



**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO
DO CICLO SECRETOR DA GLÂNDULA SALIVAR DO
TÓRAX DE *Polistes versicolor*
(OLIVIER, 1791) (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

THALITA ROCHA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular).

**RIO CLARO
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2004**



**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO
DO CICLO SECRETOR DA GLÂNDULA SALIVAR DO
TÓRAX DE *Polistes versicolor*
(OLIVIER, 1791) (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

THALITA ROCHA

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular).

RIO CLARO
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2004

595.798 Rocha, Thalita
R672c Caracterização histoquímica e determinação do ciclo secre-
tor da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor*
(Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae) / Thalita Rocha. –
Rio Claro : [s.n.], 2004
115 f. : il., fots., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Flávio Henrique Caetano

1. Vespa. 2. Hymenoptera. 3. Sistema salivar. 4. Anato-
mia interna. 5. Análise comportamental. I. Título.

Aos que me amam
incondicionalmente; Dimas José
da Rocha, Francisca Barros Rocha,
Thiago Rocha e Henrique Rocha

Dedico

Agradecimentos

A Deus. "E é Ele quem suprirá todas as necessidades que vocês têm, por meio das suas riquezas na glória, por causa do que Jesus Cristo fez por nós. Filipenses 4:19".

A minha família, por conhecer e praticar o amor.

Ao professor, orientador e amigo Flávio Henrique Caetano, pelos ensinamentos científicos e humanos.

A Capes e a FUNDUNESP, pelo necessário auxílio financeiro concedido.

Aos funcionários do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro: Departamento de Biologia, Biblioteca, Seção de Pós-graduação e Administração, pelo auxílio técnico para a elaboração desta dissertação.

A professora Dra. Maeli Dal Pai Silva e a Sueli Cruz Michelin do Departamento de Morfologia - Laboratório de Histoquímica da Unesp de Botucatu, pelo auxílio na realização das técnicas enzimológicas.

Aos amigos que auxiliaram diretamente na realização dos trabalhos: José Augusto (Zé), Fábio (Pirulito), Mônica (MôniCat), Cristiane (Xris), Thiago (Mineiro), Rogilene (Gingileka), Marielle e todos os colegas de pós-graduação.

Ao "sempre disposto a discutir meus resultados" Fernando José Zara e a meus "primos", Jônatas, Siddhartha, Diego e Graziela.

Ao querido José Augusto de Oliveira David que eu tanto amo. Por me auxiliar profissionalmente e me amparar sempre em amor!

Aos companheiros do coração: Camila de Moraes, Fábio Barros Britto e Vanessa Alonso.

Aos amigos de Campinas e Rio Claro, aos amigos da "minha sala" e as companheiras das repúblicas (Casa da Gina e Republicanas), pela força diária.

E a você que está lendo estes agradecimentos e que lerá também esta dissertação.

Obrigada!

Emoções

(Roberto Carlos)

Quando eu estou aqui eu vivo este momento lindo.
Olhando pra você e as mesmas emoções sentindo.
São tantas já vividas, são momentos que eu não esqueci.
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui.

Amigos eu ganhei. Saudades eu senti partindo.
E às vezes eu deixei você me ver chorar sorrindo.
Sei tudo que o amor é capaz de me dar.
Eu sei já sofri, mas não deixo de amar.
Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi.

Mas eu estou aqui vivendo este momento lindo.
De frente pra você e as emoções se repetindo.
Em paz com a vida e o que ela me traz.
Na fé que me faz otimista demais.
Se chorei ou se sorri o importante é que emoções eu vivi.

ÍNDICE

	Página
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
3. Artigo 1: Ultrastructure of salivary glands: thoracic glands of <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) Hymenoptera: Vespidae.....	21
4. Artigo 2: Análise enzimológica da glândula salivar do tórax de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) Hymenoptera: Vespidae.....	36
5. Artigo 3: Caracterização histoquímica da glândula salivar do tórax de <i>Polistes versicolor</i> (Olivier, 1791) Hymenoptera: Vespidae.....	57
6. Considerações finais.....	88
7. Conclusão.....	92
8. Resumo.....	95
9. Referências Bibliográficas.....	98
10. Anexos.....	109



1. Introdução

Entre os Hymenoptera, a família Vespidae apresenta-se dividida em 11 subfamílias das quais a subfamília Polistinae possui grande diversidade morfológica e comportamental (SPRADBERY 1973; CARPENTER 1991). O gênero *Polistes* está distribuído por todo o Brasil (CARPENTER 1991), sendo *P. versicolor* uma das espécies mais comuns no estado de São Paulo (GOBBI & ZUCCHI 1980).

Nos Hymenoptera sociais as fêmeas dominantes – fêmeas α , são responsáveis pela construção do ninho e pela postura dos ovos, já as fêmeas subordinadas cuidam das crias e da manutenção do ninho (RICHARDS 1978; EDWARDS 1980).

Em Polistinae há divisão reprodutiva de trabalho, mas como as diferenças morfológicas existentes entre a fêmea dominante e as subordinadas são pequenas, é o comportamento na colônia e o desenvolvimento ovariano que determinam as diferentes castas (EICKWORT 1961). Quando analisados os ovários das fêmeas dominantes estes são bem desenvolvidos e a espermateca apresenta grande número de espermatozoides armazenados. Já as fêmeas subordinadas apresentam ovariolos curtos e filamentosos ou nada desenvolvidos (NASCIMENTO & CRUZ-LANDIM 1997).

Em *Polistes* o ciclo de vida é anual (WILSON 1980) e as colônias podem iniciar-se por haplometrose ou pleometrose (EVANS 1958). *Polistes versicolor* apresenta ninho com um favo simples peçolado (stelocytarus), não envelopado (gymnodomous) feito de fibras vegetais (REEVE 1995).

Os indivíduos recém emergidos de *Polistes* passam as primeiras horas inativos, sendo posteriormente responsáveis pelas atividades de forrageamento (néctar, presas, polpa vegetal e água), utilizadas na alimentação dos demais membros da colônia, construção e resfriamento do ninho. Neste processo de construção, as fibras vegetais coletadas são maceradas juntamente com as secreções salivares, formando assim o “papel” que constitui o ninho (EVANS & WEST-EBERHARD 1970).

As glândulas do sistema salivar apresentam-se relacionadas a várias atividades necessárias ao sucesso da colônia. A glândula salivar do tórax está tanto associada à diluição e lubrificação do alimento, como à construção do ninho (SPRADBERY 1973) a partir de fibras e outros tecidos vegetais macerados e misturados às secreções orais (WENZEL 1991). A manutenção do ninho é garantida por meio da aplicação, à superfície do mesmo, da secreção salivar (KUDÔ et al 1998; YAMANE et al 1998).

Nos Hymenoptera a porção secretora da glândula salivar do tórax pode ser formada por estruturas alveolares, pseudotubulares e tubulares (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972).

Nos Vespidae a porção secretora da glândula salivar do tórax apresenta-se dividida em 4 lóbulos (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972) e a secreção produzida pelas unidades secretoras é levada ao exterior por meio dos canalículos e dutos (DELEURANCE 1955; LANDOLT & AKRE 1979).

As vespas da tribo Polistini, até hoje estudadas, possuem a glândula salivar do tórax semelhante à de Bembicini e Sphecidae, sendo a porção secretora acinosa, com uma célula central envolvida por células periféricas, pequenas e achatadas (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972).

Em *P. versicolor* a glândula salivar do tórax apresenta-se formada por pseudoácinos que apresentam uma célula central, circundada por células periféricas, e entre as células periféricas e a célula central há um duto coletor da secreção. Nesta espécie a glândula salivar do tórax não apresenta reservatório, porém na região proximal do duto coletor da glândula há uma porção diferenciada de células, não descrita para outras vespas (ROCHA & CAETANO 2003).

Algumas características das glândulas salivares do tórax, como o formato das unidades secretoras, a presença ou não de reservatório, são distintas entre os Hymenoptera. Desta forma a análise da estrutura desta glândula possibilita a comparação filogenética entre Hymenoptera solitários e sociais (ROCHA & CAETANO 2003).

A composição química da secreção glandular, a presença de proteínas, mucosubstâncias, lipídeos, DNA e RNA, pode ser determinada por meio de técnicas histoquímicas que marcam a secreção produzida pelos diferentes tecidos secretores (PEARSE 1985) entre eles as glândulas do sistema salivar de Hymenoptera - a glândula salivar do tórax.

Estudos realizados em larvas de *Apis mellifera* (SILVA 1999), *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (ZARA 1998) e *Scaptotrigona postica* (PETRALIA et al 1980), *Scaptotrigona invicta* (CRUZ-LANDIM & MELLO 1981) evidenciaram que a secreção eliminada pelas glândulas salivares é rica em proteínas e mucopolissacarídeos, como também observado nos indivíduos adultos de *Trigona hypogea*, *Trigona recursa*, *Trigona spinipes*, *Xylocopa frontalis*, *Xylocopa suspecta*, *Megachile* sp., *Oxaea flavescens* (CAVASIN-OLIVEIRA 1995) e *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*) *pusillus* (RIBEIRO 2000).

Muitas enzimas, como as ATPases ácida e alcalina, succinato desidrogenase (SDH) e NADH-tetrazólio redutase (NADH-TR), estão envolvidas em processos oxidativos (NELSON & COX 2002; VOET et al 2002), sendo presentes também nas glândulas salivares de Hymenoptera, como observado na glândula pós-faríngea de formigas *Dinoponera australis* (CAETANO 1998).

As fosfatases alcalinas são enzimas encontradas, também, nos insetos e estão relacionadas a mecanismos de absorção e transporte, e refletem os níveis da função celular, uma vez que estão relacionadas à presença de lisossomos (CHEN et al 2000).

Outro aspecto interessante é que as glândulas do sistema salivar dos insetos sofrem processos degenerativos, ocasionados por morte celular programada ou não, durante toda a vida adulta (BOWEN et al 1993). Nestes processos estão envolvidas algumas enzimas características dos processos de lise celular, como as fosfatases ácida e alcalina (GREGORC & BOWEN 1997).

Assim sendo o conhecimento da composição química, como a caracterização histoquímica e enzimológica das glândulas salivares é importante para ajudar no esclarecimento de sua função durante o desenvolvimento das colônias de Hymenoptera.



2. Revisão de Literatura

Os Vespoidea constituem um grande grupo entre os Hymenoptera e compreendem 3 famílias; Massaridae, Eumenidae e Vespidae. A maioria destes Hymenoptera é solitária, sendo poucos subsociais ou sociais (MATEUS et al 1997). As famílias Masaridae e Eumenidae são formadas por indivíduos solitários e a família Vespidae apresenta apenas indivíduos sociais (EDWARDS 1980). Esta família está dividida em 11 subfamílias, entre as quais encontramos a subfamília Polistinae (SPRADBERY 1973).

A subfamília Polistinae constitui o grupo mais diverso de vespas sociais, tanto em nível de riqueza de espécies como na diversidade morfológica e comportamental (CARPENTER 1991), apresentando 29 gêneros distribuídos em 4 tribos; Ropalidiini, Polistini, Mischocyttarini, Epiponini (RICHARDS 1978).

O gênero *Polistes*, pertencente à tribo Polistini, passou a ser bastante estudado, pois alguns pesquisadores acreditam ser este o “gênero chave” para o entendimento da evolução do comportamento social e das sociedades das vespas (EVANS 1958). Este gênero apresenta-se distribuído por toda região tropical do velho e novo mundo, sendo considerado um gênero cosmopolita (CARPENTER 1991).

P. versicolor é uma das espécies mais difundidas da América do Sul, sendo comum em vários estados brasileiros, principalmente no estado de São Paulo (GOBBI & ZUCCHI 1980).

Desta forma estudos anatômicos do sistema salivar poderiam fornecer elementos para o entendimento do desenvolvimento do comportamento social da subfamília Polistinae e contribuir para o entendimento de outras. Isto porque o sistema salivar está relacionado à produção de várias substâncias que atuam na interação entre os membros da colônia dos Hymenoptera sociais (CHAPMAN 1975; CAETANO et al 2002).

2.1. ORGANIZAÇÃO SOCIAL

Os Hymenoptera sociais são divididos em castas, sendo as fêmeas dominantes (fêmeas α ou rainhas) responsáveis, basicamente, pela construção do ninho e postura dos ovos. Já às fêmeas subordinadas (fêmeas β , γ , δ ou operárias) são atribuídas as demais funções que garantem o sucesso da colônia, como o cuidado das crias e a manutenção do ninho. As fêmeas subordinadas são aquelas não fertilizadas e com ovários pouco ou nada desenvolvidos (RICHARDS 1978).

Em formigas (superfamília Formicoidea, família Formicidae) e abelhas sociais (superfamília Apoidea, família Apidae) as castas de rainhas e operárias podem ser distinguidas pelas diferenças morfológicas (WILSON 1976). Algumas são divididas em castas operárias, soldados ou rainha, e os machos constituem uma casta adicional (WILSON 1980).

As formigas são todas sociais e apresentam comportamentos diversos, desde o aprovisionamento de outros insetos paralisados, comportamento comum em Sphecoidea, até a distribuição de presa macerada às larvas, como observado em Vespidae (WILSON 1976).

As abelhas apresentam desde indivíduos solitário a indivíduos com comportamento comunal, quase-social, semi-social e eusocial (WILSON 1976). Com exceção das abelhas solitárias, suas colônias são iniciadas a partir de uma fêmea fertilizada. As operárias são incapazes de serem fecundadas e seus ovos (partenogenéticos) darão origem apenas a machos. As rainhas são originadas a partir de ovos fecundados, como as operárias, porém durante sua fase larval passam a receber uma dieta diferenciada que as tornará maiores, com ovários mais desenvolvidos, e assim capazes de serem fecundadas (MICHENER 1974).

Nas abelhas semi-sociais as fêmeas de uma mesma geração cooperam na construção e aprovisionamento do ninho. Suas castas não diferem morfológicamente, mas apenas pelo desenvolvimento dos ovários e pelos comportamentos a elas atribuídos (WILSON 1976). Já nas abelhas altamente eusociais (subfamília Apinae) as castas são diferenciadas não só pelo comportamento e desenvolvimento ovariano, mas também pelas diferenças físicas (MICHENER 1974).

Em vespas, como observado na subfamília Polistinae, a divisão reprodutiva de trabalho existe, porém as diferenças morfológicas entre a fêmea dominante e as subordinadas são pequenas (RICHARDS 1978) e é o comportamento social na colônia, o desenvolvimento ovariano e o conteúdo da espermateca que permite distinguirmos as diferentes castas (EICKWORT 1961). Entretanto, a tribo Epiponini pode ser morfológicamente diferenciada, apresentando 3 castas distintas (RICHARDS 1978). Alguns gêneros entre os Vespidae apresentam castas bem diferenciadas, com rainha, operárias e machos, morfológicamente distintos (EDWARDS 1980).

Em Polistinae a hierarquia de dominância é determinada quando uma fêmea assume postura de dominante sobre as demais fêmeas da colônia. A fêmea dominante – fêmea α , posiciona-se acima do ninho, com a cabeça e as antenas elevadas, antenando e/ou mordendo a subordinada – fêmea β , que por sua vez coloca-se abaixada, com a cabeça e as antenas imóveis. Quando dissecadas estas fêmeas apresentam relação entre o tamanho do ovário e a posição na hierarquia social, apresentando a fêmea α ovário mais desenvolvido que a fêmea β (PARDI 1948). A fêmea α possui o monopólio, mesmo que temporário, da postura dos ovos e as demais, β , γ , δ , atuam em outras funções no ninho (EDWARDS 1980).

No gênero *Polistes* não há como diferenciar as fêmeas, em dominante e subordinada, apenas externamente (EDWARDS 1980), sendo as castas baseadas em diferentes categorias comportamentais e não em diferenças morfológicas (EVANS & WEST-EBERHARD 1970). Neste grupo a hierarquia de dominância pode desempenhar importante papel na determinação de diferentes funções em indivíduos proximalmente aparentados com diferentes capacidades reprodutivas (WEST 1967).

Polistes constitui o protótipo do comportamento de dominância e subordinação nos invertebrados, sendo a hierarquia social demonstrada por Pardi (1948) em *Polistes gallicus*, também encontrada em outras espécies do gênero, como *Polistes canadensis* (WEST-EBERHARD 1986), *Polistes lanio* (GIANNOTTI & MACHADO 1999) e *Polistes versicolor* (ZARA & BALESTIERI 2000).

Segundo Gobbi et al. (1993) não há diferenças significativas em relação ao tamanho das fêmeas dominantes e das subordinadas de *P. versicolor*, porém o melhor caractere para distinguir as castas é o comprimento dos ovariolos.

Machado (1977) classificou os ovários de *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) em: ovários filamentosos (sem ovócitos maduros), ovários em início de desenvolvimento (1 a 4 ovócitos maduros), ovários desenvolvidos (5 a 8 ovócitos maduros), ovários bem desenvolvidos (9 a 12 ovócitos maduros) e ovário muito desenvolvido (13 ou mais ovócitos maduros).

Em *P. versicolor* o sistema reprodutivo apresenta um par de ovários, sendo estes constituídos por 3 ovariolos que se reúnem em um cálice de ovos, do qual parte um oviduto lateral, que posteriormente forma o oviduto comum. Os ovariolos podem ser divididos em 3 partes: o primeiro terço superior (filamento terminal) é formado por células da bainha peritonal do ovariolo; o segundo terço (germário) é formado por um epitélio

germinativo constituído por células germinativas e somáticas. Já o terceiro terço (vitelário) é preenchido por ovócitos em diferentes fases de maturação, acompanhados por suas respectivas células nutridoras e envoltos pelas células foliculares. As fêmeas dominantes desta espécie têm ovários muito desenvolvidos e ovariolos longos, com muitos ovócitos em amadurecimento no vitelário, enquanto as fêmeas subordinadas têm ovários pouco desenvolvidos, com ovariolos curtos e filamentosos, ou nada desenvolvidos (NASCIMENTO & CRUZ-LANDIM 1997).

Em *P. fuscatus* não há relação significativa entre a idade e o desenvolvimento ovariano. Entretanto, as fêmeas com ovários mais desenvolvidos não realizam atividade de forrageamento (WEST-EBERHARD 1969).

Estudos realizados em *P. gallicus* demonstraram que as fêmeas dominantes, e/ou que venham a ser dominante, apresentam *corpora allata* e ovários mais desenvolvidos que as subordinadas (RÖSELER et al 1984, 1985). Tais resultados justificam a hipótese de que a alta dominância está baseada nos altos níveis de atividade endócrina e na alta capacidade reprodutiva. Porém não se pode afirmar se o aumento da atividade endócrina é a causa do comportamento de dominância ou se é consequência do alto nível de dominância, uma vez que estudos afirmam que a hierarquia de dominância é estabelecida ao longo do ciclo da colônia (RÖSELER et al. 1981).

2.2. NINHO, CICLO DA COLÔNIA E COMPORTAMENTO DOS INDIVÍDUOS

Os ninhos são o centro das colônias das vespas sociais e servem como um local para o desenvolvimento das crias (JEANNE 1977). Em Polistinae os ninhos são grandes com células arranjadas em agrupamento circular. As fibras vegetais são coletadas com o auxílio das mandíbulas e transportadas ao ninho na forma de uma “bola de fibras”. A fêmea passa a macerar o material, sendo este simultaneamente aderido ao ninho juntamente com a secreção salivar (EVANS & WEST-EBERHARD 1970). O favo único em Polistini é sustentado por um pecíolo e não apresenta envelope (EDWARDS 1980, DOWNING & JEANNE 1986).

Em *P. versicolor* o ninho apresenta um favo simples peciolado (stelocytarus), não envelopado (gymnodomous) feito de fibras vegetais (REEVE 1995).

Os estágios imaturos em *P. versicolor* duram, em média, de 5 a 16 dias, para ovo, de 12 a 45 dias, para larva, de 16 a 26 dias para pupa e de 10 a 17 dias para fêmeas subordinadas (GOBBI 1977).

Em *Polistes* o ciclo de vida é anual (WILSON 1980) e as colônias podem apresentar apenas uma fêmea responsável pela postura dos ovos (haplometrose) ou podem ser fundadas por mais de uma fêmea (pleometrose) (EVANS 1958). As fundações por pleometrose são comuns nas espécies do gênero *Polistes* distribuídas na região tropical, sendo as fundações por haplometrose comuns nos demais espécies de *Polistes* e todos os membros da subfamília Vespinae (EDWARDS 1980).

Segundo Reeve (1995), o ciclo das colônias de Polistinae pode ser dividido em 4 fases: fase de fundação, fase de operária (pré-emergência), fase reprodutiva (pós-emergência) e fase intermediária.

A fase de fundação inicia-se com a construção do ninho, sendo esta realizada por haplometrose ou pleometrose. A fase de operária tem início quando a primeira operária emerge, perdurando até a emergência da primeira fêmea reprodutiva quando então inicia-se a fase reprodutiva, que segue até o declínio da colônia. A fase intermediária compreende a fase entre o declínio da colônia e a fundação de novas colônias (REEVE 1995).

Em regiões de clima temperado, como a Europa e América do Norte, as colônias de *Polistes* são fundadas na primavera por fêmeas fertilizadas ainda no verão (EVANS & WEST-EBERHARD 1970). A fêmea fundadora passa a ser a principal responsável pela postura dos ovos. Estas fêmeas passam a maior parte do tempo imóveis no ninho, saindo ocasionalmente para coleta de fibra vegetal para a construção do mesmo. Além destes comportamentos, as fêmeas fundadoras realizam aqueles de dominância, como vibrar o gáster sobre o ninho (RÖSELER et al 1981).

As fêmeas subordinadas passam a desempenhar papéis de operárias no ninho e seus ovários não se desenvolvem enquanto a fêmea dominante estiver presente (PARDI 1948). Estas fêmeas são responsáveis pelo forrageamento, atividade esta que pode ser iniciada assim que estas fêmeas emergem e consistem basicamente da captura de fibra vegetal, presa, néctar e água. Algumas recém emergidas passam por um período letárgico, somente realizando auto-limpeza e solicitando alimento, estando a maior parte do tempo paradas. Quando iniciam atividades de saída do ninho estas sempre são infrutíferas, sem presa para as larvas, néctar, fibra vegetal ou água. Algumas destas operárias são destinadas a serem rainhas (EVANS & WEST-EBERHARD 1970).

As relações de dominância e subordinação passam a ser mais ritualizadas quando a hierarquia já está estabelecida e as interações de agressividade entre elas raramente ocorrem (RÖSELER et al 1981).

Em *P. versicolor* é comum ocorrer à substituição da fêmea dominante por uma subordinada, por meio de confrontos, que, segundo Carneiro (1991), ocorrem quando duas fêmeas rivalizam-se assumindo a mesma postura e intensidade de agressividade.

As fêmeas subordinadas possuem capacidade de ovoposição, mas não a realizam justamente por ser esta uma função da fêmea dominante, ocorrendo apenas durante a substituição natural da mesma (ZARA & BALESTIERI 2000). Caso uma das fêmeas subordinadas venha a ovopositar, estes ovos serão "comidos" pela dominante (ovofagia diferencial) (GERVET 1964).

Os comportamentos de dominância não são observados em *Apis* (Apinae), uma vez que estes foram substituídos pela ação de hormônios secretados pela "rainha" (WILSON 1976).

Segundo West-Eberhard (1986) existem padrões comportamentais que podem caracterizar as relações de dominância e subordinação em *Polistes*. Zara & Balestieri (2000) determinaram 18 padrões diferentes de comportamentos de fêmeas dominantes e subordinadas de *P. versicolor*, entre os quais destacam-se: permanecer imóvel no ninho, auto-limpeza corporal, verificar células com a cabeça, vibrar o gáster sobre o ninho, trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto, alimentar as larvas, comportamentos de dominação e subordinação física, manutenção do ninho, bem como a construção de novas células, aplicar secreção bucal ou gastral ao pecíolo, ovoposição, ovofagia, forrageamento de presas, néctar, água e polpa vegetal e viagem infrutífera.

As atividades comportamentais desempenhadas pelos indivíduos no ninho variam durante o decorrer do dia e são influenciadas pela temperatura e luminosidade (EDWARDS 1980).

A diferenciação das castas em vespas eusociais primitivas, como *Polistes*, pode ocorrer em diferentes estágios. Durante a fase de cria as fêmeas podem desenvolver-se em fêmeas operárias ou fundadoras em potencial, dependendo de fatores externos e da qualidade e quantidade de alimento recebido quando larva (RÖSELER et al. 1981).

Em Polistinae os indivíduos recém emergidos passam as primeiras horas inativos ou se limpando. As fêmeas em geral, andam sobre o ninho, realizando com frequência a verificação das células, colocando a cabeça dentro de cada uma delas. As atividades de forrageamento consistem na obtenção de néctar e presas, utilizadas na alimentação das demais subordinadas e da dominante, e das crias respectivamente, além da coleta de água e fibras vegetais. As subordinadas realizam a limpeza das células do ninho, e também fazem o resfriamento e aquecimento do mesmo nos períodos quentes e frios (EDWARDS 1980).

Em algumas espécies de Vespinae as atividades de forrageamento são realizadas de acordo com a idade de cada indivíduo, diferente do observado em Polistinae (JEANNE 1991).

2.3. GLÂNDULAS SALIVARES EM HYMENOPTERA

Heselhaus (1922) descreveu as seguintes glândulas, como constituintes do sistema salivar de Hymenoptera: glândula mandibular, glândula hipofaríngea e glândula salivar do tórax. Nas formigas o sistema salivar é constituído também pela glândula pós-faríngea (CAETANO et al 2002).

As glândulas do sistema salivar possuem variações anatômicas e histológicas, pelas quais pode-se estabelecer, dentro do grupo, as linhas evolutivas seguidas por estes órgãos, podendo ser relacionadas às castas ou às espécies (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972).

A glândula salivar do tórax, também denominada por glândula labial ou somente glândula salivar, está associada à diluição e lubrificação do alimento, como também a construção do ninho (SPRADBERY 1973).

Muitas espécies de vespas utilizam fibras e outros tecidos vegetais, os quais são macerados e misturados às secreções orais, para construir o ninho (WENZEL 1991). A secreção salivar também é utilizada para a manutenção do ninho, sendo aplicada à superfície do mesmo para protegê-lo da chuva e ação do tempo; como observado em *P. chinensis* e *P. riparius* (KUDÔ et al 1998; YAMANE et al 1998).

Estudos realizados com *P. annularis* afirmam que a secreção eliminada pela glândula salivar do tórax está associada à produção da “cola” usada para manter unidas às paredes das células que formam o ninho e, também, o material formador do pecíolo que o sustenta (ESPELIE & HIMMELSBACH 1990).

Nas abelhas as secreções glandulares também estão envolvidas nos processos de construção do ninho, como observado em *Chalicodoma sicula* (Megachilidae) (KRONENBERG & HEFETZ 1984), e na alimentação (MICHENER 1974).

Nos Hymenoptera a porção secretora da glândula salivar do tórax é formada por estruturas alveolares, pseudotubulares ou tubulares, e nos Vespidae pode apresentar-se dividida em 4 lóbulos, sendo um par localizado na região do protórax e o outro na região do mesotórax (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972).

A secreção produzida pelas unidades secretoras é levada, por meio dos canalículos, para o duto principal. Este desemboca na base do reservatório salivar, quando presente, ou diretamente na glossa (DELEURANCE 1955; LANDOLT & AKRE 1979).

Em estudos com abelhas, observou-se que a glândula salivar do tórax resulta da modificação da glândula de seda pré-existente na fase larval (SNODGRASS 1956).

A glândula salivar do tórax de *Apis mellifera* (Apinae), *Schwarziana quadripunctata* e *Camargoia* sp (Meliponinae) apresenta a porção secretora tubular, sendo os túbulos ramificados e paulatinamente afinados (CRUZ-LANDIM 1967; REGINATO & CRUZ-LANDIM 1996; SALLES & CRUZ-LANDIM 1998).

Nas abelhas que apresentam glândulas alveolares como *Centris fuscata*, *Hemisiella tarsata*, *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa suspecta* (CAVASIN-OLIVERA & CRUZ-LANDIM 1998), os ácinos apresentam 1 ou 2 células grandes, centrais, envoltas por uma bainha de células achatadas (CRUZ-LANDIM 1967).

Nas formigas das subfamílias Ponerinae e Dolichoderinae a glândula salivar do tórax possui porção secretora alveolar, com uma célula secretora central. Em Ponerinae a glândula salivar do tórax não apresenta um reservatório propriamente dito, mas dutos laterais dilatados. Algumas espécies destas subfamílias apresentam a glândula salivar do tórax com formato pseudotubular.

Já nas formigas das subfamílias Myrmicinae e Formicinae a porção secretora apresenta-se pseudotubular ou tubular, sendo constituída por células epiteliais, revestidas internamente por cutícula (GAMA 1985). A maioria das espécies pertencentes à subfamília Myrmicinae não apresenta reservatório, como observado em *Zacryptocerus pusillus* (Myrmicinae) (RIBEIRO & CAETANO 1994). Apenas o gênero *Atta* possui dilatações dos dutos laterais, fazendo às vezes de reservatório. Em Formicinae os túbulos secretores são longos e unem-se para formar um reservatório globoso (GAMA & CRUZ-LANDIM 1982).

Em *Camponotus rufipes* (Formicinae) a glândula salivar do tórax está presente desde a fase larval. As porções da glândula de seda desaparecem na pupação e a glândula salivar do tórax forma-se a partir dos dutos excretores finais, remanescentes desta glândula (GAMA 1985).

As vespas das tribos Polistini *Polistes canadensis*, *Polistes actaeon* e Epiponini, *Polybia nigra*, *Polybia occidentalis scutellaris*, *Polybia sericea*, *Protopolybia minutissima sedula*, *Apoica pallida*, possuem a glândula salivar do tórax com o mesmo aspecto morfológico observado nas espécies de vespas pertencentes à tribo Bembicini (*Bycirtes variegata*, *Rubrica surinamensis*) e *Sphex johannis* (Sphecidae), sendo a porção secretora formada por ácinos, constituídos por uma célula central grande envolvida por uma bainha de células pequenas e achatadas (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972).

O contato entre as células periféricas e a célula central se dá por meio de duto coletor, que origina o canalículo do ácino, como também observado em *P. versicolor* (ROCHA & CAETANO 2003). Tal aspecto possibilitou que estas unidades secretoras fossem denominadas pseudoácinos, uma vez que os ácinos são constituídos por células que apresentam sua porção apical voltada para um duto comum (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1995).

Os canalículos projetados das unidades secretoras se unem formando os dutos coletores laterais e o duto excretor final (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972; ROCHA & CAETANO 2003).

O reservatório está presente, em *Rubrica surinamensis* e *Bycirtes variegata*, na parte inicial do duto excretor final, não sendo comum sua presença nos demais Vespidae (SAENZ & CRUZ-LANDIM 1972), como também observado em *P. versicolor* (ROCHA & CAETANO 2003).

Os dutos das glândulas salivares em Hymenoptera e a parede dos reservatórios, quando presentes, são formados por epitélio de células baixas (GAMA & CRUZ-LANDIM 1982).

A glândula salivar do tórax de *P. versicolor* apresenta, na região proximal do duto coletor, uma porção diferenciada de células, não encontrada em outras vespas. Estas células são grandes, com formato arredondado e núcleo alongado, porém apresentam número reduzido de vesículas no citoplasma, se comparadas às células centrais dos pseudoácinos (ROCHA & CAETANO 2003).

As características das glândulas salivares do tórax, como o formato das unidades secretoras, a ausência ou a presença de reservatório, diferem entre os Hymenoptera solitários (abelhas e vespas) e os sociais (abelhas, vespas e formigas). Desta forma a estrutura geral desta glândula pode ser utilizada na diferenciação filogenética do grupo (ROCHA & CAETANO 2003).

2.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SECREÇÃO GLANDULAR

Alguns estudos têm sido realizados com objetivo de caracterizar quimicamente a composição da secreção oral produzida pelas vespas. Utilizando-se técnicas histoquímicas é possível caracterizar a secreção produzida pelos diferentes tecidos secretores, como a glândula salivar do tórax. Algumas técnicas são capazes de demonstrar a presença de proteínas com grupos reativo NH_2 (Ninhydrina Schiff), proteínas com grupos reativos SH (Azul de Bromofenol), mucossubstâncias (Ácido Periódico de Schiff - PAS), lipídeos (Sudan Black B), DNA (Reação de Feulgen, Verde de Metila-Pironina, Azul de Toluidina) e RNA (Verde de Metila-Pironina, Azul de Toluidina) (PEARSE 1985).

Em *Ropalidia* (Ropalidiini), *Polistes* (Polistini) e *Protopolybia* (Epiponini), esta secreção é composta basicamente de proteínas (SCHREMMER et al 1985; KUDÔ et al 1998). Em estudos realizados com larvas de *Apis mellifera*, as células do duto e a secreção contida em seu lúmen apresentaram reações positivas ao Azul de Bromofenol e ao PAS, caracterizando desta forma as células e a secreção como protéica e rica em glicoconjugados (SILVA 1999). Em larvas de formiga *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* as células secretoras que constituem a glândula salivar apresentaram reações positivas para as técnicas PAS e Azul de Bromofenol, e reação fracamente positiva para Ninhydrina Schiff, caracterizando desta forma a secreção como rica em mucopolissacarídeos e proteínas ricas em ligações SH (ZARA 1998). Resultados semelhantes a estes foram observados em *Scaptotrigona postica* (PETRALIA et al 1980) e *Scaptotrigona invicta* (CRUZ-LANDIM & MELLO 1981).

Em indivíduos adultos de *Trigona hypogea*, *Trigona recursa*, *Trigona spinipes*, *Xylocopa frontalis*, *Xylocopa suspecta*, *Megachile* sp., *Oxaea flavescens* os resultados obtidos para as técnicas Azul de Bromofenol, PAS e Sudan Black B foram positivos, evidenciando que a secreção produzida apresenta característica mucosa, protéica e lipídica (CAVASIN-OLIVEIRA 1995). O epitélio secretor da glândula mandibular de *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*) *pusillus* apresentou reação positiva ao Azul de Bromofenol, sendo esta

fracamente positiva para PAS, caracterizando a secreção como protéica. A reação ocorreu, também, de forma diferenciada no epitélio da mandíbula, na cutícula e nos dutos da glândula (RIBEIRO 2000).

As glândulas hipofaríngeas de indivíduos adultos de *P. versicolor* apresentam-se ricas em proteínas (Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff positivos) e mucopolissacarídeos (PAS positivo) (BRITTO 2001), porém a concentração destas substâncias é variada entre as idades e/ou atividades desenvolvidas pelos diferentes indivíduos da colônia (BRITTO 2003 *com. pes.*).

Além de caracterizar as proteínas presentes na secreção é possível determinar a presença de enzimas, como as ATPases ácida e alcalina, que estão relacionadas a processos celulares que envolvem a hidrólise de ATP - processos que requerem energia (VOET et al 2002). Como estas enzimas estão presentes nas membranas do retículo endoplasmático, nas vesículas secretoras lisossômicas e endossômicas, na membrana mitocondrial interna e na membrana plasmática, é possível também verificar a presença e a forma de tais estruturas nas células (NELSON & COX 2002).

As fosfatases alcalinas, por exemplo, são enzimas que estão relacionadas a processos bioquímicos fundamentais, como os mecanismos de absorção e transporte. Tendo em vista que a atividade destas enzimas está ligada a reações oxidativas, a detecção das mesmas pode ser utilizada para mensurar os níveis do metabolismo energético das células, uma vez que suas concentrações estão diretamente relacionadas aos metabolismos oxidativos dos tecidos; conseqüentemente a redução da atividade destas enzimas nos tecidos, reflete a diminuição de sua função celular (CHEN et al 2000).

As células secretoras da glândula pós-faríngea de formigas *Dinoponera australis* apresentam reações positivas a succinato desidrogenase (SDH) e a NADH-tetrazólio redutase (NADH-TR); enzimas que evidenciam a presença de mitocôndrias, uma vez que são enzimas oxidativas, e estão presentes na membrana interna das mitocôndrias, ligadas às cadeias de citocromo P450 (CAETANO 1998).

A caracterização histoquímica e enzimológica das glândulas salivares em Hymenoptera é importante uma vez que tais estruturas estão ligadas a processos fundamentais da vida destes insetos, como a alimentação das crias, a construção do ninho, a produção de feromônios (SPRADBERY 1973).

Em *P. chinensis* foram evidenciados mais de 20 aminoácidos na secreção oral, entre eles glicina, serina, alanina, valina e prolina. A composição da secreção nesta espécie de vespa é semelhante a outras espécies do gênero *Polistes* já estudadas, porém diferente quando comparada com outros gêneros de Vespidae. O conhecimento dos aminoácidos presentes nas proteínas da secreção oral pode refletir relações filogenéticas entre as vespas. A natureza química da secreção oral, especialmente a presença de prolina, bem como as quantidades da secreção produzidas podem atuar no endurecimento e fortalecimento da estrutura do ninho (KUDÔ et al 2000).

2.5. DEGENERACÃO GLANDULAR

Deleurance (1955) demonstrou que há regressão das glândulas salivares em operárias de *P. gallicus*, progressivamente com a idade, tendo, possivelmente, esta glândula papel importante na determinação das castas nesta espécie.

Além destes processo, ocorridos na vida adulta, durante a metamorfose dos insetos holometábolos, o corpo da larva é totalmente reestruturado. Este processo é regido por extensivo controle hormonal e envolve a lise de tecidos da larva para a formação dos novos tecidos do adulto (BOTHE & RATHMAYER 1994).

As glândulas do sistema salivar dos insetos, bem como os demais tecidos sofrem processos degenerativos ocasionados por eventos de morte celular programada ou não (BOWEN et al 1993). Por exemplo, os músculos abdominais em algumas espécies de Lepidoptera sofrem morte celular programada sob controle dos hormônios 20-hidroxiecdisona e hormônios de eclosão (BOTHE & RATHMAYER 1994).

Nas abelhas os processos de metamorfose são dirigidos pelo hormônio ecdisteróide e hormônio juvenil. Neste caso o hormônio ecdisteróide é responsável pela indução da metamorfose e causa a degradação dos tecidos da larva e o hormônio juvenil coordena as mudanças qualitativas durante o processo (GREGORC & BOWEN 1997).

A metamorfose é terminada na eclosão do adulto, expansão e esclerotização da cutícula (BOTHE & RATHMAYER 1994).

Os hormônios que causam proliferação e diferenciação das células em algumas situações podem causar, ao mesmo tempo, a morte celular em outros. Por exemplo, no desenvolvimento de anfíbios, o hormônio da tireóide estimula o crescimento geral do corpo ao mesmo tempo em que leva à degeneração da cauda e das brânquias (KERR et al 1972).

A localização histoquímica e citoquímica da fosfatase ácida tem sido também usada para mapear sítios de lise e morte celular. Se estiver livre no citoplasma ela pode indicar autólise celular. A presença desta enzima tem sido verificada em hemócitos, glândulas salivares e corpo gorduroso de insetos. Agregados de cromatina distribuídos pelo núcleo, alterações no envelope nuclear e a presença de proteínas anti-histonas associadas à fragmentação do DNA, também são indícios de morte celular programada (GREGORC & BOWEN 1997).

A apoptose, ou morte celular tipo 1, é caracterizada pelo colapso nuclear, condensação e marginalização da cromatina (ZAKERI et al 1995). No núcleo, as massas densas de cromatina aparecem e aumentam em número antes que o mesmo torne-se picnótico. O retículo endoplasmático rugoso e os polissomos perdem seus ribossomos e as organelas tornam-se empacotadas. A membrana plasmática torna-se convoluta dando a células aspecto de estrela, apresentando-se estas condensadas devido à perda de água (CLARKE 1990). Há fragmentação do citoplasma, porém sem vacuolização do retículo endoplasmático e eventos de heterofagocitose podem ser observados (ZAKERI et al 1995).

A morte celular do tipo 2 é a que ocorre nos processos de metamorfose. As células apresentam núcleo colapsado, porém esse processo é mais demorado que na apoptose. O citoplasma apresenta-se vacuolizado e com muitos lisossomos. Neste tipo de morte celular são visualizados eventos de autofagocitose, podendo ser observados um grande número de vacúolos autofágicos (CLARKE 1990; ZAKERI et al 1995).

As mitocôndrias e os retículos endoplasmáticos aparecem dilatados e o complexo de Golgi apresenta-se maior e com alta atividade de difosfatase, sendo esta relacionada à síntese de lisossomos primários. Algumas alterações podem ser observadas em nível de membrana plasmática, como a perda das microvilosidades e junções celulares. Neste tipo de morte celular há uma mudança na distribuição autofágica de fosfatase ácida e nova síntese de hidrolases nos ribossomos. A fosfatase ácida lisossômica e extracisterna têm importante papel neste tipo de morte celular (CLARKE 1990).

Já a morte celular do tipo 3 apresenta-se subdividida em 3A, onde a degradação vesicular é não lisossomal. É caracterizada pelo aumento das organelas, seguida da formação de espaços vazios no citoplasma. A célula é destruída pela desintegração de diferentes estruturas celulares, como também da membrana plasmática. Na morte celular tipo 3B há degeneração citoplasmática e esta difere da tipo 3A uma vez que a quebra do envoltório nuclear ocorre antes de sua desintegração (CLARKE 1990).

A necrose é morfologicamente diferente da apoptose. Neste processo de morte celular, a célula torna-se primeiramente inchada e posteriormente sofre lise (HÄCKER 2000). A fragmentação do DNA ocorre de forma aleatória e geralmente consiste de quebras simples da molécula (STADELMANN & LASSMANN 2000). São vários os agentes que induzem a necrose, como vírus, bactérias, protozoários, além de poder ocorrer acidentalmente (PROSKURYAKOV et al 2003).

Tanto a necrose como a apoptose podem ser consideradas formas das fases de execução da morte celular programada. Na necrose os componentes citoplasmáticos eliminados ao espaço intercelular, através da membrana plasmática já danificada, podem provocar respostas inflamatórias (STELLER 1995); durante a apoptose estes produtos são eliminados isoladamente por meio dos macrófagos (PROSKURYAKOV et al 2003).

O termo morte celular programada era usado apenas para descrever os processos de morte celular ocorridos durante o desenvolvimento, quando as células são programadas para morrer no processo normal de desenvolvimento (KERR et al 1972). Atualmente este termo é utilizado como sinônimo para a apoptose (HÄCKER 2000).

Poucos estudos neste sentido foram realizados em invertebrados adultos, que, por exemplo, podem sofrer reestruturações de alguns órgãos, adaptando-se a novas tarefas. Nestes casos podem ser observadas as ocorrências de morte celular programada em estruturas inativas ou que já cumpriram seu papel.

Nas operárias de *Apis mellifera*, por exemplo, as glândulas hipofaríngeas assumem funções diversas e bem definidas na colônia. O maior desenvolvimento glandular é observado em operárias nutridoras, as quais oferecem a secreção glandular como alimento a todas as larvas, rainhas e machos da colônia (SZOLDERTZ & CRAILSHEIM 1993). Após a fase de nutridora, as operárias iniciam as atividades de forrageamento. Esta mudança coincide com a acentuada redução das glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES 1973), sendo a morte celular um evento facilmente observado neste período (SILVA DE MORAES & BOWEN 2000).

3. Artigo 1

Ultrastructure of salivary glands: thoracic glands
of *Polistes versicolor* (Olivier, 1791)

Hymenoptera: Vespidae

Thalita Rocha & Flávio Henrique Caetano

* Brazilian Journal of Morphological Sciences

ABSTRACT

The salivary system of Vespidae consists of mandibular, hypopharyngeal and salivary (thoracic) glands. Our aim was to describe the thoracic glands ultrastructure in adult *Polistes versicolor* by transmission electron microscope, paying attention to various component cell types. In *P. versicolor*, the thoracic glands exhibit a secretory portion consisting of pseudoacini. Each pseudoacinose secretory unit includes a central cell (TA), surrounded by several parietal cells (TB). From these pseudoacini, canaliculus arises and joins together to form the main ducts (ducts 1, 2, 3, according to their increasing diameters). Epithelial cells form the duct system, namely type C cells (TC), but lacks any reservoir. Near the base of duct 2 are included further cell types, namely type D cells (TD). From these data, it seems that component cells in *P. versicolor* thoracic glands perform several, sequential role: secretory biosynthesis (TA), modification (TB, TC in duct 1, TD) and conduction of secretion (TC).

Key words: Hymenoptera, salivary system, thoracic glands, ultrastructure, Vespidae.

INTRODUCTION

Most pterygote insects have salivary glands in the thorax. A secretory portion and a common duct usually compose these. In Hymenoptera the salivary glands consist of several secretory branched tubules, or of secretory units acinose in shape. In this order a reservoir may be present. Tubular secretory units are found in ants [6] whereas in wasps only acinose secretory units are found [9, 12, 17]. In bees both secretory units are found, as well as intermediate structure, pseudotubular [18].

In the Vespidae, the salivary system include mandibular, hypopharyngeal and salivary glands, the last one usually occurring in the thorax (thoracic glands). Some bees, presents this glands in the head too. Those glands of salivary system develop from the ectoderm, undergoing their major change and development during the metamorphosis. Several studies suggest the relationship among the salivary system and food digestion, larval feeding, synthesis of pheromones, and nest construction [5, 19, 21].

Thoracic glands product are considered to be a source of glue used to hold together the fibers of the nest paper [19, 21]. However, the role of the thoracic glands is still an open question: Jeanne [10] suggested that in *Dolichovespula* it produces the rubbery material of the petiole of nests, however Deleurance [4] reported that in *Polistes* sp it as a source of brood food. Knowledge about this gland in wasps is limited to light microscopy observations [4, 9, 17, 19].

Among Vespidae, *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) is one of the most disseminated species in South America, being very common in São Paulo state, Brazil [8, 21]. The genus *Polistes* has been extensively studied because some scientists believe this can be a “key-genus” to understand relationships between the social insects evolution and the wasp societies [19, 21].

Just the prominence to study this genus and the importance of salivary system glands to these insects our aim was to describe the ultrastructure of *P. versicolor* thoracic glands by transmission electron microscope (TEM) pointing to the differences between its component cells.

MATERIAL AND METHODS

Adults of *P. versicolor* were collected in Rio Claro, São Paulo state, Brazil (22°24'36" S; 47°33'36" W). The specimens were dissected under stereomicroscope and the thoracic glands transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for two hours, rinsed twice (15 minutes) in 0.1M sodium cacodylate buffer, and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer (2 hours). Once rinsed again, the thoracic glands were partly dehydrated in 10% ethanol for 15 minutes.

The samples were then submitted to 2% uranyl acetate in 10% ethanol staining (4 hours) and completely dehydrated in ethanol series. Later the samples were submitted to Epon-Araldite in 100% ethanol (1:1) and in 100% Epon-Araldite.

This material was embedded in Epon-Araldite and sections were obtained with a MT2-B ultramicrotome. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate for 45 minutes and lead citrate [20] for 10 minutes, and observed under a Zeiss EM9S-2 transmission electron microscope (TEM).

RESULTS

Under the TEM, *P. versicolor* thoracic glands show distinct types of cells. Each pseudoacinus includes two cells types: a central cell (TA) (Figs.1, 2A), surrounded by several parietal cells (TB) (Figs.1, 2B).

The TA cell cytoplasm holds a large number of secretory vesicles, with products of different electron densities (Figs.1, 2A, 2B). The nucleus is always irregular in shape with large nucleoli and heterochromatin clumps randomly distributed (Fig.2A).

The TB cells cytoplasm does not exhibit any secretory vesicle (Figs.1, 2B). These TB cells penetrate into TA cell, in association with the collecting duct; encircled by microvilli (Figs.1, 2B). The TB basal plasmic membrane in labyrinth invaginations forming cytoplasm areas with mitochondria (Fig.2B). The TB nucleus is regular in shape and holds two or more nucleoli; however these are smaller than those present in TA cell. The collecting duct inside the pseudoacini appears to be located between TA and TB cells (Figs.1, 2B).

All pseudoacini present canaliculus that result from collecting duct arising (Fig.1). Two or more these canaliculi, in turn, merge together to form ducts with different diameters, according to increasing lumen. The first duct formed is termed duct 1 (D1) (Figs.1, 3A, 3B). Ducts 1 fuse and form duct 2 (D2) (Fig.1, 3C) and these two ducts 2 fuse and form the duct 3 (D3) (Figs.1, 3D, 3E). Type C cells (TC) is found constituting the D1, D2 and D3 (Figs.1, 2A, 2C, 2E) epithelium. The morphology of this cells is variable according to the duct formed.

The D1 cells hold a lot of mitochondria (Figs.3A, 3B), which decrease in number in D2 and D3 cells (Figs.3C, 3E). The basal plasmic membrane in D1 cells is similar to TB and TD cell plasmic membrane (Figs.2B, 2C, 3A). The D1 cells apical plasmic membrane also forms microvilli like TB cells (Figs.2B, 3A, 3B). The apical plasmic membrane in the

duct 2 and duct 3 TC cells do not form microvilli and the mitochondria is higher than in duct 1 and 3 smaller (Figs.3A, 3C, 3E). In D1 the aspect of TC cells resemble that involved in active transport of molecules different from TC cells forming D2 and D3 ducts.

The lumen of these ducts is lined by taenidia (chitin) (Figs.1, 3A, 3C, 3E) produced by the duct epithelial cells (TC).

Type D (TD) cells was found in association with the duct 2 (Figs. 1, 2C) without any other cell type intervening. The TD cell cytoplasm is similar to that TA cytoplasm, holding vesicles with products of different electron densities, but decreased in number (Figs.2A, 2B). On the other hand, their nucleus and basal plasmic membrane resemble corresponding structures in TB cells.

Between secretory pseudoacini, fat body cells can be observed (Fig.1D). The fat body cells constituted the fat body, that is the principal store of lipid in the insects' body and are not part of the thoracic glands. Fat body cells contribute to the cells in general as a nutrient reservoir. These cells can be filling all the cavities of the head, thorax and abdomen and is divided into parietal (adhered to the cuticle) and visceral (located among the organs) fat body [11].

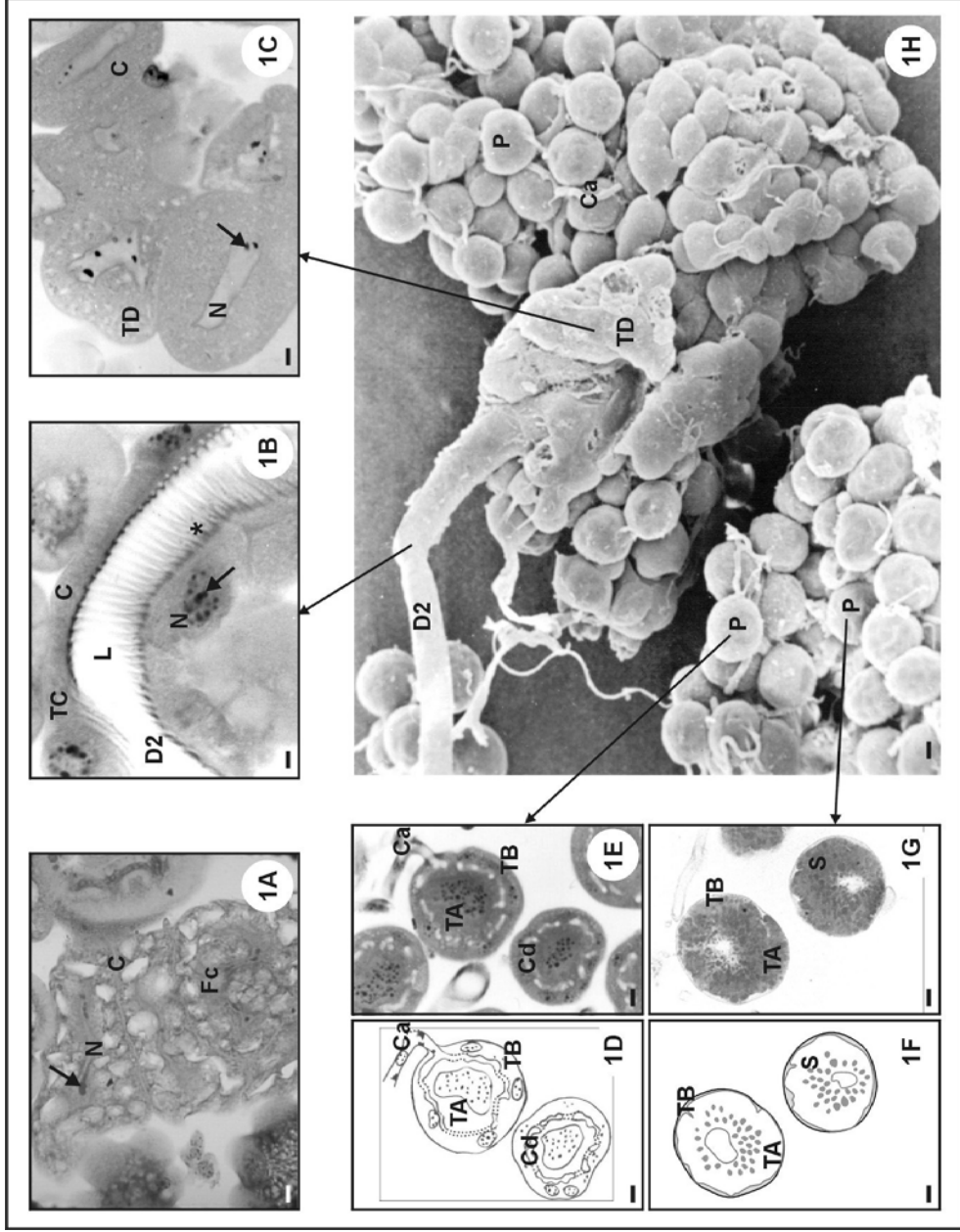


Figure 1: The general aspects of the *P. versicolor* thoracic glands. **A:** Fat cells (Fc). **B:** TC cells (TC). **C:** TD cells (TD). **D** - **G:** pseudoanici (P). **H:** thoracic glands by scanning electron microscopy (SEM). Nucleus (N), nucleolus (arrow), secretory vesicles (S), cytoplasm (C), collecting duct (Cd), canaliculus (Ca), lumen (L).

Bar: 1.5µm

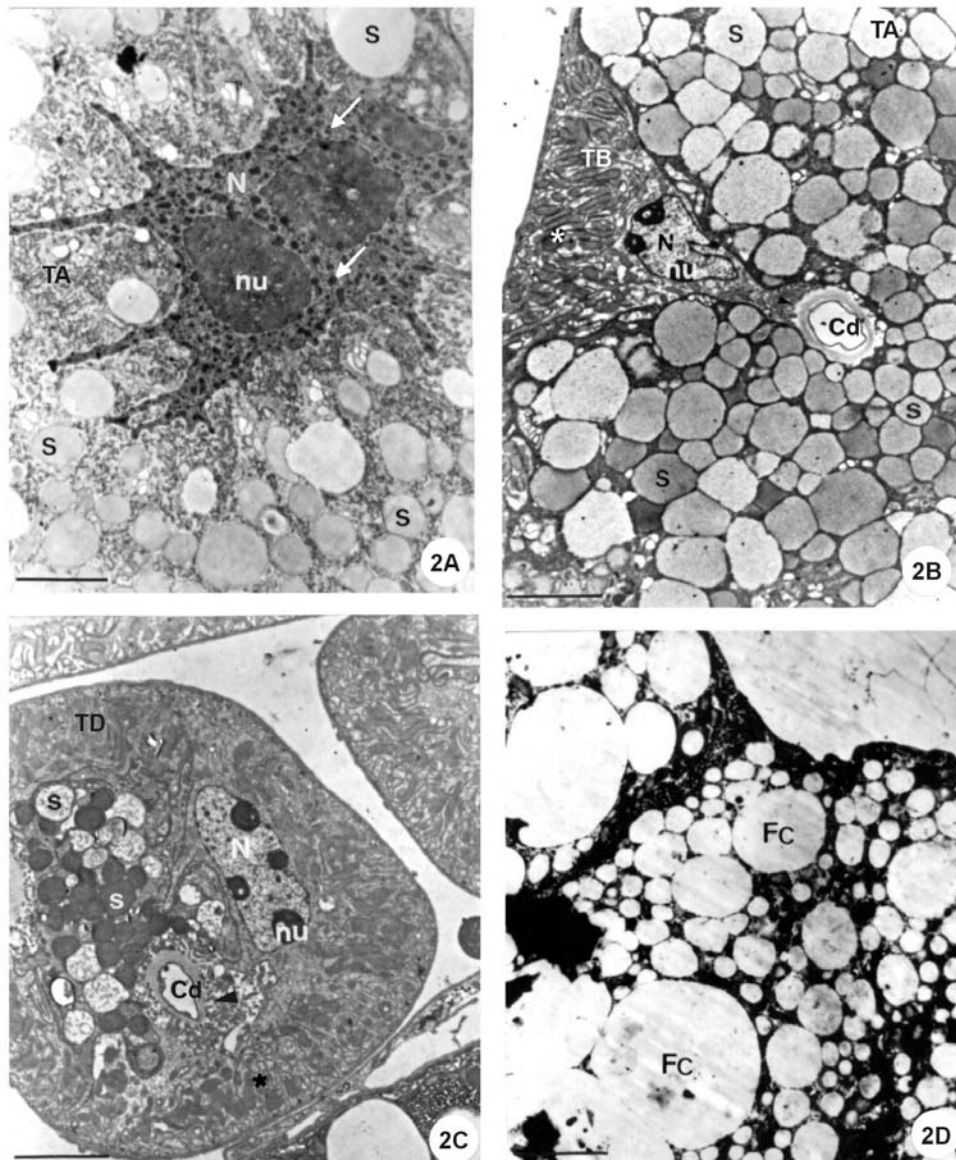


Figure 2A: Main features of central cell (TA) showing a irregular nucleus (N) with large nucleolus (nu) and many heterochromatin clumps (arrow). Note the different types of secretory vesicles (S).

Figure 2B: Detail of the pseudoacinus showing the peripheral region with parietal cell (TB) and the central cell (TA) cytoplasm. Note the collecting duct (Cd) between the TA and TB cells and the basal plasmic membrane involved in labyrinthine invaginations forming cytoplasm areas with mitochondria (*). Nucleus (N), nucleolus (nu), secretory vesicles (S).

Figure 2C: Main features of TD cell. Nucleus (N), nucleolus (nu), secretory vesicles (S), collecting duct (Cd), microvilli (arrowhead). The basal plasmic membrane is involved in labyrinthine invaginations, associated with mitochondria (*) similar to that present in TB cells.

Figure 2D: Detail of the fat cell showing the lipid droplets (Fc).

Bar: 5 μ m

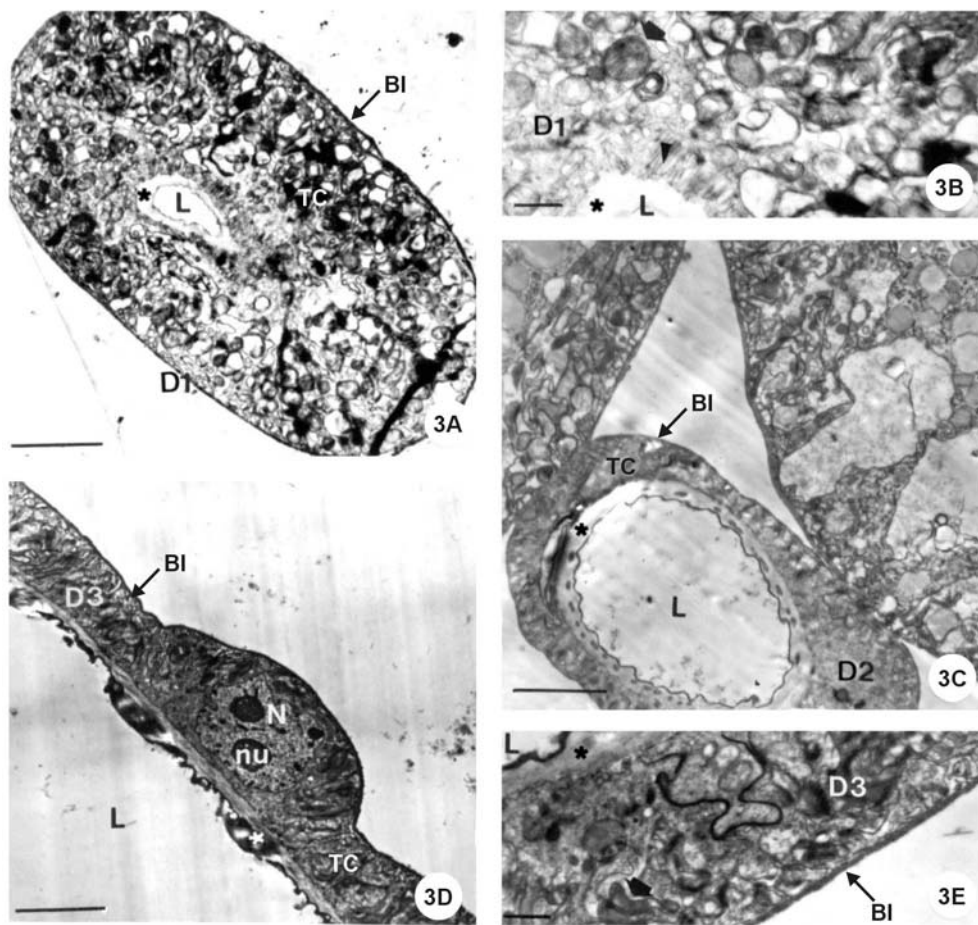


Figure 3A: General view of duct 1 (D1); duct cell (TC), lumen (L), chitin (*), basal lamina (BL). Note the grate number of mitochondria.

Figure 3B: Detail of the TC cells in duct 1, showing the mitochondria (arrow) and the microvilli (arrowhead). Lumen (L), chitin (*), basal lamina (BL).

Figure 3C: General aspects of the duct 2 (D2); duct cell (TC), lumen (L), chitin (*), basal lamina (BL).

Figure 3D: Detail of the duct 3 (D3); duct cell (TC), lumen (L), nucleus (N), nucleolus (nu), chitin (*), basal lamina (BL).

Figure 3E: Detail of duct 3 cells (D3) showing the basal plasmatic membrane involved in a labyrinthine pathway with associated mitochondria (arrow). Lumen (L), chitin (*), basal lamina (BL).

Bar: 5 μ m

DISCUSSION

The thoracic glands secretory units in *P. versicolor* are similar to *Xylocopa frontalis*, *Xylocopa suspecta*, *Centris fuscata*, *Hemisiella tarsata* [2], *Polistes canadensis*, *Polistes actaeon* [3], *Vespula pensylvanica* [12] and some ants' species of Ponerinae and Dolichoderinae subfamily [7], showing a single central cell per acinus. The pseudoacini central cell in *P. versicolor* thoracic glands is surrounded by several parietal cells [17]. Those aspects are presented in all Hymenoptera species that have the thoracic glands acinose.

In *P. versicolor*, like as in *X. frontalis*, *X. suspecta*, *C. fuscata* and *H. tarsata* the central cell (TA) cytoplasm holds a great number of vesicles of several sizes, with secretory product showing different electron densities [1].

The aspects of the TA cell like a presence of a great number of vesicles in the cytoplasm and the irregular nucleus morphology, suggested that are the secretory cells in the pseudoacini *P. versicolor* thoracic glands.

The positive reaction to Periodic Acid-Schiff (PAS - test for carbohydrates), suggested that the TA cell would be producing proteinaceous and carbohydrate material [16].

A small duct surrounded by variable number of cells forms the typical acinar gland. This aspect is different from *P. versicolor* thoracic glands, that present a central cell (TA) surrounded by parietal cells (TB) and a single collecting duct between the TA end TB cells. These differences confirm the term pseudoacini to name this gland in *P. versicolor* [17].

The parietal cells (TB) in *P. versicolor* are similar to those of *X. frontalis*, *X. suspecta* and *C. fuscata* since they are located in the outer part of the acini and their apices penetrate toward the central cell [1].

The duct 1 is different from duct 2 and duct 3. Their peculiar aspect of its TC cells was not seen in other insects; the occurrence of microvilli could be involved in secretory product concentration (dehydration) and the mitochondria associated with the basal plasmic membrane suggest that it could be involved in modifying the ionic concentration of the secretory fluid in the duct, similar to salivary gland cells of *Calliphora vomitoria* [14]. Although the ducts 2 and duct 3 TC cells present an aspect of conducting cells.

Type D (TD) cells were found in association with the duct 2, are similar to TA cell cytoplasm, holding vesicles, but decreased in number. On the other hand, their nucleus and basal plasmic membrane resemble corresponding structures in TB cells. The TD cells also presents mitochondria associated with the basal plasmic similar to TC cells in duct 1.

According to Landolt and Akre [12] the parietal and duct cells may regulate water and ion content in the secretion. The highly enfolded apical plasmic membranes, forming microvilli, and numerous mitochondria in association with the basal plasmic membrane, provided greatly increased surface area and energy for active transport, respectively, suggesting active uptake of material from hemolymph to be transferred into the ducts [12], as observed in TB, TD cells and duct 1.

Considering the movement of water and ions from hemolymph to duct network by the parietal cells (TB), TD cells and duct 1 might be able to produce large quantities of fluids. In addition, since thoracic glands secretion is in part proteinaceous [16], it could be a brood food as suggested in *Polistes* salivary glands by Deleurance [4] or glue, mucoprotein in nature [16], used in paper making, as suggested by Spradbery [19].

The lumen of the ducts in *P. versicolor* thoracic glands is lined with twisted taenidia, as described in *V. pensylvanica* [12] and bees *Bombus* sp and *Tricholletes* sp [2]. The epithelial cells, that are the duct cells (TC), produce the chitin present in these taenidia.

Apparently the secretion is not accumulated or stored, since in *P. versicolor* the thoracic glands does not present any reservoir, similar to other wasps' species. The occurrence of reservoir can be seen in some ants and bees species [1, 2, 6, 7, 13, 15].

Considering the wide cell diversity in *P. versicolor* thoracic glands several, we assign to each cell type a specific role: secretion biosynthesis (TA), modification (TB, TD and duct 1) and conduction (duct 2 and duct 3).

REFERENCES

1. Cavasin-Oliveira GM, Cruz-Landim C (1998) Ultrastructure of Apoidea (Hymenoptera, Anthophorinae). Salivary glands. I. Alveolar glands. *Rev. Bras. Entomol.* **42**, 1-6.
2. Cruz-Landim C (1967) Estudo comparativo de algumas glândulas de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. *Arq. Zool. São Paulo.* **15**, 177-290.
3. Cruz-Landim C, Saenz MHP (1972) Estudo comparativo de algumas glândulas dos Vespoidea (Hymenoptera). *Papéis Avulsos. Zool. São Paulo.* **25**(24), 251-263.
4. Deleurance EP (1955) Contribution à l'étude biologique des *Polistes* (Hymenoptères, Vespides) II, - L'écycle évolutif du couvain. *Insects Soc.* **11**, 285-302.
5. Downing HA (1991) The function and evolution of exocrine glands. In: *The social biology of wasp* (Ross KG, Matthews RW, eds). pp. 540-547. Cornell University Press.: London.
6. Gama V (1985) O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera, Formicinae). *Rev. Bras. Biol.* **45**, 317-359.
7. Gama V, Cruz-Landim C (1982) Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera – Formicidae). *Naturalia.* **7**, 145-165.
8. Gobbi, N.; Zucchi, R. (1980) On the ecology of *Polistes versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). I Phenological Account. *Naturalia.* **5**, 97-104.
9. Heselhaus F (1922) Die hautdüsen der Apiden und verwandter formen. *Zool. Jahrd. Abt. Anat. Ontog. Tiere.* **43**, 369-464.
10. Jeanne RL (1977) A specialization in nest petiole construction by queens of *Vespula* sp. (Hymenoptera: Vespidae). *N.Y. Entomol. Soc.* **85**, 127-129.
11. Keeney LL (1978) Endocrine regulation of fat body development and function. *Ann. Rev. Entomol.* **23**, 329-352.

12. Landolt PJ, Akre RD (1979) Ultrastructure of the thoracic gland of queens of the Western yellow jacket *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **72**, 586-590.
13. Oliveira GMC, Cruz-Landim C (1996) Ultrastructural study of salivary glands of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae). *Braz. J. morphol. Sci.* **13**, 120.
14. Oschman JL, Berridge MJ (1970) Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue Cell.* **2**, 281-310.
15. Reginato RD, Cruz-Landim C (1996) Secretory cycle of glands from salivary system in *Schwarziana quadripunctata* (Apidae, Meliponinae). *Braz. J. morphol. Sci.* **13**, 122.
16. Rocha T, Caetano FH (2000) Histoquímica da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hym.: Vespidae). In: *Braz. J. morphol. Sci.* **17**, 157.
17. Rocha T, Caetano FH (2003) Ultramorfologia e histologia da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). *Neotropical entomology.* **32**, 585-590.
18. Schönitzer K, Seifert P (1990) Anatomy and ultrastructure of the salivary gland in the thorax of the honeybee worker, *Apis mellifera* (Insecta, Hymenoptera). *Zoomorphology.* **109**, 211-222.
19. Spradbery JP (1973) Form and function. In: *Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps* (Spradbery JP, ed.). pp. 33-37. University of Washington Press.: Seattle.
20. Venable JH, Coggeshall R (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **25**, 407.
21. Zara FJ, Balestieri JBP (2000) Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Olivier (Vespidae: Polistinae) post-emergent colonies. *Naturalia.* **25**, 301-319.

4. Artigo 2

Análise histoenzimológica da glândula salivar do tórax de *Polistes*

versicolor (Olivier, 1791)

Hymenoptera: Vespidae

Thalita Rocha & Flávio Henrique Caetano

RESUMO

A glândula salivar do tórax, também denominada por glândula labial ou somente glândula salivar, pode estar associada, em vespas, à diluição e lubrificação do alimento, à produção de enzimas digestivas, como também à construção do ninho (SPRADBERY 1973).

Em *Polistes versicolor* esta glândula apresenta-se dividida em 4 lóbulos constituídos por unidades secretoras globulares, denominadas pseudoácinos. Estes pseudoácinos são formados por uma célula grande central (TA), circundada por células periféricas (TB). Na porção proximal dos dutos coletores laterais da glândula está presente um tipo diferente de célula (TD), ainda sem função definida. Os dutos coletores laterais e o duto excretor da glândula são formados por um epitélio simples, constituído de células achatadas (TC) (ROCHA & CAETANO 2003).

A célula TA apresenta reações positivas às técnicas ATPase ácida e alcalina, NADH-TR e SDH. Estas células estariam diretamente relacionadas à produção da secreção salivar. Já na célula TD a reação é diferenciada no citoplasma, sendo esta mais forte na região periférica que na região central, onde se encontra o núcleo. Esta célula, bem como as células TB, estaria relacionada à modificação da secreção, antes de sua eliminação ao exterior. As células TC apresentam reação positiva a estas técnicas, porém estas células no duto 2 têm função apenas na sua constituição e não na produção ou modificação da secreção glandular. Todos os tipos celulares constituintes desta glândula não apresentam reação a fosfatase alcalina.

Tais resultados, associados aos resultados positivos a fosfatase ácida, evidenciam que as células constituintes da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* estão relacionadas a processos oxidativos e que necessitam de energia, dada a grande quantidade de mitocôndrias e lisossomos marcados pelas técnicas.

Palavras-chave: Hymenoptera, sistema salivar, glândula salivar do tórax, enzimologia, Vespidae.

INTRODUÇÃO

Algumas organelas celulares podem ser identificadas por meio de reações histoquímicas, onde os elementos químicos presentes nas soluções corantes interagem com os compostos presentes nas organelas, evidenciando-as. Como exemplos de organelas histoquimicamente evidenciadas temos o retículo endoplasmático e as mitocôndrias.

A mitocôndria é a organela responsável por processos oxidativos pelos quais a célula obtém energia; ciclo do ácido cítrico - Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (ALBERTS et al 1997), como também a oxidação dos ácidos graxos e a degradação dos aminoácidos (VOET et al 2002), além de cumprir outras funções como armazenamento de lipídios (CAETANO 1998). Estes processos oxidativos são catalisados por enzimas localizadas nas cristas mitocondriais (succinato desidrogenase e ATPase) e na matriz mitocondrial (demais enzimas do Ciclo de Krebs) (SADAVA 1993, NELSON & COX 2002).

As ATPases pertencem a uma grande classe de enzimas que catalisam processos em que há hidrólise de ATP (VOET et al 2002), produzindo ADP e fosfato; estando relacionadas aos processos que requerem energia. Há pelo menos quatro tipos gerais de ATPases de transporte presentes nas membranas do retículo endoplasmático, nas vesículas secretoras lisossômicas e endossômicas, na membrana mitocondrial interna e na membrana plasmática (NELSON & COX 2002).

A Ca^{2+} ATPase está ligada à membrana do retículo endoplasmático das células musculares. Nestas células a concentração de Ca^{2+} citoplasmática é menor que nos espaços extracelulares; tal gradiente de concentração é mantido pelo transporte ativo de Ca^{2+} através do retículo endoplasmático, bombeando Ca^{2+} ativamente para fora do citoplasma, levando à contração. A Ca^{2+} ATPase atua também na liberação de neurotransmissores e na degradação de glicogênio (polímero de glicose, grande e ramificado, contido em grânulos no citoplasma). Além da Ca^{2+} ATPase existem também a Na^+ - K^+ ATPase que possui papel direto na regulação do volume celular, controlando a concentração de solutos dentro da célula e assim regulando as forças osmóticas que podem fazer a célula aumentar ou diminuir de volume (ALBERTS et al 1997).

Sistemas como Na^+ - K^+ ATPase, por exemplo, geram grandes gradientes eletroquímicos através das membranas. Essa energia livre armazenada pode ser aproveitada como fonte energética para vários outros processos fisiológicos endergônicos (VOET et al 2002).

Os lisossomos, assim como os peroxissomos (BEARD & NOVIKOFF 1969) são organelas ricas em enzimas oxidativas, sendo responsáveis pela digestão enzimática de componentes celulares e materiais ingeridos. Estas enzimas oxidativas (proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases) são hidrolases ácidas, usadas para a digestão intracelular controlada de macromoléculas, e operam melhor em pH 5. Tais enzimas concentram-se na face interna da membrana dos lisossomos, ocorrendo também em outros compartimentos celulares (SADAVA 1993).

As fosfatases alcalinas estão relacionadas a processos bioquímicos fundamentais, como os mecanismos de absorção e transporte. Quando encontradas no fígado e nos ossos, as fosfatases alcalinas têm sido utilizadas como valores diagnósticos para monitorar doenças associadas a estes órgãos, como também no diagnóstico de tumores (STIGBRAND 1984) e da AIDS (PAYNE et al 1991).

Tendo em vista que a atividade destas enzimas está ligada a reações oxidativas, a detecção das mesmas pode ser utilizada para mensurar os níveis do metabolismo energético das células, uma vez que suas concentrações estão diretamente relacionadas ao metabolismo oxidativo dos tecidos; conseqüentemente a redução da atividade destas enzimas nos tecidos, reflete a diminuição de sua função celular (CHEN et al 2000).

Os Hymenoptera, como outros insetos, apresentam estruturas glandulares ligadas às peças bucais, que constituem o sistema salivar. São constituintes do sistema salivar dos Hymenoptera: glândula salivar do tórax, mandibular, hipofaríngea e pós-faríngea, sendo a última exclusiva das formigas (GAMA & CRUZ-LANDIM 1982; CAETANO 1998). Nos Hymenoptera a glândula salivar do tórax pode apresentar-se formada por estruturas globulares, tubulares, (CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972) e pseudotubulares (CRUZ-LANDIM 1967).

Algumas vespas já estudadas apresentam a porção secretora da glândula salivar do tórax globular, como *Sphex johannis*, *Rubrica surinamensis*, *Polybia nigra*, *Polybia occidentalis*, *Polistes canadensis* e *Polistes versicolor* (SAENZ & CRUZ-LANDIM 1972; CRUZ-LANDIM & SAENZ 1972; ROCHA & CAETANO 2003).

Os pseudoácinos, que constituem a glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, são formados por uma célula central (TA), circundada por células periféricas (TB). A célula TA apresenta um núcleo estrelado com grandes nucléolos e o citoplasma com inúmeras vesículas de secreção. Já as células TB apresentam-se com núcleo central e arredondado com muitos nucléolos, sendo ausentes às vesículas de secreção no seu citoplasma. Dos

pseudoácinos partem canalículos, que se anastomosam formando os dutos coletores laterais da glândula e estes o ducto excretor final. Os dutos apresentam-se formados por células epiteliais TC e o lúmen é revestido por um reforço de quitina em espiral (tenídea). A glândula salivar do tórax de *P. versicolor* não apresenta reservatório. Na região proximal dos dutos coletores laterais da glândula há uma porção diferenciada de células cuja função é desconhecida. As células TD são arredondadas e seu núcleo é alongado. O citoplasma apresenta-se com vesículas de secreção, porém em número reduzido se comparadas à célula TA (ROCHA & CAETANO 2003).

A glândula salivar do tórax tem sido associada à diluição e lubrificação do alimento, como também à construção do ninho (SPRADBERY 1973). Segundo Landolt e Akre (1979) a secreção eliminada por esta glândula, nas vespas, estaria relacionada à produção da “cola” usada para manter unidas às paredes das células que formam o ninho e, também, do material formador do pecíolo que o sustenta.

Estudos realizados com a glândula salivar do tórax de *P. versicolor* mostraram que não existem diferenças morfológicas entre as diferentes castas, sendo que estas apresentam os mesmos tipos celulares (ROCHA & CAETANO 2003).

Portanto, faz-se necessário o estudo dos aspectos histoquímicos e enzimológicos desta glândula para, assim, avaliar o grau de atividade das células durante sua fase secretora, e conseqüentemente, sua função celular, utilizando para isso as técnicas para detecção de ATPases, NADH-tetrazólio redutase (NADH-TR), succinato desidrogenase (SDH) e fosfatases.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos de *Polistes versicolor* foram coletados no município de Rio Claro (22° 24'36"S; 47° 33'36"W). Os tórax obtidos foram emergidos em nitrogênio líquido, sendo posteriormente afixados nos suportes metálicos com adesivo (Cryo Embedding Compound Microm Laborgerät GmbH) e mantidos, "over night", no criostato Leica JUNG CM 1800, à -20°C. O material foi cortado (7µm) e as lâminas obtidas submetidas as reações enzimáticas (DAL PAI 1995), sendo analisadas ao fotomicroscópio (Leica DMLB). As imagens foram capturadas pelo programa Leica Qwin e digitalizadas.

ATPase ácida: as lâminas destinadas a esta técnica foram pré-incubadas em tampão veronal acetato 0.1M (pH 4.4), por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo posteriormente incubadas em estufa a 37° em solução contendo cloreto de cálcio 0.18M, 6 mL de água destilada, 2mL de tampão barbiturato de sódio 0.1M, 25mg de ATP, (pH 4.4), sendo mantidas nesta por 40 minutos.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas em cloreto de cálcio hexahidratado 1%, por 10 minutos, tratadas em cloreto de cobalto 2%, por 3 minutos, e lavadas em barbiturato de sódio 0.1M, por 3 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, por 30 segundos, e tratadas com sulfeto de amônia 1%, por 10 segundos, até atingirem coloração escura. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

ATPase alcalina: primeiramente as lâminas foram incubadas na solução contendo 2mL de barbiturato de sódio 0.1M, 2mL de cloreto de cálcio 0.18M, 6mL de água destilada (pH 10.2), por 5 minutos, a temperatura ambiente, e posteriormente à 37°C, em solução contendo 7.8mL de cloreto de cálcio 0.18M, 0.2mL de água destilada, 2mL na barbiturato de sódio 0.1M, 25mg de ATP (pH 10.2), sendo mantidas nesta por 40 minutos.

Passado o período de incubação, as lâminas foram lavadas em cloreto de cálcio hexahidratado 1%, por 10 minutos, tratadas em cloreto de cobalto 2%, por 3 minutos, e lavadas em barbiturato de sódio 0.1M, por 3 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, por 30 segundos, e tratadas com sulfeto de amônia 1%, por 10 segundos, até atingirem coloração escura. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ As técnicas para detecção de ATPase ácida e ATPase alcalina evidenciam a presença de mitocôndrias, marcando-as em marrom.

NADH-tetrazólio redutase (NADH-TR): as lâminas foram incubadas no meio apropriado (8mg de NADH, 10mL de NBT, 10mL de tampão Tris 0.2M, pH 7.4), por 40 minutos a 37°C, sendo posteriormente lavadas, por 3 vezes, em água destilada. As lâminas foram fixadas em formol 5% pH 7.0, por 5 minutos, novamente lavadas em água destilada e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ A presença da NADH-TR é observada na forma de grânulos corados em azul, sendo estes depositados nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático.

Succinato desidrogenase (SDH): as lâminas foram incubadas no meio (1mL de succinato de sódio 0.2M, 1mL de NBT, 2mL de tampão fosfato 0.1M, pH 7.4), por 40 minutos a 37°C, sendo posteriormente lavadas em água destilada. As lâminas foram fixadas em formol cálcio de Baker, por 5 minutos, novamente lavadas em água destilada e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ As mitocôndrias são marcadas em roxo-azulado.

Fosfatase ácida: as lâminas foram incubadas no meio apropriado (10mL de tampão acetato 0.1M, 20 mg de nitrato de chumbo, 32mg de betaglicerofosfato de sódio, pH 5.0), a 37°C, por 1 hora. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas, por 2 minutos, em sulfeto de amônio 1%, sendo lavadas em água destilada e, posteriormente, montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

Fosfatase alcalina: as lâminas foram incubadas no meio apropriado (10mL de barbiturato de sódio 2%, 10mL de betaglicerofosfato de sódio 3%, 20mL de cloreto de cálcio 2%, 1mL de sulfato de magnésio 5%, 5mL de água destilada, pH 9.4), por 1 hora. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 5 minutos, e imersas em solução de nitrato de cobalto 2%, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada, imersas em sulfeto de amônio 0,5%, por 1 minuto e, em seguida, montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ A atividade da fosfatase ácida e alcalina é marcada na forma de grânulos corados em preto ou vermelho, estando estes presentes no citoplasma, organelas e no núcleo.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para as técnicas enzimológicas, nos diferentes tipos celulares, estão resumidamente abordados na tabela 1.

As células constituintes da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* quando submetidas às reações para detecção de ATPase, apresentaram resultados semelhantes, para o pH 4.4 e para o pH 10.2 (figura 2), porém diferentes entre os tipos celulares.

Em ambas as técnicas, as células TA apresentaram pequenos grânulos dispersos em todo o citoplasma, havendo um acúmulo de grânulos na região nuclear (figuras 2A, 2C). Já as células TB apresentaram forte reação, mostrando-se homoganeamente coradas (figuras 2A, 2C), dificultando assim a diferenciação do núcleo e do citoplasma.

Apesar de serem encontrados na glândula salivar do tórax de *P. versicolor* três tipos diferentes de dutos, foram analisados no presente trabalho apenas as células TC que constituem o duto 2.

As células TC também apresentaram reação homoganeamente positiva, porém menos intensa quando comparada às células TB (figuras 2B, 2D). Já nas células TD a reação foi positiva em todo o citoplasma, sendo mais forte na região periférica, que na região central (figuras 2B, 2D).

As células TA, quando submetidas à reação para detecção de SDH, apresentaram pequenos grânulos marcados em todo o citoplasma, estando estes concentrados na região nuclear. Já as células TB apresentaram-se totalmente coradas (figura 3A).

As células TC apresentaram reação homoganeamente positiva (figura 3B), como observado nas células TB. Já nas células TD a reação foi positiva, sendo esta mais intensa na região periférica, que na região central, onde podem ser observados grânulos (figura 3B).

Na reação ao NADH-TR as células TA apresentaram grande número de grânulos citoplasmáticos (figura 3C). Já as células TB mostraram reação fortemente positiva e homogênea em todo o citoplasma (figura 3C).

Nas células TC a reação foi positiva (figura 3D), porém mais fraca em relação à apresentada pelas células TB (figura 3C).

As células TD apresentaram reação positiva, sendo mais intensa na periferia da célula (figura 3D).

As células TA da glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, submetidas a fosfatase ácida, apresentaram grânulos avermelhados no citoplasma, sendo estes de tamanhos variados (figura 4A). Já o citoplasma das células TB apresentou-se homogeneamente corado de rosa (figura 4A). Em ambas as células os núcleos puderam ser diferenciados, sendo corados em verde e apresentaram reação negativa a técnica (figura 4A).

Nas células TC o citoplasma apresentou-se corado em rosa, como nas células TB (figura 4B).

As células TD apresentaram reação semelhante às células TB e TC, porém nestas pode ser observado o acúmulo de grânulos avermelhados próximo ao núcleo (figura 4B).

Quando submetidas à reação para detecção de fosfatase alcalina as células constituintes da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* não apresentaram reação (figura 4C, 4D).

Tabela 1: Resultados apresentados para os diferentes tipos celulares da glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, de acordo com as técnicas enzimológicas aplicadas.

	ATPase ácida ph 4.4	ATPase alcalina ph 10.2	NADH-TR	SDH	Fosfatase ácida ph 5.0	Fosfatase alcalina ph 9.4
Célula TA - região nuclear	+	+	+	+	-	-
Célula TA - citoplasma	+	+	+	+	+	-
Célula TB - região nuclear	++	++	++	++	-	-
Célula TB - citoplasma	++	++	++	++	+	-
Célula TC - região nuclear	+	+	+	++	-	-
Célula TC - citoplasma	+	+	+	++	+	-
Célula TD - região nuclear	+	+	+	+	-	-
Célula TD - citoplasma (região central/região periférica)	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	++ / +	-

Reação positiva (+), fortemente positiva (++), ausente (-).

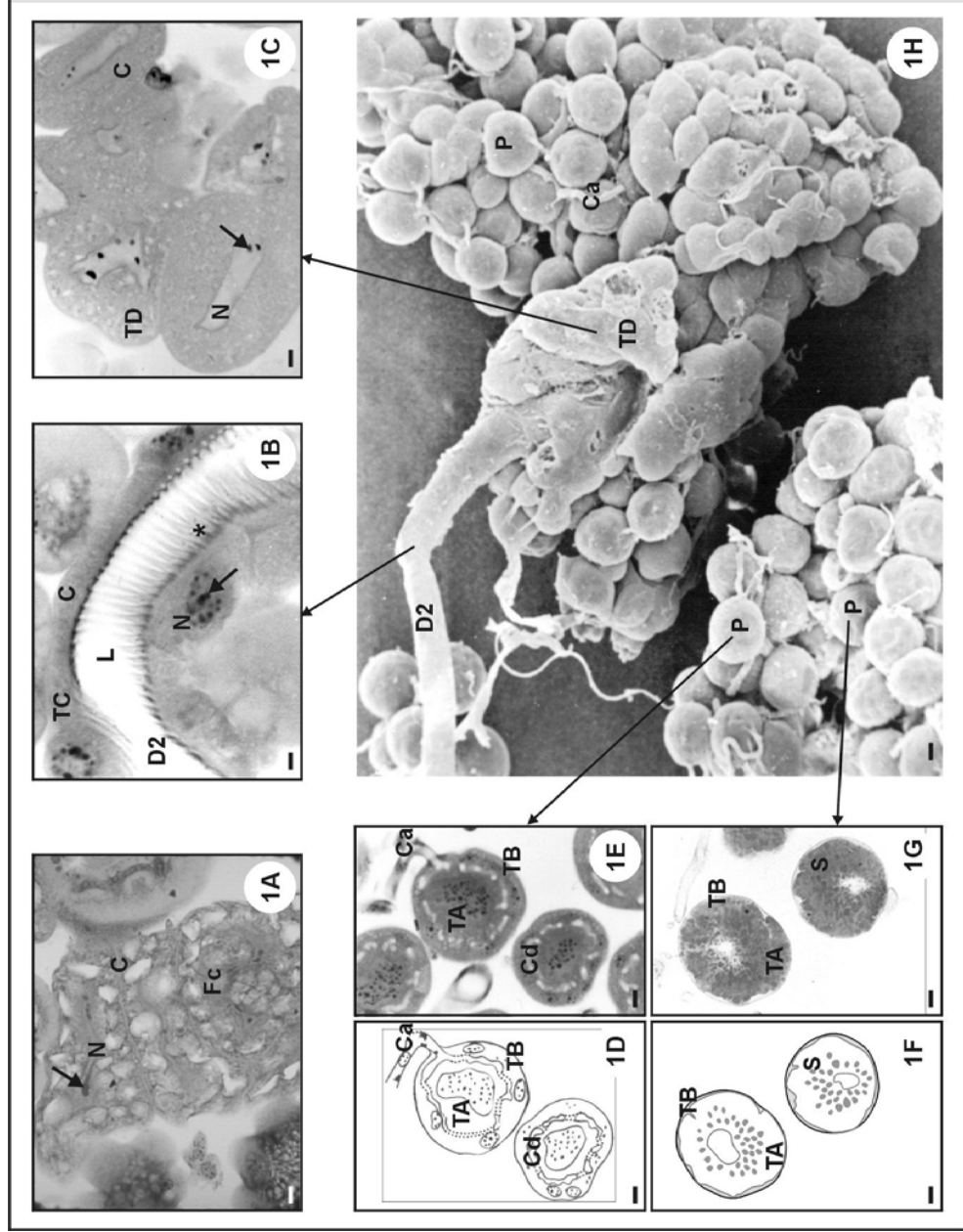


Figura 1: Caracterização da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* vista em microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A)** Detalhe do corpo gorduroso visceral (MO). **B)** Detalhe das células tipo C (TC) que constituem o epitélio do duto coletor lateral (D2) (MO). **C)** Detalhe das células tipo D (TD) presentes na região do duto coletor lateral (D2) (MO). **D a G)** Detalhe dos pseudoácinos (P), evidenciando as células tipo A (TA) e tipo B (TB). Notar a presença de vesículas secretoras (S) no citoplasma (C). **H)** Aspecto geral da glândula em MEV. Canalículo (Ca), núcleo (N), nucléolo (seta), duto coletor (Cd), duto coletor lateral (D2).

Barra = 1.5 μm

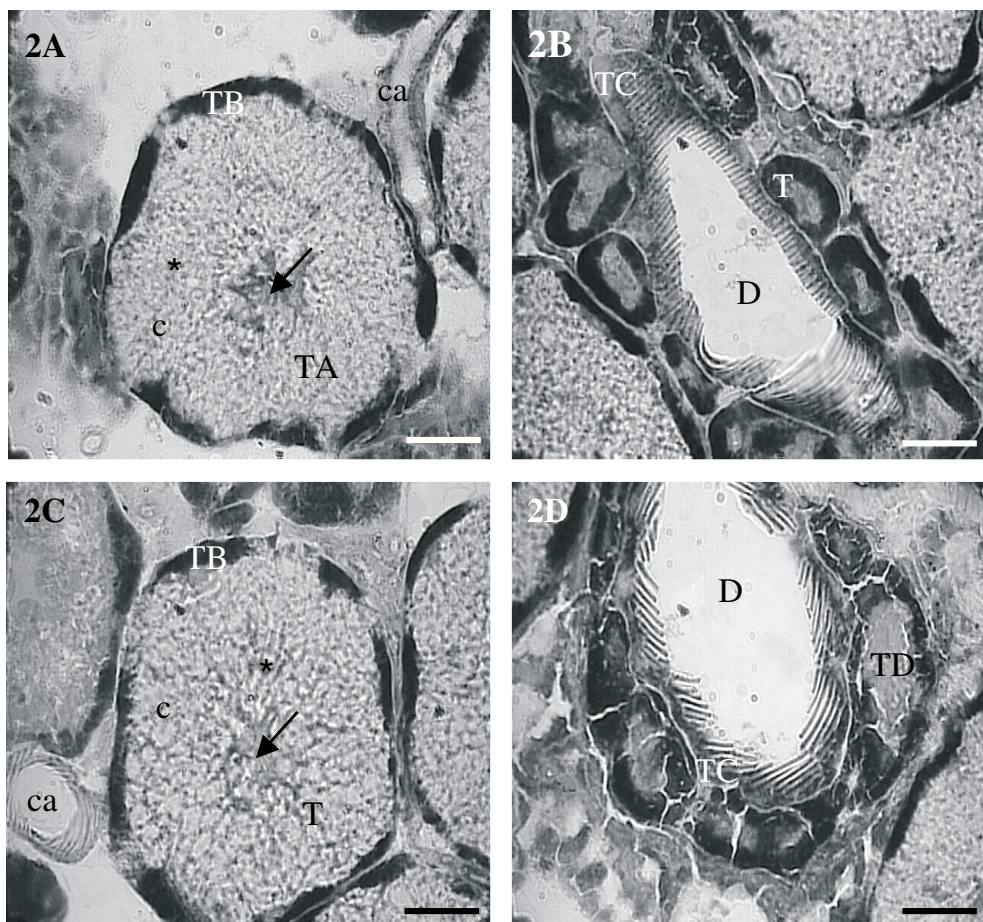


Figura 2: Reação para detecção de ATPase ácida pH 4.4. **A)** Notar os grânulos positivos (*) dispersos no citoplasma (C) da célula tipo A (TA) e concentrados na região nuclear (seta). Reação homogênea na célula tipo B (TB). Canalículo (ca). **B)** Região do duto coletor lateral (D2). Notar a reação positiva nas células tipo C (TC) e nas células tipo D (TD). **C)** Reação para detecção de ATPase alcalina pH 10.2. Notar os grânulos positivos (*) dispersos no citoplasma (C) da célula tipo A (TA) e concentrados na região nuclear (seta). Células tipo B (TB) com reação homogênea. Canalículo (Ca). **D)** Notar a reação positiva nas células tipo C (TC) e nas células tipo D (TD), presentes na região do duto coletor lateral (D2).

Barra = 20µm

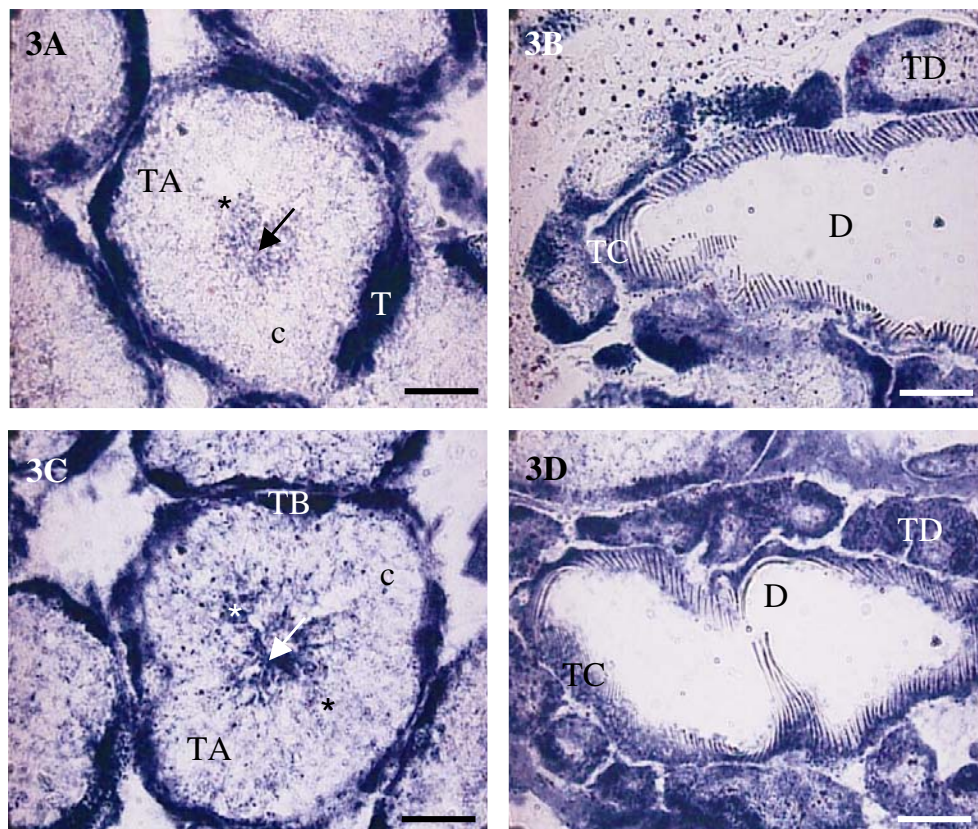


Figura 3: **A)** Reação para detecção de SDH. Célula tipo A (TA) com grânulos positivos (*) no citoplasma (C), estando estes concentrados na região nuclear (seta). Nas célula tipo B (TB) a reação é positiva e homogênea. **B)** Notar as células tipo D (TD) presentes na região do duto coletor lateral (D2) e as células tipo C (TC) que o formam, com reação positiva. **C)** Reação para detecção de NADH-TR. Notar os grânulos positivos (*) dispersos no citoplasma (C) da célula tipo A (TA) e concentrados na região nuclear (seta). Reação homogênea na célula tipo B (TB). **D)** Região do duto coletor lateral (D2). Notar a reação positiva nas células tipo C (TC) e nas células tipo D (TD).

Barra = 20 μ m

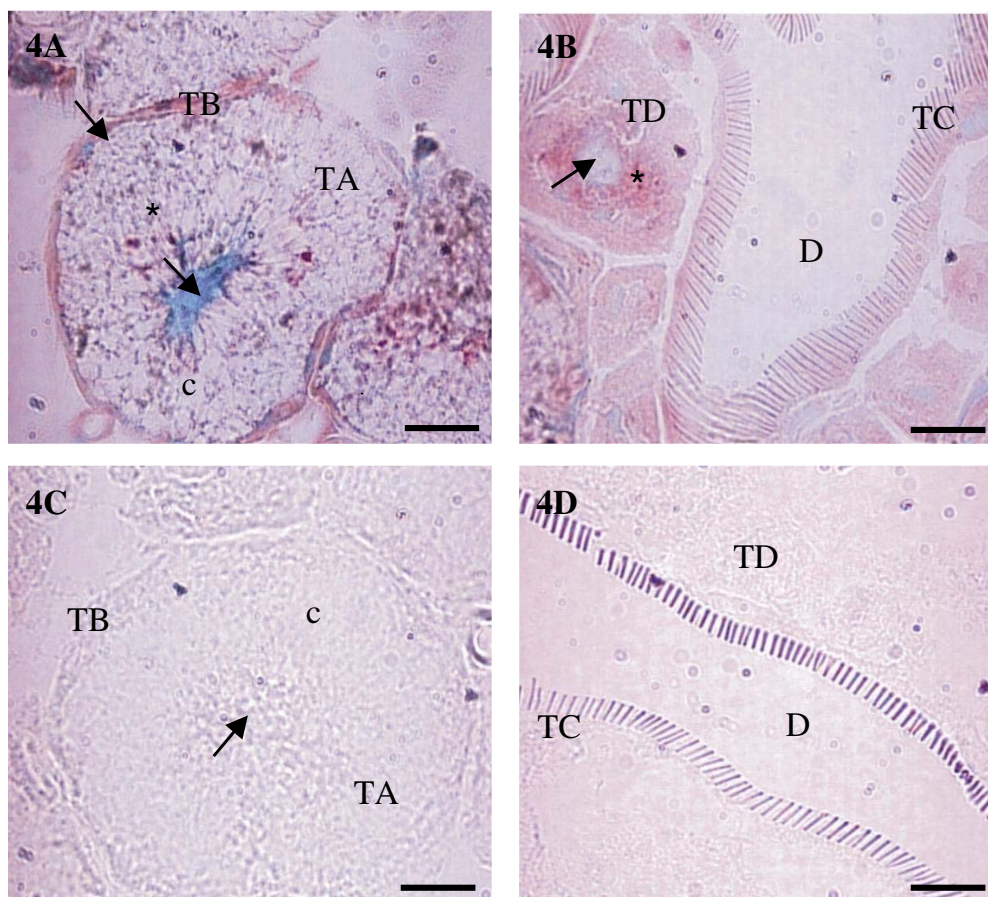


Figura 4: **A)** Reação para detecção de atividade de fosfatase ácida. Notar a presença de grânulos positivos (*) no citoplasma (C). Núcleo (seta), citoplasma (C), canalículo (ca). Células tipo B (TB) positivas. **B)** Região do duto coletor lateral (D2). Notar o acúmulo de grânulos positivos (*) na periferia do núcleo (seta) das células tipo C (TC). Células tipo D (TD) positivas. **C e D)** Reação para detecção de atividade de fosfatase alcalina. Todos os tipos celulares apresentaram reação negativa. Célula tipo A (TA), célula tipo B (TB), núcleo (seta), citoplasma (C), canalículo (ca), duto coletor lateral (D2), célula tipo C (TC), célula tipo D (TD). Barra = 20 μ m

DISCUSSÃO

As enzimas oxidativas presentes nas mitocôndrias como NADH-tetrazolio redutase (NADH-TR) e succinato desidrogenase (SDH) podem ser utilizada para mensurar os níveis do metabolismo energético (CHEN et al 2000).

A glândula salivar do tórax de *P. versicolor* apresentou reações positivas às técnicas enzimológicas para detecção de ATPase, NADH-TR, SDH, sendo diferente entre os tipos celulares.

As células TA apresentaram reação a ATPase, NADH-TR e SDH caracterizada pela presença de pequenos grânulos dispersos no citoplasma, sendo estes em maior número na região nuclear.

Estas células estão envolvidas na produção da secreção da glândula, que se apresenta rica em proteínas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos (ROCHA & CAETANO 2000). A reação positiva destas enzimas justifica a presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso; atuando na produção de ATP, fornecendo a energia necessária à manutenção da célula durante a síntese de proteínas (produção da secreção glandular).

No teste para NADH-TR os grânulos encontrados no citoplasma das células TA apresentaram-se em quantidade superior àquela apresentada pelo testes para SDH, o que revela a existência de outros sítios contendo a enzima, além das mitocôndrias, como o observado por Caetano (1998) para glândula pós-faríngea de formigas *Dinoponera australis*. Para o autor estes sítios corresponderiam àqueles contendo citocromo P450, envolvidos no metabolismo de lipídeos.

As células TB apresentaram reação intensa e homogênea, para as enzimas ATPase, NADH-TR e SDH. Tais resultados revelam a presença de grande quantidade de mitocôndria nas células TB, estando estas células, portanto, diretamente relacionadas aos processos oxidativos.

As ATPases atuam no transporte de íons, estando presentes também nas membranas. Como já descrito por Rocha & Caetano (2001) a membrana plasmática basal das células TB é rica em invaginações, estando estas associadas a mitocôndrias, o que intensifica a reação positiva à enzima. Provavelmente estas células estejam envolvidas nos processos de transformação da secreção produzida pelas células TA, atuando na remoção de água da secreção e na captação e retirada de íons, antes de sua eliminação pelos canalículos ao exterior. Tal fato é conhecido para as glândulas de seda presentes em larvas de Lepidoptera.

Nas células TC a reação foi homogênea e positiva para as enzimas ATPase, NADH-TR e SDH. No ducto 2 (D2) estas células não estão envolvidas nos processos de síntese de secreção da glândula ou modificação da mesma, sendo apenas responsáveis pela formação do epitélio dos dutos.

As células TD apresentaram reação positiva às enzimas ATPase, NADH-TR e SDH. Segundo Rocha & Caetano (2001) a membrana plasmática basal destas células também apresenta-se invaginada e associada a mitocôndrias, como observado nas células TB e TC do ducto 1. As células TD estão posicionadas na base dos dutos coletores laterais, estando possivelmente, relacionadas à modificação da secreção antes desta ser eliminada ao exterior, apresentando, portanto, função semelhante à célula TB.

As fosfatase alcalina e ácida podem ser encontradas em vários tecidos de insetos, como também em outros invertebrados e vertebrados (ANDERSON 1981). Estas enzimas estão relacionadas a processos bioquímicos fundamentais como os mecanismos de absorção e transporte (DAL PAI 1995).

Nas células TA da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* os grânulos de fosfatase ácida aparecem próximos ao núcleo e também dispersos por todo o citoplasma, como observado na glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (CAETANO 1998).

As reações para detecção de atividade de fosfatase ácida foram positivas para todos os tipos celulares. As marcações desta enzima, encontradas no citoplasma das células TA e TD, provavelmente estejam relacionadas à presença de lisossomos, os quais estariam atuando nos processos de digestão intracelular. Nas células TD a reação concentrou-se ao redor do núcleo.

Em *Apis mellifera* a atividade de fosfatase ácida foi observada nas microvilosidades das células epiteliais do intestino, bem como na porção basal destas células, sendo esta um indicativo de intensa atividade metabólica nestas células (GREGORC et al 1998), uma vez que as mesmas são responsáveis por secretarem enzimas digestivas e absorverem nutrientes (HARVEY & BLANKEMEYER 1975).

A presença de fosfatase ácida livre tem sido determinada enzimologicamente nos insetos em hemócitos (ARMBRUSTER et al 1986), em glândulas salivares em metamorfose (BOWEN & BOWEN 1990), intestino de larvas (DIMITRIADIS & KASTRITSIS 1985), em larvas durante processos de morte celular (SKELTON & BOWEN 1987). Esta associação não pode ser feita com as células da glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, pois os pseudoácinos apresentam-se íntegros nesta fase secretora.

Em insetos a atividade das fosfatases alcalinas foi detectada principalmente nas microvilosidades na lâmina basal do ventrículo de vespas *Myschocyttarus cerberus styx*, participando dos mecanismos de absorção e transporte de nutrientes (COSTA 2003 *com. pes.*).

Segundo Gouranton (1968) e Yadav & Karyakarte (1980) a presença de fosfatases alcalinas ao nível de concreções poderia estar, também, relacionada com mecanismos de esgotamento de reservas de glicogênio contíguas a tais estruturas. Nas células distais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, por exemplo, a atividade fosfatásica alcalina detectada em concreções laminares é sugerida como estando relacionada ao processo de calcificação dessas estruturas e/ou ao mecanismo de esgotamento de reservas de glicogênio (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO 1986).

Porém em *P. versicolor* as reações para detecção de atividade de fosfatase alcalina foram negativas para todos os tipos celulares da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* revelando que, nesta fase secretora, os mecanismos de absorção e transporte de água e íons não podem ser detectados pela fosfatase alcalina.

Tais resultados nos levam a concluir que as células TA atuam diretamente na produção da secreção salivar, sendo esta modificada pelas células TB e TD. No duto 2 as células TC atuam somente na condução da secreção. Os testes enzimológicos evidenciaram a atividade destas células, estando esta relacionada a metabolismos oxidativos e a metabolismos que requerem energia (ATP); como a síntese da secreção e os processos de digestão intracitoplasmática.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia celular e molecular**. 3^o Edição. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, 1994, 1294p.

ANDERSON, R.S. Comparative aspects of the structure and function of invertebrate and vertebrate leucocytes. In: RATCLIFFE, N.A. & ROWLEY, A.F. eds, **Invertebrate blood cells**. 1^o Edição. New York: Academic press, v.II, 1981, p.630-632.

ARMBRUSTER, L., LEVY, M., MATHIEU, M.N., BAUTZ, A.M. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v.84B, p.349-54, 1986.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., MELLO, M.L.S. Detecção de atividade fosfatásica alcalina em túbulos de malpighi de *Triatoma infestans* Klug. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.38, n.11, p.1870-1874, 1986.

BEARD, M.E., NOVIKOFF, A.B. Distribution of peroxisomes (microbodies) in the nephron of the rat: a cytochemical study. **The journal of cell biology**, [S.L.], v.42, p.501-518, 1969.

BOWEN, I.D., BOWEN, S.M. **Programmed cell death in tumors and tissues**. 1^o Edição, London: Chapman and Hall, 1990.

CAETANO, F.H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae)**. 1998. 137f. Tese (Livre docência): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

CHEN, G.; McWILLIAMS, M.L.; FECHTER, L.D. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in hair cells: a correlate for permanent threshold elevations. **Hear. Res.**, Amsterdam, v.145, p.91-100, 2000.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo Comparativo de algumas Glândulas de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e Respectivas Implicações Evolutivas. **Arq. Zool. São Paulo**, São Paulo, v.15, p.177-290, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; SAENZ, M.H.P. Estudo Comparativo de algumas Glândulas dos Vespoidea (Hymenoptera). **Papéis avulsos. Zool. São Paulo**, São Paulo, v.25, n.24, p.251-263, 1972.

DAL PAI, V. **Histoenzimologia: teoria e prática**. 1995. 59p. Apostila, Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 1995.

DIMITRIADIS, V.K., KASTRITSIS, C.D. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae - distribution of alkaline phosphatase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase, and glycogen. **Cytologia**, Tokyo, v.50, p.689-700, 1985.

GAMA, V. O. Sistema Salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1975), (Hymenoptera, Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.45, n.3, p.317-349, 1985.

GAMA, V.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo Comparativo das Glândulas dos Sistema Salivar de Formigas (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, v.7, p.145-165, 1982.

GOURANTON, J. Observations histochimiques et hisoenzymologiques sur le tube digestif de quelques homopteres cercopides et jassides. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v.14, p.569-579, 1986.

GREGORC, A., BOWEN, I.D., POGACNIK, A. Acid phosphatase activity in the midgut of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Apidologie**, Versailles, v.29, p.579-584, 1998.

HAERVEY, W.R., BLANKEMEYER, J.T. Epithelial structure and function, In: Maramorosch, K., Shope, R.E. eds. **Invertebrate Immunity**, 1^o Edição, New York: Academic Press, p.03-22, 1975.

LANDOLT, P.J.; AKRE, R.D. Ultrastructure of the Thoracic Gland of the Queens of the Western Yellowjacket *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.72, n.5, p.586-590, 1979.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 975p., 2002.

PAYNE, T.H., COHN, D.L., DAVIDSON, A.J., HENRY, T.D., SCHAEFER, J.W., GABOW, P.A. Marked elevations of serum alkaline phosphatase in patients with AIDS. **J. Acquired Immune Defic. Synd.**, [S.l], v.4, p.238-243, 1991.

ROCHA, T. CAETANO, F.H. Histoquímica da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hym.: Vespidae). **Braz. J. morphol. Sci, suppl.**, São Paulo, v.17, p.157, Abstract, 2000

ROCHA, T. CAETANO, F.H. Ultrastructure os salivary glands: thoracic gland of the *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Acta Microscopica, suppl. C**, Caracas, p.9-10, Abstract, 2001.

ROCHA, T. CAETANO, F.H. Ultramorfolgia e histologia da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v.32, n.4, p.585-590, 2003.

SADAVA, D.E. **Cell biology organelle structure and function**. 1ª Edição. London: Joner and Bartlett Publishers, 698p., 1993.

SAENZ, N.H.P; CRUZ-LANDIM, C. Glândulas do Sistema Salivar em Sphecidae (Hym.) **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.39, n.1, p.19-26, 1972.

SKELTON, J.K., BOWEN, I.D. The cytochemical localization and backscattered electron imaging of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing *Calliphora vomitoria* larvae. **Epithelia**, [S.l], v.1, p.213-223, 1987.

SPRADBERY, J. P. **Wasps: An account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. 1º Edição. Seattle: University of Washington Press, p.33-37, 1973.

STIGBRAND, T. Introduction and nomenclature. In: STIGBRAND T. AND FISHMAN W.H. eds., **Human Alkaline Phosphatase**, 1º Edição. New York: Alan R. Liss, p.19-23, 1984.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. 1º Reimpressão. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 931p., 2002.

YADAV, B.B., KARYAKARTE, P.P. Histochemical observations on phosphatase activity in the hepatopancreatic cells of *Lymnae auricularia* infected with *Gymnocephalus cercaria Cercaria Pigmentosa* Porter, 1938. **Rivista di Parasitologia**, [S.l], v.XLI, n.2, p.249-252, 1980.

5. Artigo 3

Caracterização histoquímica da glândula salivar do tórax de

Polistes versicolor (Olivier, 1791)

Hymenoptera: Vespidae

Thalita Rocha & Flávio Henrique Caetano

RESUMO

A glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* apresenta sua porção secretora formada por pseudoácinos, constituídos por uma célula central (TA) e células periféricas (TB). Os dutos coletores laterais, formados por células TC apresentam, em sua porção proximal, uma região diferenciada de células denominadas TD.

A reação às técnicas histoquímicas, PAS, Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e Azul de Toluidina para as células TA foi positiva. A secreção produzida é glicoprotéica e estas células apresentam-se em atividade nos indivíduos que desempenham os comportamentos de forrageamento, trofaláxis adulto-adulto, larva-adulto, alimentação das larvas e construção do ninho.

As células TB e TC mostraram resultados fracamente positivos, não apresentando vesículas ou grânulos no citoplasma. Ao que parece estas células não estão envolvidas nos processos de síntese, mas na modificação da secreção e condução da mesma ao exterior.

As células TD apresentaram reação fracamente positiva ao Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e Azul de Toluidina não sendo atribuída, a estas células, papel na produção da secreção. O resultado positivo ao PAS indica que estas células podem atuar modificando a secreção já produzida e/ou acrescentando novos compostos a mesma.

O desenvolvimento dos ovários não está relacionado ao ciclo de síntese da secreção. Porém está diretamente ligado ao estabelecimento da hierarquia de dominância e subordinação, uma vez que apresentam-se desenvolvidos nas fêmeas α .

Os resultados obtidos nos mostram que a secreção é produzida pelas células TA da glândula salivar do tórax de *P. versicolor* e a fase secretora varia entre as fêmeas subordinadas com idade entre 0 e 40 dias, e dominantes (70 e 92 dias) de acordo com as atividades desenvolvidas no ninho e ocorre durante toda a vida do indivíduo. Assim sendo, de acordo com os resultados histoquímicos da glândula entre as diferentes castas, pode ser atribuída a ela participação no forrageamento, na alimentação de todos os indivíduos da colônia (imaturos e imagos) e na construção do ninho, elaborando o pecíolo que o sustenta e as células que o formam, pois os indivíduos que realizavam comportamentos relacionados a estas atividades, apresentaram suas glândulas em alta atividade de síntese.

Palavras-chave: Vespidae, glândula salivar do tórax, histoquímica, comportamento, desenvolvimento ovariano.

INTRODUÇÃO

Polistes versicolor é uma das espécies mais difundidas na América do Sul, sendo comum em vários estados brasileiros, principalmente no estado de São Paulo (GOBBI & ZUCCHI 1980).

Segundo Reeve (1995), os ciclos das colônias de *P. versicolor* podem ser divididos em 4 fases: fase de fundação, fase de operária, fase reprodutiva e fase intermediária. Durante a fase de fundação, as jovens fêmeas reprodutoras iniciam as novas colônias, que podem ser formadas por apenas uma fêmea poedeira e fertilizada (haplometrose), ou por duas ou mais fêmeas poedeiras e fertilizadas, associadas (pleometrose) (EVANS 1958). Na segunda fase do ciclo emergem as primeiras “operárias” e na terceira fase, as fêmeas reprodutivas. Os machos só ocorrem posteriormente, na fase intermediária (REEVE 1995).

A vespa fundadora do ninho atua como fêmea dominante, sendo responsável pela construção do ninho e postura dos ovos, e as demais, fêmeas subordinadas, passam a desempenhar outras atividades, como forrageamento, alimentação das crias e defesa do ninho. O estabelecimento da fêmea dominante (rainha ou fêmea α) ocorre por relações de dominância desta fêmea sobre as demais. Assim sendo, as pupas não são separadas em rainha e operária, e a determinação das castas se dá somente após o nascimento, pelo próprio estabelecimento das mesmas na colônia (ZARA & BALESTIERI 2000).

As atividades de forrageamento incluem a obtenção de líquido, presa e fibra vegetal. O comportamento de trofaláxis adulto-adulto caracteriza-se pela transferência de alimento regurgitado (néctar) entre vespas adultas. Já na trofaláxis larva-adulto somente é considerado o oferecimento de secreção larval aos adultos, sendo verificado quando a vespa insere a cabeça em uma célula com larva e lá permanece por mais de 10 segundos. Alimentar as larvas consiste do oferecimento de alimento líquido ou presa macerada. A construção do ninho inclui os comportamentos de iniciar ou aumentar nova célula, macerar fibra vegetal e aplicar secreção ao ninho. O comportamento de dominância inclui vibrar o gáster sobre o ninho, ovoposição, ataque físico e confronto às demais fêmeas (WEST-EBERHARD 1986; ZARA & BALESTIERI 2000; GIANNOTTI 2002).

Por serem poucas as diferenças morfológicas entre fêmea dominante e as fêmeas subordinadas é a análise do comportamento, do desenvolvimento ovariano e do conteúdo da espermateca que nos permite distinguir as diferentes castas (EICKWORT 1969).

Os ovários de Hymenoptera foram classificados por Machado (1977) em: filamentosos (sem ovócitos maduros), ovários em início de desenvolvimento, desenvolvidos, bem desenvolvidos e muito desenvolvidos, possuindo estes 13 ou mais ovócitos maduros.

Em *P. versicolor* os ovários das fêmeas dominantes (α) apresentam-se muito desenvolvidos, com ovariolos longos e muitos ovócitos em amadurecimento no vitelário. Já as fêmeas subordinadas têm ovários pouco desenvolvidos, com ovariolos curtos e filamentosos, ou nada desenvolvidos (NASCIMENTO & CRUZ-LANDIM 1997).

Os testes histoquímicos são utilizados com o objetivo de detectar a composição química da secreção produzida pelas células. A reação de Feulgen é utilizada na detecção de DNA. Já as técnicas Azul de Toluidina e Verde de Metila Pironina Y são utilizadas na detecção diferenciada de DNA e RNA. Por estas técnicas é possível determinar a presença dos núcleos e seu formato, bem como a quantidade de RNA presente no citoplasma. (PEARSE 1985).

Em *Triatoma infestans* a reação de Feulgen foi utilizada para mensurar os valores de DNA nos túbulos de Malpighi de ninfas e adultos, em diferentes idades (MELLO & RAYMUNDO 1977).

As reações negativas revelam a ausência dos componentes químicos analisados pelas técnicas. Grânulos encontrados no citoplasma das “spherule cells” de baratas (Dictyoptera), quando submetidos à reação de Feulgen apresentaram-se negativos, evidenciando que estes não eram formados por DNA como se acreditava (GUPTA & SUTHERLAND 1967).

Algumas técnicas são utilizadas para determinar a presença de proteínas, como Azul de Bromofenol e Ninhydrina Schiff. Mucossubstâncias, como glicoconjugados e o glicogênio, podem ser evidenciadas pela reação com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) (PEARSE 1985).

Estudos realizados em órgãos emissores de luminescência em *Photinus pyralis* (Coleoptera) revelaram a presença de enzimas respiratórias, evidenciadas pelas técnicas enzimológicas succinato desidrogenase e ATPase, como também glicogênio, presente na camada refletora. A presença diferenciada de RNA e proteínas pode ser observada nas células da camada refletora e na camada fotogênica (STREHLER et al 1967).

Os Hymenoptera, como outros insetos, apresentam estruturas glandulares embrionariamente ligadas às peças bucais que constituem o sistema salivar, sendo estas as glândulas mandibulares, hipofaríngeas, salivar do tórax e pós-faríngea, esta última exclusiva de formigas (GAMA 1985; CAETANO et al 2002).

A morfologia da glândula salivar do tórax é variada, podendo ser as unidades secretoras tubulares, pseudotubulares e alveolares. Em *P. versicolor*, a glândula salivar do tórax é do tipo alveolar, apresentando-se constituída de pseudoácinos, sendo estes formados por uma célula central (TA), envolta por células periféricas (TB). A secreção produzida é eliminada ao exterior por um sistema de dutos. Na base dos dutos coletores laterais há uma porção diferenciada de células (TD), sem função definida. Tais aspectos se mantêm nas diferentes castas da colônia (ROCHA & CAETANO 2003).

A secreção produzida pela glândula salivar do tórax pode ser associada à diluição e lubrificação do alimento, à construção do ninho (SPRADBERY 1973); auxiliando no processo de maceração das fibras vegetais para a construção das células do ninho, atuando como “cola”, mantendo unidas as paredes destas células, e como material formador do pecíolo que o sustenta (LANDOLT & AKRE 1979). Entretanto, estas funções atribuídas à glândula salivar do tórax não foram ainda comprovadas.

Em *P. versicolor* a observação auxilia a interpretação dos resultados relacionados à caracterização histoquímica e a determinação do ciclo secretor da glândula salivar do tórax, bem como das demais glândulas do sistema salivar, uma vez que não apresentam castas claramente definidas. Estas glândulas estão diretamente ligadas às atividades comportamentais apresentadas pelos Hymenoptera sociais, como produção de feromônios, alimentação das crias, construção e manutenção do ninho (SPRADBERY 1973).

Nas operárias de abelha *Trigona recursa* a glândula salivar apresentou reação positiva para o Azul de Bromofenol, o que caracteriza sua secreção como protéica. Em operárias recém emergidas, nutridoras e campeiras de *T. recursa*, *T. spinipes* e *T. hypogea* esta glândula apresentou reação positiva, com relação à técnica de PAS + Alcian Blue, para o citoplasma, evidenciando assim a presença de agrupamento 1-2 glicol na secreção. Em *Xylocopa frontalis*, a glândula salivar também apresenta grânulos protéicos na secreção (CAVASIN-OLIVEIRA 1995).

As células que formam os dutos coletores da glândula salivar de *T. recursa* e *X. frontalis* apresentaram-se positivas para as técnicas Azul de Bromofenol e PAS + Alcian Blue (CAVASIN-OLIVEIRA 1995).

Tendo em vista os resultados apresentados em tecidos de insetos, como também em glândulas salivares de outros Hymenoptera e a presença de diferentes tipos celulares na glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, o presente trabalho tem o objetivo de investigar, por meio de testes histoquímicos, a natureza química da secreção destas células nas diferentes castas da colônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise histoquímica:

Fêmeas adultas de *P. versicolor* foram coletadas em Rio Claro (22°24'36"S, 47°33'36"W) - São Paulo - Brasil, anestesiadas a baixa temperatura (4°C), e dissecadas diretamente em solução Paraformaldeído 4%, sendo as glândulas salivares do tórax obtidas mantidas nesta solução por 2 horas.

Posteriormente as glândulas foram submetidas à solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4 - 0,1M) por 24 horas, desidratadas em etanol e incluídas em historesina Leica. Os blocos foram cortados (5µm) em micrótomo Leica RM 2145 e as lâminas obtidas processadas de acordo com as técnicas histoquímicas a seguir.

Reação de Feulgen (F): método para DNA (FEULGEN & ROSSENBECK 1924 apud PEARSE 1985)

As lâminas foram tratadas com HCl 2N, por 45 minutos, lavadas em água destilada, por 5 minutos, e submetidas ao ácido periódico de Schiff (1,5g de fucsina básica, 4,5g de metabissulfeto de potássio, 300mL de água, 1g de carvão ativado, 45mL de HCl), por 1 hora no escuro. Em seguida lavadas em água corrente e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ Resultado: DNA corado em rosa-avermelhado.

Ácido Periódico de Schiff (PAS): método para glicoconjugados (PEARSE 1951 apud PEARSE 1985)

As lâminas foram tratadas com ácido periódico 1%, por 3 minutos, lavadas em água destilada e submetidas ao reagente de Schiff (1,5g de fucsina básica, 4,5g de metabissulfeto

de potássio, 300mL de água, 1g de carvão ativado, 45mL de HCl), por 15 minutos, no escuro. Estas foram lavadas em água corrente, por 15 minutos, e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ Resultado: estruturas ricas em grupos SS, hexoses contendo mucossubstâncias 1,2-glicol e o glicogênio são corados em rosa forte a magenta.

Azul de Bromofenol (Abr): proteínas básicas (BLOCH & HEW 1960 apud PEARSE 1985)

As lâminas foram tratadas com solução de azul de bromofenol, por 1 hora, lavadas por 4 minutos, em solução de ácido acético 5%. Posteriormente lavadas em água corrente para montagem com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ Resultado: proteínas básicas do núcleo e citoplasma são coradas em azul ou vermelho.

Ninhydrina-Schiff (NS): método para proteínas NH_2 (YASUMA & ITCHIKAWA 1953 apud PEARSE 1985)

As lâminas foram submetidas à solução aquosa de ninhydrina (0.5%), a 37°C, por 20 minutos, sendo lavadas em água corrente por 5 minutos. Após a secagem, as lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff (1,5g de fucsina básica, 4,5g de metabissulfeto de potássio, 300mL de água, 1g de carvão ativado, 45mL de HCl), por 25 minutos, a temperatura ambiente, novamente lavadas em água corrente (10 minutos), e posteriormente montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ Resultado: proteínas que contenham um número suficiente de grupos NH_2 reativos são coradas em vermelho-rosado a magenta.

Azul de Toluidina (AT): método para DNA e RNA (FEDER & WOLF 1965 apud PEARSE 1985)

Primeiramente as lâminas foram hidratadas e submetidas à solução de azul de toluidina 1% (1g de azul de toluidina, 1g de borato de sódio, 1mL de álcool absoluto,

100mL de água destilada), por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada para posterior montagem com Bálsamo do Canadá sintético.

❖ Resultado: DNA corado em azul escuro (não metacromático) e o RNA em roxo claro.

Análise do desenvolvimento ovariano:

Os ovários das vespas coletadas foram dissecados e mantidos em solução de Dietrich (30mL de álcool 96%, 10mL de formaldeído, 2mL de ácido acético, 60mL de água destilada) para posterior análise e classificação de acordo com o estabelecido por Machado (1977), para Hymenoptera e verificado por Nascimento & Cruz-Landim (1997), para *P. versicolor*.

Análise comportamental:

Primeiramente cada indivíduo recém emergido foi coletado do ninho, anestesiado rapidamente sob baixa temperatura e pintado com tinta para aerodelismo Testors, na região central do tórax, com uma cor ou mais cores combinadas (anexo 1).

Foram marcados e observados 218 espécimes ao longo do experimento, mas apenas 30 destes puderam ser aproveitados para as análises da glândula salivar do tórax, devido ao desaparecimento da maioria durante as atividades de forrageamento.

Com todas as vespas do ninho marcadas foram iniciadas as observações para análise comportamental. Tendo como base os trabalhos de Zara & Balestieri (2000) e Giannotti (2002), um repertório de atividades foi estabelecido e cada indivíduo foi rigorosamente acompanhado. Foram consideradas as atividades de forrageamento, trofalaxis adulto-adulto e larva-adulto, receber e/ou macerar presa, alimentar larva, construção, comportamentos de dominância, subordinação e permanecer imóvel no ninho.

O ninho foi observado diariamente por 3 meses, sendo os indivíduos coletados em idades diferentes, a fim de se analisar a glândula salivar do tórax.

Durante as observações dos comportamentos foram computados os tempos individuais em horas e a frequência diária dos comportamentos realizados por cada indivíduo foi calculada (frequência diária = n° total de comportamentos x 24 / tempo total observado em horas).

Com as frequências definidas montou-se uma tabela de contingência, onde, a partir dos valores observados, foram calculados os valores esperados e os valores de qui-quadrado (ZAR 1999), para determinar estatisticamente, quais comportamentos se sobressaíram entre as vespas, e quais eram realizados com frequência abaixo do esperado (anexo 2).

O teste de qui-quadrado não foi realizado nos indivíduos recém emergidos (0 dias), uma vez que não tiveram seus comportamentos analisados, porém foram considerados importantes para o presente estudo (anexo 2).

RESULTADOS

Análise histoquímica:

Para melhor compreensão veja as tabelas 1 e 2 antes da leitura dos resultados.

A figura 1 revela a morfologia do núcleo das células TA e TB, nos indivíduos recém-emergidos (figura 1A) e em atividade secretora (figura 1B).

De acordo com a quantidade de secreção presente nas células da glândula salivar do tórax, estas foram agrupadas em: sem secreção (reação negativa), com pouca secreção (reação fracamente positiva), com secreção moderada (reação positiva) e com muita secreção (reação fortemente positiva).

Célula TA:

Histoquímica para PAS: no citoplasma, os indivíduos (3) **A**, **V** e **W** não apresentaram reação (figura 2A). Outros indivíduos (2) apresentaram reação fracamente positiva, **B**, **R** (figura 2B); (24) positiva **C**, **D**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **K**, **L**, **M**, **N**, **O**, **P**, **Q**, **S**, **T**, **U**, **X**, **Y**, **Z**, **AB**, **AC**, **AD**, **AE** (figura 2C) e fortemente positiva, **E** (figura 2DA).

Relação com a atividade comportamental: apesar de possuírem idades diferentes, os indivíduos **A** (0 dias), **B** (0 dias), **R** (25 dias) e **V** (27 dias) não realizavam atividades no ninho. Já o indivíduo **W** (33 dias), apresentou valores significativos para as atividades de forrageamento, trofaláxis adulto-adulto e alimentação das larvas.

A maioria dos indivíduos, com idade variando entre 0 a 92 dias, apresentou resultados positivos para a técnica. Tendo estes realizado comportamentos diversos, como trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto, forrageamento, alimentação das larvas, construção. Entretanto a maior concentração de secreção foi observada no indivíduo **E** (0 dias).

Histoquímica para Azul de Bromofenol: no citoplasma, o indivíduo **A** (0 dias) não apresentou reação, sendo esta fracamente positiva na região nuclear (figura 3A). Os indivíduos (3) **U, Y, Z** apresentaram reação fracamente positiva no citoplasma e positiva para o núcleo (figura 3B); (25) **B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, Q, R, S, T, V, W, X, AB, AC, AD, AE** positiva no citoplasma e fortemente positiva na região nuclear (figura 3C) e **P** fortemente positiva para o núcleo e citoplasma (figura 3D).

Relação com a atividade comportamental: nos indivíduos em que a reação caracterizou-se fracamente positiva, as idades foram respectivamente 26, 27 e 38 dias, tendo somente o indivíduo **U** realizado comportamento de trofaláxis adulto-adulto.

Nas vespas em que a reação foi positiva, as idades variaram de 0 a 92 dias sendo os comportamentos realizados os mesmos apresentados pelos indivíduos em que as células TA mostraram-se positivas ao PAS.

Histoquímica para ninhydrina Schiff: para o citoplasma, a vespa **A** (0 dias) apresentou resultado negativo (figura 4A), muito semelhante ao da vespa **Y** (35 dias) (figura 4B). Ambas apresentaram resultado fracamente positivo para a região do núcleo.

Nos demais indivíduos (25) **B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, Z, AB, AC, AD** a reação foi positiva para o núcleo e citoplasma (figura 4C). Em (3) **M, W, AE** a reação foi fortemente positiva para o núcleo e citoplasma (figura 4D).

Relação com a atividade comportamental: a maioria das vespas com idade entre 0 e 70 dias apresentou resultado positivo, sendo estes: **B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, Z, AB, AC** e **AD**. Estas realizaram comportamento como trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto, forrageamento, alimentação das larvas e construção. Nas vespas **M** (10 dias), **W** (33 dias) e **AE** (92 dias) a reação foi fortemente positiva. Apenas as vespas **W** e **AE** realizaram atividades no ninho, sendo forrageamento, trofaláxis adulto-adulto e alimentação das larvas, para **W**; construção e dominação para **AE**.

Histoquímica para Azul de Toluidina: os indivíduos (5) **C, D, E, Z, U**, apresentaram reação positiva para o núcleo e citoplasma (figura 5C e 5D). Já os indivíduos (25) apresentaram **A, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, W, Z, Y, AB, AC,**

AD e **AE** apresentaram reação fortemente positiva para o núcleo e positiva para o citoplasma (figura 5A e 5B).

Relação com a atividade comportamental: todos os indivíduos apresentaram reação positiva para o citoplasma e estiveram envolvidos nas atividades de forrageamento, trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto, alimentação das larvas e construção.

Célula TB, TC e TD:

A figura 6A indica a morfologia do núcleo das células TC e TD.

As células TB (figura 2, 3, 4 e 5) e TC (figura 6) apresentaram resultados fracamente positivos para o citoplasma de todos os indivíduos nas técnicas PAS, Azul de bromofenol, Ninhydrina Schiff. Para a técnica Azul de Toluidina as células TB apresentaram-se positivas para todos os indivíduos, exceto **U**, que apresentou-se fracamente positivo (figura 5D) assim como a célula TC em todos os indivíduos.

Nas células TD, o resultado para técnica PAS foi positivo para todos os indivíduos, apresentando os indivíduos **F, G, J, L, W, AD** (figura 6E) um maior acúmulo de grânulos no citoplasma. Para as técnicas Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e Azul de Toluidina, as células TD apresentaram citoplasma fracamente positivo (figura 6B, 6C e 6D).

Os núcleos das células TB, TC e TD apresentaram-se negativos para PAS, fracamente positivos para Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e positivos para Azul de Toluidina.

Análise do desenvolvimento ovariano:

Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Os indivíduos **A, C, E, J, K, N, O, P, Q, S, U, V, X, Z, AB**, com idade entre 0 e 40 dias, apresentaram ovários filamentosos. Já os indivíduos **B, D, F, G, H, I, R, T, W, Y** (de 0 a 35 dias), apresentaram ovários em início de desenvolvimento.

Os demais indivíduos apresentaram ovário variando entre desenvolvidos **L, M**, (10 dias) e muito desenvolvidos **AC, AD** (70 dias) e **AE** (92 dias).

Análise comportamental:

Os comportamentos analisados, de cada indivíduo, foram totalizados e calculadas suas frequências diárias. O valor do teste de qui-quadrado obtido foi de 3058,6 (gl=192 $p < 0,01$), o que revela que há uma relação significativa entre algumas vespas e alguns comportamentos (anexo 2).

Para estabelecer as associações das vespas entre os comportamentos todos os valores de qui-quadrado foram analisados individualmente. Com os maiores valores individuais (valores significativos) definidos pode-se definir as associações positivas e negativas entre cada vespa e cada comportamento.

As vespas recém emergidas (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**) não tiveram os comportamentos observados e as principais tendências comportamentais das demais vespas puderam ser identificadas por meio dos maiores valores de qui-quadrado referentes a cada comportamento. Assim, os indivíduos foram agrupados por afinidade de comportamentos: **G** (7 dias), **K** (9 dias), **N** (15 dias), **S** (26 dias), **W** (33 dias), apresentaram valores significativos de qui-quadrado para os comportamentos de forrageamento e alimentação (receber e/ou mastigar presa, alimentar a larva, trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto). Já os indivíduos **F** (7 dias), **P** (18 dias) e **U** (26 dias) apresentaram valores significativos de qui-quadrado apenas às atividades de alimentação. O indivíduo **J** (9 dias) apresentou valores significativos de qui-quadrado para as atividades de forrageamento e construção (anexo 2).

tiveram frequências semelhantes para os mesmos comportamentos. Entretanto, a maior parte das vespas apresentou variações específicas de modo a não poderem ser agrupadas (anexo 2).

Os indivíduos **Q** (20 dias), **R** (25 dias), **Y** (35 dias), **Z** (38 dias) e **AB** (40 dias) apresentaram associação negativa com o comportamento de permanecer imóvel, porém não se apresentaram relacionados a nenhuma atividade comportamental específica. Já os indivíduos **H** (8 dias), **I** (8 dias), **L** (10 dias), **M** (10 dias), **O** (18 dias), **T** (26 dias), **V** (27 dias), **X** (35 dias), apresentaram valores significativos de qui-quadrado para o comportamento de permanecer imóvel, não tendo realizado, de forma significativa, qualquer outra atividade no ninho (anexo 2).

Os indivíduos **AC** (70 dias), **AD** (70 dias) e **AE** (92 dias) apresentaram valores significativos de qui-quadrado para o comportamento de dominância (anexo 2). **AC** e **AD**

eram indivíduos dominantes que perderam a posição de fêmea dominante (α), mas continuaram a viver no ninho. Tal fato pôde ser percebido no caso do indivíduo **AC**, quando este ausentou-se do ninho por alguns dias ocorrendo sua substituição natural como fêmea α por uma fêmea β . Já para o indivíduo **AE** o fator idade (92 dias) pode ter sido o responsável por sua substituição. Entre as dominantes a vespa **AE** apresentou o maior valor de qui-quadrado para o comportamento de construção.

Tabela 1: Testes histoquímicos aplicados à glândula salivar do tórax de *P. versicolor* em todos os indivíduos analisados. Os resultados apresentados são referentes à região nuclear.

	TA	TB	TC	TD
	Todos	Todos	Todos	Todos
-				
+	0	0	0	0
++	0	0	0	0
+++	0	0	0	0
-	0	0	0	0
+	A	Todos	Todos	Todos
++	U, Y, Z	0	0	0
+++	B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, W, X, AB, AC, AD, AE	0	0	0
-	0	0	0	0
+	A, Y	Todos	Todos	Todos
++	B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, Z, AB, AC, AD	0	0	0
+++	M, W, AE	0	0	0
-	0	0	0	0
+	0	0	0	0
++	C, D, E, U, Z	Todos	Todos	Todos
+++	A, B, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, AB, AC, AD, AE	0	0	0

As letras correspondem a cada indivíduo. Nenhum indivíduo (0), todos os 30 indivíduos analisados (Todos).
Reação negativa (-), fracamente positiva (+), positiva (++) , fortemente positiva (+++).

Tabela 2: Testes histoquímicos aplicados à glândula salivar do tórax de *P. versicolor* em todos os indivíduos analisados. Os resultados apresentados são referentes ao citoplasma.

		TA	TB	TC	TD
	-	A, V, W	0	0	0
	+	B, R	Todos	Todos	0
PAS	++	C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, S, T, U, X, Y, Z, AB, AC, AD, AE	0	0	Todos
	+++	E	0	0	0
	-	A	0	0	0
	+	U, Y, Z	Todos	Todos	Todos
AZUL DE BROMOFENOL	++	B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, Q, R, S, T, V, W, X, AB, AC, AD, AE	0	0	0
	+++	P	0	0	0
	-	A	0	0	0
	+	Y	Todos	Todos	Todos
NINHYDRINA SCHIFF	++	B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, Z, AB, AC, AD	0	0	0
	+++	M, W, AE	0	0	0
	-	0	0	0	0
	+	0	U	Todos	Todos
AZUL DE TOLUIDINA	++	Todos	Todos (exceto U)	0	0
	+++	0	0	0	0

As letras correspondem a cada indivíduo. Nenhum indivíduo (0), todos os 30 indivíduos analisados (Todos).
Reação negativa (-), fracamente positiva (+), positiva (++) , fortemente positiva (+++).

Tabela 3: Análise do desenvolvimento ovariano dos indivíduos de *P. versicolor* analisados.

Tipo de ovário	Indivíduos
Filamentoso	A, C, E, J, K, N, O, P, Q, S, U, V, X, Z, AB
Início de desenvolvimento	B, D, F, G, H, I, R, T, W, Y
Desenvolvido	L, M
Muito desenvolvido	AC, AD, AE

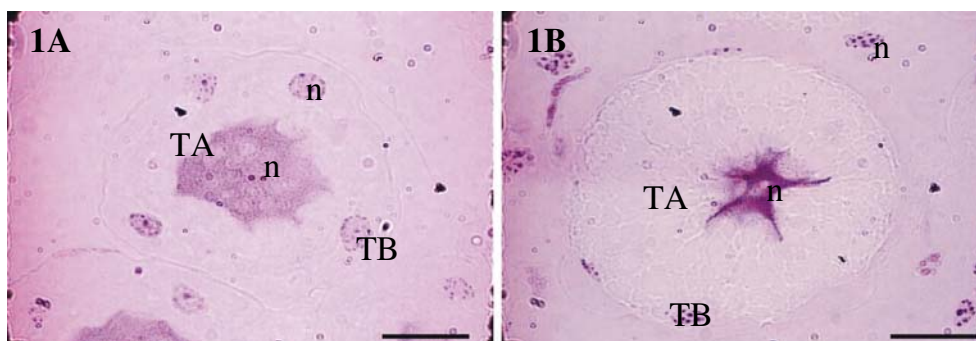


Figura 1: Reação de Feulgen. **A)** Indivíduos recém emergidos. Notar o aspecto arredondado do núcleo (n) da célula tipo A (TA) e das células tipo B (TB). **B)** Indivíduos nos quais a síntese da secreção já estava em andamento. Notar o aspecto estrelado do núcleo (n) da célula tipo A (TA) e que a morfologia dos núcleos nas células tipo B (TB) não se altera.

Barra = 10 μ m

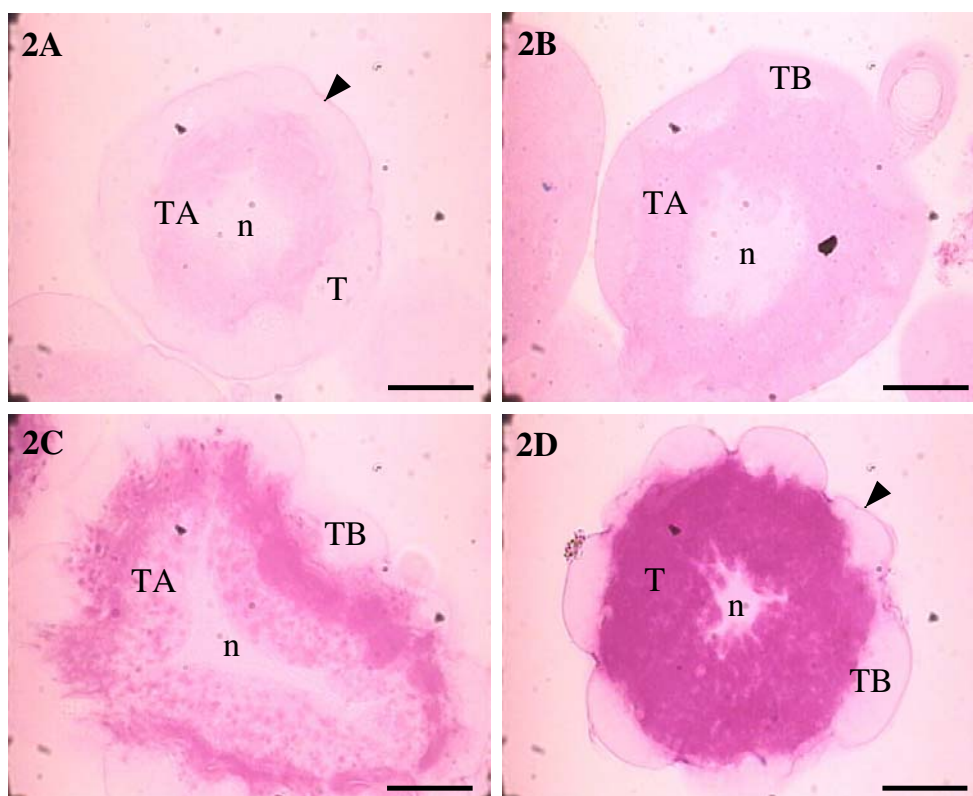


Figura 2: Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A)** Indivíduos (A, V, W) onde não se nota a presença de secreção no citoplasma das células tipo A (TA) e tipo B (TB). **B a D)** Indivíduos adultos de 0 a 92 dias onde é possível observar o aumento progressivo da secreção no citoplasma das células tipo A (TA). Entretanto as células tipo B (TB) não alteram seu conteúdo citoplasmático, apresentando resultado homogêneo e fracamente positivo. Notar em **A** e **D** a lâmina basal (cabeça de seta) com reação mais forte que o citoplasma. Núcleo (n).

Barra = 10 μ m

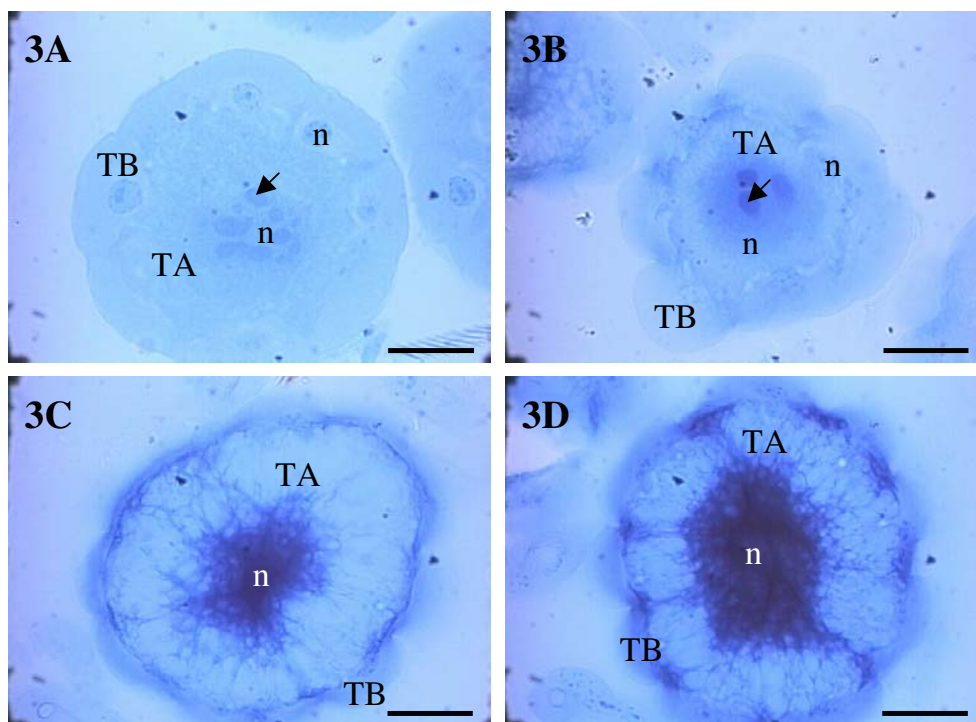


Figura 3: Azul de Bromofenol (Abr). **A)** Indivíduos recém emergidos podendo-se notar a ausência de grânulos de secreção protéicos nas células tipo A (TA) e tipo B (TB). **B a D)** Indivíduos adultos de 0 a 92 dias mostrando a diferença de concentração dos grânulos secretores protéicos nas células tipo A (TA). As células tipo B (TB) apresentam resultado fracamente positivo e homogêneo. Núcleo (n), nucléolo (seta).

Barra = 10 μ m

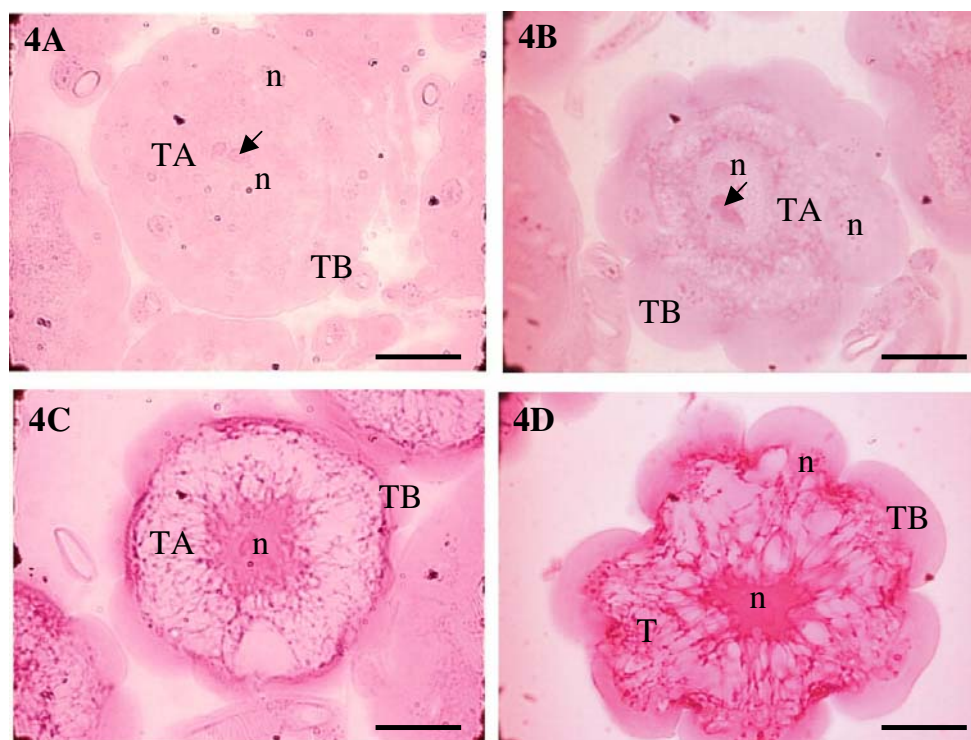


Figura 4: Ninhydrina Schiff (NS). **A)** Indivíduo recém emergido sem grânulos de secreção protéicos nas células tipo A (TA) e tipo B(TB). **B)** Indivíduo Y em que pode se notar o início do acúmulo de secreção. **C)** Indivíduos adultos de 0 a 70 dias com a diferença de concentração dos grânulos secretores protéicos nas células tipo A (TA). As células tipo B (TB) apresentam resultado homogêneo. **D)** Indivíduos (M, W, AE) onde reação é fortemente positiva no citoplasma da célula TA. Núcleo (n), nucléolo (seta).

Barra = 10µm

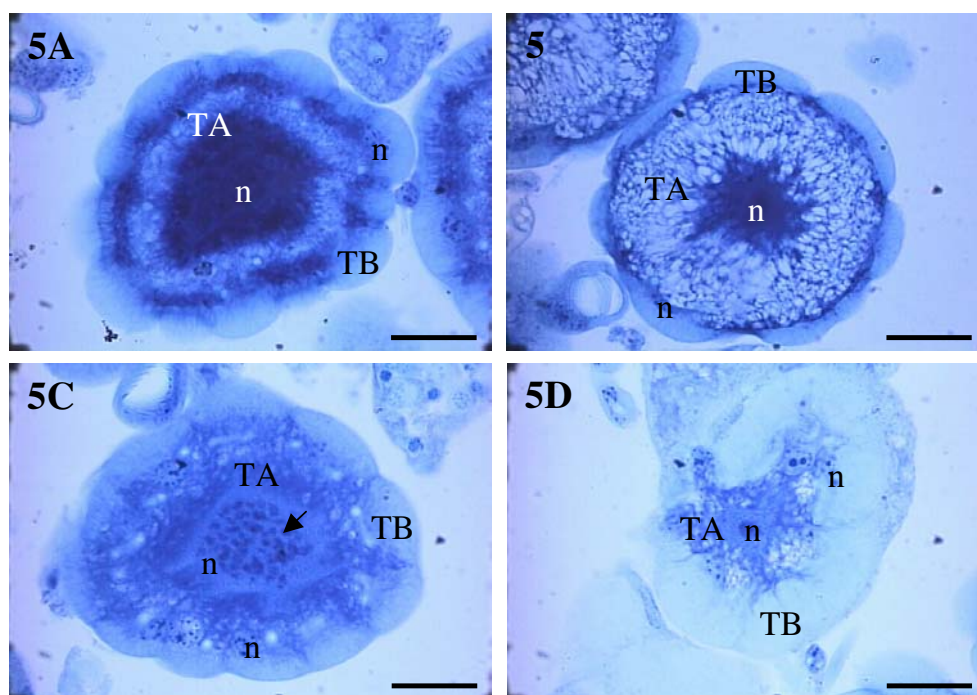


Figura 5: Azul de Toluidina (AT). **A e B)** Indivíduos de 0 a 92 dias onde observa-se reação fortemente positiva na região nuclear e positiva no citoplasma. Notar que os grânulos em **B** correspondem aos sítios positivos de Azul de Bromofenol e Ninhydrina Schiff, evidenciando também a presença de RNA. **C)** Indivíduos (C, D, E, Z) com reação positiva no núcleo e citoplasma. **D)** Indivíduo (U) onde a reação é positiva para a célula TA e fracamente positiva para a célula TB. Todos os indivíduos, exceto U, apresentam reação positiva para as células TB. Núcleo (n), nucléolo (seta).

Barra = 10 μ m

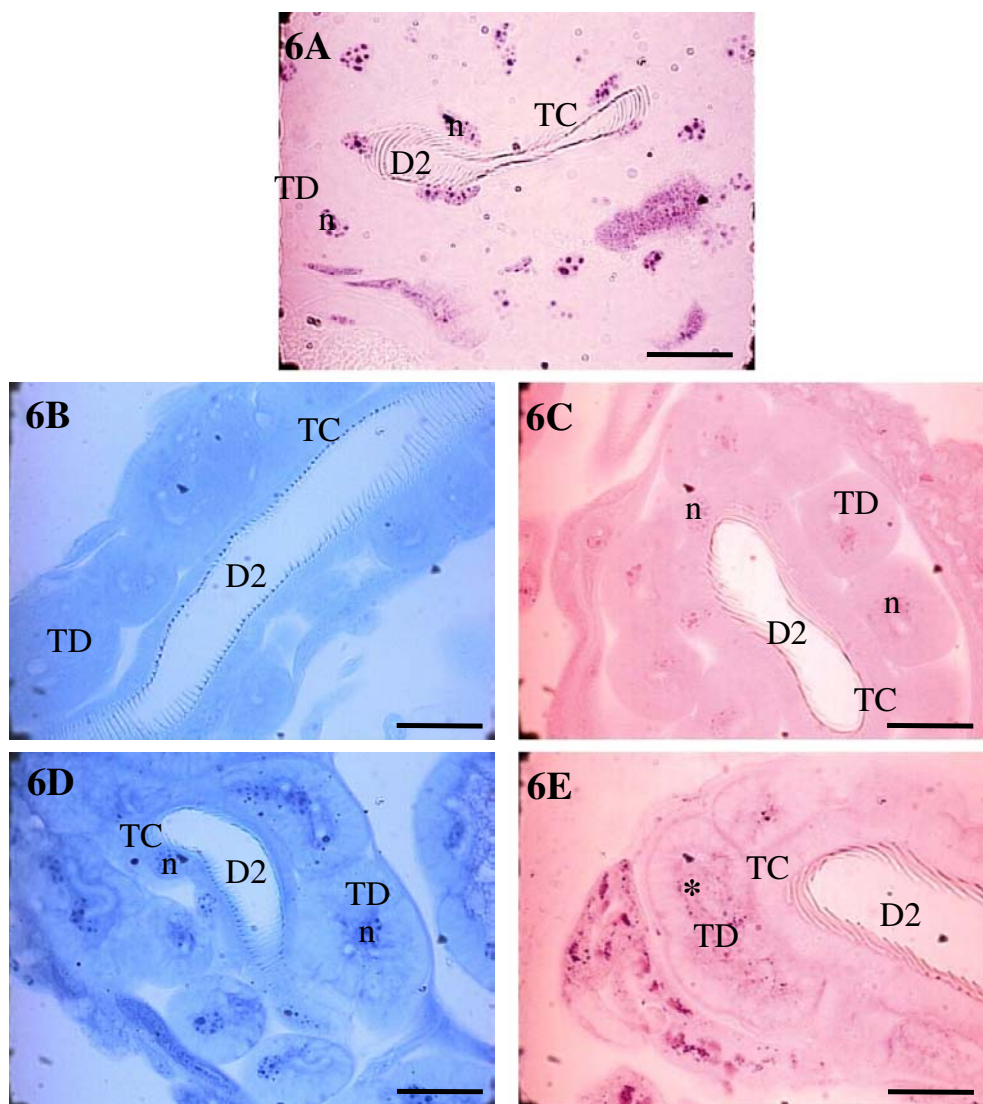


Figura 6: Região do duto 2 (D2) onde é possível observar o aspecto das células TC e TD. **A)** Reação de Feulgen. **B)** Azul de Bromofenol (Abr). **C)** Ninhydrina Schiff (NS). **D)** Azul de Toluidina (AT). **E)** Ácido Periódico de Schiff (PAS). Notar a presença de grânulos PAS positivos (*) no citoplasma das células TD. A reação às demais técnicas foi fracamente positiva para ambos os tipos celulares. Núcleo (n).

Barra = 10 μ m

DISCUSSÃO

Em estudos comportamentais realizados com *P. lanio* (GIANNOTTI & MACHADO 1999) e *P. versicolor* (ZARA & BALESTIERI 2000) não foram encontradas atividades definidas por faixa etária, ocorrendo grande plasticidade comportamental. Tal plasticidade comportamental também foi observada no presente trabalho.

O desenvolvimento da glândula salivar do tórax em *P. versicolor* apresentou-se variado em vespas com a mesma idade, e em outros casos, apresentou-se semelhante em vespas com idades diferentes, sendo constatado que as glândulas mais desenvolvidas estavam presentes nas idades entre 07 e 92 dias, portanto quase a vida toda. Entretanto, a variação na concentração da secreção entre vespas nesta faixa etária pode estar relacionada a alguma atividade social. Isto pode ocorrer já que a distribuição das atividades comportamentais observadas não está ligada à idade das vespas, de modo que, se a glândula salivar do tórax estiver relacionada a alguma função social, esta não vai apresentar desenvolvimento relacionado a fatores temporais.

Em estudo realizado com *P. versicolor*, ROCHA & CAETANO 2003, observaram a ultramorfologia e a histologia da glândula salivar do tórax e não estabeleceram diferenças entre as castas da colônia. Porém, no atual estudo, foi observada a relação entre a produção da secreção e alguns comportamentos dos indivíduos.

É importante ressaltar que nem todas as atividades das vespas puderam ser analisadas, principalmente quando estas estavam forrageando. Assim, o comportamento das vespas fora do ninho também poderia influenciar no desenvolvimento da glândula salivar do tórax, explicando o fato de alguns casos não se encaixarem em tais relações.

Nos indivíduos em que a reação nas células TA foi positiva ou fortemente positiva para a técnica PAS, a secreção apresentou-se na forma de vesículas dispersas por todo o citoplasma. Estas vesículas, inicialmente, acumularam-se na periferia das células atingindo posteriormente a região próxima ao núcleo. Nas células TB e TC, em que a reação foi fracamente positiva esta se deu de forma homogênea em todo o citoplasma. Nas células TD a secreção apresentou-se também na forma de vesículas.

Já nas técnicas Azul de Bromofenol e Ninhydrina Schiff, exceto para o indivíduo A que não apresentou reação nas células TA, a secreção acumulou-se inicialmente na região próxima ao núcleo, atingindo a periferia da célula. Em todo o citoplasma a secreção protéica apresentou-se na forma de grânulos dispostos entre as vesículas contendo

glicoconjugados. Nas células TB, TC e TD a reação às técnicas foi fracamente positiva e homogênea em todo o citoplasma.

As células TA apresentaram grande concentração de ácidos nucléicos no citoplasma (técnica Azul de Toluidina), o que demonstra, de forma indireta, a presença de retículo endoplasmático rugoso. A região onde se encontram os compostos protéicos é semelhante à região onde são detectadas as altas concentrações de ácidos nucléicos no citoplasma.

A presença de compostos glicoconjugados e protéicos revelam que a natureza da secreção produzida é glicoprotéica e são as células TA responsáveis por esta produção. As células TB e TC não atuam na produção da secreção e podem estar relacionadas à modificação da mesma. Já as células TD poderiam atuar produzindo novos elementos a serem acrescentados à secreção antes de sua saída. Entretanto testes bioquímicos seriam necessários para tal confirmação.

Alguns estudos têm demonstrado que a composição da secreção oral produzida por *Ropalidia* (*Ropalidiini*), *Protopolybia* (*Epiponini*) e outras vespas do gênero *Polistes* (*Polistini*) é basicamente protéica (SCHREMMER et al 1985; KUDÔ et al 1998). Estes fatos concordam com os nossos resultados.

A secreção produzida pelas glândulas labiais de larvas de *Apis mellifera* é rica em proteínas e glicoconjugados (SILVA 1999), como também observado em larvas de *Pachychondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (ZARA 1998), *Scaptotrigona postica* (PETRALIA et al 1980), *Scaptotrigona invicta* (CRUZ-LANDIM & MELLO 1981).

Nas operárias de abelha *Trigona recursa* e *Xylocopa frontalis*, a glândula salivar do tórax apresentou reação positiva para Azul de Bromofenol como em *P. versicolor*, embora nestas espécies de abelha a porção secretora da glândula seja tubular e formada por epitélio de células cúbicas sem diferenciação entre elas. Em *X. frontalis* estes grânulos se dispõem ao redor dos canalículos (CAVASIN-OLIVEIRA 1995), já em *P. versicolor* os grânulos estão entre as vesículas de secreção contendo glicoconjugados. Como pode ser visto as proteínas básicas estão presentes na secreção da glândula salivar de todos os Hymenoptera já estudados.

A glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, assim como nas operárias recém emergidas, nutridoras e campeiras de *T. recursa*, *T. spinipes*, *T. hypogea* e *X. frontalis* (CAVASIN-OLIVEIRA 1995), apresentou reação positiva, com relação à técnica de PAS, o que atribui à secreção caráter glicoprotéico.

As células TC, que formam os dutos coletores laterais da glândula salivar do tórax de *P. versicolor*, assim como as células que formam os dutos coletores da glândula salivar do tórax de *T. recursa* e *X. frontalis* apresentaram-se positivas para as técnicas Azul de Bromofenol e PAS (CAVASIN-OLIVEIRA 1995), porém estas células não são secretoras.

Como as células TD não são descritas para outros Hymenoptera, e tão pouco seus aspectos histoquímicos, não foi possível estabelecer relações entre estas células, encontradas na glândula salivar do tórax de *P. versicolor* e outras espécies.

As vespas **H, I, L, M, O, Q, R, T, V, X, Y, Z, AB**, não atuaram de forma significativa no ninho, porém na maioria dos indivíduos, a glândula salivar do tórax apresentou-se em atividade secretora. A quantidade de secreção na glândula salivar do tórax de cada indivíduo independe de sua idade. Porém pode-se verificar que a concentração da secreção glicoprotéica é maior nos indivíduos com idade de 07 a 92 dias.

Entre os indivíduos recém-emergidos, o indivíduo **E** apresentou suas glândulas ricas em glicoconjugados. Neste indivíduo os ovários apresentaram-se filamentosos. Possivelmente esta vespa poderia desenvolver seus ovários e tornar-se a fêmea α do ninho, substituindo a já estabelecida ou fundando sua própria colônia ou, ainda poderia atuar como as demais, forrageando, realizando trofalaxia e alimentando as larvas

Dos indivíduos analisados, o indivíduo **J** apresentou valores de qui-quadrado muito acima do esperado para os comportamentos de forrageamento e construção. Neste indivíduo a glândula apresentou-se desenvolvida, auxiliando na realização destas tarefas, uma vez que a morfologia dos seus ovários (filamentosos) não proporciona a mesma capacidade de oviposição e assim não poderia fundar sua própria colônia.

O comportamento de construção de um ninho inicia-se com a fêmea α , porém, quando já estabelecido, a manutenção das células e a construção de novas células pode ser realizada por fêmeas subordinadas (PARDI 1948), o que explica o fato das vespas **J** participarem ativamente na manutenção do ninho.

Quanto ao desenvolvimento ovariano a maioria dos indivíduos com a glândula salivar do tórax em atividade secretora apresentou ovário filamentoso ou em início de desenvolvimento, o que descarta a hipótese do desenvolvimento glandular estar associado a ovários também desenvolvidos.

Os indivíduos **AC** (70 dias), **AD** (70 dias) e **AE** (92 dias), que apresentaram valores altos de comportamentos de dominância possuíam ovários muito desenvolvidos. Desta forma o desenvolvimento ovariano estaria influenciando o estabelecimento da hierarquia

de dominância em *P. versicolor*, como descrito por Pardi (1948) para *Polistes* e também verificado por Nascimento & Cruz-Landim (1998) para *P. versicolor*. Para estes autores o desenvolvimento ovariano está diretamente relacionado ao comportamento de dominância e ao desenvolvimento das glândulas associadas ao aparelho de ferrão. O que não ocorreu com a glândula salivar do tórax.

A vespa **AE** também obteve valores de qui-quadrado acima do esperado para o comportamento de construção. Nas vespas **AC** e **AD** tais valores observados, para este comportamento, foram próximos ao esperado. Desta forma estas vespas também estariam realizando o comportamento de construção e a secreção da glândula salivar do tórax estaria sendo utilizada para este fim.

Nos indivíduos **L** e **M** (10 dias) a glândula salivar do tórax estava em atividade secretora e seus ovários apresentavam-se desenvolvidos, porém não realizavam atividades no ninho. Desta forma estas vespas poderiam tornar-se dominantes no ninho ou fundarem suas próprias colônias e a secreção da glândula salivar do tórax auxiliaria neste processo. O mesmo pode ser inferido aos indivíduos **H** e **I** (8 dias), que também não atuam no ninho e apresentaram ovários em início de desenvolvimento.

As vespas **G**, **K**, **N**, **S**, **W**, atuam como forrageiras típicas. Em **N** (15 dias), **S** (26 dias), **T** (26 dias), **W** (33 dias), **Y** (35 dias), **Z** (38 dias), **AB** (40 dias), os ovários apresentam-se pouco desenvolvidos, como observado em indivíduos mais jovens, onde os ovários estão em início de desenvolvimento. Nestas vespas, como já descrito por Pardi (1948) pode ter ocorrido à regressão dos ovários.

A produção de formas estéreis e férteis é uma consequência indireta do sistema de dominância e é independente da nutrição recebida durante a fase larval (PARDI 1948). Desta forma à variação do desenvolvimento ovariano apresentado no presente trabalho está relacionada à hierarquia estabelecida quando do ciclo da colônia.

A falta de um padrão definido de comportamentos no ciclo de vida de *P. versicolor* impossibilitou a relação destes com as idades. Também não foi possível relacionar o ciclo secretor às idades, mas o desenvolvimento da glândula salivar do tórax pode ser relacionado a alguns comportamentos como forrageamento, alimentação e construção. Isto nos leva a inferir que a glândula salivar do tórax de *P. versicolor* possui ciclo secretor constante nos períodos em que tais comportamentos são desempenhados independente da idade das vespas da colônia.

A glândula salivar do tórax dos indivíduos analisados não apresentou características de células em apoptose, morte celular programada ou que qualquer alteração que indicasse ocorrência de regressão glandular. Tal fato possivelmente não ocorre uma vez que a glândula está relacionada a funções vitais da colônia, as quais são desempenhadas pelas vespas durante, praticamente, toda sua vida.

BIBLIOGRAFIA

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: Gráfica e Editora Topázio, 2002, 42p.

CAVASIN-OLIVEIRA, G.M. **Histoquímica e ultra-estrutura das glândulas salivares de algumas espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea)**. 1995. 85f. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1995.

CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, R.A. Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. São Paulo, **Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, v.31, 118p., 1981.

EICKWORT, K. Separation of the castes of *Polistes exclamans* and notes on its biology (Hym: Vespidae). **Ins. Soc.**, [S.l.], n.16, p.67-72, 1969.

EVANS, H.E. The evolution of social life in wasps. **Proceedings Tenth International Congress of Entomology**, v.2, p.449-457, 1958.

GAMA, V. O. Sistema Salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1755), (Hymenoptera, Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.45, n.3, p.317-349, 1985.

GIANNOTTI, E. Comportamento de machos em colônias da vespa social *Polistes lanio* (Hymenoptera, Vespidae). In: 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002. **Livro de resumos....** Manaus, AM.: IMPA, 2002, 320p.

GIANNOTTI, E.; MACHADO, V.L.L. Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Londrina, v.43, n.3/4, p.158-190, 1999.

GOBBI, N.; ZUCCHI, R. On the ecology of *Polistes versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). I Phenological Account. **Naturalia**, São Paulo, v.5, p.97-104, 1980.

GUPTA, A.P.; SUTHERLAND, D.J. Phase contrast and histochemical studies of spherule cells in cockroaches (Dictyoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v.60, n.3, p.557-565, 1967.

KUDÔ, K; YAMANE, Sô.; YAMAMOTO, H. Physiological ecology of nest construction and protein flow in pre-emergence colonies of *Polistes chinensis* (Hymenoptera: Vespidae): effects of rainfall and microclimates. **Ethol. Ecol. Evol.** [S.1], v.10, p.171-183, 1998.

LANDOLT, P.J.; AKRE, R.D. Ultrastructure of the Thoracic Gland of the Queens of the Western Yellowjacket *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.72, n.5, p.586-590, 1979.

MACHADO, V.L.L. Aspectos biológicos de *Protopolybia pumila* (Saussure, 1863) (Hym. Vespidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.771-784, 1977.

MELLO, A.L.S.; RAYMUNDO, H.H. Change with age of Feulgen-DNA values in the Blood-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. **Histochemistry**, v.54, p.219-223, 1977.

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* (OLIVER, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.57, n.4, p.709-718, 1997.

PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological zoölogy**, [S.1], v.21, p.1-13, 1948.

PEARSE, A.G.E. **Analytical technology. Histochemistry. theoretical and applied.** 4th ed. Edinburgh. : Churchill Livingstone, 1985, 618p.

PETRALIA, R.S.; SORENSEN, A.A.; VINSON, S.B. The labial gland system of larvae of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Cell Tissue Res.**, [S.l], v.206, p.145-156, 1980.

REEVE, H.K. Polistes. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Ed.). **The social biology of wasps**. 2nd ed. New York: Comstock Publishing Associates, 1995, 668p.

ROCHA, T. CAETANO, F.H. Ultramorfolgia e histologia da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v.32, n.4 , p.585-590, 2003.

SCHREMMER, F.; MÄRZ, L.; SIMONSBERGER, P. Chitin im speichel der papierwespen (sociale Faltenwespen, Vespidae): Biologie, Chemismus, Feinstruktur. **Mikroskopie**, [S.l], v.42, p.52-56, 1985.

SILVA, E.C.M. **Caracterização histoquímica das glândulas salivares de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) durante o desenvolvimento larval**. 1999. 131p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

SPRADBERY, J. P. **Wasps: An account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. Seattle: University of Washington Press, 1973, , p.33-37.

STREHLER, B.L.; PRESS, G.D.; RAYCHAUDHURI, A. Histochemistry of the lantern of the firefly *Photinus pyralis* (Coleoptera: Lampyridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.60, n.1, p.81-91, 1967.

WEST-EBERHARD, M.J. Dominance relation in *Polistes canadensis* (L.), a tropical social wasp. **Monitore Zool. Ital.**, [S.l], v.20, p.263-281, 1986.

ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 3º Edição. New Jersey: Prentice Hall. 663p., 1999.

ZARA, F.J. **Caracterização morfo-histológica, histoquímica e ultra-estrutura da porção secretora da glândula salivar do quarto estágio larval de *Neoponera villosa* (Formicidae: Ponerinae)**. 1998. 126f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

ZARA, F.J.; BALESTIERI, J.B.P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Olivier (Vespidae: Polistinae) post-emergent colonies. **Naturalia**, São Paulo, . v.25, p.301-319, 2000.



6. Considerações Finais

Os resultados obtidos nas diferentes técnicas realizadas foram agrupados para cada tipo celular.

1. Célula TA:

Apresenta citoplasma com grande número de vesículas de secreção, tendo estas, eletrondensidades diferentes. O núcleo apresenta forma estrelada, grandes nucléolos e porções heterocromáticas distribuídas aleatoriamente. Estas células estão envolvidas na produção da secreção.

Nestas células as reações enzimológicas, ATPase ácida e alcalina, NADH-TR, SDH, foram positivas e apresentaram-se na forma de grânulos dispersos no citoplasma e concentrando-se na região nuclear. As reações a fosfatase alcalina foram negativas e a fosfatase ácida apresentaram-se positivas em todo o citoplasma.

A reação positiva destas enzimas justifica a presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, organelas associadas à produção de ATP, fornecendo a energia necessária à manutenção da célula e a síntese da secreção.

Os grânulos positivos de fosfatase ácida ocorrem próximos ao núcleo e dispersos em todo o citoplasma, e revelam a presença de lisossomos.

As reações às técnicas histoquímicas, PAS, Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e Azul de Toluidina são fortemente positivas. A secreção produzida é glicoprotéica e estas células apresentam-se em atividade secretora nos indivíduos que desempenham as atividades de forrageamento, trofaláxis adulto-adulto, larva-adulto, alimentação das larvas e construção do ninho, estando diretamente relacionada ao desempenho destas atividades na colônia.

2. Célula TB:

Nesta célula o citoplasma não apresenta vesículas de secreção. A membrana plasmática basal é invaginada, formando regiões citoplasmáticas com grande número de mitocôndrias. A membrana plasmática apical evagina-se, formando microvilosidades. O núcleo é regular com dois ou mais nucléolos, porém estes são menores que os presentes nas células TA.

Quando submetidas aos testes enzimológicos, ATPase ácida e alcalina, NADH-TR, SDH, estas células apresentaram reação homogênea e fortemente positiva em todo o citoplasma, revelando a presença de grande quantidade de mitocôndrias. A presença de ATPases nas membranas intensifica a reação.

Provavelmente estas células estejam envolvidas nos processos de transformação da secreção e na captação e retirada de íons antes de sua eliminação, já que estas enzimas atuam no transporte de íons e a grande quantidade de mitocôndrias está associada ao transporte ativo de moléculas.

Em relação à atividade de fosfatase alcalina os resultados forma negativos, entretanto para a fosfatase ácida os resultados forma positivos e semelhantes aos observados nas células TA.

Nestas células as reações histoquímicas que evidenciam a presença de glicoconjugados e proteínas são homogêneas e fracamente positivas, não aparecendo vesículas ou grânulos fortemente positivos no citoplasma.

3. Célula TC:

Estas células constituem o epitélio dos dutos e apresentam aspectos diferenciados em cada duto. Apresentaram resultados positivos e homogêneos as técnicas enzimológicas que determinam a presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático (ATPase ácida e alcalina, NADH-TR, SDH), uma vez que estas células não estão envolvidas nos processo de síntese sendo apenas responsáveis pela formação do epitélio dos dutos 2 e 3.

Estas células não apresentaram reação a fosfatase alcalina, porém esta foi positiva a fosfatase ácida e ocorreu na região de forma homogênea em todo o citoplasma.

Assim como nas células TB, a reação nas células TC as técnicas PAS, Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff, Azul de Toluidina foi fracamente positiva e homogênea, sem vesículas ou grânulos no citoplasma.

3.1. Duto 1: é o primeiro duto formado a partir da união dos dutos coletores presentes nos pseudoácinos, assim que estes são projetados para fora dos mesmos. Neste duto, a membrana plasmática apical das células TC forma microvilosidades, e apresenta grande número de mitocôndrias na região basal, como nas células TB. Estas mitocôndrias estariam associadas ao transporte ativo de moléculas, atribuindo às células TC deste duto função na modificação da secreção como as células TB.

3.2. Duto 2: é formado a partir da união dos dutos 1. A membrana plasmática apical não forma microvilosidades. A membrana plasmática basal também está invaginada, porém o número de mitocôndrias associadas às invaginações é menor do que no duto 1.

3.3. Duto 3: é o duto excretor final. Suas células TC apresentam aspecto semelhante ao observado no duto 2; número reduzido de mitocôndrias, ausência de microvilosidades, presença de invaginações basais.

O lúmen dos dutos 1, 2 e 3 como também do duto coletor presente no interior dos pseudoácinos é revestido por quitina em espiral (tenídia). O diâmetro destes dutos aumenta à medida que os mesmos fusionam-se durante sua origem.

4. Célula TD:

Estas células estão associadas ao duto 2, sem células intermediárias. Há a presença de vesículas secretoras com diferentes eletrondensidades, porém em menor número que nas células TA. Elas apresentam aspectos semelhantes às células TB e TC no duto 1, como núcleo regular, membrana plasmática apical formando microvilosidades e a membrana plasmática basal com invaginações associadas a mitocôndrias.

As reações às técnicas enzimológicas foram positivas na região central da célula e fortemente positiva na região periférica, onde estão presentes as mitocôndrias, em grande quantidade e as invaginações da membrana plasmática basal.

Tais características, como já explicado para as células TB e TC do duto 1, atribuem a esta célula papel importante na modificação da secreção antes de sua eliminação ao duto 2.

O formato do núcleo e a reação fracamente positiva ao Azul de Bromofenol, Ninhydrina Schiff e Azul de Toluidina não atribuem a estas células papel na produção da secreção. Porém estas células podem estar acrescentando outros componentes (glicoconjugados) à secreção, uma vez que apresentaram resultados positivos ao PAS.

Os resultados positivos a fosfatase ácida revelam a presença de lisossomos no citoplasma, os quais estão relacionados à digestão intracelular.



7. Conclusão

Os aspectos do núcleo e do citoplasma das células tipo A (TA) evidenciam suas características de célula secretora. As vesículas encontradas no citoplasma são de natureza glicoprotéica.

A morfologia das células tipo B (TB), associada aos resultados enzimológicos revelam que esta atua na captura de material da hemolinfa ou na retirada de íons da secreção, e não na produção da secreção salivar.

As células formadoras dos dutos – células tipo C (TC), apresentam-se diferenciadas segundo o duto considerado. Apenas na formação do duto 1 (D1), as células TC são semelhante às células TB e, portanto, atuam também na modificação da secreção durante sua condução.

As células tipo D (TD), associadas ao duto 2 (D2), apresentam características estruturais e químicas que evidenciam sua função na modificação da secreção, como nas células TB e TC dos dutos 1, ou acréscimo de produtos glicoconjugados dada a presença de vesículas PAS positivas no citoplasma.

O desenvolvimento ovariano não está relacionado à idade, mas estabelece a hierarquia; determinando quem são as fêmeas subordinadas e a dominante na colônia.

As técnicas histoquímicas associadas às análises comportamentais demonstraram que há relação do ciclo secretor da glândula salivar do tórax a algumas das atividades desempenhadas pelas vespas no ninho, atuando durante todo o seu ciclo de vida. Uma vez que as atividades comportamentais realizadas na colônia não são determinadas pela idade, o ciclo secretor também não se apresentou relacionado a fatores temporais.



8. Resumo

A glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* apresenta-se formada por pseudoácinos, constituídos de uma célula central (TA) envolta por células periféricas (TB). Os dutos são formados inicialmente pela união dos canalículos projetados dos pseudoácinos. A fusão dos dutos 1 leva a formação dos dutos 2, e a união destes ao duto 3. As células TC constituem o epitélio destes dutos e apresentam-se diferenciada em cada um. A secreção é produzida pelas células TA e modificada pelas células TB, TC nos dutos 1 e TD, apresentam a membrana plasmática invaginada e com muitas mitocôndrias associadas, que auxiliam na captura de material da hemolinfa. Quando submetidas a reações enzimológicas, para os processos oxidativos, as células TB e TD mostram-se atuando na regulação do volume celular e na concentração de solutos. As células TD também podem atuar acrescentando glicoconjugados à secreção uma vez que apresentam grânulos PAS positivos em seu citoplasma. As células TA por sua vez não apresentam tais aspectos. Porém quando submetidas aos testes histoquímicos mostram resultados positivos a glicoconjugados e proteínas, revelando-se rica em glicoconjugados e proteínas. A ausência de reservatório sugere que a secreção é conduzida pelos dutos e eliminada ao exterior de forma contínua, sem que seja previamente armazenada. O desenvolvimento da glândula salivar do tórax não depende do grau de desenvolvimento ovariano. As vespas subordinadas são responsáveis pela manutenção da estrutura física do ninho, defesa e também na alimentação dos imaturos e imagos. Já às dominantes cabe a reprodução e a fundação de novas colônias. Dados comportamentais sugerem que a glândula salivar do tórax em *P. versicolor* está relacionada às atividades de forrageamento, trofalaxia adulto-adulto, larva-adulto, alimentação das larvas e construção do ninho. Estas atividades são realizadas por vespas em diferentes idades, subordinadas e dominantes. Portanto, embora a morfologia das células presentes na glândula salivar do tórax de *P. versicolor* não se altera nas diferentes castas, o ciclo secretor independe de fatores temporais ou do desenvolvimento dos ovários, mas está relacionado a fatores comportamentais.

ABSTRACT

The *Polistes versicolor* thoracic salivary gland is composed by pseudoacini, constituted by a central cell (TA) surrounded by peripheral cells (TB). The ducts are initially formed through the union of the canaliculi that project from the pseudoacini. The of ducts 1 leads to the formation of ducts 2 and the fusion from these, the duct 3 is formed. The TC cells constitute the epithelium of these ducts and they appear differentiated in each one of the ducts. The secretion is produced by the TA cells and modified by the TB cells, by the TC cells in the ducts 1, and also by the TD cells. The latter type of cells present a plasma membrane with numerous infoldings containing many mitochondria, which aid in the uptake of diverse materials from the haemolymph that are added to the secretion. When subjected to enzymatic reactions, these cells (TB and TD cells) react positively to reactions related to oxidative processes, thus indicating that they act in the regulation of cell volume and in the concentration of solutes. The TD cells may also add glycoconjugates to the secretion, since these cells present granules positives to PAS reaction in their cytoplasm. The TA cells differ from the TB and TD cells in the aspects mentioned above. However, when the TA cells were subjected to the histochemical tests, they reacted positively to the tests for the detection of glycoconjugates and proteins, thus indicating that the secretion consists of glycoproteins. Since the thoracic salivary gland of this species lacks a reservoir the secretion is conducted by the ducts toward the exterior and eliminated continuously, without being stored. The development of the thoracic salivary glands is not dependant on the degree of ovarian development. In the dominant females, the ovary appears well developed, while in the subordinate females it appears filamentous, under development, or poorly developed. Subordinate females are responsible for the maintenance of the physical structure of the nest, nest defense, and also feeding the larvae. The dominant females are in charge of reproduction and funding new colonies. The salivary gland of the thorax in *P. versicolor* is related to the foraging activities, adult-adult and adult-larvae trophalaxis, larval feeding, and construction of the nest. These activities are performed by wasps of different ages, both subordinated and dominant. Therefore, the morphology of the cells of the salivary gland of the thorax of *P. versicolor* does not differ among the different castes, the secretory cycle is independent of the age factor or degree of ovarian development; instead, it is related to behavioral factors.



9. Referências Bibliográficas

BOTHE, G.W.M.; RATHMAYER, W. Programmed degeneration of thoracic eclosion muscle in the flesh fly, *Sarcophaga billata*. **J. Insect. Physiol.**, [S.l], v.40, n.11, p.983-995, 1994.

BOWEN, T.D.; MORGAN, S.M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biology International**, [S.l], v.17, n.1, p.13-33, 1993.

BRITTO, F.B. **Histologia e histoquímica das glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor* (Hymenoptera; Vespidae) (Oliver)**. 2001. 39f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

CAETANO, F.H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae)**. 1998. 137f. Tese (Livre docência): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: Gráfica e Editora Topázio, 2002, 42p.

CARNEIRO, A. **Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae, Polistinae)**. 1991. 206f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1991.

CARPENTER, J.M. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Ed.). **The social Biology of wasps**. Comstock Publishing Associates, p.7-32, 1991.

CAVASIN-OLIVEIRA, G.M. **Histoquímica e ultra-estrutura das glândulas salivares de algumas espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea)**. 1995. 85f. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1995.

CAVASIN-OLIVEIRA, G.M.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of Apoidea (Hymenoptera, Anthophorinae). Salivary glands. I. Alveolar glands. **Rev. Bras. Entomol.**, Londrina, v.42, p.1-6, 1998.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. New York: American Elsevier, 1975, 819p.

CHEN, G.; McWILLIAMS, M.L.; FECHTER, L.D. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in hair cells: a correlate for permanent threshold elevations. **Hear. Res.**, Amsterdam, v.145, p.91-100, 2000.

CLARKE, P.G.H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, [S.l.], v.181, p.195-213, 1990.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo Comparativo de algumas Glândulas de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e Respectivas Implicações Evolutivas. **Arq. Zool. São Paulo**, São Paulo, v.15, p.177-290, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, R.A. Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. São Paulo, **Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, v.31, 118p., 1981.

CRUZ-LANDIM, C.; SAENZ, M.H.P. Estudo Comparativo de algumas Glândulas dos Vespoidea (Hymenoptera). **Papéis avulsos. Zool. São Paulo**, São Paulo, v.25, n.24, p.251-263, 1972.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Degenerative structures in the hypopharyngeal gland from aging bees (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.). **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v.9, n.1-4, p.157-168, 1973.

DELEURANCE, E.P. Contribution à l'étude biologique des *Polistes* (Hymenoptères, Vespides) II, - L'écycle évolutif du couvain. **Insects Soc.** [S.l.], v.11, p.285-302, 1955.

DOWNING, H.A.; JEANNE, R.L. Intra- and Interspecific variation in nest architecture in the paper wasp *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae). **Insects Soc.**, [S.l.], n.33, p.422-443, 1986.

EDWARDS, R. **Social wasps; their biology and control.** [S.l.]: The Rentokie Library, 1980, 398p.

EICKWORT, K. Separation of the castes of *Polistes exclamans* and notes on its biology (Hym: Vespidae). **Insects. Soc.**, [S.l.], n.16, p.67-72, 1969.

ESPELIE, K.E.; HERMANN, H.R. Surface lipids of the social wasps *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. **J. Chem. Ecol.**, [S.l.], v.16, p.1841-1852, 1990.

EVANS, H.E. The evolution of social life in wasps. **Proceedings Tenth International Congress of Entomology**, v.2, p.449-457, 1958.

EVANS, H.E.; WEST-EBERHARD, M.J. **The wasps.** [S.l.], The University of Michigan Press, 1970, 265p.

GAMA, V. O. Sistema Salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera, Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.45, n.3, p.317-349, 1985.

GAMA, V.; CRUZ-LANDIM, C. Estudo Comparativo das Glândulas dos Sistema Salivar de Formigas (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, v.7, p.145-165, 1982.

GERVET, J. Le comportement d'oophagie différentielle chez *Polistes gallicus* (Hyménoptérés Vespides). **Insectes Soc.** [S.l.], v.11, p.343-382, 1964.

GIANNOTTI, E.; MACHADO, V.L.L. Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Londrina, v.43, n.3/4, p.158-190, 1999.

GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor***. 1977. 220f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1977.

GOBBI, N.; FOWLER, H.G.; CHAUD-NETTO, J.; NAZARETH, S.L. Comparative colony productivity of *Polistes simillimus* and *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) and the evolution of paragyny in the Polistinae. **Zoologische Jahrbücher**, [S.l], v.97, p.239-243, 1993.

GOBBI, N.; ZUCCHI, R. On the ecology of *Polistes versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). I Phenological Account. **Naturalia**, São Paulo, v.5, p.97-104, 1980.

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. **Cell Biology International**, [S.l], v.21, n.3, p.151-158, 1997.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res.**, [S.l], v.301, p.5-17, 2000.

HESELHAUS, F. Die hautdüsen der Apiden und verwandter formen. **Zool. Jahrd. Abt. Anat. Ontog. Tiere.**, [S.l], v.43, p.369-464, 1922.

JEANNE, R.L. A specialization in nest petiole construction by queens of *Vespula* sp. (Hymenoptera: Vespidae). **N.Y. Entomol. Soc.**, [S.l], v.85, p.127-129, 1977.

JEANNE, R.L. Polyethism. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Ed). **The social biology of wasps**. 2nd ed. New York: Comstock Publishing Associates, 1991, p. 389-425.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 433p.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brasilian Journal of Cancer**, [S.l], v.26, p.239-257, 1972.

KRONENBERG, S.; HEFETZ, A. Role of labial glands in nesting behaviour of *Chalicodoma sicula* (Hymenoptera, Megachilidae). **Physiological Entomology**, [S.l], v.9, p.175-179, 1984.

KUDÔ, K; YAMANE, Sô.; YAMAMOTO, H. Physiological ecology of nest construction and protein flow in pre-emergence colonies of *Polistes chinensis* (Hymenoptera: Vespidae): effects of rainfall and microclimates. **Ethol. Ecol. Evol.** [S.l], v.10, p.171-183, 1998.

KUDÔ, K; YAMAMOTO, H.; YAMANE, Sô. Amino acid composition of the protein in pre-emergence nests of paper wasp, *Polistes chinensis* (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Soc.** [S.l], v.47, p.371-375, 2000.

LANDOLT, P.J.; AKRE, R.D. Ultrastructure of the Thoracic Gland of the Queens of the Western Yellowjacket *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera: Vespidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.72, n.5, p.586-590, 1979.

MACHADO, V.L.L. Aspectos biológicos de *Protopolybia pumila* (Saussure, 1863) (Hym. Vespidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.771-784, 1977.

MATEUS, S.; NOLL, F.B.; ZUCCHI, R. Morphological caste differences in the neotropical swarm-founding polistine wasps: *Parachartergus smithii* (Hymenoptera:Vespidae). **J. New York Entomol. Soc.** [S.l], v. 105, n.3-4, p.129-139, 1997.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the Bees: A comparative study.** 2nd ed. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1974, 395p.

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* (OLIVER, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.57, n.4, p.709-718, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 2002, 975p.

PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological zoölogy**, [S.l], v.21, p.1-13, 1948.

PEARSE, A.G.E. **Analytical technology. Histochemistry. theoretical and applied**. 4th ed. Edinburgh. : Churchill Livingstone, 1985, 618p.

PETRALIA, R.S.; SORENSEN, A.A.; VINSON, S.B. The labial gland system of larvae of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Cell Tissue Res.**, [S.l], v.206, p.145-156, 1980.

PROSKURYAKOV, S. YA.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, [S.l], v.283, p.1-16, 2003.

REGINATO, R.D.; CRUZ-LANDIM, C. Secretory cycle of glands from salivary system in *Schwarziana quadripunctata* (Apidae, Meliponinae). **Braz. J. morphol. Sci.**, Campinas, v.13, p.122, 1996.

REEVE, H.K. *Polistes*. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (Ed). **The social biology of wasps**. 2nd ed. New York: Comstock Publishing Associates, 1995, 668p.

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

RIBEIRO, E.M. **Histologia, histoquímica e ultra-estrutura da glândula intramandibular de *Cephalotes (=Zacryptocerus) pusillus*, Andrade & Baroni, 1999 (Hymenoptera: formicidae).** 2000. 74f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2000.

RIBEIRO, E.M.; CAETANO, R.H. Morfo-histologia comparada de glândulas salivares de operárias de formigas *Zacryptocerus pusillus*. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 6. 1994. **Livro de Resumos...** 1994, p.120.

ROCHA, T.; CAETANO, F.H. Ultramorfolgia e histologia da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae). **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v.32, n.4 , p.585-590, 2003.

RÖSELER, P-F.; RÖSELER, I.; STRAMBI, A. Rôle des corpora allata dans l'établissement de la hierarchie sociale chez *Polistes gallicus*. **Bull. Int. Sect. Française UEIS**, Toulouse, p. 112-113, 1981.

RÖSELER, P-F; RÖSELER, T.; STRAMBI, A.; AUGIER, R. Influence of insect hormones on the establishment of dominance hierarchies among foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, [S.1], v.15, p.133-142, 1984.

RÖSELER, P-F; RÖSELER, T.; STRAMBI, A. Role of ovaries and ecdysteroids in dominance hierarchy establishment among foundresses of the primitively social wasp, *Polistes gallicus*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, [S.1], v.18, p.9-13, 1985.

SAENZ, N.H.P; CRUZ-LANDIM, C. Glândulas do Sistema Salivar em Sphecidae (Hym.) **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.39, n.1, p.19-26, 1972.

SALLES, H.C.; CRUZ-LANDIM, C. Levantamento das glândulas exócrinas presentes em *Camargoia nordestina*, 1989 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.41, n.2-4, p.297-302, 1998.

SCHREMMER, F.; MÄRZ, L.; SIMONSBERGER, P. Chitin im speichel der papierwespen (sociale Faltenwespen, Vespidae): Biologie, Chemismus, Feinstruktur. **Mikroskopie**, [S.l], v.42, p.52-56, 1985.

SILVA, E.C.M. **Caracterização histoquímica das glândulas salivares de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) durante o desenvolvimento larval**. 1998. 131f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; BOWEN, I.D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Cell Biology International**. [S.l], v.24, n.10, p.737-743, 2000.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey Bee**. New York: Comstock Publishing Associates, 1956. p.70-71.

SPRADBERRY, J. P. **Wasps: An account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. 1^o Edição. Seattle: University of Washington Press, 1973, p.33-37.

STADELMANN, C.; LASSMANN, H. Detection of apoptosis in tissue sections. **Cell Tissue Res.**,[S.l], v.301, p.19-31, 2000.

STELLER, H. Mechanisms and genes of celular suicide. **Science – apoptosis**, [S.l], v.267, p.1445-1449, 1995.

SZOLDERTS, M.J.; CRAILSHEIM, K. A comparison of pollen consumption and digestive in honeybee (*Apis mellifera*) drones and workers. **J. Insect. Physiol.**, [S.l], v.39, n.10, p.877-881, 1993.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 931p.

WENZEL, J.W. Evolution of nest architecture. In: ROSS, K.G.; R.W. MATTHEWS, Ed.). **The Social Biology of Wasps**. Ithaca: Cornell University Press, 1991, p. 480-519.

WEST, M.J. Foundress association in Polistine wasps: Dominance hierarquies and the evolution of social behaviour. **Science**, [S.l], v.157, n.3796, p.1584-1585, 1967.

WEST-EBERHARD, M.J. Dominance relation in *Polistes canadensis* (L.), a tropical social wasp. **Monitore Zool. Ital.**, [S.l], v.20, p.263-281, 1986.

WEST-EBERHARD, M.J. The social biology of Polistine wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology of the University of Michigan**. [S.l], v.140, p.1-101, 1969.

WILSON, E.O. **The Insect Societies**. 4th ed. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1976, 529p.

WILSON, E.O. The social insects. WILSON, E.O, In: **Sociobiology**, [S.l.]: The Abridged Edition, 1980, 349p.

YAMANE, Sô.; KUDÔ, K.; TAJIMA, T.; NIHON'YANAGI, K.; SHINODA, M.; SAITO, K.; YAMAMOTO, H. Comparison of investment in nest construction by the foundresses of consubgeneric *Polistes* wasps, *Polistes (Polistes) riparius* and *P. (P.) chinensis* (Hymenoptera, Vespidae). **J. Ethol.** [S.l], v.16, p.97-104, 1998.

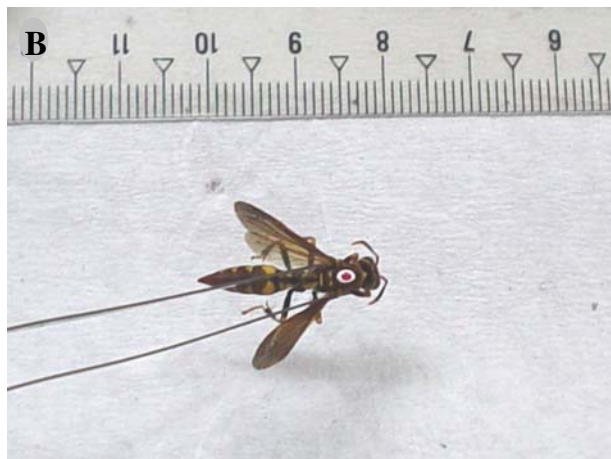
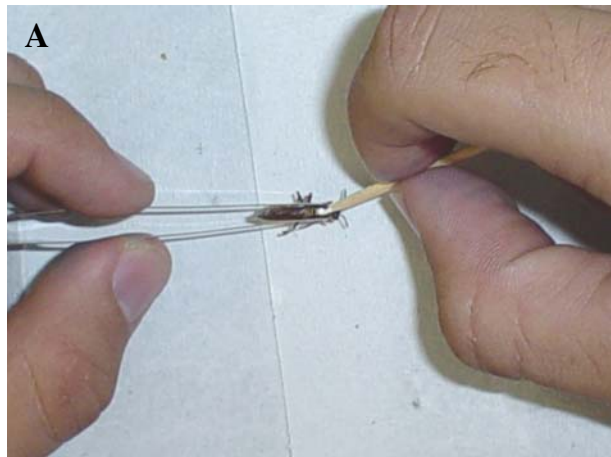
ZAKERI, Z.; BURSCH, W.; TENNISWOOD, M.; LOCKSHIN, R.A. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or others? **Cell death and differentiation**, [S.l], v.2, p.87-96, 1995.

ZARA, F.J. **Caracterização morfo-histológica, histoquímica e ultra-estrutural da porção secretora da glândula salivar do quarto estágio larval de *Neoponera villosa* (Formicidae: Ponerinae)**. 1998. 126f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

ZARA, F.J.; BALESTIERI, J.B.P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Olivier (Vespidae: Polistinae) post-emergent colonies. **Naturalia**, São Paulo, v.25, p.301-319, 2000.



10. Anexos



Anexo 1: Marcação dos indivíduos adultos de *Polistes versicolor* (A e B) e vespas marcadas no ninho (C).

Anexo 2: Tabela de contingência demonstrando a frequência diária de comportamentos observados para cada vespa, seguidos de seus valores esperados e de qui-quadrado. Em azul estão os comportamentos com associação positiva significativa com os diferentes indivíduos e em vermelho os dados com associação negativa significativa com os diferentes indivíduos. Os valores não marcados indicam que os comportamentos são realizados com frequência igual ou próxima ao esperado. Para facilitar as análises dos resultados, foram acrescentadas na tabela as idades dos espécimes.

IDADES (I) INDIVÍDUOS (IND)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Atividade de forrageamento (Af)	0	0	0	0	0	11	34	0	0	79
observado	0	0	0	0	0	26,73	15,62	13,31	14,19	29,59
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	9,25	21,63	13,31	14,19	82,52
Trofalaxis adulto-adulto (Taa)	0	0	0	0	0	43	42	0	0	26
observado	0	0	0	0	0	23,69	13,84	11,79	12,57	26,22
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	15,75	57,28	11,79	12,57	0,00
Receber e/ou mastigar presa (R/Mp)	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0
observado	0	0	0	0	0	5,49	3,21	2,74	2,92	6,08
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	127,85	3,21	2,74	2,92	6,08
Trofalaxis larva-adulto (Tla)	0	0	0	0	0	21	15	0	0	9
observado	0	0	0	0	0	10,94	6,39	5,45	5,81	12,11
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	9,26	11,60	5,45	5,81	0,80
Alimentar larva (Al)	0	0	0	0	0	21	8	0	0	0
observado	0	0	0	0	0	9,50	5,55	4,73	5,04	10,51
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	13,94	1,08	4,73	5,04	10,51
Construção (C)	0	0	0	0	0	18	4	0	0	70
observado	0	0	0	0	0	10,30	6,02	5,13	5,47	11,40
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	5,76	0,68	5,13	5,47	301,31
Comportamento de dominância (Cd)	0	0	0	0	0	29	8	0	8	26
observado	0	0	0	0	0	18,41	10,76	9,16	9,77	20,37
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	6,10	0,71	9,16	0,32	1,55
Comportamento de subordinação (Cs)	0	0	0	0	0	11	8	0	3	9
observado	0	0	0	0	0	7,68	4,49	3,83	4,08	8,50
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	1,43	2,75	3,83	0,29	0,03
Permanecer imóvel no ninho (Pin)	0	0	0	0	0	57	23	121	118	50
observado	0	0	0	0	0	130,28	76,13	64,87	69,16	144,21
esperado (O-E) ² /E	0	0	0	0	0	41,22	37,08	48,57	34,49	61,55
TOTAL OBSERVADO (T)						243	142	121	129	269

(I)	9	10	10	10	15	18	18	18	20	25	26	26	26	27
(IND)	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V		
(Af)	observado	28	0	0	74	10	35	15	58	4	18	4		
	esperado	14,19	14,63	15,29	34,21	20,24	32,56	13,42	22,33	14,08	13,09	11,44		
	(O-E) ² /E	13,44	14,63	15,29	46,29	5,18	0,18	4,10	56,99	7,22	1,84	4,84		
(Taa)	observado	16	6	0	48	10	12	10	48	4	23	0		
	esperado	12,57	12,96	13,55	30,31	17,94	28,85	11,89	19,79	12,48	11,60	10,14		
	(O-E) ² /E	0,93	3,74	13,55	10,32	3,51	9,84	0,30	40,22	5,76	11,20	10,14		
(R/Mp)	observado	0	6	0	24	0	27	0	0	0	0	0		
	esperado	2,92	3,01	3,14	7,03	4,16	6,69	2,76	4,59	2,89	2,69	2,35		
	(O-E) ² /E	2,92	2,98	3,14	40,94	4,16	61,61	2,76	4,59	2,89	2,69	2,35		
(Tla)	observado	16	0	5	42	2	9	14	10	0	5	0		
	esperado	5,81	5,99	6,26	14,00	8,28	13,32	5,49	9,14	5,76	5,36	4,68		
	(O-E) ² /E	17,90	5,99	0,25	56,03	4,76	1,40	5,49	0,08	5,76	0,02	4,68		
(Al)	observado	8	0	0	27	0	12	6	29	0	9	0		
	esperado	5,04	5,20	5,43	12,15	7,19	11,57	4,77	7,93	5,00	4,65	4,06		
	(O-E) ² /E	1,74	5,20	5,43	18,14	7,19	0,02	4,77	55,95	5,00	4,07	4,06		
(C)	observado	0	0	0	6	14	18	0	0	4	0	0		
	esperado	5,47	5,64	5,89	13,18	7,80	12,54	5,17	8,60	5,42	5,04	4,41		
	(O-E) ² /E	5,47	5,64	5,89	3,91	4,94	2,38	5,17	8,60	0,37	5,04	4,41		
(Cd)	observado	0	18	0	21	2	18	3	0	0	0	4		
	esperado	9,77	10,07	10,53	23,56	13,94	22,42	9,24	15,83	9,69	9,01	7,88		
	(O-E) ² /E	9,77	6,24	10,53	0,28	10,22	0,87	4,21	1,47	15,38	9,01	1,91		
(Cs)	observado	4	3	0	21	2	3	6	0	1	14	4		
	esperado	4,08	4,20	4,39	9,83	5,82	9,36	3,86	6,61	4,05	3,76	3,29		
	(O-E) ² /E	0,00	0,35	4,39	12,69	2,50	4,32	1,19	4,76	71,03	27,86	0,15		
(Pin)	observado	57	100	134	48	144	162	97	58	95	50	92		
	esperado	69,16	71,30	74,52	166,73	98,65	158,69	65,41	108,83	68,62	63,80	55,76		
	(O-E) ² /E	2,14	11,55	47,48	84,55	20,85	0,07	15,26	23,74	10,14	2,98	23,56		
T	129	133	139	311	184	296	122	209	203	128	119	104		

(I)		33	35	38	40	70	70	70	92	TOTAL OBSERVADO
(IND)		W	X	Y	Z	AB	AC	AD	AE	
(Af)	observado	48	6	9	20	25	0	2	15	501
	esperado	27,50	14,96	11,11	13,53	27,61	28,38	27,83	22,22	
	(O-E) ² /E	15,29	5,37	0,40	3,10	0,25	28,38	23,97	2,34	
(Taa)	observado	86	9	8	16	14	0	7	6	444
	esperado	24,37	13,26	9,85	11,99	24,47	25,15	24,66	19,69	
	(O-E) ² /E	155,87	1,37	0,35	1,34	4,48	25,15	12,65	9,52	
(R/Mp)	observado	0	2	0	0	0	0	7	2	103
	esperado	5,65	3,08	2,28	2,78	5,68	5,83	5,72	4,57	
	(O-E) ² /E	5,65	0,38	2,28	2,78	5,68	5,83	0,29	1,44	
(Tla)	observado	10	2	2	0	8	9	13	13	205
	esperado	11,25	6,12	4,55	5,54	11,30	11,61	11,39	9,09	
	(O-E) ² /E	0,14	2,77	1,43	5,54	0,96	0,59	0,23	1,68	
(Al)	observado	38	2	2	2	10	0	4	0	178
	esperado	9,77	5,31	3,95	4,81	9,81	10,08	9,89	7,89	
	(O-E) ² /E	81,58	2,07	0,96	1,64	0,00	10,08	3,51	7,89	
(C)	observado	0	0	0	0	6	9	9	18	193
	esperado	10,59	5,76	4,28	5,21	10,64	10,93	10,72	8,56	
	(O-E) ² /E	10,59	5,76	4,28	5,21	2,02	0,34	0,28	10,41	
(Cd)	observado	0	3	0	2	20	59	67	46	345
	esperado	18,94	10,30	7,65	9,32	19,01	19,54	19,16	15,30	
	(O-E) ² /E	18,94	5,17	7,65	5,75	0,05	79,68	119,42	61,60	
(Cs)	observado	10	6	3	8	2	5	0	0	144
	esperado	7,90	4,30	3,19	3,89	7,94	8,16	8,00	6,39	
	(O-E) ² /E	0,56	0,67	0,01	4,35	4,44	1,22	8,00	6,39	
(Pin)	observado	58	106	77	75	166	176	144	102	2442
	esperado	134,03	72,91	54,15	65,94	134,56	138,32	135,64	108,30	
	(O-E) ² /E	43,13	15,02	9,64	1,24	7,34	10,27	0,52	0,37	
T		250	136	101	123	251	258	253	202	4555
										3058,647

Anexo 3: Tabela com os resultados dos testes histoquímicos aplicados à glândula salivar do tórax de *P. versicolor* em todos os indivíduos analisados.

TIPOS CELULARES	PAS			AZUL DE BROMOFENOL			NINHYDRINA SCHIFF			AZUL DE TOLUIDINA			
	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++	
TA- núcleo	Todos	0	0	0	0	0	0	A, Y	M, W, AE	0	0	C, D, E, U, Z	A, B, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, W, X, Y, AB, AC, AD, AE
TA- citoplasma	A, V, W	B, R		A	U, Y, Z		P	A	Y	0	0	Todos	0
TB- núcleo	Todos	0	0	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos	0
TB- citoplasma	0	Todos	0	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos (exceto U)	0
TC- núcleo	Todos	0	0	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos	0
TC- citoplasma	0	Todos	0	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos	0
TD- núcleo	Todos	0	0	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos	0
TD- citoplasma	0	0	Todos	0	Todos	0	0	0	Todos	0	0	Todos	0

As letras correspondem a cada indivíduo analisado. Nenhum indivíduo (0), todos os 30 indivíduos analisados (Todos). Reação negativa (-), fracamente positiva (+), positiva (++), fortemente positiva (+++).