



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

“ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MOLECULAR COMPARADA DO FLUIDO
ESPERMATECAL E DA SECREÇÃO DAS GLÂNDULAS ESPERMATECAIS
DAS FÊMEAS E DAS GLÂNDULAS DE MUCO DOS MACHOS EM TRÊS
ESPÉCIES DE ABELHAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SOCIABILIDADE”

Mateus Marcondes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“ANÁLISE HISTOQUÍMICA E MOLECULAR COMPARADA DO FLUIDO
ESPERMATECAL E DA SECREÇÃO DAS GLÂNDULAS ESPERMATECAIS
DAS FÊMEAS E DAS GLÂNDULAS DE MUCO DOS MACHOS EM TRÊS
ESPÉCIES DE ABELHAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SOCIABILIDADE”**

Mateus Marcondes

Orientador: Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
2013

595.799 Marcondes, Mateus
M321a Análise histoquímica e molecular comparada do fluido espermatecal e da secreção das glândulas espermatecais das fêmeas e das glândulas de muco dos machos em três espécies de abelhas com diferentes níveis de sociabilidade / Mateus Marcondes. - Rio Claro : [s.n.], 2013
93 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fábio Camargo Abdalla

1. Abelha. 2. Aparelho reprodutor. 3. Espermateca. 4. Bandeamento proteico. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Análise histoquímica e molecular comparada do fluido espermatecal e da secreção das glândulas espermatecais das fêmeas e das glândulas de muco dos machos em três espécies de abelhas com diferentes níveis de sociabilidade

AUTOR: MATEUS MARCONDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO CAMARGO ABDALLA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Fábio Camargo Abdalla

Prof. Dr. FABIO CAMARGO ABDALLA
UFSCAR - Campus Sorocaba

Roglene Aparecida Prado

Profa. Dra. ROGLENE APARECIDA PRADO
UFSCAR - Campus Sorocaba

Edmilson Amaral de Souza

Prof. Dr. EDMILSON AMARAL DE SOUZA
Universidade Federal de Viçosa - campus Rio Paranaíba

Data da realização: 01 de março de 2013.

**Dedico este trabalho a minha
família, pelo incentivo, compreensão
e carinho.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida.

À minha família, por nunca me desamparar, por ser, sempre, meu refúgio de amor e paz.

À Universidade Estadual Paulista, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio C. Abdalla, por acreditar no meu potencial e pelos anos de aprendizado.

À Profa. Dra Carminda da Cruz-Landim, pela revisão do Projeto.

A toda equipe do Laboratório de Bioluminescência da UFSCar, campus de Sorocaba, em especial aos amigos Deimison e Rogilene, pela paciência e boa vontade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Funcional e Estrutural, que deixarão boas lembranças.

Aos meus amigos, por sempre torcerem por mim.

RESUMO

Nas abelhas, a espermateca, órgão responsável por estocar os espermatozoides e mantê-los viáveis após a cópula, está presente nas fêmeas da maioria dos insetos. Associadas a estas, encontram-se as glândulas espermatecais, cuja função é sintetizar o fluido espermatecal no qual os espermatozoides ficam imersos. As rainhas das espécies de abelhas eussociais, pertencentes as tribos Apini e Meliponini, podem estocar os espermatozoides dos machos por anos devido a sua longevidade ser maior do que a de outras espécies de abelhas. Contudo, espécies que apresentam longevidade e taxa de oviposição menores, como é o caso, dos Bombini e das abelhas solitárias, também possuem glândulas espermatecais e espermateca, e mecanismos de preservação dos espermatozoides. Não se sabe ao certo como a espermateca conserva os espermatozoides e se a secreção das glândulas espermatecais são as únicas responsáveis pela formação do fluido espermatecal, o qual se supõe ser o responsável por manter os espermatozoides viáveis nas espécies de abelhas. O fluido espermatecal é formado também pelo conteúdo seminal dos machos, produzido por suas glândulas de muco. Em abelhas, a composição química e a função da secreção das glândulas espermatecais das fêmeas e das glândulas de muco dos machos ainda são pouco estudadas e não se tem nada conclusivo na literatura. Com o intuito de verificar se a organização social e o estado reprodutivo das abelhas refletem em diferenças no tipo de secreção contido nas espermatecas, nas glândulas espermatecais e nas glândulas de muco foi realizado um estudo comparado da histoquímica e do padrão de bandeamento proteico das glândulas de muco, bem como do conteúdo da vesícula seminal dos machos, juntamente com as glândulas espermatecais e do fluido espermatecal das fêmeas com diferentes níveis de sociabilidade e estado de fecundidade: virgens e fecundadas. Três espécies foram comparadas: *Centris (ptilotopus) scopipes* (solitária), *Bombus morio* (primitivamente eussocial) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (eussocial avançada) – neste último caso analisou-se o conteúdo das vesículas seminais, já que os machos dos meliponíneos não possuem a glândula de muco.

Palavras-chave: Espermateca; glândula de muco; secreção.

ABSTRACT

Spermatheca is the organ responsible to store the sperm and keep it viable after the copula. In association with this organ, we can find the spermathecal glands, which synthesize the spermathecal fluid that maintains the sperm. The eusocial bee queens of Apini and Meliponini tribes can store the male sperm for years due to its longevity is bigger than the others bee species. However, species with smaller longevity and oviposition rates like Bombini and lonely bees also have spermatheca, spermathecal glands and sperm preserving mechanisms. It is not known for sure how the spermatheca preserves the sperm and if the spermathecal glands secretion is the only responsible for the spermathecal fluid generation, which is believed to keeps the sperm viable. Some studies show that the spermathecal fluid is also formed by male seminal content produced in mucus glands. The spermathecal glands function and chemical composition in female bees and the male mucus glands are still less studied and there is nothing conclusive in the literature. This study aims to verify if different oviposition rates, longevity and social organization reflects in thta different kinds of secretion contained in spermatheca, spermathecal and mucus glands. For this I made a compared study of the histochemistry and protein band pattern of: 1. mucus glands secretion; 2. male seminal vesicle content plus spermathecal glands secretion; and 3. female spermathecal fluid. This comparison was done in diverse sociability levels and fecundity conditions: virgins and inseminated; with three bee species: *Centris (ptilotopus) scopipes* – solitary, *Bombus morio* – primitively eusocial, and *Melipona quadrifasciata anthidioides* – advanced eusocial. *M. quadrifasciata anthidioides* males don't have mucus gland, so in this case the seminal vesicle content was analyzed.

Keywords: Spermatheca; mucus gland; secretion.

3.2.5 Técnica da Variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (Segundo MELLO <i>et al.</i> , 1993 – modificada) – Análise do metabolismo nuclear.....	22
3.3 Preparo do material - Molecular.....	23
3.3.1 Extração proteica.....	23
3.3.2 Quantificação proteica.....	23
3.3.3 Eletroforese em Gel de SDS (SDS-PAGE).....	24
3.3.4 Coloração por Comassie Brilliant Blue.....	24
3.3.5 Coloração por Nitrato de Prata.....	24
3.3.6 Distância de migração das bandas no gel.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Análise da morfologia geral do aparelho reprodutor feminino de <i>Centris (ptilotopus) scopipes</i> , <i>Bombus morio</i> e <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	26
4.2 Análises histoquímicas das glândulas espermatecais e epitélio espermatecal de <i>Centris (ptilotopus) scopipes</i> , <i>Bombus morio</i> e <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	27
4.3 Discussão.....	31
4.4 Morfologia geral e histoquímica da glândula de muco de <i>Bombus morio</i>	32
4.5 Morfologia geral e histoquímica da glândula de muco de <i>C. (ptilotopus) scopipes</i>	34
4.6 Morfologia geral e histoquímica das vesículas e dutos vesiculares de <i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	35
4.7 Discussão.....	37
4.8 Análises moleculares.....	38
4.9 Discussão.....	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICE A.....	53
APÊNDICE B.....	54
APÊNDICE C.....	55

APÊNDICE D.....	56
APÊNDICE E.....	57
APÊNDICE F.....	58
APÊNDICE G.....	59
APÊNDICE H.....	60
APÊNDICE I.....	61
APÊNDICE J.....	62
APÊNDICE K.....	63
APÊNDICE L.....	64
APÊNDICE M.....	65
APÊNDICE N.....	66
APÊNDICE O.....	67
APÊNDICE P.....	68
APÊNDICE Q.....	69
APÊNDICE R.....	70
APÊNDICE S.....	71
APÊNDICE T.....	72
APÊNDICE U.....	73
APÊNDICE V.....	74
APÊNDICE W.....	75
APÊNDICE X.....	76
APÊNDICE Y.....	77
APÊNDICE Z.....	78
APÊNDICE AA.....	79
APÊNDICE BB.....	80
APÊNDICE CC.....	81
APÊNDICE DD.....	82

APÊNDICE EE.....	83
APÊNDICE FF.....	84
APÊNDICE GG.....	85
APÊNDICE HH.....	86
APÊNDICE II.....	87
APÊNDICE JJ.....	88
APÊNDICE KK.....	89
APÊNDICE LL.....	90

1. INTRODUÇÃO

As abelhas apresentam espécies com vários níveis de sociabilidade, desde solitárias até o mais complexo grau de organização eussocial, havendo variações entre estes dois extremos (WILSON, 1971; MICHENER, 2000).

As abelhas solitárias não formam colônias perenes, não há castas e tampouco sobreposição de gerações e cuidados parentais (WILSON, 1971). As fêmeas se acasalam, ovipositam e, juntamente com o ovo, depositam certa quantidade de alimento para o desenvolvimento do imaturo, depois de feito isso, operculam a entrada do ninho. As larvas eclodem dos ovos após a embriogênese, e, posteriormente, os adultos emergem depois da metamorfose das larvas. As fêmeas adultas são fecundadas e começam a busca pelo local adequado para ovipositar ou mesmo utilizam os ninhos pré-existentes. Em geral uma fêmea solitária constrói de seis a 15 ninhos, todos revestidos com material secretado pela glândula de Dufour. Esta secreção, em contato com o ar, polimeriza-se, formando um revestimento impermeável semelhante a um celofane, protegendo o imaturo em desenvolvimento das ações externas e microrganismos (HEFETZ *et al.*, 1979).

Centris (ptilotopus) scopipes, abelha solitária, utiliza de termiteiros arborícolas e epígeos para nidificar. A fêmea passa a maior parte do tempo coletando pólen e óleos florais, posteriormente misturados e depositados em cada célula construída, formando uma massa pastosa homogênea. A edificação das células de cria ocorre de maneira ascendente, de forma tal que as larvas mais jovens ficam nas células mais distantes da entrada. O número de galerias pode variar, ainda que apenas uma, com células mais próximas ao canal de entrada, sejam mais comuns. O período de desenvolvimento das larvas até eclosão sugere a existência de apenas uma geração ao ano (GAGLIANONE, 2001).

Nas abelhas primitivamente eussociais a diferenciação das castas se faz através de uma rainha dominante, não havendo, no que se sabe da biologia destas abelhas até o momento, controle feromonal. A dominância das rainhas nas abelhas primitivamente eussociais, como *Bombus*, é feita através do combate físico que leva à subordinação das outras abelhas da colônia, a qual não é perene, como nos Apini e Meliponini. Neste caso há dois tipos de fêmeas, grandes e pequenas. Todas as fêmeas grandes das colônias, em princípio, podem se

acasalar e por ovos férteis, só não o fazem devido à coerção daquela que se estabeleceu como rainha. As operárias, então se dividem em grandes e pequenas sendo que as grandes não apresentam diferenças morfológicas acentuadas com relação à rainha (GARÓFALO, 1978).

Em *Bombus terrestris*, as rainhas fundam o ninho e quando dele emergem as primeiras operárias, começa a fase social da colônia, a qual é afetada quando a rainha começa a ovipositar ovos haploides que originarão machos. É neste momento que a rainha perde a dominância, havendo combate físico por parte das operárias, as quais também começam a ovipositar em novos alvéolos ou mesmo nos alvéolos contendo ovos da rainha, após comê-los. Este período foi chamada de "*competition point*" por Duchateau e Velthuis (1988). Após esta fase que culmina com a total eliminação da rainha fundadora, havendo rainhas (fêmeas maiores) na colônia, estas se acasalam e, posteriormente ao período de hibernação, fundarão outro ninho. Não se sabe ao certo o que provoca a oviposição de machos pela rainha e tampouco se a alimentação é o único e exclusivo fator desencadeador do desenvolvimento larval da rainha.

Processo semelhante ao observado para *B. terrestris* ocorre com as colônias de *Bombus morio*. Definido o local para fundação do ninho, a rainha constrói um pote de cera para guardar o néctar coletado, construindo, posteriormente, sua primeira célula de cria. Após as larvas eclodirem, a rainha mantém o papel de operária, coletando pólen para alimentar os imaturos que constituirão as primeiras operárias da fase social do ninho. Esta função é suprimida conforme as operárias eclodem. A rainha, então, dedica-se exclusivamente a postura de novos ovos, ainda que de maneira lenta, em intervalos variando de dois a 11 dias. Conforme a colônia cresce, a postura de ovos também aumenta, podendo ocorrer oviposição em duas células em um único dia. Com um número alto de operárias e consequente aumento da colônia, a dominância da rainha sobre as mesmas diminui. Neste momento, operárias poedeiras começam a construção de células e oviposição. Com o intuito de manter sua dominância, a rainha torna-se agressiva e hostil, passando a agredir as operárias, destruindo seus alvéolos ou mesmo comendo os ovos não ovipositados por ela. O mesmo ocorre com as operárias poedeiras com relação aos ovos postos pelas rainhas e por outras operárias. Porém, impedir o desenvolvimento dos ovos das operárias da colônia torna-se extremamente difícil, e nesta fase, agressões entre as próprias operárias começam a ocorrer. Neste período surgem os primeiros machos e as novas rainhas, interrompendo a produção de operárias. As novas rainhas serão produzidas pela rainha original, enquanto os machos serão produzidos por ela e também pelas operárias poedeiras. Com quatro dias de idade, os machos saem para o campo e

não mais retornam. As novas rainhas podem vir a abandonar a colônia para estabelecer seus próprios ninhos, podem realizar trabalhos na colônia como se fossem operárias ou mesmo iniciar posturas no ninho materno, após acasalarem. Antes ou após a emergência das novas rainhas, a rainha velha é morta pelas operárias. Com a produção de novas rainhas, as operárias restantes morrem e a colônia perece, podendo ser reativada por uma das novas rainhas. No caso de mais de uma rainha iniciar postura dos ovos no ninho materno, a disputa pelo mesmo irá ocorrer, restando ao final, apenas uma (GARÓFALO, 2013).

Nas colônias de espécies eussociais avançadas o tempo de sobrevivência das rainhas é longo, devido à complexa estrutura social existente. As operárias não só estruturam e cuidam da manutenção do ninho, como o protegem de pragas e o mantêm em temperatura e umidade constantes. Somado ao supracitado, o suprimento e armazenamento contínuo de alimento faz com que as rainhas possam viver por longos períodos, variando de quatro a oito anos. Nos meliponíneos há ainda o oferecimento de ovócitos não funcionais, ou ovos tróficos, produzidos pelas operárias e ofertados ritualmente à rainha, o que representa uma enorme complementação da sua dieta (CRUZ-LANDIM, 2008). Por estes motivos, as rainhas das abelhas eussociais avançadas que se acasalam só uma vez (meliponíneos) armazenam espermatozoides dentro da espermateca, mantendo-os viáveis por anos (CRUZ-LANDIM, 2002; CRUZ-LANDIM, 2008). Este fenômeno não acontece somente nas abelhas, mas nos insetos sociais em geral (KELLER & GENOUD, 1997).

Nos meliponíneos as células de cria são iguais para operárias, zangões e rainhas, sendo que a determinação de castas é genético-alimentar e em algumas espécies, como *Melipona bicolor* Lep., mais de uma rainha fisogástrica pode coexistir na colônia (AIDAR, 1996).

Constituinte do aparelho reprodutor feminino (Fig. 1), a espermateca, órgão de origem ectodérmica, consiste de uma bolsa formada por um epitélio simples de células colunares, revestidas por uma espessa cutícula. As células epiteliais apresentam uma grande quantidade de invaginações da membrana plasmática basal, as quais se aprofundam até cerca da metade do comprimento total das células, originando um labirinto basal desenvolvido, que à microscopia óptica se apresenta como uma região mais clara e que se separa facilmente da porção médio apical do epitélio (CRUZ-LANDIM, 2002). Este órgão é responsável por armazenar os espermatozoides após o acasalamento da fêmea para posterior fecundação dos ovócitos. À medida que os ovócitos tornam-se maduros no final do vitelário e prontos para serem fertilizados, eles passam pelo oviduto comum (ou vagina, na porção proximal, nas

abelhas) de tal modo que na câmara genital (ou bolsa copuladora, nas abelhas) ficam posicionados com o lado da micrópila direcionado à abertura do duto ejetor da espermateca, graças a uma estrutura especial chamada válvula sanfonada. Esta dará apoio e direcionará o ovócito, que ao ser fecundado, será eliminado diretamente da câmara genital (KERR E LELLO, 1962; SNODGRASS, 1956).

Para alguns autores, a espermateca é simplesmente um órgão de reserva de espermatozoides, não tendo atividade secretora (CAMARGO & MELLO, 1970; CRUZ-LANDIM, 2002; CRUZ-LANDIM *et al.*, 2003), diferentemente do observado em algumas espécies de formigas, onde o epitélio interno da espermateca mostra-se produtor de secreção e em algumas espécies em que o epitélio espermatecal é muito desenvolvido, parece não ocorrer a existência de glândulas espermatecais (ORTIZ & CAMARGO-MATHIAS, 2006; ORTIZ, 2007).

Associada à espermateca existe um par de glândulas chamadas glândulas espermatecais. Estas glândulas são constituídas por um aglomerado de células glandulares da classe III de Noirot & Quenedey (1991), ou seja, são células secretoras que apresentam um canalículo intracelular (ou coletor) formado por uma invaginação da membrana plasmática. A secreção produzida por estas células primeiramente é armazenada nestes canalículos intracelulares que se conectam a um segundo grupo de canalículos, produzidos por um tipo de célula chamada célula formadora do canal. Este segundo canalículo, o canalículo excretor, conduz a secreção do canalículo intracelular para o exterior do corpo, reservatórios ou para outros órgãos, neste caso para o interior da espermateca (SNODGRASS, 1956; ABDALLA & CRUZ-LANDIM, 2002; CRUZ-LANDIM, 2008, CRUZ-LANDIM & SERRÃO, 2002).

O fluido das espermatecas em rainhas fecundadas de *A. mellifera* possuem uma alta concentração de íons potássio (K⁺), fazendo com que o pH do conteúdo luminal da espermateca seja alcalino e, conseqüentemente, mantendo os espermatozoides em níveis metabólicos muito baixos (GESSNER, 1973; VERMA, 1973; KLENK *et al.*, 2004). De acordo com Den Boer *et al.* (2009) componentes proteicos existentes no fluido luminal da espermateca (cerca de cinco a 10 mg/mL) podem ter papel na manutenção dos espermatozoides em *A. mellifera*. Segundo Den Boer *et al.* (2009) o conteúdo seminal dos machos também contribuiria para a manutenção dos espermatozoides na espermateca, fato ainda não comprovado até o presente momento.

Em alguns insetos as glândulas espermatecais estão ausentes, (SOUZA *et al.*, 2012). Sua secreção pode servir simplesmente para lubrificar o ducto da espermateca (VAN WICK, 1952) ou estar envolvida na ativação e/ou nutrição dos espermatozoides (FLANDERS, 1939; SNODGRASS, 1933; SOUZA *et al.*, 2008). O epitélio espermatecal não é formado por células da classe I de Noirot & Quennedey (1991) e sim por células glandulares da classe III. Porém, parece haver uma íntima entre estas células e a cutícula muito fina que rodeia o lúmen das espermatecas destes insetos (SOUZA *et al.*, 2008).

O aparelho reprodutor masculino dos insetos é constituído por um par de testículos, conectados a um ducto ejaculador através de vasos seminíferos. Os vasos seminíferos são ductos sinuosos que partem de cada testículo, confluindo em ductos maiores e dilatados chamados vesículas seminais.

Assim como as fêmeas, os machos possuem glândulas associadas ao aparelho reprodutor (Fig. 2), com exceção dos Meliponini (ARAÚJO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2004). As glândulas acessórias masculinas ou glândulas de muco, quando existentes, estão associadas ao trato reprodutivo dos insetos em geral, produzindo secreções que serão adicionadas ao esperma. Quando estas glândulas acessórias são ausentes, células glandulares oriundas das vesículas seminais, canal deferente ou ducto ejaculatório, acabam por desempenhar sua função (DALLACQUA & CRUZ-LANDIM, 2003). O órgão intromitente do macho, também chamado de pênis, ao ser inserido na vagina da fêmea, fica firmemente acoplado ao aparelho genital feminino através de espículas e outras ornamentações da cutícula, liberando um líquido viscoso com espermatozoides. Estes migram da câmara genital e se encaminham para o ducto espermatecal, chegando à espermateca. A válvula genital do aparelho reprodutor feminino impede a entrada dos espermatozoides no ducto comum e, ao mesmo tempo, os direciona para a entrada da espermateca (CRUZ-LANDIM, 2002).

As vesículas seminais de cada um dos dois testículos convergem para um ducto ejaculador comum. As glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino podem desembocar nos vasos deferentes (mesadênia) ou no ducto ejaculador (ectadênia). No primeiro caso, geralmente, constituindo-se em expansões ou divertículos dos vasos deferentes, tem origem mesodérmica (FERREIRA *et al.*, 2004; CRUZ-LANDIM, 2008).

As glândulas acessórias variam de tamanho e morfologia conforme as espécies das abelhas, podendo ser utilizadas para classificação filogenética do grupo. De acordo com Ferreira *et al.* (2004) não parece estar clara a total predominância de glândulas de origem

mesodérmica. Com exceção das nativas sem ferrão, ou meliponíneos, as glândulas acessórias parecem estar presentes em todos os machos das espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM, 2008).

Em *Apis cerena indica* as glândulas de muco completam seu desenvolvimento no final da fase de pupa, sendo que os machos se tornam aptos a se reproduzirem entre oito a 10 dias após emergirem, período em que as glândulas de muco estão completamente preenchidas com secreção (SAWARKAR & TEMBHARE, 2010). Processo semelhante ocorre com *Apis mellifera* (Apidae), onde os machos das abelhas atingem a maturação sexual ao redor do décimo segundo dia de vida adulta, quando estão prontos para o acasalamento, porém a glândula acessória já possui seu lúmen repleto de secreção viscosa ao nono dia de vida do macho adulto (TOZETTO *et al.*, 2007). Durante o acasalamento o endófalo do macho começa a ser evertido dentro da câmara genital da fêmea e quando atinge metade da sua capacidade, o esperma é injetado dentro da vagina (MINDT, 1962; WOYKE, 1958; KOENIGER *et al.*, 1991). Quando o endófalo está totalmente evertido e, aparentemente após a passagem de todo o esperma, as fibras musculares que envolvem as glândulas acessórias dos machos contraem-se e liberam a secreção glandular na câmara genital da fêmea (KOENIGER, 1984; RUTTNER, 1957). Esta secreção, em contato com o ar, imediatamente enrijece-se, ficando muito mais viscosa do que quando está contida nas glândulas acessórias (BISHOP, 1920). Neste sentido, uma das hipóteses para a função da secreção das glândulas de muco é produzir um tampão para impedir o acasalamento da fêmea com outros machos (KOENIGER, 1986).

Segundo Koeniger *et al.* (1991) em *A. mellifera* há glândulas especiais na região dos cornos do endófalo. Tais glândulas, juntamente com a secreção da glândula de muco, sinalizariam que a fêmea foi acasalada, pois após o acasalamento, a secreção destas duas glândulas é depositada no abdômen da fêmea, porém, isto não ocorre para todas as subespécies de *A. mellifera* (KOENIGER *et al.*, 1991; KOENIGER *et al.*, 1996). Em *B. terrestris* a secreção da glândula acessória masculina também produz um tampão para impedir múltiplos acasalamentos da fêmea. Estudos da natureza química da secreção revelaram que ela contém, dentre quatro tipos de ácidos graxos e um peptídeo cíclico, um ácido graxo muito eficaz para a sinalização da fêmea acasalada e previne de alguma maneira, o acasalamento múltiplo. Tal substância é um ácido graxo de cadeia longa, denominado ácido linoléico e funciona como um feromônio (BAER *et al.*, 2001).

Porém, há controvérsias sobre a eficácia ou garantia da inseminação da fêmea através deste processo, que envolve tanto a sinalização como a função de tampão da secreção das glândulas acessórias, especialmente em *Apis*, gênero mais estudado quanto a este aspecto da biologia reprodutiva (MIKHEYEV, 2004). O fato de haver espécies deste gênero que não se utilizam da glândula cornual, da secreção da glândula de muco sofrer mudanças de viscosidade até os machos estarem maduros sexualmente (BISHOP, 1920; MINDT, 1962) e também de apresentar variação no conteúdo proteico ao longo do período de recém-emergência até a maturação sexual (COLONELLO & HARTFELDER, 2003; COLONELLO & HARTFELDER, 2005), lança dúvidas sobre a eficácia da secreção como um tampão do aparelho reprodutor feminino e da sua capacidade de sinalização feromonal. Além disto, *A. mellifera* apresenta acasalamentos múltiplos (MOORS *et al.*, 2005).

Apesar de vários estudos sobre glândulas acessórias em insetos e, mais especificamente em abelhas, não se sabe com exatidão suas reais funções. Nas abelhas, é atribuída à secreção da glândula acessória masculina o papel de produzir o material que realizará a obstrução do trato genital feminino após a cópula, impedindo o refluxo do sêmen (BISHOP, 1920).

De acordo com Colonello & Hartfelder (2003; 2005), peptídeos encontrados na glândula de muco dos machos adultos de *A. mellifera* africanizada têm papel na ativação da vitelogenese dos ovários de rainhas fecundadas.

Nas abelhas solitárias não há quase estudos sobre a histologia, desenvolvimento, composição química e função das glândulas acessórias. Pelo exposto, ainda não há consenso da função destas glândulas nas abelhas sociais e eussociais, em especial *A. mellifera*. Para Moors *et al.* (2005), a produção de secreção da glândula de muco é muito superior a sua utilização. Além disto, aventa-se que na ausência da glândula acessória nos machos dos meliponíneos, as vesículas seminais e o duto ejaculador podem exercer tal função, devido à observação de áreas hipertrofiadas no seu epitélio e mecanismo de secreção apócrina o que pode indicar regiões de células especializadas ao longo do tecido de revestimento destas estruturas (DALLACQUA & CRUZ-LANDIM, 2003; CRUZ-LANDIM & DALLACQUA, 2005; RIVERA *et al.*, 2012).

Apesar da importância dos estudos comparados com abelhas nativas de diferentes níveis de organização social e, conseqüentemente, com diferentes estratégias reprodutivas, há falta de dados sobre a estrutura e função dos órgãos acessórios, bem como de suas secreções,

que compõem o sistema reprodutor das abelhas. Portanto, faz-se necessário um estudo mais detalhado destes órgãos em abelhas nativas solitárias, eussociais primitivas e eussociais avançadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar se as diferenças de organização social e estado reprodutivo, em três espécies de abelhas com níveis diferentes de sociabilidade – *Centris (ptilotopus) scopipes* (solitária), *Bombus morio* (primitivamente eussocial) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (eussocial avançada) se refletem em diferenças no tipo de fluido contido nas espermatecas, na secreção produzida pelas glândulas espermatecais das fêmeas e pelas glândulas de muco dos machos. Contribuir para o conhecimento de como a espermateca, juntamente com suas glândulas espermatecais, armazenam e conservam os espermatozoides, fornecendo assim, subsídios para o melhor conhecimento da função destes órgãos diretamente ligados ao processo reprodutivo e de desenvolvimento das abelhas.

2.2 Específicos

1. Realizar uma análise histológica comparada da morfologia geral das espermatecas, glândulas espermatecais e glândulas de muco (glândulas acessórias), através de microscopia óptica de rotina, em fêmeas virgens e acasaladas, e machos de *C. (ptilotopus) scopipes* (solitária), *B. morio* (primitivamente eussocial) e *M. quadrifasciata anthidioides* (eussocial avançada).
2. Realizar testes histoquímicos para verificar a natureza da secreção e a atividade metabólica das espermatecas, glândulas espermatecais e glândulas de muco de *C. (ptilotopus) scopipes*, *B. morio* e *M. quadrifasciata anthidioides*.

3. Realizar um estudo comparado do padrão eletroforético das proteínas de homogenados das glândulas espermatecais, das espermatecas e das glândulas acessórias em machos, fêmeas virgens e acasaladas de *C. (ptilotopus) scopipes*, *B. morio* e *M. quadrifasciata anthidioides*, por meio do método de SDS-PAGE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas

As coletas foram realizadas em fragmentos de floresta estacional semidecidual e cerrado (Fig. 3), de dezembro de 2011 a maio de 2012, totalizando 24 saídas a campo (23°34'53.1"S; 47°31'29.5"O). No total foram coletadas 31 espécimes de *C. (ptilotopus) scopipes*, sendo 15 fêmeas fecundadas, duas fêmeas virgens e 14 machos e 78 espécimes de *B. morio*, sendo quatro fêmeas fecundadas, 53 fêmeas virgens e 21 machos (Tabela 1), todas capturadas em voo com auxílio de rede entomológica. As abelhas *M. quadrifasciata anthidioides* foram coletadas de duas colônias cedidas pelo Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa e mantidas nas proximidades do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF - UFSCar, campus de Sorocaba, SP). Destas, retirou-se duas rainhas fisogástricas, uma de cada colônia e uma rainha virgem, além de 34 machos.

Como mostrado na Tabela 1, nem todos os exemplares de fêmeas virgens e fecundadas foram adquiridos. Apesar da literatura não estabelecer um número mínimo necessário de indivíduos de cada uma das espécies aqui estudadas para uma melhor visualização em gel de SDS-PAGE, optou-se por realizar testes moleculares com grupos de interesse maiores do que 10 indivíduos.

3.2 Preparo do material – Histologia e Histoquímica

Após coletadas, as abelhas foram transferidas para vidros âmbar e deixadas 5 min. a 4°C para evitar qualquer efeito de estresse. As glândulas acessórias e as espermatecas de fêmeas virgens e fecundadas foram dissecadas, fixadas em paraformaldeído a 4% e separadas de acordo com a espécie (Fig. 4). O mesmo procedimento foi efetuado para as glândulas de muco, com exceção dos machos de *M. quadrifasciata anthidioides*. Por não possuírem

glândulas de muco, suas vesículas seminais, que supostamente desempenham a mesma função destes órgãos (CRUZ-LANDIM, 2002; RIVERA *et al.*, 2012), foram dissecadas, assim como seus testículos.

Decorrida a desidratação e a fixação, o material foi incluído em resina JB - 4 (Polysciences) de acordo com as recomendações do fabricante. A resina foi polimerizada à temperatura ambiente. Cortes histológicos de 2 μm de espessura foram feitos em micrótomo Leica® (RM 2255). O material foi analisado em fotomicroscópio Leica® (DM 1000).

3.2.1 Técnica da Hematoxilina e Eosina (Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

Esta técnica baseia-se em corar, por diferentes afinidades específicas, os compostos ácidos e os básicos. Os compostos ácidos (denominados basófilos) coram-se de roxo, devido sua afinidade com o corante Hematoxilina. Já os compostos básicos (acidófilos) coram-se de rosa, pois possuem afinidade com o corante Eosina. As lâminas com material de interesse, foram hidratadas, coradas com hematoxilina de Harris e Eosina aquosa, por 10 e 5 minutos, respectivamente. As lâminas, secas, foram montadas em Permount (Fisher®).

3.2.2 Técnica do Azul de Bromofenol (Segundo PEARSE, 1985 – modificada) – Investigação de proteínas totais

Não se sabe o mecanismo exato da ação química entre o Azul de Bromofenol e as proteínas. Portanto, esta técnica não deve ser considerada uma técnica histoquímica. Com uso de corante, o pH deve ser neutro. Neste pH o corante tem afinidade para proteínas. Também é utilizado como indicador de pH em géis de eletroforese. Quando positivo ao corante o material apresenta uma cor azul escura.

As lâminas com material de interesse foram hidratadas durante 30 minutos em água destilada a 50 °C. Em seguida, incubadas no escuro em solução de Azul de Bromofenol com pH neutro, por 2 horas. Após, lavadas em água corrente por 30 minutos, sem posterior banho com ácido acético, uma vez que o corante utilizado foi da marca Merck®. As lâminas, secas, foram montadas em Permount (Fisher®).

3.2.3 Técnica do Sudan Black para Lipídios - (Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983 – técnica adaptada para historesina, ABDALLA - dados não publicados).

O corante Sudan Black é um corante, solúvel em lipídios, com grupamento diazo. É mais comumente utilizado para corar material através de métodos de congelamento, porém pode-se utilizá-lo para cortes em historesina. Grupamentos lipídicos são corados de magenta ou vermelho escuro pelo Sudan Black.

As lâminas com os materiais de interesse foram hidratadas durante 30 minutos em água destilada a 50 °C, lavadas rapidamente em álcool 70% e coradas em solução alcoólica de Sudan Black a 1% por 10 minutos. Lavadas rapidamente em álcool 70%, novamente e, após, em água destilada. As lâminas, secas, foram montadas em Permount (Fisher®).

3.2.4 Técnica do Ácido Periódico Schiff (PAS) (Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983 – modificada) – Glicoconjugados neutros – Glicogênio (quando não tratado com amilase) e Glicoproteínas

Esta técnica baseia-se na capacidade do ácido periódico criar grupamentos aldeídicos em carboidratos e polissacarídeos com grupamento 1,2 glicol (hexoses adjacentes com grupamentos hidroxila e amina), que apresentam hidroxilas vicinais, susceptíveis a oxidação por ácido periódico. Os aldeídos são ligados especificamente ao reagente de Schiff, produzindo uma cor magenta ou um rosa escuro.

As lâminas com os materiais de interesse foram hidratadas durante 30 minutos em água destilada a 50°C. Imediatamente após a hidratação, incubadas em ácido periódico (Merck®) a 1% durante 20 minutos no escuro. Decorrido este período, lavadas em água corrente e colocadas no reativo de Schiff (Merck®) por 30 minutos no escuro. Posteriormente, deixadas as em água corrente por mais 20 minutos. As lâminas, secas, foram montadas em Permount (Fisher®). O material não foi contra corado com Hematoxilina, pois o controle constituiu-se de lâminas com secções de mesmo nível de corte coradas com Hematoxilina e Eosina.

3.2.5 Técnica da Variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (Segundo MELLO *et al.*, 1993 – modificada) – Análise do metabolismo nuclear

Baseado no fato de que o ponto de CEC (Concentração Crítica de Eletrólitos), onde ocorre à abolição da metacromasia, é sempre menor no RNA do que no DNA, utiliza-se uma variante do método de CEC, onde o tratamento com Mg^{+2} não é simultâneo, mas posterior à coloração com Azul de Toluidina, pH 2,4. Desta maneira, o cátion Mg^{+2} extrai o azul de toluidina dos sítios de ligação do DNA. Sob estas condições, enquanto ocorre a abolição da metacromasia do DNA, que se cora em verde, o RNA permanece metacromático (azul ou violeta).

As lâminas com os materiais de interesse foram coradas com 0,025% de Azul de Toluidina em tampão McIlave, pH 4,0, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Depois, transferidas diretamente para solução aquosa de $MgCl_2$ 0,05M, onde permaneceram por diferentes tempos (3, 5, 7, 10, 13 minutos), até atingir o “ponto crítico ou de CEC”. A seguir, lavadas em água destilada para retirar todo o sal (três vezes) e secas à temperatura ambiente, no escuro. As lâminas foram montadas em Permount (Fisher®), analisadas e fotografadas no mesmo dia, devido à possibilidade de degradação do RNA.

3.3 Preparo do material - Molecular

3.3.1 Extração proteica

Os órgãos de interesse não utilizados para microscopia de luz e histoquímica, foram separados por espécie e estados fisiológicos e transferidos para tubos de microcentrífugas contendo 50 μL de tampão TRIS-HCl pH 7,5, 0,1 M, acrescido de coquetel antiprotease. Estes foram mantidos em freezer (-20°C), até o momento da preparação dos extratos, imersos em TRIS-HCl pH 7,5 e anteprotease.

Com auxílio de pistilo de plástico as amostras foram maceradas e centrifugadas a 6000 RPM, por 15 minutos a 4°C . Do sobrenadante contendo proteínas solúveis, 25 μL de um total de 50, foi utilizado nos ensaios de quantificação de proteínas totais e eletroforese.

3.3.2 Quantificação proteica

Os 25 μL , separados do sobrenadante total de cada amostra, foram adicionados em 1,25 mL de reagente colorido. Após deixar a amostra em temperatura ambiente por 5 minutos, as absorbâncias da solução foram medidas em triplicatas, a 595 nm. A quantidade proteica total foi determinada para o sobrenadante de cada amostra, por meio do método de Bradford (1976). Este método é baseado em medições da absorbância de diferentes concentrações de uma proteína padrão, neste caso o BSA (soro albumina bovina), com reagente colorido, em espectrofotômetro. A partir destas medições, feitas em triplicata a 595 nm, foi possível elaborar uma curva padrão de absorbância por diluição de BSA em um gráfico (Fig. 5), através de extrapolação linear. Calculando-se o fator da curva padrão, chegou-se ao valor de 1,48, aproximadamente. Este valor, multiplicado pelas médias das absorbâncias das amostras de interesse, resultou nas concentrações proteicas das mesmas (Tabela 2).

3.3.3 Eletroforese em Gel de SDS (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida 10% foi preparado misturando-se 4 mL de água ultrapurificada, 3,3 mL de acrilamida, 0,1 mL de SDS 10%, 2,5 mL de solução de TRIS-HCl 1.5M pH 8.8, 50 μ L de persulfato de amônio 1,5% e 5 μ L de Temed®. As alíquotas (25 μ L) contendo as amostras de macerados de espermatecas, glândulas acessórias, glândulas de muco e vesículas seminais, foram diluídas em tampão de amostra (25 μ L) e aquecidas a 95°C por 5 minutos em uma chapa de aquecimento, totalizando 50 μ L por amostra.

3.3.4 Coloração por Comassie Brilliant Blue

Os géis previamente preparados foram colocados em uma cuba de eletroforese e imersos em tampão de corrida. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese por um período de 60 minutos, sob a tensão de 150 V. Decorrido o tempo, os géis foram retirados e imersos em solução corante Comassie Brilliant Blue, sob leve agitação, por aproximadamente 60 minutos. Logo após, ainda sob leve agitação, foi adicionado solução descorante, sendo trocada a cada 20 minutos, até a visualização das bandas de proteína nos géis. Por fim, os géis foram retirados da solução e envolvidos em papel celofane.

3.3.5 Coloração por Nitrato de Prata

Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi imerso por 10 minutos em solução fixadora (40% de metanol e 13,5% de formalina). O gel foi lavado duas vezes por 5 minutos em água e posteriormente, imerso por 1 minuto em solução de 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Após, o gel foi novamente imerso e lavado em água por 20 segundos. Por 10 minutos o gel foi deixado em solução de 0,1% AgNO_3 . Após uma nova lavagem foi imerso em solução de desenvolvimento (3% de carbonato de sódio, 0,05% de formalina e 0,000016% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e em seguida em

uma nova solução de desenvolvimento, acrescentando formalina (solução comercial de 37% de formaldeído), até o aparecimento de bandas com intensidade satisfatória (3 minutos). Para bloquear a reação, foi adicionado 6g de ácido cítrico sólido sob agitação por 10 minutos e lavado em água pelo mesmo período. O gel foi deixado de molho por 30 minutos, antes da secagem.

3.3.6 Distância de migração das bandas no gel

Com o intuito de se obter os pesos moleculares das bandas desconhecidas apresentadas nos géis, realizou-se o cálculo do fator de retenção (RF), ou fator de mobilidade das bandas. Através do padrão utilizado (Colorplus™, 10-230kDa), sabendo-se o tamanho do gel e as distâncias percorridas por cada banda verticalmente, é possível chegar a esta variável:

$$\text{Fator de retenção} = \frac{\text{distância de migração da banda}}{\text{tamanho do gel}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da morfologia geral do aparelho reprodutor feminino de *Centris (ptilotopus) scopipes*, *Bombus morio* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*

O conjunto de ovariolos de um ovário forma o ducto lateral. Os ovidutos laterais de cada ovário se fusionam e formam o oviduto médio ou comum, o qual se abre na câmara genital (Fig. 6). Acima da câmara genital em sua porção distal (no sentido oposto da cabeça) localiza-se a espermateca que é uma estrutura esferóide, menor nas abelhas solitárias e eussociais primitivas, com diâmetros de aproximadamente 350 μm em *C. (ptilotopus) scopipes* e 360 μm em *B. morio*, em comparação com as eussociais avançadas (aproximadamente 405 μm em *M. quadrifasciata anthidioides*). Nas abelhas estudadas, dorso lateralmente à espermateca encontra-se duas estruturas esferoidais na sua porção proximal, que são as glândulas espermatecais, apresentando diâmetro aproximado de 200 μm para as três espécies.

A espermateca é uma estrutura esférica formada por uma camada simples de células epiteliais, porém ao contrário do relatado por autores em outras espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM, 2008), as células do epitélio espermatecal são colunares e não cuboidais (Fig. 7). Todo o epitélio é revestido por espessa cutícula. Ao esteriomicroscópio é possível observar o epitélio espermatecal rodeando um lúmen translúcido em fêmeas virgens, já nas fêmeas acasaladas, o lúmen é constituído de material escuro (marrom), indicando que o lúmen encontra-se repleto de espermatozoides imersos em fluido. À microscopia de luz, as fêmeas acasaladas apresentam o lúmen com uma massa de espermatozóides enovelados aparentemente de forma organizada, embebidos numa matriz amorfa, ou dispostos aleatoriamente preenchendo todo o conteúdo luminal (Fig. 8).

As células epiteliais que formam a parede da espermateca são polarizadas, apresentando na porção basal extenso dobramento da membrana plasmática, formando um labirinto basal (Fig. 9) deslocando os núcleos celulares para a porção mediana da célula, como já relatado para outras espécies de abelhas (para revisão consultar CRUZ-LANDIM, 2008). O labirinto basal muitas vezes provoca um artefato no material, rompendo o epitélio ao meio.

Na região apical é possível notar que há também um intenso dobramento da membrana plasmática, seguido de material acumulado no espaço subcuticular e, aparentemente atravessando a cutícula. Estes dados também corroboram a tese de que a espermateca pode ser um órgão não só armazenador de espermatozoides, mas ativo contribuinte do fluido espermatecal por captar substâncias da hemolinfa (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002).

De uma forma geral, as glândulas espermatecais não diferiram morfológicamente entre as espécies estudadas. Constituem-se num par de aglomerados de poucas células da classe III de Noirot & Quennedeu (1991). Os canalículos excretores desembocam num ducto formado por células do ducto comum e são rodeados por uma grande massa de fibras musculares viscerais concêntricas a este ducto comum. A porção do ducto que desemboca na espermateca é tangencial a ela e constitui-se de um epitélio simples de células achatadas.

4.2 Análises histoquímicas das glândulas espermatecais e epitélio espermatecal de *Centris (ptilotopus) scopipes*, *Bombus morio* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Ácido Periódico Schiff (PAS)

Todos os componentes das glândulas espermatecais dos indivíduos analisados indicaram negatividade à reação de PAS. Em fêmeas virgens e fecundadas de *B. morio*, fêmeas fecundadas de *C. (ptilotopus) scopipes* e fêmeas virgens e fecundadas de *M. quadrifasciata anthidioides*, o PAS demonstrou que a secreção das glândulas espermatecais e do conteúdo luminal da espermateca apresentam leve positividade aos glicoconjugados neutros, considerando-a negativa, pois a coloração da secreção confunde-se muitas vezes com o background produzido pela resina. Alguns autores (CRUZ-LANDIM, 2008) confundem positividade do epitélio espermatecal e das células glandulares com positividade do conteúdo luminal e da secreção glandular, respectivamente. É de se esperar que as células possuam glicoconjugados neutros em seu citoplasma, os quais podem fazer parte das glicoproteína e glicolipídios utilizados no metabolismo e mecanismos de síntese de secreção da célula, ou mesmo acúmulo de glicogênio no citoplasma. Portanto, depósitos de glicoconjugados neutros

no interior da célula não são garantia de que estas os estão produzindo para secretar. Por outro lado, se a atividade secretora da glândula for cíclica, pode-se aventar que a positividade das células glandulares ao PAS indica início de produção e acúmulo de glicoconjugados neutros para serem posteriormente liberados aos canalículos intracelulares e coletores. O que não parece ser o caso das abelhas estudadas. Através do exame com cuidado da Figura 10, observa-se que os canalículos intracelulares das glândulas espermatecais estão muito abertos, o que indica alta atividade de síntese de substâncias, assim como o epitélio espermatecal, colunar com um extenso labirinto basal, já mencionado no tópico acima. Porém as granulações transparentes à luz que se observam à microscopia óptica e que equivaleriam na região basal aos espaços extracelulares entre uma invaginação e outra e na porção apical, ao espaço abaixo da cutícula (espaço subcuticular) não apresenta material corado pelo PAS. Portanto, considera-se nesta pesquisa que a tanto a glândula como o conteúdo espermatecal não apresentam positividade suficiente ao PAS para serem considerados positivos a este teste histoquímico.

Azul de Bromofenol

O epitélio da espermateca se mostrou no todo positivo ao teste com o azul de bromofenol, inclusive o citoplasma das células, evidenciando, portanto, a presença de proteínas, corroborando os achados de vários autores para diferentes espécies de abelhas (SOUZA *et al.*, 2008; CAMARGO & MELLO, 1970; Den BOER *et al.*, 2009). As glândulas espermatecais, assim como seus canalículos intracelulares também se coraram fortemente pelo azul de bromofenol, indicando que a matriz que envolve os espermatozóides na luz das fêmeas fecundadas das três espécies estudadas é protéica (Fig. 11).

Os testes com azul de bromofenol revelaram acúmulo de secreção na camada subcuticular da parede espermatecal, evidenciando um possível papel secretor destas células. Segundo Laidlaw (1944), as células da parede da espermateca são secretoras, legitimando o notado no espaço subcuticular entre o epitélio e a cutícula, sendo o mesmo relatado por Souza *et al.* (2008) e Cruz-Landim (2008) para meliponíneos, porém não testemunhado por Camargo & Mello (1970), Dallai (1975) e Kressin *et al.* (1996), para rainhas de *A. mellifera*. Porém, a atividade secretora parece ser na realidade excretora. Uma vez que as análises com a

variante do CEC mostram núcleos celulares com cromatina muito compactada, ou seja, com pouca atividade metabólica (Fig. 12). Além disto, mesmo através de microscopia óptica, podemos observar o labirinto de invaginações da membrana basal notado para todas as espécies de abelhas até o momento estudadas. Dobras profundas e numerosas da membrana plasmática basal indicam que estas células podem absorver substâncias da hemolinfa. Este fenômeno é comum nas células de origem ectodérmica em abelhas (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002) e adicionalmente na espermateca de abelhas eussociais encontraram-se ATPase e muitas mitocôndrias associadas a estas invaginações, indicando, portanto, atividade de absorção de substâncias com gasto de energia (CRUZ-LANDIM, 2008).

Os núcleos das células espermatecais, apesar de apresentarem cromatina muito compactada, não apresentando sinais de morte e/ou divisão celular, como observado por Souza *et al.* (2008) em *M. quadrifasciata anthidioides*, contrastam com as informações obtidas no trabalho de Camargo & Mello (1970), que cita a ocorrência de núcleos picnóticos no epitélio constituinte da espermateca.

As glândulas espermatecais de *C. (ptilotopus) scopipes*, bem como de *B. morio*, são positivas ao azul de bromofenol, tanto seu citoplasma, como o conteúdo do espaço intracelular e dos canalículos excretores. O que está de acordo com a literatura, ou seja, que a maior parte desta secreção é de natureza protéica. Porém, assim como as células do epitélio espermatecal, as células glandulares apresentam muitos vacúolos claros, negativos ao PAS. Se para estas espécies o pH do conteúdo luminal é neutro a básico, podemos aventar que a secreção das glândulas espermatecais também, o que é comprovado pela indicação que tanto o citoplasma das células do epitélio espermatecal como das glândulas é acidófilo, ou seja, coram-se pela eosina (Fig. 13).

Variante da CEC

O ponto crítico da CEC é definido como quando todo o DNA somente do núcleo celular tem suas moléculas de azul de toluidina substituídas pelo Mg^{+} , diz-se, neste caso, que o núcleo apresentou ortocromasia e apresentam-se verde celeste. Porém os RNAs do núcleo (nucléolo) e intracitoplasmáticos continuam com as moléculas de azul de toluidina, apresentando coloração azul. Esta técnica nos permite saber com precisão a quantidade

heterocromática do núcleo celular, como também a atividade nucleolar, pela morfologia do nucléolo (regiões fribilares e granulares) e quantidade de RNA no citoplasma da célula.

O ponto de CEC para as glândulas espermatecais foi de 3 minutos. Notou-se que neste tempo de exposição ao Mg^{+} todos os núcleos das células glandulares apresentam-se ortocromáticos, porém os das células espermatecais, não (Fig.12), isto significa, que a quantidade de heterocromatina nas células espermatecais é maior do que o das células glandulares. Os poucos núcleos ortocromáticos das células espermatecais apresentam-se bastante condensados pelo azul de toluidina sem nucléolos visíveis. Em contrapartida, através da variante da CEC observa-se que estes são formados basicamente de DNA altamente condensado, sem nucléolos aparentes. Nas células glandulares, os núcleos possuem muitos nucléolos e seu citoplasma é abundante em RNA, o que está de acordo com os achados com o teste de azul de bromofenol, ou seja, a função destas células é, principalmente, de produção de proteínas.

Os espermatozoides contidos na luz da espermateca apresentam o mesmo tempo de ortocromasia dos núcleos destas glândulas, com exceção de alguns ao meio da maioria, que se apresentam extremamente condensados, o que nos leva a concluir que a viabilidade dos espermatozoides na espermateca é cerca de 100%, pois praticamente todos os espermatozoides encontram-se no mesmo estágio de condensação cromatínica.

Sudan Black

A análise das glândulas espermatecais e da espermateca com Sudan Black, revelou que tanto as células glandulares como o epitélio espermatecal são positivos à presença de lipídios (Fig.14). Fato este plausível, uma vez que no interior das células há todo o sistema de endomembranas e organelas celulares, além dos glicolipídios intrínsecos do citoplasma das células em geral. A secreção contida nos canalículos excretores, como aquela contida no duto comum das glândulas espermatecais (que desemboca a secreção das glândulas na espermateca) corou-se fracamente pelo Sudan Black em algumas regiões de corte, assim como o lúmen da espermateca. Porém em outras é notória a atividade da secreção de lipídios pelas glândulas espermatecais.

4.3 Discussão

Constatou-se que as espermatecas das abelhas solitárias e primitivamente eussociais são muito menores do que as das abelhas eussociais avançadas. Em *C. (ptilotopus) scopipes* (solitária) como em *Bombus morio* (eussocial primitiva), a espermateca juntamente com as glândulas espermatecais localizam-se mais dorso-lateralmente, associadas à parede externa na região proximal da espermateca.

Os testes histoquímicos demonstraram que a secreção glandular e do fluido espermatecal nas fêmeas fecundadas é proteica, não contém polissacarídeos neutros, porém apresentam lipídios na sua composição. A secreção do fluido espermatecal seria produto das proteínas secretadas pelas próprias glândulas espermatecais, assim como transferidas pelos machos no momento da cópula (Den BOER *et al.*, 2009).

O exame da atividade nuclear demonstrou uma grande quantidade de RNA no citoplasma das células glandulares e núcleos descondensados. A análise do epitélio da espermateca revelou o extenso labirinto que formam as invaginações basais das células epiteliais, já relatado por alguns autores (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002). Adicionalmente, o epitélio é hipertrofiado, com células colunares que apresentam secreção na porção basal, apical, subcuticular e atravessando a cutícula, o que nos leva a supor que estas células são especializadas na captação de substâncias da hemolinfa, principalmente no que se refere aos lipídios. Este fenômeno é muito comum em células epidérmicas de abelhas. Em espécies eussociais grande quantidade de ATPase é encontrada na região basal destas células, indicando mecanismo de absorção ativa de elementos da hemolinfa (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002).

Dentre a infinidade de espermatozoides presentes no lúmen das espermatecas das abelhas estudadas, pouquíssimos apresentam alto grau de compactação cromatínica através do CEC e, portanto, provável inviabilidade, o que comprova a grande eficácia desta estrutura em manter os espermatozoides viáveis. Em *Apis mellifera* enzimas relacionadas com a proteção contra radicais livres e microrganismos já foram detectadas no fluido espermatecal, assim como alto teor de K^+ , o que leva ao aumento do pH e conseqüente diminuição do metabolismo basal dos espermatozoides (1973; VERMA, 1973; KLENK *et al.*, 2004).

4.4 Morfologia geral e histoquímica da glândula de muco de *Bombus morio*

De acordo com a classificação de Ferreira *et al.* (2004) os testículos de *Bombus morio* pertencem ao tipo III, que se caracteriza por apresentarem duas unidades testiculares não encapsuladas pela membrana escrotal. Cada unidade testicular contém um testículo, constituído de quatro túbulos seminíferos. Os dutos pré-vesiculares são mais curtos do que os pós-vesiculares e a vesícula seminal é facilmente discernível como uma protuberância globular entre os dutos e geralmente localiza-se na base do aparelho genital envolvida pela membrana escrotal. Neste tipo de testículo, as glândulas de muco são muito desenvolvidas e também não são encapsuladas pela membrana escrotal (Fig.15). Segundo Ferreira *et al.* (2004) este tipo de testículo é encontrado na espécie *B. agrorum*, por outro lado, *B. atratus* possuem testículos do tipo II. Ainda de acordo com estes autores, o testículo do tipo III parece prevalecer nas abelhas, com exceção dos meliponíneos que apresentam características testiculares muito peculiares, como ausência da glândula de muco e menor complexidade do duto ejaculatório. O não isolamento dos túbulos seminíferos e das glândulas de muco, assim como o aumento do número dos primeiros, parece ser uma tendência nas abelhas (Ferreira *et al.*, 2004).

Através da análise histológica, todo o epitélio que constitui a glândula de muco desta espécie mostra características secretoras (Fig.16). As células glandulares são colunares e na parte apical apresentam vesículas apócrinas sendo liberados na luz da glândula. O conteúdo luminal, assim como o epitélio secretor apresenta-se predominantemente acidófilo, porém na secreção há regiões basófilas. À parede epitelial externa, ao longo de toda a extensão da glândula, encontram-se fibras musculares viscerais associadas.

A histoquímica mostrou que a secreção da glândula de muco de *B. morio* é positiva para PAS (Fig. 17) e também para o Azul de Bromofenol (Fig. 18), demonstrando que a secreção é constituída de glicoconjugados neutros, além de proteínas, respectivamente. A secreção apresentou-se heterogênea, possuindo uma matriz homogênea preenchendo todo o lúmen glandular e granulações próximas à porção apical do epitélio glandular, coradas pelos métodos de rotina e histoquímicos supracitados.

As técnicas histoquímicas de PAS e Azul de Bromofenol demonstraram haver uma interposição entre o conteúdo mais fortemente corado pelo PAS e pelo Azul de Bromofenol,

isto é, a porção mais fortemente positiva ao PAS encontra-se próxima do epitélio, formando uma espécie de faixa aureolar escura ao redor da periférica no lúmen da glândula, enquanto a fracamente positiva para o Azul de Bromofenol encontra-se justaposta à mesma região mais fortemente corada pelo PAS.

Os grânulos fortemente corados pelo PAS e pelo Azul de Bromofenol podem constituir vesículas de secreção recém liberadas pelas células glandulares. O fato das mesmas vesículas serem marcadas tanto para os testes para evidenciar glicoconjugados neutros e proteínas totais indica que estes compostos são produzidos e liberados ao mesmo tempo pela célula, e se associados quimicamente, podem constituir glicoproteínas.

Em *B. terrestris* foram encontrados quatro principais ácidos graxos na secreção da glândula de muco (ácido palmítico, linoleico, oléico e esteárico), tais ácidos graxos são responsáveis pela formação do tampão (mating plug) na genitália da fêmea após a deposição do sêmen. Além disso, um peptídeo cíclico (cycloprolylproline) também foi encontrado como composto predominante da glândula de muco nos machos de *B. terrestris* (BAER *et al.*, 2000). Os peptídeos poderiam desempenhar um papel na diminuição da receptividade da fêmea fecundada a outros acasalamentos, já que o ácido linoleico, mais abundante de todos os ácidos graxos encontrados na glândula desta espécie de abelha, não surte efeito algum sobre a ativação ovariana (KOENIGER & KOENIGER, 2000; COLONELLO & HARTFELDER, 2005).

A presença de lipídios foi detectada na composição da glândula de muco de *B. morio* pela técnica de Sudan Black (Fig. 19). Pela intensidade da coloração, os lipídios e as proteínas parecem ser os componentes mais abundantes da glândula de muco desta espécie e assim como as proteínas e glicoconjugados neutros, são produzidos e liberados juntamente com estes componentes no lúmen glandular. Não se observaram vesículas de secreção apócrina positivas ao teste de Sudan Black, o que indica que o mecanismo de produção de secreção e liberação da mesma, apesar de sincrônico, é desassociado ao apresentado pelas glicoproteínas e proteínas. Também não há marcação de estruturas vesiculares próximo ao epitélio glandular, com exceção de lamelas mais fortemente coradas pelo Sudan Black. As estruturas granulares ou vesiculares observadas para as técnicas de PAS e de Azul de Bromofenol aparecem como estruturas circulares pouco coradas.

Neste sentido, postula-se que os lipídios seguem outra via de produção e liberação de secreção, através da via merócrina e, apesar de serem liberados à luz da glândula, ao menos

intracelularmente, não são associados quimicamente, sugerindo que há proteínas mais complexas em *B. morio* e não somente peptídeos simples, como encontrados para *B. terrestris* (BAER *et al.*, 2000). Através dos presentes dados, também se postula que a secreção pode sofrer modificações no lúmen glandular, haja vista a heterogeneidade do conteúdo luminal quanto aos glicoconjugados e proteínas. Segundo Colonello & Hartfelder (2003), a diversidade de proteínas da glândula de muco diminui à medida que o macho atinge sua maturidade sexual, por outro lado, a complexidade destas aumenta. A maioria dos estudos feitos com estas glândulas utiliza cromatografia gasosa, o que talvez impeça detectar as glicoproteínas presentes na glândula de muco.

Corroborando com a técnica do Azul de Bromofenol, a variante de CEC indica que as células do epitélio glandular de *B. morio* são ativas na produção de RNA, apresentando núcleos celulares pouco heterocromáticos e um a dois nucléolos ativos, com regiões fibrilares e granulares (Fig. 20). A abundância de RNA e a positividade para PAS e Azul de Bromofenol do epitélio glandular e da secreção, reforçam a sua natureza glicoproteica. Porém, exame mais detalhado da maquinaria biossintética das células glandulares através de microscopia eletrônica de transmissão faz-se necessário para verificar quais tipos de organelas estão envolvidas na síntese de secreção e como ocorre o mecanismo apócrino de liberação desta.

4.5 Morfologia geral e histoquímica da glândula de muco de *C. (ptilotopus) scopipes*

A análise histológica de todo o epitélio que constitui a glândula de muco de *C. (ptilotopus) scopipes* apresentou-se muito semelhante ao observado em *B. morio* no que se refere as suas características secretoras (Fig. 21). A glândula é constituída por células glandulares colunares apresentando vesículas apócrinas em sua parte apical. Já uma característica que se apresenta diferente entre as duas espécies é em relação ao conteúdo luminal, o qual é predominantemente basófilo, diferentemente do epitélio secretor que apresenta-se predominantemente acidófilo.

É possível verificar duas regiões da glândula de muco, uma vez que em corte transversal pode verificar vários níveis de profundidade da glândula, e assim, apresentando uma porção mais apical, onde a secreção é propriamente gerada e excretada ao lúmen glandular, e uma porção mais basal, onde já há a ligação com os dutos deferentes pós-vesiculares, podendo ser evidenciado pela presença de espermatozoides nessa região.

Os resultados histoquímicos mostraram que a secreção da glândula de muco desta espécie apresenta menor conteúdo proteico em relação ao comparado com *B. morio*, uma vez que sua secreção apresenta-se levemente positiva para o Azul de Bromofenol (Fig. 22).

Em relação aos testes realizados com PAS, pode-se dizer que a secreção da glândula de *C. (ptilotopus) scopipes* é constituída de glicoconjugados neutros (Fig. 23).

Para os testes de Sudan Black obteve-se resultado negativo para a secreção desta espécie (Fig. 24). Estes resultados podem corroborar o fato de que a secreção e liberação do conteúdo glandular apresentado pelas glicoproteínas e proteínas são desassociadas ao de produção de lipídios, como observado em *B. morio*.

Os resultados para a técnica Variante da CEC indicam a grande atividade celular da glândula de muco na produção de RNA (Fig. 25), confirmando assim sua grande produção de compostos glicoproteicos, conforme apresentado nos testes Azul de Bromofenol e PAS. Os núcleos celulares apresentam-se pouco heterocromático.

4.6 Morfologia geral e histoquímica das vesículas e dutos vesiculares de *M. quadrifasciata anthidioides*

Segundo Ferreira *et al.* (2004) os testículos dos meliponíneos enquadram-se no tipo IV. Este grupo possui as glândulas de muco ausentes (todos os meliponíneos) ou pouco desenvolvidas (Fig. 26). Os espermatozoides produzidos ficam imersos na vesícula seminal, cujo epitélio tem características de ser secretor (DALLACQUA & CRUZ-LANDIM, 2003). A esta glândula é atribuída à função de identificar feromonalmente se a fêmea é virgem ou

fecundada, assim como pode contribuir, juntamente com outras glândulas para a produção da substância de rainha em *A. mellifera* (ABDALLA *et al.*, 2000).

Apesar da redução de complexidade e perda da glândula de muco, os meliponíneos conservam uma cápsula genital grande que, neste caso, serve como tampão físico, impedindo que a fêmea depois de acasalada consiga-o fazer novamente. Mesmo neste caso não se sabe se a ativação ovariana é fruto do sêmen passado pelo macho durante a cópula ou simplesmente a persistência da cápsula genital na bursa copulatrix das fêmeas exercendo um estímulo mecânico (MELO *et al.*, 2001)

No presente trabalho, observou-se que todo o epitélio que forma os dutos pré e, assim como a vesícula seminal, apresenta características de serem secretoras, apresentam um epitélio alto e muitas vesículas de secreção no lúmen (Fig. 26 e 27).

A análise histoquímica revelou vesículas de secreção que se apresentam positivas para PAS e Azul de Bromofenol tanto nos dutos deferentes pré-vesiculares, como na vesícula seminal, indicando que a composição química da glândula é diversificada, apresentando glicoconjugados neutros, conteúdo proteico e lipídico. Fato que, neste aspecto, não difere da natureza química da secreção da glândula de muco das espécies que as possuem e das estudadas no presente trabalho.

Os resultados para detecção de proteínas totais demonstraram que as vesículas esféricas observadas no lúmen dos dutos deferentes pré-vesiculares e vesícula seminal possuem proteínas (Fig. 27). Tanto na técnica de rotina (HE) como através do Azul de Bromofenol, nota-se que as vesículas de secreção encontradas nos dutos pré-vesiculares, são diferentes daquelas encontradas na vesícula seminal. Na vesícula seminal as vesículas de secreção são mais fortemente coradas pelo Azul de Bromofenol. O tipo de liberação da secreção, como nas glândulas de muco, é do tipo apócrino e, também como nas glândulas de muco de *B. morio*, a secreção parece ser formada por uma parte homogênea e outra vesicular, porém, diferentemente da glândula de muco, as vesículas de secreção apócrina são muito mais abundantes do que a secreção homogênea.

O teste para detecção de glicoconjugados neutros (PAS) (Fig. 28), mostram que as vesículas de secreção apócrina apresentam glicoconjugados neutros. Portanto, assim como no epitélio da glândula de muco de *B. morio*, a secreção produzida pela via apócrina constitui-se de glicoproteínas neutras. O mesmo resultado foi obtido com os testes histoquímicos para

análise do conteúdo lipídico através da técnica de Sudan Black (Fig. 29). Logo, a secreção produzida pela via apócrina também apresenta lipídios em sua constituição.

Nos testes da técnica de Variante de CEC (Fig. 30), não foi possível observar os mesmos padrões observados nas outras duas espécies de abelhas analisadas, pois não se chegou a atingir perfeitamente o ponto de CEC, impossibilitando a análise mais apurada do metabolismo nuclear e citoplasmático do epitélio glandular. Diferentemente das outras espécies, não foi possível visualizar o conteúdo nuclear com precisão, pois não foi observado o material nuclear como nas outras espécies.

4.7 Discussão

Os presentes resultados da análise histoquímica da secreção das glândulas de muco de machos adultos de *Bombus morio* mostraram que esta é constituída por três principais componentes químicos, glicoconjugados neutros (PAS), proteínas (Azul de Bromofenol) e lipídios (Sudan Black). Análises minuciosas da histoquímica associada ao tipo de liberação da secreção mostram que tanto as proteínas, quanto os glicoconjugados neutros são produzidos e liberados ao lúmen glandular nas mesmas vesículas de secreção apócrina. Isto significa que para esta espécie de abelha, pode estar ocorrendo à síntese de duas macromoléculas: glicoproteínas e lipídios. A presença de ácidos graxos e polipeptídeos em outras espécies deste gênero são largamente descritas na literatura, porém a presença de glicoconjugados neutros, não. A via de síntese e liberação destas macromoléculas seguem rotas diferentes, apesar de todas serem produzidas ao mesmo tempo e, aparentemente, em ciclo constante de síntese; assim, as glicoproteínas seguem a via apócrina de secreção, enquanto os lipídios a via merócrina.

Os resultados obtidos para *C. (ptilotopus) scopipes* indicam que a secreção da glândula é constituída de principalmente por glicoconjugados neutros. Diferentemente do observado em *B. morio*, a secreção não é intensamente positiva para Azul de Bromofenol, indicando menor conteúdo proteico na espécie solitária. Já um resultado bastante diferente dessa espécie em relação às eussociais foi quanto à técnica Sudan Black de detecção de lipídios, que se

mostrou negativo para a secreção glandular na espécie solitária. O mecanismo de secreção apócrino observado em *C. (ptilotopus) scopipes* foi o mesmo observado na espécie eussocial primitiva.

Os resultados para *M. quadrifasciata anthidioides* mostraram que os dutos deferentes pré-vesiculares e a vesícula seminal são secretores de substâncias através de mecanismo apócrino, sendo que a secreção fica no lúmen dos dutos, encapsulada em vesículas, no entanto, a secreção também foi homogênea no lúmen da vesícula seminal. A natureza da secreção parece ser similar, em termos gerais, a da encontrada nas glândulas de muco das espécies de abelhas que as possuem: glicoconjugados neutros, assim como proteínas e lipídios. Neste caso, os glicoconjugados e as proteínas são produzidos em sincronismo e pela mesma via de secreção ao das duas espécies, podendo, portanto, serem glicoproteínas.

A presença ou a conservação de mecanismos biossintéticos, inclusive das macromoléculas presentes nas secreções, em espécies tão diferentes etologicamente e anatomicamente no que concerne o aparelho reprodutor masculino (e também feminino) demonstra que tais substâncias são importantes para a biologia reprodutiva das abelhas. Talvez a secreção da glândula de muco dos dutos deferentes pré-vesiculares e vesícula seminal dos meliponíneos seja importante para a conservação e desenvolvimento dos espermatozoides quando ainda nas vesículas seminais dos machos e, talvez, nas espermatecas das fêmeas.

A ação mecânica da produção do tampão formado pela cápsula genital do macho parece ser o provável responsável pela ativação ovariana das rainhas acasaladas em meliponíneos (MELO *et al.*, 2001). Porém, estudos mais detalhados sobre o assunto necessitam ser realizados.

4.8 Análises moleculares

Os resultados obtidos das dosagens de proteínas totais (mg/mL) são demonstrados na Tabela 2.

Nota-se uma concentração proteica nas glândulas dos machos quando comparados às fêmeas, nas três espécies. Destaca-se ainda, o acúmulo proteico oriundo das glândulas de

muco de *B. morio*. Mesmo com maior número de machos utilizados nos testes, *M. quadrifasciata anthidioides* apresentou menor concentração proteica, se comparados aos machos restantes.

Calculando-se os fatores de retenção (RF) para os perfis proteicos do padrão dos géis realizados, confeccionou-se um gráfico (Fig. 31) relacionando o log dos pesos moleculares do padrão com seus RFs, resultando, assim, uma equação linear ($y = -1,258x + 2,1697$). Para descobrir o peso molecular de uma banda, substituiu-se a variável x pelo valor de RF obtido para aquela banda, lembrando-se que a variável y é dada em log. No gráfico o índice de precisão mostra-se maior que 94%. Na Tabela 3 e 4, é possível verificar os valores de RF e pesos moleculares (kDa), respectivamente, obtidos para os machos das três espécies aqui estudadas.

Na Figura 32, é possível verificar as bandas que apresentam maior acúmulo de proteínas no gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue. Ainda que em menor número se comparado com as fêmeas utilizadas nos testes *C. (ptilotopus) scopipes*: 11 fêmeas fecundadas e 10 machos; *B. morio*: 49 fêmeas virgens e 17 machos; *M. quadrifasciata anthidioides*: 30 machos; nota-se um destaque das proteínas contidas nas glândulas de muco de machos de *C. (ptilotopus) scopipes* e *B. morio*, bem como nas vesículas seminais de *M. quadrifasciata anthidioides*.

Na faixa entre 50-40 kDa, observa-se proteínas oriundas das glândulas de muco de *C. (ptilotopus) scopipes*. Em *M. quadrifasciata anthidioides*, a presença de bandas de grande concentração proteica é menor se comparada com as abelhas *Centris* e *Bombus*, porém, bandas de mesma massa molecular que nas outras duas espécies são observadas na faixa de 100-50 kDa. Diferente das outras duas espécies supracitadas, as bandas provenientes das proteínas da glândula de muco de *B. morio* acumularam-se em duas faixas de massa molecular distintas, sendo a primeira variando entre 80-50 kDa e a segunda 25-15 Kda.

As fêmeas virgens, mesmo em quantidades elevadas (49), como no caso de *B. morio*, praticamente não tiveram suas bandas visualizadas no gel. O mesmo ocorreu com fêmeas fecundadas de *Centris*, ainda que o número de indivíduos utilizados fosse menor.

Na Figura 33, temos a comparação entre as bandas provenientes das proteínas encontradas na vesícula seminal e no testículo. Observa-se que as bandas do testículo com

aparecem fracamente coradas que em relação à vesícula seminal quando órgão único, sendo que esta possui uma banda com peso molecular aproximado de 70 kDa que se destaca .

Com o intuito de melhorar a visualização das bandas proteicas das espécies estudadas, foi realizado um novo gel de SDS, porém no lugar do Coomassie Brilliant Blue, utilizou-se o nitrato de prata (Fig. 34). Esta metodologia foi baseada na capacidade do nitrato de prata em evidenciar bandas mesmo em baixas concentrações proteicas, dado que no gel corado com Coomassie Brilliant Blue, as glândulas espermatecais e as espermatecas não foram coradas.

Os resultados, porém, repetiram os já apresentados pelo gel corado com Coomassie Brilliant Blue, destacando com maior intensidade, apenas, as bandas do testículo, ainda que estas novamente foram menos coradas do que as bandas da vesícula seminal.

4.9 Discussão

O produto das glândulas espermatecais da maioria dos insetos teria como principais componentes glicoproteínas e glicosaminoglicanos (HAPP & HAPP, 1970). A presença de proteínas e glicoconjugados também foi observada em fêmeas virgens e fecundadas de *M. quadrifasciata anthidioides* (SOUZA *et al.*, 2008). Em abelhas, as glândulas de muco são constituídas de proteínas e carboidratos (CHEN, 1984; GILLOT, 1996; COLONELLO & HARTFELDER, 2003; CRUZ-LANDIM, 2008; SAWARKAR & TEMBHARE, 2010; RIVERA *et al.*, 2012).

Em insetos, as secreções produzidas pelas glândulas de muco dos machos ocasionam duas principais respostas nas fêmeas: ativação do desenvolvimento ovariano e consequente "start" da oviposição e repressão de receptividade sexual logo após o acasalamento (CHEN, 1984; DALLACQUA & CRUZ-LANDIM, 2003).

Para *A. mellifera*, através de estudos proteômicos realizados com secreções provenientes das glândulas de machos e fêmeas, demonstrou-se que seus perfis proteicos nos géis de SDS não se sobrepõem, sugerindo que machos e fêmeas utilizariam proteínas diferentes para aumentar a viabilidade dos espermatozoides (Den BOER *et al.*, 2009).

De acordo com Araújo *et al.* (2010), a produção de espermatozoides em abelhas solitárias é realizada apenas uma vez, sendo que o armazenamento dos mesmos é feito nas vesículas seminais. Processo semelhante foi observado em *M. bicolor*, onde os testículos entram em processo de degeneração assim que os machos se tornam sexualmente maduros (DALLACQUA & CRUZ-LANDIM, 2003). A existência de espermatozoides nas vesículas seminais dos machos das abelhas *M. quadrifasciata anthidioides* aqui utilizadas e um eventual início de processo de degeneração dos testículos pode ter contribuído para que os perfis proteicos das vesículas seminais tenham se destacado em relação aos testículos.

Para *A. mellifera*, abelha eussocial avançada, a viabilidade dos espermatozoides na presença do fluido seminal dos machos e da secreção da glândula espermatecal e da espermateca de fêmeas é aumentada, demonstrando a importância dos machos no processo de reprodução (Den BOER *et al.*, 2009). Os mesmos autores destacam que em gel de SDS-PAGE, as proteínas supostamente envolvidas na viabilidade dos espermatozoides, oriundas tanto do fluido das glândulas espermatecais quanto do fluido seminal, tem massa molecular acima de 11 kDa. Observando os géis obtidos neste trabalho, os machos das três espécies de abelhas estudadas, apresentaram acúmulo de proteínas com massa molecular acima de 15 kDa. As bandas que mais se destacaram e que refletem na concentração de proteínas, podem estar diretamente relacionadas com as proteínas envolvidas no processo de viabilidade dos espermatozoides, para cada uma das espécies.

No estudo realizado por Colonello e Hartfelder (2003) com *A. mellifera* africanizada, as proteínas da secreção da glândula de muco que mais se destacaram apresentaram massa molecular variando entre 47,5-43 kDa, assemelhando-se ao evidenciado em *C. (ptilotopus) scopipes*. Em trabalho semelhante, realizado com *A. mellifera*, as bandas proteicas apresentaram massa molecular variando de 47-37 kDa (CRUZ-LANDIM e DALLACQUA, 2005).

Em abelhas *A. cerana indica*, perfis proteicos obtidos a partir da análise da secreção das glândulas de muco dos machos se destacaram em três bandas, com peso molecular de 45, 43 e 37 kDa (SAWARKAR & TEMBHARE, 2010). Assim como *A. mellifera*, *A. cerana indica* é uma espécie eussocial avançada, porém os resultados obtidos com a espécie *C. (ptilotopus) scopipes*, espécie solitária, também ficam próximos dos valores aqui obtidos.

Quando observamos a quantidade de bandas visualizadas nos géis, a espécie que mais se destaca é a primitivamente eussocial. Os machos de *B. morio* apresentaram quinze bandas

nos géis de SDS-PAGE, frente às sete bandas obtidas tanto para *C. (ptilotopus) scopipes* quanto para *M. quadrifasciata anthidioides*. Comparado a trabalhos anteriores, em *A. cerana indica* 15 bandas foram encontradas (SAWARKAR & TEMBHARE, 2010); já em *A. mellifera* este número oscila, variando de 10 a 20 bandas (IVANOVA, 2000; COLONELLO & HARTFELDER, 2003; CRUZ-LANDIM & DALLACQUA, 2005).

Bandas de 92 e 58 kDa foram encontradas apenas em *M. quadrifasciata anthidioides* e *B. morio*, assim como de 43 e 19 kDa apenas em *B. morio* e *C. (ptilotopus) scopipes*. Uma banda de peso molecular de 40 kDa foi observada somente em *M. quadrifasciata anthidioides*, caracterizando-se como uma banda específica da espécie mencionada. Da mesma forma, uma única banda de peso molecular de 128 kDa foi evidenciada em *C. (ptilotopus) scopipes*. *B. morio* também apresentou bandas únicas, porém em maior número: 138, 119, 86, 46, 32, 29 e 16 kDa.

A quantidade de bandas obtidas nos géis para as três espécies pode ser inerente a cada uma ou pode ter sido influenciada pela idade dos indivíduos. Diferentemente das abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* (eussocial avançada) que foram coletadas de colônias, *Centris (ptilotopus) scopipes* (solitária) e *Bombus morio* (primitivamente eussocial) foram coletadas em saídas de campo. Este argumento é reforçado pelos resultados obtidos por Colonello e Hartfelder (2003), baseado no fato de que machos de *A. mellifera* cinco dias após emergirem apresentaram seis bandas e 10 no segundo dia após a emergência, evidenciando a produção de diferentes proteínas durante a vida do animal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferenças marcantes entre a espécie eussocial avançada e as duas outras espécies estudadas (solitárias e eussociais primitivas) são o tamanho menor das espermatecas e a ausência de polissacarídeos nas últimas. Pressões adaptativas nas abelhas sociais devem ter ocorrido, ao longo do processo evolutivo, para aumento do tamanho da espermateca nas abelhas eussociais, já que possuem uma longevidade muito maior e uma taxa de oviposição muito mais elevada.

Mesmo na ausência da glândula de muco, em *M. quadrifasciata anthidioides*, há regiões com atividade secretora nos dutos deferentes pré-vesiculares e vesícula germinativa, onde se observam espermatozoides lá imersos. A ausência da glândula de muco nos meliponíneos ainda é objeto de estudos.

O mecanismo de produção de secreção, assim como dos seus constituintes macromoleculares (glicoproteínas e lipídios) são conservados nas espécies eussociais. Isto significa que tais macromoléculas devem ter papel importante na biologia reprodutiva destas abelhas. Principalmente no que concerne à viabilidade dos espermatozoides ainda no aparelho reprodutor do macho, uma vez que as funções de produção de neuropeptídios ativadores da ovogênese e/ou da produção de um tampão vaginal para evitar múltiplas cópulas pelas fêmeas ainda não são comprovadas nas abelhas. Já a ausência de lipídios na espécie solitária observada pode indicar outra função desta glândula nesta espécie ou nível de sociabilidade. Ainda pode-se aventar que o ciclo de produção de lipídios não é sincrônico ao das glicoproteínas, como no caso das abelhas eussociais analisadas.

Mesmo utilizando 49 fêmeas de *B. morio*, não foi possível realizar uma comparação entre a secreção espermatecal e a secreção produzida pela glândula de muco. Um número menor que 50 indivíduos não foi suficiente para que secreções das glândulas espermatecais e da espermateca pudessem ser visualizadas no gel de SDS-Page. Todavia, ainda que em quantidades diferentes, os perfis proteicos que mais se destacaram foram os dos machos das espécies com os menores números de indivíduos empregados nos experimentos, se comparados com as fêmeas de *B. morio*.

A secreção oriunda das glândulas de *C. (ptilotopus) scopipes*, *B. morio* e *M. quadrifasciata anthidioides*, demonstraram conter grupos proteicos com distintas bandas em destaque, com pesos moleculares de 50-40 kDa, 80-50 kDa e 70 kDa, respectivamente.

O número de bandas encontradas para cada espécie pode ter sido influenciado pela idade ou sociabilidade dos indivíduos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. C.; CRUZ-LANDIM, C.; ZUCCHI, R. Why some meliponinae workers do not have a Dufour gland? In: Int. Congr. Zool., 18., 2000, Athens, Greece. **Anais**, 2000. p. 168.

AIDAR, D. S. **A mandaçaia. Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 1996.

ARAÚJO, V. A. et al. Morphology of male reproductive system of two solitary bee species (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 595-600, 2010.

BAER, B. et al. Chemistry of a mating plug in bumblebees. **J. Chem. Ecol.**, v. 26, p. 1869–1875, 2000.

BAER, B.; MORGAN, E. D.; SCHMID-HEMPEL, P. A nonspecific fatty acid within the bumble-bee mating plug prevents females from remating. **Proc. Natl Acad. Sci.**, USA. v. 98, p. 3926–3928, 2001.

BISHOP, G. H. Fertilization in the honeybee. The male sexual organs: their histological structures and physiological functioning. **J. Exp. Zool.**, v. 31 p. 225–265, 1920.

BRADFORD, M. M. A dye binding assay for protein. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMARGO, J. M. F.; MELLO, M. L. S. Anatomy and histology of the genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifera* queens (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, v. 1, n.4, p. 351-373, 1970.

CHEN, P. S. The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 29, p. 233-255, 1984.

COLONELLO, N. A.; HARTFELDER, K. Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. **Apidologie**, v. 34, p. 257-267, 2003.

COLONELLO N. A.; HARTFELDER K. She's my girl – male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees. **Apidologie**, v. 36, p. 231–244, 2005.

CRUZ-LANDIM, C. Spermiphagy in the spermatheca of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 36, n. 6, p. 339-343, 2002.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 408 p.

CRUZ-LANDIM, C. & F. C. ABDALLA. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002. 181 p.

CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 19, p. 9-16, 2002.

CRUZ-LANDIM, C.; YABUKI, A. T.; IAMONTE, M. Ultrastructure of the spermatheca of *Melipona bicolor bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Biosc. J.**, Uberlândia, Brasil, v. 1, p. 57-64, 2003.

CRUZ-LANDIM, C.; DALLACQUA, R. P. Morphology and protein patterns of honey bee drone accessory glands. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 3, p. 473-481, 2005.

DALLACQUA, R. P.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the Ducts of the Reproductive Tract of Males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, p. 276–281, 2003.

DALLAI, R. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.**, v. 21, p. 89-109, 1975.

Den BOER, S. P. A.; BOOMSMA, J. J.; BAER, B. Honey bee males and queens use glandular ecretions to enhance sperm viability before and after storage. **J. Insect. Physiol.**, v. 55, p. 538-543, 2009.

DUCHATEAU, M. J.; VELTHUIS, H. H. W. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. **Behaviour**, v. 107, p. 186-207, 1988.

FERREIRA, A. et al. Systematics, morphology and physiology: Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 5, 2004.

FLANDERS, S. E. Environmental control of sex in hymenopterous insects. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, v. 32, p. 11-26, 1939.

GAGLIANONE, M. C. Nidificação e forrageamento de *Centris (ptilotopus) scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Zool.**, v. 18, n. 1, p. 107 -117, 2001.

GARÓFALO, C. A. Bionomics of *Bombus (fervidobombus) morio* (Swederus) (Hymenoptera, Apidae) I. Cel construction and oviposition behavior of the queen. **Rev. Bras. Biol.**, v. 38, p. 227- 236, 1978.

GARÓFALO, C. A. **Bombus: as mamangavas de chão e sua importância como agentes polinizadores.** 2013. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/polinizacao2.htm>>. Acesso em: fev. 2013.

GESSNER, B. Transfer der Spermatozoen in die Spermatheca der Koenigin bei *Apis mellifica* carnica. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe Universität. 1973

GILLOT, C. Male insect accessory glands: functions and control of secretory activity. **Invertebr. Reprod. Dev.**, v. 30, p. 199-205, 1996.

HAPP, G. M.; HAPP, C. M. Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio Molitor*. **Tissue Cell**, v. 2, n. 3, p. 443-66, 1970.

HEFETZ, A.; FALES, H.; BATRA, S. W. T. Natural polyesters: Dufour's gland macrocyclic lactones from brood cell laminifers in *Colletes* bees. **Science**, v. 204, n. 4391, p. 415-417,

1979. Internal Anatomy of Honey Bees. Disponível em: <http://insects.tamu.edu/continuing_ed/bee_biology/lectures/password/Internal_Anatomy_of_Honey_Bees_PN.pdf>. Acesso em: out. 2012.

IVANOVA, E. Organ specificity of water-soluble proteins during drone (*Apis mellifera* L.) ontogenesis. **Apidologie**, v. 31, p. 671-677, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KELLER, L.; GENOUD, M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. **Nature**, v. 389, p. 958-960, 1997.

KERR, W.; LELLO, E. Sting Glands In Stingless Bees. A Vestigial Character (Hymenoptera: Apidae). **J. New York Entomol. Soc.**, v. 70, p. 190-214, 1962.

KLENK, M. et al. Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 371-381, 2004.

KOENIGER, G. Funktionsmorphologische Befunde bei der Kopulation der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, Local, v. 15, p. 189-204, 1984.

KOENIGER, G. Reproduction and mating behavior. In: RINDERER, T. E. [ed.]. **Bee genetics and breeding**. Orlando, Flórida: Academic, 1986. p. 255-280.

KOENIGER, G. et al. Comparative anatomy of male genital organs in the genus *Apis*. **Apidologie**, v. 23, p. 539-552, 1991.

KOENIGER, G. et al. Cornual gland in the honeybee drone (*Apis mellifera* L.): structure and secretion. **Apidologie**, v. 27, p. 145-156, 1996.

KOENIGER, N.; KOENIGER, G. Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. **Apidologie**, v. 31, p. 313-339, 2000.

KRESSIN, M.; SOMMER, U.; SCHNORR, B. The spermathecal epithelium of the queen bee (*Apis mellifera*): Morphology, age-dependent changes and cell contacts. **Anat. Histol. Embryol.**, v 1, p. 31 – 35, 1996.

LIDLAW, H. H. Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L): morphological basis and results. **J. Morphol.**, v. 74, p. 429–46, 1944.

MELO, G. A.R; BUSCHINI, M. L. T.; CAMPOS, L. A. O. Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens is triggered by mating plug stimulation. **Apidologie**, vol. 32, p. 355–361, 2001.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Edgard Blucher – FUNCAMP, 1980.

MELLO, M. L. S. et al. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochem Cytochem**, v. 26, p. 1-3, 1993.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

MIKHEYEV, A. S. Male accessory gland size and the evolutionary transition from single to multiple mating in the fungus-gardening ants. **Journal of Insect Science**, 2004.

MINDT, B. Untersuchungen u̇ber das Leben der Drohnen, insbesondere Ernȧhrung und Geschlechtsreife. **Zeitschrift fu̇r Bienenforschung**, v. 6, p. 6–33, 1962.

MOORS, L. et al. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. **Apidologie**, v. 36, p. 245–254, 2005.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, gland cell, glandular units: some comments on terminology and classification. **Ann. Soc. Ent. Fr.** v. 27, p. 123-128, 1991.

ORTIZ, G. (2007). Evolução do sistema reprodutivo de formigas da tribo Attini Hymenoptera:Myrmicinae) : análise das espermatecas/ Gabriela Ortiz. – Rio Claro : [s.n.], 130 f. : il., tabs, figs.

ORTIZ, G.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-physiological Differences of the Spermatheca of Attini Ants (Hymenoptera: Myrmicinae). **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 1, n. 4, p. 58-65, 2006. Disponível em: <<http://www.scipub.org/fulltext/AJAB/AJAB1458-65.pdf>>. Acesso em: fev. 2013.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. Churchill: Livingstone, 1985. 123-214 p.

RIVERA, D. N. et al. Histochemistry of the mucus gland of *Bombus morio* Swedurus, 1787 (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Morphological Sciences**, v. 29, p. 18-22, 2012.

RUTTNER, F. Aktuelle Probleme auf dem Gebiete der Fortpflanzung und der Zuchtigunsforschung der Biene. **Deutsche Bienenwirtsch**, v. 8, p. 81-87, 1957.

SAWARKAR, A. B.; TEMBHARE, D. B. Synthesis and chemical composition of mucus gland secretions in *Apis cerana indica*. **Apidologie**, v. 41, p. 488–496, 2010.

SNODGRASS, R. E. Morphology of the insect abdomen, Pt. II. The genitals ducts and the ovipositor. **Smith Misc. Coll.**, v. 89, p. 1-14, 1933.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of honey bee**. Ithaca, USA: Comstock Publish Co., 1956. 334 p.

SOUZA, E. A. et al. Effect of delayed mating on spermathecal activation in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) queens. **Apidologie**, v. 39, n. 3, p. 293-301, 2008.

SOUZA, E. A.; DOHANIK, V. T., LISBOA, L. C. O.; ARAÚJO, A. V.; SERRÃO, J. E. Histologia da espermateca de *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Heteroptera, Coreidae). In: XXIV Congr. Bras. Entomol. **Anais**, 2012. Acesso em: fev. 2013.

TOZETTO, S. D. O. et al. Protein profiles of testes, seminal vesicles and accessory gland of honey bee pupae and their relation to ecdysteroid titer. **Apidologie**, v. 38, p. 1-11, 2007.

VAN WICK, L. E. The morphology and histology of the genital organs of *Leucophera maderae* (Fabr.) (Blattidae, Orthoptera). **J. Ent. Soc. S. Afr.**, v. 15, p. 3-62, 1952.

VERMA, L. R. An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee *Apis mellifera*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 44, p. 1325-1331, 1973.

WILSON, E. O. **The Insect Societies**. Cambridge: Harvard Univ. Press., 1971.

WOYKE, J.; RUTTNER, F. An anatomical study of the mating process in the honeybee. **Bee World**, v. 39, p. 3-18, 1958.

APÊNDICES

APÊNDICE A

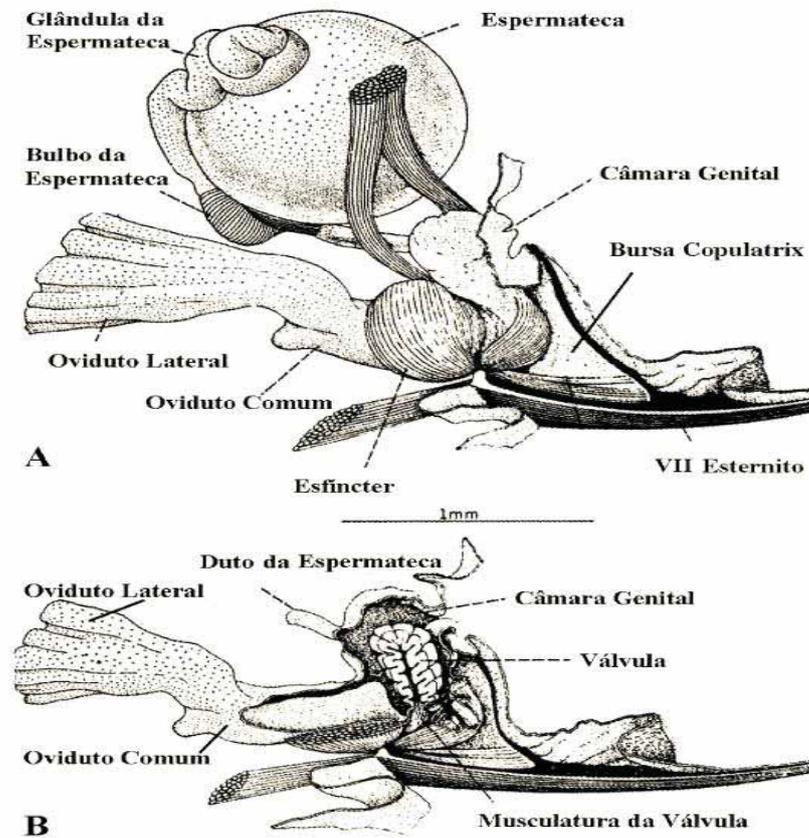


Figura 1. Esquema do trato genital de rainha de *A. mellifera* em vista lateral. A) Espermateca e glândula. B) Corte expondo a localização da válvula genital (CAMARGO & MELLO, 1970, modificado por CRUZ-LANDIM, 2008).

APÊNDICE B

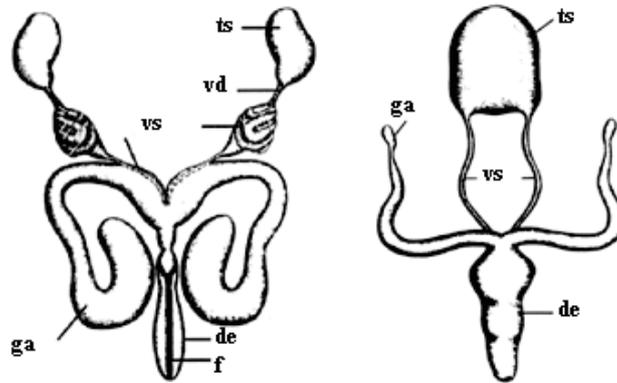


Figura 2. Esquema de dois testículos de abelhas. A) *Bombus agrorum* (Apidae, Bombini) com glândulas acessórias (ga) desembocando nos vasos deferentes (vd), ou duto deferente pós-vesicular. B) *Anthidium manicatum* (Megachilidae) com glândulas acessórias (ga) desembocando próximo à região anterior do duto ejaculador (de), na mesma altura da porção posterior final dos vasos pós-deferentes. Legenda: f = fissura da parede do duto ejaculador, vs = vesícula seminal, ts = testículo. Ferreira et al. (2004) – modificado.

APÊNDICE C



Figura 3. Vista aérea da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, campus de Sorocaba. Fragmentos florestais.

APÊNDICE D

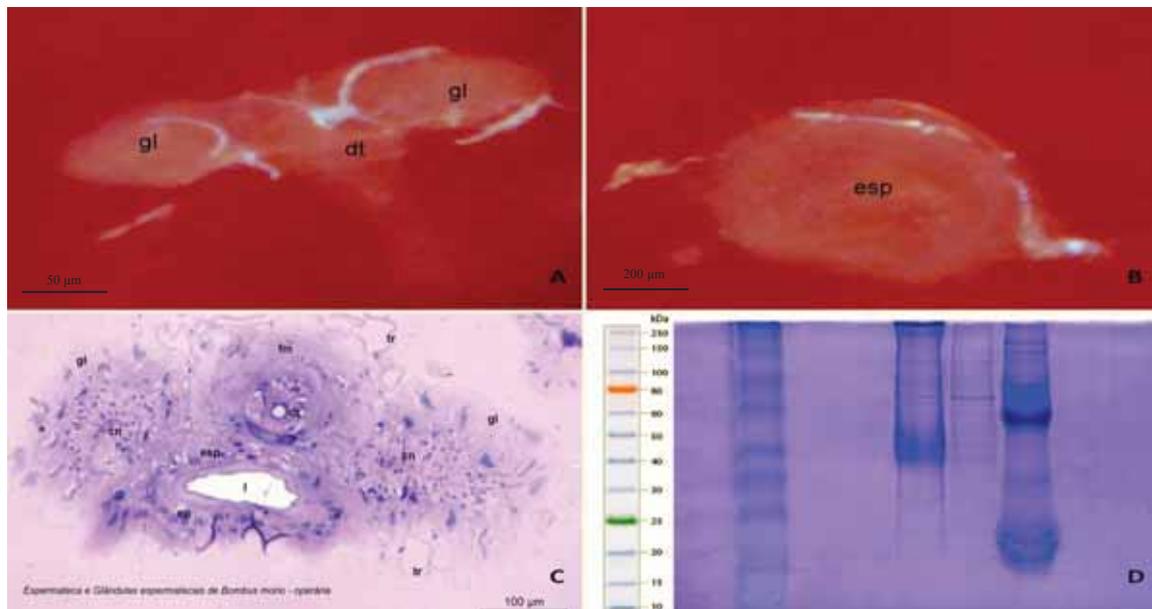


Figura 4. Representação do processo geral do estudo realizado com as espermatecas. Ao estereomicroscópio as espermatecas juntamente com as glândulas espermatecais foram dissecadas. Após o que, separadas em placa de cera com ajuda de bisturi cirúrgico (Figuras A, B). C) Concatenação da glândula em corte histológico, onde se observa as estrutura geral da espermateca junto às glândulas espermatecais. D) As colunas de bandeamento proteico realizado através da dissecação do material.

APÊNDICE E

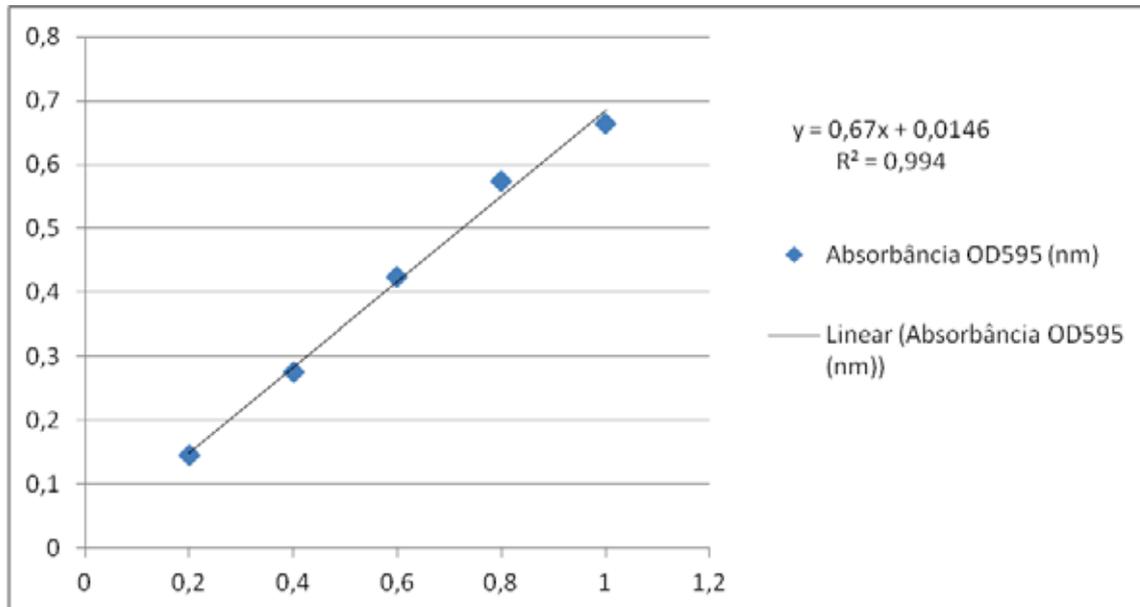


Figura 5. Absorvância a 595 nm em concentrações crescentes de BSA.

APÊNDICE F

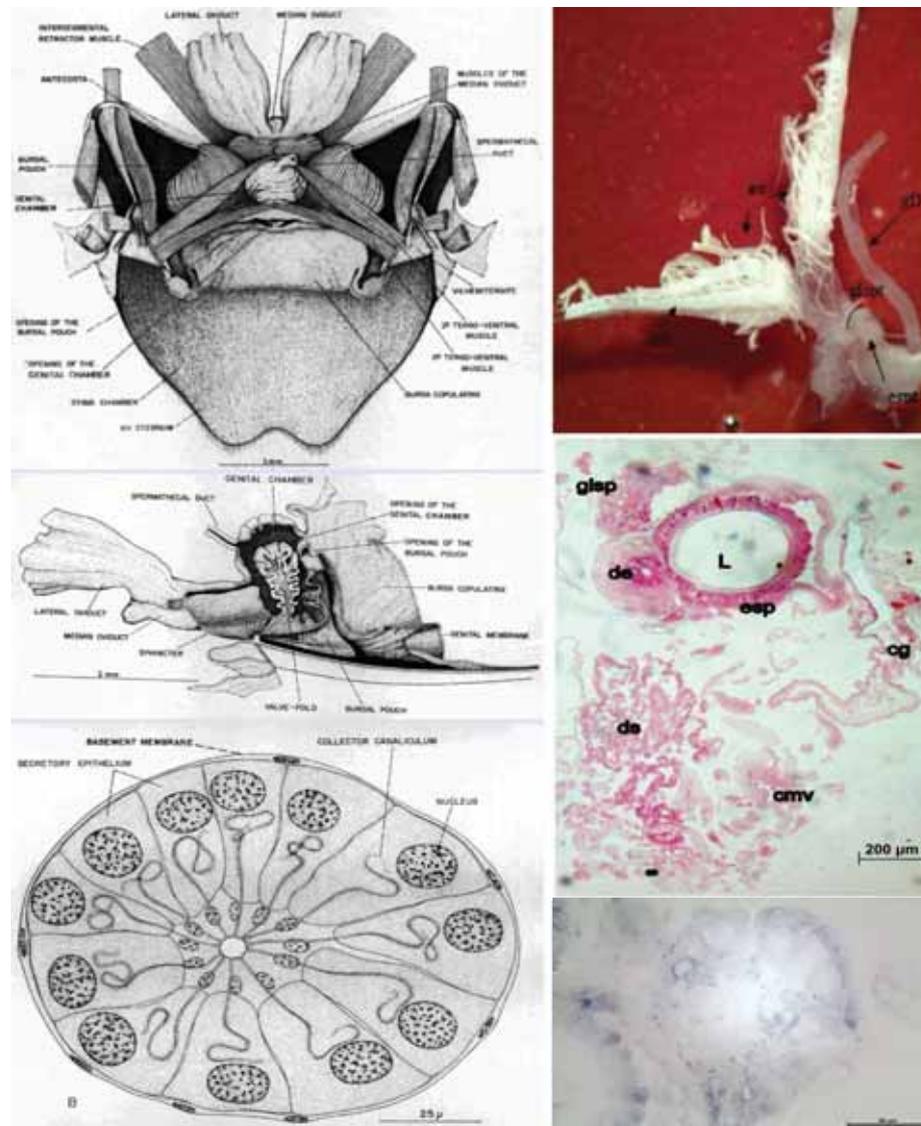


Figura 6. Preparação total do aparelho reprodutor feminino de operária de *Bombus morio*. A) Notar os ovariolos contendo somente germário ou folículos ovarianos (ovi) em estágio inicial de desenvolvimento. Acima da câmara genital (cg) encontra-se a espermateca (espt) e um par de glândulas espermatecais (glspt). Próximo ao canal vaginal e na porção final do oviduto comum encontra-se a glândula de Dufour (Gd), uma glândula acessória do aparelho reprodutor das abelhas. B) Fotomicrografia de parte do aparelho reprodutor feminino de *Bombus morio* virgem. Notar glândula espermatecal (glspt) acima da espermateca (esp), cujo lúmen (L) não possui espermatozoides. Ao lado direito, observa-se parte da câmara genital (cg) e ao esquerdo a parte da espermateca que desemboca nesta câmara, o duto comum das glândulas espermatecais (de) o qual é rodeado por várias camadas de musculatura visceral (cmv). A porção ventral da câmara genital produz uma dobra estriada, também conhecida como dobra sanfonada (ds) que ajuda a posicionar o óvulo à válvula ejetora com micrópila voltada de maneira correta. C) Fotomicrografia de detalhes da porção basal da espermateca e glândula espermatecal de *Bombus morio*.

APÊNDICE G

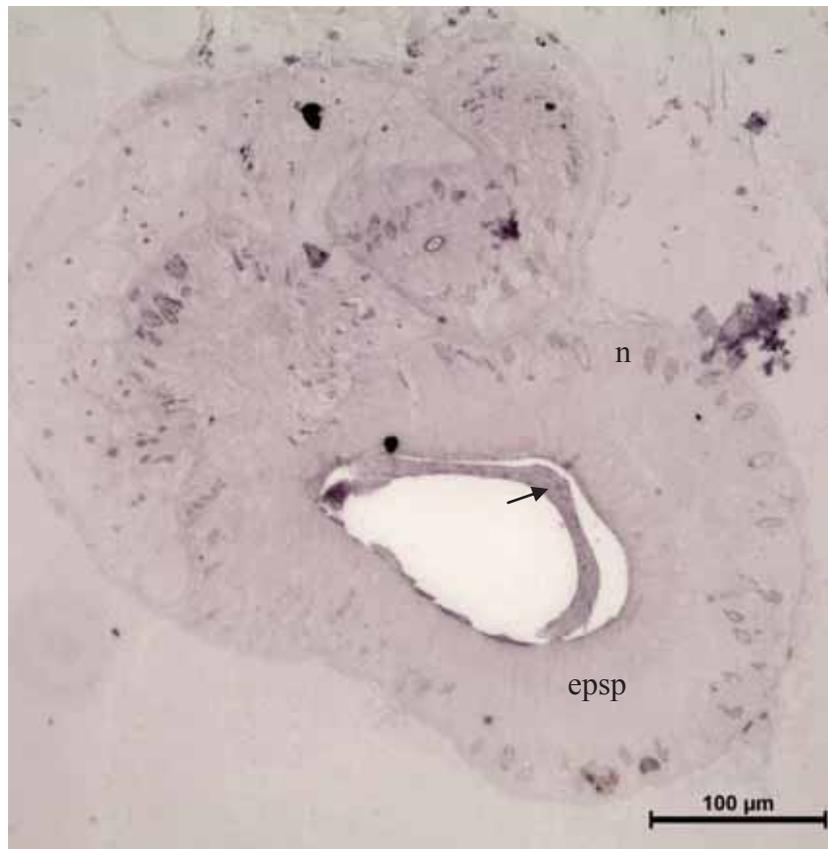


Figura 7. Fotomicrografia de corte transversal da espermateca de *Centris (ptilotopus) scopipes* – **HE**. Notar o epitélio espermatecal (epsp) com células colunares e núcleos basais (n). Os espermatozoides (seta) enovelam-se num padrão aparentemente organizado numa matriz basófila.

APÊNDICE H

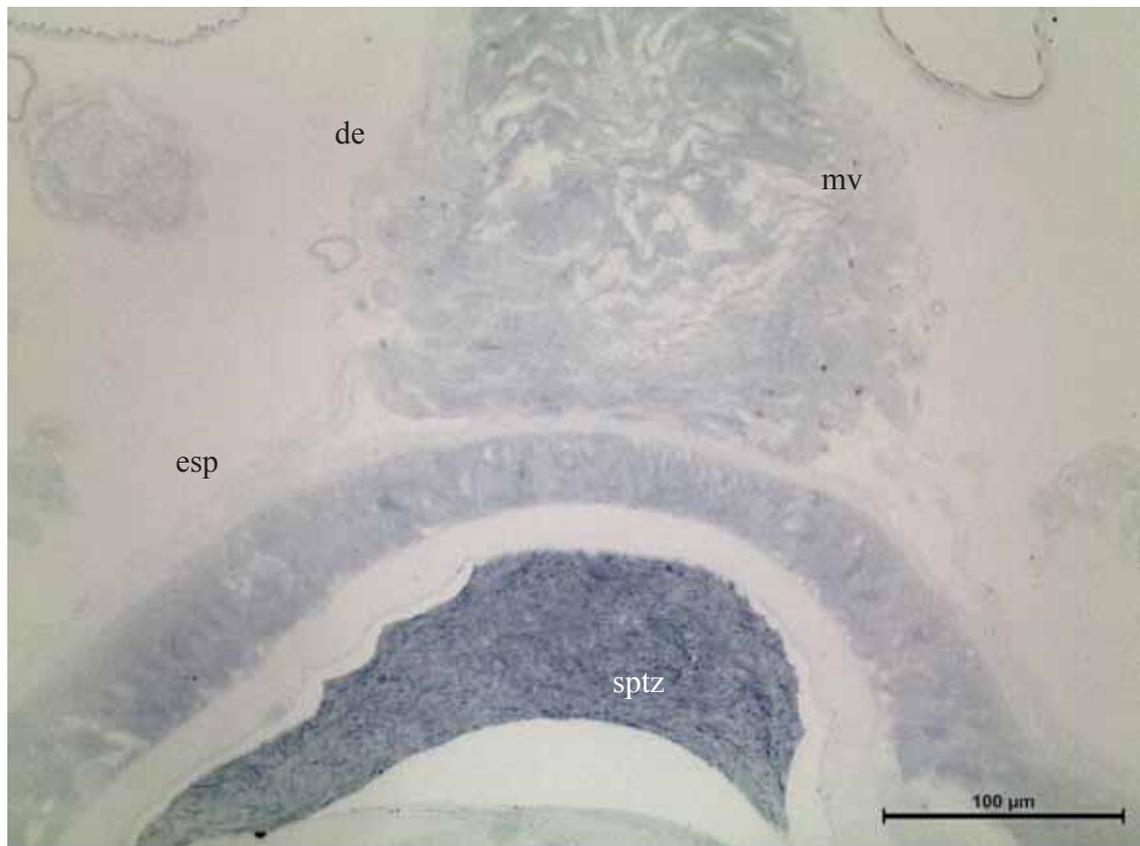


Figura 8. Corte transversal da espermateca de *Centris (ptilotopus) scopipes*. Notar a espermateca (esp) formada por células colunares polarizadas com núcleos basais. No lúmen da espermateca encontram-se espermatozoides (sptz) enovelados. Acima da espermateca encontra-se o ducto comum das glândulas espermatecais (de) envolto por musculatura visceral (mv). **Variante da CEC.**

APÊNDICE I

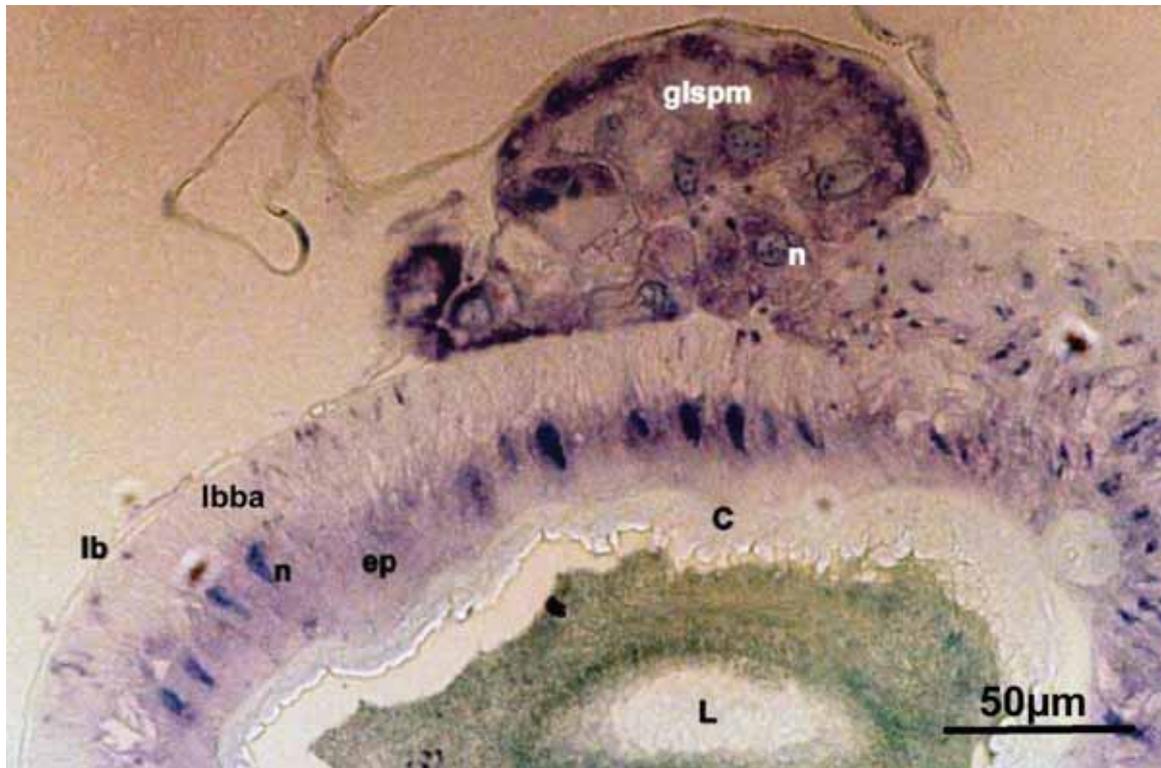


Figura 9. Fotomicrografia da porção proximal da espermateca, logo abaixo da glândula espermatecal (glsperm) de rainha de *Bombus morio*. *Variante da CEC*. Notar as células colunares abaixo da lâmina basal (lb). Observar a cutícula (C), lúmen (L), núcleo (n), o labirinto basal (lbba) bem desenvolvido por toda base do epitélio (ep), formado por diversas invaginações das membranas plasmáticas, levando a crer que o epitélio está envolvido em processos de absorção de macromoléculas da hemolinfa (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002).

APÊNDICE J

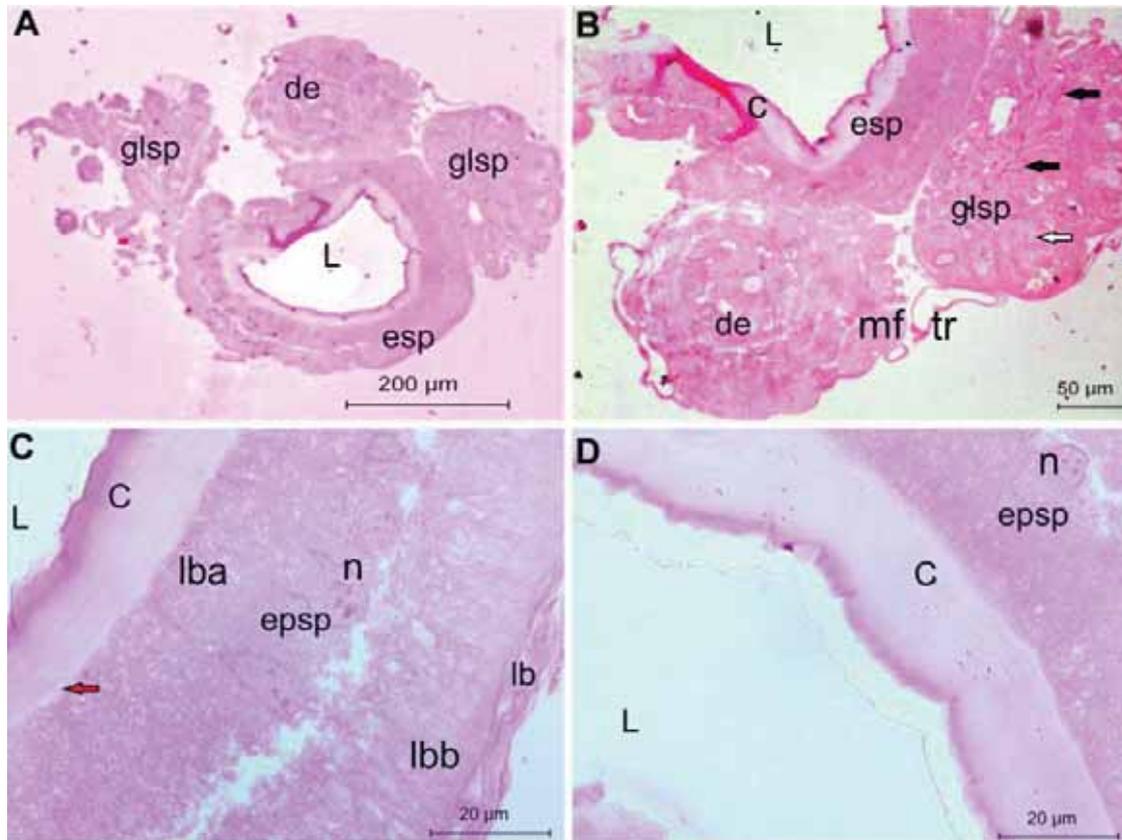


Figura 10. A) Corte transversal da espermateca e glândulas acessórias de *Bombus morio* virgem – PAS; B) Detalhe da figura A mostrando a o duto comum das glândulas espermatecais (de) envolto por musculatura visceral e a glândula espermatecal (glsp). Notar que embora o epitélio tenha sido corado, a secreção no lúmen da espermateca (L) assim como no duto comum das glândulas espermatecais e na glândula apresentou-se negativa ao tratamento; C) Detalhe do epitélio espermatecal, em que é possível notar a grande quantidade de invaginações contidas neste epitélio, possivelmente para absorção de substâncias da hemolinfa; D) Detalhe do interior da espermateca, mostrando a secreção negativa ao teste de PAS. Legenda: lbb = labirinto basal, epsp = epitélio espermatecal, lb = lâmina basal, mf = fibras musculares, esp = espermateca, C = cutícula, n = núcleo, setas pretas = canaliculos excretorios, seta vermelha = espaço subcuticular

APÊNDICE K

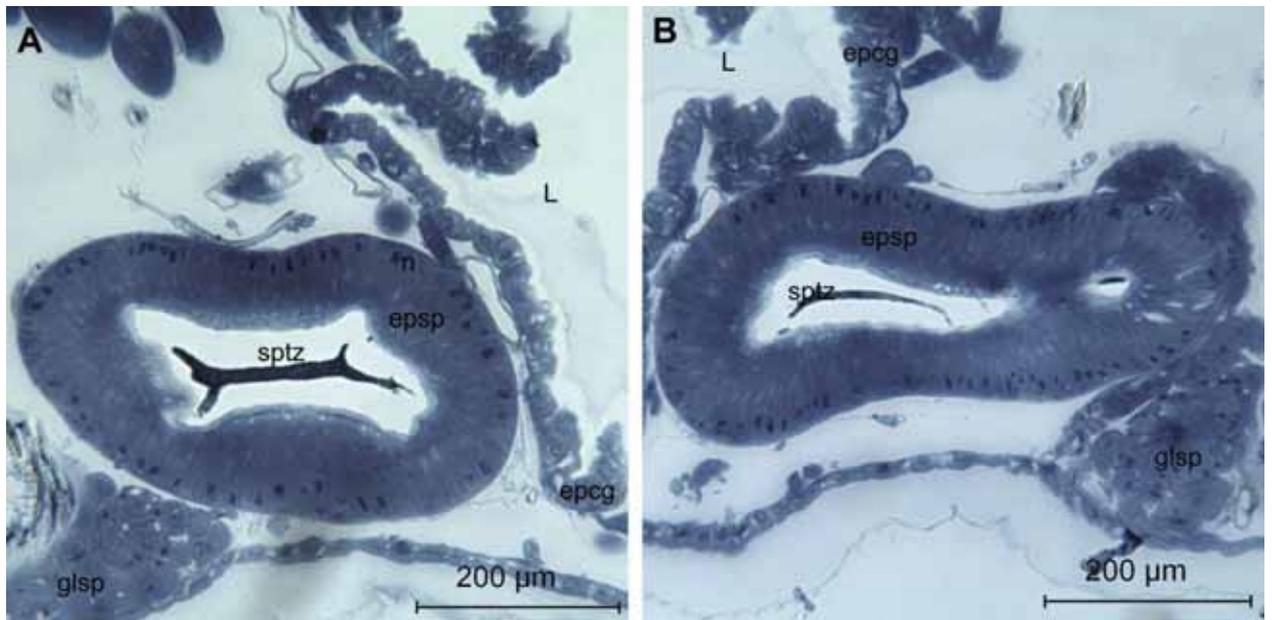


Figura 11. - Corte transversal da espermateca e glândula espermatecal de *Centris (ptilotopus) scopipes* fecundada – Azul de Bromofenol. Notar em ambas as figuras que tanto o epitélio espermatecal (epsp) quanto a glândula espermatecal (glsp) foram positivados ao teste de proteínas. A secreção que envolve os espermatozoides enovelados (sptz) também corou-se fortemente, evidenciando a alta concentração de proteínas em sua composição. Nas glândulas pode-se observar os canaliculos preenchidos com a secreção espermatecal). Legenda: epcg = epitélio da câmara genital, L = lúmen da câmara genital.

APÊNDICE L

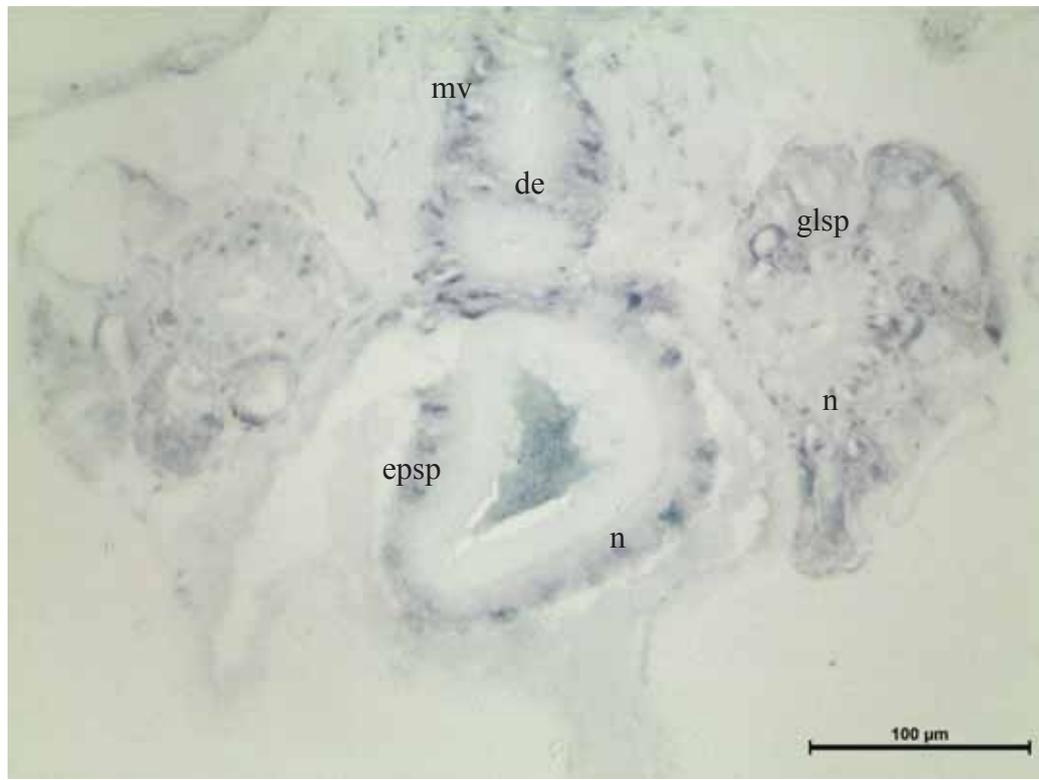


Figura 12. Corte transversal da espermateca e glândulas acessórias de *Bombus morio* fecundada – Variante da CEC. Nestas figuras também se pode notar a diferença entre o grau de condensação cromatínica nos núcleos (n) das células das glândulas espermatecais (glsp) e os do epitélio espermatecal (epsp); Legenda: Musculatura visceral (mv); duto da espermateca (de).

APÊNDICE M

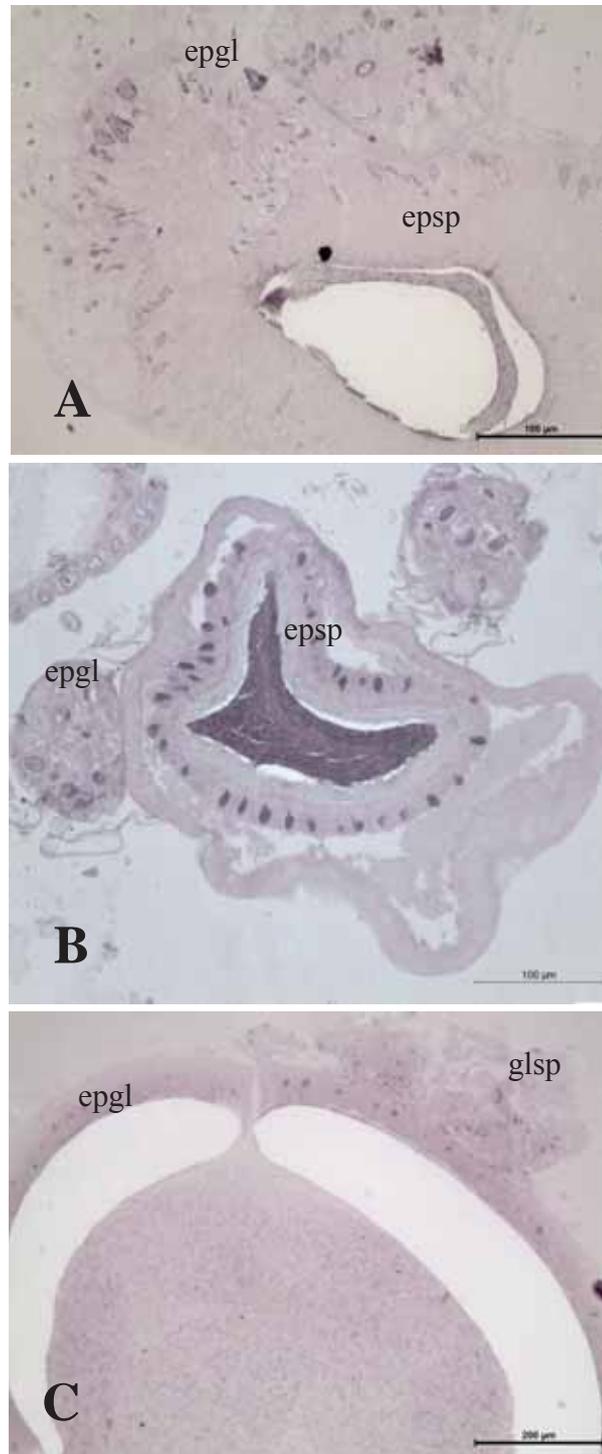


Figura 13. Epitélio espermatecal e glandular com citoplasma corado pela Hematoxilina e Eosina. A) *Centris (pilotopus) scopipes*. B) *Bombus morio*. C) *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Legenda: Epitélio espermatecal (epsp); epitélio glandular (epgl).

APÊNDICE N

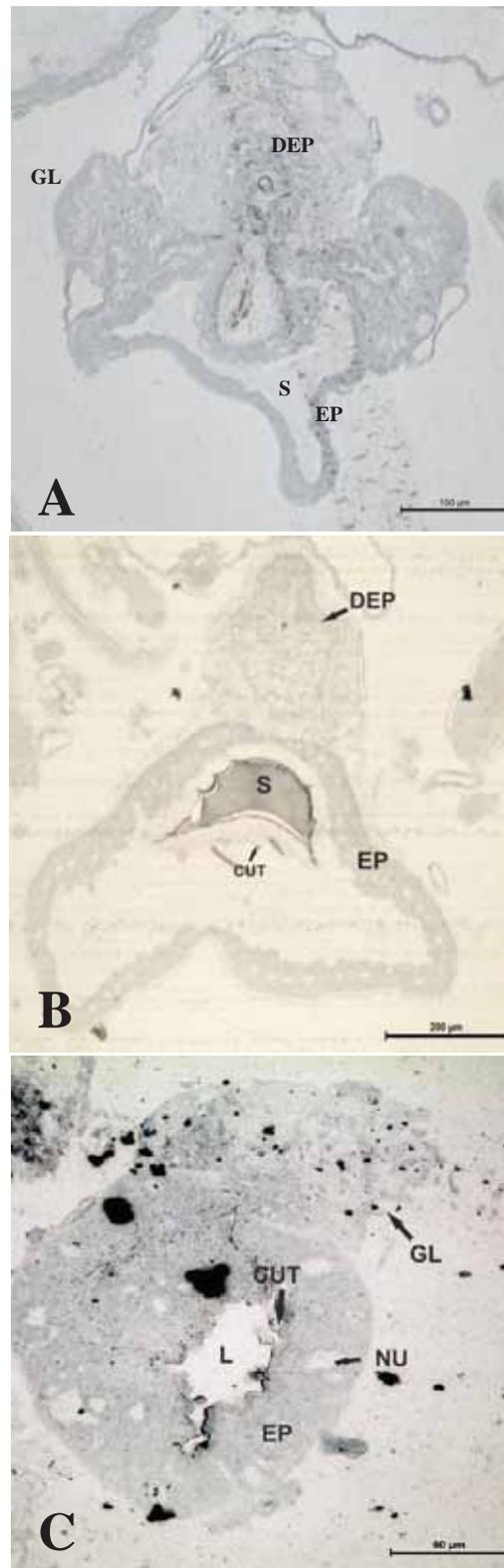


Figura 14. Porção proximal das espermatecas coradas com **Sudan Black**. A) *Centris (pilotopus) scopipes*. B) *Bombus morio*. C) *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Legenda: Duto espermatecal (DEP); epitélio (EP); secreção (S); glândula (GL); cutícula (CUT); núcleo (NU); lúmen (L).

APÊNDICE O

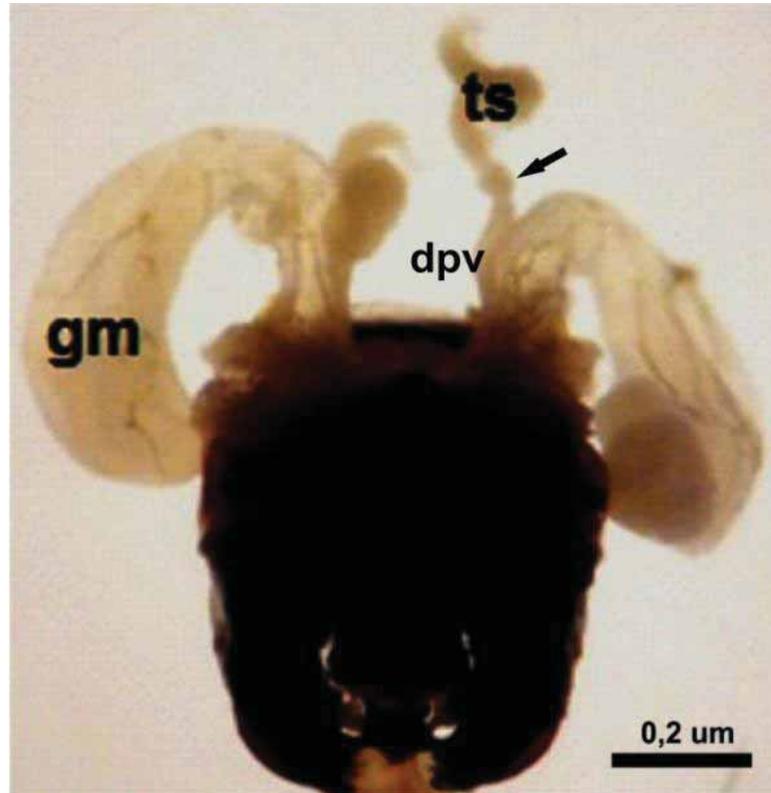


Figura 15. Montagem total do parêlho reprodutor masculino de *B. morio*. Legenda: ts = testículo; gm = glândula de muco; dpv ducto pós vesicular.

APÊNDICE P

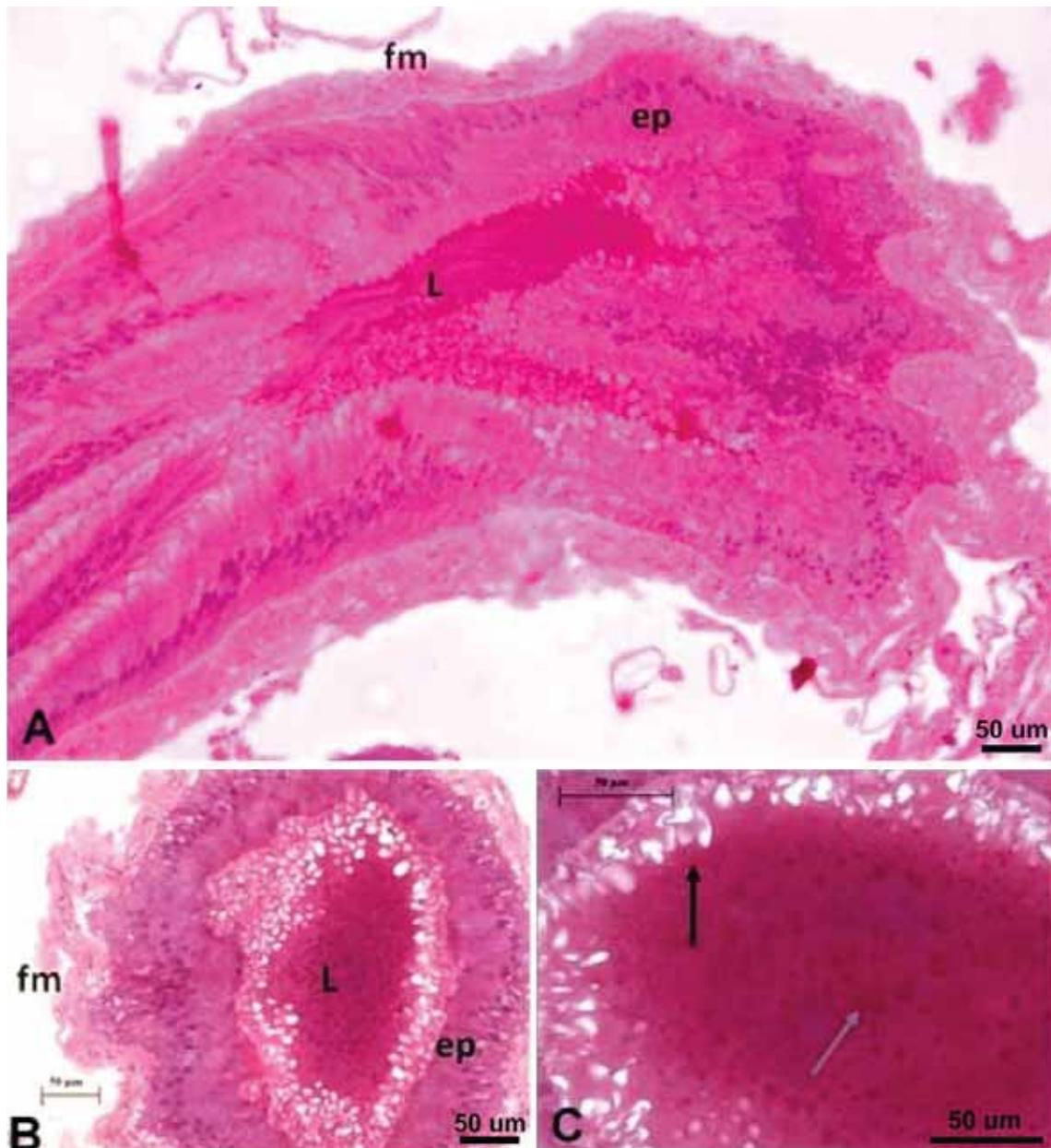


Figura 16. Fotomicrografias da glândula de muco de *B. morio* coradas com H.E. A) Corte longitudinal da glândula. B-C) Cortes transversais da glândula em diferentes aumentos. Legenda: fm= fibras musculares; ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas pretas = vesículas secretoras; setas cinzas = grânulos de secreção.

APÊNDICE Q

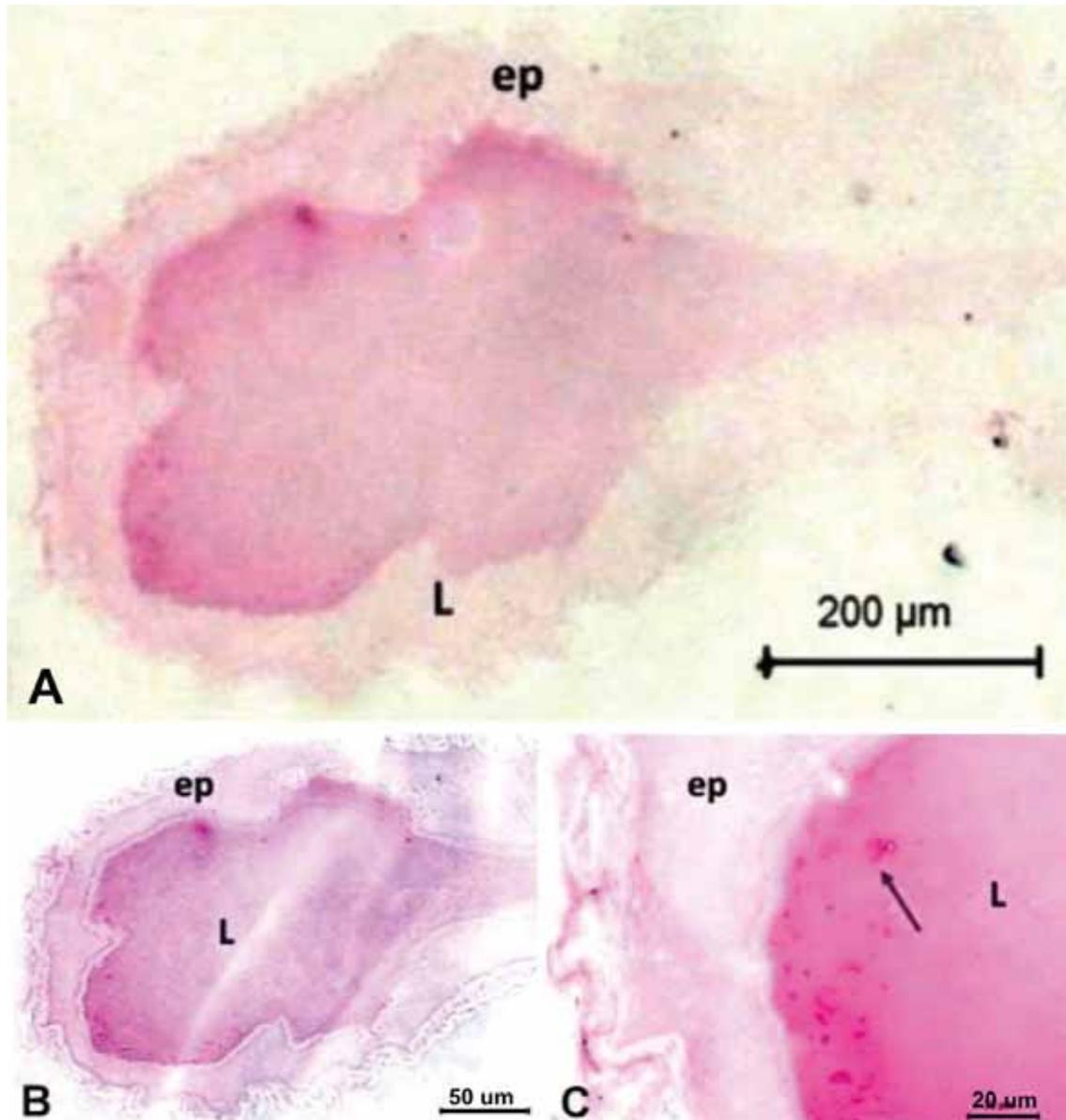


Figura 17. Fotomicrografias da glândula de muco de *B. morio* na técnica Ácido periódico Schiff, indicando presença de glicoconjugados neutros. A) Fotomicrografia da glândula em corte transversal. B-C) Cortes transversais da glândula em diferentes aumentos. Legenda: ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas cinzas = grânulos de secreção.

APÊNDICE R

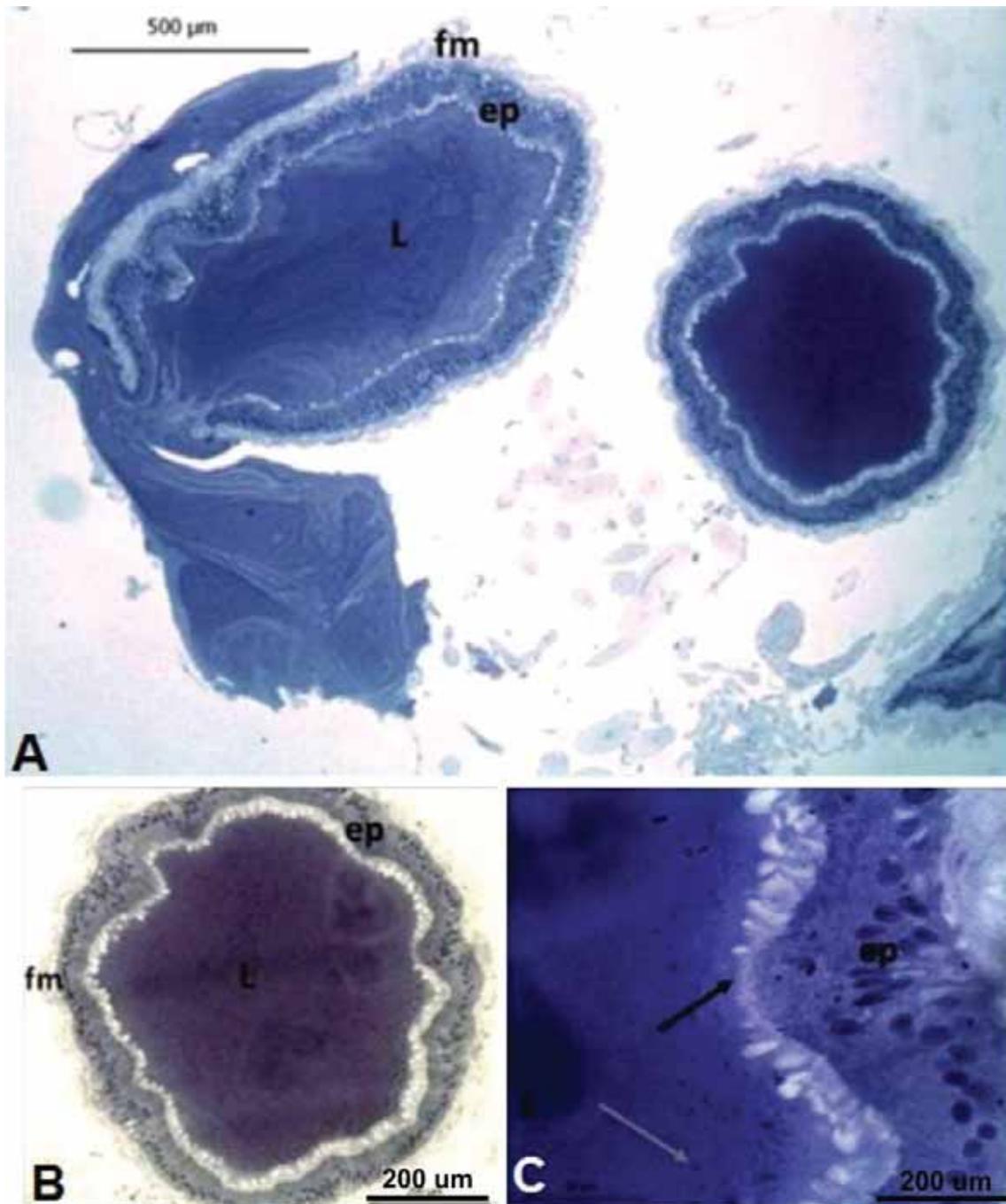


Figura 18. Fotomicrografias da glândula de muco de *B. morio* na técnica Azul de Bromofenol, indicando presença de proteínas totais. A) Corte transversal da região onde se encontram as duas glândulas. B-C) Cortes transversais da glândula em diferentes aumentos. Legenda: fm= fibras musculares; ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas pretas = vesículas secretoras; setas cinzas = grânulos de secreção.

APÊNDICE S

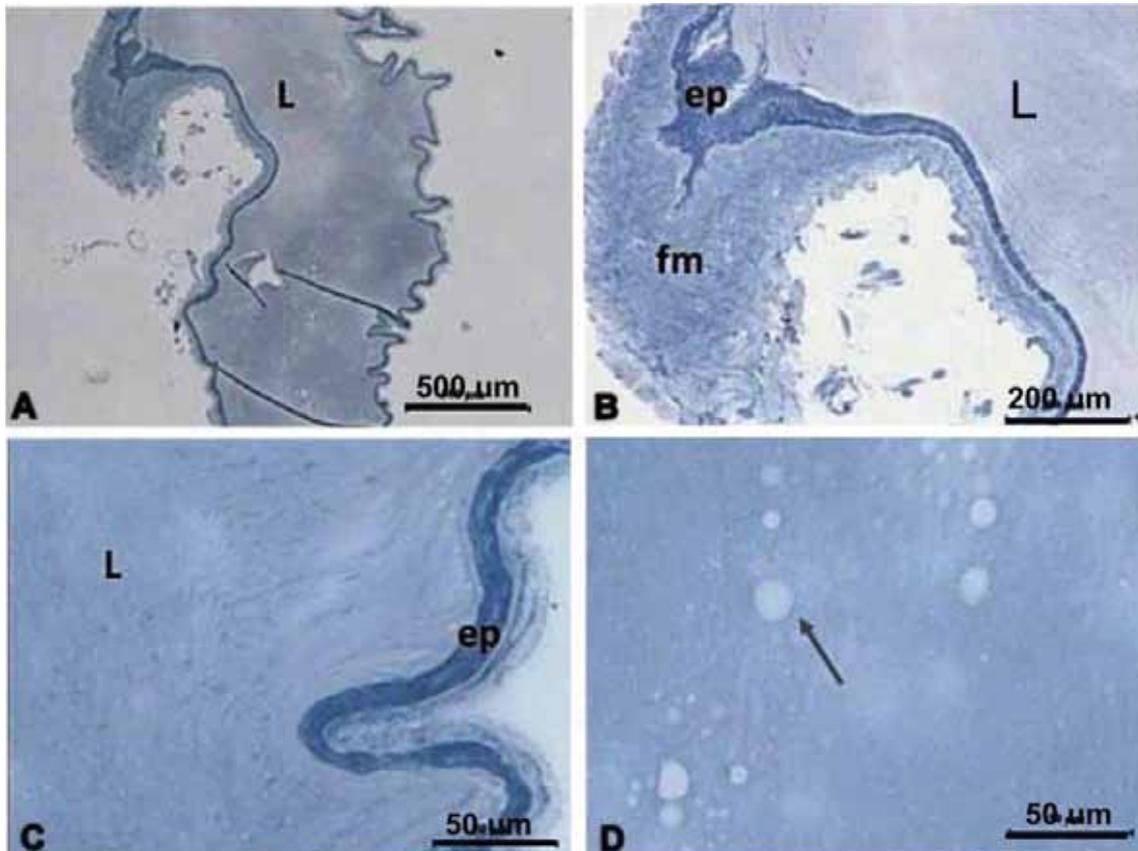


Figura 19. Fotomicrografias da glândula de muco de *B. morio* na técnica Sudan Black, indicando presença de lipídios (corados de preto e escalas de cinza). A) Fotomicrografia da glândula em corte transversal. B-C) Cortes transversais da glândula em diferentes regiões. D) Região do lúmen da glândula. Legenda: fm= fibras musculares; ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas cinzas = grânulos de secreção.

APÊNDICE T

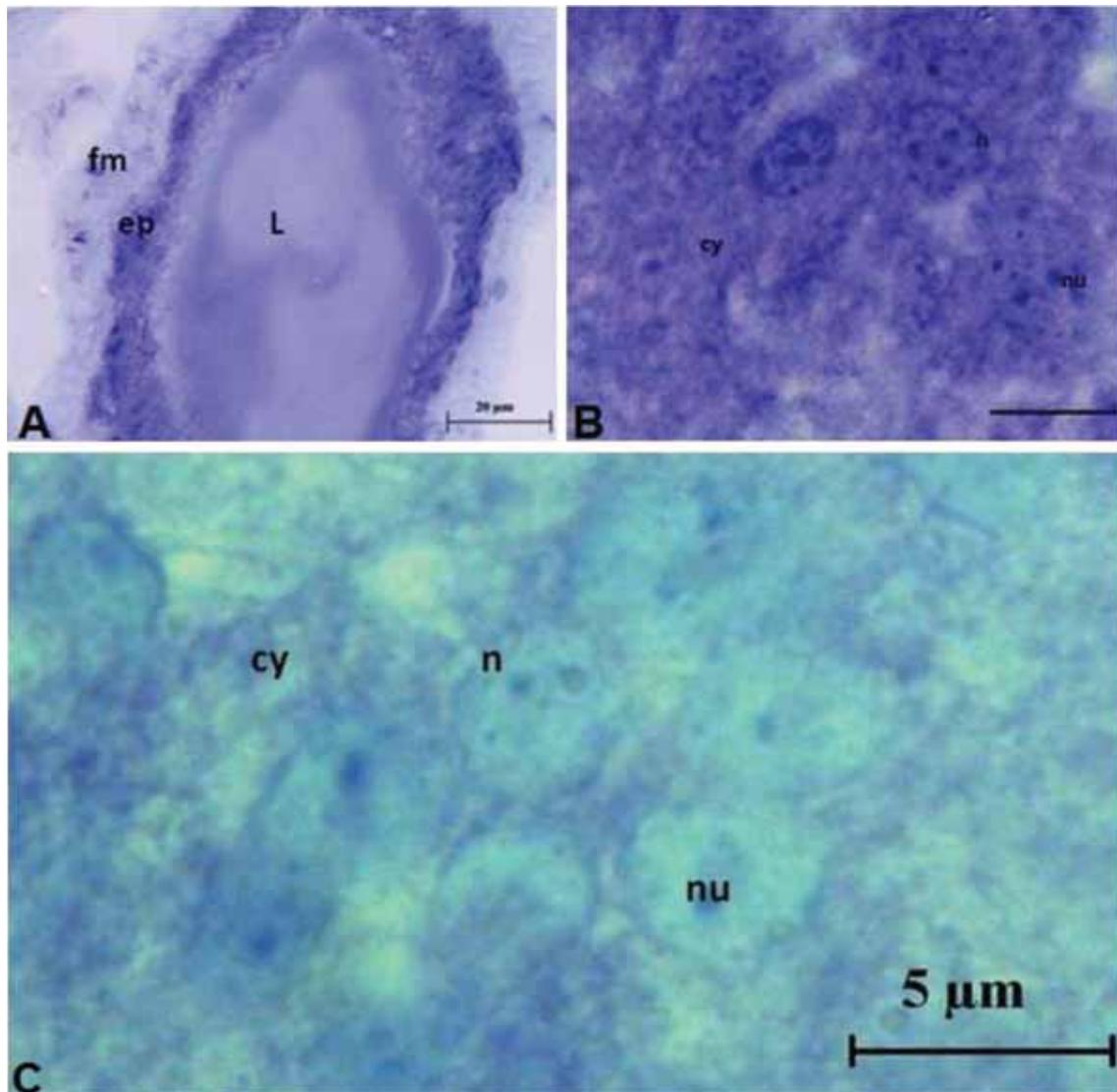


Figura 20. Fotomicrografias da glândula de muco de *B. morio* na técnica variante da Concentração Crítica de Eletrólitos, indicando presença de DNA (verde) e RNA (metacromático). A) Fotomicrografia panorâmica da glândula em corte transversal. B) Fotomicrografia controle; região do epitélio glandular. C) Fotomicrografia após atingir tempo de CEC; células do epitélio glandular em maior aumento (1000X). Legenda: fm = fibras musculares; ep = epitélio glandular; L= lúmen glandular; n = núcleo, nu = nucléolo, cy = citoplasma celular.

APÊNDICE U

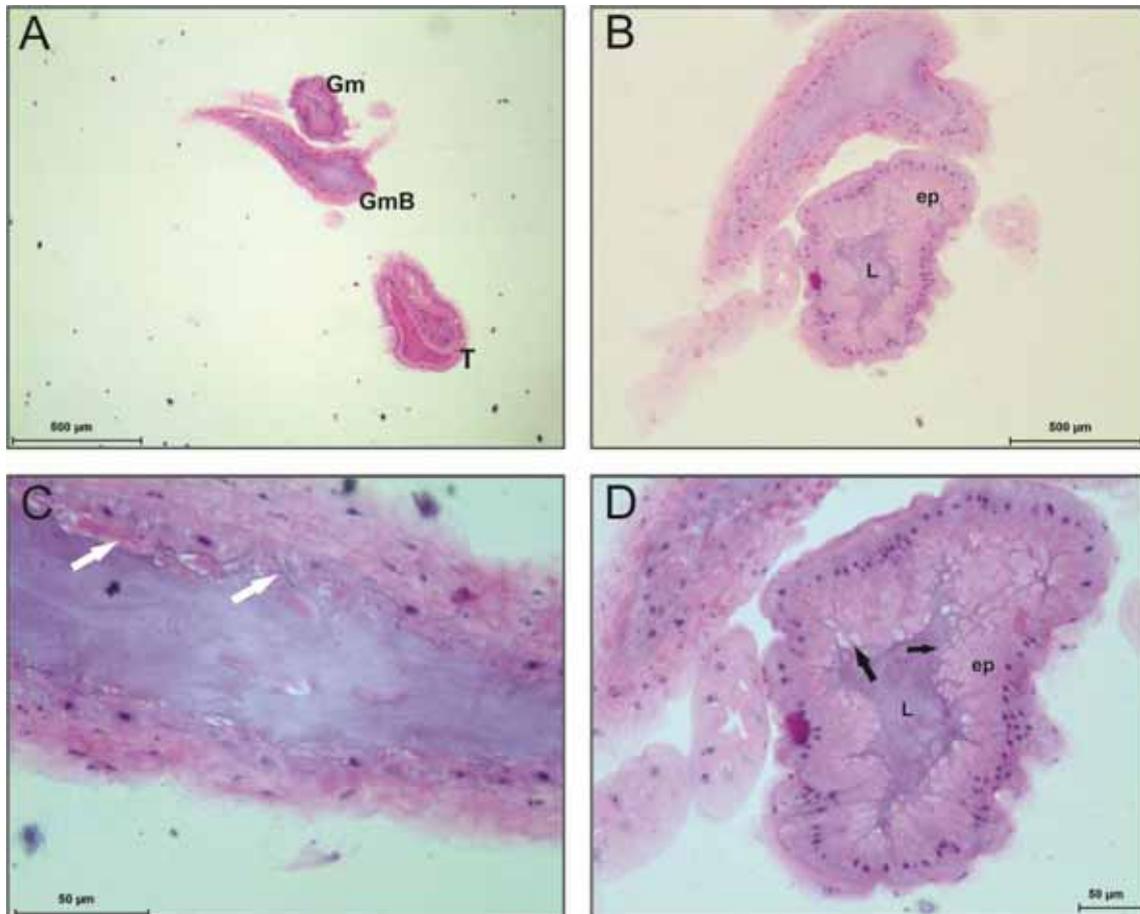


Figura 21. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Centris (pilotopus) scopipes* em cortes transversais. Técnica: Hematoxilina e Eosina. A) Aparelho reprodutor contendo testículo e glândula de muco. B) Glândula de muco. C) Glândula de muco em região basal com presença de espermatozoides. D) Glândula de muco em maior aumento (200X). Legenda: ep = epitélio glandular; Gm = glândula de muco; GmB = Glândula de muco em região basal ; L = lúmen glandular; setas brancas = espermatozoides; setas pretas = vesículas de secreção; T = testículo.

APÊNDICE V

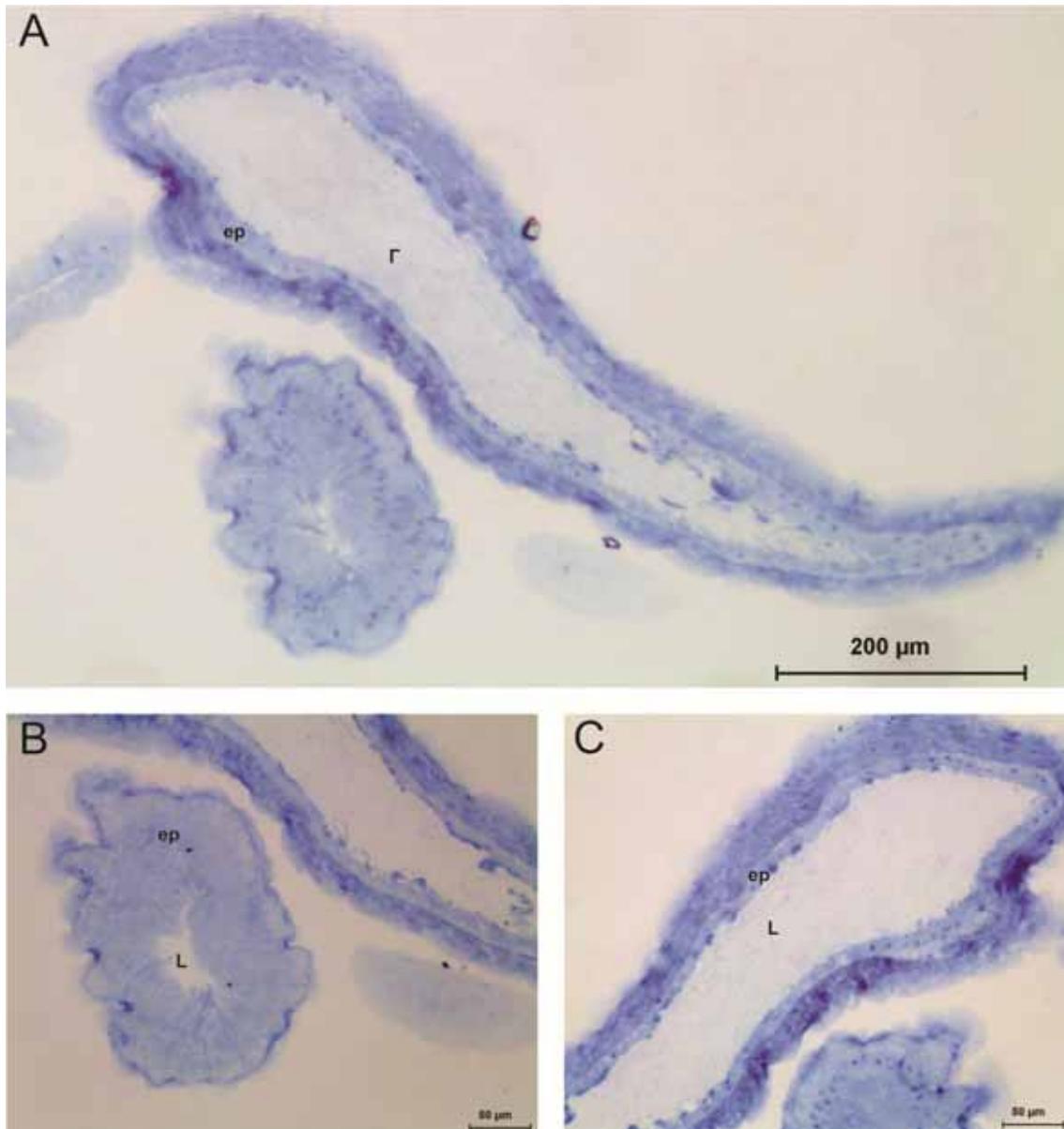


Figura 22. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Centris (ptilotopus) scopipes* em cortes transversais. Técnica: Azul de Bromofenol. A) Glândula de muco. B) Ênfase para glândula de muco em região mais apical. C) Ênfase para glândula de muco em região basal. Legenda: ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular.

APÊNDICE W

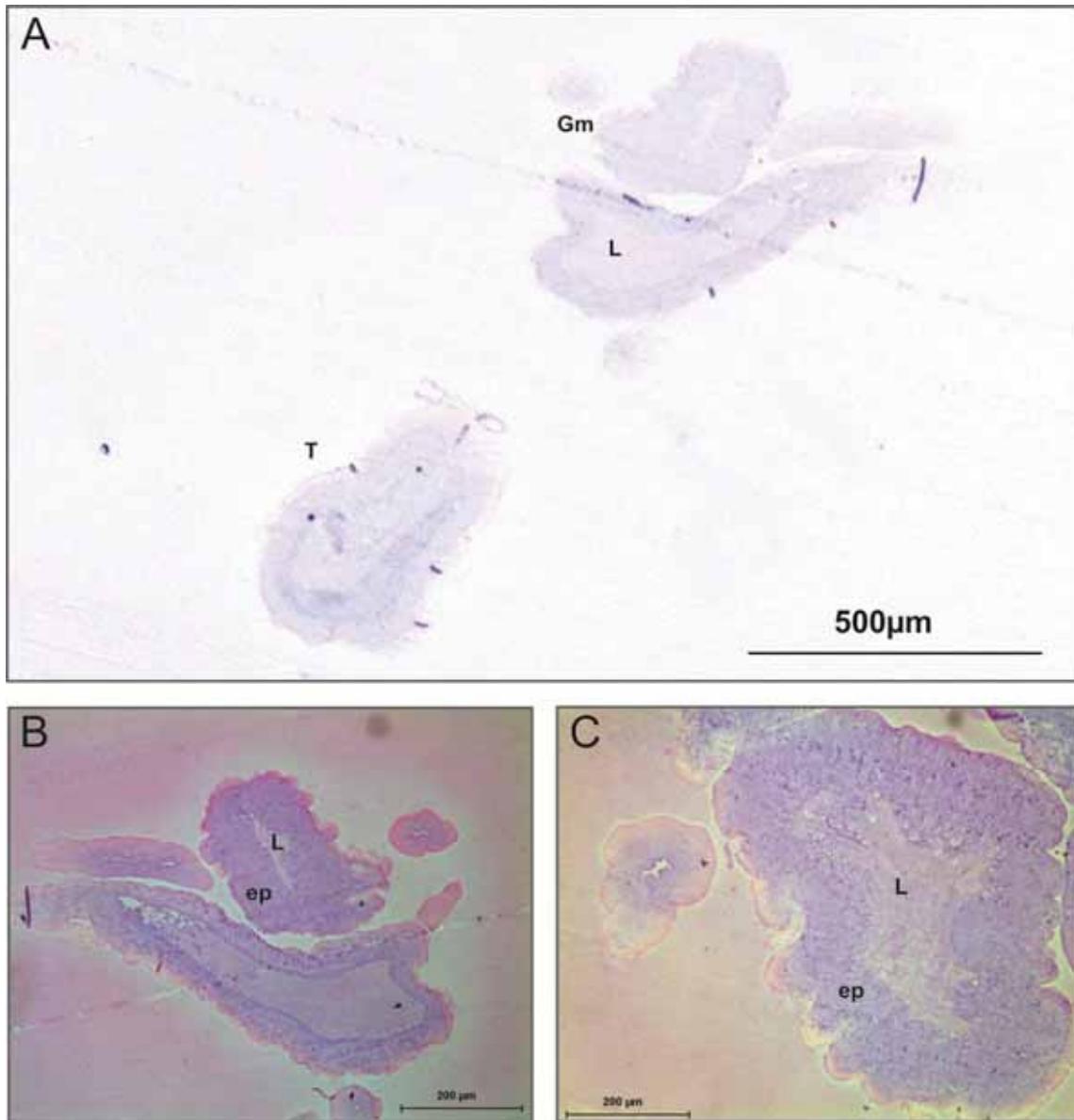


Figura 23. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Centris (ptilotopus) scopipes* em cortes transversais. Técnica: PAS conjugado com Azul de Alcian. Legenda: ep = epitélio glandular; Gm = glândula de muco; L = lúmen glandular; T = testículo.

APÊNDICE X

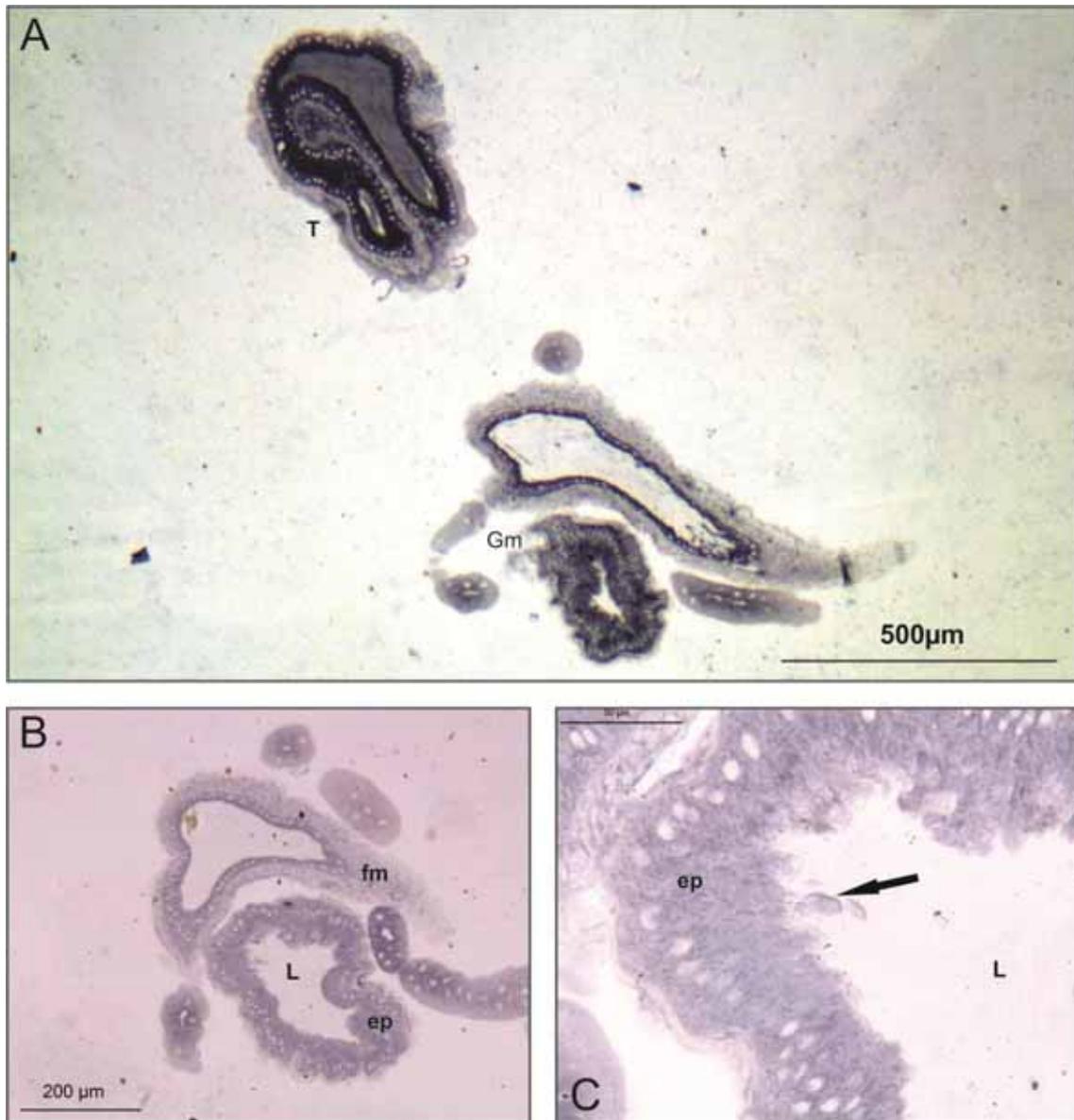


Figura 24. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Centris (ptilotopus) scopipes* em cortes transversais Técnica: Sudan Black. A) Aparelho reprodutor em maior escala. B-C) Glândula de muco em diferentes aumentos. Legenda: ep = epitélio glandular; FM = fibra muscular; Gm = glândula de muco; L = lúmen glandular; seta preta = vesícula secretora; T = testículo.

APÊNDICE Y

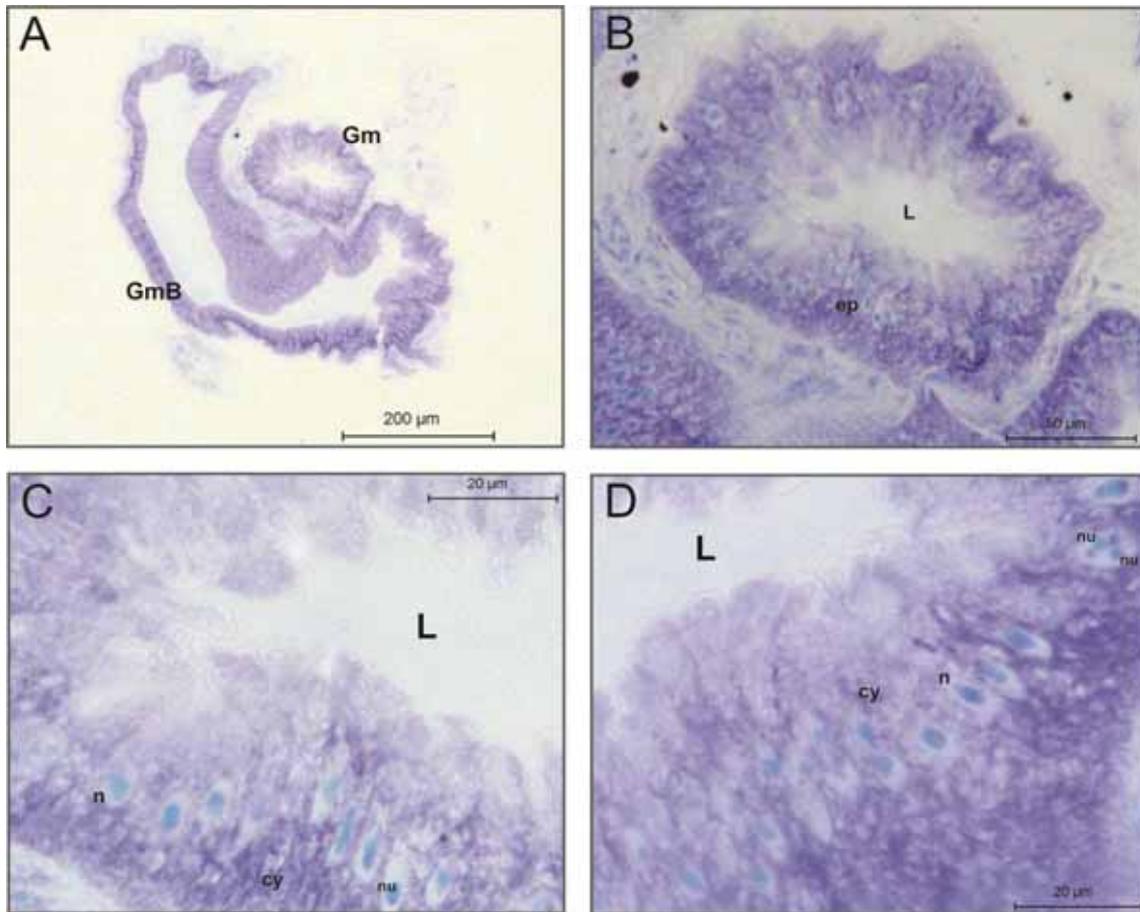


Figura 25. Fotomicrografias da glândula de muco de *Centris (pilotopus) scopipes* na técnica Concentração Crítica de Eletrólitos, indicando presença de DNA (verde) e RNA (metacromático). A) Fotomicrografia panorâmica da glândula em corte transversal. B) Fotomicrografia da região do epitélio glandular. C-D) Fotomicrografias região do epitélio glandular em maior aumento. Legenda: cy = citoplasma celular; ep = epitélio glandular; Gm = glândula de muco; GmB = Glândula de muco em região basal ; L = lúmen glandular; n = núcleo; nu = nucléolo.

APÊNDICE Z

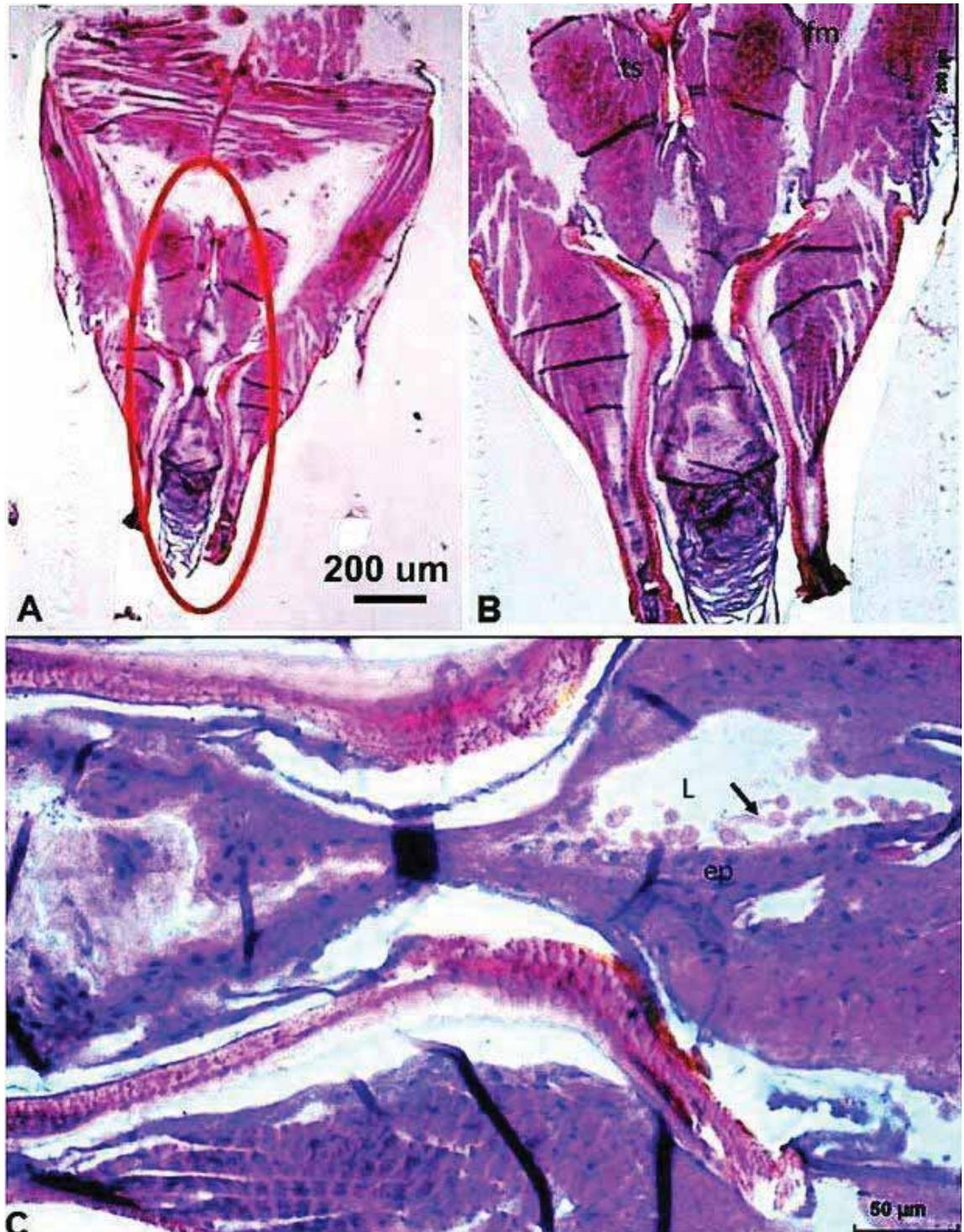


Figura 26. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na técnica Hematoxilina e Eosina. A) Corte longitudinal em maior aumento. B-C) Cortes transversais em diferentes aumentos. Legenda: fm= fibras musculares; ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas pretas = vesículas de secreção.

APÊNDICE AA

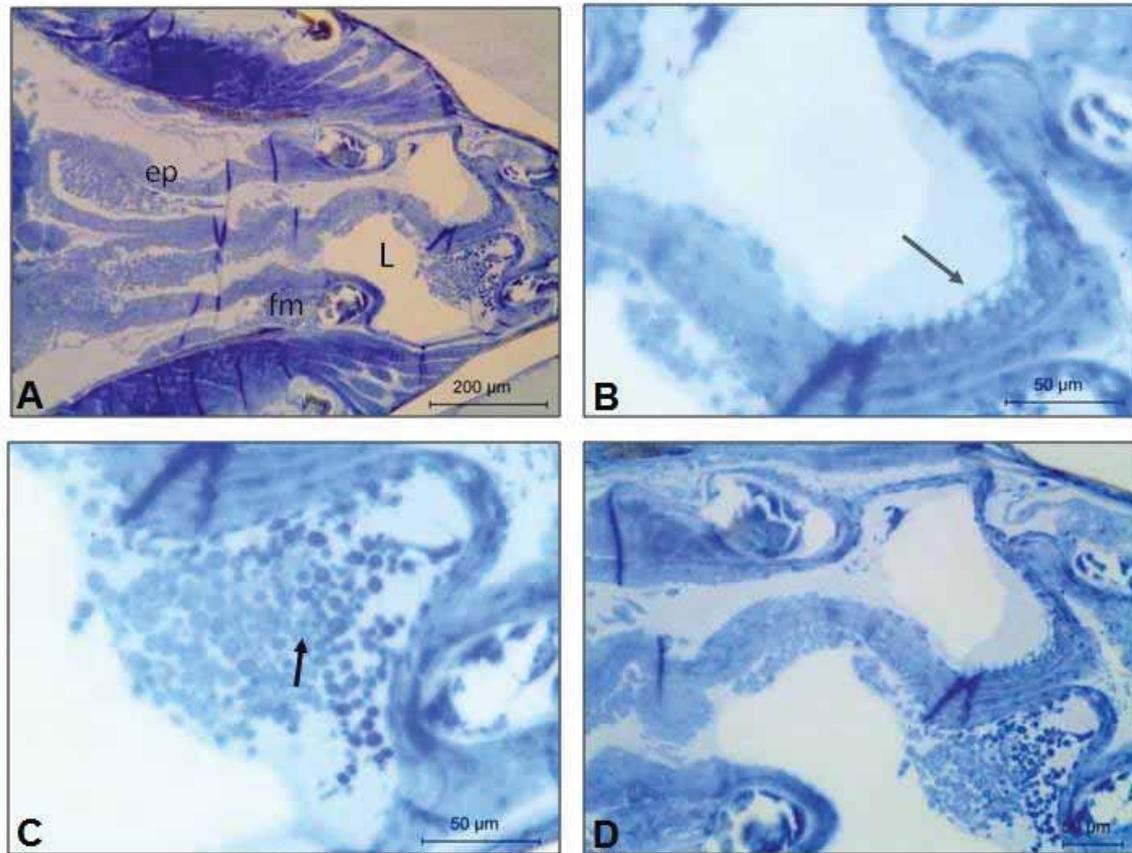


Figura 27. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de muco de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na Azul de Bromofenol. A) Corte longitudinal em menor aumento. B-C) Cortes transversais da vesícula seminal. D) Corte transversal da região das vesículas seminais. Legenda: fm= fibras musculares; ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas pretas = vesículas secretoras; setas cinzas = vestígios de secreção no ápice celular.

APÊNDICE BB

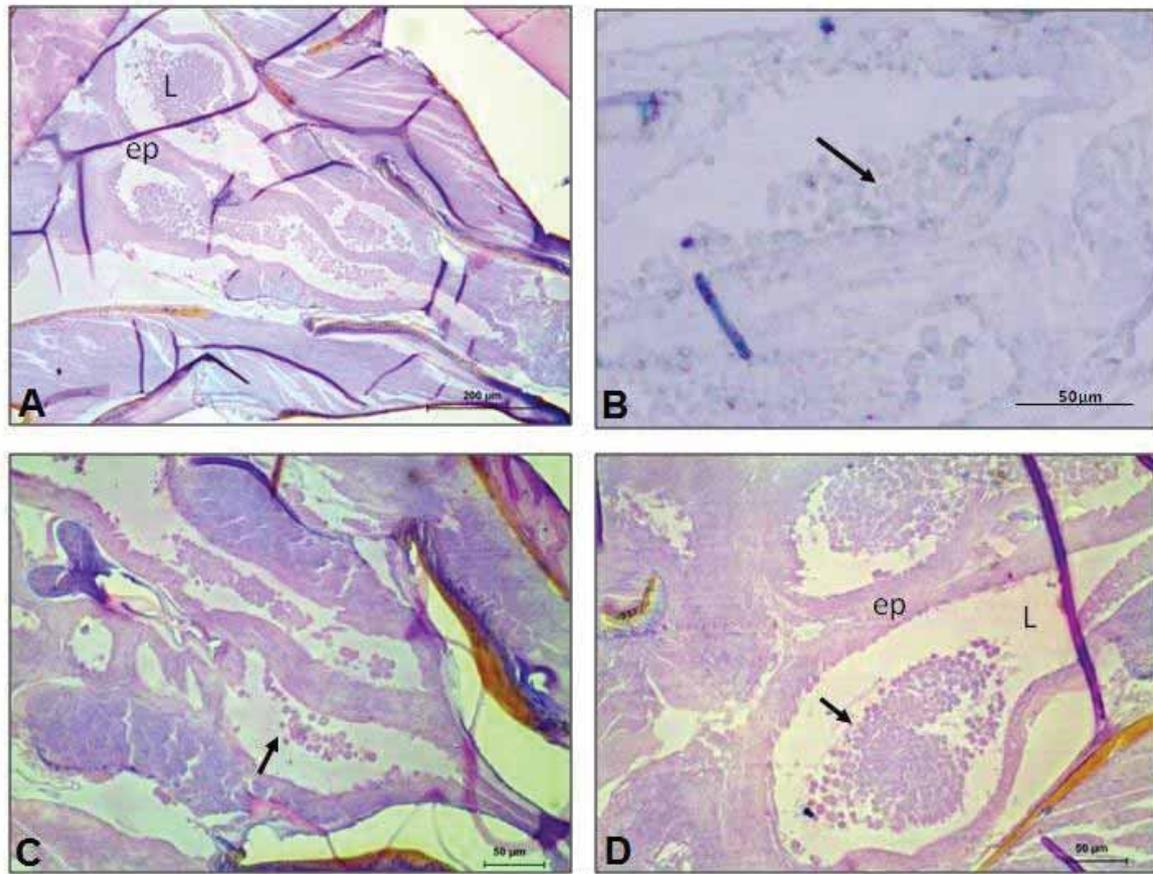


Figura 28. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de muco de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na técnica conjugadas de PAS com Alcian Blue (A-C-D) e somente com Alcian Blue (B). A) Corte longitudinal em maior aumento. B-C) Corte longitudinal da região da vesícula seminal. D) Corte longitudinal da região superior dos dutos deferentes pré-vesiculares. Legenda: ep = epitélio glandular; L = lúmen glandular; setas pretas = grânulos de secreção.

APÊNDICE CC

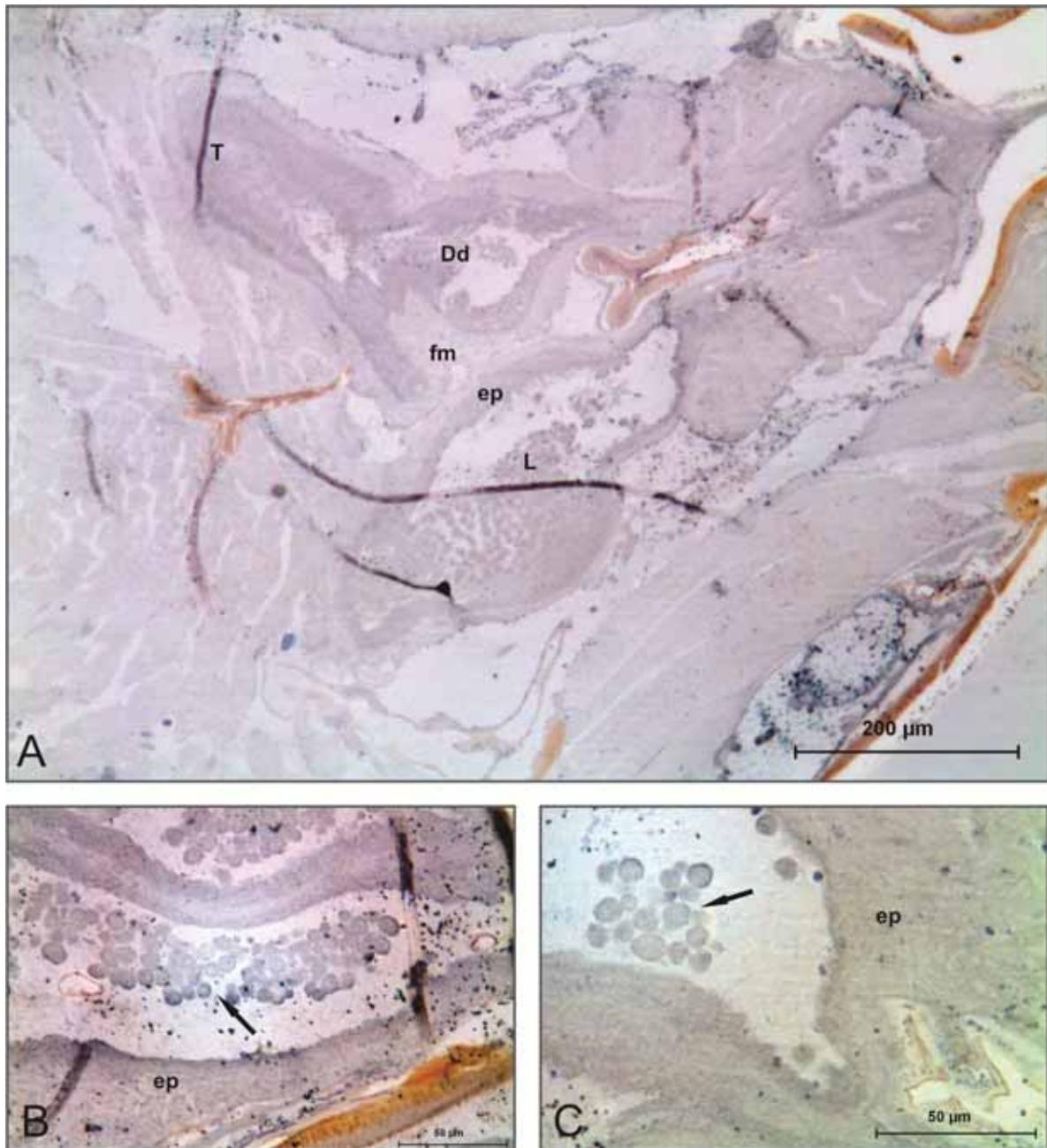


Figura 29. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de muco de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na técnica Sudan Black. A) Corte longitudinal em menor aumento. B-C) Cortes longitudinais em diferentes aumentos. Legenda: Dd = ducto deferente; ep = epitélio glandular; fm= fibras musculares; L = lúmen glandular; setas pretas = vesículas de secreção; T = testículo.

APÊNDICE DD

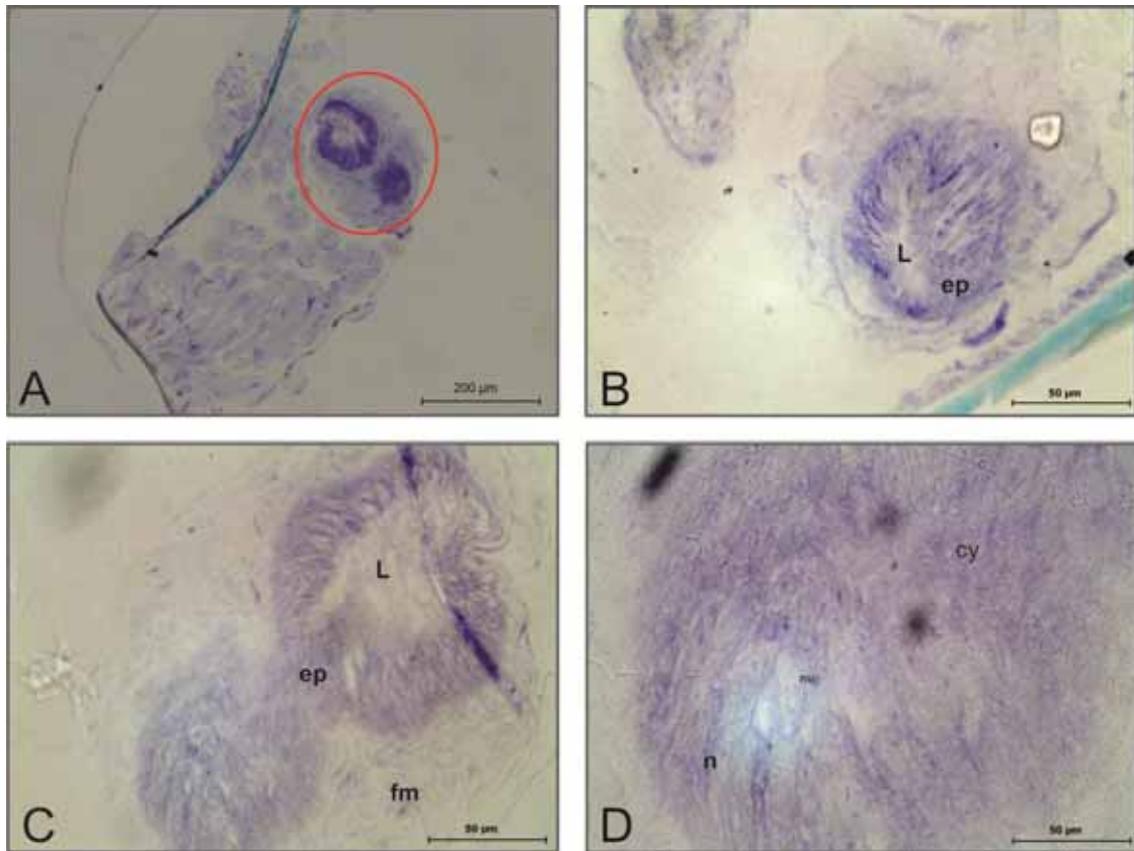


Figura 30. Fotomicrografias do aparelho reprodutor masculino de *Melipona quadrifasciata anthidioides* na técnica Concentração Crítica de Eletrólitos, indicando presença de DNA e RNA. A) Fotomicrografia do epitélio em corte transversal (círculo vermelho) – primeiro teste (4min). B-C-D) Fotomicrografias do epitélio em corte transversal – segundo teste (6min). C) Região do epitélio celular da região de interesse. D) Detalhamento do epitélio celular. Legenda: cy = citoplasma celular; ep = epitélio glandular; fm = fibras musculares; L= lúmen glandular; n = núcleo, nu = nucléolo.

APÊNDICE EE

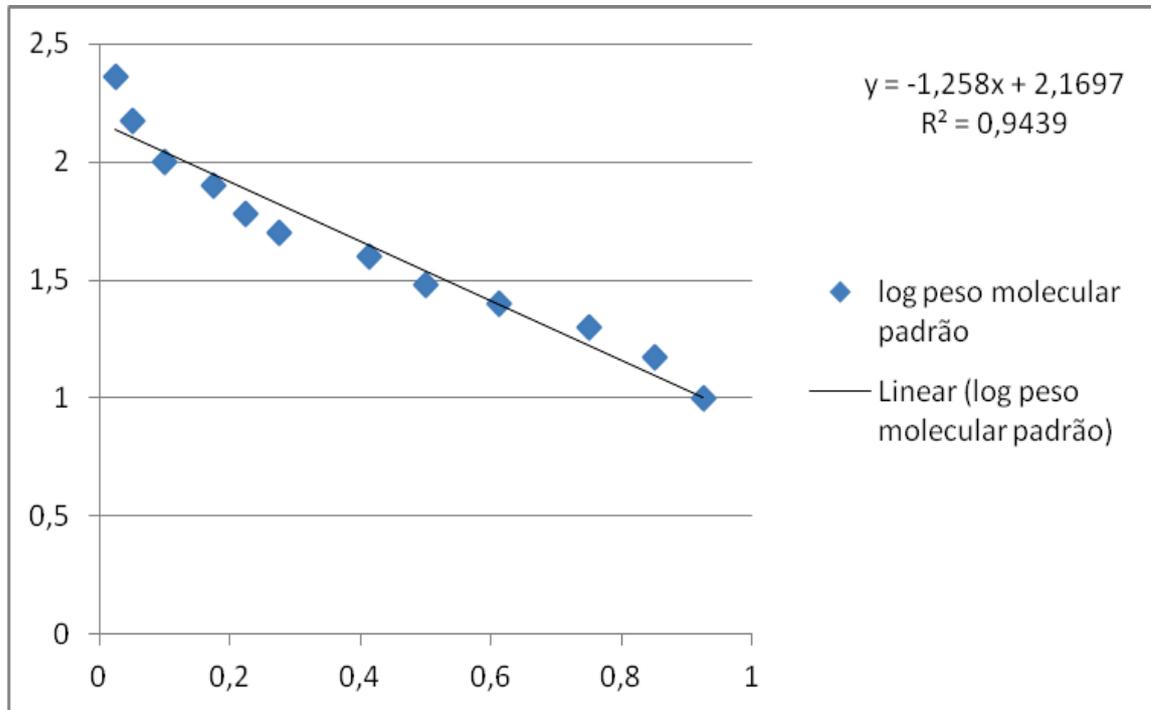


Figura 31. Gráfico do Fator de Retenção (eixo X) pelo log do peso molecular (eixo Y) do perfil proteico do padrão utilizado nos géis. Nota-se o índice de precisão maior do que 94%.

APÊNDICE FF

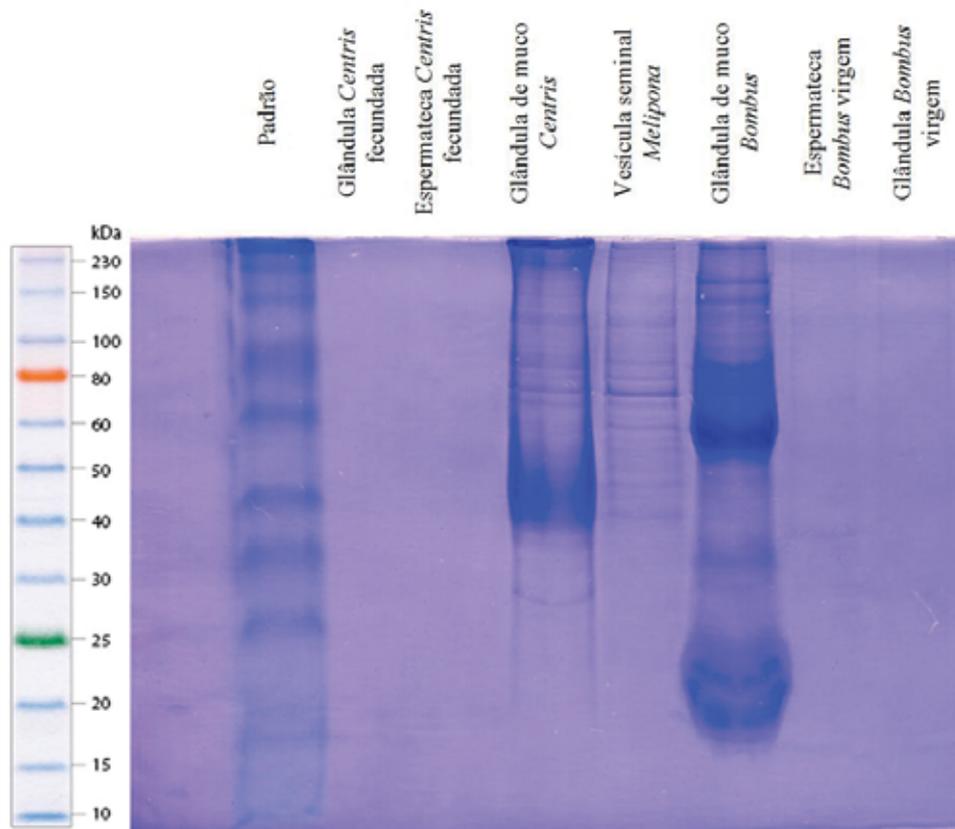


Figura 32. Gel de SDS-PAGE 10% extratos brutos contendo proteínas da glândula de muco, glândula espermatecal e espermateca de *Centris (ptilotopus) scopipes* e *Bombus morio* e vesícula seminal de *Melipona quadrifasciata anthidioides* com Coomassie Brilliant Blue G250.

APÊNDICE GG

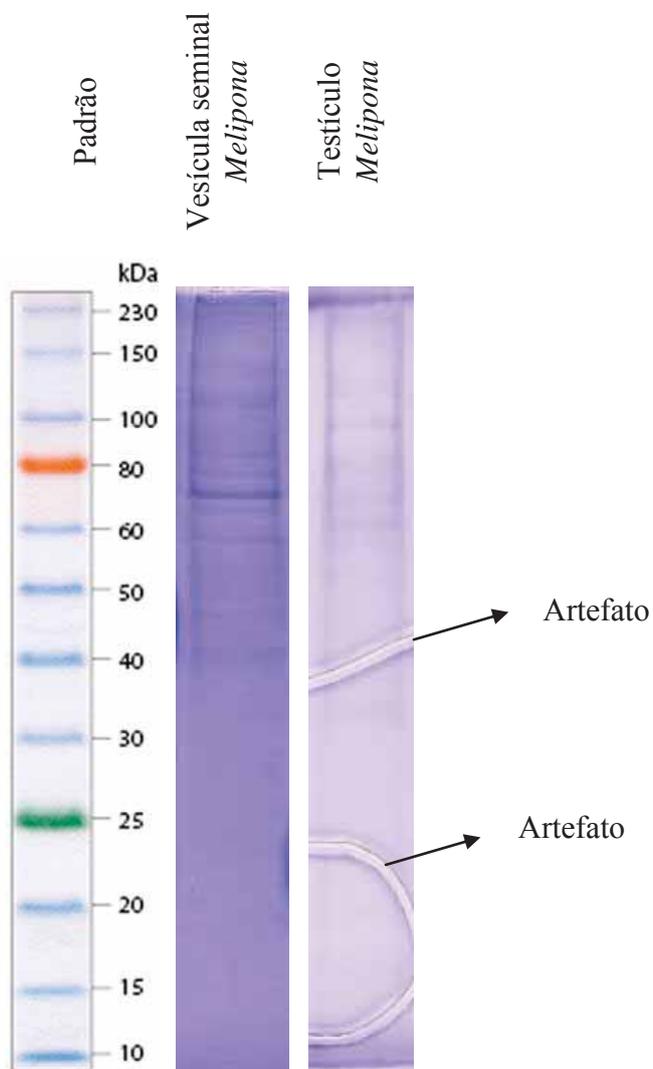


Figura 33. Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue. Comparação entre bandas da vesícula seminal e testículo com parte da vesícula seminal de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

APÊNDICE HH

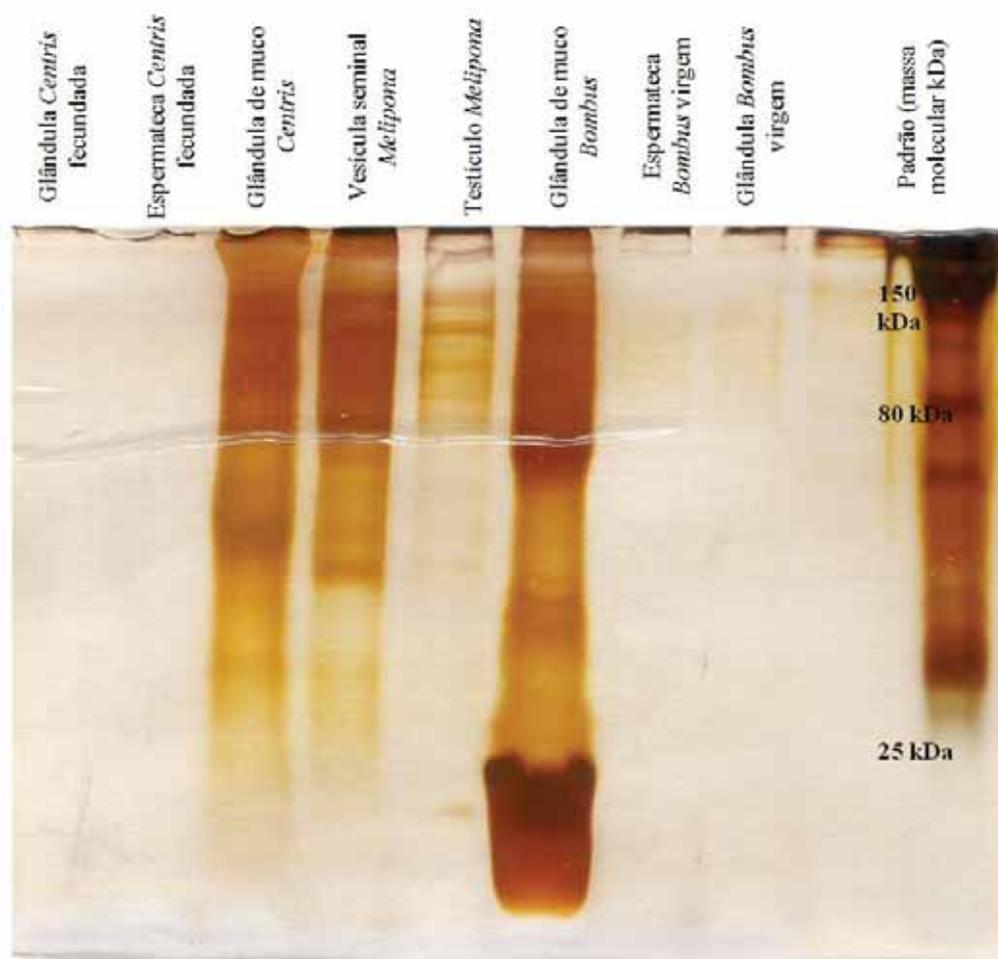


Figura 34. Gel de SDS-PAGE corado com Nitrato de Prata. Bandas proteicas dos machos das três espécies aparecem fortemente coradas.

APÊNDICE I I

Tabela 1. Abelhas coletadas em 24 saídas a campo entre os períodos de dezembro de 2011 a maio de 2012.

Espécie	Fêmeas virgens		Fêmeas fecundadas		Machos		Total
	histologia	molecular	histologia	molecular	histologia	Molecular	
<i>Centris (ptilotopus) scopipes</i>	2	0	4	11	4	10	31
<i>Bombus morio</i>	4	49	4	0	4	17	78
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	1	0	2	0	4	30	37

APÊNDICE JJ

Tabela 2. Concentração proteica a partir da média das absorvâncias das amostras.

	Glândula <i>Centris</i> fecundada (11)	Espermateca <i>Centris</i> fecundada (11)	Glândula de muco <i>Centris</i> (10)	Testículo <i>Melipona</i> (30)	Vesícula seminal <i>Melipona</i> (30)	Glândula de muco <i>Bombus</i> (17)	Espermateca <i>Bombus</i> virgem (49)	Glândula <i>Bombus</i> virgem (49)
Média das absorvâncias (nm)	0,0296	0,01	0,532	0,328	0,401	0,582	0,057	0,076
Concentração proteica (mg/mL)	0,044	0,014	0,792	0,488	0,597	0,867	0,084	0,113

APÊNDICE KK

Tabela 3. Valores de RF (Fator de Retenção) obtidos para as três espécies de machos. Em azul RFs iguais (bandas de mesmo peso molecular), em vermelho RFs que mais se destacaram por espécie (bandas fortemente coradas nos géis) e em verde banda específica de espécie.

Distância de migração das bandas (cm) de <i>Centris (ptilotopus) scopipes</i>	Fator de retenção das bandas (RF)	Distância de migração das bandas (cm) de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Fator de retenção das bandas (RF)	Distância de migração das bandas (cm) de <i>Bombus morio</i>	Fator de retenção das bandas (RF)
				0,1	0,025
0,2	0,05				
				0,3	0,075
0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1
0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125
		0,65	0,1625	0,65	0,1625
				0,75	0,1875
0,8	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2
1	0,25	1	0,25	1	0,25
		1,3	0,325	1,3	0,325
				1,6	0,4
1,7	0,425			1,7	0,425
		1,8	0,45		
				2,1	0,525
				2,25	0,5625
2,8	0,7			2,8	0,7
				3,1	0,775
7 bandas		7 bandas		15 bandas	

APÊNDICE LL

Tabela 4. Pesos moleculares (kDa) das bandas dos géis dos machos, adquiridos através do cálculo do fator de RF. Em azul pesos iguais (bandas de mesmo peso molecular), em vermelho pesos que mais se destacaram por espécie (bandas fortemente coradas nos géis) e em verde peso específico de espécie.

Peso molecular					
(kDa) das bandas de <i>Centris (ptilotopus) scopipes</i>	Fator de retenção das bandas (RF)	Peso molecular (kDa) das bandas de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Fator de retenção das bandas (RF)	Peso molecular (kDa) das bandas de <i>Bombus morio</i>	Fator de retenção das bandas (RF)
				138	0,025
128	0,05				
				119	0,075
111	0,1	111	0,1	111	0,1
103	0,125	103	0,125	103	0,125
		92	0,1625	92	0,1625
				86	0,1875
83	0,2	83	0,2	83	0,2
72	0,25	72	0,25	72	0,25
		58	0,325	58	0,325
				46	0,4
43	0,425			43	0,425
		40	0,45		
				32	0,525
				29	0,5625
19	0,7			19	0,7
				16	0,775
7 bandas		7 bandas		15 bandas	