

Cintia Etsuko Yamashita

Mapeamento histológico das áreas  
protocerebrais e do complexo  
retrocerebral de operárias de *Melipona*  
*quadrifasciata anthidioides*  
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

São Paulo

2009

Cintia Etsuko Yamashita

Mapeamento histológico das áreas  
protocerebrais e do complexo  
retrocerebral de operárias de *Melipona*  
*quadrifasciata anthidioides*  
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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): Mirian David Marques

São Paulo  
2009

## Ficha Catalográfica

Yamashita, Cintia Etsuko

Mapeamento histológico das áreas  
protocerebrais e do complexo retrocerebral de  
operárias de *Melipona quadrifasciata*  
*anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)  
83 p.

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

1. *Melipona quadrifasciata anthidioides*  
2. Protocérebro 3. Complexo retrocerebral  
I. Universidade de São Paulo. Instituto de  
Biotecnologia. Departamento de Fisiologia Geral.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

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

Aos meus pais e ao meu irmão,  
pelo apoio incondicional  
em todos os momentos  
da minha vida.

A B F C Dm Am B<sup>b</sup> F B<sup>b</sup><sub>6</sub> C F C Dm Am B<sup>b</sup> F B<sup>b</sup><sub>6</sub> C  
 E F C Dm Am B<sup>b</sup> F B<sup>b</sup><sub>6</sub> C F C  
 Dm Am B<sup>b</sup> F B<sup>b</sup><sub>6</sub> C F Am C Dm F B<sup>b</sup> F B<sup>b</sup><sub>6</sub> C

*Tuchos de Canon,*  
*Johann Pachelbel*  
*(1663-1706)*

## **Um agradecimento especial**

Este projeto não teria a menor possibilidade de execução sem a participação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Freymüller Haapalainen. Na verdade, ela atuou como co-orientadora, assumindo riscos e responsabilidades da aplicação de testes em um sistema biológico que lhe era completamente desconhecido. Todos os procedimentos histológicos foram feitos em seu impecável laboratório: o Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da Universidade Federal de São Paulo. Além da cessão do espaço e equipamentos, ela permitiu – e incentivou – a atuação de seu pessoal técnico, que foi um auxílio imprescindível durante os processos de preparação das lâminas para histologia e análise ao microscópio de luz. Foi idéia sua, a reconstrução tridimensional aqui apresentada e, para tanto, ela disponibilizou microscópio, computadores e programas especiais, juntamente com o especialista que orientou todo o processo. Em todos os momentos, ela se dispôs a sugerir técnicas e a discutir resultados, tendo sempre alternativas para oferecer. Com atitudes como estas descritas, aprendi com ela o sentido de colaboração científica que implica profissionalismo, dedicação e absoluto desinteresse material. A ela, aqui fica meu agradecimento mais sincero e aquele de todos do Laboratório de Cronobiologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

## **Agradecimentos**

Agradeço:

À Profª Drª Mirian David Marques, por ter sido minha Orientadora e ter participado com afinco em todas etapas deste trabalho. Ela sempre se mostrou disposta a conversar, discutir e me ajudar de todas as formas possíveis e inimagináveis. Agradeço por todos ensinamentos, todas as sugestões e correções minuciosas. Obrigada por me ajudar a manter minha mente (e até estômago) em ordem, pela amizade e momentos de descontração. Dada sua alegria em trabalhar na área do conhecimento e sua postura íntegra frente à pesquisa científica, tenho-na como exemplo a ser seguido.

A toda minha família. Meus pais, Izuru e Tereza, e meu irmão, Eduardo, sempre me apoiaram e incentivaram a trabalhar com o que eu gosto. Devo a eles todo o suporte emocional e a postura de sempre procurar dar o melhor. Não conseguiria realizar este trabalho sem o amor de cada um. Aos meus tios e primos, obrigada pelo apoio.

Ao Marco Antonio Pires Camilo Lapa, por todo amor, carinho e compreensão.

A todos do Centro de Microscopia Eletrônica (CEME): André Haraguti Aguilera, Patrícia Cristina Milanez, Márcia Fujie Araguth Tanaka, Maria Isabel dos Santos e Thiago Cesar Prata Ramos, por terem sido essenciais durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao André devo todo o meu aprendizado prático das técnicas histológicas. Sem ele, eu não teria conseguido fazer os cortes da cabeça da abelha (com o EXOESQUELETO!). Sua experiência, paciência e determinação foram fundamentais e o reflexo do seu empenho está também presente neste trabalho. À Patrícia por me ajudar muito durante a aquisição das imagens dos cortes histológicos e pelas dicas durante a reconstrução tridimensional. À Márcia pelas dicas, sugestões e auxílios durante as muitas horas que passei na 'companhia' do micrótomo. À Maria Isabel que sempre resolveu toda parte burocrática. Ao Thiago que me ensinou a utilizar o programa de

reconstrução tridimensional, por ter realizado o tratamento gráfico no Blender e o vídeo do complexo retrocerebral ('Lola').

Ao Prof Dr Alexandre Peixoto do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, do Instituto Oswaldo Cruz – RJ, por ter me disponibilizado seu excelente laboratório e demais instalações para os ensaios de imunomarcção.

À Profª Drª Rafaela Vieira Bruno, do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, do Instituto Oswaldo Cruz – RJ por ter me ajudado diretamente nos ensaios de imunomarcção que apresento neste trabalho. Por todas as horas de experimento, as trocas de informações 'cronobiológicas', e as 'eternas' horas no confocal. Em todos os momentos que passei ao seu lado sua determinação e alegria foram contagiantes, sem que a seriedade científica ficasse de lado. Agradeço também ao Paulo que junto com a Rafaela me hospedaram e me proporcionaram momentos inesquecíveis.

Ao João Silveira Moledo Gesto, do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, do Instituto Oswaldo Cruz – RJ, que me introduziu ao mundo da imunocitoquímica com muita alegria e dedicação. Por procurar resolver todos os empecilhos da melhor forma possível para que eu pudesse realizar meus experimentos. Além de ter me apresentado o Arthromint.

Aos meus companheiros de 'batalha' (e faxina) do Laboratório de Cronobiologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Jessica Martins Camargo, Rodrigo Cantamessa Golçalvez, Débora Cosignani, Fábio Nascimento e Laura Varella Teixeira; todas as conversas, os auxílios, as risadas e a amizade foram mais do que essenciais para mim.

À Profª Drª Gisele Akemi Oda, do Laboratório de Cronobiologia, do Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo, por permitir a instalação de colônias de abelhas no seu laboratório. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar e a conversar sobre todos os assuntos, principalmente sobre conceitos e curiosidades científicas.

Ao Prof Peter Verleyen, da Universidade de Leuven, Bélgica, por me ceder tão prontamente o anticorpo anti-Corazonina.



Ao Prof Dr Johan Billen, da Universidade de Leuven, Bélgica; Prof Dr Christopher Tudge, da American University, Estados Unidos; Prof Dr Carsten H. G. Muller, da Universidade de Rostock, Alemanha, pela atenção em sugerir inúmeras e preciosas sugestões sobre técnicas histológicas que poderiam ser empregadas para cortar a cabeça da abelha com a presença do exoesqueleto.

À Dr<sup>a</sup> Denise Loli que prontamente me concedeu abelhas para alguns dos meus experimentos.

Prof Dr Alberto de Freitas, do Instituto de Biociências, por permitir o uso do microscópio confocal de seu laboratório.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Visconti, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pelo empréstimo de materiais e por toda atenção que se dispôs em me ajudar.

Ao Prof Dr Márcio Reis Custódio, do Departamento de Fisiologia, por me disponibilizar seu laboratório e seu microscópio para captura de imagens.

Ao Dr Enrique Rozas por sua amizade e por me ajudar diretamente na captura de imagens dos cortes histológicos.

Ao Enio, técnico do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; ao Adilson e Júnior do Instituto de Biomédicas da Universidade de São Paulo, por tentarem me ajudar a estabelecer um protocolo para cortar a cabeça da abelha com a presença do exoesqueleto.

À Adriana Azevedo e Simone Costa da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, pela gentileza em me disponibilizar o microscópio invertido.

Ao Dr Gustavo Resende da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, obrigada pela atenção em me ajudar, passando o protocolo da solução de Trips.

Ao Prof Dr André Oliveira e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Cheble, pela perseverança e disposição durante a aquisição de imagens no microscópio confocal.

Ao Dr Sidney Mateus por todas as dicas e ajuda, fundamentais para a criação das abelhas sem ferrão.

Ao Prof Dr Klaus Hartfelder, da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto; por todas as sugestões sobre os anticorpos que poderiam ser empregados neste trabalho.

À Dione Seripierri pela revisão tão cuidadosa e atenciosa que realizou nas Referências Bibliográficas deste trabalho.

Ao Prof Dr Nelson Papavero, por tirar todas as minhas dúvidas gramaticais de termos em latim.

À banca de qualificação: Prof Dr Gilberto Fernando Xavier, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Freymüller Haapalainen e a Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Airias; por todas sugestões e críticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

À minha querida amiga Marcella Sobral, por ter me ajudado durante as preparações histológicas, cedendo corantes e discutindo protocolos.

Aos meus queridos amigos de faculdade: Adne, Angélica, Arthur, Eduardo Macchione, Elaine, Fernando Mesquita, Flávio Gomes, Gilson, Márcia, Marina, Suzana; por tudo o que passamos juntos e pelas nossas conversas e risadas sem fim.

A todos os meus colegas e amigos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, principalmente: Ana Paula, Arnaldo, Breno, Carol, Fernando, João, Lucas, Mara, Renato Honji, Vitor e Wataru; por todos os momentos especiais, pelas conversas, por me ajudarem a cuidar e transportar caixas de abelhas. Obrigada por toda ajuda e amizade!

Aos alunos do Laboratório de Cronobiologia, do Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo: Bárbara, Danilo e Patrícia; pelo entusiasmo e disposição em manter o laboratório em ordem.

Ao demais membros do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Fundação Oswaldo Cruz - RJ: Carolina Spiegel, Denise, Felipe, Gabriel, Gustavo, Jorge, Kiko, Luisa, Paulo, Rachel Canto, Rachel Lins, Ricardo, Samira, Saori, Tâmara, Ademir, Jutta, Lurdinha e Robson; muito obrigada por me receberem e acolherem com tanta alegria.

Obrigada a todos os porteiros, vigias e demais funcionários do Museu de Zoologia.

A Capes e Fapesp, pelo apoio financeiro.

## Resumo

Uma colônia de abelhas sem ferrão é composta pela rainha, operárias de diferentes idades, que desempenham diferentes tarefas e por machos, presentes apenas na época anterior à fecundação da rainha. Dentre as operárias, somente as mais velhas – forrageiras - mantém contato direto com o ciclo claro/escuro ambiental. Ritmos biológicos estão presentes e são gerados pelo sistema circadiano localizado no sistema nervoso central e no complexo retrocerebral. Este sistema é composto por uma rede de múltiplos osciladores integrados com vias aferentes, provenientes do sistema sensorial, e eferentes. As vias eferentes se expressam através de componentes nervosos, neurohormonais e hormonais.

Neste trabalho, o sistema nervoso central e o complexo retrocerebral de forrageiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi mapeado, usando procedimentos histológicos clássicos, complementados por ensaios de imunocitoquímica. Anticorpos gerados contra Fasciclina II, PDF e Corazonina foram utilizados e a marcação obtida foi específica.

Neurópilas estão presentes, tanto nos lobos ópticos como no cérebro e são áreas de referência para identificação das diferentes estruturas. As neurópilas do lobo óptico: lâmina, medula e lóbula, são regiões bem delimitadas e evidentes. O protocérebro é o gânglio cerebral mais dorsal e com o maior volume. Nele encontram-se dois conjuntos neuropilares: os *corpora pedunculata*, de forma cogumelar, que ocupam grande parte do protocérebro; e o complexo central, na linha média. Duas regiões protocerebrais concentram células neurosecretoras: *pars intercerebralis* e *pars lateralis*. O complexo retrocerebral é composto por duas glândulas pares: *corpora cardiaca* e *corpora allata*. A localização espacial destas estruturas foi reconstruída em imagens tridimensionais.

Reconhece-se no sistema nervoso central e no complexo retrocerebral de *M. quadrifasciata* estruturas com características morfológicas e localização espacial específicas da espécie. Os resultados encontrados neste trabalho são as informações anatômicas básicas imprescindíveis para estudos posteriores que visam identificar os componentes e a organização do sistema circadiano em abelhas sem ferrão.

## **Abstract**

The stingless bees colony comprises a queen, workers of different ages that perform different tasks and males only present before the queen's fecundation. Among the workers, only the oldest ones – foragers – keep a direct contact with the light/dark environmental cycle. Biological rhythms are present and are generated by the circadian system located in the central nervous system and in the retrocerebral complex. This system is composed by a web of multiple oscillators coupled to input pathways from the sensorial system and output pathways. The output pathways consist in nervous, neurohormones and hormones components.

In this study, the central nervous system and the retrocerebral complex of *Melipona quadrifasciata* foragers were analyzed by classical histological procedures complemented by immunocytochemical essays. Specific reactive antibodies against Fasciclin II, PDF and Corazonin have been used.

The optic lobes neuropils: lamina, medulla and lobula are distinct and evident. The protocerebrum is the dorsal most and largest ganglia. In this structure two neuropilar groups are present: *corpora pedunculata*, the bilateral “mushroom bodies” that occupy a large portion of the protocerebrum; and the central complex in the median line. Neurosecretory cells cluster together in two protocerebral regions: *pars intercerebralis* and *pars lateralis*. The retrocerebral complex is composed by two pairs of glands: *corpora cardiaca* and *corpora allata*. In this work, tridimensional images show their specific localization in the nervous system.

In both, central nervous system and retrocerebral complex of *M. quadrifasciata*, species specific traces can be recognized in morphological characteristics and spatial localization of certain structures. The results on the anatomy of stingless bees' nervous system shown here are indispensable to proceed with studies that aim to identify the components and the organization of the circadian system of stingless bees.

## Índice

	Página
Resumo.....	xi
<i>Abstract</i> .....	xii
I. Introdução.....	1
II. Objetivo.....	18
III. Justificativa.....	18
IV. Material e Métodos.....	19
V. Resultados.....	27
VI. Discussão.....	59
VII. Conclusões.....	73
VIII. Referências Bibliográficas.....	75

## I. Introdução

### As abelhas sem ferrão

A sub-família Apinae é composta por dezenove tribos, incluindo as abelhas que apresentam uma estrutura dilatada na tíbia especializada no transporte de pólen, denominada corbícula. As abelhas corbiculadas são classificadas nas tribos: Apini, Bombini, Euglossini, Meliponini. (Michener, 2000). Destas, apenas Apini e Meliponini expressam um alto nível de organização social, com características eussociais evidentes nas colônias. Estas características incluem a sobreposição de pelo menos duas gerações, com divisão reprodutiva entre os indivíduos e o consequente estabelecimento de castas (Wilson, 2000).

A tribo Apini é composta pelas abelhas “verdadeiras” ou com ferrão. No gênero *Apis* reconhecem-se atualmente sete espécies. Essas espécies são restritas à Eurásia e à África, mas a espécie mais comum, *Apis mellifera* foi introduzida em todas as partes do mundo (Michener, 1974).

Os Meliponini incluem as abelhas indígenas sem ferrão. Nesta tribo reconhecem-se 56 gêneros e mais de 600 espécies distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo 400, apenas na região Neotropical (citado em Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Os caracteres que diferenciam os Meliponini dos Apini são: redução do número de nervuras nas asas, presença do penicillum (uma ou mais fileiras curtas de cerdas longas e curvas na margem externa do ápice das tíbias) (Winston & Michener, 1977), ferrão reduzido ou ausente e glândula de cera na região dorsal (nos Apini, a glândula fica na região ventral) da cavidade abdominal da operária (Sakagami, 1982; Wille, 1983). Nos Meliponini, é possível notar uma grande diversidade de organização entre as espécies, porque o número de indivíduos numa colônia pode variar de uma centena a milhares; a arquitetura da colônia é muito diferente de uma espécie para outra; o tamanho do corpo dos indivíduos, que vai de 2 a 14 mm de comprimento nas diferentes espécies e até as estratégias de forrageamento (Slaa *et al.*, 2006).

Das abelhas sem ferrão, a espécie *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia) tem sido foco de muitos estudos, provavelmente por conta de sua importância econômica, sua frequente ocorrência e o grande tamanho dos indivíduos. Possui ampla distribuição geográfica ao longo da costa brasileira, da Paraíba até o sul do Rio Grande do Sul (Moure & Kerr, 1950). Ela apresenta duas sub-espécies: *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*, sendo a primeira encontrada nas regiões mais altas e frias da Mata Atlântica (do estado de São Paulo ao Rio Grande do Sul), enquanto que *M. quadrifasciata anthidioides* encontra-se em regiões de temperatura mais elevadas (do Nordeste ao estado de São Paulo).

As colônias de *Melipona quadrifasciata* são construídas em troncos ou ramos ocos de árvore (Sakagami, 1982; Michener, 1974). Todas as colônias, independentemente de seu tamanho e do local de nidificação, exibem uma divisão clara dos seus elementos estruturais. Todas elas exibem a mesma divisão em áreas que podem apresentar formas características, dependendo da espécie. As áreas que compõem uma colméia de meliponíneos são: o tubo de entrada (que conecta a colônia ao ambiente externo), a área onde se localizam os potes de alimento e a região de depósito de lixo (localizadas na periferia da colônia) e o ninho, onde ficam reunidos os favos de cria (localizado no centro da colônia).

Na colônia de meliponíneos, além dos machos cuja presença é restrita as fases de reprodução, é possível reconhecer duas castas reprodutivas, a rainha e as operárias. Geralmente as rainhas de abelhas sem ferrão, em comparação com as operárias, apresentam: cabeça e olhos menores, antenas maiores e asas menores (Sakagami, 1982). Na colônia de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre apenas uma rainha fisogástrica. Ela é fecundada no vôo nupcial e, em seguida, inicia a postura de ovos férteis que darão origem a machos, rainhas virgens e fêmeas estéreis.

Entre as operárias é possível reconhecer subdivisões relacionadas às tarefas desempenhadas dentro da colônia. A especialização comportamental não se expressa, como nas formigas, com diferenças morfológicas entre as subcastas, mas está intimamente associada a padrões temporais. As operárias desempenham tarefas distintas de acordo com a idade, configurando uma

situação conhecida como polietismo etário (Robinson, 1992). Esta divisão temporal é bem conhecida em *Apis* e situação semelhante ocorre nas abelhas sem ferrão (Michener, 1974). Operárias jovens constroem, reparam e depositam alimento larval nos favos de cria (Cepeda, 2006). Operárias de idade intermediária desempenham funções relacionadas com a manutenção estrutural da colônia, alimentam as abelhas mais jovens e a rainha, constroem favos de alimento e recebem o néctar. Pouco mais velhas passam a guardar a entrada da colônia e a remover materiais descartados. Por último, assumem o forrageamento no ambiente (Wille, 1983). Vale ressaltar que esta divisão de trabalho apresenta um fator plástico que permite diferentes possibilidades de re-alocação de atividades desempenhadas pelas operárias de acordo com as necessidades da colônia (Gordon, 1996).

A divisão de tarefas entre as operárias está intimamente associada com a arquitetura da colônia. As abelhas mais jovens desempenham funções no centro da colônia, onde estão os favos de cria. À medida que se tornam mais velhas, passam para regiões progressivamente mais periféricas da colmeia até que passam a voar no ambiente externo. Portanto, observa-se uma divisão centrífuga de atividades de acordo com a idade das operárias (Bourke & Franks, 1995). Esta progressão é acompanhada por uma transição de micro-climas: de uma condição quase homogênea encontrada nos favos de cria (local de escuro constante e variação muito pequena de temperatura), até seu contato direto com as grandes variações presentes no ambiente externo.

Muitas atividades desempenhadas nas diferentes porções da colônia apresentam um componente rítmico (Marques & Yamashita, 2008). Um exemplo é a arquitetura da colônia que é diferente a cada estação do ano; a região dos favos de cria é maior no verão e a porção de potes de alimentos é maior durante o inverno e outono (Cosignani *et al.*, em preparação). O processo de construção e provisionamento das células de cria, seguido pela oviposição da rainha (abreviadamente POP) é comportamento presente exclusivamente em meliponíneos e a sequência de eventos forma um ciclo que se repete continuamente (Zucchi *et al.*, 1999). No POP, a duração das atividades e



comportamentos é específica para cada espécie, sendo o ciclo como um todo reflexo do ciclo de oviposição da rainha (Zucchi *et al.*, 1999; Bellusci, 2003).

Forageiras são as únicas operárias que mantém contato direto com o ciclo claro/escuro ambiental. Como suas saídas para o campo são restritas à fase clara do dia, um ritmo diário de atividade torna-se bastante evidente (Bellusci & Marques, 2001). Este ritmo é responsável pela sincronização da atividade das abelhas com a abertura das flores e com a disponibilidade de néctar e pólen. Durante a fase escura, as forrageiras de *M. quadrifasciata* permanecem no interior da colônia.

A dinâmica entre os indivíduos de uma colméia de meliponíneos representa um caso extremo de interdependência. Nenhuma abelha é capaz de sobreviver isoladamente, cada uma das castas e sub-castas depende das outras e o modo como elas se relacionam é expresso pelo amplo repertório comportamental de cada um dos componentes.

### **Estrutura geral do sistema nervoso central dos insetos**

O comportamento expresso nos organismos é o resultado da integração e coordenação de diversas vias fisiológicas, das quais o sistema nervoso é considerado o principal centro.

O cérebro dos insetos é proveniente do arquicérebro dos anelídeos que, por sua vez, é resultante da fusão de diversos centros nervosos primários. Nos anelídeos, o arquicérebro fica localizado acima da porção terminal anterior do trato alimentar. Dois nervos latero-ventrais percorrem longitudinalmente toda a extensão do corpo e ligam-se ao arquicérebro. Células nervosas primárias, os neurócitos, agregam-se em cada segmento do corpo, resultando no surgimento de gânglios segmentares. Neste estágio, o sistema nervoso central é constituído por um cérebro anterior, o arquicérebro, localizado na cabeça; dois cordões nervosos ventrais localizados na região latero-ventral do corpo e os gânglios são unidos longitudinalmente por conectivos e transversalmente por comissuras (Snodgrass, 1935).

O cérebro é composto por três regiões de origens evolutivas diferentes. Estas regiões consistem em gânglios nervosos distintos, mas estreitamente associados. O primeiro gânglio corresponde aos apêndices pré-antenas dos artrópodos primitivos e é chamado protocérebro. Os centros nervosos correspondentes ao primeiro segmento antenal do embrião constituem a segunda porção do cérebro, denominada deutocérebro. Em todos os insetos e na maioria dos crustáceos, os centros nervosos do segundo segmento antenal do embrião formam a terceira parte do cérebro, o tritocérebro. Repetindo a situação ancestral, de cada lobo tritocerebral sai um conectivo que se dirige ao primeiro gânglio da cadeia nervosa ventral. Os dois conectivos contornam o estomodeo (região anterior do canal alimentar do embrião) e são parte do anel periesofágico do adulto (Snodgrass, 1935).

É interessante salientar que os lobos ópticos, grandes massas de tecido nervoso subjacente aos olhos compostos, têm sua origem a partir do arquicérebro dos anelídeos (Snodgrass, 1935).

Todas as porções do cérebro e dos gânglios apresentam um arranjo de fibras, conhecido como neurópila. A neurópila é constituída por ramificações terminais dos neurônios sensoriais, por arborizações dendríticas de neurônios motores e por arborizações dendríticas e ramificações axonais de interneurônios (Bullock & Horridge, 1965).

O cérebro recebe as informações dos órgãos sensoriais da cabeça e dos gânglios do cordão ventral. O protocérebro é a região mais anterior e dorsal, de maior volume. Em sua neurópila é possível reconhecer estruturas bilaterais em forma cogumelar, denominadas corpora pedunculata ou “mushroom bodies”. Nos insetos, o tamanho e a complexidade dessas estruturas são associados à ‘inteligência’. Dujardin (1850) foi o primeiro a descrever em detalhes o cérebro de um inseto e indicou que aqueles mais ‘inteligentes’, como formigas e abelhas, teriam os maiores corpora pedunculata (citado em Howse, 1975).

De maneira geral, os corpora pedunculata são formados pelas células de Kenyon (Kenyon, 1896; Mobbs, 1985; Fahrbach, 2006). A massa de ramificações dendríticas das células de Kenyon formam uma massa neuropilar denominada cálice e o número de cálices varia nas diferentes ordens de insetos. Os cálices

podem apresentar desenvolvimento completo, como nos Hymenoptera, ou incompleto, como em alguns Lepidoptera e Hemiptera (Flögel, 1878; citado em Kenyon, 1896). Na maioria dos insetos, os corpos celulares das células de Kenyon estão organizados em volta dos cálices dos *corpora pedunculata*. As projeções axonais das células de Kenyon constituem os pedúnculos, que por sua vez ramificam-se em dois lobos ou três lobos.

Os *corpora pedunculata* são os principais centros associativos sensoriais e estão envolvidos com vários processos fisiológicos e comportamentais. Além de serem atribuídos a essas estruturas diversos processos ligados à memória e ao aprendizado (Hammer & Menzel, 1995; Menzel & Manz, 2005; Giurfa, 2007). Características estruturais dos *corpora pedunculata* fornecem boas indicações de suas funções, como acontece com o cálice, onde chegam projeções provindas dos olhos compostos e das antenas (Kenyon, 1896; Mobbs, 1985; Iwama & Shibuya, 1998; Kirschner *et al.*, 2006).

Na região central do cérebro localiza-se o complexo central, formado por quatro neurópilas interconectadas: a pons cerebrealis, o corpo central superior, o corpo central inferior e os nódulos. Essa constituição é característica dos insetos, uma vez que nos Crustacea, o complexo central é uma massa glomerular única (Snodgrass, 1935). O tamanho do complexo central varia nas ordens de insetos. Nos Apterygota, ele é bem desenvolvido e bastante reduzido nos Hymenoptera (Bullock & Horridge, 1965). O complexo não possui nervos diretamente conectados a ele, mas é um importante centro de associação de terminações nervosas de todas as partes do cérebro (Snodgrass, 1935). Já foi demonstrado que o complexo central está envolvido na comunicação acústica relacionada à reprodução em grilos (Weinrich *et al.*, 2008) e em diversos processos sensoriais relacionados a tempo-espaço, como na orientação espacial da borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Zhu *et al.*, 2008).

Um outro componente presente no cérebro de todos os insetos é um tipo de célula nervosa especializada, cujo corpo celular é relativamente grande, que ao invés de produzir neurotransmissores produz pequenos polipeptídeos (neurohormônios) ou em certos casos, aminas biogênicas (Chapman, 1998). Esta célula é denominada célula neurosecretora (Nijhout, 1994). Além do cérebro, as

células neurosecretoras estão presentes em todos os gânglios do sistema nervoso central dos insetos. Elas não secretam seus produtos nas terminações sinápticas, mas projetam seus axônios para estruturas especializadas que liberam suas secreções diretamente na hemolinfa (Nijhout, 1994).

No cérebro da maioria dos insetos existem duas grandes regiões em que concentram numerosas células neurosecretoras, a *pars intercerebralis* e a *pars lateralis* (Mobbs, 1985, Nijhout, 1994; Chapman, 1998). Ambas possuem projeções para o complexo retrocerebral. A *pars intercerebralis* está localizada entre os lobos protocerebrais e é constituída por células de diferentes origens embrionárias (Ludwig *et al.*, 2002). Algumas das células da *pars intercerebralis* estão envolvidas em diversos comportamentos, como na atividade locomotora (Belgacem & Martin, 2002, 2007), no comportamento de vôo (Diederer *et al.*, 1988; citado em De Velasco *et al.*, 2007) e na regulação da reprodução e longevidade em fêmeas de *Pyrrhocoris apterus*, Coleoptera (Hodkova, 2008). As *pares laterales* variam em posição no cérebro, em alguns insetos têm uma posição mediana com relação aos *corpora pedunculata*, em outros, estão próximas aos lobos ópticos. Assim como a *pars intercerebralis*, a *pars lateralis* deriva da placa neuroectodermal da região dorso-medial da cabeça (De Velasco *et al.*, 2007). Em alguns Diptera e Hymenoptera, as células das *pares laterales* estão associadas com as células neurosecretoras da *pars intercerebralis* (Nijhout, 1994). As células da *pars lateralis* estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como na sinalização do processo de ecdise em *Manduca sexta*, Orthoptera (Kim *et al.*, 2004), mudanças no padrão de coloração de gafanhotos (Roller *et al.*, 2003, Tanaka, 2006) e junto com a *pars intercerebralis* está envolvida no processo de diapausa no adulto de *Protophormia terraenovae*, Diptera (Hamanaka *et al.*, 2007).

Da região lateral do protocérebro saem dois lobos que chegam às retinas e constituem os lobos ópticos. Em cada lobo óptico encontram-se 3 grandes regiões neuropilares: lâmina, medula e lóbula. Entre as neurópilas dos lobos ópticos existem fibras nervosas que se cruzam horizontalmente, formando os quiasmas ópticos interno e externo (Chapman, 1998). Os lobos ópticos são responsáveis pela transmissão das informações sensoriais captadas pelos olhos compostos ao cérebro, onde ocorrem a associação e a integração do sinal.

O deutocérebro é o segundo gânglio do cérebro, localizado ventral e posteriormente ao protocérebro. Esta região é constituída pelos lobos da antena, pelas fibras mecanossensíveis das antenas e por centros motores (Chapman, 1998). Os lobos da antena são constituídos por pequenas porções neuropilares, os glomérulos, sendo que em alguns insetos essas estruturas são envoltas por células da glia (Chapman, 1998). Os lobos da antena são considerados os centros primários do olfato no cérebro dos insetos. Os estímulos sensoriais são captados pelas antenas e enviados até essas estruturas através de tratos sensoriais da antena. As projeções axonais dos lobos da antena partem para diversas áreas cerebrais através dos tratos anteno-cerebrais (Kirschner *et al.*, 2006).

O tritocérebro é a terceira e menor porção do cérebro. Ele é formado por dois lobos bilaterais, localizados atrás do deutocérebro. Deles partem os conectivos periesofágicos, que chegam ao gânglio sub-esofágico, o primeiro gânglio do cordão nervoso ventral. Os lobos tritocerebrais estão ligados por uma comissura que contorna parcialmente o esôfago (Snodgrass, 1935). Os principais nervos do tritocérebro são: os conectivos frontais e os nervos do labro. Filogeneticamente, os lobos tritocerebrais representam o primeiro par de gânglios do cordão nervoso ventral primitivo, sendo que sua união com o cérebro é secundária (Snodgrass, 1935).

Numa posição posterior e ventral, com relação ao cérebro, encontra-se o complexo retrocerebral, composto por glândulas endócrinas pares: as glândulas protorácicas, os corpora cardiaca e os corpora allata. Como dito anteriormente, projeções da *pars intercerebralis* e da *pars lateralis*, chegam ao complexo retrocerebral. O sistema formado pela *pars intercerebralis* e pelo complexo retrocerebral dos insetos possui paralelos com o sistema hipotálamo-hipófise dos vertebrados (Scharrer & Scharrer, 1944). O complexo retrocerebral pertence ao sistema endócrino dos insetos e tem papel fundamental em diversas etapas do metabolismo, principalmente nos processos de muda.

As glândulas protorácicas têm origem ectodérmica e estão localizadas no tórax de muitos insetos (Chapman, 1998). Geralmente possuem disposição difusa e o seu número varia de acordo com a espécie. Elas desempenham papel fundamental durante os estágios imaturos do inseto, uma vez que este é o local de

síntese do hormônio da muda. As glândulas protorácicas degeneram nos adultos de todos os insetos, com exceção dos Apterygota, que apresentam mudas cuticulares ao longo de toda a vida.

Os *corpora cardiaca* estão frequentemente associados à aorta e são conectados ao protocérebro por um par de nervos e ao gânglio hipocerebral por um único nervo. Cada *corpus cardiacum* apresenta células secretoras intrínsecas com longas projeções citoplasmáticas, que provavelmente facilitam a liberação da secreção na hemolinfa (Chapman, 1998). Esta estrutura é responsável por armazenar e liberar hormônios provenientes das células neurosecretoras do cérebro. Suas células também são capazes de sintetizar hormônios, como o hormônio adipocinético e outros peptídeos cuja função fisiológica ainda é desconhecida (Chapman, 1998).

Os *corpora allata* são corpos glandulares geralmente dispostos um de cada lado do esôfago. Na maioria dos insetos, os *corpora allata* são órgãos sólidos, compostos por células glandulares secretoras. Eles sintetizam o hormônio juvenil cuja principal função é regular a metamorfose e, em algumas espécies, sintetizar vitelo e para sua deposição nos ovos (Chapman, 1998).

## Ritmos biológicos

A precisão temporal com que os processos fisiológicos e comportamentais ocorrem é conferida pela existência de um sistema temporizador. A maioria dos organismos estudados apresenta ritmos que se mantêm mesmo em condições ambientais constantes (condição de livre-curso), o que demonstra o caráter endógeno do ritmo biológico (Aschoff, 1960).

O período do ritmo endógeno é próximo, mas diferente dos ciclos ambientais e é denominado período em livre-curso, expresso pela letra grega  $\tau$  (tau). O  $\tau$  é espécie específico e pode ser classificado, conforme sua frequência, em ultradiano ( $\tau < 20$  horas), infradiano ( $\tau > 28$  horas) e circadiano ( $\tau$  variando entre 20-28 horas) (Marques *et al.*, 2003).

Quando o organismo é exposto aos ciclos ambientais, seu ritmo endógeno é sincronizado por ele em um processo conhecido como arrastamento (Pittendrigh, 1981). Os ciclos ambientais que promovem arrastamento são denominados zeitgebers, neologismo alemão criado por J. Aschoff (1960) para designar 'doadores de tempo'. O ciclo claro/escuro é o *zeitgeber* responsável pelo arrastamento fótico do ritmo de atividade/repouso da maioria das espécies.

### **Componentes do Ritmo Circadiano**

O ritmo circadiano é entre os 'circa-ritmos' o mais estudado e entendido. Nos insetos, ele se expressa em processos ligados ao desenvolvimento e à reprodução, nas variações das taxas de hormônios, na sensibilidade fotorreceptora, na atividade locomotora e em muitas outras variáveis fisiológicas (citado em Helfrich-Förster *et al.*, 1998). Ele também é essencial para a navegação orientada pelo Sol e compensada no tempo e em respostas fotoperiódicas (citado em Helfrich-Förster *et al.*, 1998; Saunders, 2002).

O sistema circadiano é composto por uma rede de múltiplos osciladores, que acoplados mantém a organização temporal em um organismo. Ainda que estes osciladores originem ritmos de períodos diferentes, a expressão final é circadiana (Dunlap *et al.*, 2004). A rede de osciladores encontrada desde moluscos até os mamíferos, é formada por um oscilador central e outros secundários (Dunlap *et al.*, 2004). O sistema circadiano é composto por três componentes básicos: o relógio central, que gera uma oscilação circadiana; as vias aferentes de arrastamento, através das quais os *zeitgebers* sincronizam o relógio; e vias eferentes que conectam os osciladores aos centros efetores.

### **Vias de aferência**

Nos insetos, o arrastamento fótico pode ocorrer através de muitas vias fotorreceptoras. Em baratas, experimentos de ablação identificaram os olhos compostos como a principal via de aferência aos osciladores (Nishiitsutsuji-Uwo & Pittendrigh, 1968a, b).

Em drosófila, cinco fotorreceptores e/ou fotopigmentos parecem estar envolvidos na percepção luminosa e na sincronização do relógio biológico: os olhos compostos, os ocelos, os receptores de Hofbauer-Büchner, H-B, e o fotopigmento criptocromo *blue-light* (Rieger *et al.*, 2003). Cada componente contribui de formas e pesos diferentes. Os ocelos, por exemplo, parecem não ser essenciais para a sincronização do ritmo de locomoção (Helfrich-Förster *et al.*, 1998).

### **Oscilador**

A localização do oscilador central do sistema circadiano nos insetos é diferente nos hemi e holometábolos. Nos hemimetábolos, os osciladores principais encontram-se nos lobos ópticos. Nos holometábolos, com exceção dos coleópteros que possuem hipermetamorfose, a localização muda e passa a ser nas regiões periféricas do protocérebro. Esta mudança deve ter acontecido em função da metamorfose completa, que implica a histólise de todas as vias nervosas que saem dos órgãos fotorreceptores da larva (estemata) em direção ao cérebro. Assim, a metamorfose deve ter sido a pressão de seleção que provocou a passagem dos osciladores centrais dos lobos ópticos para o interior do cérebro nos holometábolos (Truman, 1971).

Em grilos, baratas e besouros, o oscilador principal parece estar na medula acessória (Helfrich-Förster *et al.*, 1998), uma neurópila adjacente à medula e a lóbula do lobo óptico. A medula acessória é constituída por projeções de neurônios intrínsecos, da lâmina, dos neurônios do lobo óptico contralaterais e do protocérebro dorsal (Petri *et al.*, 1995; Helfrich-Förster *et al.*, 1998). Na drosófila, que é o inseto cuja organização do sistema circadiano é a mais conhecida, o oscilador principal consiste em dois conjuntos neuronais: os neurônios laterais localizados ao lado da medula do lobo óptico próximo ao protocérebro lateral (ou seja, espacialmente perto da medula acessória); e os neurônios dorsais localizados na região dorsal do protocérebro (Helfrich-Förster *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2001; Taghert & Shafer, 2006). Os neurônios laterais possuem projeções ipsilaterais e contralaterais para neurópilas do lobo óptico, ipsilaterais para a medula acessória e para o protocérebro dorsal. Já os neurônios dorsais possuem



conexões com várias partes do cérebro, inclusive com o complexo retrocerebral, via células da *pars intercerebralis* e *pars lateralis* (citado em Helfrich-Förster, 1998). Já na mariposa *Manduca sexta*, o oscilador central parece ser composto por células neurosecretoras da *pars lateralis* (Wise *et al.*; 2002).

A geração do ritmo circadiano pelos osciladores é atribuída a mecanismos moleculares e genéticos. Diversos genes do relógio já foram identificados e são divididos de acordo com a natureza molecular dos seus produtos (Hardin, 2005). Existem fatores que ativam a transcrição gênica, como: *Clock (Clk)*, *Cycle (Cyc)* “*Par domain protein 1ε*” (*PDP1ε*); fatores que reprimem a transcrição, *Period (Per)* e *Timeless (Tim)*; *Vrille (Vri)*; fatores que alteram a estabilidade de proteínas: *Doubletime (Dbt)*, *Shaggy (Sgg)*, *proteína fosfatase 2a (PP2a)*; e fatores que degradam proteínas: *F-box/WD40 proteína Slimb (Slimb)* (Hardin, 2005). A cada dia novas engrenagens deste relógio molecular são descobertas, revelando um sistema altamente complexo e passível de modulação. Resumidamente, a maquinaria molecular é composta por alças de retroalimentação positivas e negativas, envolvendo a transcrição e a tradução dos genes do relógio (Dunlap, 1999; Hardin, 2005).

### **Vias de eferências**

A maquinaria molecular exposta acima é responsável pela geração da expressão circadiana, mas a transmissão do ritmo gerado depende do envolvimento de vias eferentes. A informação oscilatória é sinalizada em um organismo através de elementos nervosos, hormonais e neurohormonais.

O conjunto de células da *pars intercerebralis* e *pars lateralis* que são capazes de secretar neuropeptídeos e o complexo retrocerebral, parecem ser componentes fundamentais para a expressão do ritmo circadiano nos diferentes insetos.

Uma das vias de eferência do relógio que controla o ritmo locomotor da barata *L. maderae* consiste em projeções que ligam os lobos ópticos com neurônios da *pars intercerebralis* (Nishiitsutsuji-Uwo *et al.*, 1967). No grilo, *Achaeta domesticus* há um ritmo circadiano de síntese de RNA (Cymborowski & Dutkowski, 1969, 1970) e de mudanças estruturais nas células neurosecretoras

da *pars intercerebralis*, relacionadas à atividade locomotora (Dutkowski *et al.*, 1971). Larvas de *Drosophila melanogaster* apresentam ritmos bimodais diários no tamanho nucleolar e nuclear das células neurosecretoras, dos *corpora allata* e das glândulas protorácicas (Rensing, 1964a, b). Nas abelhas do gênero *Apis*, células da *pars intercerebralis* e *corpora cardiaca* apresentam ritmo de secreção com amplitude mínima ao meio-dia (Heinzeller, 1976). Células da *pars intercerebralis* em duas espécies de barata, *Blattella germanica* e *Blattella bisignata* e em duas espécies de grilo, *Dianemobius nigrofasciatus* e *Allonemobius allardi*, apresentam expressão de genes do relógio (Shao *et al.*, 2006; Wen & Lee, 2008).

Quanto aos componentes neurohormonais, diferentes linhas de pesquisa sugerem que um neuropeptídeo relacionado com o '*pigment-dispersing factor*' – PDF - de crustáceos esteja envolvido nas vias de eferência do sistema circadiano e na sincronização dos osciladores centrais localizados contralateralmente (Nässel, 2000). Nos insetos, a denominação PDF é mantida, apesar do hormônio não ter ação na pigmentação (Rao & Riehm, 1993; citado em Nässel, 2000). Os ensaios de imunomarcagem revelaram que a expressão de PDF em drosófila está restrita aos neurônios laterais, a um dos osciladores centrais e a projeções axonais na medula acessória (Helfrich-Förster & Homberg, 1993; Helfrich-Förster *et al.*, 1998). PDF está co-localizado com genes do relógio, como *period*, *tim* e *vrille*, nos neurônios laterais de drosófila (Helfrich-Förster, 1995; Blau & Young, 1999; Park *et al.*, 2000).

Os estudos indicam que PDF possui papel humoral importante nas vias de eferência do sistema circadiano. A expressão ectópica de PDF em neurônios laterais cujas projeções se estendem até o protocérebro dorsal modifica o padrão de atividade e de eclosão de larvas de drosófila (Helfrich-Förster *et al.*, 2000) e mutantes nulos de drosófila para PDF não expressam ritmicidade (Park *et al.*, 2000). A função desempenhada por este neuropeptídeo parece estar ligada a mudanças no  $\tau$  (Wülbeck *et al.*, 2008). Também em *Drosophila*, mutantes *sine oculis*<sup>1</sup> (*so*<sup>1</sup>) mostram uma grande densidade de fibras na medula acessória, contendo PDF. O ritmo de atividade desses mutantes expressa-se com um  $\tau$  maior

do que o grupo controle. Já em mutantes *so<sup>mda</sup>* e *small optic lobes;so<sup>1</sup>* (*sol<sup>1</sup>;so<sup>1</sup>*), os níveis de PDF nas fibras do protocérebro dorsal eram bem maiores do que no grupo controle e o neuropeptídeo parece encurtar o  $\tau$  do ritmo de atividade (Wülbeck *et al.*, 2008).

Os trabalhos demonstram que PDF é apenas uma parte da via de eferência do sistema circadiano. Um outro neuropeptídeo de inseto vem ganhando atenção como participante desta via: a corazonina. A corazonina foi isolada pela primeira vez, a partir de 600 *corpora cardiaca* de *Periplaneta americana* (Veenstra, 1989, citado em Roller *et al.*, 2003). Ela está presente em todos os insetos estudados até o momento, com exceção dos Coleoptera (Roller *et al.*, 2003). E ensaios de marcação específica revelaram que em todos eles, a corazonina está presente principalmente em células pertencentes à *pars lateralis* que possuem projeções para o complexo retrocerebral (Roller *et al.*, 2003). Assim como o PDF, corazonina faz parte do pequeno grupo de neuropeptídeos que ocorrem numa única isoforma (Kim *et al.*, 2004; Predel *et al.*, 2007). Corazonina apresenta três homólogos, com poucas diferenças na sequência de aminoácidos. A [Arg<sup>7</sup>]-corazonina é a expressa na maioria das ordens de inseto, [His<sup>7</sup>]-corazonina é a sequência em alguns gafanhotos, e [Thr<sup>4</sup>His<sup>7</sup>]-corazonina é a sequência encontrada apenas em *Apis* (Verleyen *et al.*, 2006; Predel *et al.*, 2007).

Com a observação de projeções contendo corazonina na região da medula acessória de *Leucophaea maderae* foi sugerida a sua participação em vias de eferência do sistema circadiano (Petri *et al.*, 1995). Em *Manduca sexta*, células da *pars lateralis*, que se supõe que sejam o oscilador central em mariposas, apresentam co-expressão de corazonina e de *Period* (proteína do relógio biológico) (Wise *et al.*, 2002).

Em drosófila, não há expressão de corazonina em células próximas da medula acessória que expressam PDF e *Period* (Wen & Lee, 2008). Porém, além da *pars lateralis*, corazonina está presente em células do lobo óptico cujas projeções estão espacialmente muito próximas de projeções, contendo PDF e *Period*, sugerindo assim conexões neurais entre esses componentes no sistema nervoso central (Wen & Lee, 2008).

Estudos na literatura atribuem ainda à corazonina um papel em mecanismos fotoperiódicos, que seria o monitoramento das mudanças sazonais do fotoperíodo, contribuindo assim para o ajuste sazonal de vários processos fisiológicos (Shiga, 2003, citado em Lee *et al.*, 2008).

Ao contrário de PDF e de corazonina que são neuropeptídeos envolvidos com o sistema circadiano, a molécula de adesão fasciclina II possui papel distinto no sistema nervoso central dos insetos. Ela é uma molécula de adesão que se expressa em um grande número de neurônios de diferenciação precoce (Nassif *et al.*, 1998). A fasciclina II se expressa na superfície de agregados de corpos celulares neuronais antes do crescimento axonal, característica esta que permite seu uso como marcador de percursos neuronais. A marcação específica de fasciclina é realizada principalmente em estudos sobre desenvolvimento embriológico, auxiliando no mapeamento e acompanhamento de diversas estruturas (Crittenden *et al.*, 1998; Nassif *et al.*, 1998; De Velasco *et al.*, 2007).

### **Ritmos circadianos em abelhas**

Como já citado, o ritmo circadiano em drosófila é o mais bem estudado e conhecido. Contudo, a organização estrutural encontrada nesta espécie pode não ser a mesma encontrada nas abelhas. A comparação entre a estrutura e o padrão de expressão dos genes do relógio revelou que a organização do sistema circadiano de *Apis* é mais parecida com a de mamíferos do que com aquela de *Drosophila* (Rubin *et al.*, 2006).

Tratando-se de espécies eussociais, o estudo da expressão dos genes ligados a ritmos comportamentais pode vir a sofrer grandes modificações, como mostram estudos recentes. Organismos sociais mostram mecanismos de influência bilateral entre a expressão gênica que ocorre no sistema nervoso central de cada um dos indivíduos e o comportamento social (Robinson *et al.*, 2008). Em aves, já foram mapeados alguns genes, como o gene de expressão precoce: *egr 1*, que se expressa no cérebro, influenciando o comportamento de tentilhões. O canto do macho de *Taeniopygia guttata* induz a expressão de *egr 1* em outros machos, numa região específica do cérebro associada à audição (Mello *et al.*,

2000, citado em Robinson *et al.*, 2008). Dados interessantes com abelha suportam também esta idéia. A expressão do gene *for* aumenta ao longo da ontogênese da operária, e a manipulação de sua expressão induz o forrageamento precoce (Ben-Shahar *et al.*, 2002).

A maior parte dos trabalhos com abelhas encontrados na literatura foi realizada em *Apis*. Sabe-se que a expressão do gene do relógio *period* é maior em abelhas forrageiras do que em jovens (Bloch *et al.*, 2001), indicando uma ontogenia do sistema circadiano ligado ao polietismo etário.

*Period* e PDF não estão co-localizados em células nervosas de *Apis* (Bloch *et al.*, 2003) e os únicos corpos celulares marcados com PDF estão localizados numa região do lobo óptico que os autores (Bloch *et al.*, 2003) sugerem ser a medula acessória.

Apesar dos estudos cronobiológicos com meliponíneos serem ainda muito preliminares, sabe-se que há uma relação entre os ritmos circadianos e o polietismo etário (Marques & Yamashita, 2008). Foi detectado um ritmo da taxa metabólica, medida indiretamente através do consumo de oxigênio, em jovens, forrageiras e abelhas de idade intermediária de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, sendo o padrão circadiano mais claramente marcado e a amplitude do consumo maior nas abelhas mais velhas (Varella-Teixeira, 2006). Estes dados sugerem que a expressão circadiana esteja presente em todas as castas de operárias, desde muito cedo na vida adulta. Nas abelhas mais velhas, a ritmicidade circadiana se expressa nas atividades que desempenham no campo.

Dado que as abelhas sem ferrão possuem características particulares tanto em aspectos comportamentais (Sakagami, 1982; Wille, 1983; Michener, 1974; Zucchi *et al.*, 1999; Marques & Yamashita, 2008) como em processos fisiológicos e metabólicos (Hartfelder *et al.*, 2006), a generalização a partir de dados encontrados em *Apis* deve ser realizada com cautela. Estudos direcionados e aprofundados sobre o sistema circadiano nas abelhas sem ferrão constituem-se num grande campo a ser explorado.

Desta forma, o presente trabalho se propôs a mapear o sistema nervoso central de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, esclarecendo suas bases

anatômicas que permitirão estudos mais aprofundados sobre o sistema circadiano. A espécie *M. quadrifasciata* foi escolhida para este trabalho por causa do grande tamanho dos indivíduos que permite acesso relativamente fácil a áreas do sistema nervoso. Somente forrageiras foram escolhidas para este trabalho, porque sendo as operárias mais velhas, nelas o sistema nervoso deve ter atingido seu ponto máximo de maturação. O esforço de descrição ficou concentrado nas áreas protocerebrais e no complexo central por se tratar de regiões relacionadas ao sistema circadiano em outros insetos. Ensaio preliminares com imunomarcadores específicos foram realizados a fim de completar o mapeamento histológico e direcionar os estudos futuros sobre a organização estrutural do sistema circadiano em abelhas sem ferrão.

## VII. Conclusões

Neste trabalho foi realizado o mapeamento geral do sistema nervoso central e do complexo retrocerebral da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*. As principais características observadas foram:

- 1) As três neurópilas que constituem o lobo óptico: lâmina, medula e lóbula, são bem delimitadas. A lâmina e a medula (interna e externa) têm formato biconvexo enquanto a lóbula tem formato circular em cortes transversais. Não foi localizada a sub-divisão da medula denominada medula acessória.
- 2) O protocérebro é o maior gânglio do cérebro de *M. quadrifasciata*. Os *corpora pedunculata* são bastante desenvolvidos e ocupam grande parte da área central do protocérebro. O complexo central fica localizado entre os pedúnculos dos *corpora pedunculata*, na linha média do cérebro.
- 3) A *pars intercerebralis* está localizada entre os cálices medianos dos *corpora pedunculata* e seguindo horizontalmente a mesma linha de orientação estão as *pares laterales*. Histologicamente, podem ser identificados três tipos diferentes de células que constituem estas estruturas.
- 4) As imagens de reconstrução tridimensional do complexo retrocerebral são inéditas para abelhas e permitem entender a organização espacial de seus componentes.
- 5) Os *corpora cardiaca* estão mais próximos do cérebro do que os *corpora allata*. Aparentemente, não estão fundidas com qualquer outra estrutura. Recebem um único par de projeções do cérebro, os *nervi corporis cardiaci*. Sua estrutura compreende dois agregados celulares, morfologicamente distintos.
- 6) Os *corpora allata* são um par de estruturas com formato oval, localizadas uma de cada lado do canal alimentar. Não foram observadas projeções que os ligassem aos *corpora cardiaca*. Também não existem comissuras entre eles. Sua estrutura é composta por um tipo celular que apresenta material granuloso no citoplasma.

- 7) Os ensaios de imunocitoquímica complementaram o mapeamento histológico. Fasciclina II é expressa nos lobos ópticos e em algumas regiões protocerebrais. A marcação observada em células da *pars intercerebralis* pode indicar que sejam células da comissura primária.
- 8) PDF se expressa com um padrão e em locais distintos daqueles descritos para *Apis mellifera*, principalmente no lobo óptico. Corpos celulares na lóbula e na região da *pars lateralis* foram marcados com este neuropeptídeo.
- 9) Corazonina se expressa em células da *pars lateralis* e do complexo retrocerebral.
- 10) Áreas do sistema nervoso, descritas em outros insetos, que são vias envolvidas com o sistema circadiano mostraram expressão de PDF e de corazonina em áreas específicas do sistema nervoso de *M. quadrifasciata*. Talvez, também nesta abelha, elas tenham função semelhante.

A partir dos dados do mapeamento histológico geral realizado neste trabalho verifica-se que o sistema nervoso central e o complexo retrocerebral possuem organização estrutural semelhante ao encontrado nos demais himenópteros. Porém algumas características morfológicas aliadas à localização espacial de certas estruturas permitem distinguir particularidades no sistema de *Melipona quadrifasciata*. Isto pode ser notado pela posição e distribuição das *pares lateralis* no protocérebro, formando quase que um 'contínuo' com a *pars intercerebralis*. Os *corpora cardiaca* de forma alongada e os *corpora allata* de formato oval, que além de possuírem estas características morfológicas, possuem localização específica na cápsula cefálica. Os dados estruturais exclusivos de *M. quadrifasciata* são de suma importância para o conhecimento organizacional do sistema nervoso central e do complexo retrocerebral de uma abelha sem ferrão. Os resultados relatados neste trabalho são os primeiros passos para estudos posteriores que visam relacionar bases anatômicas com as vias de expressão do sistema circadiano em uma abelha sem ferrão.



## VIII. Referências Bibliográficas

- Akahira, Y.; Beig, D. 1967. Comparative study of *corpora allata* in Brazilian stingless bees. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 20, n. 16, p.165-190.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.25, p.11-28.
- Belgacem, Y. H.; Martim, J.-R. 2002. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the *pars intercerebralis* in *Drosophila*. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 22, n. 23, p.15154-15158.
- Belgacem, Y. H.; Martin, J.-R. 2007. Hmgcr in the *corpus allatum* controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 2, n.1, p. e187.
- 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 Ciência e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bellusci, S.; Marques, M. D. 2001. Circadian activity of the foragers of a eusocial bee (*Scaptotrigona* aff. *depillis*; Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) outside the nest. **Biological Rythm Research**, v. 32, n. 2, p. 117-124.
- Ben-Shahar, Y.; Robichon, A.; Sokolowski, M. B.; Robinson, G. E. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. **Science**, v. 296, p. 741-744.
- Blau, J.; Young, M. W. 1999. Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. **Cell**, v. 99, p. 661-671.
- Bloch, G.; Toma, D.P.; Robinson, G. E. 2001. Behavioral rhythmicity, age, division of labor and *period* expression in the honey bee brain. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, p. 444-456.
- Bloch, G.; Solomon, S. M.; Robinson, G. E.; Fahrbach, S. E. 2003. Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis mellifera*): age- and time-related plasticity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 464, n. 3, p. 269-84.
- Bourke, A. F. G.; Franks, N. R. 1995. **Social evolution in ants**. Princeton: Princeton University Press. 529p.

- Brandt, R.; Rohlfing, T.; Rybak, J.; Kroficzek, S.; Maye, A.; Westerhoff M.; Hege, H.-C.; Menzel, R. 2005. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **Journal of Comparative Neurology**, v. 492, p.1–19.
- Bullock, T. H.; Horridge, G. A. 1965. **Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates**. San Francisco: W. H. Freeman and Company. v. 2.
- Cepeda, O. I. 2006. Division of labor during brood production in stingless bees with special reference to individual participation. **Apidologie**, v. 37, p. 175-190.
- Chapman R. F. 1998. **The Insects: Structure and Function**. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: University Press. 770p.
- Choi, Y. J.; Lee, G.; Hall, J. C.; Park, J. H. 2005. Comparative analysis of corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 482, p. 372–385.
- Cortopassi-Laurino, M.; Imperatriz-Fonseca V. L.; Roubik, D. W.; Dollin, A.; Heard, T.; Aguilar, I.; Venturieri, G. C.; Eardley, C.; Nogueira-Neto, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, p. 275-292.
- Cosignani, D. S.; Yamashita, C. E.; Varella-Teixeira, L.; Marques, M. D. Seasonal variations of a stingless bee nest (Hymenoptera; Apidae; Meliponini). a ser submetido a **Biological Rhythm Research**.
- Crittenden, J.R.; Skoulakis, A.M.C.; Hans, K.; Kalderon, D.; Davis, R. L. 1998. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. **Learning & Memory**, v. 5, p. 38-51.
- Cymborowski B.; Dutkowski, A. 1969. Circadian changes in RNA synthesis in the neurosecretory cells of the brain and subesophageal ganglion of the house cricket. **Journal of Insect Physiology**, v. 15, p. 1187-1197.
- Cymborowski, B.; Dutkowski, A. 1970. Circadian changes in protein synthesis in the neurosecretory cells of the central nervous system of *Acheta domesticus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 341-348.
- De Velasco, B.; Erlick, T.; Shy, D.; Sclafani, J.; Lipshitz H.; McInnes, R.; Hartenstein, V. 2007. Specification and development of the *pars intercerebralis* and *pars lateralis*, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. **Developmental Biology**, v. 302, p. 309-323.
- Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, p. 271-290.
- Dunlap J. C.; Loros, J. J. ; DeCoursey, P. J. 2004. **Chronobiology: Biological Timekeeping**. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.

- Dutkowski, A.; Cymborowski, B.; Przelecka, A. 1971. Circadian changes in the ultrastructure of neurosecretory cells of the *pars intercerebralis* of the house cricket. **Journal of Insect Physiology**, v. 17, p. 1763-1772.
- Fahrbach, S. E. 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 209-32.
- Fahrbach, S. E.; Farris, S. M.; Sullivan, J. P.; Robinson, G.E. 2003. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. **Journal of Neurobiology**, v. 57, n. 2, p. 141-151.
- Gabe, M. 1968. **Techniques Histologiques**. Paris: Masson et Cie. 1113p.
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 193, p. 801-824.
- Glauert, A.M. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *In*: Glauert A.M. (Ed). **Practical method in electron microscopy**. Amsterdam: American Elsevier. v. 3, pt. 1.
- Glauert, A.M. 1991. Epoxy resins: An update in their selection and use. **Microscopy Analysis**, September, p. 15-20.
- Gordon, D. M. 1996. The organization of work in social insect colonies. **Nature**, v. 380, p. 121-124.
- Grenningloh, G; Goodman, C.S. 1992. Pathway recognition by neuronal growth cones: genetic analysis of neural cell adhesion molecules in *Drosophila*. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 2, n. 1, p. 42-47.
- Haas, F. 1992. Serial sectioning of insects with hard exoskeleton by dissolution of the exocuticle. **Biotechnic & Histochemistry**, v.67, n.1, p. 50-54.
- Hagberg, M. 1986. Ultrastructure and central projections of extraocular photoreceptors in caddisflies (Insecta: Trichoptera). **Cell and Tissue Research**, v. 245, p. 643-648.
- Hamanaka, Y.; Tanaka, S.; Numata, H.; Shiga, S. 2007. Peptide immunocytochemistry of neurons projecting to the retrocerebral complex in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. **Cell and Tissue Research**, v. 329, p. 581–593.
- Hammer, M.; Menzel, R. 1995. Learning and memory in the honeybee. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n.3, p. 1617-1630.
- Hanan, B. B. 1955. Studies of the retrocerebral complex in the honey bee: Part I. Anatomy and histology. **Annals of Entomological Society of America**, v. 48, p. 315-320.
- Hardin, P.E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. **Current Biology**, v. 15, R714-R722.

- Hartfelder, K.; Makert, G. R.; Judice, C. C.; Pereira, G. A. G.; Santana, W. C.; Dallacqua, R.; Bitondi, M. G. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, p. 144-163.
- Heinzeller, T. 1976. Circadiane Änderrugen im endokrinen system der honigbiene, *Apis mellifera*, effekt von haft und ocellenblendung. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, p. 315-321.
- Helfrich-Förster, C. 1995. The *period* clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of National Academy Science USA**, v. 92, p. 612-616.
- Helfrich-Förster, C.; Homberg, U. 1993. Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 337, p. 177-190.
- Helfrich-Förster, C.; Stengl, M.; Homberg, U. 1998. Organization of the circadian system in insect. **Chronobiology International**, v. 15, n. 6, p. 567-94.
- Helfrich-Förster, C.; Täuber, M.; Park, J. H.; Mühlig-Versen, M.; Schneuwly, S.; Houfbauer, A. 2000. Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 3339–3353.
- Hignam, K.C. 1961. The histology of the neurosecretory system of the adult female desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.102, n. 1, p. 27-38.
- Hodkova, M. 2008. Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 508-517.
- Howse, P.E. 1975. Brain structure and behavior in insects. **Annual Review of Entomology**, v.20, p. 359-79.
- Iwama, A.; Shibuya, T. 1998. Physiology and morphology of olfactory neurons associating with the protocerebral lobe of the honeybee brain. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1191-1204.

- Jackson, F. R.; Schroeder, A. J.; Roberts, M. A.; McNeil, G. P.; Kume, K.; Akten B. 2001. Cellular and molecular mechanisms of circadian control in insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 833-842.
- Kenyon, F. C. 1896. The meaning and structure of the so-called "mushroom bodies" of the hexapod brain. **The American Naturalist**, n. 356, p. 643-650.
- Kim, Y.-J.; Spalovská-Valachová, I.; Cho, D.-H.; Zitnanova, I.; Park, Y.; Adams, M. E.; Žitnan, D. 2004. Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 101, n. 176704-6709.
- Kirschner, S.; Kleineidam, C. J.; Zube, C.; Rybak, J.; Grunewald, B.; Rössler, W. 2006. Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 499, p. 933-952.
- Lee, G.; Kim, K.-M.; Kikuno, K.; Wang, Z.; Choi, Y.-J.; Park, J. H. 2008. Development regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. **Cell and Tissue Research**, v. 331, p. 659-673.
- Ludwig, P.; Williams, L.; Boyan, G. 2002. The *pars intercerebralis* of the locust brain: a developmental and comparative study. **Microscopy Research and Technique**, v. 56, p. 174–188.
- Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 409-414.
- Marques, M. D.; Yamashita, C. E. 2008. Biological rhythms in the colony of stingless bees. *In*: Fanjul-Moles, M. L.; Roblero, R. A. (Eds). **Comparative aspects of circadian rhythms**. Kerala (India): Transworld Research Network. p. 93-107.
- Marques, M. D.; Golombek, D.; Moreno, C. 2003. Adaptação temporal. *In*: Marques, N. ; Menna-Barreto, L. (Orgs). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Maunsbach, A. B. 1998. Embedding of cells and tissues for ultrastructural immunocytochemical analysis. *In*: Celis J. E. (Ed.) **Cell Biology: A Laboratory Handbook**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press. v. 3, p. 260-267.
- Menzel, R.; Manz, G. 2005. Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 4317-4332.
- Michener, C. D. 1974. **The social behaviour of the bees. A comparative study**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press. 404p.
- Michener, C. D. 2000. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 913p.

- Mobbs, P. G. 1985. Brain structure. *In*: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (Eds). **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press. v. 5, p.299-370.
- Moure, Pe.; Kerr, W. E. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona*. **Dusenía**, v.1, n. 2, p. 105-129.
- Nässel, D. R. 2000. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. **Progress in Neurobiology**, v. 68, p. 1-84.
- Nassif, C.; Noveen, A.; Hartenstein, V. 1998. Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. **Journal of Comparative Neurology**, v. 402, p. 10-31.
- Nijhout, H. F. 1994. **Insect Hormones**. Princeton, N.J.: Princeton University Press. 267p.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J.; Pittendrigh, C. S. 1968a .Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. II. The pathway of light signals that entrain the rhythm. **Zeitschrift für Vergleichende Physiologie**, v. 58, p. 1-13.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J.; Pittendrigh, C. S. 1968b. Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. III. The optic lobus, locus of the driving oscillation? **Zeitschrift für Vergleichende Physiologie**, v. 58, p. 14-46.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J.; Petropulos, S. F.; Pittendrigh, C. S. 1967. Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. I. Role of the *pars intercerebralis*. **Biological Bulletin**, v. 133, p. 79-696.
- Park, J. H.; Helfrich-Förster, C.; Lee, G.; Liu, L.; Rosbash, M.; Hall, J. C. 2000. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. **Proceedings of National Academy of Science**, v.97, n. 7, p. 3608–3613.
- Petri, B.; Stengl, M.; Wiirden, S.; Homberg, U. 1995. Immunocytochemical characterization of the accessory medulla in the cockroach *Leucophaea maderae*. **Cell and Tissue Research**, v. 282, p. 3-19.
- Pittendrigh, C.S. 1981. Entrainment. *In*: Aschoff, J. (Ed.) **Handbook of Behavioral Neurobiology, Biological Rhythms**. New York: Plenum Press. v. 4, p. 95-124.
- Predel, R.; Neupert, S.; Russell, W. K; Scheibner, O.; Nachman, R.J. 2007. Corazonin in insects. **Peptides**, v. 28, n. 1, p. 3-10.
- Rensing, L. 1964a. Daily rhythmicity of *corpus allatum* and neurosecretory cells in *Drosophila melanogaster* (Meig). **Science**, v. 144, p. 1586-1587.

- Rensing, L. 1964b. Daily rhythms in the endocrine glands of in *Drosophila* larvae. **Experientia**, v.11, n. 2, p. 103-104.
- Riddford, L. M.; Williams, C. M. 1971. Role of the *corpora cardiaca* in the behaviour of saturniid moths. I. Release of sex pheromone. **Biological Bulletin**, v. 140, n. 1, p. 1-7.
- Rieger, D.; Stanewsky, R.; Helfrich-Förster, C. 2003. Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Büchner 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**, v. 18, n. 5, p. 377-391.
- Rieger, D.; Schafer, O. T.; Tomioka, K.; Helfrich-Förster, C. 2006. Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2531-2543.
- Robinson, G. E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 637-665.
- Robinson, G. E.; Fernald, R. D.; Clayton, D. F. 2008. Genes and social behaviour. **Science**, v. 322, p. 896-900.
- Roller, L.; Tanaka, Y.; Tanaka, S. 2003. Corazonin and corazonin-like substances in the central nervous system of the Pterygote and Apterygote insects. **Cell and Tissue Research**, v. 312, n. 3, p. 393-406.
- Rubin, E. B.; Shemesh, Y.; Cohen, M.; Elgavish, S.; Robertson, H. M.; Bloch, G. 2006. Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. **Genome Research**, v. 16, p. 1352-1365.
- Sakagami, S. F. 1982. Stingless bees. *In*: Hermann, H. R. (Ed.). **Social Insects**. New York: Academic Press. p. 361-423.
- Saunders, D. S. 2002. **Insect clocks**. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science. 560p.
- Scharrer, B. 1963. Neurosecretion. XIII. The ultrastructure of the *corpus cardiacum* of the insect *Leucophaea maderae*. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 60, p. 761-796.
- Scharrer, B.; Scharrer, E. 1944. VI. A comparison between the *intercerebralis-cardiacum-allatum* system of the insects and the hypothalamo-hypophyseal system of the vertebrates. **Biological Bulletin**, v. 87, p. 242-251.
- Shao, Q.-M.; Sehadová, H.; Ichihara, N.; Sehna, F.; Takeda, M. 2006. Immunoreactivities to three circadian clock proteins in two ground crickets suggest interspecific diversity of the circadian clock structure. **Journal of Biological Rhythms**, v. 21, n. 2, p. 18-131.

- Shiga, S.; Toyoda, I.; Numata, H. 2000. Neurons projecting to the retrocerebral complex of the adult blow fly, *Protophormia terraenovae*. **Cell and Tissue Research**, v. 299, p. 427-439.
- Siegmund, T.; Korge, G. 2001. Inervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 431, p. 481-491.
- Slaa, Q.-M.; Sehadová, H.; Ichihara, N.; Sehnal, F.; Takeda, M. 2006. Immunoreactivities to three circadian clock proteins in two ground crickets suggest interspecific diversity of the circadian clock structure. **Journal of Biological Rhythms**, v. 21, n. 2, p. 118-131.
- Snodgrass, R. E. 1935. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill Book Co. 667p.
- Strausfeld, N. J.; Homberg, U.; Kloppenburg, P. 2002. Parallel organization in honey bee mushroom bodies by peptidergic Kenyon cells. **Journal of Comparative Neurology**, v. 424, n. 1, p. 179-195.
- Taghert, P. H.; Shafer, O. T. 2006. Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. **Journal of Biological Rhythms**, v. 21, p. 445-457.
- Tanaka, S. 2006. Corazonin and locust phase polyphenism. **Applied Entomology and Zoology**, v.41, n. 2, p. 179-193.
- Trpis, M. 1970. A new bleaching and descalcifying method of use general use in zoology. **Canadian Journal of Zoology**, 48, p. 892-893.
- Truman, J. W. 1971. Circadian rhythms and physiology with special special reference to neuroendocrine processes in insects. *In*: International Symposium of Circadian Rhythmicity. **Proceedings**. Wageningen. p. 111-135.
- Varella-Teixeira, L. 2006. **Variações ontogenéticas nos parâmetros do ritmo respiratório de operárias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Veleri, S.; Brandes, C.; Helfrich-Förster, C.; Hall, J. C. 2003. A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. **Current Biology**, v. 13, p. 1758-1767.
- Verleyen, P.; Baggerman, G.; Mertens, I.; Vandersmissen, T.; Huybrechts, J.; Lommel, A. V.; Loof, A. D.; Schoofs, L. 2006. Cloning and characterizantion of a third isoform of corazonin in the honey bee *Apis mellifera*. **Peptides**, v. 27, p. 493-499.



- Weinrich, A.; Kunst, M.; Wirmer, A.; Holstein, G. R.; Heinrich, R. 2008. Suppression of grasshopper sound production by nitric oxide-releasing neurons of the central complex. **Journal of Comparative Physiology A**, 194:763-776.
- Wen, C.-J.; Lee, H.-J. 2008. Mapping the cellular network of the circadian clock in two cockroach species. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 68, p. 215-231.
- Wille, A. 1983. Biology of the stingless bees. **Annual Review of Entomology**, v. 28, p. 41-64.
- Wilson, E.O. 2000. **Sociobiology: the New Synthesis**. Cambridge Mass: Belknap Press of Harvard University Press. 720p.
- Winston, M. L.; Michener, C. D. 1977. Dual origin of highly social bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 1135-1137.
- Wise, S.; Davis, N. T.; Tyndale, E.; Noveral, J.; Folwell, M. G.; Bedian, V.; Emery, I. F.; Siwicki, K. 2002. Neuroanatomical studies of period gene expression in the hawkmoth, *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 447, p. 366-380.
- Wüllbeck, C.; Grieshaber, E.; Helfrich-Förster, C. 2008. Pigment-dispersing factor (PDF) has different effects on *Drosophila*'s circadian clocks in the accessory medulla and in the dorsal brain. **Journal of Biological Rhythms**, v. 23, n. 5, p. 409-424.
- Youssef, N. N. 1971. Topography of the cephalic musculature and nervous system of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 99, p. 1-54.
- Závodská, R.; Sauman, I.; Sehna, F. 2003. Distribution of PER protein, pigment-dispersing hormone, prothoracicotropic hormone, and eclosion hormone in the cephalic nervous system of insects. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, p. 106-122.
- Zhu, A.; Kunst, M.; Wirmer, A.; Holstein, G. R.; Heinrich, R. 2008. Suppression of grasshopper sound production by nitric oxide-releasing neurons of the central complex. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 194, p. 763-776.
- Zucchi, R.; Silva-Matos, E. V.; Nogueira-Ferreira, F. H.; Azevedo, G. G. 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees - nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 34, n. 1, p. 65-86.