

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**ALINE FERNANDA CATAE**

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA COMPARATIVA  
DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE ABELHAS  
*Apis mellifera* AFRICANIZADA E DAS  
VESPAS *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes*  
*palipes* E *Polybia paulista*.**

ALINE FERNANDA CATAE

ANÁLISE HISTOQUÍMICA COMPARATIVA DAS GLÂNDULAS DE  
VENENO DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA E DAS  
VESPAS *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes palipes* E *Polybia*  
*paulista*.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharela e Licenciada em Ciências  
Biológicas.

Rio Claro  
2013

595.7  
C357a

Catae, Aline Fernanda

Análise histoquímica comparativa das glândulas de veneno de abelhas *Apis mellifera* africanizada e das vespas *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes palipes* e *Polybia paulista* / Aline Fernanda Catae. - Rio Claro, 2013

57 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Inseto. 2. Biologia celular. 3. Insetos sociais. 4. Apidae. 5. Vespidae. 6. Glândula convoluta. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas conquistas e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais que contribuem todos os dias para meu crescimento e que me auxiliam a superar cada desafio.

Em seguida agradeço aos meus pais, Eliana e Carlos, que sempre batalharam muito para que meus sonhos fossem alcançados, e ao meu irmão Eduardo, que sempre torceu pelo meu sucesso. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, compreensão e amor incondicional. Agradeço também aos meus avós, tios e primos pelo carinho e por acreditarem em mim. Não tenho como expressar em palavras tudo o que representam na minha vida! Amo vocês.

Ao Murilo, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando nas horas difíceis e comemorando comigo todas as minhas conquistas. Com você todos esses momentos se tornaram muito mais especiais.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido (Processo nº. 2010/18460-0), possibilitando assim o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela orientação, confiança e apoio. Estes anos foram extremamente enriquecedores para mim, e muito disso se deve ao fato de eu ter tido a oportunidade de trabalhar com o senhor. Meus sinceros agradecimentos!!

À Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela paciência, por todo aprendizado, pela confiança em meu trabalho e pelo incentivo.

À Thaisa Cristina Roat, por todo o auxílio oferecido desde o início da minha pesquisa e por estar sempre disposta a me ajudar.

A todos os membros do LECA - Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas, pela amizade, pelas reuniões extremamente enriquecedoras, pelas discussões e pela troca de experiências. Tenho muito orgulho de fazer parte deste grupo!

Ao Antonio Sérgio Pascon, pela coleta das abelhas e vespas, pela paciência e pelas conversas.

Aos técnicos de laboratório Gerson Mello Souza, Antonio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte e Pablo Henrique Nunes, pelo auxílio e cooperação.

À Necis por sempre me ajudar nos momentos de desespero e nas Prestações de Conta da FAPESP. Obrigada pela paciência!

Aos meus amigos de Graduação, com os quais dividi momentos inesquecíveis de uma etapa tão importante da minha vida. Agradeço especialmente à Paula, Elen e Lais, amigas e confidentes que tornaram todos esses anos ainda mais divertidos e especiais.

Às minhas amigas queridas Livinha, Ana Julia, Daphne e Bruna por fazerem parte da minha vida e por me mostrarem que a amizade verdadeira nunca acaba. Vocês são demais!

Muito obrigado a todos vocês por estarem ao meu lado e contribuírem para mais essa conquista!

## RESUMO

Estudos referentes aos insetos sociais ganham cada vez mais espaço no cenário científico e acabam por evidenciar a importância econômica e ecológica destes animais. Dentre os Aculeata, as abelhas e vespas são grupos que despertam bastante interesse devido à forma de organização social e pela potencialidade de seus venenos. As abelhas *Apis mellifera* representam insetos de considerável importância econômica tanto pelos produtos apícolas fornecidos, como pela polinização de inúmeras espécies, sendo assim, fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas. Os vespídeos são conhecidos pelas formas de organização das colônias e pelas relações estabelecidas entre estes indivíduos. Um aspecto em comum presente tanto nas abelhas como nas vespas é a presença de um aparelho de ferroar, fundamental para a defesa destes insetos, onde o veneno desempenha destacável papel em diversas esferas, tais como, farmacológica, imunológica, médica e ambiental. Por isto, a compreensão dos constituintes presentes nesta secreção é essencial para o entendimento dos seus mecanismos de alergenicidade. Compreender a organização celular da estrutura responsável pela produção desta substância utilizada nos mecanismos de defesa e de ataque dos aculeados e entender a composição destes venenos, assim como seus mecanismos de ação, se fazem extremamente indispensáveis para o avanço da ciência e para o desenvolvimento de futuros trabalhos nesta área. Com base no exposto, ressalta-se a relevância em se estabelecer as características definidoras da glândula de veneno de abelhas e vespas, de modo a caracterizá-las e diferenciá-las, complementando as informações já existentes sobre elas, e também sobre a glândula convoluta – estrutura presente no interior do reservatório de vespas. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que apesar de algumas alterações, as glândulas de veneno de abelhas *Apis mellifera* e das vespas *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes palipes* e *Polybia paulista* apresentam grande similaridade no que diz respeito à organização celular, sendo que tal semelhança também pôde ser observada nas glândulas convolutas das vespas. Além disso, observou-se que a glândula convoluta contribui para a produção final do veneno estocado no reservatório.

**Palavras-chave:** Insetos sociais. Apidae. Vespidae. Glândula convoluta. Veneno.

## ABSTRACT

Studies concerning the social insects gain more space in the scientific scenario and evidence the economic and ecological importance of these animals. Among the Aculeata, bees and wasps are groups that arouse considerable interest due to the form of social organization and because the potential of their venoms. Bees *Apis mellifera* represent insects of considerable economic importance both for bee products supplied, as for pollinating many species, being in this way, crucial to the balance of ecosystems. The wasps are known by the forms of organization of the colonies and by the relations established between these individuals. A common aspect present in both bees and wasps is the presence of a sting apparatus, fundamental for the defense of these insects, where the venom plays an important role in many aspects, such as pharmacological, immunological, medical and environmental. Therefore, understanding the constituents present in this secretion is essential for the understanding of their mechanisms of allergenicity. To comprehend the cellular organization of the structure responsible for the production of this substance used in the mechanisms of defense and attack of the aculeate and understand the composition of these venoms, as well as their mechanisms of action, are extremely essential for the advancement of science and the development of future works in this area. Based on the aforementioned, it emphasizes the importance in establishing the defining characteristics of the venom gland of bees and wasps, in order to characterize and distinguish them, complementing the existing information about this structure and about the convoluted gland - the structure inside the reservoir of wasps. From the results obtained in this study, it was concluded that despite some changes, the venom glands of bees *Apis mellifera* and wasps *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes palipes* and *Polybia paulista* are very similar on its cellular organization, being that such similarity could also be observed in the convoluted glands of wasps. Furthermore, it was observed that the convoluted gland contributes to the final composition of the venom produced and stored in the reservoir.

**Keywords:** Social insects. Apidae. Vespidae. Convoluted gland. Venom.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1 Materiais</b> .....	16
<i>3.1.1 Material Biológico</i> .....	16
<b>3.2 Métodos</b> .....	16
<i>3.2.1 Obtenção dos animais</i> .....	16
<i>3.2.2 Microscopia de Luz</i> .....	16
<b>4 RESULTADOS</b> .....	19
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Os insetos representam 4/5 do reino animal, desempenhando funções extremamente importantes do ponto de vista ecológico, contribuindo para a manutenção da estrutura da maioria dos ecossistemas terrestres. Polinização de plantas, dispersão de sementes, manutenção da estrutura e fertilidade do solo, controle de populações de organismos e ciclagem de nutrientes, são algumas das inúmeras atividades desempenhadas por eles (DELONG, 1962; MORRIS et al., 1991).

Além disso, os insetos chamam enormemente a atenção de diversas culturas pelas suas variedades de formas, tamanhos, cores, sons que produzem, formas de vida, e também pelas epidemias disseminadas ao redor do mundo que acabaram por influenciar diretamente a história da humanidade (HOGUE, 1987).

A história das civilizações foi grandemente influenciada e determinada pelos produtos destes animais, como por exemplo, no comércio da seda no oriente (MEYER, 1999), e também no comércio de tintas derivadas de cochonilhas no século XVIII (HOGUE, 1987). Apesar de todo este destaque, os insetos ainda são insuficientemente investigados pelos etnozoólogos (JARA, 1996).

Uma das classificações para os representantes da ordem dos himenópteros é aquela baseada na história evolutiva dos indivíduos, separando estes insetos em: sociais e solitários. Como base para esta distinção utilizam-se características comportamentais, biológicas, aspectos evolutivos, composição dos venenos e aspectos do aparelho de ferrão, características estas responsáveis pela evolução da adaptação destas espécies (PALMA, 2006).

Os *Scolioidea* representam os ancestrais mais primitivos dos himenópteros possuidores de ferrão (Aculeatas), dando origem deste modo às três grandes linhas evolutivas destes insetos: vespas, abelhas e formigas (BARRAVIEIRA, 1994). De acordo com Manzolli - Palma; Palma (1992), as espécies pertencentes aos himenópteros mais representativas no Brasil são as abelhas do gênero *Apis* (*Apis mellifera mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. scutellata*, *A. m. carniça*, além dos híbridos africanizados) e do gênero *Bombus* (*B. atratus* e *B. morio*), as vespas do gênero *Polistes* (*P. simillimus*, *P. versicolor*, *P. lanio lanio*), do gênero *Polybia* (*P. paulista*, *P. ignobilis*) e do gênero *Agelaia* (*Agelaia pallipes pallipes*), e as formigas do gênero *Solenopsis*, dentro do qual se encontra a espécie *S. saevissima*. As abelhas, de maneira geral, possuem uma importância cultural bastante significativa pela oferta de produtos utilizados para fins alimentícios, religiosos, cosméticos e medicinais, tais como pólen, própolis, mel, geléia real, cera, e também pelo uso de pupas e

larvas na alimentação (COSTA-NETO, 1998; RODRIGUES, 2006). Além disto, são fundamentais na área agrícola por desempenharem importante papel na polinização, sendo assim essenciais para a perpetuação de inúmeras espécies vegetais (GARY, 1992).

Estima-se que 84% de toda a produção das espécies vegetais cultivadas na Europa dependam diretamente da polinização realizada pelos insetos, principalmente pelas abelhas (WILLIAMS, 1994). Além disso, 70% das 124 principais culturas existentes para o consumo humano na Terra dependem enormemente dos polinizadores (KLEIN et al., 2007). Culturas de hortaliças, óleos vegetais e frutas, altamente dependentes da polinização, possuem um valor agregado considerado alto quando comparado àquelas não dependentes deste processo (GALLAI et al., 2009).

O valor das 46 principais culturas polinizadas por insetos representou 39% do valor da produção mundial em 2005. Entretanto percebe-se que em cada região, há pelo menos uma cultura que apresente elevado grau de vulnerabilidade quando se fala em perda de polinizadores. Tais índices variam de 22% a 94% (GALLAI et al., 2009).

A abelha *A. mellifera*, introduzida no Brasil em 1839, se tornou uma das mais estudadas, possuindo grande importância econômica. Hoje o animal que temos é resultante de um cruzamento entre *Apis mellifera scutellata* (originária da África), *Apis mellifera mellifera* (originária do norte da Europa), *Apis mellifera ligustica* (originária da Itália e norte da Jugoslávia) e *Apis mellifera iberica* (provinda da Europa Ocidental) (RUTTNER, 1988).

Em condições normais, uma colônia de *A. mellifera* contém uma fêmea fértil (rainha), numerosas fêmeas estéreis (operárias) e machos (zangões). Somente a rainha é capaz de produzir ovos viáveis que, quando não fertilizados, dão origem aos zangões, além de ovos fertilizados, que originam as fêmeas. A diferenciação das castas femininas se dá por meio de uma alimentação diferencial, oferecida às larvas a partir do 3º dia de vida (FREE, 1980; NOCELLI, 2003). As operárias são responsáveis pela realização de atividades para a manutenção do ninho. Elas exercem preferencialmente uma determinada tarefa, de acordo com a necessidade da colônia, idade e desenvolvimento glandular (FREE, 1980).

Os vespídeos, também conhecidos como marimbondos, assim como as abelhas, despertam também elevado interesse dos pesquisadores, devido a constituição de suas colônias que possuem diversos níveis de interação entre seus indivíduos, o que contribui ainda mais para a importância deste grupo de insetos no que se diz respeito ao estudo da evolução do comportamento social (SPRADBERY, 1973).

A superfamília Vespoidea possui subdivisões, sendo uma delas, representada pela família Vespidae, que possui a totalidade dos casos conhecidos de eusociabilidade em vespas.

Tal família apresenta mais de 800 espécies eusociais, predadoras de larvas de Lepidoptera, besouros, e outros animais (AKRE, 1982).

As vespas sociais são essenciais nos estudos de ecologia, de comportamento e de controle biológico, principalmente pela estrutura de suas colônias e pelo fato de representarem um importante grupo de visitantes florais (SOUZA; PREZOTO, 2006).

Os vespídeos do gênero *Polistes* são cosmopolitas, formando sociedades com um baixo número de indivíduos, subordinados a uma rainha, sendo que nestas sociedades o desenvolvimento ovariano apresenta diferenças, não havendo diferenciação morfológica entre as castas femininas. As interações físicas de ataque determinam a dominância reprodutiva (CHAUD NETTO; GOBBI; MALASPINA, 1994; SILVEIRA, 1990; SPRADBERRY, 1973). As vespas pertencentes a este gênero são fundamentais no controle biológico, pois predam pragas agrícolas (BACH, 1951). A espécie *Polistes versicolor* é um inseto bastante comum em áreas urbanas, estando presente desde a Costa Rica até o sul do Brasil e Argentina (RICHARDS, 1978).

As vespas pertencentes a este gênero são consideradas chave para o entendimento da evolução do aspecto da socialidade (EVANS; WEST-EBERHARD, 1970). As vespas representantes da espécie *P. versicolor* são organizadas de acordo com as atividades desenvolvidas como ovofagia, larvifagia e dominação física, onde uma fêmea é considerada a líder e as outras, subordinadas (GOBBI, 1977; PARDI, 1948).

Vários estudos revelam características fundamentais do comportamento dos machos de vespas do gênero *Polistes*, que desempenham funções essenciais na colônia como: manutenção do ninho e cuidado com a cria (HUNT; NOONAN, 1979; MAKINO, 1983). Pietrobon (2005) observou que em uma única colônia ocorre a produção ao mesmo tempo de fêmeas e machos, podendo-se observar a cópula entre estes indivíduos considerados irmãos, sendo que os machos e as fêmeas desta espécie de vespa são bastante semelhantes, porém em machos, as coxas, o mesoesterno e a face possuem uma coloração mais amarelada.

Após a primeira semana de vida, as vespas desta espécie iniciam suas atividades rotineiras como forrageamento e construção do ninho. Os indivíduos mais velhos normalmente cuidam das larvas, porém não há aparente divisão de trabalho seguido pelo critério de idade (YOSHIKAWA, 1963). Nestes vespídeos, a formação de uma nova colônia ocorre através de um padrão solitário, onde a rainha realiza a construção de células novas e a oviposição (CHAUD NETTO; GOBBI; MALASPINA, 1994; ROSS; MATTHEWS, 1991; SILVEIRA, 1990).

Como proposto por Cumber (1951) a diferenciação de indivíduos dominantes e subordinados em *Polistes* e *Mischocyttarus* se dá devido apenas às características comportamentais.

Estudos mostraram que as fêmeas de *P. versicolor* geralmente possuem um tamanho maior e ovários mais desenvolvidos quando comparadas com outras vespas. Isto poderia ser explicado pelo fato destas vespas neotropicais terem a possibilidade, a partir destas características, de fundarem novos ninhos logo em seguida a saída do ninho parental, ou mesmo esperarem condições favoráveis (GOBBI; NOLL; PENNA, 2006).

Os indivíduos pertencentes aos gêneros *Polybia* (*Myrapetra*) e *Agelaia* (*Stelopolybia*) se caracterizam por apresentarem sociedades com milhares de indivíduos e possuem distribuição neotropical. Analisando-se as vespas do gênero *Agelaia* pode se notar diferenças na anatomia de rainhas e operárias, sendo que em *Polybia*, tais diferenças não são tão evidentes. Estes dois gêneros pertencem à tribo dos Polybiini, formam enxames com múltiplas rainhas de fecundidade baixa se comparadas às fêmeas férteis de *Apis*. Para estes indivíduos, acredita-se que os feromônios são responsáveis pela realização do mecanismo de controle social (CHAUD NETTO; GOBBI; MALASPINA, 1994; ROSS; MATTHEWS, 1991; SILVEIRA, 1990; SPRADBERRY, 1973).

Em relação ao número de espécies de vespas sociais, mais de quatrocentas já foram contabilizadas, sendo as brasileiras, tipicamente neotropicais, possuidoras de venenos diferentes das vespas provindas de ambientes de clima temperado (CASTRO; PALMA, 2009; REISMAN; MUELLER; WYPYCH, 1982).

Além da importância ambiental, outra característica marcante dos insetos sociais é a imensa variedade de glândulas exócrinas encontradas em abelhas, vespas, formigas e cupins. Os himenópteros, dentre os grupos de invertebrados, representam as únicas espécies possuidoras de dispositivos inoculadores de veneno, que é produzido por uma glândula – a glândula de veneno (NAKAJIMA, 1986).

As diversas ordens de insetos, principalmente as abelhas, vespas e formigas, acabaram por desenvolver suas armas biológicas, como o aparelho de ferroar e o veneno com base nos seus comportamentos e biologia (PALMA, 2006).

Um grande desafio para o homem é compreender como se deu o surgimento do aparelho de ferroar nos himenópteros sociais. De acordo com alguns estudos, esta estrutura se desenvolveu devido à pressão advinda da predação realizada pelos vertebrados, já que as grandes colônias tinham a capacidade de atrair os predadores, o que ajudou a favorecer a

eusocialidade característica destes insetos. Kukut et al. (1989) acreditam que o ferrão se desenvolveu principalmente devido à pressão predatória realizada pelas formigas.

De acordo com Snodgrass (1956) o aparelho de ferrão dos Aculeata é dividido em duas partes fundamentais, sendo a primeira formada por uma estrutura muscular e quitinosa responsável pela introdução do ferrão e liberação do veneno, e a segunda, constituída por uma porção glandular, que sintetiza o veneno.

A glândula de veneno dos insetos, apesar das variações presentes em algumas espécies, em geral é constituída por túbulos secretores conectados a um reservatório. Em Apinae, Adreninae e Bombinae, as glândulas de veneno são constituídas por dois túbulos cilíndricos alongados que se fundem antes de se conectarem no reservatório. Em Vespinae, Polistinae, e Eumeninae, estes túbulos são completamente separados. Nas subfamílias Sphecinae, Phylantinae e Cabroninae eles apresentam algumas ramificações curtas, constituídas por ramos grossos (KERR; LELLO, 1962; NASCIMENTO; CRUZ-LANDIM, 1997; SILVEIRA; CAETANO, 1993).

Estudos histológicos em alguns himenópteros revelam que a porção tubular da glândula de veneno é composta essencialmente por células cilíndricas e que o epitélio é coberto internamente por cutícula (BRIDGES; OWEN, 1984; KERR; LELLO, 1962). As células secretoras são caracterizadas pela presença de núcleos grandes e esféricos, enquanto que as células que formam os canalículos (estruturas responsáveis por despejar a secreção produzida no lúmen da glândula) apresentam núcleos elípticos e menores que as demais (OWEN; BRIDGES, 1976).

O início do ciclo secretor presente nas glândulas de veneno de *A. mellifera* se inicia após a emergência, atingindo o grau máximo de desenvolvimento no momento em que estes insetos começam a exercer a função de defesa da colônia. A partir deste momento, as células secretoras do epitélio desta glândula começam a se degenerar, já que após o uso de ferrão, este e o sétimo segmento presente no abdômen sofrem autotomia, resultando deste modo, na morte da abelha (CRUZ-LANDIM; BALDISSERA; BEIG, 1967).

Duas camadas de células formam a glândula de veneno de *A. mellifera*, sendo a mais interna, recoberta por cutícula, e a externa, formada por células glandulares, que através dos canalículos, despejam a secreção sintetizada, no lúmen da glândula (CRUZ-LANDIM, 2009). O reservatório, onde o veneno é armazenado, possui parede formada por uma região distal, com células baixas e citoplasma basófilo; e uma região proximal, com células ainda mais baixas e achatadas (ABREU, 2000; CRUZ-LANDIM; KITAJIMA, 1966). As células secretoras presentes nesta glândula possuem núcleos grandes e esféricos, e as células que

formam os canalículos, apresentam núcleos de tamanho menores, e com forma elíptica (OWEN; BRIDGES, 1976).

Analisando-se a glândula de veneno de vespas, observa-se que ela é constituída por dois túbulos secretores livres ligados a um reservatório, sendo esta estrutura, bastante semelhante à glândula de veneno de formigas (MASCHIWITZ; KLOFT, 1971).

Dentro deste reservatório, encontra-se uma estrutura suspensa denominada: glândula convoluta (SCHOETERS; BILLEN, 1995), sendo esta estrutura, ausente nas abelhas sociais. Com base ainda nos estudos destes mesmos autores (1998), esta estrutura é formada por um túbulo único e enrolado que aparece como uma massa dentro do reservatório.

De acordo com o trabalho de Britto; Caetano (2005), a glândula convoluta de vespas *P. versicolor* é constituída por células com aspectos colunares e núcleos mais alongados, que tendem a seguir os formatos das células em que estão presentes. Além disto, estes autores observaram também que a secreção sintetizada pela porção tubular da glândula de veneno, pode ser modificada através dos componentes produzidos pela glândula convoluta presente no reservatório, o que foi confirmado pelos nossos resultados obtidos através das análises de microscopia de luz.

A glândula convoluta de *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera: Formicidae) é uma estrutura delicada e semitransparente presente dentro do reservatório de veneno. Nesta espécie, a maioria das secreções é sintetizada diretamente pelas células do duto de veneno, especialmente naquelas presentes na zona intermediária e na glândula convoluta (FOX et al., 2010).

Um estudo desenvolvido por Ortiz; Camargo Mathias (2003) mostrou que a porção filamentosa secretora externa das glândulas de veneno de *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae) é composta por células cúbicas, que mudam de forma à medida que o filamento se aproxima do reservatório, mudança esta que permite que tal estrutura se insira em seu interior, passando a constituir desta maneira, parte da chamada glândula convoluta.

Com base no trabalho feito com *Dinoponera australis* (Hymenoptera: Formicidae) mostrou-se que quatro tipos diferentes de células podem ser identificados na glândula convoluta e na glândula de veneno: células epiteliais que revestem a parte cuticular da glândula convoluta; células glandulares com aparatos terminais da porção tubular incorporadas na glândula convoluta; células glandulares que secretam diretamente no interior do reservatório de veneno; e células secretoras presentes no túbulo livre (SCHOETERS; BILLEN, 1995).

Cruz López, Morgan e Brand (1993) demonstraram que a presença de material elétron-denso nos espaços extracelulares dos aparatos terminais sugere que as células secretoras da glândula convoluta são responsáveis pela produção de componentes lipofílicos, que foram demonstrados quimicamente nesta estrutura.

O estudo sobre estes insetos sociais e os venenos produzidos por estes, possuem uma enorme importância na área ecológica, médica e econômica. Estas pesquisas são fundamentais na determinação de tratamentos relacionados às imunoterapias em pacientes sensíveis a estes venenos, e também para a produção de inseticidas naturais, o que tende a diminuir o impacto ecológico (BONFANTI-ALMEIDA, 1994).

Os himenópteros sociais utilizam seus venenos como meio de defesa, causando danos ao tecido da vítima, dor, alergia em alguns mamíferos e até mesmo a morte de alguns organismos, além disso, pode ser utilizado como repelente para outros insetos (SCHMIDT, 1990). Estes venenos possuem em sua composição diversos tipos de peptídeos e proteínas, sendo alguns responsáveis pelas respostas vasoativas. Porém, de acordo com Goddard (2003), seriam necessárias aproximadamente 1500 ferroadas para causar a morte de um indivíduo adulto com cerca de 70 Kg.

A compreensão da composição dos venenos é bastante complexa e um desafio para muitos pesquisadores. Além disso, os diagnósticos de alergia e processos de imunoterapia podem ser dificultados por alguns fatores como, heterogeneidade dos alérgenos e degradação de proteínas (NIEDERBERGER; VALENTA, 2004).

As reações alérgicas e sistêmicas, as dores, edemas e eritemas resultantes dos acidentes com as ferroadas de vespas, ocorrem devido à presença, no veneno destes insetos, de proteínas e peptídeos biologicamente ativos (LORENZI, 2002). Além destes constituintes, encontram-se nestes venenos também diversos tipos de aminas biogênicas (NAKAJIMA, 1986).

O veneno sintetizado pela glândula de veneno de abelhas *A. mellifera* é uma mistura que possui cerca de 50 componentes identificados, e que podem ser tóxicos para inúmeros outros animais. Este veneno é incolor, solúvel em água e transparente (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2002) e alvo de estudos de muitas pesquisas bioquímicas. Um trabalho publicado por Santos e colaboradores (2013) revelam a produção do primeiro soro contra o veneno de abelhas *A. mellifera* africanizadas, mostrando a ação desta nova substância na neutralização dos principais efeitos tóxicos do veneno destes insetos.

Um estudo desenvolvido por Lima, de Lima e Prezoto (2000) demonstrou a ação proteolítica da protease do veneno de *A. mellifera*, sugerindo assim, que esta enzima tem como função atuar no processo de maturação ou na atividade de outros componentes encontrados no veneno. Determinar as estruturas e o funcionamento das moléculas que constituem o veneno é de extrema importância para o desenvolvimento de drogas e outras aplicações (KYOGOKU et al., 2003).

O veneno de vespas é composto por substâncias alérgicas que estimulam o sistema imune a produzir anticorpos bastante específicos, o que causa assim o desencadeamento de reações alérgicas a muitas pessoas. Deste modo, definir o potencial alergênico das proteínas é fundamental e um dos maiores desafios da alergologia molecular (AALBERSE, 2000).

O veneno destes animais é uma mistura complexa de inúmeros componentes. As aminas biologicamente ativas presentes neste veneno são na maioria das vezes serotonina e histamina, substâncias estas, responsáveis pela produção de dor, vasodilatação e também pelo aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, o que tende a facilitar a penetração das toxinas no tecido (BANKS; SHIPOLINI, 1986; OLIVEIRA et al., 1999).

A composição dos venenos é um desafio para inúmeros pesquisadores, sendo que o diagnóstico de alergia e os processos de imunoterapia acabam sendo dificultados por fatores como degradação de proteínas e heterogeneidade dos alérgenos presentes nesta substância (NIEDERBERGER; VALENTA, 2004). Devido à ação sinérgica ou aditiva das diferentes toxinas e enzimas encontradas nos venenos, estes exercem efeitos em quase todas as células ou tecidos (TAVARES, 2005).

Entender os mecanismos de ação dos venenos dos himenópteros é uma tarefa bastante desafiadora. Muitos estudos buscam compreender os processos que envolvem a proteção das células secretoras da glândula de veneno contra as toxinas prejudiciais presentes nesta secreção. Estes trabalhos demonstraram que o veneno produzido por estes insetos é usado para a defesa da colônia ou dos próprios indivíduos, quando estes estão em situações de perigo (PEIREN et al., 2008).

A partir do exposto, nota-se a importância da compreensão da organização celular das glândulas de veneno e das glândulas convolutas de modo a elucidar os mecanismos pelos quais o veneno é produzido bem como a influência da secreção sintetizada pela glândula convoluta, presente no interior do reservatório de vespas, na composição do mesmo.

## 2 OBJETIVOS

Devido à importância de se estabelecer as características estruturais das glândulas de veneno de abelhas e vespas, de modo a se realizar uma comparação entre elas, definindo assim as particularidades presentes em cada espécie, se torna essencial um estudo mais aprofundado da morfologia de tal estrutura, para que os seus constituintes sejam identificados e a produção de veneno seja mais bem compreendida.

Assim, o presente trabalho visou realizar uma análise histológica e histoquímica das glândulas de veneno de abelhas *Apis mellifera* africanizadas e de vespas *Polistes versicolor*, *Agelaia palipes palipes* e *Polybia paulista*, bem como das glândulas convolutas presentes no interior dos reservatórios das vespas de interesse.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Material Biológico

Foram utilizados exemplares de abelhas *A. mellifera* africanizada coletados no apiário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista – UNESP - *campus* de Rio Claro.

Os ninhos de vespas para a coleta de indivíduos das espécies *P. versicolor*, *A. palipes* e *P. paulista*, também foram obtidos na Universidade Estadual Paulista – UNESP - *campus* de Rio Claro.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Obtenção dos animais

Para *A. mellifera*, favos limpos foram introduzidos em colméias em plena atividade para que suas rainhas realizassem a postura e foram transferidos, 24 horas depois, para as respectivas áreas de recria, onde foram monitorados para obtenção de adultos de operárias com idades de 7, 14, 21 e 28 dias.

A coleta das operárias de vespas foi feita a partir de ninhos naturais obtidos no *campus*. Dessa forma, não foi possível monitorar as idades dos indivíduos coletados.

##### 3.2.2 Microscopia de luz.

Após a coleta e anestesia (5 minutos no freezer) dos animais, as glândulas de veneno foram dissecadas em solução salina para insetos (NaCl 7,5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72g/L) e fixadas em paraformaldeído 4%, com exceção apenas dos materiais que foram corados com PAS e Sudan Black, que foram fixados respectivamente com Bouin aquoso e Formol Ca<sup>2+</sup>. Os materiais, após 24 horas de fixação, foram colocados em Tampão Fosfato de Sódio por 30 minutos, desidratados com banhos de 30 minutos em soluções com concentrações crescentes de álcool e então colocados em resina de embebição por três dias. Após este procedimento os materiais foram incluídos em historesina.

Os cortes dos materiais foram realizados em micrótomo Leica com espessura aproximada de 4  $\mu\text{m}$  e colocados sobre lâminas histológicas. Após isso, as glândulas de veneno foram processadas sob diferentes colorações, descritas abaixo, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX51. As imagens foram obtidas através da câmera digital Olympus DP-71 e a aquisição das imagens foi realizada com o software DP Controller.

- Análise morfológica - Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Alguns cortes foram corados com Hematoxilina (10 minutos) e lavados em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, foram submetidos a uma solução aquosa de Eosina por 5 minutos e lavadas com água destilada.

- Detecção de ácidos nucleicos - Azul de Toluidina (MELLO; VIDAL, 1980).

Para a evidenciação dos ácidos nucleicos o material foi corado com solução aquosa de Azul de Toluidina 1% e pH 9,0, por 10 minutos e lavado em água destilada.

- Detecção de proteínas - Azul de Mercúrio de Bromofenol (PEARSE, 1960).

As lâminas contendo as secções das glândulas de veneno foram colocadas em solução de Azul de Mercúrio de Bromofenol durante 1 hora à temperatura ambiente, banhadas por 5 minutos em solução aquosa de ácido acético 0,5% e lavadas em água destilada.

- Detecção de DNA – Feulgen. (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924) e contra-coloração com o Fast - Green 1%.

As lâminas foram colocadas em HCl por 45 minutos e posteriormente em água destilada por 5 minutos. Em seguida, foram submetidas ao Reativo de Schiff por 1 hora no escuro e em água sulfurosa por 1 minuto. As lâminas foram então lavadas em água corrente por 15 minutos e em seguida, os cortes foram contra-corados com Fast – Green 1%, por 30 segundos e lavados em água destilada.

- Detecção de polissacarídeos - PAS (McMANUS, 1946) e contra-coloração com o Verde de Metila.

Para a evidenciação de polissacarídeos, depois dos cortes serem fixados em Bouin aquoso, as lâminas foram colocadas em uma solução de ácido periódico 1%, por 5 minutos, e lavadas em água destilada. Em seguida, foram submetidas ao reagente de Schiff (fucsina básica descorada pela perda de aldeído) por 1 hora e lavadas em água corrente por 30 minutos. A seguir, os cortes foram contra-corados por 20 segundos com Verde de Metila e lavados.

Em todos os procedimentos descritos acima, após secagem, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.

- Detecção de lipídeos - Sudan Black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

As lâminas contendo os cortes das glândulas de veneno foram fixadas em Formol  $\text{Ca}^{2+}$ . O material foi desidratado e incluído conforme a técnica rotineira de inclusão em historesina Leica, descrita acima. Para a evidenciação de lipídios, os cortes, depois de lavados em álcool 70%, foram corados por 15 minutos em Sudan Black e de 2 a 4 minutos em vermelho neutro.

Todas as lâminas foram montadas em Gelatina Glicerizada após completa secagem.

## 4 RESULTADOS

As glândulas de veneno de abelhas e vespas possuem características estruturais em comum, consistindo de um túbulo secretor fino que desemboca em um reservatório; entretanto, analisando-se esta glândula em abelhas *A. mellifera* africanizada e em vespas *P. versicolor*, *A. palipes palipes* e *P. paulista* puderam-se encontrar algumas variações morfológicas entre estas espécies.

A glândula de veneno de abelhas *Apis mellifera* africanizada, a partir da análise realizada de acordo com as idades dos indivíduos, apresenta características diferenciadas, de modo que, o avanço do ciclo secretor implica em alterações na morfologia de tal estrutura. Depois de realizadas as técnicas morfológicas e histoquímicas, concluiu-se que em abelhas o epitélio da glândula de veneno tem sua espessura diminuída com o avanço do ciclo secretor, o que fica bastante evidente através da comparação entre as idades de 7, 14, 21 e 28 dias das abelhas utilizadas no trabalho. Nas idades mais avançadas o epitélio se torna mais estreito e degenerado (Figuras 1D, 5D, 9D, 13D, 17D e 21D).

Com o avançar da idade nota-se que os núcleos sofrem mudanças, aparecendo com formato mais irregular e picnóticos, com cromatina mais esparsa, além da presença de vacuolizações no citoplasma (Figuras 5C e 5D). Pode-se notar também a presença de uma maior quantidade de nucléolos no núcleo de *A. mellifera* com idades de 7 e 14 dias, o que pode sugerir uma maior atividade de síntese do veneno nestas idades quando comparadas com as demais (Figuras 5A e 5B). A quantidade de secreção liberada no lúmen aparece em menor quantidade nas idades mais avançadas (Figuras 1A e 1B), sendo quase ausente nas abelhas com idades de 28 dias (Figura 1D), característica esta, bastante evidente nos cortes corados com Hematoxilina e Eosina.

Dois tipos de células foram encontrados no epitélio da glândula de veneno de *A. mellifera* e nas três espécies de vespas. As células secretoras, presentes na porção mais externa da glândula com núcleos maiores, e as células da camada interna, possuindo núcleos menores e onde está presente a cutícula que reveste a luz da glândula (Figuras 1A, 2A, 3A e 8A).

Analisando as glândulas de veneno de vespas e comparando-as com as de abelhas, observou-se que a camada cuticular que reveste o lúmen da glândula é mais espessa em *A. mellifera* (Figuras 5A, 5C e 5D). Os canalículos, estruturas responsáveis por despejar o veneno no lúmen da glândula, são maiores e mais evidenciados em *P. versicolor*, aparecendo mais proeminentes e em maior número, quando comparados com as demais espécies (Figuras

6B, 10B e 18B). Outra característica observada tanto em *A. mellifera* africanizada, como nas vespas, foi a presença de vesículas de secreção no epitélio das glândulas (Figuras 1A, 3B, 4B, 8A e 22A).

No interior do reservatório de vespas está presente uma estrutura tubular denominada glândula convoluta. Analisando esta estrutura em *P. versicolor*, *A. palipes palipes* e *P. paulista* foi possível notar a predominância de células colunares sendo que alguns núcleos apresentaram formato mais alongado, seguindo deste modo, a forma da célula (Figuras 14C e 16C). Observando a glândula convoluta nas porções mais próximas ao lúmen do reservatório, notamos a presença de secreção, que de acordo com a posição e aparência, parece estar sendo eliminada para a luz, contribuindo deste modo, para a produção do veneno que é estocado no reservatório (Figuras 2D, 6D, 8D, 10D, 14D, 18C, 19D e 20D).

A técnica utilizada Hematoxilina e Eosina, objetiva identificar as partes basófilas e acidófilas da estrutura estudada. Nas glândulas de veneno de *A. mellifera*, os núcleos das células secretoras e das células da camada interna da glândula foram corados de roxo através da hematoxilina e aparecem bastante evidenciados, principalmente nas idades de 7 e 14 dias, idades estas de intensa atividade de síntese. Pode-se observar também que a secreção preenchendo o lúmen nestas idades, aparece com uma coloração mais rosada, sendo corada deste modo, pela eosina, podendo-se confirmar que esta secreção apresenta caráter básico (Figuras 1A e 1B). Nas vespas, os núcleos das células das glândulas de veneno apresentaram coloração arroxeada e praticamente nenhuma secreção pôde ser visualizada no lúmen da glândula (Figuras 2B, 3B e 4B). Nas glândulas convolutas, a secreção produzida apareceu mais escura, sugerindo assim, que ela é mais ácida do que a secreção encontrada na luz da glândula de veneno (Figuras 2D e 4D). Pode-se dizer também que a membrana basal aparece mais claramente definida nas fotomicrografias de *P. paulista* (Figura 4B).

Com base no material corado com Azul de Toluidina, que objetiva identificar estruturas ácidas, principalmente ácidos nucleicos, uma das principais características a serem notadas, é a marcante presença da camada de cutícula recobrimdo o lúmen da glândula de veneno de *A. mellifera* africanizada (Figura 5). Nas vespas, os canalículos foram bastante corados, especialmente em *P. versicolor* (Figura 6B), e as vesículas de secreção se tornaram bastante evidentes em *P. paulista* (Figura 8A), assim como em *A. mellifera*.

Novamente, assim como descrito para a coloração de Azul de Toluidina, através da técnica de Azul de Bromofenol, específica para proteínas, podemos notar que a cutícula em *A. mellifera* africanizada é bem mais aparente do que em vespas (Figura 9A). Além disso, pôde-

se notar nesta espécie, coloração mais evidente nos núcleos nas idades de 7 e 14 dias e na secreção sintetizada (Figura 9).

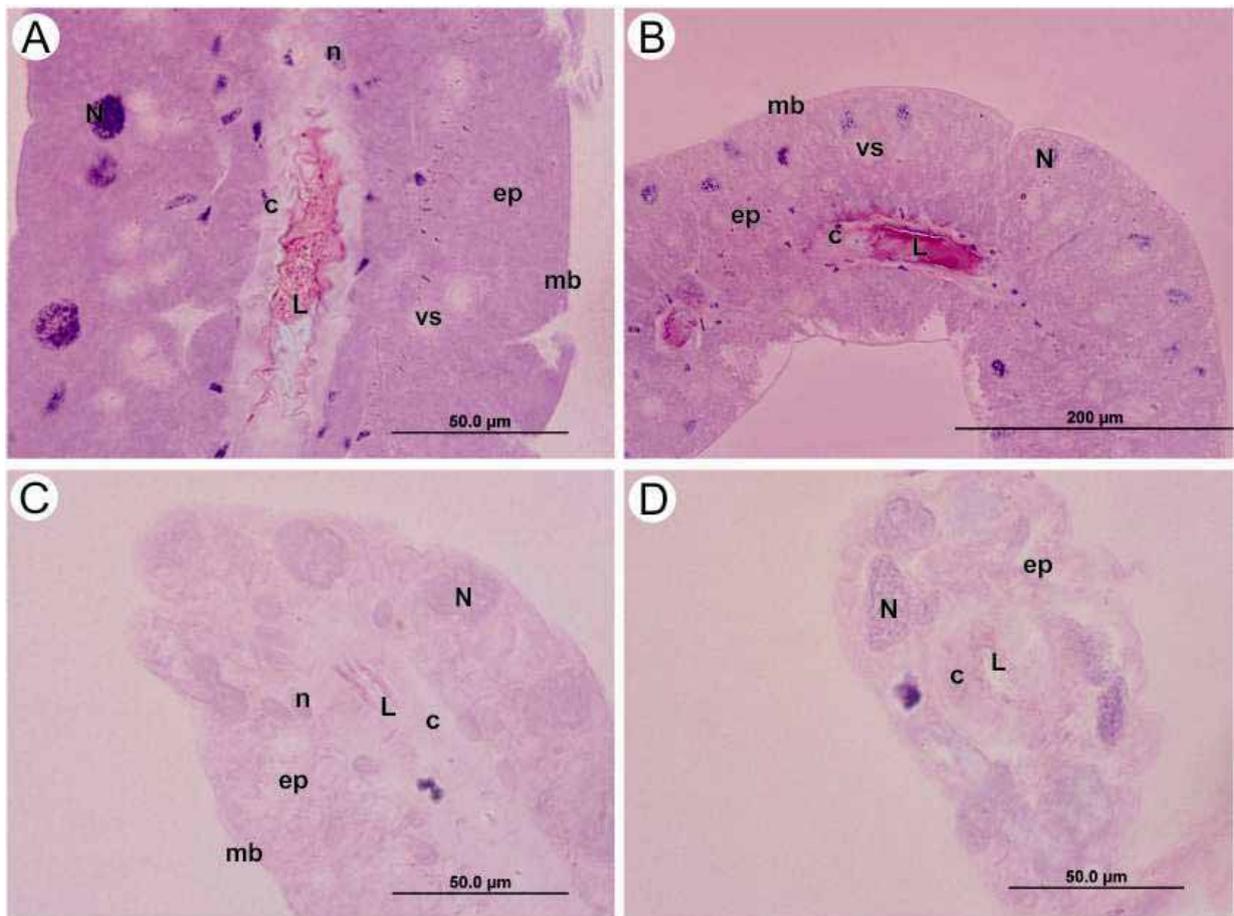
Nas vespas, os canalículos apresentaram reação positiva para esta técnica. O epitélio das glândulas convolutas de *A. palipes palipes* e de *P. paulista* foram muito mais fortemente coradas pelo Azul de Bromofenol, aparecendo mais escuro que o epitélio das glândulas de veneno (Figuras 11C, 11D, 12C e 12D). Nas glândulas convolutas de *P. versicolor*, as porções apicais das células foram coradas, indicando claramente a presença de secreção nestas regiões (Figuras 10C e 10D).

Para a reação de Feulgen, houve evidência dos núcleos das células das glândulas de veneno de abelhas e vespas. Atentando para a glândula convoluta, verificamos que os núcleos das células de *P. versicolor* e *A. palipes palipes* apresentaram formatos mais bem definidos (Figuras 14D e 15D) enquanto que em *P. paulista*, os núcleos exibiram uma forma mais alongada (Figura 16D).

Interpretando os dados obtidos através da técnica de PAS, utilizada para destacar a presença de polissacarídeos, observa-se que os canalículos e a camada de cutícula apresentaram bastante destaque nas glândulas de veneno de *A. mellifera* e de *P. versicolor* (Figuras 17A e 18A). Em relação às glândulas convolutas, evidenciou-se também a presença de secreção em porções próximas ao lúmen do reservatório, sendo que em todas as espécies, a secreção apresentou reação positiva para esta técnica (Figuras 18D, 19D e 20D).

Através da análise das fotomicrografias da técnica de Sudan Black (específica para lipídeos), pôde-se observar em *A. mellifera*, a presença de lipídeos aderidos à superfície das células (Figura 21B) e também no epitélio da glândula de veneno de *P. versicolor* (Figura 22A). Além disso, verificaram-se também vesículas de secreção nas glândulas de veneno de vespas *P. versicolor* e *P. paulista* (Figuras 22A e 24A). Com base nas análises da glândula convoluta das vespas, porções escuras foram visualizadas quando comparadas com a secreção presente ao redor desta estrutura. Assim, nós concluímos que há grânulos de lipídeos no epitélio da glândula convoluta destas vespas. Em *A. palipes palipes*, é evidente a presença destes lipídeos nas porções apicais das células, próximas à luz (Figura 23D), indicando também que eles fazem parte da constituição do veneno.

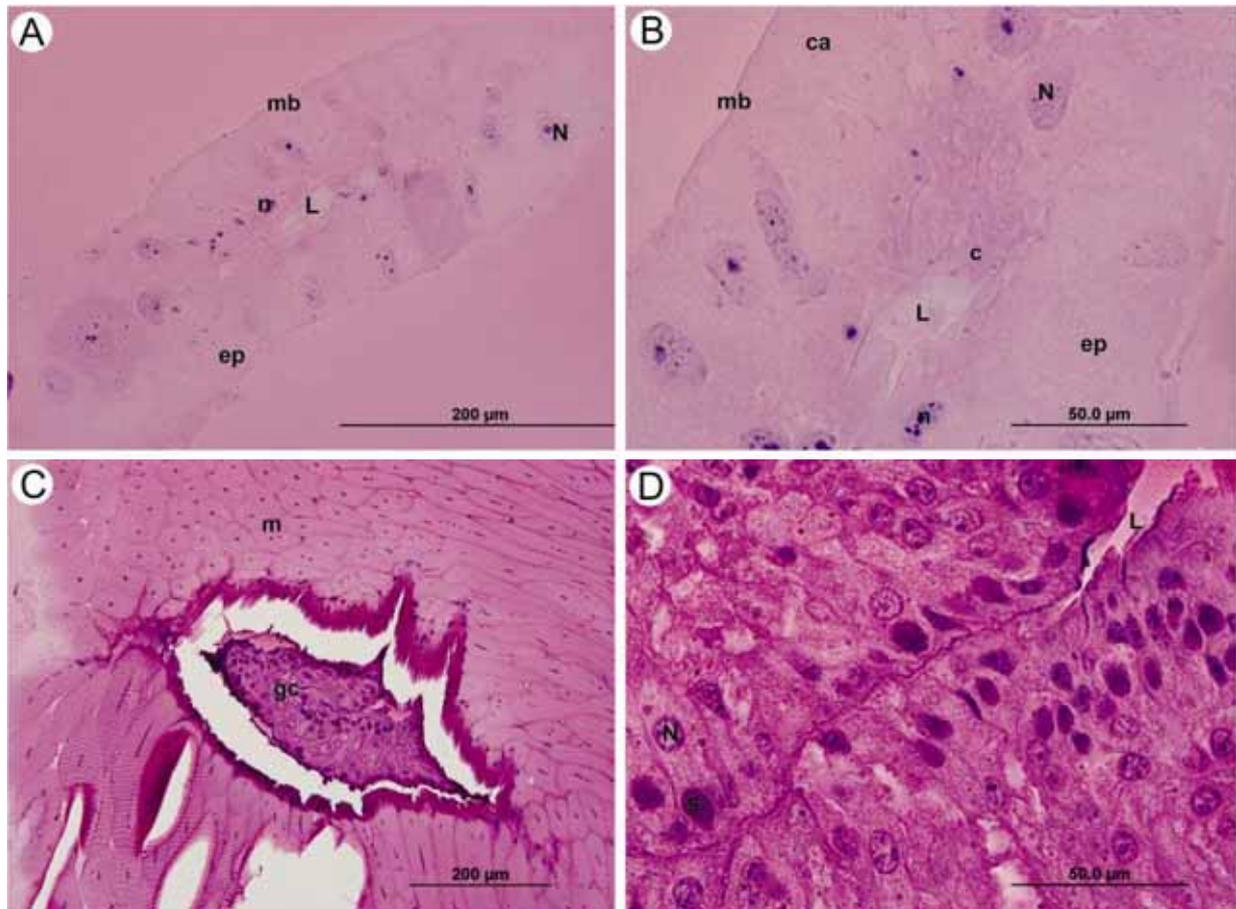
**Figura 1** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada corados com Hematoxilina e Eosina para a evidenciação de estruturas ácidas e básicas. **(A)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; vs - vesícula de secreção.

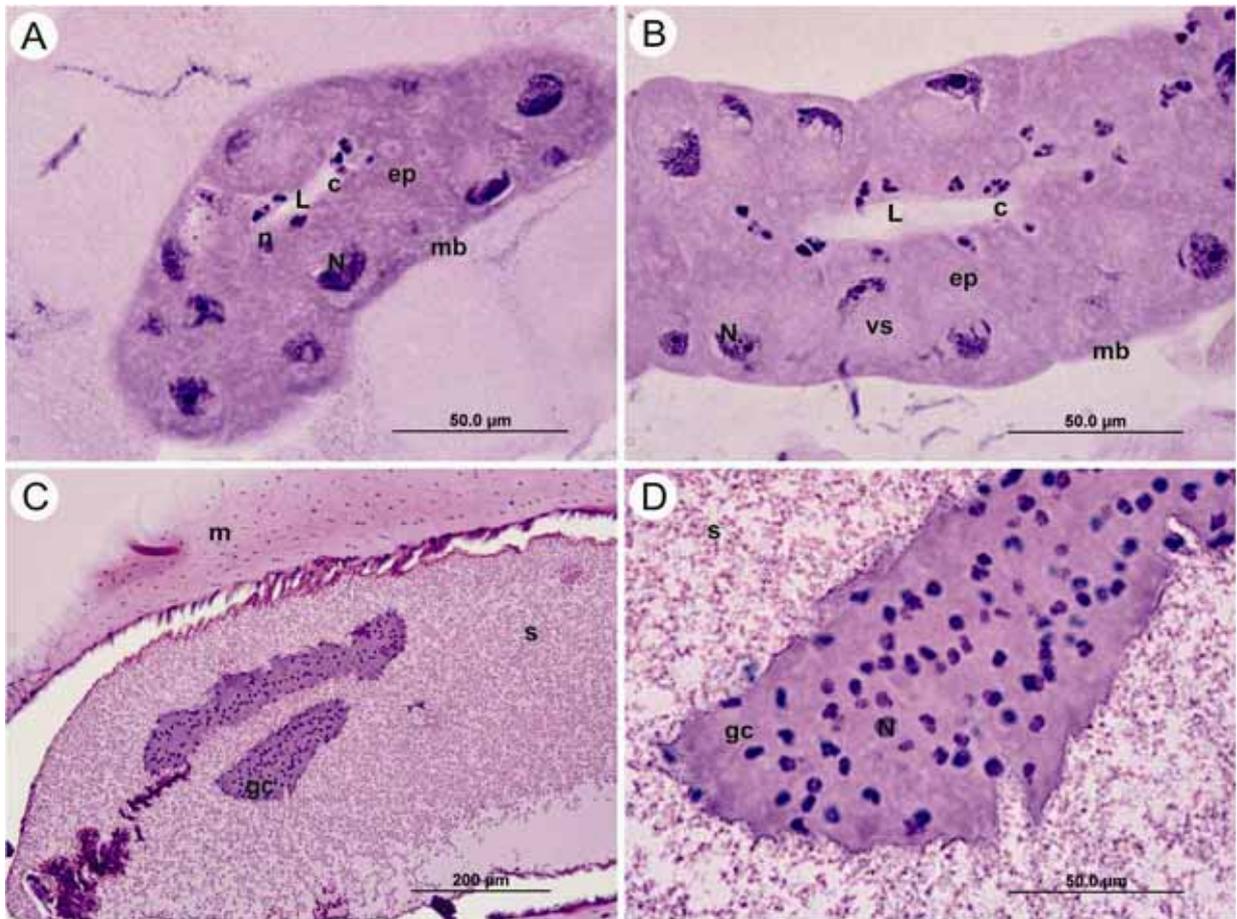
**Figura 2** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* corados com Hematoxilina e Eosina para a evidenciação de estruturas ácidas e básicas. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; ca - canalículo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção.

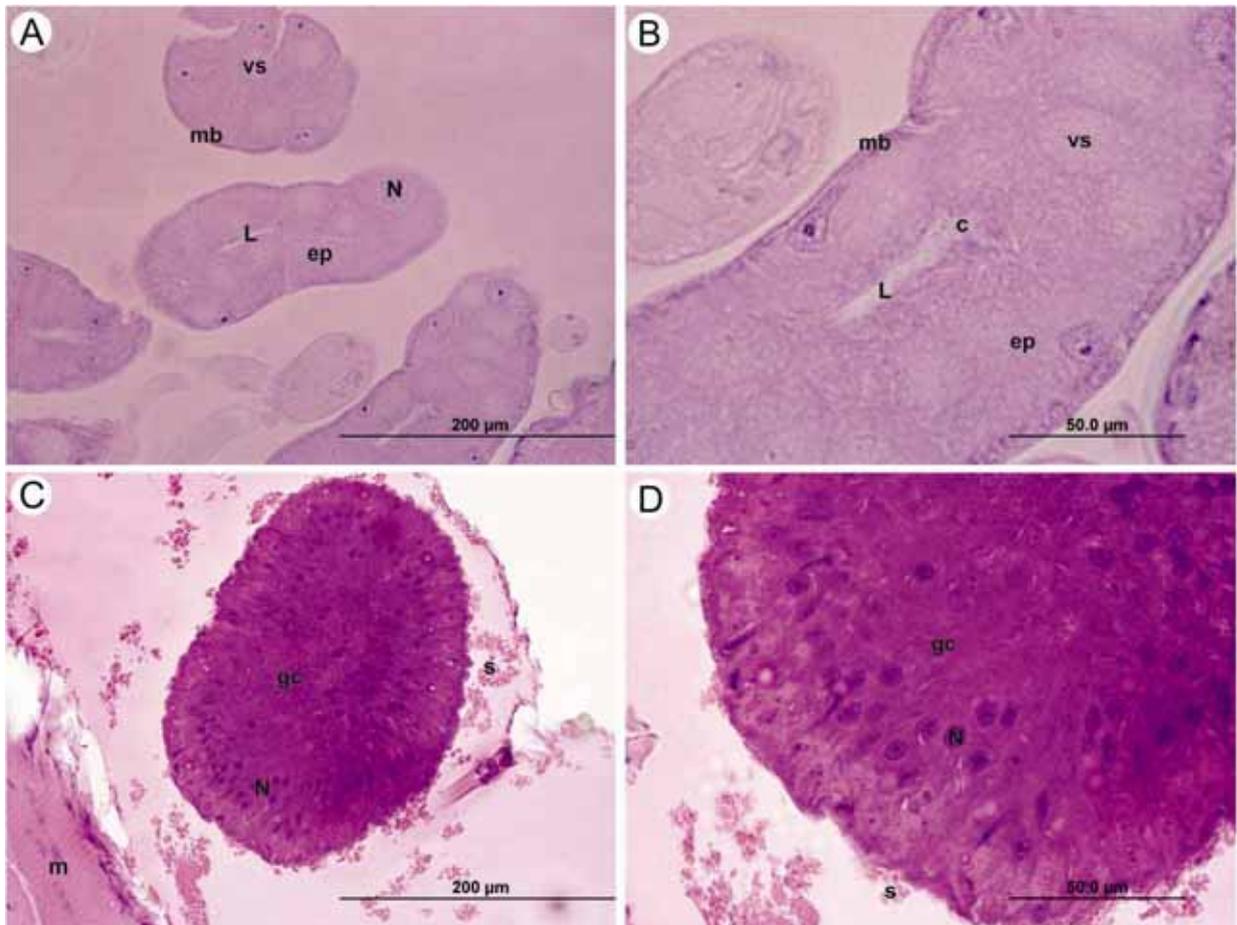
**Figura 3** – Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes* corados com Hematoxilina e Eosina para a evidenciação de estruturas ácidas e básicas. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Agelaia palipes palipes*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção.

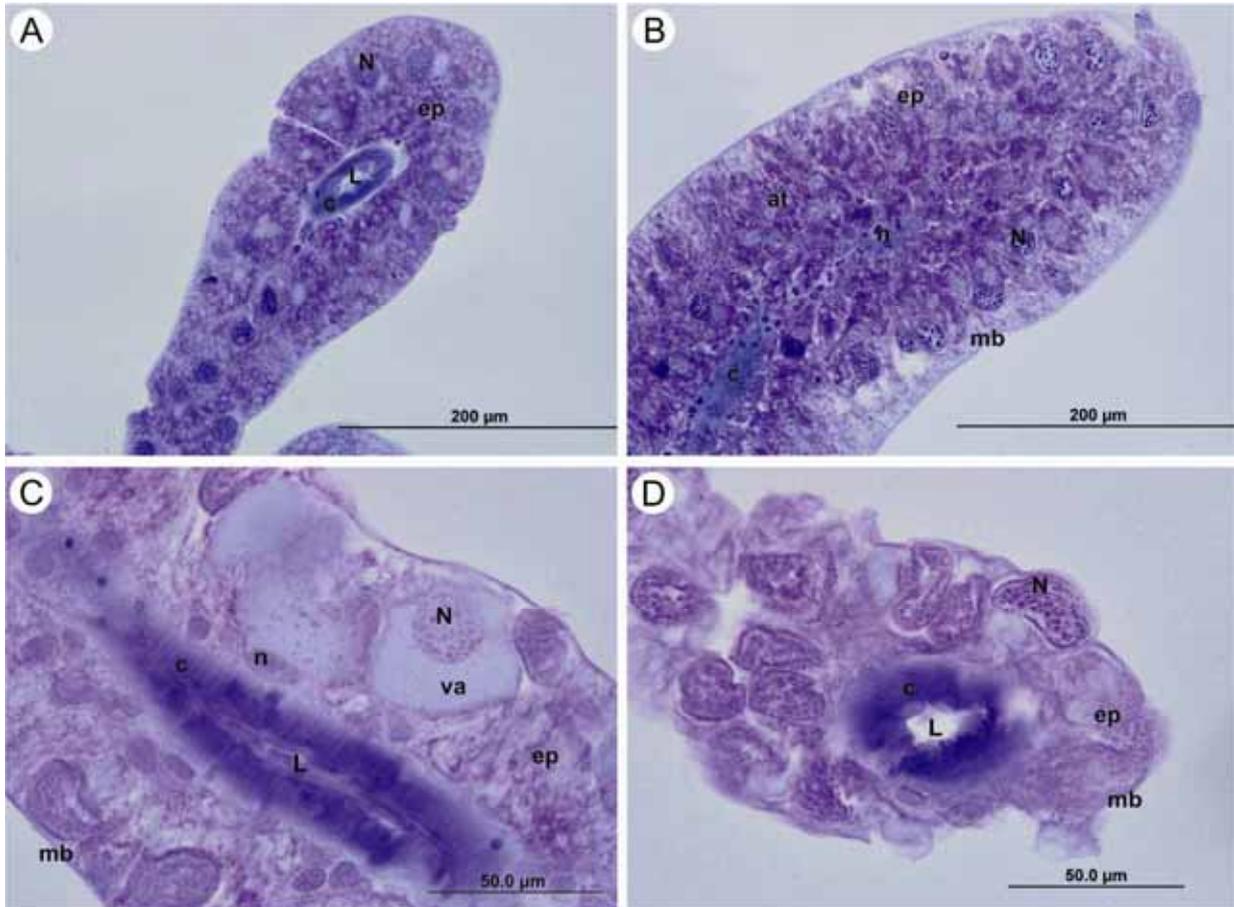
**Figura 4** – Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* corados com Hematoxilina e Eosina para a evidenciação de estruturas ácidas e básicas. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polybia paulista*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polybia paulista*. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; ca - canalículo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; vs - vesícula de secreção; s - secreção.

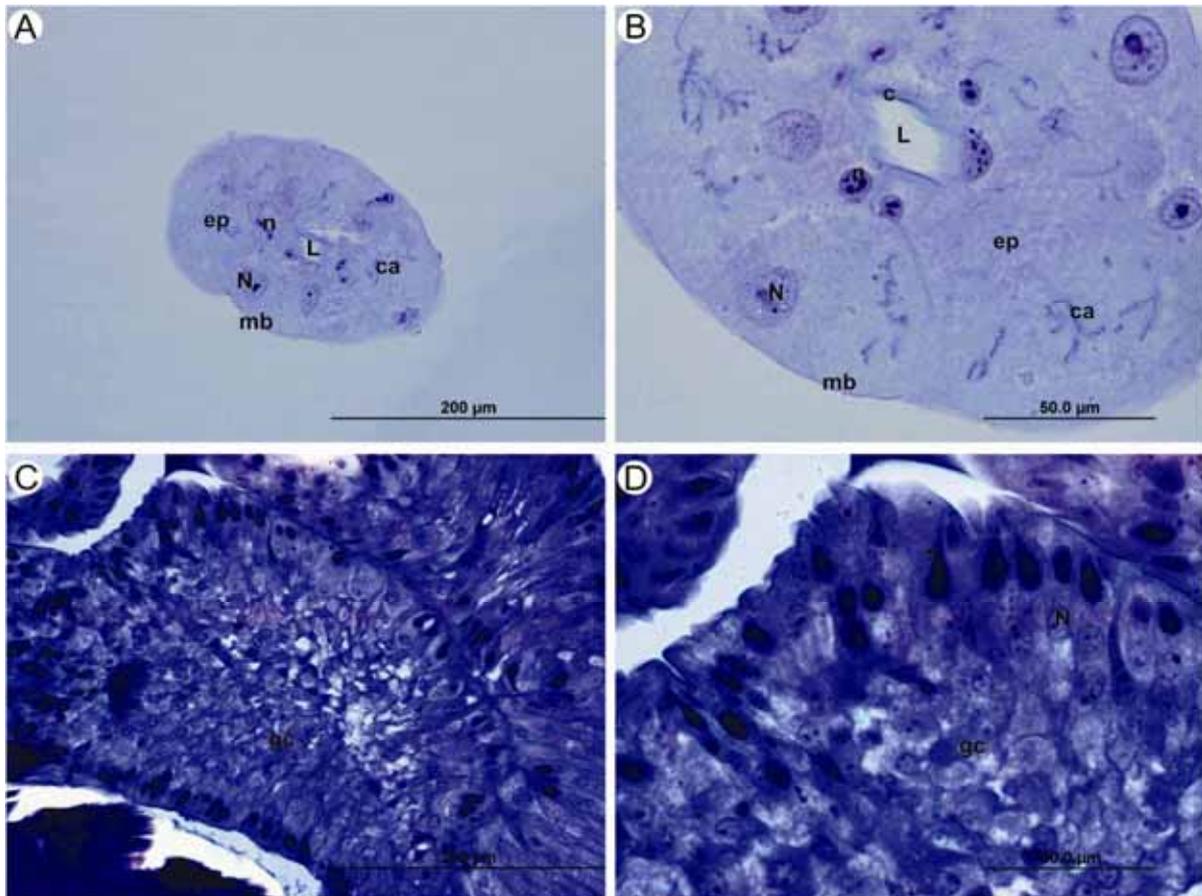
**Figura 5** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada corados com Azul de Toluidina para a evidenciação de ácidos nucléicos. **(A)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; L - lúmen; at - aparato terminal; ep - epitélio; mb - membrana basal; va - vacúolo.

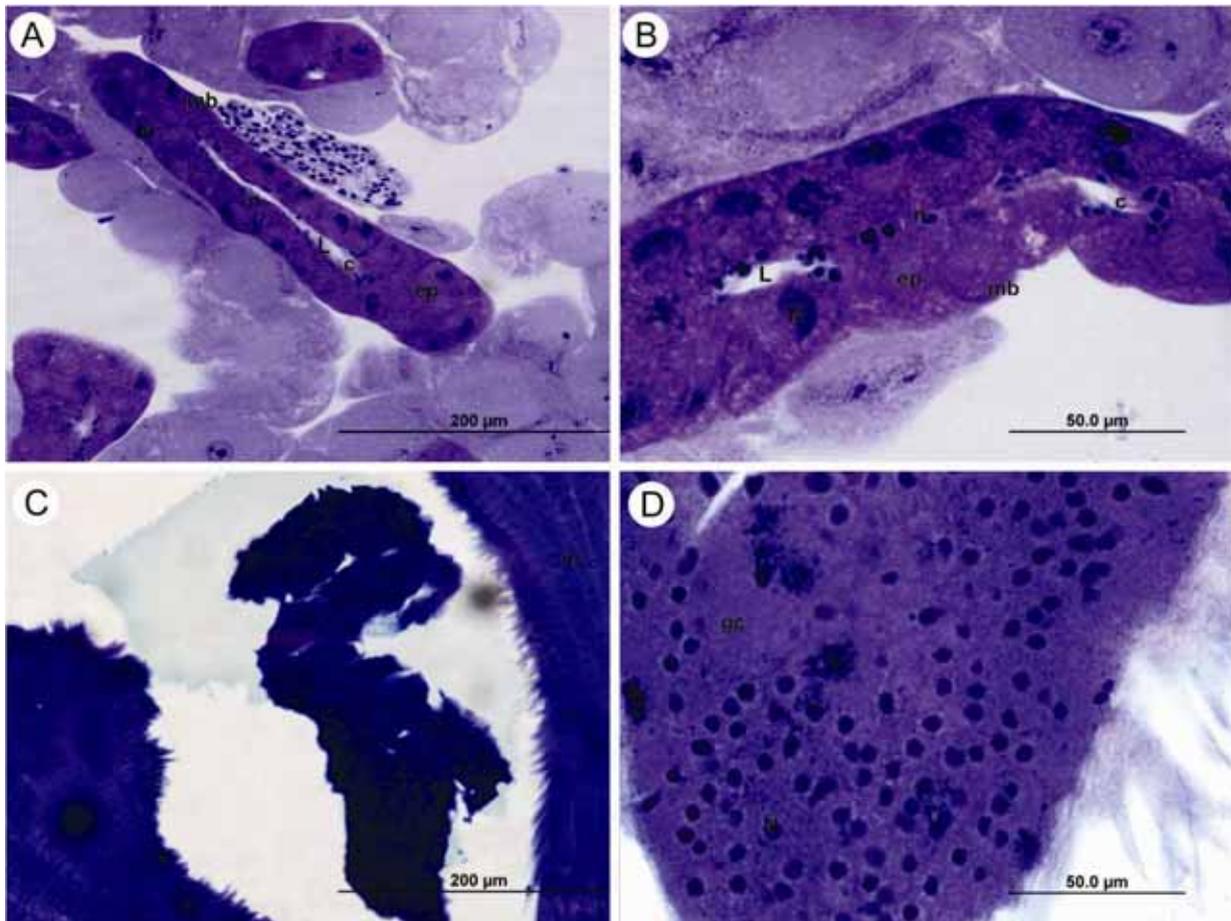
**Figura 6** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* corados com Azul de Toluidina para a evidenciação de ácidos nucléicos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; ca- canaliculo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; s - secreção.

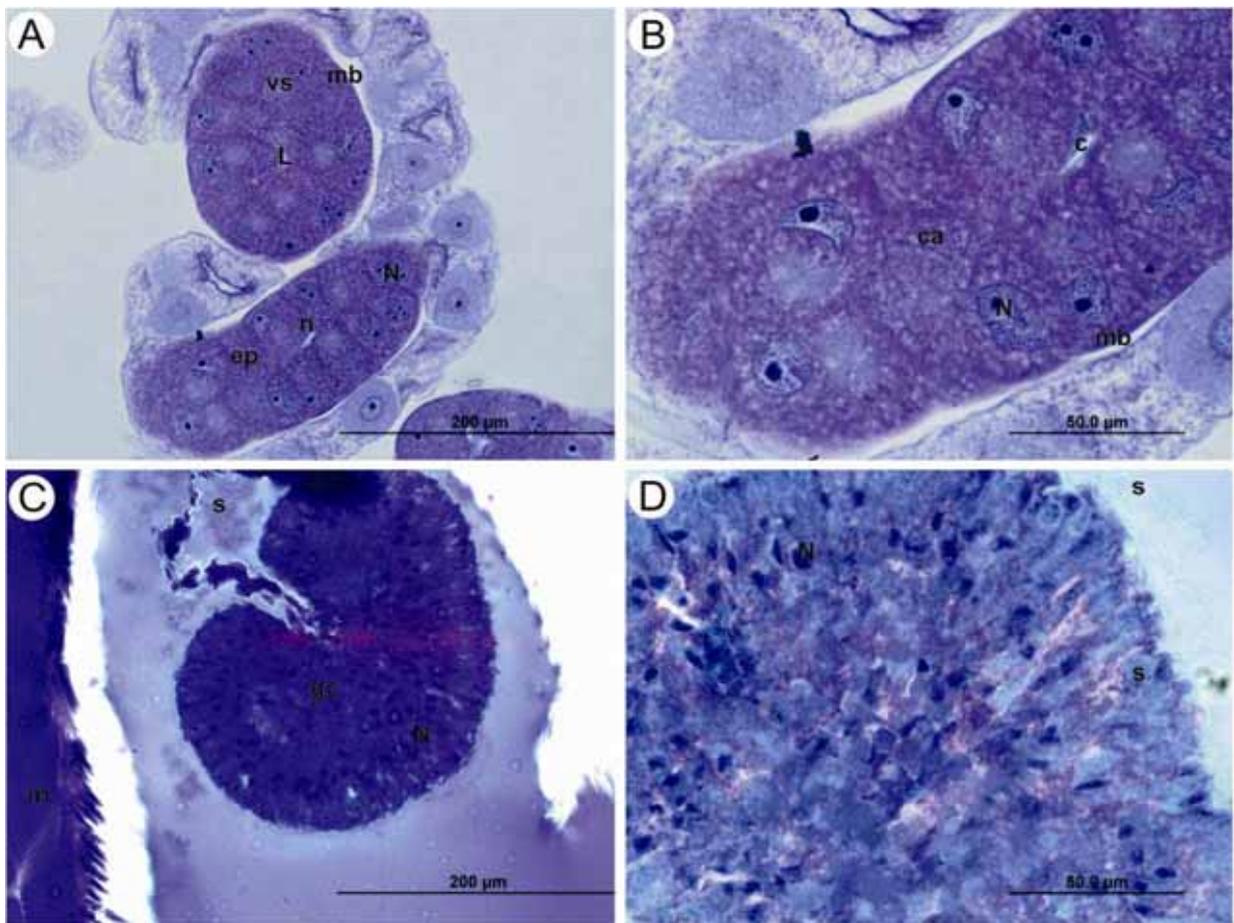
**Figura 7** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelais palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelais palipes palipes* corados com Azul de Toluidina para a evidenciação de ácidos nucléicos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Agelais palipes palipes*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Agelais palipes palipes*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; ca - canalículo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta.

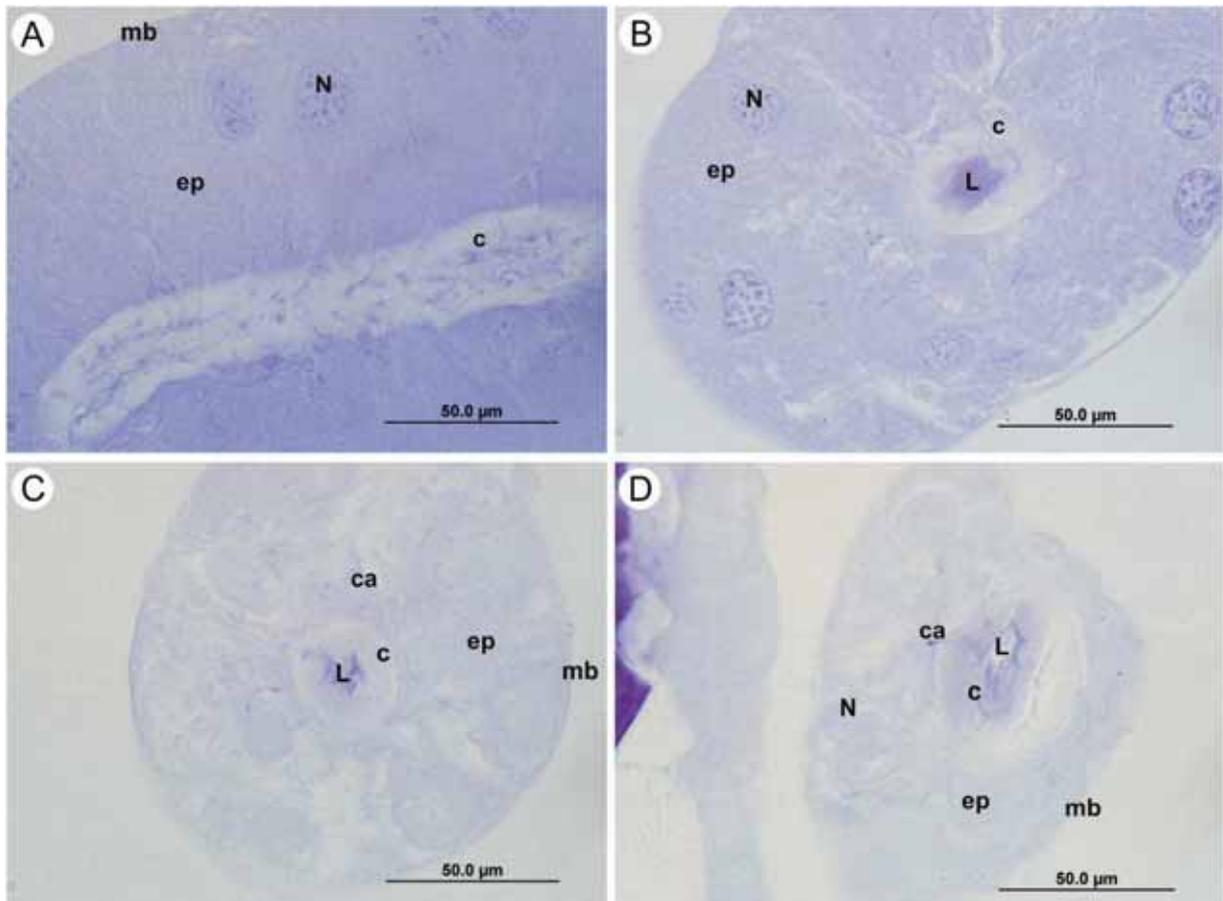
**Figura 8** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* corados com Azul de Toluidina para a evidenciação de ácidos nucléicos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polybia paulista*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polybia paulista*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; ca- canaliculo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; vs - vesícula de secreção; s - secreção.

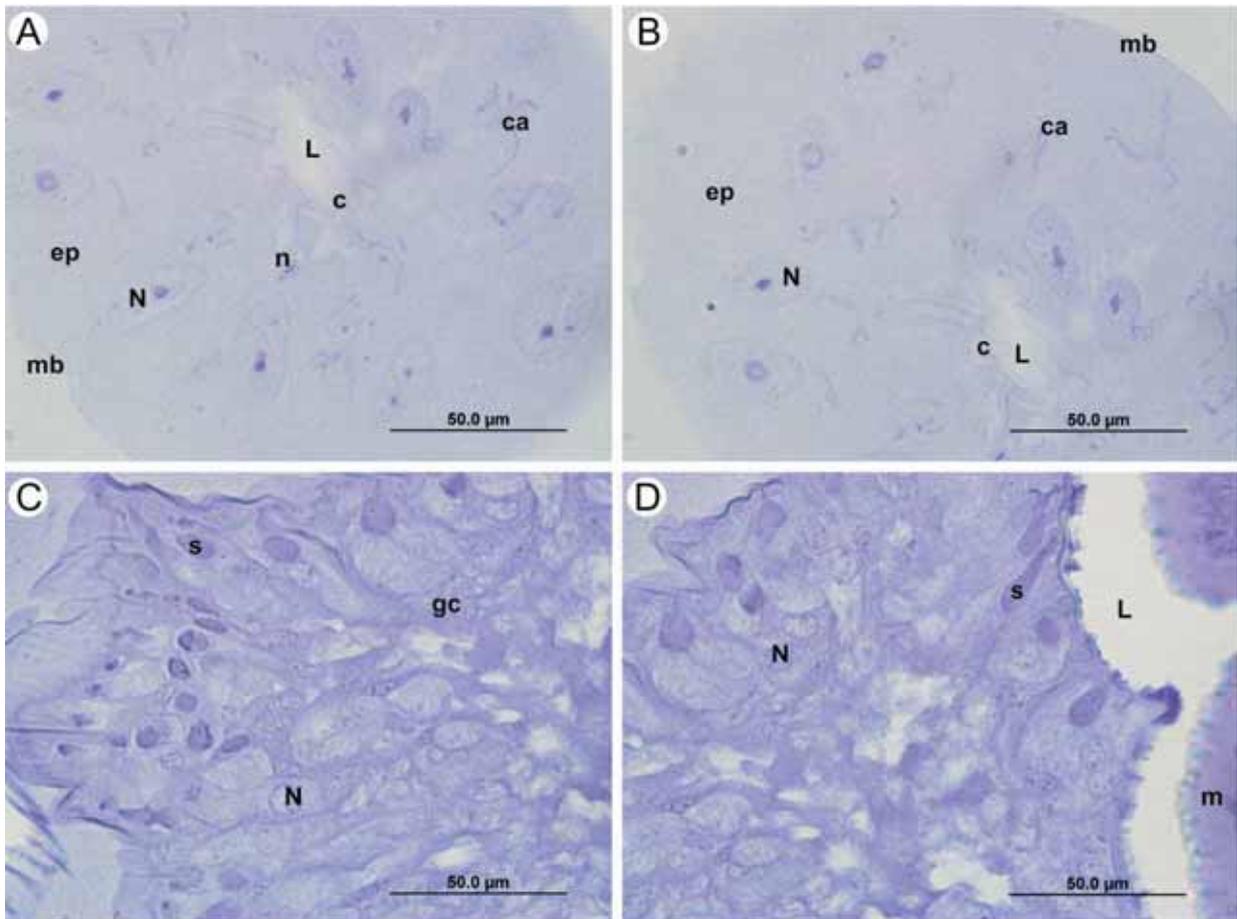
**Figura 9** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada corados com Azul de Bromofenol para a evidenciação de proteínas. **(A)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; ca - canalículo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal.

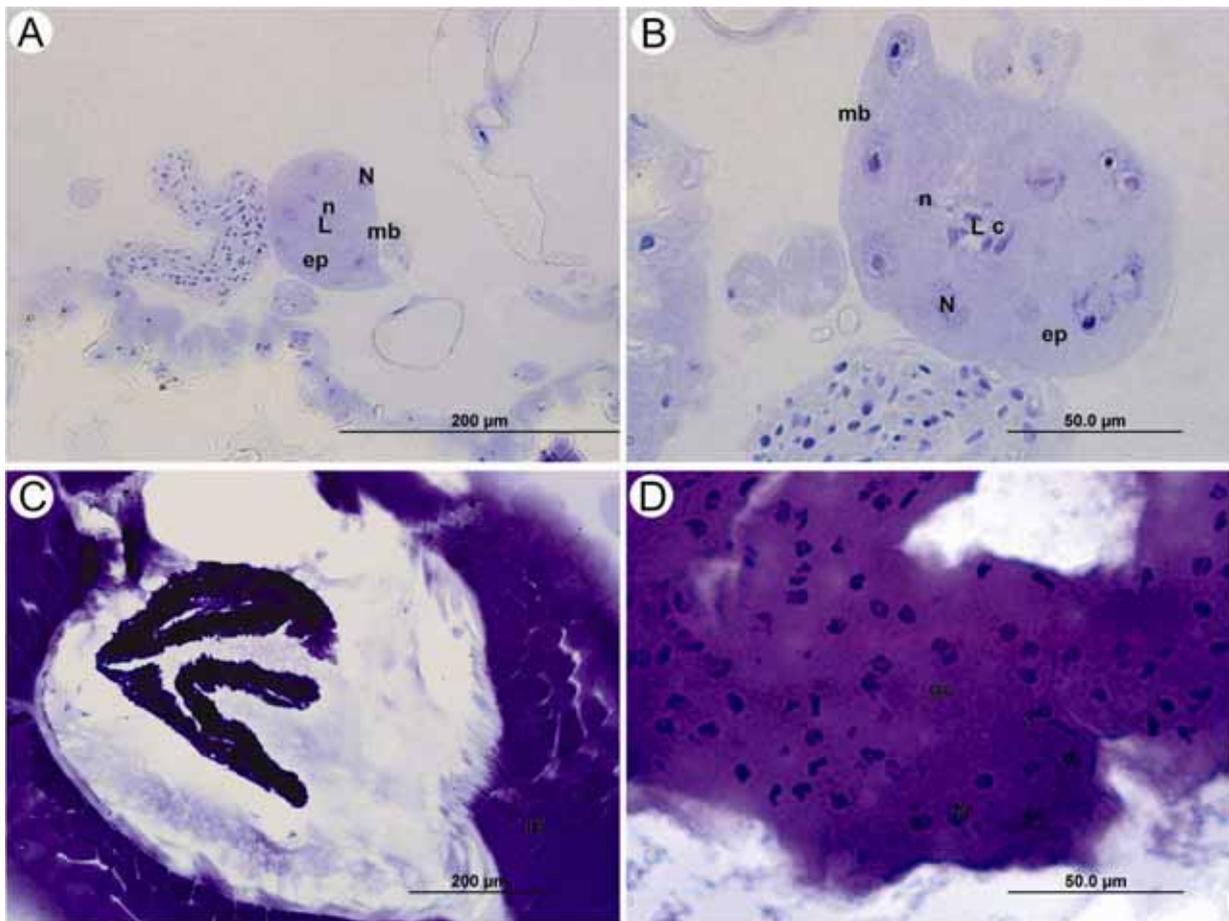
**Figura 10** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* corados com Azul de Bromofenol para a evidenciação de proteínas. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; ca - canalículo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção.

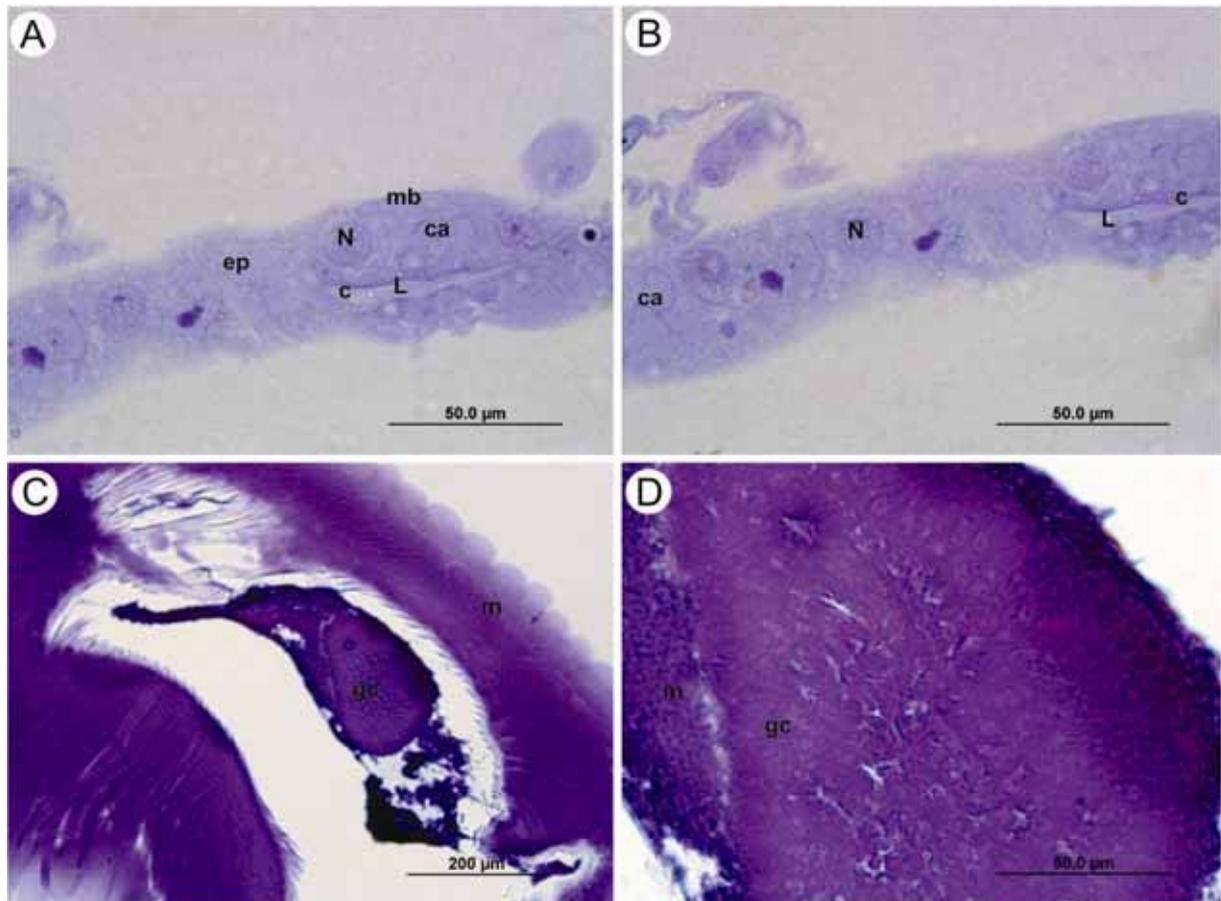
**Figura 11** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes* corados com Azul de Bromofenol para a evidenciação de proteínas. (A) e (B): Glândula de veneno de *Agelaia palipes palipes*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção.

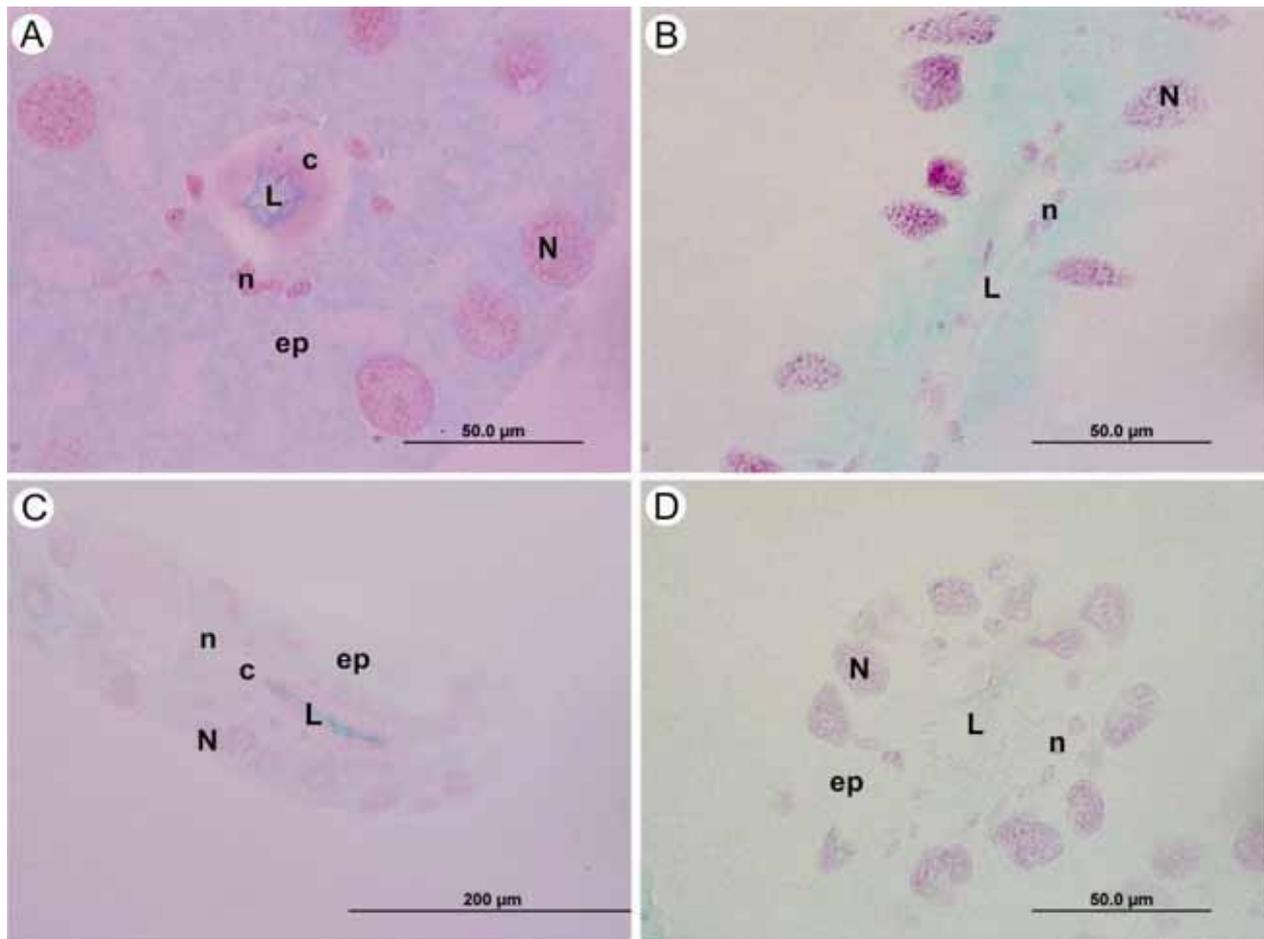
**Figura 12** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* corados com Azul de Bromofenol para a evidenciação de proteínas. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Polybia paulista*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Polybia paulista*. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; ca - canaliculo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório.

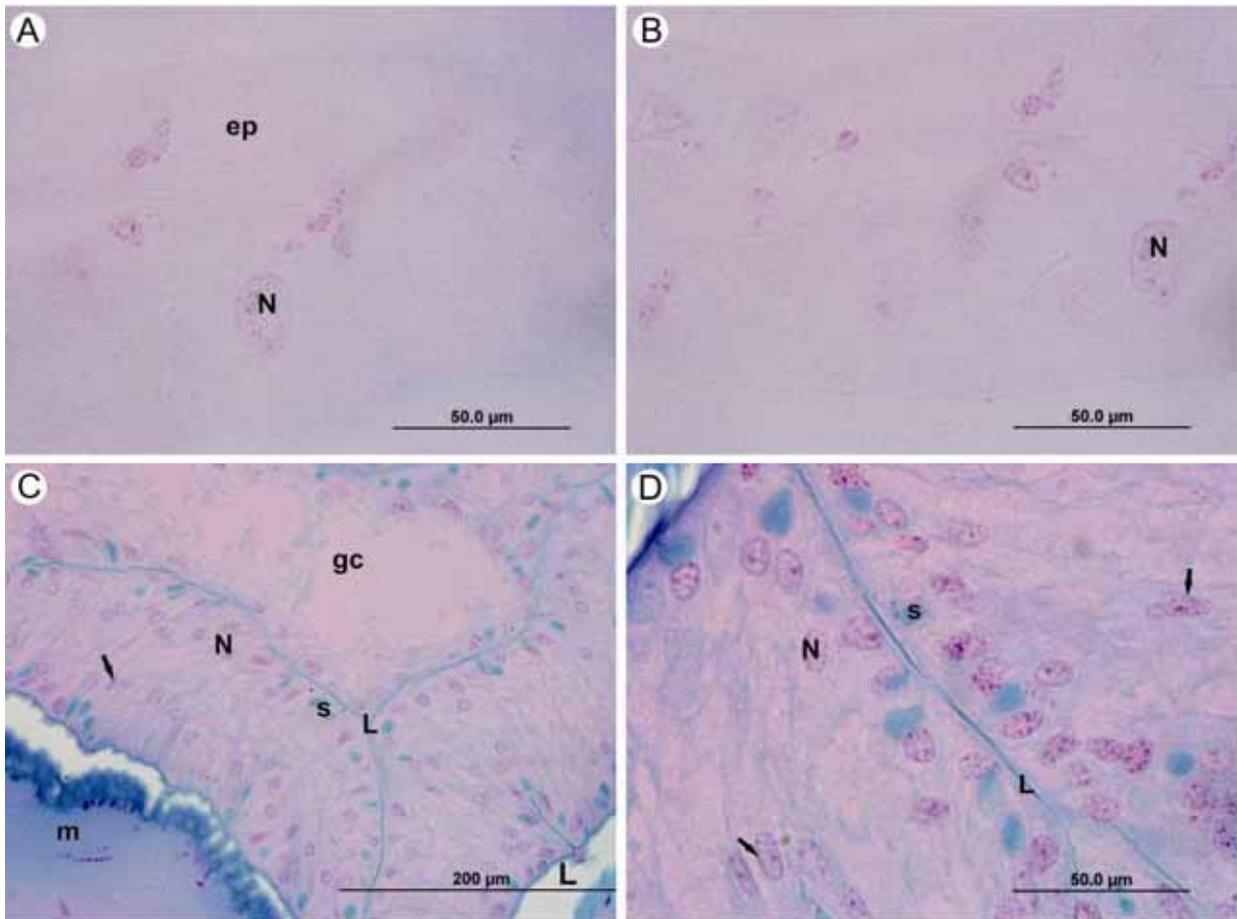
**Figura 13** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada submetidos à técnica de Feulgen para a evidência de DNA. **(A)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; c - cutícula; L - lúmen; ep - epitélio.

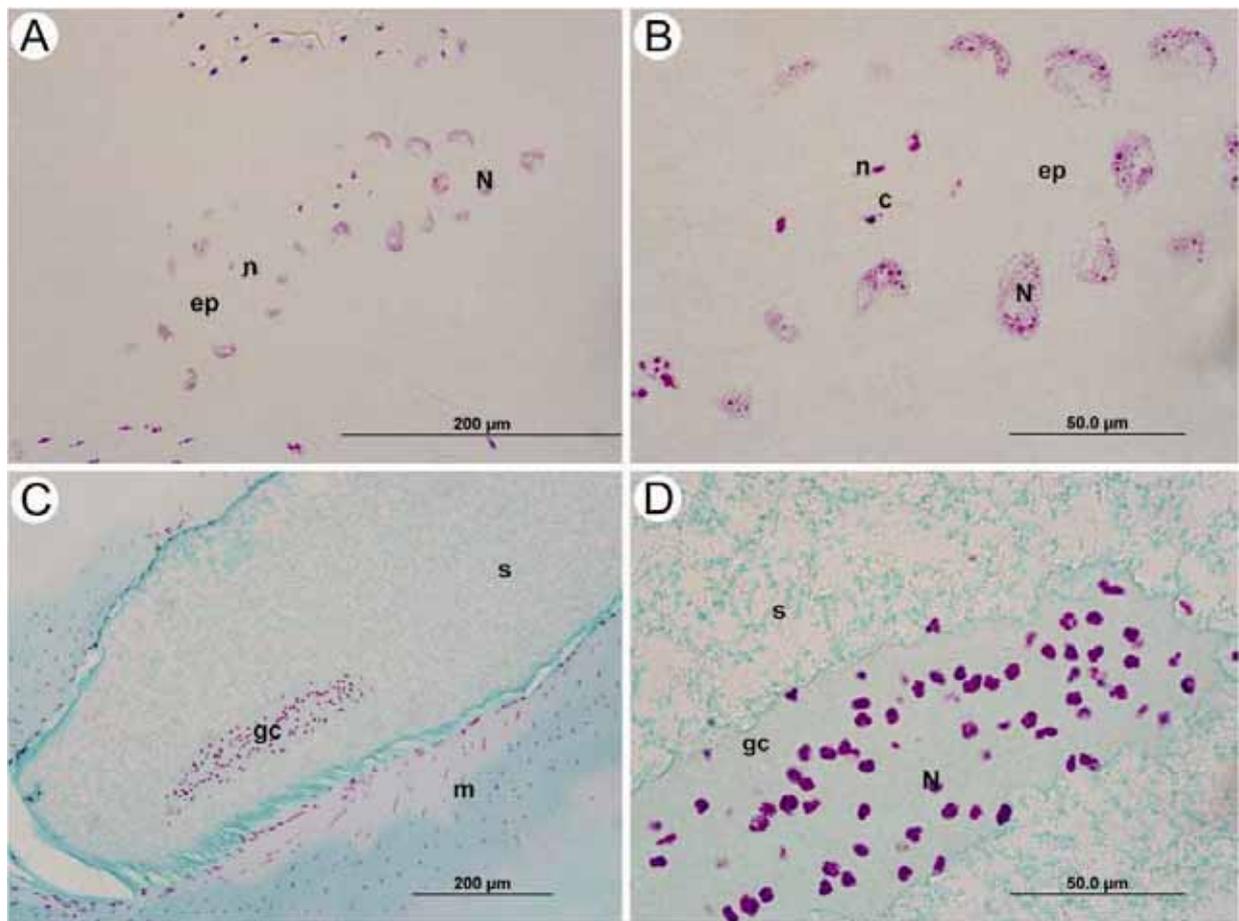
**Figura 14** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* submetidos à técnica de Feulgen para a evidenciação de DNA. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. N - núcleo da célula secretora; L - lúmen; ep - epitélio; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção; seta - núcleo (detalhe para o aspecto mais alongado do núcleo, seguindo o formato da célula).

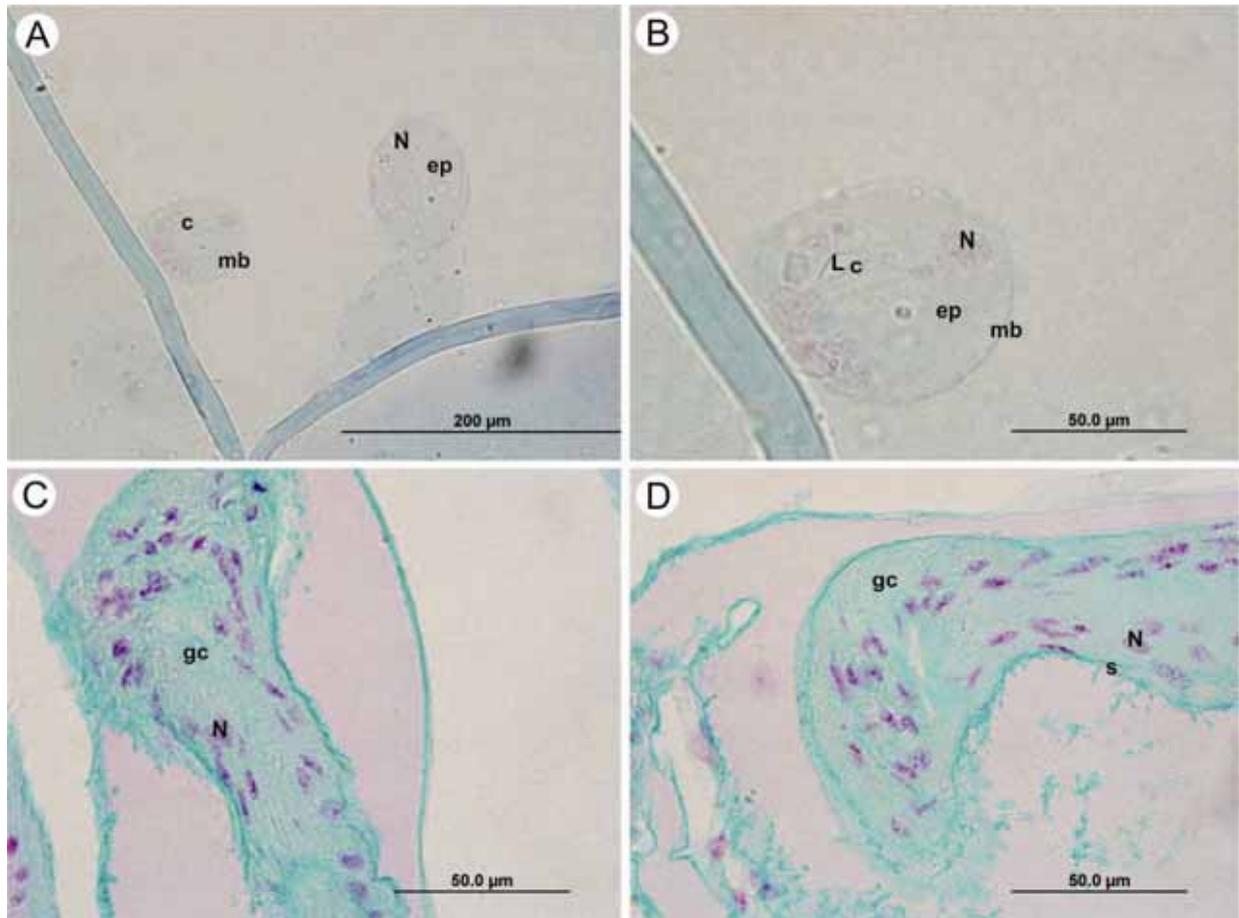
**Figura 15** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes* submetidos à técnica de Feulgen para a evidenciação de DNA. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Agelaia palipes palipes*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*. N - núcleo da célula secretora; n - núcleo da camada interna; ep - epitélio; c - cutícula; gc - glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s - secreção.

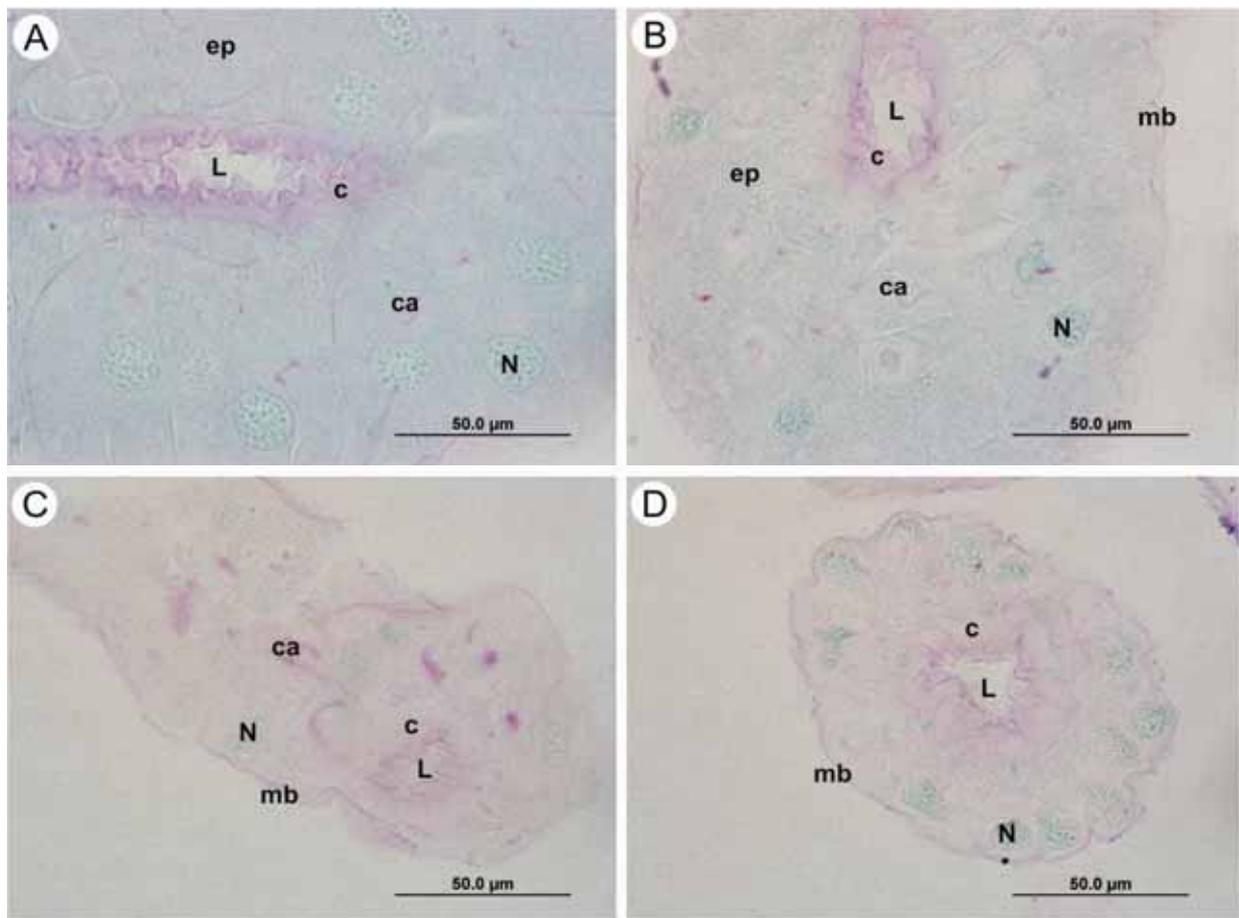
**Figura 16** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* submetidos à técnica de Feulgen para a evidenciação de DNA. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polybia paulista*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polybia paulista*. N - núcleo da célula secretora; L - lúmen; ep - epitélio; c - cutícula; mb - membrana basal; gc - glândula convoluta; s - secreção.

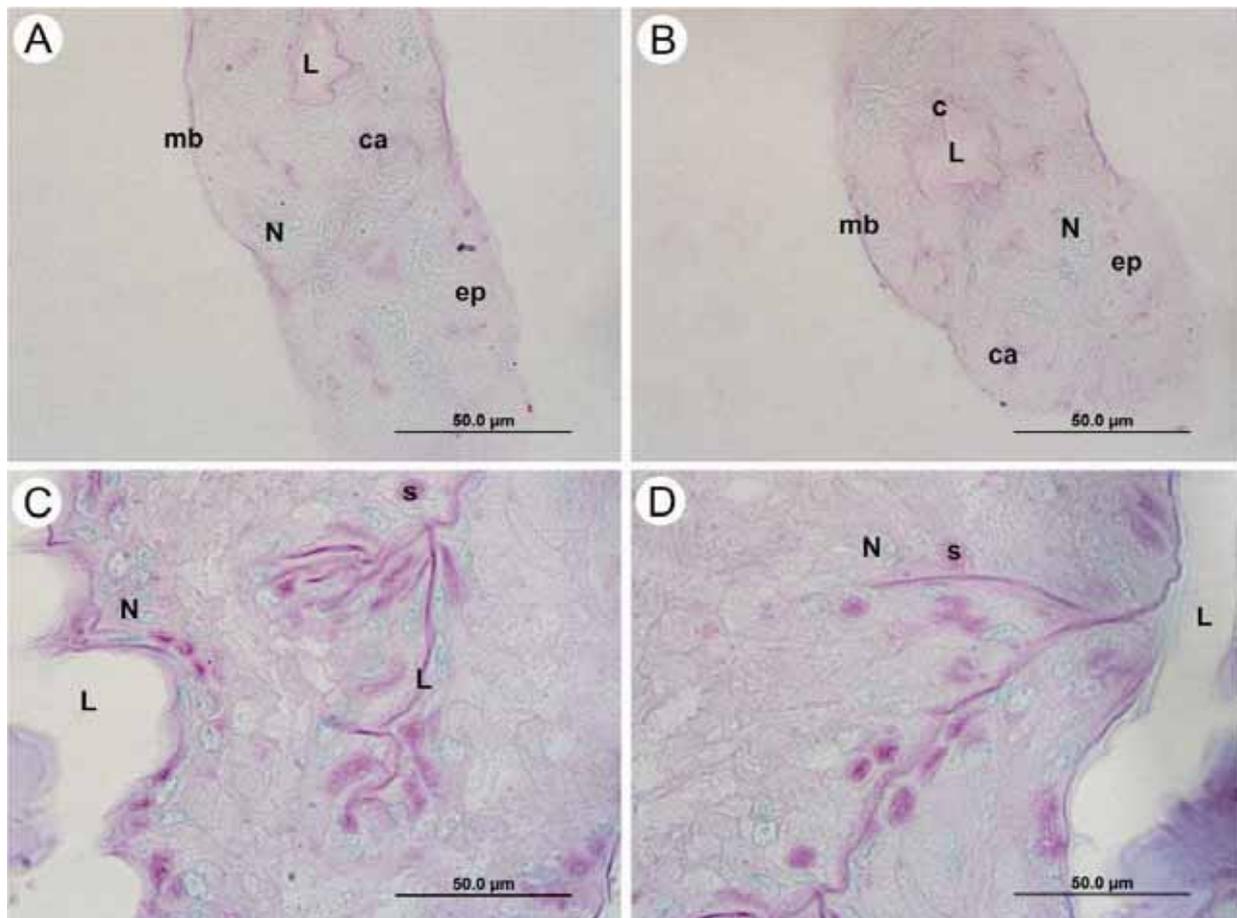
**Figura 17** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada submetidos à técnica de PAS para a evidenciação de polissacarídeos. **(A)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D)**: Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; ca - canaliculo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal.

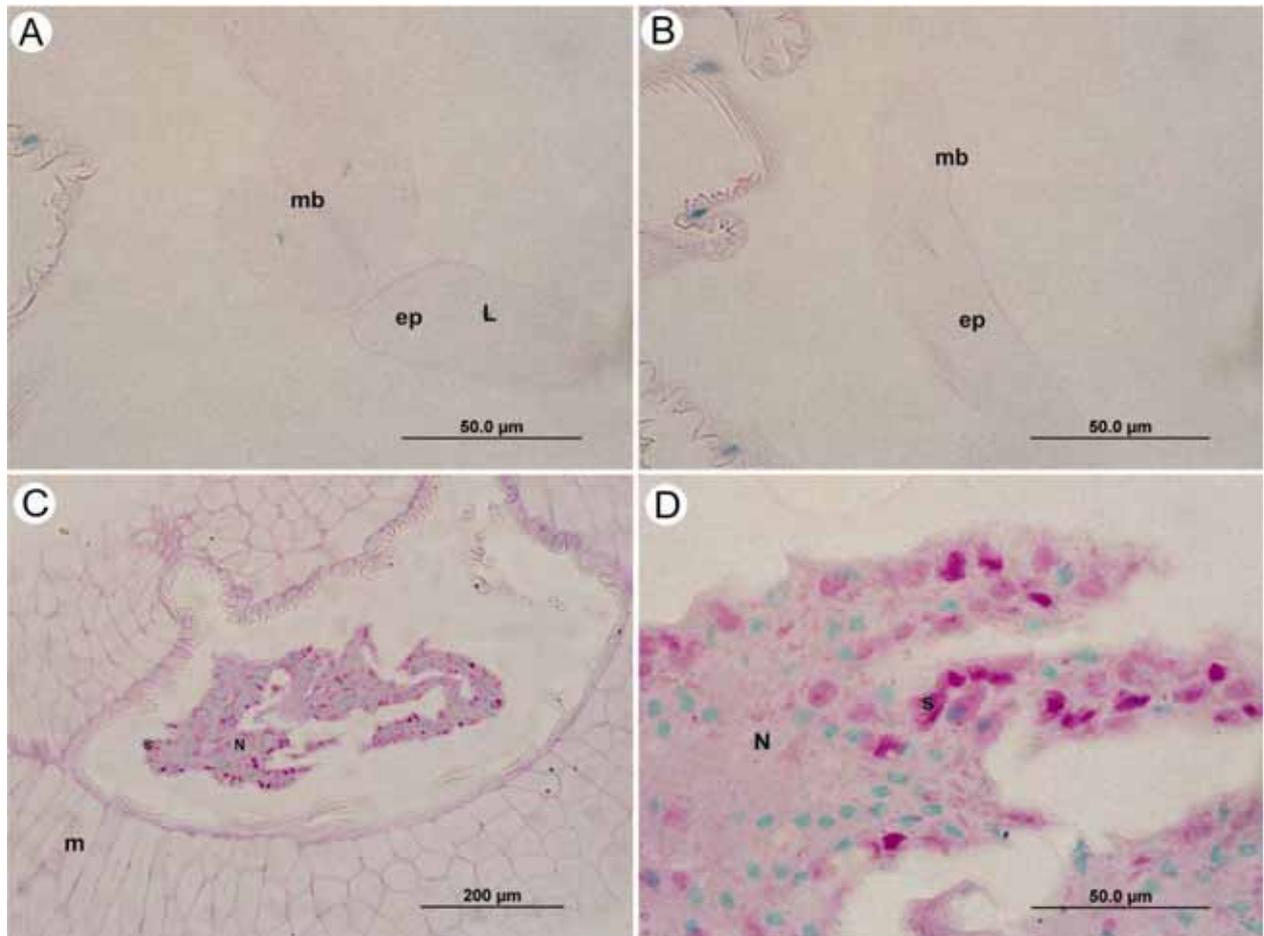
**Figura 18** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* submetidos à técnica de PAS para a evidência de polissacarídeos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; ca - canaliculo; L - lúmen; ep - epitélio; mb - membrana basal; s - secreção.

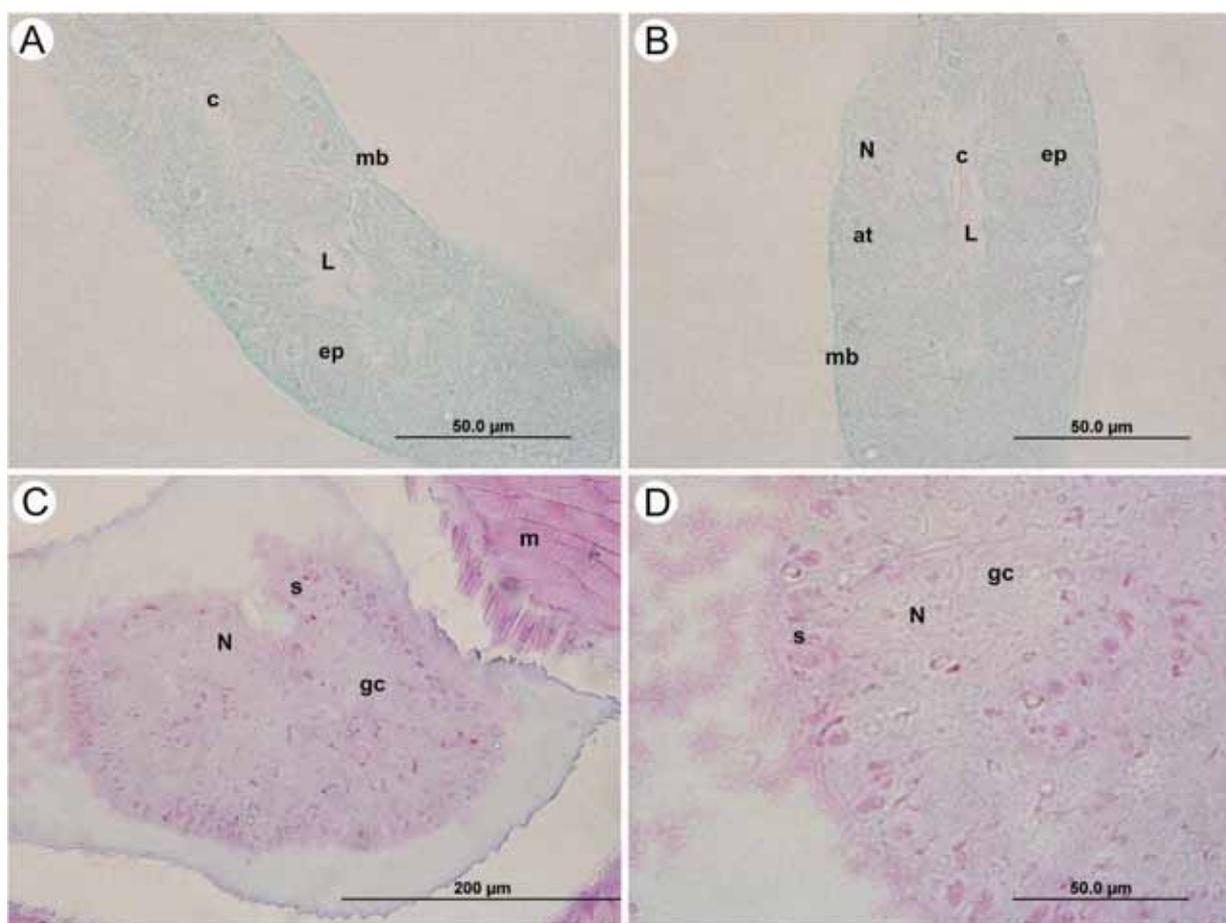
**Figura 19** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes* submetidos à técnica de PAS para a evidenciação de polissacarídeos. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Agelaia palipes palipes*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*. N – núcleo da célula secretora; L – lúmen; ep – epitélio; mb – membrana basal; m - camada muscular do reservatório; s – secreção.

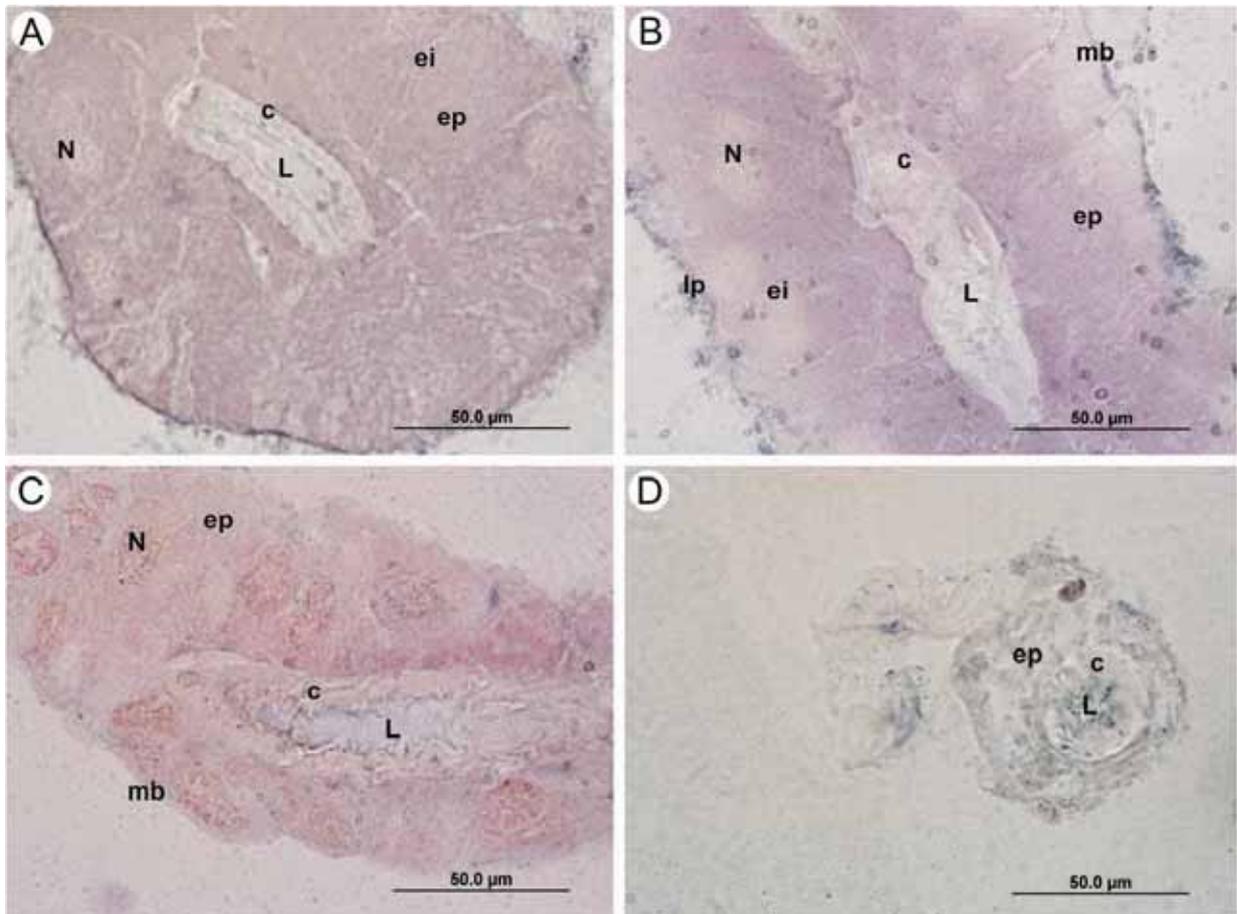
**Figura 20** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* submetidos à técnica de PAS para a evidenciação de polissacarídeos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polybia paulista*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polybia paulista*. N – núcleo da célula secretora; c – cutícula; L – lúmen; ep – epitélio; mb – membrana basal; at – aparato terminal; gc – glândula convoluta; m - camada muscular do reservatório; s – secreção.

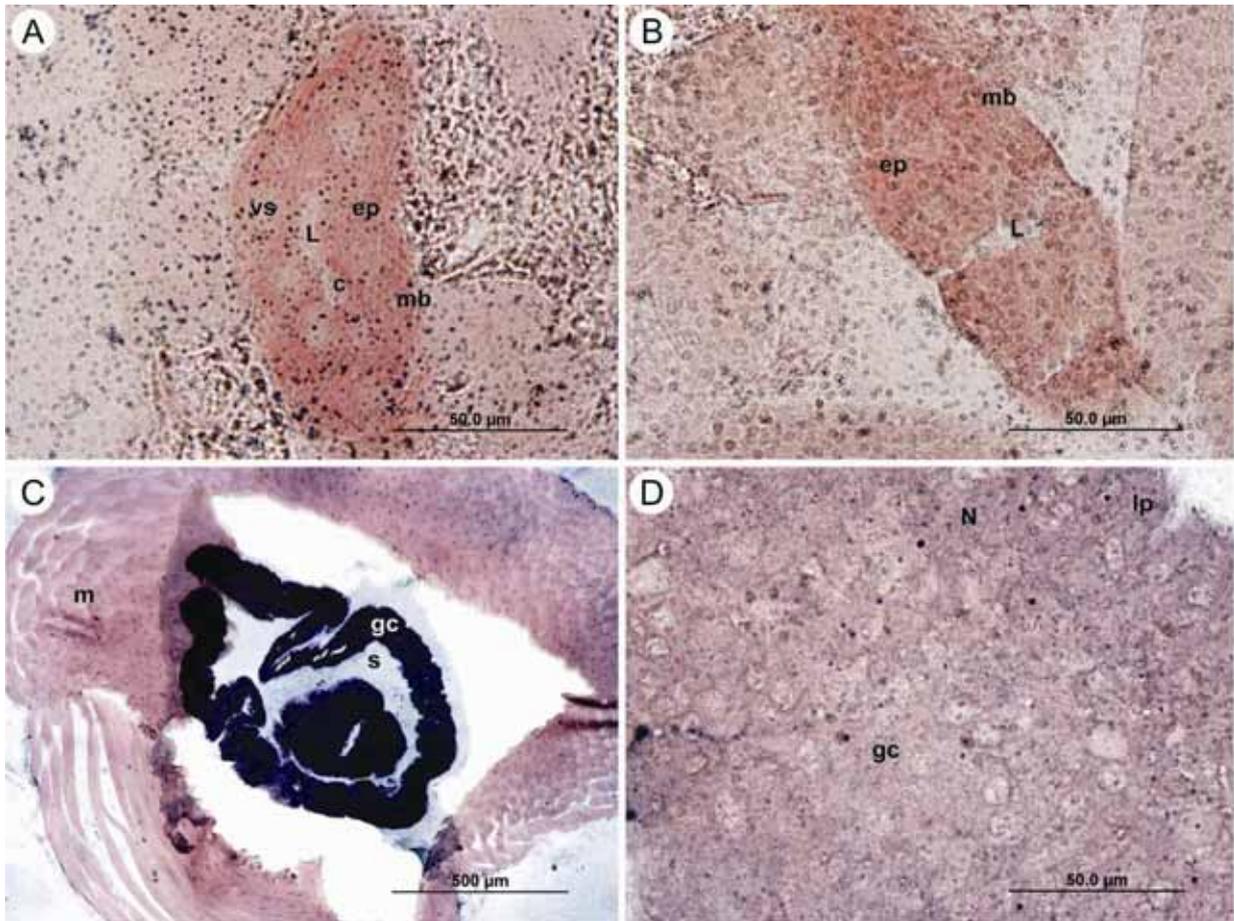
**Figura 21** - Glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada submetidos à técnica de Sudan Black para a evidenciação de lipídeos. **(A):** Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 7 dias. **(B):** Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 14 dias. **(C):** Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 21 dias. **(D):** Glândula de veneno de *Apis mellifera* com 28 dias. N - núcleo da célula secretora; c - cutícula; L - lúmen; ep - epitélio; ei - espaço intercelular; mb - membrana basal; lp - lipídeo.

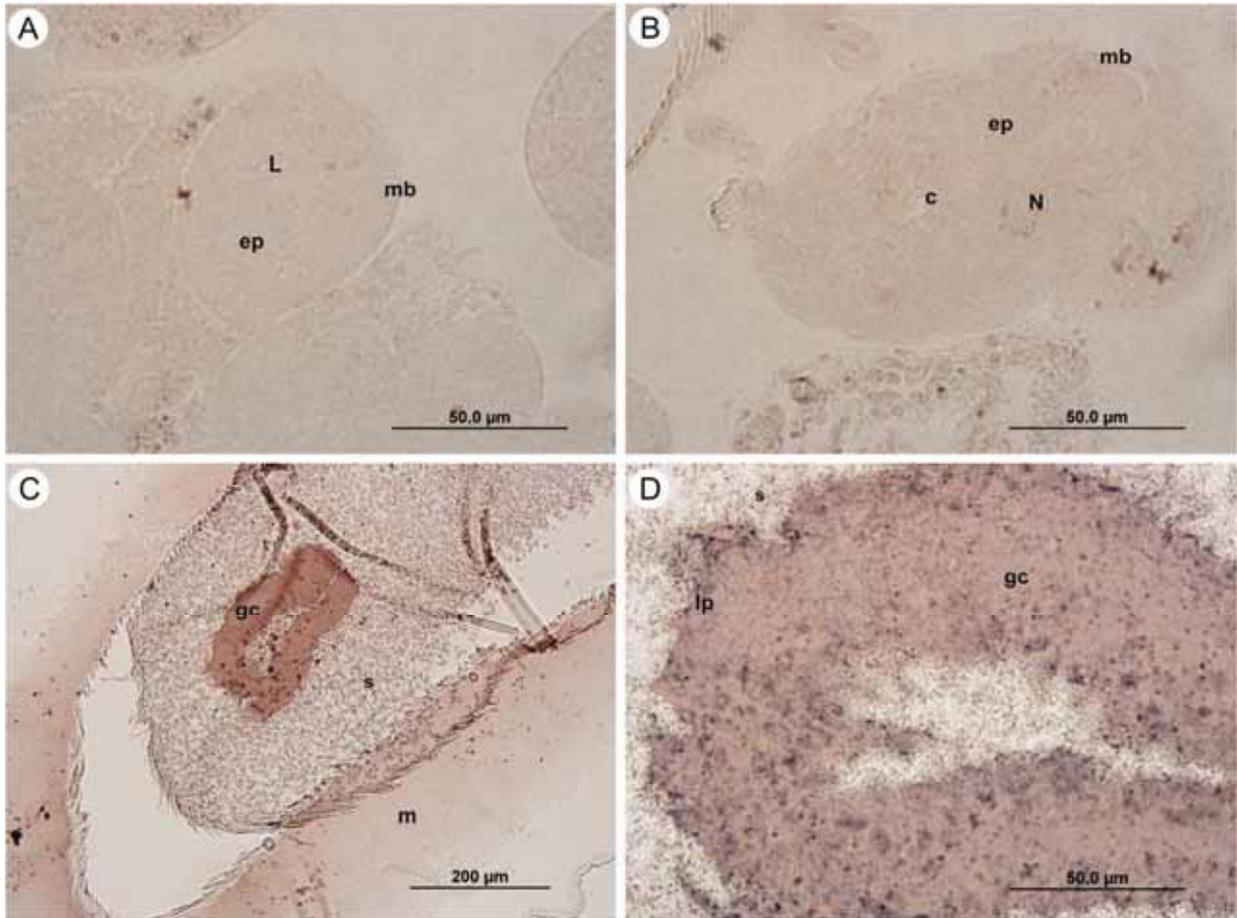
**Figura 22** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polistes versicolor*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polistes versicolor* submetidos à técnica de Sudan Black para a evidenciação de lipídeos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polistes versicolor*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polistes versicolor*. mb – membrana basal; ep – epitélio; c – cutícula; L – lúmen; vs – vesícula de secreção; N – núcleo da célula secretora; gc – glândula convoluta, m – camada muscular do reservatório; s – secreção; lp – lipídeo.

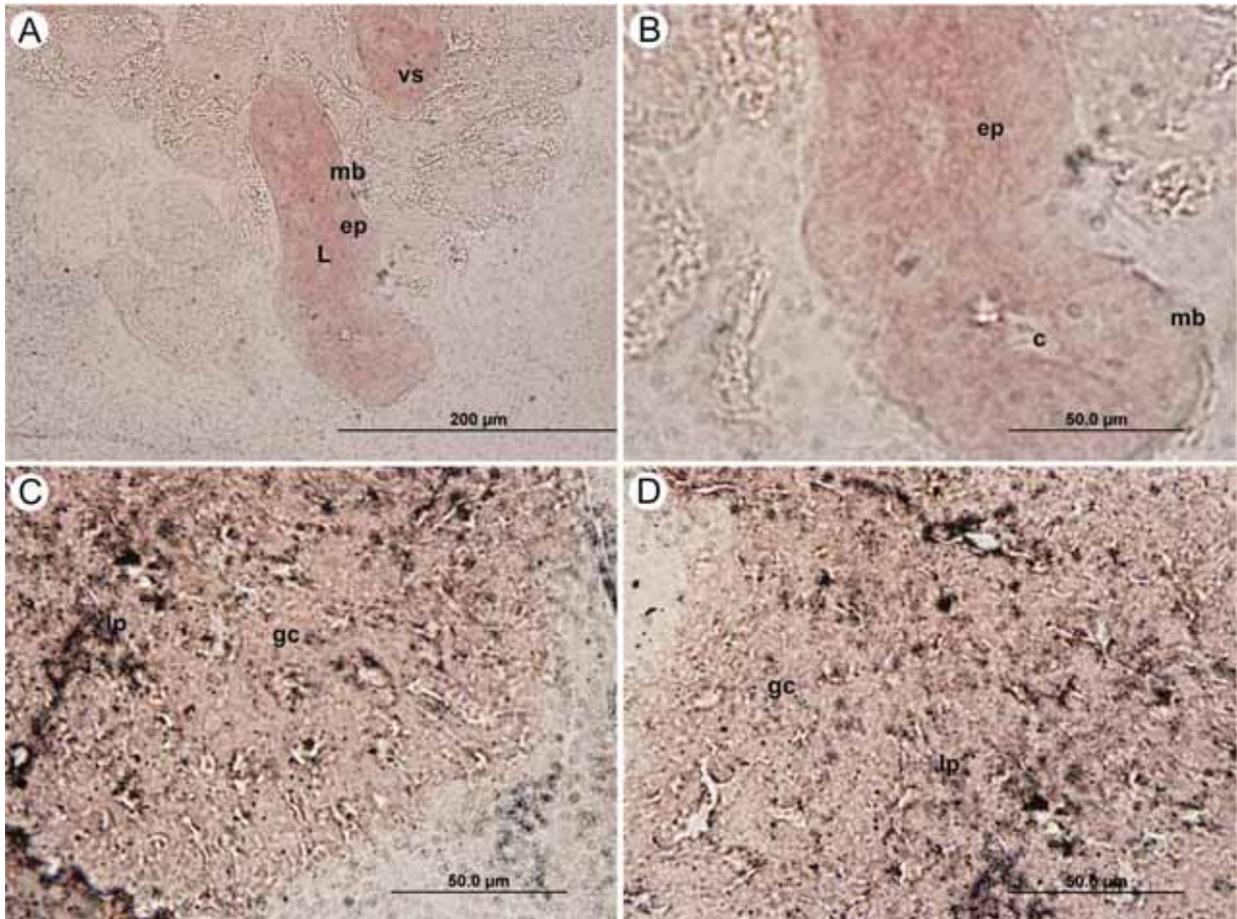
**Figura 23** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes* submetidos à técnica de Sudan Black para a evidenciação de lipídeos. **(A)** e **(B)**: Glândula de veneno de *Agelaia palipes palipes*. **(C)** e **(D)**: Glândula convoluta de *Agelaia palipes palipes*. N – núcleo da célula secretora; mb – membrana basal; ep – epitélio; L – lúmen; gc – glândula convoluta, m – camada muscular do reservatório; s – secreção; lp – lipídeo.

**Figura 24** - Glândula de veneno e glândula convoluta de *Polybia paulista*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cortes histológicos da glândula de veneno e da glândula convoluta de *Polybia paulista* submetidos à técnica de Sudan Black para a evidenciação de lipídeos. (A) e (B): Glândula de veneno de *Polybia paulista*. (C) e (D): Glândula convoluta de *Polybia paulista*. mb – membrana basal; ep – epitélio; L – lúmen; vs – vesícula de secreção; gc – glândula convoluta; lp – lipídeo.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou algumas variações morfológicas da glândula de veneno em *A. mellifera* decorrentes do avanço das idades e por consequência do ciclo secretor destes insetos. De acordo com alguns trabalhos, estas glândulas exócrinas possuem uma fase de atividade e outra de regressão, sendo que a glândula de veneno em abelhas inicia seu ciclo logo após a emergência, atingindo seu nível máximo por volta do 16º dia, fase destinada à defesa da colônia. A partir desta fase, o epitélio da glândula começa a sofrer com o processo de degeneração (NOCELLI, 2002; NOCELLI, 2003; ROAT, 2004).

A fase de maior atividade de síntese nas abelhas *A. mellifera* se dá por volta da idade de 14 dias. Depois deste período a cromatina apresenta-se mais condensada, já que os núcleos da região proximal aparecem metacromáticos (ABREU, 2000). Alguns pesquisadores indicam que este processo é caracterizado pela diminuição na altura das células, no aumento da corabilidade dos núcleos, pela desintegração do citoplasma e pela vacuolização (ABREU, 2000; CRUZ-LANDIM; BALDISSERA; BEIG, 1967).

Deste modo, as alterações encontradas na glândula de veneno de *A. mellifera* como: diminuição da espessura do epitélio, alteração do formato dos núcleos, que se tornaram irregulares e picnóticos, maior quantidade de secreção presente no lúmen das glândulas de veneno em abelhas com idades de 7 e 14 dias, e mudanças no citoplasma tais como vacuolizações, confirmam assim, os resultados esperados por estes trabalhos pré-existent.

De acordo com Cruz-Landim (2009), este ciclo que aparece nas glândulas de veneno de *A. mellifera*, varia não apenas com a idade dos indivíduos, mas também com a época do ano. Na fase de secreção, as operárias possuem suas células glandulares basófilas e altas, enquanto que após o momento em que a secreção começa a ser liberada para o lúmen da glândula de veneno, estas células vão se tornando cúbicas, menores e não tão basófilas.

O epitélio da glândula de veneno é formado basicamente por duas camadas de células. A mais externa é composta por células pertencentes à classe III (NOIROT; QUENNEDEY, 1974), formando uma organização pseudo-epitelial. Já a camada mais interna é composta por células baixas, sendo revestida na face que recobre o lúmen da glândula, por uma camada cuticular (CRUZ-LANDIM, 2009). Nesta camada de cutícula, são encontrados os canalículos, estruturas responsáveis por despejar a secreção produzida pela glândula na luz, para posterior armazenamento no reservatório. Estes canalículos terminam em uma região possuidora de muitas microvilosidades, chamada de aparato terminal (BRIDGES; OWEN, 1984; CRUZ-

LANDIM; KITAJIMA, 1966). Tais canalículos foram visualizados no atual estudo, sendo que em alguns casos, os aparatos terminais foram identificados.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos confirmar esta organização estrutural proposta por estes autores, já que as células secretoras, bem como seus núcleos ficaram bastante evidenciadas nas fotomicrografias obtidas. A camada íntima também pôde ser observada, e a cutícula se destacou principalmente nas glândulas de veneno de *A. mellifera* africanizada, onde apareceu de forma bastante realçada.

A glândula de veneno é conhecida também por uma outra designação: a de glândula ácida. Entretanto, um estudo realizado por Lello (1968), revelou que ao medir o pH da secreção da glândula de veneno de *A. mellifera* através do papel de Tornassol, o resultado encontrado seria de um pH entre 7 e 8, referindo-se assim, à uma substância básica, diferindo deste modo, do resultado esperado da denominação desta estrutura.

As células secretoras da glândula de veneno podem estocar a secreção produzida sob a forma de vesículas/esferas hialinas ou grânulos densos. Assim, esta secreção seria responsável por determinar a característica básica do citoplasma. Além disto, a grande quantidade de RNA presente nesta estrutura contribui para este caráter basofílico da célula (CRUZ-LANDIM; BALDISSERA; BEIG, 1967).

Nossos resultados condizem com esta afirmação já que através da análise da glândula de veneno de abelhas e vespas coradas com Hematoxilina e Eosina, constatou-se que esta glândula apresenta realmente característica básica, bem como a secreção encontrada no seu lúmen, sendo assim corada pela eosina, responsável pela coloração rosada.

O veneno dos himenópteros aculeados é uma mistura complexa de aminas biogênicas, enzimas e polipeptídeos (BANKS; SHIPOLINI, 1986; NAKAJIMA, 1986; NOCELLI, 2002; NOCELLI, 2003; OLIVEIRA et al., 1999). Entre os constituintes dos venenos de abelhas *A. mellifera* estão os carboidratos, os aminoácidos livres e os lipídeos, porém de acordo com Banks; Shipolini (1986), estes componentes são na verdade provenientes da hemolinfa. O atual estudo confirmou também, a presença de lipídeos nas glândulas de veneno de *A. mellifera*.

A organização epitelial em duas camadas de células, a cutícula recobrimdo o lúmen da glândula e os canalículos puderam também ser visualizados nas glândulas de veneno das três espécies de vespas estudadas neste trabalho, demonstrando desta forma, a grande similaridade desta estrutura entre as vespas e também em relação à *A. mellifera*.

Nossos resultados também mostraram que a secreção produzida pela glândula convoluta, em vespas, é aparentemente mais ácida do que a secreção presente no lúmen da

glândula de veneno, sendo esta, uma indicação da contribuição da glândula convoluta para a composição final deste composto. Em abelhas isso também foi observado: de acordo com Abreu (2000), a secreção contida no reservatório apresenta de fato um caráter básico, porém, ao ser eliminada no momento da ferroada, esta característica sofre uma alteração, passando assim a apresentar aspecto ácido. Com base ainda neste trabalho, esta mudança ocorrida na secreção é devido à contribuição de uma estrutura presente na parede dorsal do reservatório para a produção do veneno. Com base neste proposto, estudos indicam que o veneno de *A. mellifera* pode ser ativado através de enzimas que são produzidas no interior do reservatório (RATCLIFFE; KING, 1969).

Este estudo mostrou que as vesículas de secreção, assim como descrito em abelhas, são também visualizadas no epitélio da glândula de veneno de vespas, principalmente em *P. versicolor* e em *P. paulista*. Além disso, as glândulas de veneno destas espécies, após serem submetidas às técnicas descritas neste trabalho também apresentaram característica básica, quando comparadas à glândula convoluta.

Através da técnica de Azul de Bromofenol, pudemos notar a presença de proteínas na glândula de veneno e nos canalículos de *P. versicolor*, *A. palipes palipes* e *P. paulista*. Analisando as fotomicrografias resultantes da reação de PAS, pôde-se notar que as glândulas convolutas destas três espécies foram coradas, sendo bastante notória a presença de polissacarídeos na secreção sintetizada e estocada no reservatório, corroborando desta forma, os resultados obtidos por Britto e Caetano (2005), que também visualizaram na glândula de veneno de *P. versicolor*, reação positiva para proteínas, que foram encontradas no citoplasma sob a forma de vesículas homoganeamente distribuídas; e reação positiva para PAS na glândula convoluta.

Nossos resultados confirmam também os obtidos por esses mesmos autores, no que diz respeito ao formato das células da glândula convoluta, que possuem um aspecto colunar, com núcleos mais alongados, que tendem a seguir o formato da célula em que está presente. De acordo com eles, a face apical destas células é voltada para o lúmen do reservatório, região esta, onde se encontra um acúmulo de secreção.

Já analisando-se os resultados obtidos através das técnicas do Sudan Black, podemos observar porções de lipídeos na glândula convoluta de vespas, principalmente nas partes apicais das células e na secreção encontrada no interior do lúmen do reservatório, o que reforça os resultados de Britto; Caetano (2005). Abreu (2000); Oliveira et al. (1999) propõem que os lipídeos poderiam ter como função tornar ativa a conformação das proteínas. Deste modo, quando o veneno é injetado no tecido, estes lipídeos interagiriam com as camadas

fosfolipídicas da membrana plasmática, facilitando assim, o transporte das toxinas para o meio intracelular.

Com base em um trabalho realizado por KABARA; FISCHER (1969) apud MOHAMED et al. (1983) os lipídeos presentes no veneno de animais tem como função principal, facilitar a distribuição de toxinas no corpo e a penetração de peptídeos tóxicos nas células. Outros pesquisadores ainda comprovaram que a presença de lipídeos potencializa a letalidade dos venenos de alguns animais (MARIE; IBRAHIM, 1976).

Assim como proposto para *P. versicolor* (BRITTO; CAETANO, 2005), em *A. palipes palipes* e *P. paulista* a secreção sintetizada pela porção tubular da glândula de veneno pode ser modificada através dos componentes produzidos pela glândula convoluta presente no reservatório. A composição e os formatos adquiridos por esta secreção sugerem que elas estão sendo eliminadas da glândula convoluta em direção ao lúmen do reservatório. Deste modo, com base no exposto neste trabalho e também em estudos pré-existentes nós concluímos que a glândula convoluta contribui para a produção do veneno.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da análise das glândulas de veneno de abelhas *A. mellifera* africanizada e vespas *P. versicolor*, *A. palipes palipes* e *P. paulista* nos permitiram concluir que apesar de algumas variações, a organização celular e as características histoquímicas desta estrutura, de maneira geral, seguem um padrão bastante semelhante. Tal similaridade também pôde ser visualizada nas glândulas convolutas das vespas analisadas neste estudo. Além disso, o presente trabalho demonstra que os componentes produzidos pela glândula convoluta modificam a secreção sintetizada pela porção tubular da glândula de veneno. Estes resultados sugerem, deste modo, a importância em se estabelecer as características morfológicas e histoquímicas de tais estruturas, principalmente devido à falta de informação sobre elas em vespas.

## REFERÊNCIAS

- AALBERSE, R. C. Structural Biology of Allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 106, n. 2, p. 228-238, 2000.
- ABREU, R. M. M. **Padrões citoquímicos do desenvolvimento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)**. 2000. 176 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- AKRE, R. D. Social Wasps. In: Hermann, H. V. R. (Ed.). **Social Insects**. Nova Iorque: Academic Press, 1982. p. 1-105.
- BACH, P. The necessity for an ecological approach to pest control on citrus in California. **Journal of economic entomology**, Lanham, v. 44, p. 443-447, 1951.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera**. Florida: Academic Press, 1986. p. 330 - 403.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUB, 1994. 411 p.
- BONFANTI-ALMEIDA, J. C. **Estudo da viabilidade do veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera-Apidae) como biocida em ovos de *Diatrea sacharalis* (Fabricius, 1974)**. 1994. 77 f. Tese (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.
- BRIDGES, A. R.; OWEN, M. D. The morphology of the honeybee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. **Journal of Morphology**, New York, v. 181, n. 1, p. 69-86, 1984.
- BRITTO, F. B.; CAETANO, F. H. Ultramorphological analysis of the venom glands and their histochemical relationship with the convoluted glands in the primitive social paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 160-174, 2005.
- CASTRO, F. F. M.; PALMA, M. S. **Alergia a venenos de insetos**. Barueri: Ed. Manole, 2009. 230 p.
- CHAUD NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. In BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Editora de publicações biomédicas – EPUB, 1994. p. 173-193.
- COSTA-NETO, E. M. O significado dos orthoptera (Arthropoda, Insecta), no estado de Alagoas. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 18, p. 9-17, 1998.
- CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E. W. Ultraestrutura do aparelho venenífero de *Apis* (Hymenoptera, Apidae). **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 701-710. 1966.

- CRUZ-LANDIM, C.; BALDISSERA, S.; BEIG, D. Degeneração da glândula de veneno de *Apis* durante o verão e inverno. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 355-361, 1967.
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC-Editora, 2002.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p.
- CRUZ LÓPEZ, L.; MORGAN, E. D.; BRAND, J. M. Hexadecanol and hexadecyl formate in the venom gland of formicine ants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 341, n. 1296, p.177–180. 1993.
- CUMBER, R. A. Some observations on the biology of the Australian wasp *Polistes humilis* Fabr. (Hymenoptera: Vespidae) in North Auckland (New Zealand), with special reference to the nature of the worker cast. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, London, v. 26, p. 11-16, 1951.
- DELONG, D. M. Man in a world of insects. **Annual Report of the Smithsonian Institution**, Washington, D. C., p. 423-440, 1962.
- EVANS, H. E; WEST-EBERHARD, M. J. **The Wasps**. An Arbor: University of Michigan Press. 1970.
- FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch – Chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und Die Darauf Beruhend Elective Färbung von Zillkernen in Mikroskopischen Präparaten Hoppe-Seylers. **Zeitschrift für Physiologische Chemie**, Strassburg, v. 135, p. 203-248, 1924.
- FOX, E. G. P.; BUENO, O. C.; YABUKI, A. T.; JESUS, C. M.; SOLIS, D. R.; ROSSI, M. L.; NOGUEIRA, N. L. General morphology and ultrastructure of the venom apparatus and convoluted gland of the fire ant, *Solenopsis saevissima*. **Journal of Insect Science**, v. 10, 2010.
- FREE, J. B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. 79 p.
- GALLAI, N.; SALLES, J. C.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, p. 810-821, 2009.
- GARY, N. E. Activities and behavior of honey bee. In: GRAHAM, J. M. (Ed.). **The hive and the honey bee**. Hamilton: Dadant and Sons, 1992. p. 185-264.
- GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. 1977. 229 f. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1977.

GOBBI, N.; NOLL, F.; PENNA, M. A. “Winter” aggregations, colony cycle, and seasonal phenotypic change in the paper wasp *Polistes versicolor* in subtropical Brazil. *Naturwissenschaften*, v. 93, p. 487-497. 2006.

GODDARD, J. **Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

HOGUE, C. L. Cultural entomology. *Annual Review of Entomology*, Stanford, v. 32, p. 181-199, 1987.

HUNT, J. H.; NOONAN, K. C. Larval feeding by male *Polistes fuscatus* and *Polistes metricus* (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux*, Basel, v. 26, n. 3, p. 247-251, 1979.

JARA, F. La miel y el aguijón - Taxonomía zoológica y etnobiología como elementos en la definición de las nociones de género entre los Andoke (Amazonia colombiana). *Journal de la Société des Américanistes*, Paris, v. 82, n. 1, p. 209-258, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. 123 p.

KERR, W.E.; LELLO, E. Sting glands in stingless bees a vestigial character (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, Lawrence v. 70, p. 190-214, 1962.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNIGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHAMTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society*, Edinburgh, v. 274, p. 303–313, 2007.

KUKUT, P. F.; EICKWORT, G. C.; RAVERET-RICHTER, M.; ALEXANDER, B.; GIBSON, R.; MORSE, R. A.; RATNIEKS, F. Importance of the sting in the evolution of sociality in the Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*. v. 82, p. 1-5, 1989.

KYOGOKU, Y.; FUJIYOSHI, Y.; SHIMADA, I.; NAKAMURA, H.; TSUKIHARA, T.; AKUTSU, H.; ODAHARA, T.; OKADA, T.; NOMURA, N. Structural genomics of membrane proteins. *Accounts of Chemical Research*, Washington, v. 36, n. 3, p. 199-206, 2003.

LELLO, E. **Glândulas anexas do aparelho de ferrão das abelhas (Hymenoptera, Apoidea)**. 1968. 76f. Tese (Doutorado em Zoologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1968.

LIMA, M. A. P.; de LIMA, J. R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG. *Revista Brasileira de Zoociências*, Juiz de Fora, v. 2, n. 1, p. 69-80, 2000.

LORENZI, C. C. B. **Estudo Estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias**. 2002. Tese (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

MAKINO, S. Larval feeding by *Polistes biglumis* males (Hymenoptera, Vespidae). **Kontyu**, Mito, v. 51, n. 3, p. 487, 1983.

MANZOLLI-PALMA, M. F.; PALMA, M. S. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 15, n. 92, p. 123-125, 1992.

MARIE, Z. A.; IBRAHIM, S. A. Lipid content of scorpion (*Leiurus quinquestriatus*, H and E) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 14, n. 2, p. 93-96, 1976.

MASCHWITZ, U.; KLOFT, W. Morphology and function of the venom apparatus of insects-bees, wasps, ants and caterpillars. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 1-59.

McMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v. 158, n. 4006, p. 202-202, 1946.

MELLO, M. L.; VIDAL, B. C. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1980. 71 p.

MEYER, J. R. **A class of distinction**. 1999. NC State University. Disponível em: < <http://www.cals.ncsu.edu.8050/course/ent425/text01/impact2.html>>. Acesso em: 22 out. 2009.

MOHAMED, A. H.; ABU-SINNA, G.; EL-SHABAKA, H. A.; EL-AAL, A. A. Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterization of the venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. **Toxicon**, Elmsford, v. 21, n. 3, p.371-377, 1983.

MORRIS, M. G.; COLLINS, N. M.; VANE-WRIGHT, R. I.; WAAGE, J. The utilization and value of non-domesticated insects. In: COLLINS, N. M.; THOMAS, J.A. (Ed.). **The conservation of insects and their habitats**. London: Academic Press Limited, 1991. p. 319-347.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In PIEK, T. (Ed.). **Venoms of the Hymenoptera**. Orlando: Academic Press, 1986, p. 309 - 327.

NASCIMENTO, F. S.; CRUZ-LANDIM, C. Correlação da hierarquia social de dominância com o desenvolvimento das glândulas associadas ao aparelho de ferrão de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3-4, p. 709-718, 1997.

NIEDERBERGER, V.; VALENTA, R. Recombinant Allergens for Immunotherapy. Where do we stand? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, London, v. 4, n. 6, p. 549-554, 2004.

- NOCELLI, R. C. F. Glândulas anexas ao ferrão: glândula de veneno. In CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: Editora FUNPEC, 2002. p. 151 - 163.
- NOCELLI, R. C. F. **Contribuição à análise do processo de africanização de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**: características do desenvolvimento das glândulas de Dufour e de veneno. 2003. 104 f. Tese (Doutorado em Biologia celular e molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 19, n. 1, p. 61-80, 1974.
- OLIVEIRA, M. R. P.; SCHEIDT, A. C.; PALMA, M. S.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Venenos de “Hymenoptera” sociais: coleta, composição, bioquímica e mecanismo de ação. In BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**, Rio de Janeiro: Editora de publicações biomédicas – EPUB, 1999. p. 251-258.
- ORTIZ, G.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. **Micron**, New York, v. 37, n. 3, p. 243-248, 2003.
- OWEN, M. D.; BRIDGES, A. R. Aging in the venom glands of queen and worker bees (*Apis mellifera* L.). Some morphological and chemical observations. **Toxicon**, Elmsford, v. 14, n. 1, p. 1-5, 1976.
- PALMA, M. S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A. J. **Handbook of biologically active peptides**. 1ª Edição, Oxford: Academic Press, 2006. p. 389-396.
- PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 21, p. 1-13, 1948.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemical Theoretical and Applied**. 3ª ed. London: Jet. Churchill Ltda, 1960, 988 p.
- PEIREN, N.; de GRAAF, D. C.; VANROBAEYS, F.; DANNEELS, E. L.; DEVREESE, B.; Van BEEUMEN, J.; JACOBS, F. J. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. **Toxicon**, Elmsford, v. 52, n. 1, p. 72-83. 2008.
- PIETROBON, T. A. O. **Glândula ectomandibular e comportamento de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae)**. 2005. 158f. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2005.
- RATCLIFFE, N. A.; KING, P. E. **Journal of Morphology**, New York, v. 127, n. 2, p. 177–203, 1969.
- REISMAN, R. E.; MUELLER, V.; WYPYCH, J. Comparison of the Allergenicity of Yellow Jacket and Hornet Venoms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 69, n. 3, p. 268-274, 1982.

RICHARDS, O. W. **The social wasps of the Americas excluding the Vespinae**. London: Fletcher & Son Ltd, British Museum (Natural History), 1978. 580 p.

ROAT, T. C. **A glândula de veneno de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae): efeito do hormônio juvenil sobre seu ciclo secretor**. 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

RODRIGUES, A. S. Até quando o etnoconhecimento sobre as abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) será transmitido entre gerações pelos índios Guarani da Aldeia Morro da Saudade, localizada na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil? **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 6, n. 4, p. 343-350, 2006.

ROSS, K. G.; MATTHEWS, R.W. **The social biology of wasps**. Ithaca: Cornell University Press, 1991. 678 p.

RUTTNER, F. **Biogeography and Taxonomy of Honeybees**. Berlin: Springer- Verlag, 1988. 284 p.

SANTOS, K. S.; STEPHANO, M. A.; MARCELINO J. R.; FERREIRA, V. M. R.; ROCHA, T.; CARICATI, C.; HIGASJI, H. G.; MORO, A. M.; KALIL, J. E.; MALASPINA, O.; CASTRO, F. F. M.; PALMA, M. S. Production of the first effective hyperimmune equine serum antivenom against africanized bees. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013.

SCHMIDT, J. O. **Hymenopteran Venoms: Striving Toward the Ultimate Defense Against Vertebrates**. In: EVANS, D. L.; SCHMIDT, J. O. (Eds.). *Insect Defenses, Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*, Albany: State University of New York Press, p. 387-419, 1990.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology and ultrastructure of a secretory region enclosed by the venom reservoir in social wasp (Insecta, Hymenoptera) **Zoomorphology**, Berlin, v. 115, p. 63-71, 1995.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Venom gland ontogeny in Formicinae, with special reference to the pulvinate convoluted gland (Hymenoptera, Formicidae). **Zoomorphology**, Berlin, v. 118, n. 4, p. 245-253, 1998.

SILVEIRA, O. T. **Morfologia comparada das glândulas associadas ao aparelho de ferrão de algumas espécies de vespas (Hymenoptera: Vespidae)**. 1990. 98 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1990.

SILVEIRA, O. T.; CAETANO, F. H. A morphometric study of sting glands in vespid wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, v. 23, p. 45 - 62. 1993.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the Honey Bee**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1956, 334 p.

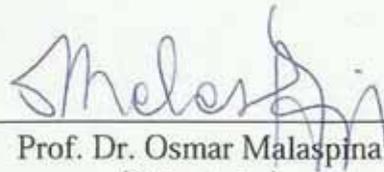
SOUZA, M. M.; PREZOTO, F. Diversity of Social Wasps (Hymenoptera, Vespidae) in Semideciduous Forest and Cerrado (Savanna) Regions in Brazil. **Sociobiology**, v. 47, n. 1, p. 135 - 147. 2006.

SPRADBERY, J. P. **Wasps**: an account of the biology and natural history of solitary and social wasps. Biology series. Seattle: University of Washington Press, 1973. 408 p.

TAVARES, B. Alergia a veneno de himenópteros: novos métodos de diagnóstico. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 18, n. 6, p. 445-451, 2005.

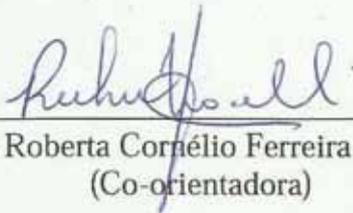
WILLIAMS, I. H. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. **Agricultural Zoology Reviews**, United Kingdom, v. 6, p. 229–257, 1994.

YOSHIKAWA, K. Introductory studies in the life economy of Polistine wasps. II Superindividual stage. 2. Division of labor among workers. **Japanese Journal of Ecology**, Tokyo, v. 13, n. 2, p. 53-56, 1963.



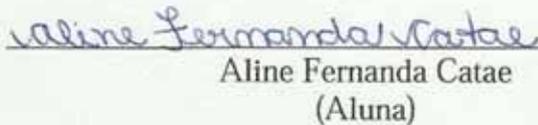
---

Prof. Dr. Osmar Malaspina  
(Orientador)



---

Dr.ª. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
(Co-orientadora)



---

Aline Fernanda Catae  
(Aluna)

Rio Claro, 2013