após a completa absorção de gás carbônico e água, o ar emergente passa ao sensor do aparelho (Figura 8), registrando o consumo de oxigênio no momento da retomada do fluxo de ar controlado.

Figura 8- Diagrama do sistema de respirometria, (modificado de Kawamoto, 2011). 8.1- Bomba de ar, responsável pela injeção de ar no sistema. 8.2- Controlador de fluxo de massa de ar (Omega®, modelo 9106HCO90069/2). 8.3- Multiplexer Sable System® permite abertura e fechamento automatizados de cada câmara de forma sequencial. 8.4- Câmara respirométrica, que era mantida sob temperatura constante e iluminação controlada. 8.5- Conjunto de absorvedores de água e de gás carbônico. 8.6- Sensor de oxigênio. 8.7- Computador receptor da saída analógica. Os dados foram descodificados com o programa Expedata Sable System®. Setas indicam o sentido do fluxo do ar.

O sensor utilizado neste trabalho foi FC_1B Oxygen Analyzer (Sable Systems®). As análises neste equipamento ocorrem por oxidação de uma célula de zircônio, que, liberando elétrons no processo, gera uma corrente linearmente proporcional à pressão parcial de O₂. Este tipo de analisador permite (segundo o manual do equipamento) atingir a precisão de 0,001%.

O resultado apresentado é uma curva de diminuição da PPO₂ contido na mistura de gases oriundos da câmara (Figura 9), até a recuperação dos níveis atmosféricos da concentração de O₂ (~21%) no interior da câmara. O cálculo da PPO₂ é feito a partir do valor da integral correspondente à área entre o nadir da curva e a linha de base, utilizando o programa ExpeData[®] da Sable Systems[®].

Figura 9- Exemplo de registro de variação de PPO₂. Câmara 1; tempo de fluxo de ar (tempo de registro) de 0 a 10min. 9.1- Linha de base com concentração de oxigênio igual ao ambiente. 9.2- Subsequente queda na PPO₂ (% O₂), provocada pelo consumo do gás pelo animal. 9.3- Retorno à linha de base. 9.4- A linha tracejada representa o nível mais baixo na PPO₂ (nadir da curva). O cálculo da integral foi feito pelo programa ExpeData[®], utilizando todo o tempo de registro para cada câmara.

O cálculo do oxigênio consumido foi feito pela equação abaixo:

$$VO_2 \text{ CONSUMIDO} = \left| \int PPO_2 \right| \cdot F \cdot M^{-1} \cdot \Delta T^{-1}$$

$VO_2 \text{ CONSUMIDO}$ = o volume de oxigênio consumido (ml do gás.g⁻¹.hora⁻¹)

$\left| \int PPO_2 \right|$ = módulo da integral do sinal obtido em relação à linha de base (%)

F = fluxo de ar utilizado (ml. hora⁻¹)

M = massa fresca das abelhas (g)

ΔT = intervalo de tempo em que as câmaras permanecem fechadas (hora)

4 - Desenho experimental cronobiológico

No estabelecimento das condições ambientais necessárias para a manutenção das abelhas foram usados ciclo claro/escuro (CE) e escuro constante. O escuro em ambas condições consistiu em luz vermelha (escuro para as abelhas) de 650nm. O experimento foi dividido em três fases:

Fase1 – Compreende etapas cumpridas antes das medidas de respirometria. São as primeiras 24 horas após emergência (nutrizes) ou recaptura do animal (forrageiras). Condição utilizada: retorno à colônia ou isolamento do animal em câmara metabólica.

Fase2 – Primeiras 48 horas após o início da respirometria. Condição ambiental: temperatura constante, ciclo CE 12/12h.

Fase3 – 48 a 144 horas após início da respirometria. Condição ambiental: temperatura constante, escuro constante.

4.1- Fase1: primeiras 24 horas anteriores aos experimentos de respirometria – tratamento dos animais experimentais

As primeiras 24 horas anteriores à realização das medidas de respirometria são parte importante deste trabalho e constituíram uma adequação do protocolo cronobiológico para lidar com componentes de sistemas sincronizados – pós-efeito e mascaramento.

Outra etapa relevante desta primeira fase foi a definição de dois subgrupos experimentais dentro do grupo das nutrizes. Nestes subgrupos foi testada a interferência do contato prévio do indivíduo com a colônia e sua possível influência na expressão do ritmo endógeno.

4.1.1- Nutrizes

4.1.1.a–Nutrizes mantidas em estufa incubadora (B.O.D) – Nutri_BOD

Oito indivíduos emergidos em placa de Petri eram marcados e pesados. Em seguida, eram transferidos para câmaras respirométricas individuais.

As câmaras permaneciam em estufa incubadora sob temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, mantidas 24h sob iluminação vermelha constante (Figura 10).

Figura 10- Estufa incubadora. As câmaras metabólicas ficam acondicionadas no interior desta estrutura, sob temperatura e iluminação controlada.

A luz vermelha foi obtida com a utilização de lâmpadas dicróicas de “led” (do inglês “light emitting diode”) brancas cobertas por tripla camada de filtro vermelho. Esta forma de iluminação não provocou desvios significantes da temperatura. As lâmpadas ficavam em posições equidistantes no interior da estufa, proporcionando iluminação homogênea de intensidade 1000 lux.

É importante salientar que os tubos que conectavam o interior da câmara e o meio externo eram curtos (menor que 5 cm), evitando a formação de “espaços respiratórios mortos”, nos quais não há uma troca controlada de gases entre meio externo e interno, possivelmente gerando um espaço hipercapnêico e/ou hipóxico.

4.1.2.b–Nutrizes devolvidas à colônia de origem - Nutri_Col

Neste grupo, 12 das abelhas nutrizes que emergiam nas placas de Petri eram marcadas e pesadas, em seguida devolvidas à colônia da qual havia sido retirado o favo de cria.

Após 24h ($\pm$ 2h) de permanência em sua colônia de origem, as abelhas eram recapturadas, pesadas e transferidas para câmaras respirométricas individuais. Em seguida, era a Fase2 dos experimentos (início da respirometria).

4.1.2- Forrageiras

Neste grupo, após coleta dos indivíduos, os animais eram pesados e mantidos individualizados em câmaras de respirometria e transferidos para a estufa incubadora sob temperatura de $25 \pm 0,5$ °C e iluminação vermelha constante.

4.2- Fase2: primeiras 48 horas após o início da respirometria – condição ambiental

Depois das condições descritas no item 3.1, todas as abelhas eram pesadas novamente (pesagem 2), sob luz vermelha e recolocadas em suas câmaras metabólicas, na estufa incubadora ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). As câmaras eram conectadas ao equipamento e a respirometria iniciada.

Nesta fase, que corresponde as primeiras 48h de respirometria, foi estabelecido um ciclo de iluminação, claro/escuro 12:12h (CE 12:12). A fase clara tinha início às 06:00h, criada por duas lâmpadas brancas de “led”. Cada lâmpada era coberta por duas camadas de papel manteiga, que funciona como filtro de densidade neutra, atenuando a incidência de luz branca sobre os animais (intensidade luminosa = 1000 lux). Na fase escura, as abelhas eram mantidas sob iluminação vermelha, com mesma intensidade luminosa.

A primeira medida respirométrica de cada câmara foi desconsiderada por não apresentar o tempo de fechamento padronizado.

4.3- Fase3: de 48 a 144 horas após o início da respirometria

Nesta fase, a temperatura continuava no mesmo padrão constante ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), mas o ciclo CE 12:12 foi descontinuado e a condição de iluminação era de escuro constante (iluminação vermelha), desta forma os animais foram colocados em condição de livre curso. O protocolo de respirometria foi mantido inalterado.

Todos os grupos experimentais, independente do tratamento recebido na Fase1, foram submetidos às mesmas condições nas Fases2 e 3.

5 - Análises dos dados

5.1- Análise visual do perfil obtido na variação PPO₂ ExpeData®

Os dados da variação da PPO₂, obtidos em gráfico pelo ExpeData[®], referem-se a todos os animais amostrados, no mesmo intervalo de tempo (6 dias), para as duas fases experimentais (Fase2 e Fase3). Desta forma, não há um gráfico de ΔPPO_2 por indivíduo, mas sim um gráfico para cada grupo etário por colônia.

A observação visual perfil de ΔPPO_2 ao longo do tempo experimental gera, mesmo que não diretamente, informações relevantes quanto à ritmicidade e sincronismo do consumo de oxigênio dos indivíduos amostrados. Isto porque, se houver comportamento rítmico aliado à sincronização entre os diferentes indivíduos amostrados juntos, haverá definição de fases de maior amplitude de ΔPPO_2 , e provavelmente do consumo de O_2 . Essas fases estarão equidistantes entre si e intercaladas por fase de menor ΔPPO_2 , e definirão um padrão periódico.

Caso não haja sincronismo neste comportamento rítmico, ou mesmo não haja ritmo, não será possível ver fases definidas de maior ou menor amplitude de ΔPPO_2 .

5.2- Médias de consumo e comparação entre os grupos experimentais

Dos resultados do cálculo de consumo de oxigênio (VO_2 CONSUMIDO) separou-se os valores por grupo etário, e posteriormente por fase experimental (Fase2 ou Fase3). Na Fase2, os dados ainda foram divididos em consumo na fase clara ou consumo na fase escura. Destes grupos de consumo, foram calculadas as médias e variâncias no programa Excel (Microsoft®). Nos valores assim obtidos, foi testada a significância da diferença entre os grupos, utilizando-se o teste t de Student, (nível de significância = 0,05). Eventuais diferenças indicariam:

1- Fase preferencial de maior ou menor consumo (caso as médias diferissem significativamente entre as fases clara e escura, num mesmo grupo etário). Isso indicaria indiretamente sincronismo de consumo entre os animais.

2- Médias de consumo diferente entre os grupos, indicando taxas metabólicas distintas; seja pela diferença da idade (Forrageira x Nutriz), ou pelo contato prévio com a colônia (Nutrizes_COL x Nutrizes_B.O.D).

5.3- Detecção de frequências pela Transformada rápida de Fourier

A Transformada Rápida de Fourier (TRF) é uma técnica frequentemente utilizada em diversas áreas do conhecimento para análise de ondas periódicas. A TRF permite a decomposição destas ondas em suas componentes de diferentes frequências.

A aplicação desta metodologia é possível, pois os ritmos biológicos podem ser entendidos fisicamente como ondas, apresentando, portanto, as mesmas características, tais como periodicidade e amplitude (Sebrian, 2011). Entretanto, os ritmos biológicos podem ser desafiadores na visualização de períodos relevantes, já que são compostos

por diversas somas de senos, cossenos e seus harmônicos (Feynman *et al.*, 1970). A TRF, entretanto parece resolver satisfatoriamente problemas de natureza semelhante, em outras áreas do conhecimento (Figura 11).

Figura 11- Aplicação da TRF para análise de uma onda composta por três frequências distintas. 11.1- Visualização do perfil rítmico gerado por somatória de ondas senoidais. 11.2- Decomposição da onda em suas frequências (cada cor representa uma frequência diferente). 11.3- Apresentação do resultado obtido. “Poder” = amplitude espectral do sinal.

Neste trabalho, a TRF foi aplicada para cada indivíduo, separadamente para as Fase2 (CE) e 3 (EE). Os cálculos foram realizados, utilizando o programa MATLAB 7.5.0® (função nfft; The Mathworks Inc., Natica).

Os gráficos construídos relacionam a frequência (eixo x) ao poder (eixo y), sendo que a frequência de maior amplitude, dada em Hz, foi multiplicada por 86.400, a fim de que fosse obtida na unidade ciclos/dia, segundo a metodologia utilizada por Sebrían (2011).

Assim sendo, detecção na TRF de frequências próximas a 1 ciclo de 24 h foram consideradas como indicativas de presença de ritmos diários e/ou circadianos.

5.4- Detecção de períodos relevantes por Periodogramas

Para identificar periodicidades relevantes nas séries temporais obtidas utilizou-se o método de periodograma de qui-quadrado (ou periodograma de Enright, 1965).

O periodograma é uma estimativa da densidade espectral de um sinal e é frequentemente calculado a partir de uma sequência finita de dados gerados pela transformada rápida de Fourier (TRF). Em última análise, este método permite identificar periodicidades relevantes, à medida que estima a frequência de um processo, bem como sua probabilidade. Os cálculos foram realizados, utilizando o programa MATLAB 7.5.0[®] (The Mathworks Inc., Natica).

Os resultados foram representados em gráfico, no qual cada valor de período (eixo x) é associado a um valor de poder (amplitude do espectro do sinal). Em linhas gerais, o valor de poder é um indicativo relativo da robustez do período.

O valor de poder é calculado pela soma dos quadrados dos coeficientes obtidos pela distribuição dos coeficientes de Fourier, para cada período obtido, multiplicada por $N/2$ (N =comprimento da série temporal).

O teste de significância é embasado em uma distribuição de qui-quadrado, com intervalo de confiança de 0,95; dois graus de liberdade (representada no gráfico pela linha vermelha).

5.5- “Respirogramas” como método visual de análise de ritmo

Os “respirogramas” apresentados neste trabalho são modificações de representações de dados em cronobiologia conhecidas como actogramas.

Actogramas consistem em representações gráficas de uma série temporal em coordenadas cartesianas.

Para obter um actograma, plotam-se os dados de tempo na abscissa e a variável em estudo é plotada na ordenada. As variáveis estudadas são bastante diversas, sendo a mais comum o ciclo de atividade/inatividade. É comum a apresentação destes gráficos com dados duplicados (“double-plot” ou duplo gráfico) que facilita a visualização das transições entre os dias (Figura 12).

Figura 12- Obtenção de um actograma de um roedor. O movimento do animal na roda de atividade gera um sinal marcado no sistema de registro contínuo ou digital. A movimentação é associada a um horário de coleta, no decorrer das 24 horas. Os registros de dias consecutivos geram um grande gráfico que é então recortado a cada 24 horas (1 unidade). As unidades são empilhadas sequencialmente, sendo que cada linha em y corresponde a 1 unidade. O perfil destes sinais no decorrer dos dias informa a condição do ritmo: arrastado, em livre curso ou arrítmico; permitindo sua avaliação (modificado de Moore-Ede, *et al.*, 1982)

Da mesma forma que os actogramas, os respirogramas aqui apresentados permitem visualização da variação de dispersão e amplitude relativas dos dados, ao longo do tempo. Para a obtenção dos respirogramas, os dados de consumo de oxigênio foram introduzidos como séries temporais no programa “El temps”, versão 1 (Díez Noguera, 1999). A escala dos dados foi ajustada a intervalo paramétrico, contendo 75% dos dados (foram excluídos 12,5% dos valores mais altos e 12,5% dos valores mais baixos), tal como representado na Figura 13. A retirada dos pontos extremos da curva é importante por ajustar as escalas dos gráficos, evitando o achatamento dos dados.

Figura 13- Esquema representando consumo de oxigênio ao longo do tempo experimental. As linhas tracejadas representam a delimitação do intervalo paramétrico de 75%, utilizada na plotagem dos respirogramas.

Resultados

1 - Problemas amostrais

O número de forrageiras amostrado não foi igual ao de nutrízes (forrageiras = 9 indivíduos; Nutri_BOD e Nutri_Col = 12 indivíduos/cada). As razões foram as características metabólicas das forrageiras, bem como limitações técnicas. Devido ao alto consumo de O₂ das forrageiras, o tempo que resistem ao fechamento do fluxo de ar é cerca de sete vezes menor que para as nutrízes.

O equipamento de respirometria funciona acoplado a um sistema automático, que permite que apenas uma câmara fique aberta enquanto acontece a leitura, as demais câmaras permanecem sem fluxo de ar. Desta maneira, para evitar que os animais entrassem em hipóxia e garantir que todo o ar da câmara metabólica fosse trocado, a opção foi amostrar um número menor de animais.

Das nove forrageiras amostradas, foram descartados os dados de duas. Durante as medidas destas forrageiras, houve problemas em uma das válvulas do equipamento, que só foram percebidos durante a análise de dados. Na série de resultados destes animais, foram observados padrões negativos de consumo, uma situação sem sentido biológico.

Outro fator limitante foi a impossibilidade de determinar a idade exata das forrageiras capturadas. Indivíduos de idades distintas podem apresentar variações no perfil de significância das frequências de consumo de oxigênio. Entretanto, como o forrageamento exibe um ritmo diário robusto em abelhas, espera-se que frequências no intervalo circadiano sempre estejam presentes.

2 - Observações dos efeitos das 24h anteriores à respirometria (Fase1) sobre os diferentes grupos experimentais

2.1- Taxa de mortalidade

A Fase1 consistiu nas primeiras 24 horas anteriores ao início da respirometria. Forrageiras e o grupo Nutriz_BOD eram mantidos sob condições constantes, em

câmaras metabólicas. O efeito do isolamento dos indivíduos nas câmaras foi diferente nos dois grupos.

Esses efeitos se traduziram em diferentes taxas de mortalidade verificadas nas primeiras 24 horas de isolamento. Forrageiras apresentaram cerca de 17% de taxa de mortalidade, contrastando com os cerca de 32% das Nutrizes_BOD.

Não foi feito o cálculo de mortalidade para o grupo Nutriz_COL nesta fase experimental. Isso porque a taxa de recaptura dos indivíduos devolvidos à colônia era baixa (cerca de 30%) e a baixa eficiência pode ser explicada por diversos fatores, tais como:

- 1- dificuldade de visualização da marcação sob luz vermelha;
- 2- existência de abrigos dentro da própria estrutura do ninho;
- 3- perda dos números de identificação do indivíduo;
- 4- não reconhecimento, pelos demais, dos indivíduos devolvidos à colônia mãe, gerando a rejeição e morte das nutrízes marcadas.

2.2- Aumento de massa corpórea nas primeiras 24 horas

O ganho de massa durante a Fase1 do experimento também foi diferente entre os grupos experimentais. As forrageiras apresentaram um aumento de 8,5% da massa, enquanto as Nutrizes_BOD aumentaram em 3,4%. As Nutrízes_Col, por sua vez, apresentaram um ganho de massa cerca de oito vezes maior, após serem recapturadas da colônia original, com cerca 26% de aumento de peso.

2.3- Comportamento no interior da câmara

As forrageiras apresentavam-se mais ativas, andando pela tela plástica, movimentando as asas e ensaiando voos curtos, em raras ocasiões. As nutrízes, por outro lado, permaneciam paradas ou locomoviam-se lentamente pela tela plástica, realizando limpeza de antenas e pernas na maior parte do tempo.

O padrão de comportamento observado diferia somente entre as faixas etárias, não sendo visíveis diferenças entre as nutrízes mantidas em BOD e aquelas devolvidas para a colônia. Em nenhum dos grupos abelhas foram vistas sobre o fundo da câmara, região que não era recoberta pela grade plástica.

3 - Análise visual do perfil obtido na variação da pressão parcial de oxigênio (ΔPPO_2)

A Figura 14 contém exemplos representativos dos gráficos obtidos pelo Expedata[®] para as três colônias. Foi gerado, para cada colônia e para cada grupo etário, um gráfico de variação da pressão parcial de oxigênio (ΔPPO_2) (Figura 14.1). Assim, cada um dos gráficos de forrageiras é composto de ciclos de medidas sequenciais de 3 câmaras, (câmara 1, câmara 2, câmara 3/ câmara 1, câmara 2, câmara 3/ etc). Para as nutrízes, o gráfico é obtido de forma semelhante (Figura 14.2), entretanto, medidas de oito câmaras são sequenciadas, sem diferenciação entre os grupos Nutri_BOD ou Nutri_Col.

A mesma escala de variação na porcentagem de O_2 detectada em forrageiras e em nutrízes, não indica média de consumo semelhante nos dois grupos. Isto porque nos gráficos não são considerados os intervalos de tempo de fechamento de fluxo de ar, nem de fluxo de lavagem, que são diferentes entre forrageiras e nutrízes (vide equação de cálculo de consumo e Tabela 1).

Embora os gráficos de ΔPPO_2 não possam ser utilizados para comparação de consumo entre os grupos; foi possível obter informações sobre ritmicidade e sincronismo em ΔPPO_2 . A emergência do ritmo de ΔPPO_2 indica a existência de sincronismo entre os animais amostrados, provavelmente provocado pelo pulso representado pela mudança de condições de acondicionamento previamente às medidas.

A Figura 14.1, mostra nas forrageiras um ritmo de ΔPPO_2 determinado pela alternância de fases de maior e menor amplitude de variação de pressão. Na fase de maior amplitude de ΔPPO_2 , há uma variação média de 0,5% na concentração do gás (tempo de fechamento: 20min). Há uma tendência de redução da média de ΔPPO_2 com o passar do tempo, acompanhada de um incremento das fases de maior amplitude, em detrimento das fases de menor amplitude de ΔPPO_2 .

Durante a fase de menor amplitude de ΔPPO_2 , não foi possível diferenciar a modificação causada pelo consumo do animal, das pequenas variações que ocorrem normalmente no ar atmosférico, visualizadas na linha de base.

A não diferenciação de ΔPPO_2 é resultado da redução acentuada do consumo da forrageira durante essa fase do ciclo; para a realização de medidas metabólicas seria necessário o aumento do tempo de interrupção do fluxo de O_2 . Entretanto, neste

trabalho, o tempo de fechamento foi constante ao longo de toda a medida de respirometria. A manutenção do tempo de fechamento foi importante para a uniformização da medida, o que permitiu a comparação da diferença periódica que ocorre no consumo de O_2 , utilizando o perfil de ΔPPO_2 , dentro do grupo das forrageiras.

Nas nutrizes, não é possível visualizar padrão rítmico no perfil de ΔPPO_2 (Figura 14.2), o que não comprova que o ritmo não exista. Isto porque, mesmo que haja ritmicidade, sem sincronização dos indivíduos amostrados perde-se a possibilidade de visualização da informação rítmica. Os ritmos poderiam estar com fases deslocadas ou mesmo, em antifase, se fossem observados individualmente. Entretanto apenas a visualização dos dados, tal como são apresentados na figura, não permite a verificação desta possibilidade.

A média de ΔPPO_2 para as nutrizes foi de 0,2%, sendo o tempo de fechamento 200min. Essa média mostrou tendência a aumentar com a progressão dos dias, indicando um aumento do consumo.

Figura 14- Exemplo representativo da variação da pressão parcial de O_2 (ΔPPO_2) obtido nos seis dias de experimento. Durante os primeiros dois dias, os animais são mantidos sob temperatura constante e ciclo de iluminação (CE 12:12). Nas 96h seguintes, o ciclo de iluminação é eliminado e os animais são mantidos em condição de escuro constante. 14.1- Padrão obtido para amostragem de três forrageiras de uma mesma colônia. Intervalo de fechamento de cada câmara 20min; intervalo de abertura 10min. 14.2- Padrão obtido para amostragem de oito nutrízes de uma mesma colônia. Intervalo de fechamento de cada câmara 200min; intervalo de abertura 25min.

3.1- Fase2 – Primeiras 48h de respirometria: Efeito do ciclo claro/escuro sobre a ΔPPO_2

A Fase2 foi realizada com as abelhas mantidas sob um regime de claro/escuro. Os registros respirométricos das forrageiras mostram um padrão rítmico de variação da ΔPPO_2 (Figura 14.1). Um detalhe ampliado do registro é mostrado na Figura 15.1, em que se observa que as variações de maior amplitude iniciam-se anteriormente à fase de claro e se prolongam durante ela.

A amplitude de ΔPPO_2 nas forrageiras começa a aumentar cerca de 3h antes do início da fase de claro e cai subitamente com o apagar das luzes. A concentração de oxigênio na fase de maior amplitude de ΔPPO_2 manteve-se cerca de 0,205% nas câmaras metabólicas.

No caso das nutrízes, a presença de um ritmo de período de cerca de 24 horas não é evidente, mesmo que ritmos de frequências maiores pareçam estar presentes (Figura 14 e 15). Este registro, contraposto ao ciclo de iluminação, não mostra relações entre fases do ritmo e o ciclo ambiental (Figura 15.2).

A concentração de oxigênio, durante as medidas das câmaras, variou de 0,2095% (condição ambiental) a 0,208%.

Observações comportamentais

Nas forrageiras, durante a Fase2, houve uma definição de padrões de comportamento diferentes na fotofase e na escotofase, apresentando nítido padrão diário. Na fase de claro, as abelhas movimentavam-se ativamente pela tela plástica e era comum verificar batidas de asas não acompanhadas de voo. Episódios de voos curtos foram vistos apenas duas vezes. Durante a escotofase, elas ficavam imóveis sobre a tela plástica. Era comum ver animais com antenas voltadas para baixo, num padrão similar ao descrito como sono em abelhas.

Quanto às nutrízes, elas locomoviam-se pouco, independentemente da condição de iluminação, claro ou escuro. Foram vistas abelhas mordiscando a tela plástica, mas este comportamento também não tinha associação perceptível com a hora do dia.

Figura 15- Exemplo representativo da variação da pressão parcial de O₂ (ΔPPO₂) obtido nas primeiras 48h de experimento. Animais mantidos sob temperatura constante e ciclo CE 12:12. – Fase experimental 2. As barras abaixo do eixo x indicam condição de iluminação. Barra branca: fase de claro (06:00 – 18:00h). Barra cinza: fase de escuro (18:00 – 06:00h). 15.1- Padrão obtido para amostragem de três forrageiras de uma mesma colônia. Intervalo de fechamento de cada câmara 20min; intervalo de abertura 10min. 15.2- Padrão obtido para amostragem de oito nutrízes de uma mesma colônia. Intervalo de fechamento de cada câmara 200min; intervalo de abertura 25min. Os dois grandes picos encontrados em cada um dos gráficos são resultado da troca do sistema de absorvedores.

3.2- Fase3 – Efeito da condição de livre curso sobre o perfil de ΔPPO_2

Com o encerramento do ciclo luminoso e início das condições de livre curso (após 48h de experimento), observou-se nas forrageiras uma tendência de manter o período do ritmo observado na Fase2 (Figura 14.1). Esta manutenção do período indica que o ritmo devia estar arrastado pelo ciclo CE, além da provável existência de um componente endógeno nos ritmos de consumo de oxigênio de forrageiras.

Os gráficos dos registros mostram que as médias de ΔPPO_2 , nas fases de maior amplitude, tendem a diminuir com o passar dos dias, num comportamento similar a uma reta descendente. Não se pode dizer, entretanto, que o valor médio ΔPPO_2 ao longo das 24 horas tenha diminuído. Isso porque houve um aumento da duração da fase de maior amplitude de ΔPPO_2 , em detrimento da redução da duração da fase de menor amplitude de variação da pressão parcial do gás.

Em condição constante, o período do ritmo tendeu a diminuir, o que indica uma tendência de τ ser menor que 24h. Devido à provável existência de pós-efeitos, não é possível, neste trabalho, determinar o tamanho exato de τ .

Nas nutrízes, diferentemente do que ocorreu nas forrageiras, a média de ΔPPO_2 tendeu a aumentar com a progressão dos dias, indicando um aumento do consumo após o início do escuro constante.

4 - Médias de consumo de oxigênio e comparação entre os grupos experimentais

O consumo médio dos grupos, ao longo dos seis dias, foi de 0,0036ml/ g.h para as forrageiras; 0,00045ml/ g.h para as Nutri_BOD e 0,00087ml/ g.h para Nutri_Col. O efeito do aumento da idade e/ou mudança de função na colônia sobre as taxas metabólicas é o aumento do consumo em cerca de 5,5 vezes (forrageiras em relação à média das nutrízes). Em contrapartida, o contato com a colônia mostra ter efeito sobre a taxa metabólica, que aumenta cerca de duas vezes no grupo Nutri_Col.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste t de Student, e é importante destacar que os valores de média e variância aqui representados trazem informações unificadas sobre os grupos experimentais provenientes das três colônias empregadas.

4.1- Fase2 – Efeito do ciclo claro/escuro sobre as médias de consumo de oxigênio nos diferentes grupos amostrados

Os valores médios e as variâncias, obtidos para cada grupo amostrado durante a Fase2 estão representados na Figura 16.

Figura 16- Médias e variância de consumo de oxigênio durante a Fase2. BOD: Nutri_BOD; COL: Nutri_Col; FOR: Forrageiras. Barra clara indica médias obtidas durante a fotofase (06:00h às 18:00h). Barra escura indica médias obtidas durante a escotofase (18:00h às 06:00h). O símbolo (*) indica o grupo que não apresentou diferença significativa segundo o teste t, (nível de significância de 0,05). Número em cada um dos retângulos é a média encontrada.

Forrageiras

Nas forrageiras, o momento de maior média de consumo (0,0123ml/g.h) ocorre durante a fotofase (Figura 16). Durante a escotofase, o consumo cai cerca de sete vezes (0,0018ml/ g.h). Esse perfil confere um padrão de um ritmo diário de consumo de oxigênio, reforçando o resultado observado no perfil de ΔPPO_2 por colônia (Figura 14) e trazendo à tona a informação de que há sincronismo entre as forrageiras de diferentes colônias.

De acordo com os dados de variância no consumo das forrageiras (nas duas fases do ciclo CE), a proporção da variância é maior na fase de escuro. Essa variação pode ser decorrência de maiores variações no consumo inter, intra-individual e/ou intra-colonial. A variação de consumo poderia ser gerada, por exemplo, por diferentes momentos de vigília/sono, mesmo na fase de escuro.

Segundo o teste t, na Fase2, as forrageiras diferem significativamente dos grupos de nutrízes, inclusive durante a escotofase, quando o consumo médio de O_2 é menor do que aquele durante a fotofase. Assim sendo, a taxa metabólica das forrageiras é maior que das nutrízes, independentemente da condição de iluminação.

Nutrízes

No grupo Nutriz_BOD não é encontrada diferença significativa entre os valores médios de consumo na fase de claro ou na fase de escuro, sendo as taxas metabólicas sob as duas condições, semelhantes. Os dados indicam uma ausência de sincronismo e/ou ritmo de consumo de O_2 entre os indivíduos das três colônias amostradas neste grupo (Figura 17).

Figura 17- Médias e variância de consumo de oxigênio durante a Fase2, somente para as nutrízes. BOD: Nutri_BOD; COL: Nutri_Col. Barra clara indica médias obtidas durante a fotofase (06:00h às 18:00h). Barra escura indica médias obtidas durante a escotofase (18:00h às 06:00h). O símbolo (*) indica o grupo que não apresentou diferença significativa segundo o teste t, (nível de significância de 0,05). Número em cada um dos retângulos é a média encontrada.

A variância no grupo Nutri_BOD não se comportou igualmente nas duas fases do ciclo CE. Há uma menor dispersão dos dados de consumo na fase de claro, o que indica que o claro deve limitar a amplitude de variação do consumo neste grupo.

Para as Nutri_Col, em contrapartida, há diferença significativa de consumo no claro e no escuro. Na fase de claro, há um maior consumo médio. Desta forma há indício da existência de um padrão rítmico diário e sincronizado entre as colônias.

Os dois subgrupos de nutrízes diferem significativamente em suas taxas metabólicas, em ambas as condições de iluminação, sendo as taxas de Nutri_Col sempre superiores às das de Nutri_BOD (Figura 17).

4.2- Fase2 e Fase3 – Efeito das condições de livre curso sobre as médias de consumo de O₂

Neste item é comparado o consumo médio de O₂ total, ao longo das 24 horas, na Fase2 com aquele verificado na Fase3, sem levar em conta o horário do dia ou o ciclo de iluminação. Esta análise mostrou diferenças das médias nas duas etapas experimentais.

Durante a Fase2, o consumo médio ao longo das 24h (média total) é de 0,00705ml/ g.h para o grupo das forrageiras. Este valor médio pode ser considerado baixo (se comparado com valores da literatura) e é resultante do achatamento da média total, gerado pelos baixos valores de consumo obtidos na fase de escuro (vide Figura 15.1, escotofase). Durante a Fase3, para este mesmo grupo experimental, a média total é de 0,01205ml/ g.h, o que corresponde a um aumento de consumo de O₂ de quase duas vezes (1,7 vezes) em relação ao consumo na Fase2. Apesar do aparente contraste com os dados apresentados na Figura 15.1, o aumento da média de consumo de O₂ na Fase3, deve ser devido a um aumento da duração da fase de maior amplitude de ΔPPO_2 (e consequente diminuição da fase de menor amplitude), gerando maior consumo diário.

Nas nutrízes, a média total obtida na Fase2 é menor que a média total obtida na Fase3, apontando para um aumento de consumo na condição de livre curso. Nas nutrízes do grupo Nutri_BOD, as médias passam de 0,0009ml/ g.h para 0,0035ml/ g.h, resultando num aumento de 3,9 vezes do consumo de O₂. Nas Nutri_Col, em contrapartida, a média total de consumo aumenta em 2,5 vezes, passando de 0,0014ml/ g.h para 0,0035ml/ g.h.

Quando considerada a média de consumo de O_2 somente durante a Fase3, foram encontradas diferenças significativas entre os valores obtidos nos intervalos de 06:00h às 18:00h em relação ao intervalo de 18:00h às 06:00h (vide Figura 18).

Figura 18– Médias e variâncias dos dados de consumo de oxigênio obtidos em condição de livre curso-Fase3 experimental. Mesmo sob condições constantes de iluminação, os valores de consumo foram separados pelas horas do dia, em valores obtidos entre as 06:00h e 18:00h e entre 18:00h e 6:00h.

A primeira constatação de diferença significativa entre duas fases, em Nutriz_BOD, foi encontrada em condições constantes. Essa diferença significativa indica a existência de um ritmo endógeno, em pelo menos parte dos indivíduos do grupo.

Para Forrageiras e Nutriz_Col, a média de consumo de O_2 aumentou no intervalo das 18:00h às 06:00h, confirmando a existência do perfil rítmico e sua provável endogenicidade.

5 - Detecção de frequências no consumo de oxigênio

5.1- Problemas metodológicos

A Transformada rápida de Fourier – TRF – é uma metodologia sensível a um pequeno número de pontos amostrais. Assim sendo, optou-se por testar a influência do

número de pontos obtidos em cada fase experimental (Fase2 e Fase3), para cada um dos grupos etários, como um teste de adequação do método de análise aos dados obtidos neste trabalho.

O teste foi feito, aplicando-se o método em três padrões de curva distintos: $\text{seno}(t/24)$; ruído branco e $\text{seno}(t/24)$ com ruídos brancos associados. O resultado do teste está representado na Figura 19.

Figura 19- Gráficos resultantes do teste de adequação da Transformada rápida de Fourier ao número de pontos amostrais deste trabalho. Azul tracejado: curva senoidal com frequência $1/24 - \text{seno}(t/24)$. Preto: ruído branco gerado pelo programa MATLAB®. Vermelho: mesma curva senoidal com ruído branco adicionado. 19.1- Número de pontos idênticos ao de forrageiras em Fase2 (96 pontos amostrais). 19.2- Número de pontos idêntico ao de nutrízes em Fase2 (15 pontos amostrais). 19.3- Número de pontos idênticos ao de forrageiras em Fase3 (192 pontos amostrais). 19.4- Número de pontos idênticos ao de nutrízes em Fase3 (28 pontos amostrais).

O número de pontos obtidos (Figura 19.1 e Figura 19.3) para cada forrageira, em Fase2 e Fase3, é suficiente para a detecção de ritmos com frequência aproximada a 1ciclo/24h, ou seja, padrões diários de ritmicidade; mesmo que haja ruído associado. Ainda que seja em condição associada a ruído, a detecção do ritmo é importante, uma vez que se espera que os ritmos biológicos sejam resultantes de diversos senos, cossenos, harmônicos, além de perturbações não previsíveis.

Verifica-se ainda que o aumento do número de pontos amostrados torna mais semelhantes os resultados obtidos para seno com ruído e sem ruído, indicando que ainda há influência do número de pontos amostrais nos resultados obtidos em Fase2 das forrageiras (Figura 19.3). A influência do tamanho amostral não foi considerada suficiente para descartar os gráficos obtidos para esse grupo.

Para o grupo de nutrízes, o número de pontos amostrais impossibilitou a detecção confiável de padrões diários e/ou circadianos pela TRF (Figura 19.2 e Figura 19.4). Os gráficos assim obtidos, bem como os Periodogramas de X^2 , originados a partir da TRF foram descartados. A não constatação de períodos relevantes nas Figuras 19.2 e 19.3 não é, de maneira alguma, uma comprovação de ausência de ritmo, já que não há diferenciação entre o padrão encontrado pela curva senoidal (com ou sem ruído) e o ruído branco.

A pequena amostragem é decorrente do fato dos gráficos serem gerados para cada indivíduo separadamente. A geração de gráficos individuais é importante, uma vez que os indivíduos, mesmo tendo ritmo, podem não estar sincronizados entre si. A dessincronização impede a detecção do ritmo no grupo ou poderia gerar novos períodos como artefato metodológico. Como já mencionado, outra causa para o reduzido número amostral é o baixo consumo, gerando necessidade de grande tempo de fechamento do fluxo de ar, e conseqüentemente um menor número de medidas por unidade de tempo por indivíduo.

5.2- Ritmos encontrados sob ciclo claro/escuro

Forrageiras

Os resultados das TRF e dos Periodogramas de X^2 calculados a partir delas, estão representados na Figura 20.

Os valores obtidos nas TRFs e Periodogramas das forrageiras mostram que existe variação entre as frequências significativas dos diferentes indivíduos (Figura 20). Mesmo não tendo iguais frequências, todas as forrageiras apresentavam períodos significativos contidos dentro do intervalo considerado circadiano (entre 18h e 25h). Na maioria dos casos, os períodos circadianos destacavam-se, ultrapassando, sozinhos, a linha de significância do Periodograma.

Dois indivíduos da mesma colônia apresentaram um único período significativo igual a 19h (Figura 20.2). Outros períodos encontrados na faixa circadiana foram de

21h; 23,4h; 24,5h; 25h. Em um mesmo indivíduo, não foi observado mais de um período significativo contido no intervalo circadiano. Todos os valores de período no intervalo circadiano aproximavam-se de 24h, entretanto, em nenhum momento foram iguais a 24h.

Outros ritmos significativos não contidos na faixa circadiana foram encontrados em dois indivíduos (Figura 20.6) não pertencentes à mesma colônia. Esses ritmos apresentavam altas frequências, classificados, portanto, como ultradianos. Em somente um dos seis indivíduos, esses períodos apresentaram maior valor de poder em relação ao poder do ritmo circadiano (Figura 20.6).

Figura 20- Fase2- Resultados representativos da TRF (Figuras 20.1, 20.3, 20.5 e 20.7) acompanhados dos respectivos Periodogramas de X^2 (Figuras 20.2, 20.4, 20.6, 20.8). A linha vermelha no Periodograma representa a linha de corte para períodos significativos; intervalo de confiança 0,95.

5.3- Fase 3 (EE) – Detectando ritmos endógenos de consumo de oxigênio

Forrageiras

Os resultados obtidos em condição de livre curso confirmam a existência do ritmo circadiano de consumo de oxigênio, mas revelam também novos ritmos endógenos com frequências maiores (Figuras 21).

Ritmos de frequências diferentes são detectados na forma de pequenos picos, visualizados em grande número nos gráficos obtidos de TRFs (Figuras 21.1; 21.3; 21.5; 21.7). Esta ocorrência não é um artefato da análise já que o número de pontos amostrais é suficiente para detecção de frequência de até 1 ciclo/dia, como visto na Figura 19.

Os períodos ultradianos encontrados tinham valor aproximado de 10,5 horas (11h; 10,5h; 10h) e foram detectados em três diferentes indivíduos.

Períodos de cerca de 20h foram encontrados em cinco animais (20h; 20,4h; 20,21h; 19,9h; 20h). Em três indivíduos foram detectadas outras decomposições de frequência no intervalo circadiano (de 18 a 24 horas) - Figuras 21.2; 21.4; 21.6; 21.8. A presença de diferentes frequências dentro do intervalo circadiano pode ser um indício de instabilidade do relógio biológico.

Figura 21- Fase3- Resultados representativos da TRF (Figuras 21.1, 21.3, 21.5 e 21.7) acompanhados dos respectivos Periodogramas de X^2 (Figuras 21.2, 21.4, 21.6, e 21.8). A linha vermelha no Periodograma representa a linha de corte para períodos significativos; intervalo de confiança 0,95.

6 – Respirogramas: obtendo informações dos padrões cronobiológicos

Os respirogramas facilitam a visualização das variações da expressão do consumo de O_2 ao longo de todo o intervalo experimental. Ao contrário do que acontecia com os tratamentos de dados apresentados até aqui, através dos respirogramas é possível detectar o efeito das mudanças das condições ambientais sobre cada animal, individualmente.

Forrageiras

Tal como mostrado nas análises anteriores, também os respirogramas montados a partir de dados da Fase2, mostram nas forrageiras, um maior consumo relativo de O_2 durante a fotofase (Figura 22).

O padrão periódico é mantido na transição para escuro constante, sugerindo a endogenicidade do ritmo. Como a fase de maior consumo não mantém relação de fase estável em dias consecutivos, adiantando-se sempre em relação ao dia anterior, há indicações de um ritmo em livre curso com τ menor que 24 horas.

O cálculo de τ não pode ser feito com precisão, pois seriam necessários mais dias de registro em condições constantes, após o término dos pós-efeitos.

O pós-efeito varia entre os indivíduos, desde aqueles que mostram longos intervalos de instabilidade (Figura 22.1) até outros, que parecem não apresentar pós-efeitos, apresentando um aparente ritmo em livre curso, assim que se encerra a Fase2 (Figura 22.3).

Em alguns indivíduos foi notada uma tendência à descompressão da fase de maior consumo, aumentando a duração desta, em detrimento da duração da fase de menor consumo (Figura 22.2, 22.3). Essa descompressão também varia entre os animais, não sendo percebida facilmente em alguns deles (Figura 22.1)

Figura 22- Respirogramas em duplo gráfico de forrageiras. Barra superior 0h-48h: ciclo de iluminação nas primeiras 48h; fase de claro (barra branca); fase de escuro (barra preta). Barra inferior 48-144h: escuro constante. Retângulo desenhado sobre o actograma = resultados durante a fotofase. Setas indicam o fim da Fase2 experimental, início da condição de livre curso (Fase3).

Nutrizes

O perfil de consumo ao longo dos dias varia muito entre os indivíduos deste grupo etário. Mesmo quando considerados separadamente, nos subgrupos de nutrizes são encontradas diferenças interindividuais nas respostas ao ciclo luminoso (Fase2) e/ou à condição de livre curso (Fase3). As diferenças indicam que a capacidade de expressão ou mesmo a existência de um ritmo endógeno, nesta faixa etária, variam entre os diferentes indivíduos, mesmo que originados da mesma colônia, portanto com um índice considerável de semelhança genética. Essa variação interindividual possivelmente indica que o sistema temporal do animal encontra-se num processo de amadurecimento nesta fase da vida.

As nutrizes certamente reagem à presença da luz, entretanto, esta reação não é padronizada entre os indivíduos.

No grupo das Nutri_BOD, algumas nutrizes reagem à luz com um aumento do consumo de oxigênio (Figura 23.1; Figura 23.2), enquanto outras apresentam as mais baixas taxas de consumo metabólico na fase de claro (Figura 23.3). É provável que esse aumento de consumo de alguns indivíduos, somado à diminuição desta mesma variável em outros, possa ter gerado a perda da informação sobre a presença de ritmos nos valores de média (Resultados – item 4). Em Nutri_Col, há uma tendência maior, que em Nutri_BOD, ao aumento das taxas de consumo de O₂ durante a fotofase, mas não há uma relação de fase estável entre o aumento do consumo e o ciclo CE. As variações da relação de fase são detectadas inter e intra-individualmente (Figura 24).

Sob escuro constante, algumas nutrizes passam a exibir padrões de ritmo em livre curso (Figura 23.3; Figura 24.2). Esta situação foi observada em ambos os subgrupos, mas não é comum a todas as nutrizes.

Figura 23- Respirogramas em duplo gráfico do grupo Nutri_BOD. Barra superior 0-48h: ciclo de iluminação nas primeiras 48h; fase de claro (barra branca); fase de escuro (barra preta). Barra inferior 48-144h: escuro constante. Retângulo desenhado sobre o actograma = resultados durante a fotofase. Setas indicam o fim da Fase2 experimental, início da condição de livre curso (Fase3).

Figura 24- Respirogramas em duplo gráfico do grupo Nutri_COL. Barra superior 0-48h: ciclo de iluminação nas primeiras 48h; fase de claro (barra branca); fase de escuro (barra preta). Barra inferior 48-144h: escuro constante. Retângulo desenhado sobre o actograma = resultados durante a fotofase. Setas indicam o fim da Fase2 experimental, início da condição de livre curso (Fase3).

7 - Diferentes efeitos da respirometria sobre os diferentes grupos experimentais

Ao fim dos experimentos de respirometria, os animais foram pesados e calculada a variação da massa corpórea.

O comportamento ao fim do experimento, durante a pesagem, também era diferente nos dois grupos experimentais. Nutrizes, em sua maioria apresentavam-se pouco ativas; somente um indivíduo foi capaz de levantar voo quando retirado da câmara para a pesagem final. Por outro lado, a maioria das forrageiras apresentavam intensa movimentação, batendo asas e emitindo sons característicos. Algumas levantaram voo quando retiradas das câmaras.

A porcentagem da massa perdida nas forrageiras foi de 17% e nas nutrizes, 34%, sendo 38% no sub-grupo Nutri_BOD e 30%, em Nutri_Col.

As diferenças comportamentais e de porcentagem de perda de massa indicam que o efeito da etapa experimental não é idêntico nos grupos. As diferenças detectadas entre forrageiras e nutrizes podem ser atribuídas a dois fatores principais: função e idade. Aquelas entre os dois sub-grupos de nutrizes, porém, devem ser devidas à influência do contato com a colônia.

Discussão

1 - Forrageiras

1.1- Eficiência do CE experimental como agente arrastador

No início deste trabalho, esperava-se que o grupo das forrageiras funcionasse como grupo controle. Isto porque o caráter endógeno do ritmo de consumo de O₂ de *M. quadrifasciata* já foi bem demonstrado (Teixeira *et al.*, 2011) e a perspectiva de evidenciar um padrão arrastado era bastante provável. Assim, a realização das medidas sob um ciclo de claro/escuro foi feita exatamente com o objetivo de se obter arrastamento, tendo em vista a eficiência deste ciclo sobre o ritmo de atividade das forrageiras. Entretanto, o estabelecimento de um ângulo de fase estável com o ciclo experimental não foi observado em todas as forrageiras (Figura 22.3).

Quando acontece o ajuste de fase do oscilador com o *zeitgeber*, o período do ritmo fica igual àquele do ciclo ambiental, no caso dos experimentos aqui realizados, período de 24 horas. Os testes de TRF e Periodograma mostraram, porém, que os períodos significativos presentes não eram iguais a 24 horas, demonstrando ausência de arrastamento do ritmo de consumo de O₂. Há evidências de que o ciclo CE utilizado não agiu de forma eficiente como agente arrastador. Estes resultados podem ser devidos a características do próprio sistema temporal ou a características do protocolo experimental utilizado.

Características do sistema temporal - Transientes: A inexistência de expressão de um padrão arrastado do ritmo, já foi descrita em outros momentos na literatura (citados em Moore-Ede *et al.*, 1982) e pode ocorrer mesmo quando o organismo é exposto a *zeitgebers* sabidamente eficientes. Os períodos intermediários entre a expressão em livre curso e aquela do ritmo arrastado são conhecidos como “transientes” (ver Figura 3, Introdução). A ocorrência de transientes não é geral, sendo que sua duração varia entre espécies e/ou no mesmo indivíduo, dependendo das condições ambientais a que o organismo é exposto (Saunders, 2002).

Neste trabalho, os transientes foram detectados na passagem da Fase1 para a Fase2, em que o ritmo das forrageiras não mostrou a esperada estabilização do período.

As variações do período do ritmo, observadas na Fase2, seriam resultantes da expressão do período endógeno, mas sob a influência do ciclo ambiental, que não tem força para promover o arrastamento. Esta situação pode ser causada por um *zeitgeber* fraco (pequena diferença de amplitude entre suas fases) (Holst, 1939 *apud* Moore-Ede *et al.*, 1982). É importante salientar que houve uma variação inter-individual na ocorrência de transientes, e somente alguns animais apresentaram indícios de ação do ciclo CE sobre a expressão do ritmo (Figura 22.1 e 22.2).

Saunders (2002) demonstrou que o número de transientes é maior quando ocorrem adiantamentos de fase e esta parece ser a situação neste trabalho (ver ritmo em condição de livre curso, Figura 22).

A ausência de sincronização também pode ser explicada pelas próprias características do processo de arrastamento do sistema circadiano de *M. quadrifasciata*. Em muitas espécies, o arrastamento não acontece imediatamente após a introdução do ciclo CE. Isto pode ser devido às propriedades do oscilador, ou então, ao tempo de processamento da informação rítmica por suas eferências. Esta última alternativa foi considerada a mais provável por Pittendrigh e Daan (1976b), numa longa série de modelagens de respostas de osciladores biológicos. No estágio atual de conhecimento sobre o sistema circadiano de abelhas sem ferrão, é difícil adiantar qual das alternativas é mais adequada para explicar os dados aqui apresentados. Experimentos com séries mais longas de dados serão fundamentais para elucidar a questão.

A passagem da Fase2 para Fase3 mostrou outra característica do ritmo biológico, que é a descompressão da fase de atividade (Pittendrigh e Daan, 1976b). No presente estudo, esta descompressão se traduziria em um aumento na duração da fase de maior consumo de O₂. Na situação anterior – Fase2 – a atividade era subitamente restrita pela transição do claro para o escuro (Figura 22). A descompressão foi descrita em locomoção de mamíferos e tende a ocorrer em ritmos que apresentam τ menor que 24h (Pittendrigh e Daan, 1976b).

A descompressão da fase de atividade foi relacionada com a propriedade do relógio de responder diferentemente a um pulso – adiantando ou atrasando a fase – dependendo do momento em que o pulso é administrado (Pittendrigh, 1981). O início do claro e do escuro agem como pulsos. Caso as forrageiras estivessem de fato em livre curso na Fase1, o relógio de cada uma delas estaria em fase diferente das demais, resultando em respostas distintas como: a descompressão de fase de atividade (Figura

22.2 e 22.3), ou um arrastamento instável (Figura 22.1), ou a presença de transientes (Figura 22.3).

Características do sistema temporal – Dessincronização interna: Ainda não pode ser excluída a possibilidade de ocorrência de dessincronização interna. A dessincronização interna é um processo que ocorre quando se perde a relação de fase entre os múltiplos ritmos que estão presentes dentro de um mesmo organismo. A maior parte dos eventos de dessincronização é provocada pela condição ambiental, como variações da duração das fases de um *zeitgeber*, ou então, pela existência de condições não permissivas (Marques *et al.*, 2003). Considerando que o ritmo de consumo de oxigênio é a resultante de todas as atividades metabólicas do organismo, a possibilidade de dessincronização de seus componentes não pode ser descartada. Em termos de interpretação, a dessincronização dos ritmos internos impediria que o ritmo de consumo de oxigênio fosse visto como arrastado.

Características do sistema biológico - Eussocialidade e isolamento do indivíduo: – O isolamento de um organismo eussocial do seu grupo pode gerar padrões não observados na natureza como resposta ao estresse gerado pela condição imposta. Embora não tenham sido feitas medidas fisiológicas do estresse causado pelo isolamento em insetos sociais, em mamíferos com sociedades menos complexas, esse isolamento gera modificações neuroendócrinas e comportamentais (estudo em ratos, Weiss *et al.* 2004). Comportamentalmente, sabe-se que em formigas (*Camponotus fellah*), o isolamento do indivíduo por 20 dias gera alteração no padrão de agressividade (Boulay e Lenoir, 2001), bem como perda de peso e redução da taxa de sobrevivência (Lihoreau *et al.*, 2009).

As abelhas fazem parte de um sistema eussocial de divisão de tarefas, assim sendo uma abelha é parte de um conjunto complexo e integrado, a colônia, como os sistemas e órgãos de um metazoário. Como acontece a sobrevivência de tecidos isolados? O isolamento de tecidos em cultura, embora necessário em determinadas condições experimentais, pode resultar na morte de seus componentes ou em perda dos padrões sem relevância para o sistema como um todo. Quais os motivos dessa divergência da parte para o todo? As abelhas, tais como os tecidos, recebem informações vindas do todo, a colmeia. As informações podem vir por meio de feromônios ou hormônios, e geram modulação e/ou disparam determinadas atividades características do indivíduo.

Características do protocolo experimental – Condição ambiental: No ciclo claro/escuro empregado, a intensidade luminosa da fotofase pode ter sido muito baixa, criando um *zeitgeber* fraco, de pequena amplitude e, portanto, insuficiente para gerar arrastamento. Em 1993, Moore e Rankin utilizaram em seus protocolos de arrastamento do ritmo de atividade locomotora de *A. mellifera*, uma intensidade luminosa cerca de 130 vezes superior à utilizada nos protocolos deste trabalho ($200 \text{ w/m} = 136600\text{lux}$). Levando em conta estes dados, intensidades luminosas maiores foram testadas, sem respirometria, em protocolos piloto com as nutrízes. A taxa de sobrevivência nestes pilotos foi muito baixa (20%), sendo que os indivíduos morriam antes de 48h de exposição ao ciclo CE, com 3000lux na fotofase, caracterizando uma condição não permissiva.

Características do protocolo experimental – Tempo de manutenção em Fase2: Uma alternativa possível para tentar garantir o arrastamento, com a mesma intensidade de iluminação, seria o aumento do número de dias em Fase2 (ciclo CE). É importante ressaltar que o tempo de experimento é um fator limitante para estudo com abelhas, principalmente em decorrência dos efeitos de isolamento nas expressões fisiológicas do animal. É importante também destacar que mais dias em Fase2 seria possivelmente incongruente com o objetivo do trabalho, já que nesse intervalo as nutrízes mudariam de tarefa e passariam a ser construtoras.

1.2- Sincronização com a fotofase, mesmo sem arrastamento do ritmo.

Os gráficos obtidos pelo perfil de ΔPPO_2 apresentam coerência como inverso dos dados de Klein *et al.* (2008) para o padrão rítmico de sono de indivíduos registrado em colônias de *A. mellifera*, sob condição natural de iluminação. Para forrageiras, a fase de maior amplitude de consumo de O_2 ocorre na fotofase experimental, que corresponde à fase com menor número de indivíduos dormindo (Klein *et al.*, 2008). O comportamento inverso entre a fase de maior consumo de O_2 (dados deste trabalho) e a fase de sono é esperada, uma vez que no momento de atividade o gasto energético é maior.

A existência de diferença significativa entre as médias de consumo de O_2 na fotofase em relação à escotofase mostra que o padrão diário de consumo deste gás é mantido em todos os animais (Figura 15), e é confirmada no padrão da Figura 16.1. Embora não exista a sincronização perfeita dos períodos dos ritmos dos indivíduos, os ritmos observados se mantêm na faixa circadiana.

1.3- Fase3 – Ritmo em condição de livre curso e sua expressão histórico dependente

Ainda que não tenha sido observado o padrão arrastado no ritmo em estudo, há uma perturbação na expressão do relógio. Esta perturbação se traduz na ocorrência de pós-efeitos observados na Fase3. O comportamento do ritmo observado na Fase3 é provavelmente a resultante de:

- a- transientes provocados pela situação de livre curso da fase anterior (Fase1);
- b- ação de um ciclo CE com amplitude insuficiente para gerar padrão de arrastamento, mas capaz de atuar sobre o relógio;
- c- o estabelecimento de nova condição de livre curso.

Assim, na Fase3, observa-se uma fase de instabilidade, não sendo possível calcular o τ do ritmo de consumo de O_2 para forrageiras. Para tal cálculo seria necessária uma série temporal mais longa, em que se observasse a estabilização do período endógeno do ritmo.

Mesmo sem o valor preciso de τ , as observações de todos os respirogramas de forrageiras indicam sua tendência a ser menor que 24h, revelada pelos adiantamentos de fase do ritmo em dias consecutivos (Figura 22).

2 - Nutrizes

2.1- Efeito tópico da luz

No grupo Nutri_BOD, a simples presença de luz parece induzir alterações, não somente no consumo respiratório, como no próprio comportamento. Em alguns indivíduos, os pontos obtidos na Fase2 localizavam-se fora dos 75% amostrados no respirograma, indicando um consumo de oxigênio fora do padrão esperado. O dado é consistente com o padrão de alta taxa mortalidade observado nos experimentos piloto em ciclo CE, (2dias, ciclo CE, 3000lux, 80% mortalidade). Aparentemente o efeito sobre o ritmo de consumo de O_2 não demonstra um processo de sincronização, mas uma

consequência do estabelecimento de uma condição não permissiva sobre o animal como um todo, não só sobre o seu sistema temporal. O consumo de O₂ não demonstrou sensibilidade ao ciclo CE, o que se obteve foi um efeito tônico e possivelmente deletério da luz sobre os animais.

Em alguns casos, pode-se observar arritmicidade circadiana nos respirogramas, durante a Fase2. A explicação para esta arritmicidade tem muitos aspectos. É possível que a maturação das aferências ainda não tenha ocorrido nas nutrízes e, assim sendo, a informação sobre a condição de iluminação ambiental não chega ao relógio. Sasagawa e colaboradores (2003) detectaram um ritmo circadiano na expressão de RNAm dos fotopigmentos (opsinas e arrestinas) tanto em forrageiras quanto em nutrízes. No mesmo trabalho, os autores comprovaram que um pulso de luz gera aumento da expressão destes RNAm, mas os níveis expressos em nutrízes são inferiores aos expressos em forrageiras, indicando um processo de maturação do sistema visual ainda em curso. Como os pigmentos em questão, especialmente as opsinas, fazem parte das aferências ao oscilador circadiano (Rieger *et al.*, 2003), é possível que nutrízes de *M. quadrifasciata* tenham esta fase de maturação e que isso implica uma percepção parcial da condição ambiental.

Na Fase3, alguns indivíduos apresentam ritmo em livre curso, sejam eles do grupo Nutri_BOD ou do grupo Nutri_Col. A presença do ritmo em somente parte dos indivíduos é um forte indício de que está ocorrendo um processo pós embrionário de maturação do sistema circadiano. Isso porque a velocidade de desenvolvimento é diferente em diferentes indivíduos. De acordo com Shemesh e colaboradores (2010) uma das formas de identificar um processo de maturação do sistema circadiano, seria a presença de ritmo, sem definição de uma fase específica, em abelhas removidas da colônia. A condição do ritmo exibido pelas nutrízes neste trabalho encontra-se numa situação como a proposta pelos autores.

Outro dado favorável à hipótese de maturação do sistema é a modificação na expressão de um dos principais genes do relógio, *period*, ao longo da ontogênese do animal. Este gene apesar de ser expresso nas abelhas jovens (*A. mellifera*), tem uma amplitude de oscilação diária muito menor nesta fase da vida, quando comparada com aquela que aparece forrageira (Bloch *et al.*, 2001).

Bloch e colaboradores (2001) atribuíram os baixos níveis de expressão deste gene nas nutrízes à influência da colônia e/ou à ausência de estímulo luminoso. Sua proposta baseava-se no fato dos níveis expressos de *period* nas nutrízes, 7 dias após a

emergência, serem idênticos àqueles expressos pelas forrageiras quando no interior do ninho. Esta hipótese foi refutada nas nutrizes, uma vez que a expressão de *period* não respondeu à presença de luz, nem foi modificada quando o animal foi isolado da colônia (Bloch *et al.*, 2004). A impossibilidade de resposta ao ciclo de iluminação na expressão dos genes do relógio nas nutrizes pode ser mais um indício de que as aferências do sistema circadiano ainda não estão completamente desenvolvidas.

Estudos recentes mostraram que tanto genes do relógio, quanto genes relacionados ao sistema visual apresentam comportamentos diferentes no cérebro de nutriz e de forrageira, ambas mantidas em escuro constante (Rodrigues-Zas *et al.*, 2012). As principais modificações são relacionadas à quantidade transcrita e ao surgimento de uma oscilação destes RNAm. Nas nutrizes, alguns genes do relógio e do sistema visual não oscilam. Todos estes dados foram obtidos com *A. mellifera* e mesmo que haja evidências de que o mecanismo molecular do relógio seja bastante conservado, não se pode aplicar estas conclusões para tentar explicar resultados obtidos com outra espécie. Ainda assim, pode-se levantar algumas hipóteses sobre a maturação do sistema circadiano em *M. quadrifasciata*.

Propõe-se, neste trabalho, que ocorra um processo de maturação do sistema circadiano, sem a necessidade da presença da colônia. Entretanto, ainda é necessário definir se o processo de maturação ocorre no oscilador propriamente dito ou no sistema de aferência do relógio.

2.2- Efeito do retorno à colônia, sobre a expressão do ritmo

Comparando-se os dois grupos de nutrizes, os resultados não mostraram diferença no número total de indivíduos que apresentaram ritmo em livre curso para consumo de O₂, indicando desta forma, que a influência da colônia não é essencial para o desenvolvimento do ritmo endógeno. No entanto, ficou evidente que a expressão do ritmo demonstra a influência do grupo social.

A existência de um ritmo foi comprovada pelas médias, que mostraram diferenças significativas entre fases. Na situação de CE, houve aumento de consumo de O₂ na fotofase, observado nas nutrizes do grupo Nutri_Col, mas não nas Nutri_BOD. Muito provavelmente esta diferença foi causada pelo contato com a colônia. Assim, a presença da colônia agiria como um pulso sincronizador da expressão do ritmo de consumo de oxigênio nas nutrizes.

Uma análise dos respirogramas revela uma etapa de arritmicidade nas Nutri_BOD, além da impossibilidade destas nutrízes de identificar as fases de claro e de escuro. Os resultados com o grupo Nutri_Col, por sua vez, indicam que o contato com a colônia modula o ritmo, sincronizando-o. Como as nutrízes dos dois grupos experimentais tinham precisamente a mesma idade e eram provenientes das mesmas colônias, pode-se dizer ainda, que a influência social aparentemente acelera o aparecimento do ritmo. Robinson e colaboradores (2008) mostraram que a informação social pode ter efeitos muito amplos sobre expressões gênicas no cérebro de diversas espécies. Um destes efeitos é modificar radicalmente estados neurogenômicos. Assim, um único neurônio, cuja ação é modulada por proteínas sinápticas, pode mudar seu desempenho e sinais sinápticos transientes podem se transformar em mudanças permanentes. Esta forma de ação do grupo social parece ser geral e pode-se supor que os componentes neuronais do sistema circadiano das nutrízes Nutri_Col tenham tido seu desempenho modulado e consolidado pelo contato com a colônia.

Em linhas gerais, evidenciamos neste trabalho que o ritmo de consumo de oxigênio é endógeno e passa por um processo de ontogênese que independe da presença da colônia, mas é modulado por ela. Essa modulação se dá, acelerando o aparecimento do ritmo nos indivíduos, bem como a possibilidade de sincronização com um ciclo claro/escuro, mesmo que essa sincronização ainda não possa ser definida como arrastamento ou mascaramento.

Conclusões

Neste trabalho, o objetivo foi detectar mudanças no sistema temporal que ocorrem ao longo do desenvolvimento ontogenético de abelhas operárias. O ritmo monitorado foi aquele de consumo de O_2 , empregando um ciclo claro/escuro como agente sincronizador.

A partir dos dados obtidos pode-se concluir que:

1- nutrízes não apresentam capacidade semelhante àquela das forrageiras de lidar com a informação luminosa;

2- a exposição à luz branca (1000lux), mesmo apenas num intervalo de 12 horas, representa uma condição não permissiva para as nutrízes. A alta mortalidade na situação de claro/escuro indica que o organismo não está preparado fisiologicamente para esta condição ambiental;

3- existe um processo de maturação pós-embrionária do sistema circadiano nas nutrízes;

4- o processo de maturação ocorre mesmo em indivíduos separados da colônia;

5- o contato com a colônia modula a velocidade do processo de maturação do relógio:

5.1- acelerando o aparecimento da expressão do ritmo endógeno, pelo menos em alguns indivíduos;

5.2- sincronizando os animais e permitindo que respondam antecipadamente ao ciclo claro/escuro, ainda que esta seja uma condição ambiental não permissiva.

Entretanto, como o número de dias sob condições ambientais experimentais não foram suficientes para obter séries temporais longas o bastante, não foi possível:

1- certificar que as nutrízes que apresentaram ritmo na Fase2, poderiam apresentar arrastamento;

2- determinar τ , embora nos dois grupos etários haja indícios de que τ seja menor que 24h.

Abrem-se novas perspectivas:

1- Esclarecer qual o papel da colônia no desenvolvimento do ritmo de cada indivíduo.

2- Esclarecer os passos da dinâmica do desenvolvimento do sistema circadiano e as etapas de maturação de seus componentes: aferências, osciladores e eferências.

Referências bibliográficas

- Abreu, C.O. 2011. **Atividades de voo de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Apidae, Meliponinae) e sua preferência floral no Parque das Neblinas, Mogi das Cruzes, SP.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Entomologia, 83 p.
- Allen, M.D. 1958. Respiration rates of worker honeybee of different ages and at different temperatures. **The Journal of Experimental Biology**, 36: 92-101.
- Almeida, G.F. 2004. **Estudo de componentes rítmicos detectados na colônia de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Entomologia, 96 p.
- Alves, D.A.; Menezes, C.; Imperatriz-Fonseca, V.; Wenseleers, T. 2010. First discovery of a rare polygyne colony in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, doi: 10.1051/Apido/2010053.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 25: 11-28.
- Aschoff, J. 1988. Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. *In*: Hekkens, W.T.J.M.; Kerkhof, G.A.; Rietveld, W.J. (eds.). **Trends in Chronobiology**. Oxford: Pergamon Press, p. 149-161.
- Bartholomew, B.; George, A.; Vleck, D.; Vleck, C. 1981. Instantaneous measurements of oxygen consumption during pre-flight warm-up and post-flight cooling in Sphingid and Saturniid moths. **The Journal of Experimental Biology**, 90: 17-32.
- Bellusci, S. 2003. **Colônia de abelhas eussociais: modulação de ritmos com ênfase no processo de construção de células de cria e postura em duas espécies de abelhas sem ferrão, *Frieseomelitta doederleini* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae).** Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Entomologia, 135 p.
- Bellusci, S.; Marques, M.D. 2001. Circadian activity rhythm of the foragers of a eusocial bee (*Scaptotrigona* aff. *depilis*, Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) outside the nest. **Biological Rhythm Research**, 32(2): 117-124.
- Bloch, G.; Toma, D.P.; Robinson, G.E. 2001. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and *period* expression in the honey bee brain. **The Journal of Biological Rhythms**, 16(5): 444-456.

- Bloch, G.; Rubinstein, C.D.; Robinson, G.E. 2004. Period expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34: 879-891.
- Boulay, R.; Lenoir, A. 2001. Social isolation of mature workers affects nestmate recognition in the ant *Camponotus fellah*. **Behavioural Processes**, 55(2): 67-73.
- Calderone, N.W.; Page, R.E. 1988. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 22: 17-25.
- Camargo, J.M.F.; Kerr, W.; Lopes, E. 1967. Morfologia externa de *Melipona marginata* Lepeletier (Hymenoptera, Apoidea). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 20(20): 229.
- Cepeda, O.I. 2006. Division of labor during brood production in stingless bees with special reference to individual participation. **Apidologie**, 37: 175-190.
- Chauí-Berlinck, J.G.; Bicudo, J.E.P.W. 2006. **Respirometria**. 1ª edição. São Paulo: Santos Editora, 130 p.
- Chown, L.C.; Nicolson, S.W. 2004. **Insect physiological ecology: mechanisms and patterns**. 1ª edição. Oxford: Oxford University Press, 254 p.
- Crailsheim, K.; Hrassnig, N.; Stabentheiner, A. 1996. Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). **Apidologie**, 27: 235-244.
- Daan, S.; Pittendrigh, C.S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. **Journal of Comparative Physiology A**, 106: 253-266.
- Díez-Noguera, A. 1999. “El Temps”. Barcelona: Universitat de Barcelona, Espanha.
- Dunlap, J.C.; Loros, J.J.; DeCoursey, P.J. (eds.) 2004. **Chronobiology: Biological Timekeeping**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 213-254.
- Enright, J.T. 1965. Synchronization and ranges of entrainment. In: Aschoff, J. (ed.). **Circadian Clocks**. Amsterdam: North Holland, p. 112-124.
- Feynman, R.P.; Leighton, R.B.; Sands, M. 1970. Harmonics. In: Feynman, R.P.; Leighton, R.B.; Sands, M. (eds.). **The Feynman Lectures on Physics**. Redwood City: Addison Wesley, v. 1, cap. 50: 1-10.
- Franck, P.; Cameron, E.; Good, G.; Rasplus, J.Y.; Oldroyd, B.P. 2004. Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. **Molecular Ecology**, 13: 2317-2331.
- Frisch, B.; Aschoff, J. 1987. Circadian rhythms in honeybees: entrainment by feeding cycles. **Physiological Entomology**, 12: 41-49.
- Frisch, B.; N. Koeniger. 1994. Social synchronization of the activity rhythms of honeybees within a colony. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 35: 91-98.

- Fuchikawa, T.; Shimizu, I. 2007. Effects of temperature on circadian rhythm in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. **Journal of Insect Physiology**, 53: 1179-1187.
- Hastings, J.W.; Rusak, B.; Boulous, Z. 1991. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: Prosser, C.L. (ed.). **Neural and Integrative Animal Physiology**. 4ª edição. New York: John Wiley & Sons, p. 435-546.
- Heinrich, B. 1972. Temperature regulation in bumblebee, *Bombus vagans*: a field study. **Science**, 175: 185-187.
- Hepburn, H.R. 1998. Reciprocal interactions between honeybees and combs in the integration of some colony functions in *Apis mellifera* L. **Apidologie**, 29: 47-66.
- Jones, J.C.; Myerscough, M.R.; Graham, S.; Oldroyd, B.P. 2004. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. **Science**, 305: 402-404.
- Kaiser, W. 1988. Busy bees need rest, too: behavioural and electromyographic sleep signs in honeybees. **Journal of Comparative Physiology A**, 163: 565-584.
- Kaiser, W.; Steiner-Kaiser, J. 1983. Neuronal correlates of sleep wakefulness and arousal in a diurnal insect. **Nature**, 301: 707-709.
- Kawamoto, T.H. 2011. **Padrões bioenergéticos das aranhas de teia: considerações sobre a unidade e a diversidade**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Biológicas. Departamento de Fisiologia Geral, 107 p.
- Klein, B.A.; Olzowy, K.M.; Klein, A.; Saunders, K.M.; Seeley, T.D. 2008. Caste-dependent sleep of worker honey bees. **The Journal of Experimental Biology**, 211: 3028-3040.
- Klowden, M.J. 2007. **Physiological systems in insects**. 2ª edição. Moscow: Editora Elsevier, p. 433-461.
- Lihoreau, M.; Brepson, L.; Rivault, C. 2009. The weight of the clan: even in insects, social isolation can induce a behavioural syndrome. **Behavioral Processes**, 82(1): 81-84.
- Marques, M.D.; Yamashita, C.E. 2008. Biological rhythms in the colony of stingless bees. In: Fanjul-Moles, M.L.; Roblero, R.A. (orgs.). **Comparative Aspects of Circadian Rhythms**. Kerala, India, p. 93-107.
- Marques, M.D.; Golombek, D.; Moreno, C. 2003. Adaptação temporal. In: Marques N.; Menna-Barreto, L. (orgs.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**: 3ª edição. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 55-98.
- Marques, N.; Menna-Barreto, L. (orgs.). 2003. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3ª edição. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 383 p.
- Menzel, R.; Ventura, D.F.; Werner, A.; Joaquim, L.C.M.; Backhaus, W. 1989. Spectral sensitivity of single photoreceptors and color vision in the stingless bee, *Melipona quadrifasciata*. **Journal of Comparative Physiology A**, 166(2): 151-164.
- Michener, C.D. 1974. **The Social Behavior of the Bees. A Comparative Study**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 404 p.

- Moore, D.; Rankin, M.A. 1985. Circadian locomotor rhythms in individual honeybees. **Physiological Entomology**, 10: 191-197.
- Moore, D.; Rankin, M.A. 1993. Light and temperature entrainment of a locomotor rhythm in honeybees. **Physiological Entomology**, 18: 271-278.
- Moore-Ede, M.C.; Sulzman, F.M.; Fuller, C.A. 1982. **The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System**. Cambridge: Harvard University Press, 448 p.
- Moritz, R.F.A.; Kryger, P. 1994. Self-organization of circadian rhythms in groups of honeybees (*Apis mellifera* L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 34: 211-215.
- Moritz, R.F.A.; Sakofski, F. 1991. The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 29: 361-365.
- Moure, J.S.; Kerr, W.E. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía**, 1(2): 105-129.
- Nogueira-Neto, P. 1997. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 441 p.
- Oster, G.F.; Wilson, E.O. 1978. **Caste and ecology in the social insects**. Princeton NJ: Princeton University Press, 372 p.
- Page, T.L. 1985. Clocks and circadian rhythms. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. (eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, v.6, p. 578-652.
- Page, T.L. 1989. Masking in invertebrates. **Chronobiology International**, 6: 3-11.
- Page, T.L.; Wassmer, G.T.; Fletcher, J.; Block, G.D. 1997. Aftereffects of entrainment on the period of the pacemaker in the eye of the mollusk *Bulla gouldiana*. **Journal of Biological Rhythms**, 12(3): 218-225.
- Paranjpe, D.A.; Sharma, V.K. 2005. Evolution of temporal order in living organisms. **Journal of Circadian Rhythms**, doi:10.1186/1740-3391-3-7.
- Pittendrigh, C.S. 1954. On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. **Proceedings of National Academy of Science**, 40: 1018-1029.
- Pittendrigh, C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 25: 159-184.
- Pittendrigh, C.S. 1981. Circadian systems: general perspective. In: Aschoff, J. (org.). **Handbook of Behavioral Neurobiology - Biological Rhythms**. New York: Plenum Press, v. 4, p. 57-80.
- Pittendrigh, C.S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual Review of Physiology**, 55: 17-54.
- Pittendrigh, C.S.; Daan, S. 1976a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. **Journal of Comparative Physiology A**, 106: 223-252.

- Pittendrigh, C.S.; Daan, S. 1976b. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. **Journal of Comparative Physiology A**, 106: 291-331.
- Rieger, D.; Stanewsky, R.; Helfrich-Förster, C. 2003. Cryptochrome, compound eyes Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Rhythms**, 18(5): 377-391.
- Robinson, G.E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, 37: 637-665.
- Robinson, G.E.; Fernald, R.D.; Clayton, D.F. 2008. Genes and Social Behavior, **Science**, 322(5903): 896-900.
- Rodriguez-Zas, S.L.; Southey, B.R.; Shemesh, Y.; Rubin, E.B.; Cohen, M.; Robinson, G.E.; Bloch, G. 2012. Microarray analysis of natural socially regulated plasticity in circadian rhythms of honey bees. **Journal of Biological Rhythms**, 27(1): 12-24.
- Roubik, D.W. 2006. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, 37: 124-143.
- Sakagami, S.F. 1982. Stingless bees. In: Hermann, H.R. (ed.). **Social Insects**. Academic Press, New York, p. 361-423.
- Sakagami, S.F.; Beig, D.; Zucchi, R.; Akahira, Y. 1963. Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Revista Brasileira de Biologia**, 23(2): 115-129.
- Sasagawa, H.; Narita, R.; Kitagawa, Y.; Kadowaki, T. 2003. The expression of genes encoding visual components is regulated by a circadian clock, light environment and age in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Neuroscience**, 17(5): 963-970.
- Saunders, D.S. 2002. **Insect Clocks**. 3ª edição. Amsterdam: Elsevier Science, 560 p.
- Schulz, D.J.; Robinson, G.E. 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. **Journal of Comparative Physiology A**, 184: 481-488.
- Sebrian, T.G. 2011. **Métodos lineares e não lineares de análise de dados cronobiológicos de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Biológicas. Departamento de Fisiologia Geral, 60 p.
- Seeley, T.D. 1989. The honey bee colony as a superorganism. **American Scientist**, 77: 546-553.
- Sharma, V.K.; Chandrashekar, M.K. 2005. Zeitgebers (time cues) for biological clocks. **Animal Behavior**, (Special section), 89 (7): 1136-1146.

- Shemesh, Y.; Eban-Rothschild, A.; Cohen, M.; Bloch, G. 2010. Molecular dynamics and social regulation of context dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee. **Journal of Neuroscience**, 30(37): 12517-12535.
- Southwick, E.; Moritz, R.F.A. 1987. Social synchronization of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*). **Physiological Entomology**, 12: 209-212.
- Spangler, H.G. 1972. Daily activity rhythms of individual worker and drone honey bees Hymenoptera - Apidae. **Annals of the Entomological Society of America**, 65: 1073-1075.
- Stussi, T. 1972. Ontogenese du rythme circadien de la depense energetique chez l'abeille. **Archives des Sciences Physiologiques**, 26: 161-173.
- Sullivan, J.P.; Jassim O.; Fahrbach, S.E.; Robinson, G.E. 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior**, 37: 1-14.
- Teixeira, L.V. 2006. **Variações ontogenéticas nos parâmetros do ritmo respiratório de operárias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Departamento de Biologia, 57 p.
- Teixeira, L.V.; Waterhouse, J.M.; Marques, M.D. 2011. Respiratory rhythms in stingless bee workers: circadian and ultradian components throughout adult development. **Journal of Comparative Physiology A**, 197: 361-372.
- Toma, D.P.; Bloch, G.; Moore, D.; Robinson, G.E. 2000. Changes in *per* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97(12): 6914-6919.
- Whitfield, C.W.; Ben-Shahar, Y.; Brillet, C.; Leoncini, I.; Crauser, D.; LeConte, Y.; Rodriguez-Zas, S.; Robinson, G.E. 2006. Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, 103(44): 16068-16075.
- Wille, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Annual Review of Entomology**, 28: 41-64.
- Wilson, E.O. 1971. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press of Havard University Press, 548 p.
- Winston, M.L.; Fergusson, L.A. 1985. The effect of worker loss on temporal caste structure in colonies of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Canadian Journal of Zoology**, 63: 777-780.
- Withers, G.S.; Fahrbach, S.E.; Robinson, G.E. 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**, 364: 238-40.