

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO



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

GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS NA VESPA SOCIAL Polistes versicolor (OLIVIER): DA MORFOLOGIA ÀS RELAÇÕES COM O COMPORTAMENTO

FÁBIO BARROS BRITTO

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

Junho - 2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO



i

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

GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS NA VESPA SOCIAL Polistes versicolor (OLIVIER): DA MORFOLOGIA ÀS RELAÇÕES COM O COMPORTAMENTO

FÁBIO BARROS BRITTO

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

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

Junho - 2006

Dedico esta tese à melhor família do mundo: meus pais, José Britto e Leda, e meus irmãos, Gláucio e Gustavo.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de Pós-Graduação (processos 02/05400-4 e 04/10469-7).

Ao Professor, Orientador e Amigo Dr. Flávio Henrique Caetano, pela orientação, amizade, ensinamentos, puxões de orelha e conselhos, que contribuíram enormemente para minha formação acadêmica e para minha vida.

Ao Departamento de Biologia, pela estrutura proporcionada para o desenvolvimento desta tese e pelas pessoas que trabalham para o bom funcionamento do mesmo. Agradeço, portanto, à Lucila de Lurdes Segalla Franco e Neusa Aparecida Perinotto. Agradeço também ao Gerson Melo Souza, pela alegria e pela presteza na realização dos serviços técnicos. Em especial, agradeço à Cristiane M. Miléo, pelo companheirismo e amizade durante todos estes anos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unesp, Campus de Rio Claro, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano e dos técnicos Antônio Teruyoshi Yabuky (vulgo Sensei) e Monika Iamonti, pelo treinamento, auxílio técnico e amizade ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Edilberto Giannotti e à Profa. Dra. Sulene Noriko Shima, pelos ensinamentos e por me motivar a seguir buscando respostas para a melhor compreensão destes insetos tão fascinantes e, ao mesmo tempo, tão marginalizados aos olhos de muitos: as vespas.

À Profa. Dra. Regina L. M. Silva de Moraes, por me introduzir neste tão fascinante mundo da ciência.

À Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório por gentilmente permitir com que as dependências do Centro de Microscopia Eletrônica da Unesp, campus de Botucatu, fossem utilizadas para o desenvolvimento de parte deste trabalho e à Maria Helena Moreno, pelo auxílio técnico.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pae Silva, por gentilmente permitir com que as dependências de seu laboratório, no Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu, fossem utilizadas para o desenvolvimento de parte deste trabalho. À Seção de Pós-Graduação da Unesp de Rio Claro, na pessoa de Heloisa Aparecida Scopinho Nicoletti.

Aos amigos Pv's Thalita Rocha e Thiago Pietrobon. Sem eles este trabalho não chegaria aonde chegou. Agradeço, portanto, pela amizade e pelos momentos de aventura, risos e riscos, contando com as ferroadas (sempre com a amiga Thalita levando mais delas, é claro!).

Ao Prof. Dr. José Chaud Neto pela amizade.

À Profa. Dra. Doralice Maria Cella (Dora), pela amizade e pela sensibilidade de quem entende a cabeça dos alunos como ninguém.

Aos amigos Vagner e Marielle, pelo respeito e amizade, pelos conselhos e conversas de mesa e por me emprestarem seus ouvidos para ouvir minhas lamentações. Vocês vão longe!!!

Mais uma vez (agora na Tese), como não podia deixar de lembrar, agradeço ao meu amigo Akio. A verdadeira pessoa que me trouxe para Rio Claro.

Aos amigos e companheiros de basquete Bob, Kleber (Mamute), Alberto, Fernando (Ferfo) e Andrigo.

Aos amigos do departamento Zé Augusto, Thaís, Márcia, Tati, Rogilene (Rogi), Douglas (Doug), Izabela (Iza), Antônio, Fred, Dani, Eduardo (Du), Érika, Bruno, Thaisa, Karim, Silvana, Pablo, Bruna, Reinaldo, Márcio, Lorena, Sandra, Gislaine, Patrícia e a tantos outros que minha memória não permite lembrar neste momento, pelas experiências, festas, noites de boteco, churrascos, discussões científicas, papo furado, etc., etc...

Aos amigos de graduação, sempre lembrados em qualquer ocasião, Tati, Sheila, Ana, Samara, Larissa, Vagner, Cauré, Daniel, Patrícia, Sílvia, Renata, Lye, Carolzinha, BH, entre outros...

Aos amigos e companheiros de orientação, atuais ou já em outros cantos, Rodrigo, Murillo, Runer, Giovana e Zara. Obrigado pela força e pela amizade.

Aos "caras" lá de casa Felipe e Mylo. O primeiro pelas aventuras e caçadas, pelas baladas e viagens e pelas bebedeiras e outras doideiras que a convivência nos proporciona. Valeu Cara! O segundo pelos passeios no horto, por me fazer rir e por sempre estar feliz ao me recepcionar. Também agradeço por me agüentarem todos esses anos. Agradeço ainda ao "ex-cara lá de casa" Evandro, que sabe que sempre terá sua vaga cativa, seja qual for o "barraco".

A toda minha família, que entendendo ou não o que fui fazer longe de casa, sempre demonstrou sua preocupação e saudade. Agradeço, portanto, minha avó Nina, meu avô Edízio, minha tia Edileusa, meu tios Rogério e Elza, minhas primas Cristina, Gislaine, Bruna, Raquel, minha tias Nice, Lena e Julinha, meu tio Joe, meus primos Rogério (Gerão), Vanessa, Lúcia, Bruno (M.Q.), Aurélio (Alemão), Ricardo, e a todos meus muitos outros primos, tios, tias e agregados.

Agradeço, ainda, aos meus pais, José e Leda, por me ensinarem a respeitar o próximo e por me mostrarem que com luta nós podemos alcançar nossos objetivos. Agradeço, também, meus irmãos Gláucio e Gustavo, por serem meus melhores amigos, no verdadeiro sentido da palavra. Também não poderia deixar de lembrar dos mais novos integrantes da família, Jussara e minha sobrinha Manuela.

O mais especial dos agradecimentos à minha companheira de toda hora, seja de perto ou de longe, nas horas alegres ou de choro, sempre me apoiando, me aconselhando e me ensinando que a vida é mais bela quando existe alguém que amamos ao nosso lado. Agradeço, portanto, à minha querida namorada Thaís (Amorzão, Conchinha...), quem sempre me fez, faz e fará uma pessoa de bem com a vida. Te conhecer só trouxe alegria para minha vida. Viver ao seu lado, me faz uma pessoa melhor.

Ao Sr. Luís e à Dona Madalena, por me acolherem como um filho em suas vidas. Além disto, por proporcionarem a mim a convivência de uma pessoa tão especial: sua filha. Ainda, nesta segunda família, não poderia deixar de citar os amigos Thiago e Amanda.

A todos os citados ou não citados que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja com críticas, sugestões ou me estimulando nos momentos difíceis.

Agradeço a Deus.

ÍNDICE

Resumo Geral	1
General Abstract	3
Introdução Geral e Revisão da Literatura	5
Objetivos	18
Capítulo 1 - Caracterização histoquímica da secreção e variações morfológicas apresentadas	
pelas glândulas hipofaríngeas de vespas de diferentes idades	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	25
Resultados	32
Tabelas	37
Figuras	42
Discussão	54
Capítulo 2 - A atividade enzimática das glândulas hipofaríngeas de	
Polistes versicolor	64
Resumo	65
Abstract	66
Introdução	67
Material e Métodos	70
Resultados	74
Figuras	77
Discussão	85
Capítulo 3 - Um olhar mais profundo à morfologia e à química das glândulas hipofaríngeas de	
Polistes versicolor: ultra-estrutura e citoquímica ultra-estrutural	90
Resumo	91
Abstract	92
Introdução	93
Material e Métodos	97
Resultados	101
Figuras	107
Discussão	136
Capítulo 4 - A Relação do desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas com o	
comportamento de <i>Polistes versicolor</i>	149
Resumo	150
Abstract	151
Introdução	152
Material e Métodos	155
Resultados	161
Tabelas	174
Figuras	186
Discussão	195
Conclusões Gerais	202
Referências Bibliográficas	205
Apêndices	221

RESUMO GERAL

As glândulas hipofaríngeas são estruturas presentes apenas na ordem Hymenoptera e apresentam-se como células epidérmicas modificadas em alguns grupos, enquanto em outros, apresentam morfologia mais elaborada, caracterizando-se como órgãos com anatomia bem definida. Muito bem estudadas em abelhas, as glândulas hipofaríngeas são glândulas exócrinas que fazem parte do sistema salivar e são responsáveis, em *Apis*, pela produção de substâncias que constituem a geléia real. Este produto é oferecido a todas as larvas como alimento, de maneira desigual, sendo este um fator responsável pela diferenciação das castas nas abelhas.

Os objetivos do presente estudo foram analisar as glândulas hipofaríngeas de vespas, que carecem de estudos, procurando reconhecer seu papel na regulação social da colônia, bem como identificar a presença de aspectos glandulares que indicassem a ocorrência de morte celular. Utilizando *Polistes versicolor*, uma das espécies do gênero considerado como "chave" para o entendimento da evolução do comportamento social em insetos, foram realizadas análises histoquímicas, enzimológicas e ultra-estruturais das glândulas hipofaríngeas. Juntamente com estas análises foi realizado o estudo comportamental dos indivíduos analisados.

Estes estudos auxiliaram no entendimento do ciclo de desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, bem como determinaram a constituição química da secreção glandular, representando uma contribuição inédita à identificação da morfologia e função dessas estruturas e de seu possível papel no contexto social das colônias de *P*.

1

versicolor. Os resultados encontrados levam a crer que as glândulas destas vespas não estão envolvidas na produção de alimento para as larvas, como ocorre em abelhas. As características morfológicas das células secretoras e da secreção encontrada, bem como as características comportamentais apresentadas por estas vespas, sugerem que as glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* possam estar envolvidas com a produção de enzimas digestivas.

GENERAL ABSTRACT

The hypopharyngeal glands are structures present only in the order Hymenoptera. They are constituted by modified epidermal cells in some groups, while in others, they present a more elaborated morphology and are characterized as distinct organs with a defined anatomy. These exocrine glands are part of the salivary system and have been well studied in bees. In *Apis*, they are the main responsible for the production of components of royal jelly. Brood is not fed equally with royal jelly resulting in cast differentiation in this genus.

The aims of the present work were to analyze the hypopharyngeal glands of the wasp *Polistes versicolor* in order to recognize their role in the social regulation of the colony, as well as to identify the presence of glandular features that could indicate cell death. *Polistes* is considered a "key genus" for the understanding of the evolution of social behavior in insects. In the present work we used histochemical, enzymological and ultrastructural analyses. Behavioral studies were also carried out to determine the relationship between glandular development and individual activities.

These studies provided important information about the development of the hypopharyngeal glands in *P. versicolor* and determined the histochemical characteristics of the glandular secretion. It represents an important contribution to the identification of the morphology and the roles played by these structures in the social context of *P. versicolor* colonies. The results suggest that these glands are not involved in food production for the brood, unlike the observed in bees. The morphological

characteristics of the secretory cells and their secretion, as well as the behavioral characteristics of these wasps suggest that the hypopharyngeal glands of *P. versicolor* might be involved in the production of digestive enzymes.

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DA LITERATURA

Os Hymenoptera possuem vários tipos de glândulas ligadas ao aparelho bucal que são, por isso, consideradas como glândulas anexas ao tubo digestivo. De maneira geral, estas glândulas são designadas de glândulas salivares, ou constituem o chamado sistema salivar. As principais glândulas que compõem este sistema são as salivares do tórax, as mandibulares e as hipofaríngeas (BORDAS, 1895).

As glândulas hipofaríngeas são, de certa maneira, especiais, porque, diferentemente das outras, estão presentes apenas na ordem Hymenoptera. Neste grupo, algumas espécies apresentam glândulas hipofaríngeas formadas apenas por células epidérmicas diferenciadas, enquanto, em outras, estas constituem um órgão com anatomia bem definida (CRUZ-LANDIM, 1967). Pouco se sabe sobre a função destas estruturas, sendo que seu papel somente pode ser inferido indiretamente, relacionando a sua morfologia e seu grau de desenvolvimento à atividade dos indivíduos, às características comportamentais e por analogia com *Apis mellifera*, onde sua função está estabelecida com relativa segurança (CRUZ-LANDIM & COSTA, 1998).

A secreção produzida por estas glândulas representa um importante componente do processo de diferenciação de castas em abelhas, onde, na fase larval, apenas indivíduos que se tornarão rainhas recebem continuamente esta secreção, que em *Apis* é denominada geléia real (DIXON & SHUEL, 1963).

Os estudos destas estruturas em espécies de insetos sociais considerados menos derivados, como em diversas espécies de vespas, são escassos. As únicas evidências

presentes com relação à função das glândulas hipofaríngeas são encontradas somente em grupos com hierarquia altamente organizada, que possuem divisão de casta e de trabalho bem definidas e pré-estabelecidas (SZOLDERTZ & CRAILSHEIM, 1993).

As vespas do gênero Polistes vêm sendo utilizadas como organismos modelo para o estudo de evolução do comportamento social desde a década de 1940. Elas têm atraído a atenção de pesquisadores, por serem consideradas o "gênero chave" para o entendimento da evolução dos insetos sociais, tanto devido à existência de apenas uma leve diferença entre castas, comprovando o estágio primitivo na evolução da organização social como, também, pelo fato de ocupar uma larga faixa de áreas climáticas, permitindo comparações efetivas entre as espécies de clima temperado e tropical (EVANS, 1958). Além disto, estas vespas representam um importante material para estudo, dado seu enorme potencial biológico como agentes controladores de pragas, ainda a ser estudado pelo homem (PREZOTO, 1996). Nesse sentido, o conhecimento da biologia destes insetos é de fundamental importância, pois, cerca de ¹/₄ das famílias da ordem Hymenoptera são predadoras e muitas destas tendem a ser sociais e viver em colônias. Vespas sociais abastecem seus ninhos com larvas e outros tipos de insetos e, por isto têm sido usadas em diversos projetos de controle biológico (DEBACH, 1974). Estudos relacionados com a predação de larvas de Spodoptera frugiperda (Leptodptera) e Heliothis zea (Lepdoptera) por Polistes similimus evidenciaram que cada vespa captura, em média, 12 presas por dia, sendo constatada redução de 77,16% e 80,0%, respectivamente, na população destas pragas em plantações de milho (Zea mays) (PREZOTO, 1996).

Assim, como as glândulas exócrinas são estruturas essenciais na biologia dos insetos sociais, o estudo das glândulas hipofaríngeas torna-se muito importante neste grupo, onde há pouca informação sobre sua morfologia, função e importância na vida destes insetos. Praticamente não existem trabalhos que abordem tanto a questão comportamental quanto as características morfológicas de glândulas como as hipofaríngeas em *Polistes* ou em outras vespas. Portanto, no presente estudo, ambas as características foram abordadas concomitantemente.

1. O Gênero Polistes

Os Vespidae caracterizam-se por apresentar grande variação quanto à organização social. Possuem representantes que podem ser arranjado em um gradiente de complexidade social, indo desde estágios pré-sociais e sociedades incipientes até estágios socialmente muito desenvolvidos. De acordo com os dados levantados por Richards (1971), a família Vespidae engloba 3 subfamílias: Stenogastrine, Vespinae e Polistinae. Gillot (1985 – apud PREZOTO, 1996) estima que e o número aproximado de espécies para cada grupo seja, respectivamente, 50, 60 e 800, sendo os Stenogastrinae distribuídos desde a Índia até a Nova-Guiné, os Vepinae distribuídos pela Ásia, Europa e América do Norte e os Polistinae com distribuição cosmopolita. No entanto, estudos cladísticos mais recentes demonstraram que além destas subfamílias também fazem parte dos Vespidae os Euparaginae, Massarinae e Eumeninae (CARPENTER, 1993).

O gênero *Polistes* está localizado dentro da subfamília Polistinae, tribo Polistini. Segundo Akre (1982), existem 206 espécies descritas deste gênero distribuídas por toda região tropical e temperada do globo terrestre. Nas Américas elas também possuem ampla distribuição, com mais de 84 espécies (RICHARDS, 1978).

O ciclo de vida das colônias de *Polistes* pode ser dividido em distintas fases. Reeve (1991) divide o mesmo em quatro: (1) Fase de fundação (ou fase de préemergência); (2) Fase de operárias; (3) Fase de reprodutores (as fases 2 e 3 podem ser agrupadas em uma única denominada de pós-emergência); (4) Fase intermediária (mais nítida nas espécies de clima temperado).

Na fase de fundação ou pré-emergência, as fêmeas reprodutoras jovens (ou fundadoras) iniciam a construção de novos ninhos. Esta atividade pode ser desempenhada solitariamente (fundação por haplometrose) ou com outras fêmeas auxiliares (fundação por pleometrose), sendo este último padrão comportamental o mais observado. A fase de operárias se inicia com a eclosão das primeiras fêmeas geradas na colônia. Como o nome sugere, estas fêmeas exercem, principalmente, atividades de operárias e sua eclosão demarca o fim da pré-emergência. O fim da fase de operárias é marcado pelo início da produção dos primeiros indivíduos reprodutores (futuras rainhas e machos). Este acontecimento marca o início da fase de reprodutores, que dura até o período de declínio da colônia. A fase intermediária ocorre entre o fim de uma colônia e o início da próxima.

Para as espécies de regiões temperadas, a fase intermediária ocorre exatamente no período em que as vespas entram em hibernação, durante o inverno. Isto faz com que as colônias desta região possuam ciclos de desenvolvimento sincronizados durante o ano. Já as vespas de regiões tropicais possuem ciclo de desenvolvimento assincrônico e, assim, colônias em diferentes fases de desenvolvimento podem ser encontradas o ano todo. Neste caso não ocorre hibernação, sendo que, apenas em épocas mais frias, as vespas podem se juntar em grupos denominados de agregados de inverno, onde elas permanecem imóveis a maior parte do tempo (WEST-EBERHARD, 1969; GOBBI, 1977).

Em espécies de clima temperado o ciclo de vida das colônias dura por volta de cinco meses (SPRADBERY, 1973). Já as de clima tropical como *Polistes versicolor*, o ciclo de vida das colônias podem durar de 3 a 10 meses e, além disto, podem ser observadas colônias de ciclo curto e colônias de ciclo longo (GOBBI, 1977). As colônias de ciclo curto geralmente se desenvolvem entre os meses de dezembro e janeiro e duram de 3 a 6 meses. São colônias de alta produtividade que, dependendo das condições climáticas, dão origem aos agregados de inverno na fase intermediária. Já as colônias de ciclo longo duram de 7 a 10 meses e são fundadas logo após o inverno. Em alguns casos estas perdurarão até o inverno seguinte, porém com produtividade inferior ou, no máximo, semelhante às colônias de ciclo curto (GOBBI, 1977).

As colônias de *Polistes* são abastecidas com alimento de origem animal (geralmente larvas de Lepdoptera), água e néctar (GOBBI, 1977; PREZOTO, 1996; GIANNOTTI & MACHADO, 1999; ZARA & BALESTIERI, 2000), sendo este padrão comumente observado tanto em espécies de climas tropical quanto nas de temperado. Em algumas espécies ocorre um fator diferencial quanto à atividade forrageira que é a estocagem de néctar (WEST-EBERHARD, 1969; PREZOTO, 2001).

Como uma espécie social primitiva, a diferenciação morfológica de castas é praticamente inexistente, sendo que rainhas e operárias não apresentam distinção física significante, embora em algumas espécies as rainhas tendam a ser maiores (CUMBER, 1951). A manutenção da hierarquia nos ninhos de *Polistes* é feita, principalmente, por meio da dominação física e da utilização de oofagia e larvifagia diferenciais, onde as vespas distinguem sua cria das demais e ingerem os descendentes (ovos e larvas) das concorrentes. Esse processo faz com que uma das fêmeas se torne dominante (ou

rainha) enquanto as outras serão as subordinadas. As operárias também se organizam em uma hierarquia estabelecida pela força física apesar de, em situações normais, não botarem ovos. Neste sistema forma-se um tipo de organização hierárquica denominada de "hierarquia linear" (PARDI, 1948). Assim, por exemplo, em uma colônia com quatro indivíduos (A, B, $C \in D$), o indivíduo A domina os indivíduos B, $C \in D$, o indivíduo Bdomina os indivíduos $C \in D$ e o indivíduo C domina o indivíduo D. Entretanto, apenas A é a rainha (ou fêmea α).

As características comportamentais dos indivíduos apresentam alguns padrões, que podem ou não ser observados, dependendo da fase em que a colônia se encontra. Em geral, as vespas recém-emergidas de *P. versicolor* permanecem imóveis na face posterior do ninho durante a maior parte do tempo, podendo realizar apenas alguns vôos de orientação (ZARA & BALESTIERI, 2000). Após cerca de uma semana elas iniciam as atividades de forrageamento. As operárias mais velhas têm a tendência de participar de trabalhos domésticos, permanecendo, boa parte do tempo sobre as pupas, entretanto, não há nenhuma divisão de trabalho bem definida segundo a idade (YOSHIKAWA, 1963).

Outras fêmeas recém emergidas, após a primeira semana de vida, podem apresentar desenvolvimento ovariano e se tornar fêmeas de substituição. A fêmea de substituição poderá realizar disputa pelo domínio do ninho ou fundar uma nova colônia em período oportuno (CARNEIRO, 1991). Na fase reprodutiva, começam a aparecer os machos, as fêmeas com potencial para estabelecer novas colônias acasalam-se e chega ao ponto em que a hierarquia linear se desestabiliza. Neste ponto, inicia-se o final do ciclo da colônia, onde começa a ocorrer diminuição no número de imaturos, as saídas para forrageamento são poucas e a hierarquia linear fica muito abalada (GOBBI, 1977).

Com relação à arquitetura dos ninhos, em geral, a maioria de espécies de *Polistes* seguem o mesmo padrão. Eles são constituídos por uma única camada de favo, sem envelope de cobertura, que é fixada ao substrato por um pedúnculo. Ninhos com estas características são denominados de *stelocyttarus gymnodomous* segundo classificação de Richards & Richards (1951). Geralmente, nos favos de *Polistes*, o pedúnculo encontra-se localizado próximo às células periféricas, fazendo com que em diversas espécies eles fiquem a cerca de 90° de inclinação com relação ao substrato (Fig. 1) (DOWNING & JEANNE, 1986). O principal material utilizado para a

construção é a fibra vegetal que, juntamente com a secreção salivar produzida por estas vespas forma um tipo de polpa vegetal que posteriormente é moldado sobre as paredes do ninho para a construção de novas células ou para aumentar as já existentes (RICHARDS, 1978). Assim, no final do processo, o ninho adquire a textura de um papel. Esta característica é responsável pela denominação *paper wasp* (ou vespa papel) recebida por estas vespas em diversos locais do mundo.



FIGURA 1. Colônia de Polistes versicolor

2. As Glândulas Hipofaríngeas

A função das glândulas exócrinas nos insetos é de fundamental importância, visto que as mesmas podem atuar na produção de enzimas digestivas, substâncias de comunicação (feromônios), substâncias nutritivas que são oferecidas a outros indivíduos, substâncias lubrificantes, etc. Assim, as glândulas interferem diretamente em sua biologia.

Noirot & Quennedey (1974) descreveram três tipos distintos de organização para as células que formam as glândulas exócrinas dos insetos, sendo estes tipos designados de classes I, II e III. Na classe I as células secretoras são células epidérmicas simples que se desenvolvem para produzir alguma substância de exportação, sendo recobertas em sua face apical pela cutícula tegumentar. A secreção produzida é liberada para o exterior do corpo, atravessando a cutícula (Fig. 2).

A classe II é representada por células glandulares que se apresentam rodeadas por células epidérmicas. Assim as células glandulares não estão em contato direto com a cutícula, sendo que a secreção produzida precisa passar por dentro das células epidérmicas circundantes antes de atravessar a cutícula e ser eliminada (Fig. 2).

Na classe III as células são oriundas da epiderme, mas, assim como na classe II, não apresentam contato direto com o tegumento cuticular. Estas células destacam-se da epiderme, sendo geralmente esféricas, e se ligam à cutícula por meio de um canal condutor (constituído por outra célula). Neste caso o lúmen do canal se conecta a um poro da cutícula, por onde a secreção é eliminada (Fig. 2).



FIGURA 2. As três classes de células secretoras das glândulas de insetos, de acordo com a classificação de Noirot & Quennedey (1974): classe I (c1); classe II (c2) e classe III (c3). As setas indicam o sentido de eliminação da secreção através da cutícula (cu). (Esquema retirado de Quennedey, 1998).

As glândulas hipofaríngeas são constituídas por células da classe III. São estruturas pares, sendo uma porção localizada de cada lado da placa hipofaríngea. A ligação das células secretoras com a placa ocorre por meio de canalículos que conduzem a secreção. Esta característica é responsável pelo nome da glândula.

A placa hipofaríngea localiza-se na cabeça dos insetos, porém as glândulas hipofaríngeas somente são encontradas na ordem Hymenoptera, a qual representa as abelhas, formigas e vespas. Entretanto, apesar de serem exclusivas desta ordem, ainda não existem estudos que abranjam todo o grupo. Estas glândulas também não estão presentes nas larvas e surgem durante a pupação. Elas se originam de invaginações látero-ventrais do epitélio da região anterior da faringe (CRUZ-LANDIM & MELLO, 1967; GAMA, 1978).

Diferenças entre os tipos anatômicos das glândulas hipofaríngeas estão basicamente ligadas ao local onde os canalículos provenientes das células secretoras desembocam. Neste aspecto, foram descritos quatro tipos anatômicos distintos de glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM & COSTA, 1998):

Tipo 1 – Glândulas constituídas por unidades secretoras esféricas unicelulares conectadas individualmente à placa hipofaríngea por seus canalículos. Neste caso a placa hipofaríngea apresenta-se crivada no local onde os canalículos desembocam (Fig. 3 e 4D).

Tipo 2 – Na região do contato dos canalículos com a placa hipofaríngea ocorre uma invaginação da placa, formando um sulco onde a secreção é liberada (Fig. 3).

Tipo 3 – A invaginação da placa hipofaríngea é mais pronunciada, formando um pequeno canal axial onde os canalículos de todas as células secretoras estão conectados (Fig. 3). Neste caso a glândula toma o aspecto de um cacho curto.

Tipo 4 – A invaginação da placa hipofaríngea toma dimensões ainda maiores, formando um cacho longo (chegam a alcançar 1cm de comprimento em *Apis*) (Fig. 3). Glândulas hipofaríngeas do tipo 4 podem ainda apresentar três subtipos. No primeiro os canalículos das células secretoras são ligados direta e independentemente ao canal axial. No segundo os canalículos das células secretoras podem se ligar ao canal axial de forma agrupada. No último caso os canalículos podem estar conectados a ramificações curtas do canal axial.

As unidades secretoras de todos os Hymenoptera estudados têm se mostrado como estruturas globulares. Entretanto, no caso de *Apis* as unidades secretoras não são formadas por células individuais, mas sim por agrupamentos de células secretoras.





FIGURA 3. Os diferentes tipos de glândulas hipofaríngeas encontradas nos Hymenoptera, de acordo com classificação de Cruz-Landim & Costa, 1998.

Apesar destas variações, em todos os casos, as células secretoras continuam sendo classificadas como células da classe III (Fig. 2), segundo classificação de Noirot & Quennedey (1974). Nestas glândulas as células secretoras liberam sua secreção em uma célula canalicular que conduz a secreção até a placa hipofaríngea (no caso das glândulas dos tipos 1 e 2) ou até o canal axial (glândulas dos tipos 3 e 4). No caso das unidades secretoras multicelulares, apesar das células secretoras estarem unidas, os canalículos de cada uma destas células preserva sua individualidade. Assim, embora estes canalículos desemboquem agrupados no canal axial, eles são independentes e as células secretoras não possuem lúmen comum.

Estudos em abelhas mostraram que, quando ativas, as células secretoras possuem núcleos bem desenvolvidos e apresentam-se ricas em retículo endoplasmático rugoso e vesículas de secreção, indicando síntese intensiva de material protéico para

exportação (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986/87; HUANG & OTIZ, 1989; KNECHT & KAATZ, 1990).

Em geral, a função das glândulas hipofaríngeas só pode ser inferida indiretamente, relacionando a sua morfologia e grau de desenvolvimento às atividades dos indivíduos, às suas características comportamentais e por analogia com *Apis mellifera*, onde sua função está bem definida (COSTA, 2002). Devido à localização de seu ponto de desembocadura, o produto destas glândulas tanto pode ser misturado com o alimento que está sendo ingerido, como pode ser eliminada para o exterior e distribuído para outros indivíduos da colônia por trofalaxia.

Em *Apis* (CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969) e em alguns meliponíneos (CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986/87) o pico de desenvolvimento glandular é observado em operárias denominadas nutridoras, as quais oferecem a secreção glandular como alimento a todas as larvas, rainha e machos da colônia (SZOLDERTZ & CRAILSHEIM, 1993). A secreção produzida por estas glândulas representa um importante componente do processo de diferenciação de castas, onde, na fase larval, apenas indivíduos que se tornarão rainhas recebem continuamente esta secreção, que em *Apis* é denominada geléia real (DIXON & SHUEL, 1963). A produção da geléia real ocorre em operárias que têm, normalmente, de 3 a 18 dias de idade (FREE, 1980). Nesta fase observa-se também a produção de enzimas, sendo predominante a glicose-oxidase, a qual tem ação intracelular, possivelmente atuando na própria síntese da geléia real (COSTA, 2002).

Sucedendo a atividade nutridora, as operárias iniciam os trabalhos de forrageamento, sendo, nesta fase, denominadas forrageadoras. Durante esta atividade, essas operárias realizam vôos constantes para a coleta de alimento, suprimindo o consumo de pólen e substituindo-o por mel, que é um alimento mais energético. Esta mudança coincide com a acentuada redução das glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973) e com a marcante produção de enzimas digestivas, como a invertase (SIMPSON *et al.*, 1968), sendo a morte celular um evento facilmente observado neste período (SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000). Portanto, no decorrer da vida de uma abelha adulta, as glândulas hipofaríngeas sofrem alterações morfológicas de acordo com os estágios da vida desses animais, evidenciando um ciclo secretor (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986/87).

Nas abelhas solitárias ou nas sociais mais primitivas, onde a função das glândulas hipofaríngeas não é conhecida, o padrão glandular mais comum é o do tipo 1 ou 2, segundo classificação de Cruz-Landim & Costa (1998). Entre as famílias que apresentam este padrão temos os Colletidae, Halictidae, Andrenidae, Oxaeidae, Megachilidae e Anthophoridae. Já as abelhas da família Apidae, que engloba as espécies eussociais mais derivadas, os tipos de glândulas encontrados são mais complexos, apresentando principalmente os tipos 3 e 4.

Em formigas, as glândulas hipofaríngeas são, dentre aquelas do sistema salivar, as menos conhecidas funcionalmente. Em *Dinoponera australis*, uma formiga considerada primitiva, as células secretoras dessas glândulas desembocam individualmente na placa hipofaríngea (tipo 1) (CAETANO *et al.*, 2002). Já em *Camponotus (Myrmothrix) rufipes*, considerada mais derivada e com organização social biologicamente mais complexa, as glândulas hipofaríngeas são compostas por células secretoras que se ligam a um duto excretor (ou axial) único (tipo 3) (GAMA, 1985). Em *Atta sexdens*, apesar das células desembocarem independentemente, ocorre uma invaginação pronunciada da placa hipofaríngea no local de liberação da secreção (tipo 2) (AMARAL & CAETANO, 2005). A função desta glândula nas formigas não é conhecida, entretanto, há a possibilidade de que sua secreção possa ser ingerida com o alimento, servindo na digestão, ou então, possa ser regurgitada para alimentar outros indivíduos da colônia (GAMA, 1985).

Estudos realizados em vespas por Britto *et al.* (2004) mostraram que as glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor* são constituídas por células secretoras esféricas e individuais ligadas diretamente à placa hipofaríngea por canalículos (tipo 1) (Fig. 4). Isso as torna distintas de abelhas eussociais e espécies de formigas mais derivadas (CRUZ-LANDIM, 1967; GAMA, 1985; AMARAL & CAETANO, 2005), sendo esta característica comumente encontrada em vespas solitárias (CRUZ-LANDIM & SAENZ, 1972). Em *Paravespula germânica*, uma vespa considerada derivada, as glândulas hipofaríngeas apresentam-se formadas por cachos longos (SPRADBERY, 1973), sendo classificadas como tipo 4. Entretanto, em operárias de *Polybia*, também considerada derivada entre os Vespidae, o padrão glandular foi semelhante ao de *Polistes*, ou seja, do tipo 1.

Alguns estudos com a família Sphecidae demonstraram a ocorrência de variação entre espécies totalmente solitárias, que não mantém contato com a cria (Sphecinae), e espécies semi-sociais (Nissoninae), que mantém algum contato com as larvas. No primeiro grupo foram encontradas glândulas hipofaríngeas do tipo 1, enquanto no segundo grupo, as espécies estudadas possuíam glândulas dos tipos 3 e 4 (SAENZ & CRUZ-LANDIM, 1972). Assim, as variações anatômicas presentes nas glândulas hipofaríngeas dos Hymenoptera parecem estar mais relacionadas com o grau de socialidade do que com a filogenia em si.



FIGURA 4. (A) Esquema indicando a localização das glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor* (modificado de Edwards, 1980). (B) Glândula hipofaríngea (glh) de *P. versicolor.* (C) Face externa da placa hipofaríngea (ph) de *P. versicolor.* (D) Detalhe da região de desembocadura dos canalículos das glândulas hipofaríngeas (seta). (Figuras B, C e D - Britto *et al.*, 2004).

Com relação à ocorrência destas glândulas dentro de cada espécie, de um modo geral elas estão presentes tanto nos machos quanto nas fêmeas, contrastando com o padrão de *Apis mellifera*, onde estão ausentes nos zangões e nas rainhas (SPRADBERY, 1973). Em algumas espécies de Meliponinae, as glândulas estão presentes nos machos e ausentes nas rainhas, enquanto em outras, encontram-se tanto nos machos quanto nas rainhas (COSTA & CRUZ-LANDIM, 1977). Em *Scaptotrigona postica*, por exemplo, as glândulas dos machos e das rainhas estão presentes logo após a emergência. Porém, após um curto período de tempo as glândulas destes indivíduos regridem enquanto as das operárias seguem seu ciclo (COSTA & CRUZ-LANDIM, 1999). Em *Bombus atratus* as glândulas hipofaríngeas possuem desenvolvimento normal nas operárias e rainhas, mas, nas rainhas, apresentam desenvolvimento mais acentuado. Os machos possuem glândulas menos desenvolvidas, mas não atrofiadas (LAUER, 1975).

Nas formigas *Camponotus pennsylvanicus* (FORBES & McFARLANE, 1961) e *Solenopsis invicta* (PHILLIPS & VINSON, 1979), as glândulas hipofaríngeas apresentam maior desenvolvimento na casta das operárias. Entretanto, em *Camponotus* (*Myrmothrix*) *rufipes* o seu maior desenvolvimento ocorre na rainha, sendo intermediário nas operárias e menor nos machos (GAMA, 1985).

Em vespas do gênero *Polistes* constatou-se a presença de glândulas com as mesmas características tanto nos machos quanto nas fêmeas (BRITTO *et al.*, 2004).

Apesar das variações anatômicas presentes nas diferentes espécies, os aspectos ultra-estruturais das células secretoras exibem características semelhantes nas espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986/87; COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000) e formigas (GAMA, 1985) onde foram estudadas. O retículo endoplasmático é bem desenvolvido, há grande concentração de secreção ao redor dos canalículos intracelulares e o núcleo das células é caracterizado por contornos irregulares, nucléolos bem definidos e cromatina dispersa.

Alguns trabalhos realizados com abelhas (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986/87; COSTA, 2002) sugerem que a secreção presente nas glândulas hipofaríngeas seja produzida em nível de retículo endoplasmático rugoso, devido, principalmente, à ausência de complexo de Golgi. Poucos estudos relatam a ocorrência do Golgi nas glândulas hipofaríngeas de Hymenoptera e, quando presente, aparece em pequena quantidade e assume a forma vesicular (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; GAMA, 1985).

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- Determinar a constituição histoquímica da secreção, os diferentes aspectos morfológicos (inclusive os relacionados com a ocorrência de morte celular) e as variações morfométricas das células secretoras das glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor*, levando-se em consideração a idade dos indivíduos;
- Avaliar as variações nos níveis de atividade metabólica expressos pelas glândulas, por meio de técnicas histoquímicas;
- Analisar as células secretoras ultra-estruturalmente, por meio de técnicas de rotina e de citoquímica ultra-estrutural, para se avaliar sua dinâmica secretora e a presença de características que indicassem a ocorrência de morte celular;
- 4. Determinar a ocorrência de situações comportamentais específicas que levassem ao desenvolvimento ou à regressão glandular.

Caracterização Histoquímica da Secreção e Variações Morfológicas Apresentadas pelas Glândulas Hipofaríngeas de Vespas de Diferentes I dades

CAPÍTULO 1

RESUMO

O presente estudo mostrou, por meio de técnicas histoquímicas, a composição da secreção e os aspectos morfológicos das células secretoras das glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor*. As análises foram realizadas em indivíduos de diferentes idades. Os resultados obtidos não permitiram o estabelecimento de um ciclo de desenvolvimento glandular nítido devido ao fato das glândulas não possuírem relação definida com a idade das vespas. Entretanto, os diferentes estágios de desenvolvimento encontrados sugerem que estas passam por uma fase onde as glândulas encontram-se muito semelhantes logo após a emergência. Posteriormente inicia-se a fase de produção de secreção propriamente dita com as células secretoras apresentando-se ricas em vesículas. Uma aparente fase de degeneração foi evidenciada pela presença de extensa vacuolização citoplasmática. Entretanto, análises de integridade celular não evidenciaram células completamente mortas dente as glândulas estudadas. Apesar destas variações, as maiores diferenças encontradas entre indivíduos estão relacionadas com a concentração da secreção e com o diâmetro celular médio. Ambas as variáveis não apresentaram correlação entre si ou com a idade das vespas.

ABSTRACT

Using histochemical techniques, the present study revealed morphological aspects of secretory cells and the composition of the secretion of hypopharyngeal glands in *Polistes versicolor*. These analyses were accomplished using individuals of different ages. The results did not allow the establishment of a glandular cycle, as a defined relationship between these glands and wasp age was not observed. However, the different developmental stages found suggest that the hypopharyngeal glands exhibit very similar characteristics during the initial phase soon after wasp emergence. Later, the secretory phase begins with cells producing several vesicles. A degenerative phase was characterized by the presence of large vacuoles in the cytoplasm although analyses of cell integrity did not reveal complete cell death. Despite these variations, the main differences found among individuals seem to be related to the concentration of secretion vesicles and the average cell diameter. Both variables were not correlated to each other or to wasp age.

INTRODUÇÃO

Nas espécies de abelhas, onde as glândulas hipofaríngeas estão bem estudadas, a secreção produzida representa um importante componente do processo de diferenciação de castas. Neste processo, algumas larvas são selecionadas pelas operárias para receberem continuamente a secreção das glândulas hipofaríngeas como alimento, sendo que estas larvas se desenvolverão como rainhas. Em *Apis* esta secreção é denominada de geléia real (DIXON & SHUEL, 1963) e a eficácia das glândulas hipofaríngeas na produção desta secreção requer alimentação rica em pólen (CRAILSHEIM & STOLBERG, 1989). Nestas abelhas, portanto, o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas é nitidamente maior em operárias do que em rainhas e machos (CRUZ-LANDIM & SAENZ, 1972).

Dentre as operárias, as glândulas hipofaríngeas apresentam-se diferenciadas nas nutridoras (operárias que estão alimentando a cria) e nas forrageiras (operárias que estão em constante procura por alimento). Cruz-Landim (1967) observou que as glândulas hipofaríngeas entram em processo de degeneração após o 20º dia de vida de uma abelha adulta, que coincide com o abandono do cuidado com a cria e o início das atividades de forrageamento. Nesta fase, as glândulas hipofaríngeas demonstraram a presença de estruturas degenerativas no citoplasma (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973). Estas características determinam um ciclo secretor para as glândulas hipofaríngeas, sendo que, em *Apis*, este ciclo passa pelas fases pré-secretora (logo após a emergência), secretora (durante a fase de nutridora) e pós-secretora (durante a fase de

forrageira), na qual ocorre a degeneração glandular (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1987).

Apesar da maioria dos estudos sobre morte celular programada em insetos ocorrer durante a metamorfose, é crescente o interesse deste tipo de estudo em tecidos presentes em indivíduos adultos. As glândulas hipofaríngeas, por exemplo, já foram alvo de alguns estudos em *Apis mellifera* (SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000).

A morte celular programada, diferentemente da necrose que é desencadeada por um traumatismo ou doença, ocorre por meio de controle genético e é tão importante no desenvolvimento embrionário, metamorfose e morfogênese, como na manutenção da população de células em organismos adultos, sendo considerada uma força igual e oposta à mitose (BOWEN & BOWEN, 1990).

Em estudos ultra-estruturais de vários tecidos, foi observada, e proposta, a existência de três tipos de morte celular programada. A distinção fundamental entre esses tipos de morte celular, se dá com relação atuação dos lisossomos. O primeiro tipo, conhecido como apoptose, ocorre sem a participação dos lisossomos da célula que está morrendo, mas os fragmentos dessas células são destruídos por lisossomos de outras células (heterofagocitose). No segundo tipo, conhecido como morte celular vacuolar ou autofágica, há participação efetiva dos lisossomos da própria célula em sua destruição (autofagocitose). Já no terceiro tipo, também conhecido como atrofia, a célula é destruída sem a participação detectável de lisossomos (CLARKE, 1990).

Com relação à função das glândulas hipofaríngeas, as únicas evidências são encontradas, apenas, em grupos com hierarquia altamente organizada, que possuem divisão de castas e de trabalho bem definidas e pré-estabelecidas (SZOLDERTZ & CRAILSHEIM, 1993). A determinação de sua função em espécies sociais mais primitivas, como em diversas vespas, torna-se uma tarefa mais complexa. Como nestas espécies os estudos sobre as glândulas exócrinas são escassos, a determinação da morfologia e do tipo de secreção produzida pelas células secretoras é muito importante, sendo este o único modo de se determinar a presença de um ciclo secretor. Além disto, não há evidências de nenhum trabalho a respeito do ciclo secretor e da ocorrência da morte celular nas glândulas hipofaríngeas de vespas.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos determinar a constituição histoquímica da secreção e os diferentes aspectos morfológicos das células secretoras

das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*. Também foram levadas em conta as idades dos indivíduos que foram comparadas aos dados de desenvolvimento glandular e à ocorrência de características que indicassem a presença de morte celular programada das glândulas. O desenvolvimento glandular foi determinado pela morfologia, pela concentração de secreção e pelo diâmetro das células secretoras.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Monitorando as idades dos espécimes

Vespas recém emergidas de três colônias foram diariamente coletadas e transportadas para o laboratório, onde foram anestesiadas rapidamente sob baixa temperatura. Após este procedimento, estas foram marcadas com tinta para aeromodelismo Testors, na região central do tórax, para o controle das idades. As marcas foram feitas com o auxílio de pinça para segurar o espécime e com palito de dente, usado como "pincel" (Apêndice 1). Dando prosseguimento, os espécimes foram mantidos em recipientes individuais até a completa secagem da tinta e, posteriormente, reintroduzidas em suas respectivas colônias.

2. Distribuição dos espécimes e dissecção das glândulas hipofaríngeas

Após conseguir um número adequado de espécimes com idades variadas (Tabela 1 dos resultados), os mesmos foram novamente coletados e anestesiados com gradual diminuição da temperatura até 4°C. Com auxílio de pinças e microtesoura, as glândulas hipofaríngeas foram retiradas sobre placa de Petri de dissecção com solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO4 2,38g/L e KH2PO4 2,72g/L), sob estereomicroscópio Westover. As glândulas destas vespas foram fixadas e processadas para inclusão em historesina. Em seguida as mesmas foram destinadas para as técnicas de Azul de Bromofenol, PAS-Alcian Blue, Sudan Black B, Azul de Toluidina, Verde de Metila-Pironina e Feulgen, que serão individualmente descritas a seguir.

Outras 24 vespas tiveram suas glândulas destinadas à técnica de Azul do Nilo (realizadas em montagem total), à técnica de localização da atividade da fosfatase ácida (em montagem total) e ao ensaio do Cometa (eletroforese de células isoladas), que também serão descritas a seguir.

3. Técnicas Histoquímicas

3.1. Processamento das glândulas para inclusão em historesina

Após a dissecção das vespas, as primeiras 55 glândulas hipofaríngeas foram retiradas e fixadas em Paraformaldeído 4%, durante 4 horas. As idades referentes a estes indivíduos podem ser observadas na Tabela 1. Em seguida as glândulas foram colocadas em tampão de fosfato de sódio (0,1M; pH 7,4), por 24 horas, e desidratadas por meio de sucessivos banhos de etanol nas concentrações 70%, 80%, 90% e, dois banhos, em etanol 95%, de 30 minutos cada. Após estes procedimentos, as glândulas foram imersas numa solução de resina de embebição (Leica) com etanol 95% (1:1) durante 4 horas à temperatura ambiente, e só então foram colocadas em resina de embebição pura, por 24 horas, para perfeita infiltração da resina no material, sendo mantidas resfriadas a aproximadamente 4°C. Dando prosseguimento, as glândulas foram colocadas em resina de inclusão (Leica) com polimerizador (15:1) e mantidas em estufa à 37°C, por 24 horas, para completa polimerização da resina.

Os blocos de resina contendo as glândulas foram colados em suportes e seccionados no micrótomo Leica RM 2145, com espessura de 5,0µm e colocados sobre lâminas de vidro para microscopia óptica. Após passar pelas técnicas histoquímicas descritas a seguir, as lâminas foram montadas com lamínula e bálsamo do Canadá (exceto item *3.4*), estando prontas para as análises e documentação fotográfica no fotomicroscópio Leica.

3.2. Técnica do Azul de Bromofenol para evidenciar proteínas (PEARSE, 1985)

Lâminas contendo os cortes foram coradas com solução de Azul de Bromofenol, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida, as mesmas foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0,5%, por 5 minutos e lavadas em água destilada, por mais 5 minutos. 3.3. Técnica de PAS-Alcian Blue para evidenciar glicoconjugados neutros com grupamentos 1,2 glicol e glicoconjugados ácidos, respectivamente (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

Os cortes foram hidratados e em seguida corados em solução de Alcian Blue 1% em ácido acético, por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e, posteriormente, coradas em ácido periódico 1% por 5 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as lâminas foram colocadas no reagente de Schiff, à temperatura ambiente, por 15 minutos, no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 10 minutos.

3.4. Técnica de Sudan Black B para evidenciar lipídios (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

Lâminas contendo secções do material foram imersas em um banho rápido de etanol 70% e, em seguida, foram mergulhadas em solução saturada de Sudan Black B em etanol 70%, por 45 minutos. O material foi, novamente, mergulhado em etanol 70%, por 2 minutos, e as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Além da realização da técnica Sudan Black B nos 55 espécimes previamente descritos, as glândulas de mais 15 vespas foram destinadas para esta técnica, porém, as mesmas foram processadas de forma distinta. Após a dissecção, as glândulas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, diretamente seccionadas em criostato (Mícron HM 505E). Este procedimento foi realizado para se verificar o efeito da desidratação alcoólica realizada nos primeiros 55 indivíduos, já que o álcool etílico poderia remover parte dos lipídios das células. Assim, o material congelado foi utilizado como controle.

3.5 Azul de Toluidina para marcação de grupamentos ácidos e ácidos nucléicos (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

As lâminas contendo os cortes foram lavadas em água destilada e colocadas em solução de Azul de Toluidina 0,5% (pH 3,5), por 20 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas, para se retirar o excesso de corante.

3.6. Técnica do Verde de Metila-Pironina para marcação diferencial de DNA e RNA (MOFFITT, 1994)

Um grama de Verde de Metila foi adicionado a 200mL de tampão acetato (0,2M; pH 4,9). Esta solução foi lavada com clorofórmio até tornar-se transparente. Este procedimento retira as impurezas do Verde de Metila. A solução resultante serviu como solução estoque, sendo mantida a 4°C. A cada 50 mL da solução estoque, previamente filtrada, foi adicionado 0,1 g de Pironina Y. As secções da glândula, dispostas em lâminas, foram coradas por 3 horas, à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água destilada a 1°C, por 4 segundos.

3.7. Técnica de Feulgen para marcação de núcleos (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

Lâminas contendo o material foram tratadas em solução de HCl 5N por 45 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada por 5 minutos, sendo posteriormente submetidas ao reagente de Shiff, por 1hora, no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos.

4. Avaliação da integridade celular

As outras 24 glândulas foram obtidas de 12 vespas que tinham 10 dias de idade e outras 12 que tinham 35 dias de idade. O grupo "35 dias" foi escolhido por dois motivos: 1) indivíduos com mais de 40 dias eram escassos nas colônias; 2) esta idade foi considerada maior do que o tempo de vida médio observado por Gobbi (1977) para *Polistes versicolor*. De acordo com este autor longevidade das operárias é, em média, de 17 dias.

Cada técnica foi realizada com 4 glândulas de vespas com 10 dias e 4 de vespas de 35 dias.

4.1. Técnica do Azul de Nilo para marcação de células em necrose e/ou apoptose tardia (SAUNDERS et al., 1962)

Com o auxílio de um agitador magnético 0,001g de Azul do Nilo foi misturado em 10mL de solução salina para insetos. Após a dissecção de seis vespas (três emergidas há 10 dias e outras três emergidas há 35 dias), as glândulas hipofaríngeas foram retiradas e transferidas para o corante onde permaneceram por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas por duas vezes em solução salina, as glândulas foram colocadas sobre lâminas escavadas, contendo a mesma solução, e recobertas com lamínula para a análise, em montagem total. Logo em seguida as mesmas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio.

4.2. Localização da atividade de fosfatase ácida (HUSSEIN et al., 1990)

Glândulas hipofaríngeas de seis vespas (três emergidas há 10 dias e outras três emergidas há 35 dias) foram dissecadas em solução salina para insetos e imediatamente fixadas, por 60 minutos, em uma mistura de formalina neutra 10% tamponada e acetona (9:1), em gelo e sob rotação. Após a fixação, o material foi rapidamente lavado em tampão acetato (pH 4,8) e incubado por 45 minutos, a 37°C, no meio contendo naftol AS-TR fosfato (2,0 mg), tampão acetato (10mL, 0,1M, pH4,8), MnCl2.H20 10% (2,0 mL) e o sal vermelho violeta (6,0 mg). Posteriormente as glândulas foram lavadas em água destilada e desidratadas em etanol 70%, 90% e 100 %. O material foi, então, analisado e fotografado sob fotomicroscópio, em montagem total.

Após este procedimento, as mesmas glândulas foram incluídas em historesina e seccionadas no micrótomo Leica RM2145, como segue no item *3.1*, sendo, posteriormente, contra-coradas com hematoxilina para a análise da morfologia celular.

4.3. Teste do Cometa (eletroforese de células isoladas) (GONTIJO & TICE, 2003)

Previamente à realização dos testes, lâminas de vidro para microscopia óptica foram mergulhadas em solução de agarose 1,5% aquecida. O excesso de agarose foi retirado com o escorrimento e as lâminas foram armazenadas em geladeira.

Com as lâminas prontas, as glândulas hipofaríngeas de oito vespas (quatro emergidas há 10 dias e outras quatro emergidas há 35 dias) foram dissecadas em solução salina para insetos e, em seguida, foram mergulhadas em solução de tripsina-EDTA (0,25%) por 90 minutos, a 37°C. Após este procedimento, as glândulas foram transferidas para Eppendorf's, contendo solução salina para insetos, e agitadas intensamente em um misturador por cerca de 1 minuto, sendo mantidas no gelo, por duas horas, antes da realização do teste. Este procedimento foi realizado de acordo com Silva de Moraes (1998), para a separação das células glandulares, que normalmente
permanecem aderidas à placa hipofaríngea, devido à presença dos canalículos, e aderidas umas às outras devido ao tecido conjuntivo presente entre elas.

Em seguida, 5mL de agarose *low melting* foi fervida e, posteriormente, colocada em banho Maria a 37°C. Após este procedimento, 5µL da solução salina para insetos contendo as células das glândulas hipofaríngeas foram misturadas a 75µL da agarose *low melting*, sendo a solução resultante colocada imediatamente sobre a lâmina com pré-cobertura de agarose. Em seguida, foi colocada uma lamínula sobre cada lâmina montada, fazendo com que a solução contendo as células se espalhasse, sendo estas colocadas na geladeira até a solidificação da agarose *low melting*. Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas contendo as células foram dispostas em cubeta vertical com solução de lise gelada e protegida da luz, por 1 hora. A solução de lise foi preparada com 146,1g de NaCl (2,5M), 37,2g de EDTA (100mM) e 1,2g de TRIS (10mM) em 1 L de água destilada (pH 10,5).

Dando prosseguimento, foi efetuada a eletroforese (25V e 300mA), por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão TRIS (solução neutralizadora), três vezes, por 5 minutos cada vez, sendo, posteriormente, lavadas em água destilada.

As lâminas foram, então, secas em estufa a 37°C por 2 horas e foram transportadas para solução fixadora (etanol 100%), onde permaneceram por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram, novamente, secas em estufa a 37°C, por 2 horas, estando prontas para serem coradas com nitrato de prata.

Para a coloração, as lâminas foram, primeiramente, hidratadas em água destilada, por 5 minutos. Dando prosseguimento, estas foram coradas, por aproximadamente 15 minutos, em uma mistura de 34mL da solução denominada A (250mg de nitrato de amônia, 250mg de nitrato de prata, 625mg de ácido tungstosilicico e 375µL de formaldeído, diluídos em 250mL de água destilada) e 66mL da solução denominada B (12,50g de carbonato de sódio diluído em 250mL de água destilada).

Após este procedimento, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada e transferidas para uma solução de ácido acético 1%, onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas por mais três vezes em água destilada. Após a secagem, em temperatura ambiente, o material ficou pronto para ser analisado e fotografado em fotomicroscópio.

5. Determinação da concentração de secreção e do diâmetro celular médio

Para efeito de comparação, foram calculadas a concentração de secreção presente nas glândulas hipofaríngeas e os diâmetros médios das células secretoras das diferentes vespas analisadas. As medidas foram obtidas com o auxílio do programa de análise de imagens Leica QWin

O diâmetro celular médio foi determinado logo após a dissecção das vespas. As glândulas foram individualmente transferidas para lâminas escavadas contendo fixador (paraformaldeído 4%). Para cada glândula, foi calculado o diâmetro de 10 células secretoras, sendo posteriormente obtido o valor médio para cada indivíduo. Os resultados obtidos foram estatisticamente testados utilizando a análise de variância ANOVA, para um fator, com nível de significância de 0,05.

Para se determinar a concentração de secreção, as lâminas submetidas às diferentes técnicas foram utilizadas. Para cada glândula foram determinadas a área recoberta com secreção e a área ocupada pelas células inteiras. Este procedimento foi realizado em secções de distintas regiões das glândulas, de modo a se cobrir quase o volume total das mesmas. As porcentagens de área recoberta com secreção, aqui denominadas de concentração de secreção, foram calculadas da seguinte forma: Concentração de Secreção (%) = Área Recoberta com Secreção x 100 / Área Celular Total.

Estas medidas (diâmetro celular médio e concentração de secreção) foram, ainda, relacionadas entre si e com as idades das vespas. Por meio da correlação de Pearson, determinou-se se as variáveis possuíam, ou não, relação significativa.

RESULTADOS

1. Composição histoquímica das células secretoras

As glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* foram submetidas às técnicas de Azul de Bromofenol, PAS-Alcian Blue (coloração simultânea) e Sudan Black B, para a determinação do tipo de secreção produzida pelas células secretoras. Estas técnicas marcam, respectivamente, proteínas, glicoconjugados neutros (PAS) e ácidos (Alcian Blue) e lipídios totais.

Em geral, as glândulas hipofaríngeas mostraram a presença de proteínas, glicoconjugados neutros e pequena concentração de lipídios (Tabela 2). Os núcleos foram marcados pelo teste de Azul de Bromofenol para proteínas (Fig. 1). Para o restante dos testes, o núcleo apresentou reação negativa (Figs. 2 e 3).

No citoplasma das células secretoras, observou-se reação positiva para as técnicas de marcação de proteínas (Figs. 1), reação fracamente positiva para lipídios (Fig. 2) e glicoconjugados neutros (Fig. 2) e reação negativa para glicoconjugados ácidos (Fig. 2). Para o teste de marcação de proteínas e o de marcação de glicoconjugados neutros, observou-se reação fortemente positiva nas regiões onde se acumulavam vesículas de secreção. Estas se apresentaram em concentrações variadas entre indivíduos (Figs. 1 e 2), entretanto, quando presentes, as vesículas mostraram-se fortemente marcadas.

2. Estágios de desenvolvimento celular

As análises realizadas com o auxílio das técnicas do Azul de Toluidina, Verde de Metila-Pironina e Feulgen, deram alguns indicativos de como se comportam as glândulas hipofaríngeas durante o ciclo de vida de *Polistes versicolor*.

As técnicas de Azul de Toluidina e de Verde de Metila-Pironina mostraram a existência de glândulas que encontravam-se em diferentes estágios, sendo que, em alguns casos, foram observadas algumas características degenerativas (Figs. 4 a 6).

Algumas glândulas mostraram-se bem homogêneas (Figs. 4A e 6A), sendo estas, principalmente encontradas em vespas recém emergidas. Além de apresentarem ausência de secreção, a coloração do citoplasma pelas técnicas de Azul de Toluidina e de Verde de Metila-Pironina foi uniforme (Figs. 4A e 6A). Os núcleos das células nestas condições mostraram-se redondos com uma série de pequenos nucléolos espalhados (Figs. 4A e 6A).

Grande parte das glândulas examinadas apresentou células com citoplasma mais intensamente corado na região periférica (Figs. 4B, 6B e 6C). Em outras células, também freqüentes, o citoplasma apresentou-se repleto de vesículas e pequenos vacúolos dispersos, sendo que, nestes casos, a coloração periférica do citoplasma foi menos intensa (Figs. 4C, 6D e 6E). Nestas duas situações, presentes em aproximadamente 80% das glândulas analisadas, as glândulas apresentaram algum acúmulo de secreção. A secreção estava disposta na região central do citoplasma, na forma de pequenas vesículas agrupadas, possíveis de serem visualizadas ao microscópio óptico (Figs. 1A, 1B e 2A). Os núcleos apresentaram-se arredondados ou achatados, dependendo da concentração de secreção presente nas células (Figs. 4B a 4C, 6B a 6E e 7).

Em algumas glândulas foram encontradas células com características degenerativas, apontadas, principalmente, pela grande dimensão e pelo grande número de vacúolos espalhados pelo citoplasma (Figs. 4D e 6F). Glândulas com estas características foram observadas em apenas 5 dos 55 indivíduos analisados (cerca de 10% dos casos). Estas glândulas estavam presentes em indivíduos que tinham 9, 15, 26, 30 e 38 dias de idade. Algumas destas células mostraram alta concentração de secreção (Figs. 1C), enquanto, em outras, a concentração foi baixa (Fig. 1D e 2B). Os vacúolos apresentaram-se negativos para as técnicas de Azul de Toluidina, Verde de Metila-

Pironina e Azul de Bromofenol, entretanto, quando submetidos à reação de PAS (para glicoconjugados), estes se apresentaram fracamente positivos em todas as vespas (Fig. 2B). Os núcleos das glândulas nesta situação não mostraram características distintas dos núcleos presentes em células consideradas íntegras, havendo apenas, em alguns casos, uma deformidade semelhante à encontrada em células com grande acúmulo de secreção.

A técnica do Azul do Nilo, para detecção de células em necrose ou apoptose tardia, não demonstrou nenhum destes eventos ocorrendo nas glândulas hipofaríngeas. Todas as glândulas utilizadas nesta técnica não incorporaram o corante, mostrando que nenhuma célula ou região glandular estava em estágio de morte celular a ponto de apresentar deteriorização da membrana plasmática (Fig. 8).

Em um dos indivíduos estudados, verificou-se que, apesar de todas as células glandulares estarem com uma série de vacúolos espalhados pelo citoplasma, apresentando-se como glândulas em estágio de degeneração, foi encontrada uma única célula com características distintas. Esta célula não possuía vacúolos e seu núcleo apresentou-se muito compactado (Fig. 6F).

Outras características anômalas foram encontradas em glândulas que apresentaram assincronia no desenvolvimento das células secretoras (Fig. 5). Nestas situações, observou-se: (a) células que se assemelharam àquelas das glândulas consideradas íntegras (células presentes na maioria dos indivíduos analisados) e (b) células que se mostraram totalmente distintas, apresentando pouco ou nenhum acúmulo de secreção (Fig. 2C) e corando-se fracamente pelas técnicas de Azul de Toluidina e Verde de Metila-Pironina na região citoplasmática (Figs. 5, 6G e 6H). Os núcleos da maioria destas células diferenciadas mostraram-se bem irregulares (Figs. 5, 6G, 6H, 7E e 7F).

As análises de integridade nuclear, realizadas com a técnica de Cometa, demonstraram que os núcleos das diferentes vespas analisadas não apresentaram quebras no DNA que caracterizassem um estagio degenerativo da molécula (Fig. 9). Estes resultados foram obtidos tanto para as vespas mais jovens (com 10 dias) quanto para as mais velhas (com 35 dias).

Foram encontrados resultados similares para todas as vespas, com relação à técnica de fosfatase ácida, onde os indivíduos analisados apresentaram reação fortemente positiva (Fig. 10A e 10B). Nesta técnica, as glândulas analisadas em

montagem total foram, posteriormente, incluídas em resina e seccionadas para a análise da morfologia de suas células. Estas, assim como seus núcleos, apresentaram-se morfologicamente íntegros (Fig. 10C). Notou-se ainda nos núcleos, a presença de grande quantidade de nucléolos e ausência de características degenerativas (Fig. 10C).

Apesar das diferenças encontradas com relação à morfologia das células secretoras, as principais variações verificadas nas glândulas hipofaríngeas das vespas analisadas deram-se com relação à atividade secretora das células, caracterizada pela variação na concentração de secreção. Assim, ainda que algumas vespas tenham demonstrado glândulas com características que indicassem um estágio de deteriorização, a maioria dos indivíduos analisados apresentou glândulas consideradas íntegras.

Com o auxílio do programa de análise de imagem Leica QWin, foi calculada a concentração aproximada de secreção presente em cada glândula das diferentes vespas (Tabela 3). Com o mesmo programa, foram também obtidos os diâmetros médios das células secretoras (Tabela 3).

A concentração média de secreção encontrada nas glândulas hipofaríngeas variou de cerca 0 a 30% nos diferentes indivíduos estudados. Com relação ao diâmetro médio das células secretoras de cada vespa, a variação para a maioria dos indivíduos ocorreu entre cerca de 50 e 65 μ m, com média de 56 μ m. Neste caso as variações encontradas entre todas as vespas analisadas (n = 55) foram consideradas estatisticamente significativas, de acordo com as análises de variância (P<0,0001; F = 7,27).

Como as diferenças encontradas entre as duas variáveis foram significativas, foram realizadas análises de correlação para se determinar se o diâmetro das células secretoras estava relacionado com a concentração secreção. A correlação de Pearson demonstrou que o diâmetro celular médio e a concentração de secreção presente nas células não estavam relacionados (r = -0,207; P = 0,129) (Fig. 11A). A relação entre estas duas variáveis e a idade também foi determinada. Entre a concentração de secreção e a idade também não foi observada correlação (r = -0,0255; P = 0,8537) (Fig. 11B), porém, houve uma pequena relação entre a idade e o diâmetro celular das células secretoras (r = 0,3177; P = 0,0181) (Fig. 11C).

Devido ao pequeno número de indivíduos com mais de 50 dias de idade (Tabela 1), as análises de correlação também foram realizadas excluindo-se as três vespas mais velhas, que poderiam levar os resultados a uma falsa interpretação. As análises de correlação entre o diâmetro celular médio e a concentração de secreção continuaram dando resultados não significantes (r = -0,212; P = 0,131). O mesmo foi observado para as análises de correlação idade *versus* concentração de secreção (r = 0,105; P = 0,459). Porém, agora não houve mais resultado significativo para correlação entre diâmetro celular médio e idade (r = 0,0402; P = 0,7775).

TABELAS

TABELA 1	. Idade e número	de espécimes	s utilizados nas	s análises	morfológicas	e histoquímicas
das glându	las hipofaríngeas	de P. versicol	<i>or</i> (n = 55 vesp	bas).		

Idade (dias)	Número de vespas capturadas
0	6
2	2
6	1
7	2
8	3
9	3
10	2
15	5
17	4
18	3
20	1
25	1
26	3
27	1
28	2
29	1
30	3
31	1
33	1
34	1
35	2
38	1
40	1
50	2
70	2
92	1

TABELA 2 – Testes histoquímicos aplicados nas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*.

Testes Utilizados	Compartimentos Analisados			
	Núcleo	Citoplasma	Vesículas de Secreção ¹	
Azul de Bromofenol	++	++	+++	
PAS	-	+	+++	
Alcian Blue	-	-	-	
Sudan Black B	-	+	-	

(-) Negativo; (+) Fracamente positivo; (++) Positivo; (+++) Fortemente positivo.

¹ As vesículas de secreção não estavam presentes em todos os espécimes analisados, além de apresentarem concentração variável entre eles.

ldade (dias)	Concentração média de secrecão (%)	Diâmetro celular médio (µm)	Desvio P. do diâmetro
0	1,36	53,25	4,628
0	0,00	49,58	4,554
0	0,00	54,47	6,750
0	2,76	58,67	7,415
0	1,18	57,95	6,830
0	3,55	52,72	5,230
2	22,80	61,20	3,590
2	1,69	53,67	4,096
6	11,01	61,56	13,187
7	10,32	68,60	9,585
7	13,57	61,29	7,116
8	20,43	58,67	7,415
8	1,43	65,80	9,515
8	19,16	50,64	7,879
9	0,14	57,86	3,834
9	8,49	55,83	4,513
9	11,77	52,85	4,892
10	9,76	53,03	4,908
10	12,88	55,47	4,413
15	10,58	60,34	4,673
15	24,92	52,37	5,730
15	10,82	59,41	7,410
15	23,35	54,42	5,471
15	18,17	47,65	4,913
17	0,99	54,33	5,417
17	16,66	45,48	4,714
17	30,17	52,15	5,426
17	13,68	47,04	5,019
18	18,60	65,00	6,617
18	28,02	52,92	6,245
18	27,4	47,73	6,583
20	3,56	57,95	6,830
25	0,00	54,30	6,606
26	1,21	66,09	7,559
26	12,04	51,70	6,715
26	3,60	59,37	7,509
27	1,18	52,02	7,944
28	21,39	55,36	7,389
28	24,10	52,40	4,038
29	13,26	55,65	6,915
30	19,76	47,81	2,833
30	8,95	49,56	6,100
30	19,99	56,55	7,813

TABELA 3 – Concentração média de secreção (%) e diâmetro celular médio das glândulas hipofaríngeas de vespas em diferentes idades.

Continua na próxima página

ldade (dias)	Concentração média de secreção (%)	Diâmetro celular médio (μm)	Desvio P. do diâmetro
31	19,09	53,57	6,804
33	1,34	52,32	3,873
34	28,64	58,16	5,679
35	0,00	59,19	7,802
35	0,00	60,05	3,579
38	3,28	49,58	4,554
40	0,27	61,25	4,570
50	16,19	60,79	6,105
50	11,02	63,46	10,128
70	1,37	62,27	5,596
70	16,89	70,94	6,031
92	1,38	65,00	6,617

Continuação da tabela anterior

FIGURAS



FIGURA 1. (A a D) Glândulas hipofaríngeas de diferentes indivíduos submetidas à reação de Azul de Bromofenol. As setas indicam acúmulos de secreção. Notar que apesar da presença de vacúolos, algumas células ainda apresentam acúmulos de secreção (C e D). Idades das vespas: A - 15 dias; B - 17 dias; C - 15 dias; D - 30 dias. ci – citoplasma; n – núcleo; nu – nucléolo; va – vacúolo.



FIGURA 2. Glândulas hipofaríngeas de diferentes indivíduos submetidas à reação de PAS. (A) Glândulas com grande concentração de secreção, indicada pela seta; (B) Glândulas contendo alta concentração de vacúolos em seu citoplasma com reação PAS positiva, apontados pela seta; (C) Glândulas com algumas células com acúmulo de secreção e outras sem. Neste indivíduo, as células sem secreção apresentam-se menores e irregulares. Idade das vespas: A – 15 dias; B – 6 dias; C – 31 dias. ci – citoplasma; n – núcleo.



FIGURA 3. (**A** a **C**) Glândulas hipofaríngeas de diferentes indivíduos, submetidas à reação de Sudan Black B. Notar em **A** algumas regiões apresentando acúmulo de secreção no citoplasma com reação negativa para a técnica (seta). Em **B**, notar a presença de vacúolos citoplasmáticos (seta). Em **C** e **D**, detalhe das células secretoras processadas em historesina e em criostato, respectivamente. Idade das vespas: A – 8 dias; B – 26 dias; C - 9 dias. **ca** – canalículos; **ci** – citoplasma; **n** – núcleo; **ph** – placa hipofaríngea.



FIGURA 4. Diferentes aspectos das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* coradas com Azul de Toluidina. Em **A**, células homogêneas encontradas em vespa recém-emergida. Em **B**, células com coloração mais acentuada na periferia, presente na maioria das vespas analisadas. Em **C**, células com alguns vacúolos pequenos. Em **D**, células apresentando grande concentração de vacúolos citoplasmáticos. Idade das vespas: A – recém emergida; B - 17 dias; C - 30 dias; D - 10 dias. **ci** – citoplasma; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **va** – vacúolo.



FIGURA 5. (**A** a **D**) Aspectos das glândulas hipofaríngeas que apresentaram assincronia no desenvolvimento das células secretoras, coradas com Azul de Toluidina. A vespa possuía 31 dias de idade. Notar a presença de células diferenciadas na mesma região da secção. **ca** – canalículos; **ci** – citoplasma; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **va** – vacúolo.



FIGURA 6. Diferentes aspectos das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* coradas com Verde de Metila-Pironina. Em **A**, células homogêneas encontradas em vespa recém emergida. Em **B** e **C**, células com coloração mais acentuada na periferia. Em **D** e **E**, células com alguns vacúolos citoplasmáticos. Em **F**, células altamente vacuolizadas. Notar, ainda, célula com núcleo condensado, fortemente corado pelo verde de metila. Em **G** e **H**, glândulas apresentando células com desenvolvimento assicrônico. Idade das vespas: A – recém emergida; B – 17 dias; C – 20 dias; D – 26 dias; E – 6 dias; F – 9 dias; G e H – 31 dias. **ci** – citoplasma; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **va** – vacúolo.



FIGURA 7. Glândulas hipofaríngeas de diferentes indivíduos submetidas à reação de Feulgen. Em A e B, estão representadas células de indivíduos com concentração média de secreção (cerca de 10%); Em C e D estão representadas células de indivíduos com alta concentração de secreção (de 20% a 30%); Em E e F estão representadas células que apresentaram assincronia em seu desenvolvimento. Idade das vespas: A - 15 dias; B - 50 dias; C - 17 dias; D - 15 dias; E e F - 31 dias. n – núcleo.



Figura 8. Glândula hipofaríngea em montagem total submetida ao corante Azul do Nilo. Todas as glândulas submetidas ao teste (glândulas de indivíduos de diferentes idades) não apresentaram incorporação do corante. **cs** – célula secretora; **glh** – glândula hipofaríngea; **ph** – placa hipofaríngea.



FIGURA 9 – Núcleo das glândulas hipofaríngeas mostrando ausência de formação de cauda, após eletroforese em gel de agarose (teste de Cometa). A coloração foi efetuada com nitrato de prata.



FIGURA 10 – (**A** e **B**) Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de fosfatase ácida, mostrando reação fortemente positiva (grânulos vermelhos). (**C**) Glândulas hipofaríngeas seccionadas e contra-coradas com hematoxilina, após passarem pela técnica de fosfatase ácida. **ci** – citoplasma; **cs** – célula secretora; **glh** – glândula hipofaríngea; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **ph** – placa hipofaríngea.



FIGURA 11 – (**A**) Relação da concentração de secreção com o diâmetro celular médio; (**B**) Concentração média de secreção em vespas de diferentes idades; (**C**) Diâmetro médio das células secretoras em vespas de diferentes idades.

DISCUSSÃO

As glândulas hipofaríngeas são encontradas exclusivamente nos Hymenoptera, sendo particularmente evidentes em alguns grupos e apresentando diferenças marcantes entre castas, dentro de uma mesma espécie (CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM & COSTA, 1998). Estas glândulas estão presentes na cabeça destes insetos, sob a placa hipofaríngea e, devido à sua localização, sua secreção tanto pode ser misturada ao alimento que será ingerido, como pode ser eliminada para o exterior (COSTA, 1996).

Até o momento, o papel dessas glândulas somente foi estabelecido em abelhas sociais, onde seu desenvolvimento é nitidamente maior em operárias do que em rainhas e machos, sendo influenciado pela atividade social das operárias (CRUZ-LANDIM & SAENZ, 1972). Entre as operárias, o maior desenvolvimento destas glândulas é observado justamente nas que estão alimentando a cria (as nutridoras). Sucedendo a atividade nutridora, as operárias iniciam o forrageamento, sendo, nesta fase, denominadas forrageadoras. Durante esta atividade, essas operárias realizam vôos constantes para a coleta de alimento, suprimindo o consumo de pólen e substituindo-o por mel, que é um alimento mais energético. Esta mudança coincide com a acentuada redução das glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973; SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000) e com a marcante produção de enzimas digestivas, como a invertase (Simpson *et al.*, 1968). Portanto, no decorrer da vida de

uma abelha adulta, as glândulas hipofaríngeas sofrem alterações morfológicas de acordo com os estágios da vida, evidenciando um ciclo secretor (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986).

Isso facilita o entendimento da função dessas estruturas nestas espécies, onde as glândulas hipofaríngeas sofrem mudanças morfológicas, que refletem seu estado fisiológico em diferentes fases da vida. Em *Apis*, o ciclo secretor passa, sucessivamente, por uma fase inicial pré-secretora, seguida de uma secretora e, posteriormente, uma póssecretora, na qual ocorre degeneração glandular. Estas fases são resultados dos papéis desempenhados pelas abelhas na colônia que, em princípio, possuem glândulas inativas logo após a emergência, iniciando seu desenvolvimento tão logo começam a cuidar da cria e, por fim, entram na fase pós-secretora assim que iniciam as atividades de forrageamento (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986).

As análises realizadas com *P. versicolor* não permitiram estabelecer um ciclo secretor nítido para as glândulas hipofaríngeas, porque, primeiramente, estas não apresentaram relação com a idade das vespas e, em segundo, pelo fato da distribuição de tarefas e os comportamentos nas colônias deste gênero não ocorrer de forma tão uniforme como nas abelhas (PARDI, 1948; ZARA & BALESTIERI, 2000; ver capítulo 4).

Na maioria das vespas analisadas (cerca de 80% delas), as glândulas encontravam-se na fase secretora, com núcleo bem desenvolvido possuindo vários nucléolos. As maiores variações encontradas entre estes indivíduos deram-se com relação à concentração de secreção. Algumas vespas apresentaram glândulas possuindo células com características homogêneas, possivelmente evidenciando a fase pré-secretora ou refletindo um estado de inatividade glandular e, em outras, foram observadas algumas características típicas de células em estágio de degeneração.

Assim, apesar de, cronologicamente, não ter sido possível determinar um ciclo glandular, é provável que as glândulas hipofaríngeas passem pelas etapas acima descritas durante a vida de uma vespa. Deste modo, logo ao emergirem, os indivíduos apresentam glândulas com características homogêneas, ainda sem acúmulo de secreção. Após os primeiros dias de vida adulta, suas glândulas iniciam a fase secretora, e a secreção começa a acumular-se no citoplasma. Com o passar do tempo e de acordo com as atividades realizadas por cada indivíduo, dá-se início à fase de degeneração celular, evidenciada pela grande concentração e pelo volume dos vacúolos no citoplasma.

Downing & Jeanne (1983) estudaram glândulas exócrinas de *Polistes fuscatus*, comparando-as entre vespas dominantes e subordinadas de populações naturais e criadas artificialmente. Nas vespas criadas em laboratório, foram estudados indivíduos mantidos solitários e em pares, para se testar a influência dos comportamentos de agressividade sobre as glândulas. Verificou-se que as glândulas hipofaríngeas não apresentaram diferenças significativas entre as vespas estudadas, concluindo-se que as glândulas hipofaríngeas não devam possuir papel social nas colônias desta espécie. No entanto, esses estudos foram realizados levando-se em conta somente os diâmetros celulares, não sendo este o melhor meio de se averiguar a atividade destas glândulas. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que o tamanho dessas glândulas possa estar relacionado com seu desenvolvimento, em abelhas foi constatado por Huang & Otis (1989) que, nem as glândulas subdesenvolvidas e nem as hipertrofiadas são parâmetros para se inferir a produção de proteínas devido a maior taxa de síntese protéica ter sido encontrado em células de tamanho médio.

Estas observações também foram constatadas em *P. versicolor*, uma vez que o diâmetro de suas glândulas hipofaríngeas não apresentou relação com a concentração de secreção, de acordo com as análises de correlação entre as duas variáveis. Assim, foram comuns as glândulas que apresentaram diâmetro celular acima da média geral e concentração de secreção muito baixa. Além disto, o nível de atividade metabólica encontrado nas células glandulares está estritamente relacionado com a concentração de secreção presente nas células (ver capítulo 2), não tendo relação com o diâmetro celular.

Assim, em *P. versicolor* foi constatado que as glândulas hipofaríngeas apresentam regiões contendo acúmulos de secreção que variaram de indivíduo para indivíduo e esses acúmulos são compostos de glicoconjugados neutros e proteínas, indicando que sua natureza é glicoprotéica. Estudos histoquímicos mostraram que a secreção glandular de *Apis* também é constituída por polissacarídeos neutros e proteínas, com modificação qualitativa e quantitativa ao longo da idade e em função da dieta das operárias (FURQUIM, K.S. – dados não publicados).

Até o momento, todos os estudos envolvendo as glândulas hipofaríngeas de abelhas, mostraram que, independente da anatomia glandular, histologicamente e ultraestruturalmente as células secretoras não variam entre espécies, evidenciando que o tipo de secreção produzida é predominantemente protéica (CRUZ-LANDIM, 1967; COSTA, 2002). O mesmo pode ser considerado para *P. versicolor* devido à reação positiva para as técnicas de detecção de proteínas e à grande concentração RNA (principalmente RNAr) no citoplasma, que pode indicar, indiretamente, a presença de retículo endoplasmático rugoso. Assim, associando-se esta característica com a secreção encontrada nas células secretoras, observou-se que onde havia grande concentração de secreção, o retículo endoplasmático se acumulava na região periférica da célula, formando um anel com coloração forte. Nos casos onde não havia presença de secreção, a coloração do citoplasma pela técnica do Azul de Toluidina deu-se de forma homogênea.

Apesar de algumas células apresentarem nucléolos mais desenvolvidos do que outras, o tamanho dos núcleos não variou significativamente entre as glândulas analisadas. Aparentemente não houve aumento da quantidade de DNA, indicando que a poliploidização não é utilizada como estratégia para aumentar a produção de secreção. O mesmo foi observado em *A. mellifera* que não apresentou aumento da quantidade de DNA, embora tenha apresentado aumento significativo no volume dos núcleos em colônias onde o número de operárias era baixo (SILVA DE MORAES & CRUZ-LANDIM, 1984).

Com relação aos lipídios, as células demonstraram apenas reação fracamente positiva para o citoplasma e reação negativa para secreção e núcleo. Sabe-se que componentes de natureza lipídica são comumente secretados em glândulas exócrinas de insetos, principalmente naquelas produtoras de feromônios, incluindo os atraentes sexuais, substâncias de alarme e marcadores de trilha (BILLEN & MORGAN, 1998). Portanto, a hipótese de que as glândulas hipofaríngeas atuem em eventos de comunicação social parece não conferir com os resultados obtidos, pois, pelo contrário, seria de se esperar que as concentrações de substâncias lipídicas fossem maiores. Alguns trabalhos sugerem que as principais glândulas que atuam na produção de substâncias desta natureza seriam as mandibulares e as de veneno, sendo que, nesses casos, os feromônios estariam envolvidos com as principais armas de defesa destes insetos, ou seja, as mandíbulas e o ferrão (BILLEN & MORGAN, 1998).

A relação das glândulas hipofaríngeas com a idade das vespas não foi considerada estatisticamente significativa, de modo que, tanto as glândulas mais quanto as menos desenvolvidas, estavam presentes nas diferentes faixas etárias. Entretanto, a

oscilação na concentração de secreção entre vespas pode estar relacionada com a variação nos comportamentos por elas exercidos dentro das colônias. Isto ocorre justamente devido à distribuição das tarefas observadas para a espécie não estarem estritamente relacionadas com a idade das vespas. Assim sendo, se as glândulas hipofaríngeas estiverem envolvidas no desempenho de alguma tarefa social específica, seu desenvolvimento não deve estar relacionado com algum fator temporal.

Em estudos comportamentais Giannotti & Machado (1999) e Zara & Balestieri (2000) não encontraram atividades definidas por faixas de idade para *Polistes lanio lanio* e para *P. versicolor*, respectivamente, ocorrendo grande plasticidade comportamental. Além disto, a mesma plasticidade foi observada para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*, já que estas apresentaram desenvolvimento variando em vespas com a mesma idade e, em outros casos, apresentaram-se semelhantes em vespas com idades distintas.

Em abelhas, o fato de haver relação do desenvolvimento glandular com a idade estaria relacionado com a sincronia no desenvolvimento das atividades das operárias ao longo de suas vidas. Isso promoveria o desenvolvimento e a regressão das glândulas em períodos semelhantes. Porém, o verdadeiro responsável pela atividade celular das glândulas desses insetos está relacionado com o comportamento, que, de uma maneira mais organizada do que em *Polistes*, também é guiado pelas necessidades da colônia. Em trabalhos realizados em diferentes épocas do ano, observou-se que as glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* se desenvolvem mais rapidamente no verão do que no inverno (BROUWERS, 1982). Durante o verão, as operárias nutridoras que estão cuidando da cria na colméia exibem glândulas hipofaríngeas com altas taxas de síntese protéica, mas no inverno, quando a quantidade de cria está reduzida, a atividade de síntese também se reduz. Com a formação de nova cria, na primavera, a atividade glandular aumenta drasticamente.

Experimentos relacionando a influência da cria no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas revelaram que a atividade de síntese protéica na glândula se desenvolve em operárias quando ovos são introduzidos artificialmente na colônia, devidamente suprida de pólen, durante o inverno (BROUWERS, 1983).

Assim como o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas não parece estar relacionado com a idade das vespas analisadas, o mesmo ocorre com relação à degeneração destas estruturas. No estágio de degeneração, características como a vacuolização celular são comuns em tecidos de insetos, sendo estas observadas em diversos estudos envolvendo as glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM et al., 1986). Variações no padrão de vacuolização também foram observados quando comparadas glândulas hipofaríngeas de abelhas confinadas e livres. Em operárias forrageiras confinadas, foram encontradas células muito intumescidas, chegando a atingir o triplo do diâmetro das células íntegras e possuindo quantidade bem acentuada de vacúolos, havendo ainda algumas glândulas que se diferenciaram pela forte condensação nuclear. Nas forrageiras livres, as células em degeneração apresentaram características semelhantes às encontradas em algumas glândulas de P. versicolor, sendo ainda observado que, em alguns casos, estas abelhas apresentaram células com características apoptóticas (SILVA DE MORAES, 1998). Na apoptose, as células se condensam por perda de água, ocorre marginalização cromatínica e condensação nuclear. A produção de energia é mantida e as bombas da membrana plasmática continuam funcionando de modo que as células excluem corantes vitais como o Azul do Nilo. Neste tipo de morte celular, a destruição do citoplasma ocorre pela fragmentação da célula (ZAKERI et al., 1995). Estes eventos foram encontrados apenas em células isoladas, não sendo descritos em regiões de destruição total (SCHWEICHEL & MERKER, 1973).

De todas as vespas analisadas, em um único indivíduo foi evidenciada uma célula com condensação nuclear típica de células apoptóticas. Entretanto, esta célula estava presente em uma glândula em estágio avançado de degeneração, sendo que, com exceção desta, todas as outras células apresentaram significativo número de vacúolos. Neste caso, fica difícil afirmar que esta célula estaria em um processo típico de apoptose, pois, não teria sentido uma célula única sofrer este processo no meio de um tecido inteiramente comprometido.

Os estudos envolvendo morte celular em insetos evidenciaram que o tipo mais comum encontrado em seus tecidos é a vacuolar. Assim como seu nome indica, sua característica proeminente é a vacuolização do citoplasma, não havendo marginalização cromatínica. Neste processo, os núcleos sobrevivem até sua extrusão da célula ou autólise. Este tipo de morte celular foi estudado, principalmente, durante eventos de metamorfose dos insetos. Foi amplamente descrito por Bowen & Ryder (1976), Bowen *et al.* (1982) e Jones & Bowen (1980) como supressão celular individual em uma grande variedade de invertebrados, caracterizado por um aumento no nível de atividade autofágica, dirigindo a uma eventual fragmentação celular.

Os resultados apresentados pelas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* indicaram que a morte celular vacuolar seria a que mais se enquadra às condições morfológicas nas glândulas consideradas em degeneração, apesar de não ter sido evidenciado nenhum sinal de eliminação total das células por fragmentação.

Independente da morfologia celular, Silva de Moraes (1998) evidenciou em glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* a presença de fragmentação do DNA, por cortes de sua cadeia dupla, e externalização das fosfatidilserinas na membrana plasmática. Apesar destes dois eventos serem encontrados em células apoptóticas, as glândulas hipofaríngeas desta abelha não apresentaram outras características típicas deste tipo de morte celular, como o "blebbing" da superfície celular, a formação de corpos apoptóticos e a fagocitose das células em degeneração.

Apesar das diversas características que poderiam indicar um processo de regressão glandular, a técnica do Azul do Nilo não demonstrou glândulas completamente mortas em *P. versicolor*. Já em *A. mellifera*, onde os processos de morte celular ocorrem em abelhas forrageiras, foram encontradas células que apresentaram incorporação deste corante, sendo ainda constatado que o processo degenerativo não ocorre simultaneamente ao longo de toda a glândula hipofaríngea. Ficou comprovado que as células da porção glandular distal são as primeiras a morrerem, enquanto aquelas da porção proximal permaneceram vivas, fornecendo evidências da ocorrência de uma onda degenerativa com conseqüente morte das células que avança de uma porção para a outra da glândula. Um assincronismo no processo degenerativo foi registrado, observando-se que, na porção proximal, nem todas as células incorporam o corante, o que indica a presença de células vivas entre a massa de células mortas (SILVA DE MORAES, 1998).

Entre as vespas analisadas, um indivíduo apresentou assincronia no desenvolvimento de suas glândulas. Apesar de apresentar algumas características de desorganização celular, suas glândulas hipofaríngeas continuavam ativas, contendo considerável concentração de secreção. No entanto, algumas células secretoras mostraram-se diferenciadas, com aspecto irregular e com núcleos fora dos padrões

normalmente observados. Tais características sugerem que esta glândula tenha passado por uma fase de sobrecarga de atividade. Talvez elas pudessem, também, apresentar incorporação do corante Azul do Nilo em algumas células, como observado em *A*. *mellifera*, entretanto, como esta técnica é realizada em montagem total do material, não foi possível fazer esta constatação para a glândula em questão.

No caso das glândulas hipofaríngeas das abelhas a morte das células estaria mais relacionada com a atividade das operárias na colônia do que com o envelhecimento, representando para elas, um mecanismo de economia energética. A regressão e morte das células glandulares contribuem para a redução do peso das operárias que, quando se tornam forrageiras passam a realizar inúmeros vôos diários, necessários para a coleta de alimento (SILVA DE MORAES, 1998).

Entretanto, a economia de energia realizada pelas abelhas poderia ser perfeitamente explicável, pois suas glândulas atingem cerca de um centímetro de comprimento quando ativas (COSTA, 2002), representando, portanto, uma massa considerável para ser transportada durante as atividades de forrageamento. Também é importante o fato de que mesmo com a regressão glandular, algumas de suas células permanecem ativas, mostrando que elas ainda têm alguma importância na fase de forrageamento. Neste período as glândulas hipofaríngeas ainda são necessárias para estas abelhas, atuando na produção de enzimas digestivas como a invertase, que é importante na digestão de alguns carboidratos (SIMPSON *et al.*, 1968).

Em *Polistes* o fato de haver ou não morte das glândulas hipofaríngeas não poderia estar relacionado com o mesmo fator (economia energética) já que as proporções atingidas por estas glândulas não são comparáveis às glândulas das abelhas. Assim, o principal fator responsável pela regressão glandular, assim como pelo seu desenvolvimento, deve estar relacionado com a carga de atividades realizadas por cada indivíduo, independentemente do tempo de vida. Neste caso os indivíduos mais ativos atingiriam a fase de senescência mais precocemente.

Um único caso, considerado excepcional, foi encontrado em uma vespa que, apesar de ser jovem, possuindo seis dias de idade, apresentou glândulas com acentuada vacuolização. Alguns estudos com *Melipona* mostraram que, em alguns aspectos, às glândulas de abelhas em estágio de degeneração se assemelham às glândulas de abelhas recém emergidas, devido à presença de alguns vacúolos citoplasmáticos (CRUZ-

LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986). Entretanto, estudos do comportamento de *Polistes* indicam que indivíduos com 6 dias de idade já poderiam ter iniciado algumas atividades na colônia, mesmo sendo apenas atividades internas (ZARA & BALESTIERI, 2000)

Alguns experimentos parecem indicar que as glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera* com cerca de 20 dias de idade, que já mostravam unidades secretoras de tamanhos reduzidos, são capazes de desenvolvê-las novamente (GRACIOLI *et al.*,1999). Isto ocorreu quando, na ausência de nutridoras, as forrageiras foram requisitadas para cuidar da cria novamente. A reativação das glândulas hipofaríngeas ocorreria antes de atingido o ponto de não retorno no caminho para a morte celular. Entretanto, diferentemente das abelhas, a grande variedade de atividades realizadas pelas vespas, sem a especialização individual, exerceria uma pressão maior nas glândulas hipofaríngeas, de modo que dificilmente elas chegariam a um ponto de não retorno, já que, comportamentalmente, estas precisam ser bem mais versáteis do que as abelhas. Além disto, verificou-se que mesmo em alguns casos onde as glândulas aprestaram características degenerativas, o citoplasma ainda possuía acúmulos de secreção.

Deste modo, as glândulas de *P. versicolor* atuam, ou pelo menos permanecem em condições de atuar, durante toda a vida destes insetos. Apesar da técnica de cometa (eletroforese das células individuais) não fornecer informações sobre a morfologia das células glandulares, a ausência de fragmentação do DNA observada nas glândulas hipofaríngeas, seria mais um indicativo de que os núcleos das células secretoras permanecem em condição de coordenar as atividades celulares durante todo o ciclo de vida destes insetos. Além disto, mesmo que as glândulas estivessem sofrendo processos de morte celular vacuolar, a fragmentação do DNA não é característica deste processo.

A variação na concentração de fosfatases ácidas nas células glandulares também não foi um bom indicativo de atividade autofágica nas glândulas de *P. versicolor*, uma vez que esta enzima foi encontrada em altas concentrações em todos os indivíduos analisados. Portanto, a presença desta enzima deve estar mais relacionada com a atividade metabólica das células secretoras. Estas enzimas poderiam atuar, portanto, na digestão das moléculas absorvidas pelas células secretoras, fornecendo a matéria prima para a produção da secreção, ou ainda atuar na maturação ou ativação de outros compostos celulares.

Assim sendo, as glândulas hipofaríngeas atingem um grau de desenvolvimento em *P. versicolor* que as indica como estruturas importantes na biologia destes insetos, principalmente pela acentuada produção de glicoproteínas. Nesta espécie, as características degenerativas encontradas em alguns indivíduos poderiam estar mais relacionadas com a senilidade do que com algum mecanismo de morte celular programada propriamente dito. Neste caso, a senilidade das vespas estaria mais relacionada com a alimentação e com o stress promovido pelo grau de atividades exercidas pelas vespas do que com a idade das mesmas, já que glândulas com características degenerativas foram encontradas em vespas de idades distintas. A Atividade Enzimática das Glândulas Hipofaríngeas

de Polistes versicolor

CAPÍTULO 2

RESUMO

Glândulas hipofaríngeas de diferentes espécimes de *Polistes versicolor* foram estudadas com o auxílio de técnicas enzimológicas para a determinação da atividade metabólica de suas células secretoras. Tendo como controle o tecido muscular presente na faringe, observou-se que as glândulas hipofaríngeas possuem alta atividade metabólica, sendo que esta atividade pode ser relacionada com a concentração de secreção nas células. No presente caso, quanto maior a concentração de secreção, maiores os níveis de atividade.
ABSTRACT

Hypopharyngeal glands of different specimens of *Polistes versicolor* were examined using enzymological techniques to determine the metabolic activity of secretory cells. Using the pharyngeal muscles as control, we observed that hypopharyngeal glands have a considerable metabolic activity associated to the amount of secretion present in secretory cells. In the present study, we observed that the higher the concentration of secretion, the higher the activity.

INTRODUÇÃO

As glândulas hipofaríngeas são elementos do sistema salivar dos Hymenoptera. Elas estão localizadas na cabeça e desembocam na placa hipofaríngea, que é uma estrutura cuticular espessa assentada no assoalho bucal. São muito bem estudadas em abelhas sociais, onde são conhecidas tanto morfológica quanto funcionalmente. Em *Apis mellifera*, por exemplo, estas glândulas são responsáveis pela produção da geléia real, que é um dos alimentos oferecidos para as larvas e, também, para outros indivíduos da colônia (COSTA, 2002). Nesta espécie, as glândulas hipofaríngeas estão presentes apenas na casta das operárias, sendo atrofiadas nas rainhas e nos machos (FREE, 1980). Dentre as operárias, as glândulas hipofaríngeas têm seu maior grau de desenvolvimento nas abelhas que estão cuidando da cria, sendo claramente observada sua degeneração quando estas operárias passam a exercer atividades de forrageamento (COSTA, 2002).

Os estudos destas glândulas em espécies de insetos sociais considerados menos derivadas são escassos. Pouco se conhece sobre sua morfologia e, principalmente, sobre a função destas glândulas, nestes grupos. O gênero *Polistes*, em particular, tem atraído a atenção de pesquisadores, por ser considerado o "gênero chave" para o entendimento da evolução dos insetos sociais, devido, principalmente, à pequena ou inexistente diferenciação morfológica entre castas (EVANS, 1958).

Assim, considerando-se a importância das glândulas hipofaríngeas nas espécies mais derivadas, onde estas são bem estudadas, torna-se também relevante o seu estudo

em insetos como os do gênero *Polistes*. Deste modo, um dos meios de se avaliar a importância de sua ação, seria por meio da análise dos níveis de atividade metabólica.

O nível metabólico de uma célula pode ser interpretado como a quantidade de reações químicas energeticamente favoráveis e desfavoráveis que ocorrem em seu interior. Muitas das reações químicas, energeticamente desfavoráveis, ocorrem com o auxílio da energia liberada pela hidrólise de ATP, por enzimas que acoplam diretamente as reações desfavoráveis às reações favoráveis. Entre essas reações estão aquelas envolvidas na síntese de moléculas biológicas, no transporte ativo de moléculas através da membrana plasmática, e na geração de força e movimento. As macromoléculas formadas nas reações biossintéticas, por exemplo, levam informação, catalisam reações específicas e são montadas em estruturas altamente ordenadas. Bombas ligadas à membrana mantêm a composição especial interna das células e permitem que muitos sinais passem para dentro e entre as células (ALBERTS *et al.*, 1997).

Uma das maneiras de se determinar a atividade metabólica de uma célula é por meio da quantificação de estruturas, ou enzimas, envolvidas nos processos energéticos. As mitocôndrias, por exemplo, têm papel crucial no fornecimento de energia para as células eucariontes. Particularmente a enzima Succinato Desidrogenase (SDH) ocorre com exclusividade dentro desta organela e é possível ser demarcada através de técnicas histoquímicas (PEARSE & SCARPELLI, 1958). Portanto, neste caso, a concentração de mitocôndrias em uma célula pode ser indiretamente observada. Também há outras enzimas como a Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo (NADH) que tanto pode ser encontrada no interior das mitocôndrias, fazendo parte do ciclo do ácido cítrico, ou no citoplasma, fazendo parte das reações de glicólise ou, ainda, participando de reações relacionadas com a síntese de moléculas lipídicas. Algumas enzimas como as ATPase's podem ser identificadas nas células para a localização de sítios envolvidos com o gasto de energia. Esta enzima pode atuar, por exemplo, na membrana do retículo endoplasmático, na liberação de neurotransmissores, na membrana plasmática das células em geral, atuando na liberação de energia contida no ATP para garantir o gradiente de concentração entre dois meios diferentes. Em outros casos, por exemplo, as ATPase's atuam na degradação de moléculas complexas, como o glicogênio, presente no citoplasma das células (ALBERTS et al., 1997).

Além destas enzimas, o metabolismo celular poderia também ser mensurado com a identificação de outras enzimas envolvidas em processos de digestão de materiais capturados pela célula. Estas enzimas, conhecidas como hidrolases, são utilizadas na digestão controlada de macromoléculas no interior das células e concentram-se, principalmente, na face interna da membrana dos lisossomos (SADAVA, 1993).

Portanto, com o auxílio de técnicas histoquímicas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as variações nos níveis de atividade metabólica expressos pelas glândulas hipofaríngeas da vespa social primitiva *Polistes versicolor*.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos de *P. versicolor* (n = 15) foram coletados e anestesiados com diminuição gradual da temperatura até 4 °C. Com auxílio de pinças e microtesoura, as glândulas hipofaríngeas foram retiradas sob estereomicroscópio, em placa de Petri para dissecção contendo solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L).

Logo após a dissecção, as glândulas foram mergulhadas em resina apropriada (Cryo-embedding compound – Microm Laborgeräté GmbH) dentro de pequenos suportes individuais feitos com papel alumínio. Deste modo as glândulas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente afixadas em suporte metálico e mantidas entre -20°C a -15°C no Criostato Micrótomo HM 505 E.

Após o congelamento das amostras, as mesmas foram seccionadas, com espessura de 7µm, e os cortes foram aderidos às lâminas de vidro. Após este procedimento as lâminas foram destinadas a diferentes técnicas para detecção das enzimas descritas a seguir. A musculatura da faringe, presente nas secções juntamente com as células secretoras das glândulas hipofaríngeas, foi utilizada como tecido controle das técnicas. Assim, a intensidade de reação presente neste tecido, foi relacionada com os resultados encontrados nas glândulas hipofaríngeas.

Também foram utilizadas as técnicas de Azul de Bromofenol para a detecção de proteínas e PAS para a detecção de glicoconjugados para efeito de comparação entre a presença de secreção e a ocorrência das enzimas nas células secretoras.

1. Localização da atividade de ATPase ácida (DUBOWITZ & BROOKE, 1973)

Lâminas contendo o material foram pré-incubadas por cinco minutos, à temperatura ambiente, na seguinte solução: 5mL de cloreto de cálcio (0,18M); 0,15mL de ácido acético glacial; 45mL de água destilada. A solução foi preparada com pH 4,35. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas, por 30 minutos, a 37°C, em solução contendo 2mL de barbiturato de sódio (0,1M), 1mL de cloreto de cálcio (0,18M), 7mL de água destilada e 15mg de ATP, sendo o pH desta ajustado para 9,4. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em cloreto de cálcio (1%), por 10 minutos, e em cloreto de cobalto (2%), por três minutos, sendo, em seguida, lavadas em água destilada e transferidas para solução de sulfeto de amônio (1%), por 20s. As lâminas foram lavadas em gelatina glicerinada.

2. Localização da atividade de ATPase alcalina (DUBOWITZ & BROOKE, 1973)

Lâminas contendo o material foram pré-incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, na seguinte solução: 2mL de sódio barbitol (0,1M); 2mL de cloreto de cálcio (0,18M); 6mL de água destilada. A solução foi preparada com pH 9,4.

Após este procedimento, a incubação e as outras etapas da técnica de detecção de ATPase alcalina foram idênticas às realizadas para a ATPase ácida.

3. Localização da atividade de Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo-Tetrazolium Redutase (NADH-TR) (DUBOWITZ & BROOKE, 1973)

Lâminas contendo o material foram incubadas, por 30 minutos, a 37°C, em solução contendo 8mg de NADH e 10mg de NBT dissolvidos em 10mL de tampão Tris (0,2M; pH 7,4). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e fixadas em formol 5% tamponado (pH 7,0), por 5 minutos, sendo, posteriormente, lavadas em água destilada e montadas em gelatina glicerinada.

4. Localização da atividade de Succinato Desidrogenase (SDH) (WEGMAN & TORDET-COIDROIT, 1960)

Lâminas contendo o material foram incubadas, por 30 minutos, a 37°C, em solução contendo 1mL de succinato de sódio (0,2M) e 4mL de NBT 0,5mg dissolvidos em 2mL tampão fosfato (0,1M; pH 7,4). Em seguida, as lâminas foram lavadas três

vezes com água destilada e fixadas em formol cálcio por cinco minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada, por mais três vezes, e montadas em gelatina glicerinada.

5. Localização da atividade de Fosfatase ácida (BANCROFT & STEVEN, 1990)

Primeiramente foram misturados 0,4mL de pararosalina hidroclorada e 0,4mL de nitrato de sódio, sendo esta solução deixada de repouso por dois minutos. Após este tempo, foram adicionados à solução, 5mg de naftol AS-BI dissolvido em 0,5mL de n-n-dimetilformamide, 2,5mL de tampão veronal acetato e 6,5mL de água destilada. O pH da solução resultante foi ajustado para 5,0.

As lâminas foram incubadas, a 37°C, na solução previamente preparada, por uma hora. Em seguida, foram lavadas em água destilada e transferidas para o corante verde de metila (2%), por 10 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas em água destilada para retirar o excesso de corante e montadas em gelatina glicerinada.

6. Localização da atividade de Fosfatase alcalina (BANCROFT & STEVEN, 1990)

Primeiramente foi preparado o meio de incubação, onde foram misturados 9mL de tampão borato (0,2M), 10mg de alfa-naftil fosfato, 10mg de fast blue RR e 1mL de sulfato de magnésio (0,1M). O pH da solução resultante foi ajustado para 8,8.

As lâminas contendo o material foram incubadas a 37°C por 40 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada. Após este procedimento o material foi fixado em formalina (10%) por 20 minutos, sendo, posteriormente, mantidas em glicerina por 20h. Após este tempo, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente por 45 minutos e montadas em gelatina glicerinada.

7. Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985)

As lâminas contendo material foram coradas com solução de Azul de Bromofenol, à temperatura ambiente, durante duas horas. Em seguida foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0,5%, por cinco minutos, e lavadas em água destilada. Após este procedimento, as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

8. PAS (Ácido Periódico de Schiff) (McMANUS, 1946)

Os cortes foram hidratados e em seguida levados para solução de ácido periódico 1% por cinco minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada, as lâminas foram colocadas no reagente de Schiff à temperatura ambiente, por 15 minutos, no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 10 minutos e, após retirar o excesso de água, foram montadas em gelatina glicerinada.

RESULTADOS

As células glandulares submetidas às diferentes técnicas enzimológicas foram comparadas com o tecido muscular da faringe, que atuou como tecido controle das técnicas (Figs. 1A a 6A). Utilizou-se tecidos musculares, por eles apresentarem pronunciada atividade metabólica.

Algumas variações encontradas entre as diferentes vespas foram, também, comparadas à quantidade de secreção presente nas células secretoras, que apresentaram reação maior ou menor para as técnicas de Azul de Bromofenol (proteínas) (Figs. 7A e 7B) e PAS (glicoconjugados) (Figs. 7C e 7D).

As glândulas hipofaríngeas apresentaram reação positiva para as ATPase's ácida e alcalina. Entretanto, com relação à musculatura, a reação das duas técnicas ocorreu diferencialmente, onde houve reação positiva para a técnica de ATPase ácida (Fig. 1A) e reação fortemente positiva para a técnica de ATPase alcalina (Fig. 2A). Com relação à ATPase ácida, a intensidade de reação observada na musculatura da faringe foi semelhante à observada nas células secretoras das glândulas hipofaríngeas (Fig. 1A). As células secretoras apresentaram reação positiva de forma relativamente homogênea (Figs. 1B e 1C). A região nuclear também apresentou reação positiva, entretanto esta ocorreu de forma menos intensa (Fig. 1B). Para a ATPase alcalina a reação apresentada pelas células secretoras ocorreu de forma similar à apresentada pela ATPase ácida, sendo que a concentração destas duas enzimas nas glândulas hipofaríngeas foi semelhante (Figs. 1 e 2). O mesmo pôde ser observado com relação aos núcleos das células secretoras (Figs. 1B e 2B).

As variações observadas nas diferentes vespas, tanto para a ATPase ácida quanto para a alcalina, foram observadas nos indivíduos que apresentaram células com maior concentração de secreção (Figs. 1B, 2B, 7A e 7C) e a reação menos intensa ocorreu nas células com menor concentração de secreção (Figs. 1C, 2C, 7B e 7D).

Com relação à técnica para a detecção da enzima SDH as glândulas hipofaríngeas apresentaram reação positiva (a musculatura da faringe apresentou reação fortemente positiva) (Fig. 3A). No citoplasma das células secretoras a intensidade de reação foi semelhante à observada para as técnicas de ATPase, entretanto, em algumas glândulas, notou-se a presença de regiões diferencialmente marcadas, mostrando a presença de pequenos sítios de concentração desta enzima (Fig. 3B). Embora a variação com relação à intensidade de marcação não tenha sido muito grande entre indivíduos, notou-se que a reação SDH mais positiva estava novamente associada à maior concentração de secreção nas células secretoras (Figs. 3B, 3C e 7). Os núcleos glandulares apresentaram reação negativa (Fig. 3B e 3C).

Para a técnica de detecção da enzima NADH-TR, as glândulas hipofaríngeas apresentaram reação fortemente positiva para todos os indivíduos analisados (Fig. 4). Também foi constatada reação fortemente positiva para o tecido controle (Fig. 4A). A marcação das células secretoras ocorreu de forma heterogênea, sendo que a reação NADH-TR mais intensa ocorreu, preferencialmente, na região periférica e ao redor do núcleo das células secretoras (Fig. 4B e 4C). Mais uma vez, a variação individual das glândulas ocorreu de acordo com a concentração de secreção presente nas células secretoras. As glândulas com marcação mais intensa para NADH-TR eram aquelas com maior concentração de secreção (Figs. 4B, 7A e 7C), e reação menos intensa ocorreu nas células secretoras com menor concentração de secreção (Figs. 4C, 7B e 7D). Os núcleos apresentaram reação NADH-TR negativa (Figs. 7B e 7C).

As glândulas submetidas à técnica de fosfatase ácida apresentaram reação fortemente positiva (a musculatura da faringe não apresentou reação) (Fig. 5A). As células secretoras demonstraram a presença da enzima sempre concentrada em suas regiões periféricas (Fig. 5B e 5C). Variação na intensidade de coloração entre as glândulas também foi observada com relação à concentração de secreção, onde quanto maior a concentração de secreção mais intensa a coloração para a técnica de fosfatase ácida (Fig. 5B e 5C).

As glândulas hipofaríngeas apresentaram reação negativa para a técnica de fosfatase alcalina em todas as vespas analisadas (Fig. 6).

FIGURAS



FIGURA 1 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de ATPase ácida. (A) Células secretoras apresentando reação positiva, semelhante à encontrada na musculatura da faringe (tecido controle). (B) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva mais intensa em glândula com maior concentração de secreção. (C) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva menos intensa em glândula com menor concentração de secreção ci – citoplasma; glh – glândula hipofaríngea; m – musculatura da faringe; n – núcleo; ph – placa hipofaríngea.



FIGURA 2 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de ATPase alcalina.
(A) Células secretoras apresentando reação positiva e musculatura da faringe (tecido controle) mostrando reação fortemente positiva.
(B) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva mais intensa em glândula com maior concentração de secreção.
(C) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva menos intensa em glândula com menor concentração de secreção ci – citoplasma; glh – glândula hipofaríngea; lu – lúmen da faringe; m – musculatura da faringe; n – núcleo; ph – placa hipofaríngea.



FIGURA 3 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de SDH. (A) Células secretoras apresentando reação positiva e musculatura da faringe (tecido controle) mostrando reação fortemente positiva. (B) Detalhe de células secretoras mostrando formação de pequenas regiões mais intensamente coradas (seta) em glândula com maior concentração de secreção. (C) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva pouco menos intensa em glândula com menor concentração de secreção ci – citoplasma; glh – glândula hipofaríngea; lu – lúmen da faringe; m – musculatura da faringe; n – núcleo; ph – placa hipofaríngea.



FIGURA 4 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de NADH-TR. (**A**) Células secretoras apresentando reação fortemente positiva, semelhante à encontrada na musculatura da faringe (tecido controle). (**B**) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva mais intensa em glândula com maior concentração de secreção. (**C**) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva menos intensa em glândula com menor concentração de secreção **ci** – citoplasma; **glh** – glândula hipofaríngea; **Iu** – lúmen da faringe; **m** – musculatura da faringe; **n** – núcleo; **ph** – placa hipofaríngea.



FIGURA 5 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de fosfatase ácida. (A) Células secretoras apresentando reação fortemente positiva. (B) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva mais intensa em glândula com maior concentração de secreção. (C) Detalhe de células secretoras mostrando reação positiva menos intensa em glândula com menor concentração de secreção ci – citoplasma; glh – glândula hipofaríngea; lu – lúmen da faringe; m – musculatura da faringe; n – núcleo; ph – placa hipofaríngea.



FIGURA 6 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação de detecção de ATPase alcalina.
(A) Células secretoras apresentando reação negativa para a técnica.
(B) Detalhe de células secretoras mostrando reação negativa em glândula com maior concentração de secreção.
(C) Detalhe de células secretoras mostrando reação negativa em glândula com menor concentração de secreção ci – citoplasma; glh – glândula hipofaríngea; m – musculatura da faringe; n – núcleo; ph – placa hipofaríngea.



FIGURA 7 – Glândulas hipofaríngeas submetidas à reação azul de bromofenol para detecção de proteínas (A e B) e PAS para a detecção de glicoconjugados neutros (C e D). Em A e C, células com reação positiva mais intensa, demonstrando maior concentração de secreção. Em B e D, células com reação positva menos intensa, demonstrando pequena concentração ou ausência de secreção. ci – citoplasma; cs – célula secretora; n – núcleo.

DISCUSSÃO

As glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* apresentaram reação positiva para as técnicas de ATPase ácida, ATPase alcalina e SDH; reação fortemente positiva para as técnicas de NADH-TR e fosfatase ácida e, por fim, reação negativa para a técnica de fosfatase alcalina. As comparações realizadas com a musculatura da faringe permitiram avaliar a relevância da presença de algumas destas enzimas para as glândulas hipofaríngeas.

As glândulas hipofaríngeas apresentaram reação positiva, tanto para a ATPase ácida quanto para a alcalina, entretanto, as reações se deram de forma moderada. A presença das ATPase's nas células indica a ocorrência de processos onde há hidrólise de ATP, produzindo ADP e fosfato (VOET *et al.*, 2002). Portanto, estão relacionadas aos processos que requerem gasto de energia. Este fato explicaria a presença destas enzimas no interior do núcleo das glândulas hipofaríngeas, já que a intensa atividade de síntese em uma célula também requer gasto de ATP em determinados processos como, por exemplo, a transcrição (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1986).

A presença de tanto ATPase ácida quanto alcalina em concentrações semelhantes nas células secretoras das glândulas hipofaríngeas, pode estar relacionada à presença de diferentes sítios de ação destas enzimas já que as mesmas atuam em diferentes pHs. Em geral, estas enzimas podem atuar na membrana do retículo endoplasmático, nas vesículas secretoras, lisossomos, vesículas endossômicas e membrana plasmática, além de estarem presentes na membrana mitocondrial interna

(NELSON & COX, 2002). Entretanto, fica claro que o grau de atividade metabólica encontrado nas glândulas hipofaríngeas é bem inferior ao encontrado na musculatura da faringe, devido ao músculo apresentar reação fortemente positiva para, pelo menos, uma das ATPase's. Este fato era previsto, já que as células musculares usadas como referência neste teste, em geral, estão relacionadas com alta atividade metabólica, requerendo altas demandas de ATP para realizarem sua função (ALBERTS *et al.*, 1997).

A presença de reação positiva para a enzima SDH indica a ocorrência de mitocôndrias nas células, já que esta enzima, em particular, ocorre exclusivamente nas mitocôndrias (PEARSE & SCARPELLI, 1958). Deste modo, a reação negativa para esta técnica nos núcleos das células secretoras já era esperada. Novamente, a presença de reação fortemente positiva para esta enzima ocorreu na musculatura da faringe. As células secretoras, por sua vez, apresentaram reação mais moderada, quando comparadas à musculatura, demonstrando que as mitocôndrias presentes nas glândulas hipofaríngeas apresentam-se em menor concentração. Estes resultados corroboram os encontrados para a técnica de ATPase alcalina, já que células que possuem muitos sítios de quebra de ATP, devem possuir, também, sítios de produção desta molécula.

No teste para NADH-TR os grânulos encontrados no citoplasma das células secretoras apresentaram-se em quantidade superior àquele apresentado pelo teste para SDH, o que revela a existência de outros sítios contendo a enzima, além das mitocôndrias, como já observado por Rocha (2004) nas glândulas salivares do tórax de *P. versicolor* e, também, por Caetano (1998) na glândula pós-faríngea da formiga *Dinoponera australis*. No caso destas formigas, o autor relaciona a existência destes sítios extra-mitocondriais com a presença de NADH-TR ligado à cadeia do citocromo P450, envolvido no metabolismo de lipídios destas células.

Portanto a presença considerável de NADH-TR nas glândulas hipofaríngeas também deve também estar relacionada à ocorrência de sítios extra-mitocondriais desta enzima, pois, tem-se reação mais forte para o NADH-TR do que para o SDH. Além de poder participar da cadeia do citocromo P450 nas glândulas pós-faríngeas, esta enzima também é um dos produtos da glicólise, que ocorre fora das mitocôndrias (ALBERTS *et al.*, 1997). No caso da musculatura da faringe, que também apresentou reação intensa para a técnica, provavelmente o NADH-TR esteja mais relacionado à alta concentração

de mitocôndrias, já que as intensidades de reação para NADH-TR e SDH se deram de forma semelhante.

A forte reação apresentada pelas glândulas hipofaríngeas para a técnica de fosfatase ácida pode estar relacionada com o próprio metabolismo das células secretoras das glândulas hipofaríngeas. As fosfatases ácidas estão largamente distribuídas nos organismos vivos. Elas ocorrem principalmente no interior de lisossomos, mas fosfatases ácidas extra-lisossômicas também estão presentes em muitas células (MOSS, 1984). Grande concentração destas enzimas também foi encontrada nas células da região distal dos túbulos de Malpighi de Triatoma infestans (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1997). Esta região do órgão estaria relacionada com mecanismos de excreção, sendo que a marcante presença de fosfatase ácida encontrada nas células da região distal parece estar mais envolvida com o intenso catabolismo destas células. As análises ultraestruturais mostraram a presença de grande quantidade de lisossomos nesta região (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1998). Em A. mellifera esta enzima foi encontrada nas microvilosidades das células epiteliais do intestino, bem como em sua região basal, sendo este um indicativo da alta atividade metabólica nestas células (GREGORC et al., 1998), uma vez que estas secretam enzimas e absorvem nutrientes (HARVEY & BLANKENMEYER, 1975). Nas glândulas hipofaríngeas de A. mellifera a presença de fosfatase ácida foi relacionada à digestão intracelular e, também, a processos de síntese protéica. Além disto, visto que estas enzimas foram encontradas em maior concentração em glândulas de operárias forrageiras, elas também estariam envolvidas com processos de autofagia celular, porque netas operárias as glândulas hipofaríngeas se encontram em processo de involução (COSTA & CRUZ-LANDIM, 2001a). O mesmo foi constatado quando esta enzima foi encontrada livre no citoplasma de células de insetos durante processos de metamorfose, onde eventos de morte celular são facilmente observados (SKELTON & BOWEN, 1987). Entretanto, a presença de reação fortemente positiva para fosfatase ácida nas glândulas hipofaríngeas de P. versicolor não deve estar relacionada a eventos de morte celular, uma vez que esta enzima foi encontrada de forma significativa em todas as vespas analisadas.

As fosfatases alcalinas estão relacionadas a processos bioquímicos fundamentais, como os mecanismos de absorção e transporte. Estas enzimas ocorrem nas membranas celulares da maioria dos órgãos e tecidos do corpo humano. Quando

encontradas no fígado e nos ossos, as fosfatases alcalinas têm sido utilizadas como valores diagnósticos pra monitorar doenças associadas a estes órgãos (BRETAUDIERE & SPILLMAN, 1984). Entretanto a presença desta enzima nas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não foi observada no nível das análises histológicas. Em *A. mellifera* e *S. postica*, a análise química da secreção de glândulas hipofaríngeas e de glândulas salivares do tórax demonstrou a presença de fosfatase alcalina, mas a concentração desta foi muito baixa (COSTA & CRUZ-LANDIM, 2001b; 2002). O estudo dos túbulos de Malpighi de ninfas e imagos de *T. infestans* revelou a presença de células com reação positiva para fosfatase alcalina na região distal deste órgão. A resposta positiva para esta técnica ocorreu principalmente em glóbulos citoplasmáticos que se supõe sejam esferocristais (glóbulos mineralizados), já que estas estruturas são muito freqüentes neste órgão. No presente caso, as fosfatases alcalinas poderiam atuar em processos de calcificação dos esferocristais, bem como atuar na quebra do glicogênio, que é freqüentemente estocado nestas estruturas celulares (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1986).

Para as glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* as análises enzimológicas realizadas revelaram que o nível de atividade metabólica das células pode, também, ser expressa pela concentração de secreção nelas presente. Em células consideradas mais ativas, ou seja, com reação mais positiva para as enzimas, foi também observada maior concentração de secreção. Por outro lado, as células consideradas menos ativas apresentaram menor concentração de secreção. Apenas para a enzima SDH esta observação não pôde ser constatada nitidamente, já que a concentração de enzimas encontradas em glândulas com muita ou pouca secreção foi semelhante. Entretanto, este fato apenas mostra que o nível de atividade das glândulas hipofaríngeas, não está relacionado com o número de mitocôndrias presentes nas células secretoras. Assim, o número de mitocôndrias nas células secretoras das glândulas dos diferentes indivíduos deve ser semelhante, independente das células estarem mais ou menos ativas.

Considerou-se, portanto, que os níveis de atividade metabólica das glândulas hipofaríngeas estão de acordo com a principal função das células secretoras, que é a produção de proteínas (no presente caso, glicoproteínas, devido à reação PAS positiva). A alta concentração de fosfatase ácida encontrada nas células glandulares está, provavelmente, envolvida com processos metabólicos das células e não estão relacionados à morte celular. Isto pode mostrar, indiretamente, a alta taxa de importação de materiais presentes na hemolinfa destes insetos, que serão processados para o fornecimento de matéria-prima para a produção de secreção. Outra hipótese é a de que a fosfatase ácida poderia atuar na maturação ou modificação de outras moléculas celulares.

Apesar de ocorrerem de forma mais moderada, as ATPase's e SDH presentes nas células secretoras devem estar de acordo com o ritmo metabólico das células secretoras, que deve ser menor do que os apresentados pelas células da musculatura da faringe.

Com relação à NADH-TR, sua presença foi equivalente na musculatura da faringe e nas glândulas hipofaríngeas. Entretanto, na musculatura esta enzima deve estar mais relacionada com a presença de muitas mitocôndrias, enquanto nas glândulas elas certamente ocorrem em outras localidades. De qualquer forma, a presença desta enzima foi interpretada como uma evidência de que as glândulas hipofaríngeas possuem alta atividade metabólica.

Um olhar mais profundo à Morfologia e à Química das Glândulas Hipofaríngeas de *Polistes versicolor*: Ultra-estrutura e Citoquímica Ultra-estrutural

CAPÍTULO 3

RESUMO

Por meio de técnicas de rotina e de citoquímica aplicadas à microscopia eletrônica de transmissão pôde-se conhecer as características ultra-estruturais e a natureza química de algumas estruturas celulares das glândulas hipofaríngeas. Os resultados mostraram que em P. versicolor as glândulas hipofaríngeas são constituídas por células esféricas, núcleo grande e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. O acúmulo de vesículas de secreção é grande. As técnicas ultraestruturais para a detecção de proteínas apresentaram apenas marcações inespecíficas, tanto no citoplasma quanto no núcleo, mostrando que o tipo de proteínas previamente detectada nas vesículas de secreção pelas técnicas citoquímicas (Capítulo 1) não é detectável pela técnica de Prata Amoniacal. Com relação ao lipídio, apenas em um dos espécimes foi observado o acúmulo desta substância nas glândulas hipofaríngeas. A técnica para a detecção de depósitos de glicogênio não demonstrou a presença deste composto nas células glandulares. A técnica do Tetróxido de Ósmio, para a detecção de complexos de Golgi evidenciou regiões golgianas, sem, contudo, mostrar estruturas com características típicas. Foi detectada a ocorrência da enzima fosfatase ácida nas células secretoras e, assim como previamente observado nos estudos histológicos (Capítulos 1 e 2) as glândulas hipofaríngeas de todas as vespas analisadas apresentaram reação positiva, porém sua forte presença ocorreu na forma extra-lisossomal.

ABSTRACT

Through routine and cytochemical techniques for transmission electron microscopy, the ultrastructural characteristics and the chemical nature of some cellular structures of the hypopharyngeal glands were examined. The results showed that the glands of *Polistes versicolor* are constituted by spherical cells, large nucleus and highly developed rough endoplasmic reticulum. Secretion vesicles are abundant. The ultrastructural techniques for protein detection only stained nonspecific areas in the cytoplasm and nucleus, indicating that the type of proteins previously detected in secretion vesicles by histochemical techniques (chapter 1) is not detectable by Ammoniacal Silver reaction. Lipids were observed in the hypopharyngeal glands only in one specimen. The technique for detection of glycogen deposits did not demonstrate the presence of this substance in glandular cells. The Osmium Tetroxide technique detected structures that, although not typical, resembled the Golgi apparatus. The enzyme acid phosphatase was detected in secretory cells as previously observed in the histochemical studies (chapters 1 and 2). The hypopharyngeal glands of all analyzed wasps presented a positive reaction, however, this enzyme was mainly present in the non-lysosomal form.

INTRODUÇÃO

As glândulas hipofaríngeas são estruturas presentes apenas na ordem Hymenoptera e apresentam variação em sua morfologia e grau de desenvolvimento nas diferentes espécies deste grupo. São muito bem estudadas em abelhas, onde estão relacionadas com a produção de secreção utilizada para alimentar as larvas da colônia. Em *Apis mellifera*, está secreção é conhecida como geléia real (FREE, 1980).

Já em espécies sociais mais primitivas, as glândulas hipofaríngeas são pouco conhecidas. Seu papel nestas espécies, só pode ser inferido indiretamente, relacionando a sua morfologia e grau de desenvolvimento às atividades dos indivíduos, às características comportamentais e por analogia com *Apis mellifera*, onde sua função está estabelecida com relativa segurança (COSTA, 2002). Nesta abelha, as glândulas hipofaríngeas não estão presentes nas rainhas e machos, mas apresentam-se bem desenvolvidas nas operárias, demonstrando seu alto grau de especialização. Dentre as operárias, o maior desenvolvimento glandular é observado na fase onde estas estão alimentando a cria, sendo denominadas de operárias nutridoras (FREE, 1980). Com cerca de 20 dias após a emergência, estas operárias iniciam a fase de forrageamento e suas glândulas hipofaríngeas começam a regredir, diminuindo muito em volume. Porém, neste período, elas ainda produzem enzimas digestivas, como a invertase (SIMPSON *et al.*, 1968). Deste modo, as glândulas hipofaríngeas apresentam um ciclo de desenvolvimento intimamente ligado ao ciclo de vida destas abelhas.

Entre as espécies sociais mais primitivas, o ciclo de vida dos indivíduos pode não ser tão definido, de modo que, por exemplo, o desenvolvimento glandular pode não coincidir entre indivíduos de idades semelhantes. Em *Polistes versicolor*, as glândulas hipofaríngeas não possuem relação com a idade ou com o comportamento social destas vespas (vide Capítulo 4). Além disto, com a ausência de castas morfologicamente diferenciadas, as glândulas apresentaram desenvolvimento muito semelhante entre todas as fêmeas analisadas, além de estarem presentes e ativas nos machos. Assim, a verdadeira função destas glândulas permanece, ainda, desconhecida.

No gênero *Polistes*, a manutenção da hierarquia nas colônias se dá de forma distinta das abelhas sociais (PARDI, 1948). Em geral, a separação das castas ocorre por meio da dominação física e pelo uso de oofagia e larvifagia diferenciais, onde as vespas distinguem sua cria das demais e ingerem os descendentes da concorrente. Esse processo faz com uma das fêmeas se torne a dominante. Deste modo, as castas presentes nestas colônias são formadas pela vespa dominante (rainha) e pelas suas subordinadas (operárias). Entre as subordinadas não há especialização na realização das tarefas, de modo que a divisão de trabalho ocorre de acordo com as necessidades da colônia (GOBBI, 1977; GIANNOTTI & MACHADO, 1999; ZARA & BALESTIERI, 2000).

Com relação às glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*, as características anatômicas por elas apresentadas também as definem como estruturas primitivas dentre os Hymenoptera. Nesta espécie as glândulas hipofaríngeas são constituídas por unidades secretoras unicelulares ligadas, individualmente, à placa hipofaríngea por canalículos. Por este motivo esta placa apresenta-se crivada por inúmeros poros (Fig. 4C e 4D da introdução geral) (BRITTO *et al*, 2004). Nas espécies mais derivadas, as glândulas hipofaríngeas também são constituídas por grupos de células que contém um canalículo coletor da secreção em seu interior. Entretanto, as unidades secretoras podem ser multicelulares, como ocorre em *A. mellifera*. Além disto, estas unidades secretoras liberam sua secreção em um canal axial único, que a conduz até a placa hipofaríngea (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969).

Apesar das variações anatômicas presentes nas diferentes espécies, os aspectos ultra-estruturais das células secretoras exibem características semelhantes nas espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986; COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000) e formigas (GAMA, 1985) onde foram

estudadas. O retículo endoplasmático é bem desenvolvido, há grande concentração de secreção ao redor dos canalículos intracelulares e o núcleo das células é caracterizado por contornos irregulares, nucléolos bem definidos e cromatina dispersa.

Alguns trabalhos realizados com abelhas (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986; COSTA, 2002) sugerem que a secreção presente nas glândulas hipofaríngeas seja produzida em nível de retículo endoplasmático rugoso, devido, principalmente, à ausência de complexo de Golgi. Poucos estudos relatam a presença desta organela nas glândulas hipofaríngeas de Hymenoptera e, quando presentes, aparecem em pequena quantidade ou assumem a forma vesicular (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; GAMA, 1985).

Em *Melípona quadrifasciata anthidioides* as glândulas hipofaríngeas sofrem mudanças ao longo da vida destas abelhas que refletem um ciclo secretor único. Este ciclo é resultado dos papéis desempenhados pelas abelhas na colônia. Após a emergência, elas possuem glândulas inativas. Iniciando as atividades de cuidado com a cria, as glândulas se desenvolvem e entram na fase secretora. Após este período, elas entram na fase pós-secretora, que coincide com o início das atividades de forrageamento (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969).

Análises ultra-estruturais, realizadas na fase pós-secretora das glândulas hipofaríngeas de abelhas, demonstraram a presença de estruturas degenerativas no citoplasma (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973). Outros estudos sobre a morte celular programada das glândulas de *Apis mellifera*, demonstraram que apesar das células em fase degenerativa apresentarem aspectos mais relacionados com a necrose, algumas características apoptóticas, como fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserinas (fosfolipídio de membrana que em situações normais está voltado para o citoplasma), foram encontradas (SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000). Análises ultra-estruturais de vários tecidos propõem a existência de três tipos de morte celular programada. A distinção fundamental entre esses tipos de morte celular, se dá com a participação dos lisossomos da célula que está morrendo, mas os fragmentos dessas células são destruídos por lisossomos de outras células (heterofagocitose). No segundo tipo, há participação efetiva dos lisossomos da própria célula em sua destruição (autofagocitose). Já no terceiro tipo, a célula é destruída sem a participação detectável

de lisossomos (CLARKE, 1990). A autofagocitose é o tipo de morte celular mais característico dos insetos, sendo observada principalmente durante a metamorfose (BOWEN, 1997). Neste caso, as células que estão morrendo tornam-se ricas em lisossomos secundários e vacúolos autofágicos que, nesta situação, apresentam-se muito mais extensos do que os normalmente encontrados em células saudáveis. Também pode ser observada a dilatação de organelas celulares, tais como mitocôndria e retículo endoplasmático.

O presente trabalho teve como objetivos os estudos ultra-estrutural e citoquímico ultra-estrutural das glândulas hipofaríngeas da vespa social primitiva *P. versicolor*. Estes estudos permitirão a realização de observações mais detalhadas a respeito da organização destas glândulas, podendo oferecer mais indícios que colaborem na determinação de seu papel nos ninhos desta vespa.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Técnica de rotina para microscopia eletrônica de transmissão

Espécimes de três ninhos de *Polistes versicolor* foram coletados (n = 14 fêmeas e 1 macho) para a obtenção das glândulas hipofaríngeas. A dissecção dos espécimes foi realizada diretamente em fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2) sob estereomicroscópio, com o auxílio de pinça e microtesoura. Em seguida, as glândulas foram submetidas ao processamento para a técnica de rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto, as glândulas foram fixadas durante duas horas. Transcorrido este tempo, as mesmas foram lavadas, duas vezes, em tampão cacodilato de sódio, por 15 minutos cada vez. Em seguida foi realizada a pós-fíxação em tetróxido de ósmio 1%, durante uma hora, e, posteriormente, as glândulas foram novamente lavadas em tampão, duas vezes, por 15 minutos cada banho.

Para a contrastação em bloco, o material foi submetido ao acetato de uranila 1% dissolvido em etanol 10%, pelo período de quatro horas, sendo, em seguida, desidratado em seqüência concentrações progressivas de acetona (50 a 100%) e, posteriormente, embebido em resina Epon com acetona (1:1), onde permaneceu por 24 horas.

O material foi então incluído em resina Epon pura e levado para estufa, onde permaneceu por 72 horas a 60°C, para polimerização.

Os cortes finos e ultra-finos foram obtidos em ultra-micrótomo Sorval MT2-B. Os cortes ultra-finos foram colocados em telas de malha de cobre e contrastados com acetato de uranila, por 45 minutos, e citrato de chumbo, por 15 minutos.

2. Citoquímica ultra-estrutural

Glândulas de diferentes indivíduos foram submetidas aos testes citoquímicos para a detecção de proteínas básicas, lipídios, complexos de Golgi, fosfatase ácida e glicogênio.

2.1 - Técnica da Prata Amoniacal para detecção de proteínas básicas (MACRAE & MEETZ, 1970)

Glândulas de nove vespas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,2) por duas horas à temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi lavado, por 20 minutos, em água destilada, sendo, em seguida, incubado, por cinco minutos, em solução de prata amoniacal preparada imediatamente antes do uso, à temperatura ambiente, da seguinte maneira: adicionou-se gradualmente uma solução de nitrato de prata a 10% a uma solução concentrada de hidróxido de amônia até que aparecesse uma leve turvação de cor castanho-avermelhada. Logo após as amostras foram lavadas em água destilada e incubadas em solução de formalina 3%, por cinco minutos, à temperatura ambiente, onde se observou o escurecimento do material (o qual adquiriu tons de marrom). Depois da incubação o material foi lavado em água destilada, por 20 minutos, e posteriormente banhado em tampão cacodilato, por dez minutos. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato, durante duas horas, à temperatura ambiente, no escuro. Terminado este procedimento as glândulas foram lavadas em tampão cacodilato, por dez minutos, e, em seguida, desidratadas e incluídas em Epon.

2.2. Técnica do Tampão Ósmio-Imidazol para detecção de lipídios (ANGERMÜLLER & FAHIMI, 1982)

As glândulas hipofaríngeas de seis vespas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,2) e sacarose 3% por duas horas. Posteriormente, o material foi lavado no mesmo tampão por dez minutos. Um segundo banho foi realizado com tampão imidazol (0,1 M pH 7,5), por dez minutos. Em seguida, as glândulas foram pós-fíxadas em tetróxido de ósmio 2% em tampão imidazol, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Depois de dois banhos de dez minutos em

tampão imidazol, o material foi desidratado em acetona e incluído em Epon. Os cortes ultra-finos foram observados sem contrastação.

2.3. Técnica do Tetróxido de Ósmio para detecção de complexos de Golgi (HAYAT, 1972)

As glândulas hipofaríngeas de 6 vespas foram fixadas em tetróxido de ósmio 2%, não tamponado (pH 6,2-6,8), por 24 horas, à temperatura de 40°C. Transcorrido este tempo, as amostras foram submetidas a uma nova solução de tetróxido de ósmio 2% por outras 16 a 24 horas, na mesma temperatura. Posteriormente, as amostras foram tratadas com acetato de uranila, por 90 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, foram desidratadas e incluídas em Epon conforme rotina. Os cortes ultra-finos foram observados sem contrastação em microscópio eletrônico de transmissão.

2.4. Técnica do p-Nitrofenilfosfato para detecção de fosfatase ácida (RYDER & BOWEN, 1975)

Glândulas hipofaríngeas de 10 vespas foram dissecadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,4), durante 1 hora, a 4°C. Após a fixação as glândulas foram rapidamente lavadas em tampão acetato (pH 5,0) e incubadas, à 21°C no seguinte meio: a) 5 tabletes de paranitrofenilfosfato (Sigma Tablets); b) 0,025g de acetato de chumbo em 25mL de tampão acetato pH 4,8. Como controle, foram usadas mais 4 glândulas incubadas em meio contendo apenas a solução de acetato de chumbo tampão acetato, eliminando-se em 0 substrato (paranitrofenilfosfato).

Após a incubação, as glândulas foram lavadas em tampão cacodilato (pH 7,4), por 30 minutos, a 4°C e colocadas em tetróxido de ósmio de Milloning à mesma temperatura, por 1 hora. Posteriormente as glândulas foram desidratadas com acetona e incluídas em Epon, conforme rotina. Os cortes ultra-finos foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão, sem contrastação.

2.5. Técnica de Afzelius para detecção de depósitos de glicogênio (AFZELIUS, 1992)

Grades contendo os cortes ultra-finos, obtidos com material processado conforme a técnica de rotina em microscopia eletrônica de transmissão (item l), porém

sem a contrastação em bloco com uranila, foram tratados com ácido tânico 1% (em água destilada), por 30 minutos. Posteriormente, as grades foram lavadas com água destilada e contrastadas com acetato de uranila 4%, por 60 minutos, lavadas em água destilada e examinadas sem qualquer outra contrastação. Esta técnica foi realizada com as glândulas de nove vespas.

3. Análise do material e documentação fotográfica

As telas obtidas em todas as técnicas foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da Unesp de Rio Claro e Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unesp de Botucatu.

RESULTADOS

1. Ultra-estrutura das células secretoras

As glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* são constituídas por unidades secretoras formadas por células individuais ligadas a canalículos (Figs. 1 e 2) que conduzem a secreção até a placa hipofaríngea. As células secretoras são esféricas, com núcleos bem desenvolvidos e apresentam vesículas de secreção em concentrações que variam de indivíduo para indivíduo (Figs. 2 e 3).

Além dos núcleos serem relativamente grandes, eles apresentam contorno irregular e cromatina descondensada em quase toda sua extensão (Fig. 4A). Os nucléolos são conspícuos e variam em número, ocorrendo em média de três ou quatro (Fig. 3 e 4B). Alto nível de troca de substâncias entre o núcleo e o citoplasma, pode ser evidenciado em decorrência dos numerosos poros presentes no envoltório nuclear (Fig. 5) e pelo próprio contorno irregular deste, que garante maior superfície de contato entre os dois compartimentos. Em algumas células são encontradas profundas invaginações no envoltório nuclear (Fig. 4A).

As vesículas de secreção, além de estarem presentes em concentrações variadas nos diferentes indivíduos, também mostram eletrondensidade variável dentro das células (Figs. 2, 4A, 6A, 6B, 7B, 8A e 13B). Em todos os casos, as vesículas de secreção se agrupam, principalmente, ao redor dos **canalículos coletores** (também conhecidos como canalículos "intracelulares"), os quais são circundados pelas
microvilosidades das células secretoras. Estas microvilosidades delimitam uma região denominada de **aparato terminal** (Figs. 1A, 6A, 7A e 7B).

Os canalículos coletores (ou intracelulares), na realidade, constituem uma região formada pela invaginação da membrana plasmática da própria célula secretora, que cria um espaço, aparentemente intracelular, onde é secretada uma delgada camada de cutícula (Figs. 1A, 7A e 7B). Esta camada de cutícula, que recobre todas as células de origem ectodérmica, em seu pólo apical, está depositada sobre as microvilosidades da célula secretora de forma descontínua, num espaço topologicamente extracelular. Além disto, esta mesma cutícula delimita o lúmen do canalículo coletor (Figs. 1A, 7A e 7B). Duas camadas distintas podem ser observadas na cutícula do canalículo coletor: uma mais interna e esponjosa (pró-cutícula) (Fig. 7B) e outra mais elétron-densa, voltada para o lúmen do canalículo (epicutícula) (Fig. 7B).

Entre as microvilosidades do aparato terminal e a camada de cutícula do canalículo coletor, forma-se um espaço, denominado **espaço secretor** (Figs. 1A e 7B), para onde a secreção é primeiramente liberada logo após a exocitose (Figs. 1A, 6A, 6B, 7A e 7B). Este espaço pode ser considerado um reservatório glandular. Somente após atravessá-lo, a secreção produzida pelas células secretoras segue para o lúmen do canalículo coletor pelas interrupções presentes na epicutícula e passando pela pró-cutícula esponjosa.

Dentro do espaço secretor também são observadas algumas **figuras mielínicas** (Fig. 6A), que são aí formadas devido à constante fusão de vesículas de secreção com as microvilosidades.

Após atravessar toda a extensão dos canalículos coletores, a secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas chega ao lúmen do **canalículo condutor** (Figs. 1A, 1B, 8A e 8B). Estes canalículos apresentam uma camada de cutícula espessa e contínua, diferentemente dos canalículos coletores (Figs. 1A, 1B, 2, 8A e 8B). Eles são formados por uma célula própria e são responsáveis por levar a secreção até sua desembocadura na placa hipofaríngea (ver Figs. 4C e 4D da Introdução Geral). Os canalículos condutores apresentam uma porção inserida no interior da invaginação que forma os canalículos coletores. Por isto, em alguns cortes, eles são observados no interior das células secretoras, na região citoplasmática (Figs. 1A, 1B, 2, 8A e 8B). Nas células que formam os canalículos coletores não são observadas microvilosidades abaixo da camada

de cutícula (Figs. 1A e 8B). No contato da célula canalicular com a célula secretora ocorrem **junções septadas**, que impedem o fluxo de secreção no espaço intercelular (Figs. 1A e 8B).

Nas porções mais periféricas das células secretoras, observa-se a presença de retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido (Fig. 9A). Esta característica pode ser observada com freqüência nas células que apresentam algum acúmulo de vesículas de secreção no citoplasma. Nas células que se encontram íntegras, porém, sem a presença das vesículas de secreção (Fig. 3), o RER se apresenta pouco desenvolvido (Fig. 9B). Já nas regiões do citosol onde o RER não está presente, observa-se grande número de ribossomos livres, sendo alguns como polirribossomos (Fig. 10).

Entre a porção mediana e periférica das células secretoras nota-se a presença de inúmeras mitocôndrias. Estas são alongadas e bem características, estando presentes entre o RER (Figs. 9A e 9B) e entre invaginações da membrana plasmática (Figs. 11A e 11B). Por sua vez, estas invaginações são profundas e estão presentes em quase toda extensão da membrana plasmática (Figs. 11A e 11B).

Externamente, as células secretoras são recobertas por uma lâmina basal, intimamente ligada à membrana (Fig. 11A e 11B). As células secretoras podem apresentar-se justapostas (Fig. 2 e 12A), porém, não são observadas estruturas de comunicação intercelular, sendo este contato meramente topológico (Fig. 12A).

Estruturas como vacúolos digestivos aparecem em quantidade moderada, sendo que, alguns se apresentam como vacúolos heterofágicos (Fig. 12B), enquanto outros possuem aspectos de autofágicos. No último caso, são observados vacúolos contendo estruturas membranosas dispostas concentricamente, apresentado aspecto de RER (Fig. 12B), mitocôndrias envoltas por membranas (Fig. 11A) e algumas estruturas membranosas eletrondensas concentricamente arranjadas, sendo provavelmente constituídas por figuras mielínicas ou RER em estágios mais avançado de digestão (Fig. 11B).

Em três das glândulas analisadas, ocorrem grandes vacúolos no citoplasma (Fig. 13A e 13B). Os resultados das técnicas de citoquímica, mostrados a seguir, evidenciaram a natureza não lipídica destes vacúolos. Apesar da presença destes, as células apresentam-se bem desenvolvidas com quantidade considerável de vesículas de secreção em seu citoplasma (Figs. 13A e 13B). Dentre os indivíduos que apresentam

estas características, um deles é o macho. Estes vacúolos apresentam conteúdo homogêneo e eletrondensidade baixa (Figs. 13A e 13B). Estes vacúolos são formados pela dilatação dos compartimentos previamente denominados de espaços secretores. Analisando-se os aspectos dos espaços secretores e dos vacúolos, nota-se que ambas as regiões possuem eletrondensidade semelhante e podem estar bem próximas (Fig. 13B). Além disto, em alguns destes vacúolos ocorrem figuras mielínicas (Fig. 13B) assim como as observadas nos espaços secretores de células que não contém tais vacúolos (Fig. 6A). Em algumas células as figuras mielínicas tomam conta de todo o compartimento (Fig. 14).

Em outra glândula as células secretoras apresentam, dentro dos vacúolos, estruturas cilíndricas com aspecto de membrana lipídica (Figs. 15A, 15B e 16).

Em uma das glândulas analisadas observa-se a presença de um grande grânulo de proteína localizado no citoplasma de uma das células secretoras (Figs. 17A e 17B).

2. Citoquímica Ultra-estrutural

A técnica do Ósmio Imidazol para a detecção de acúmulo de material lipídico não demonstra acúmulo de substâncias desta natureza na maioria das glândulas analisadas (Fig. 18A). Como já mencionado anteriormente, mesmo nos grandes vacúolos que se assemelhavam às gotas lipídicas e apareceram no citoplasma de algumas células, não foi detectada reação positiva para a técnica (Fig. 18A). Entretanto, nas glândulas hipofaríngeas de um dos indivíduos estudados, ocorrem algumas gotas lipídicas pequenas acumuladas no citoplasma, assim como nos espaços secretores próximos ao canalículo coletor (Fig. 18B, 19A e 19B). Neste caso, observa-se que a marcação dos lipídios ocorreu sempre em contato íntimo com a membrana plasmática do espaço secretor e fora do lúmen do canalículo coletor (Fig. 19A). Nota-se que esta glândula apresenta muitas vesículas de secreção no citoplasma, apesar da falta de contrastação (Fig. 18B). Além disto, ao redor das gotas lipídicas, localizadas próximas à periferia celular, o retículo endoplasmático apresenta um formato que parece ser de transição entre a forma lamelar e a tubular, podendo constituir uma região de passagem da forma rugosa para a forma lisa (Fig. 19B).

A técnica para a detecção de complexos de Golgi não mostra a presença desta organela nas células secretora da maioria das vespas analisadas. Apenas em um indivíduo se nota a ocorrência de uma estrutura com características típicas de complexos de Golgi de insetos, que ocorrem na forma vesicular (Fig. 20). Neste indivíduo, o provável complexo de Golgi aparece na forma de vesículas que não apresentam marcação, rodeadas por outras vesículas elétron-densas (Fig. 20B). Estas vesículas marcadas podem ter se originado das outras não marcadas devido à posição de ambas. Estas mesmas vesículas elétron-densas já foram observadas nas glândulas hipofaríngeas de outra vespa submetida à técnica de rotina (Fig. 21). Elas são menores, menos elétron-densas e bem menos abundantes do que as vesículas de secreção (Fig 20A e 21A).

A técnica de Prata Amoniacal para a detecção de proteínas básicas evidencia apenas pequenas marcações inespecíficas nas células glandulares que são quase imperceptíveis em pequeno aumento (Fig. 22A). Além disto, as marcações não são freqüentes nas vesículas de secreção (Fig. 22B). No citoplasma a marcação apresenta-se de forma aleatória, mas homogênea (Fig. 23A). Também pode ser observada marcação no núcleo, sendo que esta se dá, principalmente, nas regiões de acúmulo de heterocromatina (Fig. 23B).

A técnica de p-nitrofenilfosfato, para detecção de sítios contendo a enzima fosfatase ácida mostra a ocorrência desta em todas as células das glândulas estudadas. A fosfatase ácida localiza-se preferencialmente nas regiões periféricas das células secretoras dentro de lisossomos ou livre no citoplasma, além de estar presente nos núcleos das células (Figs. 24 e 25). Aparentemente as células secretoras apresentam marcação diferenciada dentro de uma mesma glândula, com algumas células apresentando maior quantidade da enzima do que outras (Fig. 24A). No entanto, acredita-se que isto seja apenas uma conseqüência da região onde foi realizada a secção da célula. A fosfatase ácida extra-lisossomal é muito freqüente entre as cisternas do retículo endoplasmático, onde pode ser observado um padrão de listras regulares no citoplasma (Fig. 25B). Mesmo nas células onde a concentração de vesículas lisossomais é alta, observa-se a ocorrência de alguma fosfatase livre no citoplasma (Fig. 25A). No controle do experimento, realizado com glândulas que não foram submetidas ao p-nitrofenilfosfato, não ocorre reação. Este resultado pode ser observado tanto no núcleo quanto nas distintas partes do citoplasma (Figs. 26 e 27).

Com relação à técnica de Afzelius para a detecção de acúmulo de glicogênio, não houve marcação nas células secretoras (Fig. 28).

FIGURAS



FIGURA 1. (**A**) Esquema de uma célula secretora das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* mostrando sua ligação com a célula canalicular (ou canalículo condutor - **cd**). O esquema detalha as estruturas que fazem parte do aparato terminal, que é delimitado pelo canalículo coletor (**cl**). Note que o canalículo coletor é formado pela invaginação da própria célula secretora. Tanto a célula secretora quanto a outra célula, que forma o canalículo condutor, possuem seus próprios revestimentos de cutícula (**ct**). No caso do canalículo coletor, o revestimento de cutícula não é contínuo e encontra-se localizado sobre microvilosidades (**mv**). Nos locais onde as microvilosidades se desprendem da cutícula, forma-se o espaço secretor (**es**). Na região de contato entre a membrana da célula secretora e da célula canalicular ocorrem junções septadas (**js**). As estruturas celulares representadas no esquema não encontram-se na mesma escala. (**B**) Micrografia do aparato terminal demonstrado no esquema, indicando o canalículo coletor (**cl**) e o canalículo condutor (**cd**). (**lu** - lúmen; **n** - núcleo; **nu** - nucléolo; **s** - vesícula de secreção).



FIGURA 2. Células secretoras das glândulas hipofaríngeas em vista geral. Note a concentração de vesículas de secreção (s) e a presença dos canalículos coletores (cl) e condutores (cd). (n - núcleo).



FIGURA 3. Célula secretora presente em glândula que não apresentou acúmulo de secreção. No citoplasma observa-se a presença dos canalículos coletores (**cl**). As mitocôndrias (**m**) apresentam-se regularmente distribuídas (**n** - núcleo; **nu** - nucléolo).



FIGURA 4. Detalhe dos núcleos (**n**) das células da glândula hipofaríngea. (**A**) Núcleo (**n**) com contorno irregular, mostrando invaginações em seu envoltório. (**B**) Detalhe de núcleo (**n**) com nucléolos (**nu**) bem desenvolvidos. (**s** - vesículas de secreção).



FIGURA 5. Detalhe de envoltório nuclear em corte tangencial, apresentado complexos-poro (p). (ci - citoplasma; n - núcleo).



FIGURA 6. Vesículas de secreção (s) ao redor dos canalículos coletores (cl). (A) Canalículo coletor com microvilosidades (mi) bem características, visto em corte longitudinal. Note a presença de algumas figuras mielínicas (fm) na região do espaço secretor (es). (B) Canalículos coletores em corte transversal, apresentando espaço secretor (es) desenvolvido.



FIGURA 7. Detalhe dos canalículos coletores. (**A**) Canalículo coletor (**cl**) sinuoso cortado longitudinalmente. (**B**) Detalhe de canalículo coletor com suas das duas camadas cuticulares. A camada mais eletrondensa constitui a epicutícula (**ep**). Abaixo desta, encontra-se uma camada mais esponjosa, voltada para o espaço secretor, que constitui a pró-cutícula (**pr**). Note que a epituctícula não é contínua. (**ct** - citícula; **es** - espaço secretor; **lu** - lúmen do canalículo; **mv** – microvilosidades; **s** – vesícula de secreção).



FIGURA 8. (**A**) Canalículo condutor (**cd**) apresentando camada de cutícula contínua e espessa. (**B**) Detalhe da figura **A** demonstrando a presença de junções septadas (**js**) no contato entre a célula canalicular e a célula secretora. O asterisco indica o citoplasma da célula canalicular. (**Iu** - lúmen do canalículo condutor; **s** - vesícula de secreção).



FIGURA 9. (A) Detalhe do retículo endoplasmático rugoso na periferia celular (**rer**). Retículo com estas características foi encontrado na maior parte das glândulas analisadas. (B) Retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido presente em células que não apresentaram vesículas de secreção (ver figura 3). (**iv** - invaginações da membrana plasmática; **m** - mitocôndria).



FIGURA 10. Detalhe de alguns ribossomos livres e um polirribossomo (seta) onde podem ser observadas as duas subunidades dos ribossomos.



FIGURA 11. Porção periférica da célula secretora demonstrando a presença de profundas invaginações (**iv**) da membrana plasmática e, externamente, a presença de lâmina basal (lb). Em **A**, a seta indica uma mitocôndria envolta por estrutura membranosa, constituindo um vacúolo autofágico em sua fase inicial. Em **B**, a seta indica um vacúolo digestivo. Note a grande quantidade de ribossomos livres (**m** - mitocôndria; **rer** - retículo endoplasmático rugoso).



FIGURA 12. (A) Detalhe do contato entre duas células secretoras. A seta indica as lâminas basais de ambas as células justapostas. Note que uma apresenta maior quantidade de retículo rugoso (rer) e a outra de ribossomos livres. (B) Região periférica de célula secretora apresentando vacúolos digestivos (setas). As setas brancas indicam dois vacúolos digestivos em estágio avançado e a seta preta indica um vacúolo autofágico com parte do retículo endoplasmático rugoso. (iv - invaginações da membrana plasmática; Ib - lâmina basal; rer - retículo endoplasmático rugoso).



FIGURA 13. (A) Célula secretora com presença de grandes vacúolos (va) no citoplasma. Note que alguns vacúolos apresentam características semelhantes á vesículas lipídicas, estando alguns presentes em invaginações do envoltório nuclear ou próximas a este. (B) Detalhe da figura anterior, mostrando um vacúolo (va) em contato com canalículo coletor através do espaço secretor (es). Note que a eletrondensidade do espaço secretor e a do vacúolo são semelhantes. Note ainda a presença de grande quantidade de vesículas de secreção (s) no citoplasma. (cd - canalículo condutor; fm - figura mielínica; n - núcleo; mv - microvilosidade).



FIGURA 14. Figura mielínica (**fm**) volumosa encontrada em uma das glândulas. Note as dimensões das vesículas de secreção (**s**) com relação à figura mielínica. Compare com as figuras mielínicas mostradas nas figuras 6 e 13B.



FIGURA 15. (A e B) Partes das estruturas cilíndricas (setas) encontradas no interior dos vacúolos (va) de uma celula glandular. (c - citoplasma).



FIGURA 16. Detalhe das estruturas cilíndricas (**setas**) mostradas na figura anterior. Note que algumas delas são mostradas em corte transversal enquanto outras encontram-se seccionadas obliquamente.



FIGURA 17. (A) A seta indica um grânulo de proteína encontrado em uma das glândulas analisadas. (B) Detalhe do grânulo de proteína. (rer - retículo endoplasmático rugoso).



FIGURA 18. Citoplasma de células submetidas à técnica de Ósmio Imidazol para a detecção de lipídios. (A) Célula com ausência de material lipídico, encontradas na maioria das vespas, mostrando, ainda, vacúolo sem reação à técnica. (B) Célula em vista geral mostrando pequenos pontos reação positiva para a técnica (setas) na região dos espaços secretores (es), próximos aos canalículos coletores (cl). (cd – canalículo condutor; **ci** – citoplasma; **m** – mitocôndria; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **s** – vesícula de secreção).



FIGURA 19. Detalhe de células submetidas à técnica de Ósmio Imidazol para a detecção de lipídios. (**A**) Gotas lipídicas com reação positiva para a técnica (setas) na região dos espaços secretores (**es**), próximos aos canalículos coletores (**cl**). (**B**) Gotas lipídicas (**Ip**) presentes na periferia celular de uma das vespas analisadas. Note a morfologia diferenciada do retículo endoplasmático (**re**), que, apesar da falta de contrastação, aparenta estar em transição de rugoso para liso. (**ci** – citoplasma; **m** – mitocôndria; **n** – núcleo; **s** – vesícula de secreção).



FIGURA 20. Células submetidas à técnica do Tetróxido de Ósmio para a detecção de complexos de Golgi. (**A**) Vista geral da célula com vesículas marcadas (setas) próximas à vesículas com morfologia típica de complexos de Golgi de insetos (*). Note que nesta técnica as vesículas de secreção (**s**) também foram marcadas e apresentam-se maiores do que as vesículas encontradas próximas ao Golgi (setas). (**B**) Detalhe dos complexos de Golgi (*) e das vesículas marcadas ao seu redor (setas). (**m** – mitocôndria; **va** – vacúolo).



FIGURA 21. Célula submetida à técnica de rotina mostrando as mesmas vesículas observadas na técnica do Tetróxido do Ósmio para detecção de complexos de Golgi. (**A**) Vista geral da célula mostrando a posição onde ocorrem as vesículas (seta). (**B**) Detalhe das vesículas eletron-densas. (**ci** – citoplasma; **cl** – canalículo coletor; **n** – núcleo; **nu** – nucléolo; **s** – vesícula de secreção).



FIGURA 22. Células submetidas à técnica de Prata Amoniacal para a detecção de proteínas básicas. (**A**) Vista geral da célula onde podem ser observadas pequenas pontuações escuras que correspondem aos locais de marcação da técnica. Note que a marcação ocorre tanto no núcleo (**n**) quanto no citoplasma (**ci**). (**B**) Detalhe do citoplasma mostrando que a marcação (setas) não ocorreu especificamente nas vesículas de secreção, sendo observadas muitas proteínas citosólicas básicas. (**es** – espaço secretor; **nu** – nucléolo; **s** – vesículas de secreção).



FIGURA 23. Células submetidas à técnica de Prata Amoniacal para a detecção de proteínas básicas. (A) Detalhe da periferia celular mostrando a ocorrência de proteínas citosólicas básicas (setas). (B) Detalhe da periferia do núcleo (n) mostrando reação positiva para proteínas presentes na heterocromatina e proteínas citosólicas (setas). (**ci** – citoplasma; **Ib** – lâmina basal; **m** - mitocôndria).



FIGURA 24. Células submetidas à técnica de p-Nitrofenilfosfato para a detecção de sítios de ocorrência de fosfatase ácida. (**A**) Vista geral de células submetidas à técnica onde nota-se a marcação diferenciada das porções celulares com algumas regiões mais elétron-densas (setas) e outras mais elétron-lúcidas. Note a presença de muitos lisossomos próximos à periferia celular. Note também a forte marcação do núcleo da célula secretora. (**B**) Detalhe do núcleo (**n**). Observe que os nucléolos (**nu**) não foram marcados.



FIGURA 25. Células submetidas à técnica de p-Nitrofenilfosfato para a detecção de sítios de ocorrência de fosfatase ácida. (A) Detalhe da região onde ocorrem as vesículas de secreção (s), onde podem ser observados alguns lisossomos (li) e, também, a ocorrência de fosfatase ácida extra-lisossomal (setas). (B) Detalhe da região periférica da célula mostrando a ocorrência de fosfatase ácida extra-lisossomal ocorrendo entre as cisternas do retículo endoplasmático rugoso (rer) e um lisossomo (li). (cd – canalículo condutor; m – mitocôndria).



FIGURA 26. Controle da técnica de p-Nitrofenilfosfato mostrando ausência de reação. (A) Detalhe do núcleo (n). (B) Detalhe do citoplasma na região onde ocorre o retículo endoplasmático rugoso (rer). (nu – nucléolo; s – vesículas de secreção).



FIGURA 27. Controle da técnica de p-Nitrofenilfosfato mostrando ausência de reação. (**A**) Vista geral do citoplasma (**ci**). (**B**) Detalhe do citoplasma na região onde ocorrem as veiculas de secreção (**s**). (**ci** – citoplasma; **es** – espaço secretor; **n** – núcleo; **s** – vesículas de secreção).



FIGURA 28. Técnica de Afzelius para a detecção de sítios de deposição de glicogênio. Note a ausência de reação positiva para a técnica. (**A**) Região do canalículo coletor (**cl**) onde se acumulam as vesículas de secreção (**s**). (**B**) Detalhe do citoplasma, mostrando a ausência de marcação. (ci – citoplasma; cl – canalículo coletor; es – espaço secretor; fm – figura mielínica; m – mitocôndria; rer – retículo endoplasmático rugoso; s – vesícula de secreção).

DISCUSSÃO

Apesar da anatomia das glândulas hipofaríngeas apresentarem grande diversidade entre as espécies de Hymenoptera, a morfologia das células secretoras e sua especialização na síntese de proteínas parece ser um padrão neste grupo. Baseando-se nas análises ultra-estruturais, a dinâmica do processo secretor das glândulas hipofaríngeas de P. veriscolor mostrou-se análoga a algumas espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973; CRUZ-LANDIM et al., 1986; COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000) e formigas (GAMA, 1985). As células secretoras são individualmente ligadas a dutos que conduzem a secreção até a placa hipofaríngea, correspondendo, segundo classificação de Noirot & Quennedey (1974), às glândulas exócrinas da classe III. As análises ultra-estruturais também revelaram que estas células possuem retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido e citoplasma com grande concentração de vesículas de secreção em volta dos canalículos coletores. Os núcleos possuem contornos irregulares, cromatina dispersa, nucléolos bem desenvolvidos e poucos e pequenos grânulos de heterocromatina.

Estudos com abelhas demonstraram que, após a emergência, o RER apresenta-se com aspecto vesicular e não são observadas vesículas de secreção ao redor do aparato terminal. No terceiro dia de vida adulta as vesículas de secreção aparecem e o aparato terminal apresenta microvilosidades bem desenvolvidas. Nesta fase o RER é parcialmente vesicular e parcialmente lamelar. O pico de produção, com o maior acúmulo de vesículas de secreção é observado entre o sexto e o nono dias de vida. Neste

período, as vesículas secretoras apresentam-se grandes com contorno irregular e eletrondensidade relativamente baixa, sendo estas correspondentes às vesículas que carregam a geléia real. A partir do nono dia começa ocorrer assincronismo no desenvolvimento das células secretoras, que podem estar produzindo diferentes tipos de secreção. Após o 18º dia, a concentração de secreção de geléia real é consideravelmente reduzida (KNECHT & KAATZ, 1990; DESEYN & BILLEN, 2005). Halberstad (1980) descreveu duas fases no ciclo secretor de Apis: produção de geléia real, seguida pela produção de enzimas digestivas. A produção de α -glicosidase, por exemplo, aumenta com a idade da abelha operária. Em abelhas de 18 dias, que estão exercendo atividades de forrageamento, são encontradas massas de secreção, mas estas são mais eletrondensas em comparação com as vesículas que contêm geléia real. O autor ainda sugere que a produção de enzimas digestivas continua ocorrendo mesmo após a degeneração parcial da glândula. Tipos diferentes de vesículas secretoras são claramente visualizados nas abelhas durante o inverno, quando as atividades de cuidado com as larvas não são realizadas ou diminuem drasticamente. Nestes casos, dois tipos de vesículas secretoras foram observados. O primeiro é idêntico ao apresentado no verão e é assumido como sendo a geléia real, entretanto, o segundo tipo apresenta-se como vesículas menores, mais eletrondensas e distribuídas aleatoriamente no citoplasma das células secretoras. Foi ainda proposto que ambas as secreções são estocadas até o verão, tendo como conseqüência a hipertrofia das células (DESEYN & BILLEN, 2005). Este último tipo de vesículas assemelha-se ao encontrado em P. versicolor e os autores atribuem uma provável função enzimática para elas. Além disto, a possibilidade destas vesículas possuírem conteúdo enzimático já foi mencionada em trabalhos prévios com as glândulas hipofaríngeas de Apis (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969).

As vesículas de secreção presentes nas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* apresentaram eletrondensidade desigual entre alguns indivíduos. Este fato pode ter ocorrido em decorrência de variações no processo de contrastação do material, já que algumas glândulas foram processadas separadamente. Nos casos onde a variação ocorreu dentro da mesma célula, acredita-se que as diferenças na eletrondensidade possam estar relacionadas com distintos estágios de maturação da secreção. Esta hipótese se baseia no fato de que, mesmo com a variação na eletrondensidade, as vesículas mantêm as mesmas características morfológicas. Assim, aparentemente, as
vesículas ficam mais eletrondensas à medida que vão amadurecendo. Este processo denota a ocorrência de um mecanismo de reabsorção de substâncias específicas e/ou de água das vesículas.

Trabalhos com outras espécies de Hymenoptera também evidenciaram variações relacionadas ao tipo de secreção produzida pelas glândulas hipofaríngeas. Em *Camponotus (Myrmotryx) rufipes* a secreção apresenta-se amorfa na maioria dos casos, entretanto, às vezes, um material filamentoso surge formando feixes irregulares. Para esta espécie não fica claro se ocorrem dois tipos diferentes de secreção ou se são apenas dois estados diferentes da mesma (GAMA, 1985). Variações significativas quanto ao tipo de secreção foram encontradas em *Scaptotrigona postica*, onde três tipos de vesículas foram encontrados nas células. Um dos tipos de vesículas, que apresentou secreção de característica mucosa, foi a mais abundante e a que mais se acumulava ao redor dos canalículos coletores. Estes aspectos encontrados nas glândulas hipofaríngeas sugerem que estas podem ter outras funções além da produção de alimento para os imaturos. No caso de *P. versicolor* é provável que a função das glândulas hipofaríngeas possa estar associada com outras características que não a alimentação das larvas, devido à morfologia apresentada pelas vesículas de secreção.

Outra característica constatada nas vesículas de secreção é que as mesmas foram previamente coradas com técnicas histológicas para a detecção de proteínas básicas, porém, em nível ultra-estrutural, com a técnica da Prata Amoniacal, o mesmo não ocorreu. Sabe-se que esta técnica marca proteínas básicas tanto do citoplasma quanto do núcleo (histonas). No presente estudo a marcação destas duas regiões ocorreu, porém, de forma inespecífica. Entretanto, a maior afinidade desta técnica se dá com proteínas básicas que sejam ricas em arginina (MACRAE & MEETZ, 1970), mostrando apenas que na secreção das glândulas hipofaríngeas este aminoácido não está presente de forma significativa. Alguns estudos mostram que, no organismo humano, a arginina é um aminoácido muito importante na liberação de hormônios de crescimento, no aumento da imunidade, aumento da massa muscular e em processos de desintoxicação (BRAVERMAN *et al.*, 1997; COLGAN, 1993). Além disto, também foram encontradas referências de estudos que consideram este aminoácido como chave para a eficiência muscular devido seu papel no transporte, estocagem e eliminação do nitrogênio (COLGAN, 1993). Uma possibilidade para a marcação das proteínas citoplasmáticas

descrita pelos últimos autores seria a da produção das novas histonas ricas em arginina. A síntese citoplasmática de novas histonas foi reportada em cultura de células HeLa, sendo que esta atividade foi contínua mesmo na ausência de síntese de DNA (ROBBINS & BORUN, 1967). Entretanto, além das histonas, MacRae & Meetz (1970) também indicam que a técnica marca outras proteínas ricas em arginina, o que não foi o caso da secreção das glândulas das vespas aqui estudadas.

A variação na concentração de secreção encontrada nas glândulas destas vespas pode ser considerada como um fato que está de acordo com suas características comportamentais, já que estas vespas não apresentam especialização em alguma atividade determinada como as abelhas. Nestes últimos, os hábitos comportamentais bem definidos de indivíduos da mesma faixa etária e o tempo relativamente prolongado com que eles realizam cada atividade, auxiliam a determinação da função das glândulas hipofaríngeas como produtoras de alimento para as larvas (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969). Entretanto, como *P. versicolor* apresenta características comportamentais muito distintas das abelhas sociais, a relação do desenvolvimento glandular com de idade também não foi observada (BRITTO & CAETANO, 2005; ver Capítulo 1).

Com relação ao retículo endoplasmático rugoso, a maior parte das vespas analisadas apresentou-o de forma lamelar, sendo que estas glândulas sempre possuíam vesículas de secreção em seu citoplasma. No entanto, em uma das vespas, que não apresentou acúmulo de secreção, o retículo estava pouco desenvolvido. Como já mencionado para *Apis* (KNECHT & KAATZ, 1990; DESEYN & BILLEN, 2005), alterações morfológicas nesta organela ao longo da idade também foram observadas em *Melipona* (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986). No início, quando a glândula ainda não apresenta acúmulos de secreção em seu citoplasma, o retículo rugoso é pouco desenvolvido e possui forma mais vesicular, assumindo o aspecto lamelar com o passar do tempo. De qualquer forma, em *P. versicolor* o retículo endoplasmático rugoso mostrou-se como uma organela bem desenvolvida, sendo que esta característica confirma a importância destas glândulas na produção de substâncias protéicas.

Assim como foi proposto para as abelhas (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986), foi estudada a possibilidade de que a secreção presente nas células glandulares seja produzida em nível de retículo endoplasmático rugoso. Poucos trabalhos relatam a

presença de complexo de Golgi glândulas hipofaríngeas e, quando presentes, aparecem em pequena quantidade e assumem a forma vesicular (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; GAMA, 1985). No presente estudo, as análises citoquímicas mostraram a presença de estruturas que provavelmente constituam os complexos de Golgi das glândulas hipofaríngeas. Os complexos de Golgi observados nas glândulas de *P. versicolor* também são constituídos por estruturas vesiculares. Além disto, constatou-se que nas células onde foram encontradas, estas organelas apresentavam-se rodeadas por vesículas elétron-densas. Estas vesículas são menores e morfologicamente distintas das vesículas de secreção. Porém, mais estudos serão necessários para se determinar se estas vesículas se amadurecem para posteriormente formar a secreção ou se elas se elas seguem outro caminho. Na segunda hipótese, estas vesículas poderiam dar origem a estruturas como lisossomos ou, ainda, a outros componentes que farão parte da constituição celular. Entretanto, a presença do Golgi nas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não foi muito freqüente, e provavelmente, esta organela pode estar mascarada pelo excesso de vesículas de secreção.

Alguns estudos também sugerem que, com a ausência da atuação do Golgi nas vesículas de secreção, alterações pós-traducionais possam ser realizadas pelas microvilosidades presentes ao redor dos canalículos coletores. Assim, além de aumentar a superfície de troca entre o citoplasma e o espaço secretor, estas atuariam em alterações nas moléculas de secreção pela reabsorção de alguns de seus componentes (COSTA & CRUZ-LANDIM, 2000). Outros autores ressaltam a importância de reações extracelulares. Noirot & Quennedy (1974) sugerem que a ocorrência de regiões como os espaços secretores (que são topologicamente extracelulares) podem constituir uma boa adaptação para células que produzem substâncias tóxicas, por exemplo. Assim, as organelas celulares poderiam elaborar e secretar precursores não tóxicos, em suas formas zimogênicas que, posteriormente, alcançariam a forma do produto final apenas quando chegassem ao exterior das células. Esta característica pode estar totalmente de acordo com hipótese das glândulas hipofaríngeas de P. versicolor estarem produzindo enzimas digestivas. Além disto, as vesículas presentes no interior das células secretoras destas vespas assumem características de grânulos zimogênicos, que ocorrem normalmente em células pancreáticas de vertebrados e são constituídos de precursores de enzimas digestivas que somente serão ativadas em seu sítio de atuação

(JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1971). Devido ao local de desembocadura da secreção das glândulas hipofaríngeas (que ocorre na cavidade bucal) e aos hábitos alimentares destes insetos (que são predadores), a maturação de enzimas digestivas ocorrendo apenas após sua saída da célula secretora é completamente viável. Em geral os estudos com enzimas digestivas de diversas espécies de insetos relatam que estas são mais comumente produzidas de forma direta, não ocorrendo uma forma zimogênica inativa (TERRA & FERREIRA, 1994). Outros autores relatam a ocorrência de enzimas em sua forma precursora não ativa em *Aedes aegypti* (GRAF *et al.*, 1986). De qualquer forma, estudos neste aspecto, com as glândulas hipofaríngeas de Hymenoptera predadores, não foram realizados até o momento.

Os canalículos coletores, que podem ser designados como canalículos intracelulares, são, na realidade, extracelulares, já que estão delimitados pela membrana plasmática da própria célula secretora. Esta característica dos canalículos coletores já foi amplamente discutida para as glândulas exócrinas de insetos (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969, NOIROT & QUENNEDEY, 1974; KNECHT & KAATZ, 1990). Em geral, nesta região, a membrana da célula secretora apresenta-se composta por microvilosidades. Durante a exocitose, logo após atravessar as microvilosidades, a secreção é primeiramente enviada para o espaço secretor, antes de atingir o lúmen do canalículo coletor. O espaço secretor, por sua vez, pode ser considerado um reservatório celular. Knecht & Kaatz (1990) já haviam descrito o espaço secretor das glândulas hipofaríngeas de Apis mellifera como um tipo de reservatório. Além disto, os mesmos autores descreveram a ocorrência de variação nas dimensões deste espaço nas diferentes fases de desenvolvimento das abelhas operárias. Segundo eles, durante o desenvolvimento, a parte cuticular e o lúmen delimitado por esta cutícula permanecem com as mesmas características durante toda a vida da abelha. Entretanto, o volume do espaço secretor vai gradualmente se alterando. Logo após a emergência, as abelhas possuem apenas um pequeno espaço entre a cutícula e a membrana da célula secretora, não havendo presença de secreção nesta região. Deseyn & Billen (2005) descrevem ainda que nesta fase o aparato terminal das células secretoras não apresenta microvilosidades bem definidas. Com o passar dos dias o espaço secretor vai sendo preenchido com os produtos da secreção, alcançando o tamanho máximo no oitavo dia. Este volume persiste até a abelha iniciar a fase forrageira, na qual o espaço secretor

começa a se encolher gradualmente, até sobrar apenas um pequeno espaço. Os autores também discutem que as alterações em volume dos espaços secretores é o fator primário a determinar as alterações de volume nas glândulas hipofaríngeas das abelhas.

Por meio de técnicas histológicas, os capítulos anteriores mostraram, em P. versicolor, a presença de algumas glândulas com inúmeros vacúolos presentes no citoplasma. As análises em microscópio eletrônico mostraram que estes vacúolos são formados pela dilatação dos espaços secretores, sendo as mesmas estruturas encontradas nas glândulas hipofaríngeas de Apis mellifara (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969). Em alguns casos, ainda, os vacúolos podem ser confundidos com reservas de material lipídico, porém, as análises citoquímicas demonstraram que não seria este o caso, já que estas estruturas tiveram reação negativa para a técnica de Ósmio Imidazol. Levando-se em consideração que as glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não apresentaram um reservatório propriamente dito, pode-se concluir que, nos casos onde os vacúolos estavam presentes, as glândulas estavam ativas devido à presença das vesículas de secreção. Entretanto, a formação dos vacúolos sugere que o ritmo com que a secreção estava sendo sintetizada era superior à freqüência de utilização destas substâncias. Deste modo ocorreria a dilatação dos espaços secretores que atuariam armazenando esta secreção. Entre as vespas que apresentaram glândulas com estas características, uma delas era o macho. Em determinados casos os machos não são muito ativos nas colônias de vespas sociais, entretanto, Giannotti (2002) observou em Polistes lanio lanio que estes indivíduos permanecem, em média, apenas 10,5 dias no ninho e que neste período eles se integram à vida social da colônia e passam a desempenhar determinadas tarefas, inclusive aquelas que envolvem contato com as larvas. Em Polistes fuscatus (HUNT & NOONAN, 1979) e Polistes ferreri (SINZATO et al., 2003) observou-se que os machos também apresentaram comportamentos típicos de fêmeas. Em Scaptotrigona postica foi ainda observado que, os padrões eletroforéticos e a ocorrência de enzimas nos extratos glandulares de machos mostraram vários pontos de semelhança com as operárias, sugerindo função semelhante entre machos e fêmeas (COSTA, 2002). Assim, como nas outras vespas onde os vacúolos estavam presentes, nos machos também foram encontradas vesículas de secreção em grande quantidade, mostrando que suas glândulas realmente estavam ativas, e o seu produto estava sendo acumulado no espaço secretor.

Assim, constatou-se que a presença dos vacúolos, por si só, pode não estar relacionada com a ocorrência de algum evento de morte celular nestas vespas. As glândulas inativas poderiam apresentar seus vacúolos, mas, logo que as atividades relacionadas com a utilização da secreção glandular voltassem a ocorrer, os vacúolos poderiam diminuir gradualmente. Além disto, outras características, como presença de vacúolos digestivos, foram observadas apenas em quantidades moderadas. Também foram evidenciadas algumas estruturas com características de vacúolo autofágico, entretanto, a baixa concentração destas indica que elas devem estar envolvidas apenas com o metabolismo normal da célula, não apresentando características de morte celular. Apesar disto, admite-se que, nos casos onde ocorre a vacuolização mais intensa do citoplasma, as glândulas poderiam entrar em um estágio de atrofia que as levaria a um processo de degeneração. Porém, dentre as glândulas que apresentaram vacúolos, foram observadas organelas estruturalmente íntegras, sem indícios de alteração.

Dentro dos vacúolos ou dos espaços secretores não dilatados são observadas algumas figuras mielínicas. Porém, um dos indivíduos apresentou uma figura mielínica bem mais extensa, o que pode ser um indício de alta atividade de síntese já realizada por parte desta glândula. Estruturas similares já foram observadas em glândulas hipofaríngeas de *Melípona* em sua fase forrageira, sendo estas consideradas como estruturas degenerativas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973). No entanto, em *Polistes* observou-se que, apesar da presença desta estrutura, as vesículas de secreção ainda se acumulavam no citoplasma, evidenciando que estas glândulas não estavam sofrendo algum processo degenerativo naquele momento.

Observou-se também, no vacúolo de uma das glândulas, a presença de estruturas cilíndricas ocas com características de membrana. Uma das hipóteses seria de que estas estruturas seriam microvilosidades. Apesar de somente terem sido observadas no vacúolo de apenas um indivíduo, estas "microvilosidades" poderiam ser consideradas comuns nos espaços secretores, pois, como foi constatado que os vacúolos são apenas regiões mais dilatadas dos espaços secretores, a presença de microvilosidades ao seu interior pode ser considerada uma característica normal. Microvilosidades já foram previamente observadas nos espaços secretores dilatados de glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969). Outra hipótese é a de que estas

estruturas seriam algum tipo de produto das células secretoras, porém nada com as mesmas características foi encontrado na literatura.

Como já discutido nos capítulos anteriores, a ausência de reação positiva para as técnicas de detecção de material lipídico indicou que as glândulas de P. versicolor podem não estar envolvidas, por exemplo, com a produção de substâncias como os feromônios (BILLEN & MORGAN, 1998). No entanto, em uma das glândulas submetidas às análises ultra-estruturais foi observada a presença de pequenos acúmulos lipídicos localizados nas porções periféricas do citoplasma e, também, no interior dos espaços secretores. A quantidade de material lipídico foi pequena, mas pôde ser claramente evidenciada pela técnica de Ósmio-Imidazol. Além disto, na região do citoplasma onde as gotas foram encontradas, observou-se a morfologia diferenciada do retículo endoplasmático. Neste local, o retículo estava, aparentemente, em fase de transição da forma rugosa para a forma lisa, já que o mesmo apresentou-se em uma forma intermediária entre a lamelar e a tubular. A forma tubular de retículo é típica das células que produzem material de natureza lipídica. Além disto, a ocorrência desta organela nesta forma, bem como das gotas lipídicas na mesma região, indica que talvez as glândulas hipofaríngeas de P. versicolor pudessem estar produzindo este material para seu próprio uso, mesmo porque a quantidade destas vesículas não foi tão grande. Entretanto, a ocorrência de reação positiva no interior dos espaços secretores é um indício de que pequenas quantidades deste material poderiam ser misturadas à secreção. Convém lembrar que, na glândula deste espécime, o citoplasma mostrou a ocorrência de muitas vesículas de secreção, indicando que sua atividade metabólica estava alta.

Nas análises histológicas foi evidenciada reação fortemente positiva para a enzima fosfatase ácida (vide Capítulos 1 e 2) e, assim, foi esperada grande concentração de lisossomos nas análises ultra-estruturais. A técnica de detecção de fosfatase ácida foi utilizada para a identificação destas organelas e estas foram encontradas em quantidades significativas dentro das células secretoras. Entretanto, observou-se que, em todas as vespas, a fosfatase ácida também estava fortemente presente em sua forma extra-lisossomal. Em geral a presença desta enzima fora dos lisossomos pode ser considerada como um indicativo de morte celular (BOWEN *et al.*, 1982; BOWEN & BOWEN, 1990; SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000), porém, seria difícil afirmar que em todos os indivíduos estudados e, além disto, em todas as células presentes nas glândulas,

estivesse ocorrendo morte celular. A princípio, acreditou-se que a forte marcação observada nas células pudesse estar mais relacionada com a formação de artefatos, entretanto, analisando-se o material processado em histologia em dois procedimentos distintos para a detecção da enzima (Fig. 10 do Capítulo 1 e Fig. 5 do Capítulo 2) ficou claro que as glândulas hipofaríngeas de P. versicolor realmente possuem células que carregam grandes quantidades desta enzima. Entretanto, se realmente a fosfatase ocorre em quantidades tão altas fora dos lisossomos e não está envolvida com os processos de morte celular, permanecem diversas dúvidas sobre este tipo de "estratégia" utilizada pela célula. Este seria um mecanismo muito arriscado de armazenar esta enzima, mesmo que seja para atuar no próprio metabolismo celular. Desta forma, uma das únicas maneiras da fosfatase não danificar a célula, seria pela rigorosa manutenção do pH citoplasmático o qual deveria estar diferente do pH ótimo para a atuação da enzima. Porém, mesmo nestas condições esta seria uma estratégia totalmente atípica. Costa & Cruz-Landim (2001a) e Costa (2002b) observaram a atividade da enzima fosfatase ácida nas glândulas hipofaríngeas de S. postica com o uso de diferentes substratos. Embora a atividade encontrada nestas glândulas não tenha sido tão intensa como nas glândulas de P. versicolor, os autores sugerem que fosfatases de diferentes tipos provavelmente estejam agindo nestas células glandulares em quase todas as funções das organelas e não somente na autofagia degenerativa que ocorre no final do ciclo glandular destas abelhas. Os autores também sugerem que a alta atividade da enzima fosfatase ácida está, aparentemente, relacionada com a alta síntese de proteínas que ocorre nas células secretoras. Neste caso as fosfatases estariam relacionadas com os processos de maturação da secreção e, também, com o turnover das organelas citoplasmáticas que deve ser intensificado devido ao grande desgaste que ocorre devido à alta atividade celular.

Pelas técnicas de citoquímica ultra-estrutural, também foi constatada a presença de fosfatase ácida nos núcleos das glândulas hipofaríngeas. O mesmo fato já foi observado em diversos trabalhos que utilizaram técnicas citoquímicas para detecção desta enzima (LOVE *et al.*, 1969; DELTOUR *et al.*, 1981; CRUZ-LANDIM *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2006). Entretanto, as outras duas técnicas histológicas previamente realizadas não demonstraram o mesmo resultado. De qualquer forma, os controles realizados nas técnicas citoquímicas demonstraram que esta enzima pode, realmente,

estar localizada nos núcleos das glândulas hipofaríngeas. O porquê da ocorrência desta enzima no núcleo e seus mecanismos de atuação ainda não são claros, mas, nos trabalhos onde foi observado este tipo de marcação, os autores discutem que a fosfatase ácida nuclear atuaria em dois tipos distintos de processos. O primeiro estaria relacionado com a degeneração da célula que ocorre durante a morte celular. Assim a enzima poderia hidrolisar proteínas da matriz nuclear ou mesmo estar envolvida nos processos finais de degradação do DNA. Entretanto, a ocorrência de marcação positiva em todas as glândulas de *P. versicolor* analisadas mostra que não seria este o caso desta espécie. Na segunda hipótese a fosfatase poderia estar envolvida com os próprios processos fisiológicos da célula. Deltour et al. (1981) observaram que os níveis de atividade metabólica de embriões de Zea mays estavam diretamente relacionados com a concentração de fosfatases encontradas no núcleo. Segundo este autor, quando a transcrição ocorre, pirofosfatos são liberados dos nucleotídeos trifosfatados e são incorporados às moléculas de RNA em ascensão. Foi observado que a concentração de fosfato inorgânico é proporcional à taxa de transcrição e, além disto, também é proporcional à concentração da fosfatase ácida. Entretanto, o autor não descarta a importância dos fosfatos inorgânicos advindos do citosol e mesmo de fora da célula. Portanto, se realmente a marcação observada nas glândulas hipofaríngeas for resultado da presença da enzima fosfatase ácida e não de marcação inespecífica ou artefato da técnica, a enzima localizada no interior do núcleo estaria mais relacionada com o metabolismo das células do que com processos de morte celular.

Entre os indicativos de alta atividade de síntese presente nas glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*, a morfologia das organelas celulares também evidencia esta característica. Os núcleos, grandes e irregulares, com cromatina dispersa em sua maior parte e grande concentração de complexos poro é um indício da alta síntese de RNA. Além disto, os nucléolos bem desenvolvidos demonstram a alta produção de ribossomos, o que também pode ser observado pela alta concentração destas estruturas em todo o citoplasma. Estes estão presentes tanto aderidos ao retículo endoplasmático quanto dispersos. Outro indicativo da alta atividade de síntese celular nas glândulas de *P. versicolor* é o grande número de invaginações encontradas na membrana plasmática, sugerindo alta taxa de importação de material da hemolinfa. As invaginações estão presentes em todas as porções da membrana penetrando até regiões relativamente

profundas. Associadas às invaginações encontram-se muitas mitocôndrias, provavelmente atuando no fornecimento de energia para transporte das substâncias através da membrana, o que reforça a hipótese da importação de material da hemolinfa.

A alta taxa de transferência entre a hemolinfa e o citoplasma das glândulas hipofaríngeas também poderia ser indiretamente inferido devido à ausência de marcação para a técnica de detecção de glicogênio. Como a grande concentração de vesículas de secreção é um indício de alta síntese protéica, aparentemente, a fonte de energia para o funcionamento da célula parece não se acumular no citoplasma (em forma de reservas de glicogênio) e, portanto, a glicose deve ser constantemente importada da hemolinfa para o funcionamento celular.

A presença de junções septadas observadas entre os canalículos e a membrana plasmática da célula secretora em algumas regiões pode estar relacionada a outros aspectos além de evitar a rota para-celular de secreção. Costa-Leonardo (1981) sugere que em *Apis mellifera* as junções septadas também auxiliam no ancoramento das células secretoras nas células canaliculares, porém, Caetano (comunicação pessoal) acredita apenas na função de isolamento.

Com relação ao grande grânulo de proteína encontrado em uma das células, em trabalhos com larvas da formiga *Pachycondyla* (*=Neoponera*) *villosa*, Zara *et al.* (2003) mostraram estruturas com características semelhantes presentes no corpo gorduroso. Nesta formiga os grânulos acumulados em células do corpo gorduroso são constituídos de aminoácidos básicos capturados da hemolinfa e atuariam como material de reserva. Os autores sugerem que esta reserva poderia ser utilizada na reconstrução dos tecidos durante a metamorfose ou na esclerotização da cutícula do adulto. Entretanto, o grânulo encontrado em *P. versicolor* estava presente apenas em uma célula secretora de um único indivíduo, não sendo possível fazer maiores inferências sobre seu papel.

Em *Mellipona quadrifasciata anthidioides* as glândulas hipofaríngeas sofrem mudanças ao longo da vida dessas abelhas que refletem um ciclo secretor único. Este ciclo é resultado dos papéis desempenhados pelas abelhas na colônia que, em princípio, possuem glândulas inativas após a emergência, iniciando seu desenvolvimento logo após o começo das atividades de cuidado com a cria e, por fim, entram na fase póssecretora assim que iniciam as atividades de forrageamento (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986). Em insetos sociais como *Polistes*, onde

a divisão de trabalho não é tão definida, de modo que os indivíduos não seguem uma regra fixa e pré-determinada (REEVE, 1991), estabelecer um papel para as glândulas hipofaríngeas se torna uma tarefa mais complexa. Deste modo, não foi observado um ciclo secretor preciso e definido para as glândulas hipofaríngeas destes insetos, sendo apenas descritos os principais aspectos da organização das células secretoras destas glândulas.

Provavelmente, a função de produção de alimento para larvas, desempenhada pelas glândulas de abelhas, possa ser uma característica mais derivada (apomórfica), visto que grande parte dos Hymenoptera são predadores e, portanto, necessitam de enzimas digestivas para processar os alimentos ingeridos. Neste caso, de acordo com as características das vesículas de secreção presentes nas glândulas de P. versicolor, o mais provável é que, nesta espécie, as glândulas ainda tenham como principal papel, a produção de enzimas, aqui considerada como uma função ancestral (plesiomórfica). No entanto, as variadas características anatômicas apresentadas pelas glândulas hipofaríngeas de diversas espécies demonstram uma grande plasticidade destas estruturas, que provavelmente, possam ter evoluído nas espécies mais derivadas, para produção de outros tipos de secreção. Além disto, mesmo nestas espécies derivadas, a função primordial das glândulas hipofaríngeas não parece se ter perdido. Maurizio (1959) demonstrou que nas abelhas forrageiras mais velhas, onde as glândulas hipofaríngeas já estão em pleno processo de deteriorização, ocorre o pico de produção de enzimas digestivas e, além disto, mesmo nas glândulas que estão em franca produção de geléia real, alguma produção de enzimas digestivas também pode ser observada.

O surgimento e a evolução da divisão de castas devem ter sido guiados por forças conflitantes que promoveram a eficiência da especialização de um lado e, do outro, a flexibilidade para se adequar às variações ambientais (ENGELS, 1990). Em *P. versicolor* a flexibilidade das glândulas hipofaríngeas deve ser um fator fundamental visto que nesta espécie o custo da especialização em determinadas atividades poderia não ser vantajoso para a colônia. Portanto, a especialização destas glândulas para uma função particularizada e puramente social, assim como ocorre nas abelhas, parece não ser provável. O mais viável seria que estas estruturas devam estar envolvidas com processos digestivos, tanto por suas características ultra-estruturais quanto pelos hábitos comportamentais da espécie.

A Relação do Desenvolvimento das Glândulas Hipofaríngeas com o Comportamento de *Polistes versicolor*

CAPÍTULO 4

RESUMO

O presente estudo mostrou, por meio de técnicas histoquímicas, em conjunto com análises comportamentais, a relação das glândulas hipofaríngeas de Polistes versicolor com as atividades realizadas pelas vespas. As principais variações encontradas nas glândulas hipofaríngeas ocorreram com relação à concentração de secreção e ao diâmetro das células secretoras. Algumas glândulas com características degenerativas também foram relacionadas com as atividades das vespas. O desenvolvimento glandular não mostrou relação específica com nenhum comportamento particular, podendo não estar relacionado à nenhuma função social. Entretanto as análises realizadas nos diferentes ninhos indicaram que a maior média de desenvolvimento glandular foi observada no ninho mais produtivo.

ABSTRACT

The present study showed, through histochemical techniques and behavioral analyses, the relationship between the hypopharyngeal glands and the activities performed by individuals of some colonies of *Polistes versicolor*. The main variations found in the hypopharyngeal glands are associated to the secretion concentration and the diameter of secretory cells. The glandular development has no specific relationship with any particular behavior and was not related to any social function. However, the analyses performed using different colonies indicated that glandular development was highest in the most productive nest.

INTRODUÇÃO

Na grande maioria das espécies de Hymenoptera, uma atribuição à função das glândulas hipofaríngeas só pode ser feita por inferências indiretas, relacionando sua morfologia e seu grau de desenvolvimento com as atividades dos indivíduos, com as características comportamentais e, ainda, por analogia com *Apis mellifera*, onde seu papel está estabelecido com relativa segurança (COSTA, 2002).

Nas espécies de abelha onde as glândulas estão bem estudadas, a secreção produzida representa um importante componente do processo de diferenciação de castas, onde, na fase larval, apenas indivíduos que se tornarão rainhas recebem continuamente esta secreção. Em *Apis*, esta é denominada de geléia real (DIXON & SHUEL, 1963) e sua produção ocorre nas glândulas de operárias que têm de 3 a 18 dias de idade (FREE, 1980). A eficácia das glândulas hipofaríngeas nesta atividade requer alimentação rica em pólen (CRAILSHEIM & STOLBERG, 1989). Sucedendo a atividade nutridora, as operárias iniciam o forrageamento, sendo, nesta fase, denominadas forrageiras. Durante esta atividade, as abelhas operárias realizam vôos constantes para a coleta de alimento, suprimindo o consumo de pólen e substituindo-o por mel, que é um alimento mais energético. Esta mudança coincide com a acentuada redução das glândulas hipofaríngeas (CRUZ-LANDIM & SILVA DE MORAES, 1973; SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000) e com a marcante produção de enzimas digestivas, como a invertase (SIMPSON *et al.*, 1968). Portanto, no decorrer da vida de uma abelha adulta, as glândulas hipofaríngeas sofrem alterações morfológicas de acordo

com os estágios da vida desses animais, evidenciando um ciclo secretor (CRUZ-LANDIM et al., 1986).

Em formigas, a função desta glândula não é conhecida, entretanto, há a possibilidade de que sua secreção possa ser ingerida com o alimento, servindo na digestão, ou então, possa ser regurgitada para alimentar outros indivíduos da colônia (GAMA, 1985; AMARAL & CAETANO, 2005).

As únicas evidências presentes, com relação à função das glândulas hipofaríngeas, são apenas encontradas, como já mencionado, em grupos com hierarquia altamente organizada como as abelhas sociais, que possuem divisão de casta e de trabalho bem definidas e pré-estabelecidas (SZOLDERTZ & CRAILSHEIM, 1993).

Dentre os Vespidae, o gênero *Polistes* tem atraído a atenção de pesquisadores, por ser tido como "gênero chave" para o entendimento da evolução dos insetos sociais, tanto pelo fato de ocupar uma larga faixa de áreas climáticas, quanto pela à existência de apenas uma leve diferença entre castas, comprovando o estágio primitivo na evolução da organização social (EVANS, 1958). Cumber (1951) relata que, em diversas espécies de *Polistes* e *Mischocyttarus*, não há diferença morfológica ou variação de cor significativas.

A hierarquia, nos ninhos desta espécie, ocorre de forma linear e é estabelecida pela dominação física e pela utilização de oofagia e larvifagia diferenciais, onde as vespas distinguem sua cria das demais e ingerem os descendentes da concorrente (PARDI, 1948). Esse processo faz com que uma das fêmeas se torne dominante (PARDI, 1948; GOBBI, 1977). Entretanto, no decorrer do ciclo de vida de uma colônia, a hierarquia pode ser abalada pelo aparecimento dos indivíduos reprodutores ou pelo aumento populacional (GOBBI, 1977).

Além disso, a divisão das tarefas na colônia também não acompanha um padrão restrito (ZARA & BALESTIERI, 2000; GIANNOTTI, 2002), de modo que a observação individual das vespas passa a ser o único meio para se agrupar os indivíduos por categoria comportamental. As principais atividades realizadas em uma colônia de *Polistes* são as atividades de forrageamento, alimentação de imaturos, inspeção e manutenção do ninho, atividades de dominância e subordinação, e alguns outros comportamentos relevantes pela sua freqüência, como, por exemplo, permanecer imóvel no ninho (GIANNOTTI, 2001). Essas características somente podem ser determinadas

pelo fato dos ninhos de *Polistes* serem abertos, o que possibilita a observação das suas atividades.

Poucos estudos relacionados com a morfologia das glândulas hipofaríngeas são encontrados para *P. versicolor*. Nesta espécie a glândula é constituída por células secretoras esféricas e individuais ligadas por canalículos diretamente à placa hipofaríngea (CRUZ-LANDIM & SAENZ, 1972; BRITTO *et al.*, 2004). Este padrão as tornam distintas de abelhas eussociais e algumas espécies de formigas mais derivadas, cujas glândulas possuem um duto excretor único, ao qual estão ligadas todas as unidades secretoras, que podem ser uni ou pluricelulares (CRUZ-LANDIM, 1967; GAMA, 1985). Assim, anatomicamente, as glândulas de *P. versicolor* encontram-se em um estágio mais primitivo, mas não há evidências de outros estudos que estejam relacionados com a função destas estruturas.

Considerando que na biologia dos insetos sociais o desenvolvimento de um programa de trabalho é acompanhado por mudanças fisiológicas importantes, relacionadas com a idade e o comportamento dos indivíduos, e que estas são acompanhadas por alterações funcionais de glândulas exócrinas, o estudo destas estruturas, praticamente inexistentes em vespas, representa uma excelente contribuição para a melhor compreensão da biologia destes insetos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos determinar em quais situações comportamentais ocorre o desenvolvimento glandular. Para isso, foram analisados os comportamentos das vespas de diferentes ninhos, na tentativa de melhor conhecer sua organização hierárquica. Em seguida, foram determinados os principais papeis de cada indivíduo, para que suas características particulares pudessem ser relacionadas com o desenvolvimento glandular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Observação das colônias

Foram estudadas três colônias em fase de pós-emergência, sendo uma observada entre os meses de fevereiro e abril de 2003, e as outras duas no mês de janeiro de 2004. As colônias foram, respectivamente, denominadas de N1, N2 e N3. A colônia N1 foi observada por 40 horas e as colônias N2 e N3 por 35 horas cada.

Cerca 45 dias antes das observações (tanto em 2003 quanto em 2004), vespas recém emergidas foram diariamente coletadas para marcação. Após serem coletados os espécimes foram transportados para o laboratório, onde foram anestesiados rapidamente sob baixa temperatura. Em seguida, estes foram marcados com tinta de aeromodelismo Testors, na região centro-dorsal do tórax, para a identificação individual (Apêndice 1). Dando prosseguimento, os espécimes foram mantidos em recipientes individuais até a completa secagem da tinta e, posteriormente, reintroduzidos em suas respectivas colônias. Este procedimento foi efetuado para que espécimes de diferentes idades estivessem presentes nos ninhos no início das observações. O mesmo procedimento também foi realizado durante as observações todas as vezes que novas vespas emergiam nos ninhos.

As observações no ninho N1 foram realizadas por cerca de sete dias intercalados, por mês. As anotações foram coletadas em turnos de 2 horas por dia de observação. Já os ninhos N2 e N3 foram analisados por cinco dias consecutivos, cada um, em turnos de 7 horas diárias. Assim, as observações em N1 corresponderam aos

atos comportamentais da colônia durante boa parte do seu ciclo de pós-emergência. Já as observações feitas em N2 e N3, que também estavam em pós-emergência, foram consideradas mais pontuais, determinando apenas as características comportamentais momentâneas das colônias (determinado em 5 dias).

Com todos os espécimes devidamente marcados, iniciaram-se as atividades de análise comportamental. Tendo como base os trabalhos de Zara & Balestieri (2000) e Giannotti (2001), foi estabelecido um repertório comportamental no qual as atividades de cada indivíduo foram registradas a cada 5 minutos (Apêndice 2).

Para a análise dos resultados, as atividades consideradas mais relevantes para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas foram agrupadas em outra tabela, onde foram levadas em conta as atividades de forrageamento, trofaláxis adulto-adulto, receber e/ou mastigar presa, trofaláxis larva-adulto, alimentar larva, construção, aplicação de secreção no ninho, comportamento de dominância, comportamento de subordinação e permanecer imóvel no ninho.

O comportamento trofaláxis adulto-adulto consistiu na transferência de alimento regurgitado (néctar ou exudatos) entre adultos. Já em trofaláxis larva-adulto, somente foi levado em consideração o oferecimento de saliva larval para os adultos, sendo observado quando a vespa inseria sua cabeça em uma célula e lá permanecia por mais de 10 segundos.

As atividades de forrageamento incluíram os comportamentos de coleta de líquido, presa, fibra vegetal e viagem infrutífera. Alimentar larva incluiu os comportamentos de oferecer alimento líquido ou presa para a larva. Construção incluiu os comportamentos de iniciar nova célula, aumentar células e mastigar fibra vegetal. Comportamento de dominância incluiu vibrar abdome, ataque físico, confronto e botar ovo.

2. Análise dos dados comportamentais obtidos

A análise dos dados comportamentais adquiridos somente levou em consideração os indivíduos presentes na colônia no momento da coleta, já que a presença ou ausência de similaridade comportamental foi, posteriormente, relacionada com o desenvolvimento glandular. Assim, os comportamentos quantificados dos

espécimes que desapareceram da colônia durante os períodos de observação não foram analisados.

Desta forma, as tabelas obtidas em cada ninho foram analisadas utilizando-se a Análise dos Componentes Principais (também conhecida como PCA). O mesmo tipo de análise já foi previamente utilizado em estudos comportamentais de outros Hymenoptera (GADAKAR & JOSHI, 1983; FRESNEAU & DUPUY, 1988; THERAULAZ, 1990).

A PCA é um tipo de manipulação matemática que consiste numa transformação linear de "m" variáveis originais em "m" novas variáveis, de tal modo que a primeira nova variável computada seja responsável pela maior variação possível existente no conjunto de dados. A segunda variável responde pela segunda maior variação possível. As próximas variáveis seguem o mesmo padrão até que toda a variação do conjunto tenha sido explicada (REYMENT & JÖRESKOG, 1996).

As novas variáveis, originadas através da correlação entre os dados, são as componentes principais e, geralmente, as duas ou três primeiras componentes da nova matriz gerada explicarão a maior parte da variabilidade presente no conjunto de dados (no presente caso, a variabilidade presente entre os diferentes comportamentos). Esta nova matriz apresentará números (ou cargas) que podem ser considerados como uma medida da relativa importância de cada item analisado dentro de cada componente principal gerada. Os respectivos sinais de cada carga (positivos ou negativos) indicam se as relações destas com as componentes são diretamente ou inversamente proporcionais.

Ao se multiplicar a nova matriz, que apresenta as cargas de cada variável nas componentes principais, pela matriz original de dados, uma terceira matriz é obtida. Esta última é uma matriz de contagens (*scores*) de cada caso (no presente estudo, de cada indivíduo) em relação às componentes principais.

Esses valores poderão então ser dispostos num gráfico de dispersão de duas ou três dimensões, em que os eixos são as componentes principais mais importantes. Assim pode-se mostrar o relacionamento entre os casos (ou entre indivíduos) de acordo com as variáveis de interesse (ou seja, os comportamentos). Isto permite a visualização mais nítida da relação entre os componentes mais representativos do estudo de modo que, indivíduos que possuem repertórios comportamentais semelhantes tendem a ficar

próximos nos gráficos de PCA, enquanto os indivíduos comportamentalmente diferentes ficarão mais distantes (ver Apêndice 3).

As análises empregadas no presente trabalho foram realizadas em computador, com o auxílio do programa PC-Ord 4.0.

3. Preparação das glândulas hipofaríngeas

Após serem coletadas, as vespas foram anestesiadas com gradual diminuição da temperatura até 4°C. Com auxílio de pinças e microtesoura, as glândulas hipofaríngeas foram retiradas sobre placa de Petri de dissecção com solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L), sob estereomicroscópio Westover.

Após a dissecção, as glândulas foram fixadas em Paraformaldeído 4%, durante 4 horas, colocadas em tampão de fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,4) por 24 horas, desidratadas por meio de sucessivos banhos de etanol nas concentrações 70%, 80%, 90% e, dois banhos em etanol 95%, por 30 minutos cada. Em seguida, as glândulas foram imersas numa solução de resina de embebição (Leica) com etanol 95% (1:1) durante 4 horas à temperatura ambiente, e só então foram colocadas em resina de embebição pura, por 24 horas, para perfeita infiltração da resina no material, sendo mantidas resfriadas a aproximadamente 4°C. Dando prosseguimento, as glândulas foram colocadas em resina de inclusão (Leica) com polimerizador (15:1) e mantidas em estufa à 37°C, por 24 horas, para completa polimerização da resina.

Os blocos de resina contendo as glândulas foram colados em suportes e foram cortados no micrótomo Leica RM 2145, com espessura de 5,0µm e colocados sobre lâminas para microscopia óptica.

Para a análise das glândulas, foram utilizadas as técnicas histoquímicas de Azul de Bromofenol e PAS para a determinação da concentração de secreção, já que foi constatado que a atividade metabólica das células está relacionada com a concentração de secreção (ver capítulo 2). Também foram levados em conta os diâmetros das células secretoras, que foram relacionados com os comportamentos das vespas. Além disto, foi também empregada a técnica de Verde de Metila-Pironina, para a verificação de variação morfológica entre as células secretoras.

3.1. Técnica do Azul de Bromofenol para evidenciar proteínas (PEARSE, 1985)

As lâminas contendo o material foram coradas com solução de Azul de Bromofenol, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0,5%, por 5 minutos e lavados em água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá.

3.2. Técnica de PAS para evidenciar glicoconjugados neutros com grupamentos 1,2 glicol (McMANUS, 1946)

Os cortes foram hidratados e em seguida mergulhados em ácido periódico 1% por 5 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada, as lâminas foram colocadas no reagente de Schiff à temperatura ambiente, por 15 minutos no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 5 a 10 minutos e, após a secagem, foram montadas em Bálsamo do Canadá.

3.3. Técnica do Verde de Metila-Pironina para marcação diferencial de DNA e RNA (MOFFITT, 1994)

Adicionou-se um grama de Verde de Metila a 200mL de tampão acetato 0,2M (pH 4,9). Esta solução foi lavada com clorofórmio até tornar-se transparente. Este procedimento retira as impurezas do Verde de Metila. A solução resultante serviu como solução estoque, sendo mantida a 4°C. A cada 50 mL da solução estoque, previamente filtrada, foi adicionado 0,1 g de Pironina Y. As secções da glândula, dispostas em lâminas, foram coradas por 3 horas, à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água destilada a 1°C por 4 segundos. Após a secagem, foram montadas em Bálsamo do Canadá.

4. Determinação da concentração de secreção e do diâmetro médio das células secretoras

Para efeito de comparação, foram calculadas a concentração de secreção presente nas glândulas hipofaríngeas e os diâmetros médios das células secretoras das diferentes vespas analisadas. As medidas foram obtidas com o auxílio do programa de análise de imagens Leica QWin

O diâmetro celular médio foi determinado logo após a dissecção das vespas. As glândulas foram individualmente transferidas para lâminas escavadas contendo fixador (paraformaldeído 4%). Para cada glândula, foram mensurados os diâmetros de 10 células secretoras, sendo posteriormente obtido o valor médio para cada indivíduo. Os resultados obtidos foram estatisticamente testados utilizando a análise de variância ANOVA para um fator com nível de significância de 0,05.

Para se determinar a concentração de secreção, as lâminas cuja secreção obteve reação positiva para as diferentes técnicas foram utilizadas. Para cada glândula foram determinadas a área recoberta com secreção e a área ocupada pelas células inteiras. Este procedimento foi realizado em secções de distintas regiões das glândulas, de modo a se cobrir quase o volume total das mesmas. As porcentagens de área recoberta com secreção, aqui denominadas de concentração de secreção, foram calculadas da seguinte forma: Concentração de Secreção (%) = Área Recoberta com Secreção x 100 / Área Celular Total.

RESULTADOS

As principais variações encontradas nas glândulas hipofaríngeas estão relacionadas com a concentração de secreção e com o diâmetro das células secretoras (Tabelas 1, 2 e 3). De acordo com as análises de variância empregadas, as diferenças entre o diâmetro das células secretoras foram consideradas significativas (P<0,0001 para todos os ninhos). Algumas glândulas com características degenerativas foram, também, relacionadas com as atividades das vespas.

1. Análise comportamental e sua relação com o desenvolvimento glandular

Foram observados nas colônias N1, N2 e N3 diversos comportamentos das vespas que foram julgados relevantes para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, sendo os resultados obtidos descritos nas tabelas 4, 5 e 6.

Notou-se que as glândulas hipofaríngeas não apresentaram maior ou menor grau de atividade frente a algum comportamento específico. O mesmo ocorreu com relação ao diâmetro das células secretoras, que foi variável em indivíduos que apresentaram uma série comportamentos em comum e, em outros casos, foram semelhantes em indivíduos comportamentalmente diferentes. Por exemplo, analisando-se as atividades de forrageamento, observou-se que, em determinados casos as glândulas hipofaríngeas apresentaram desenvolvimento acentuado em indivíduos que possuíam grande freqüência deste comportamento (indivíduos L, $N \in O$ do ninho N2) (Tabelas 2 e 5).

Entretanto, outros indivíduos que não realizaram esta tarefa (**H** e **P** do ninho N2), também tiveram glândulas com alto grau de atividade secretora (Tabelas 2 e 5).

O mesmo pôde ser observado com relação a todos os outros comportamentos realizados pelas vespas de todos os ninhos analisados (Tabelas 1 a 6).

Também não foram encontradas evidências claras da função glandular quando foram comparados os comportamentos de vespas que possuíam as glândulas com característica de maior atividade. As vespas **H**, **P** e **AC** do ninho N1 (Tabela 1), por exemplo, foram as que tiveram glândulas com maior concentração de secreção da colônia. Entretanto, nota-se que, comportamentalmente, estes indivíduos não apresentaram relações que os determinassem como um grupo (Tabela 4). O mesmo pôde ser observado para os indivíduos **H** e **L** do ninho N2 (Tabelas 2 e 5) e indivíduos **B**, **F** e **J** do ninho N3 (Tabelas 3 e 6). No tocante ao diâmetro das células secretoras também não foi observada nenhuma relação.

Como dificilmente foram observadas vespas que tinham preferência no desenvolvimento de apenas determinadas atividades (especialização de tarefas), tentouse organizar as vespas por grupos relacionados com a maior afinidade comportamental existente. Assim, além das tabelas de comportamentos realizados pelas vespas dos ninhos N1, N2 e N3, também foram analisados os resultados da PCA para cada um destes ninhos (Tabelas 7 a 9 e Figs. 1 a 6). Note que as figuras 1 e 2, por exemplo, são as mesmas. Entretanto, uma traz as medidas relacionadas com a concentração de secreção encontrada nas glândulas e a outra mostra os diâmetros das células secretoras. O mesmo foi realizado com as figuras 3 e 4, assim como com as figuras 5 e 6. Deste modo, o desenvolvimento glandular foi analisado dentro de cada grupo formado, de modo a se determinar algum tipo de relação funcional das glândulas hipofaríngeas com os principais perfis de cada grupo.

Como os gráficos fornecidos pela PCA apresentam apenas os três primeiros componentes principais (que aparecem em forma de eixos nos gráficos), eles podem não explicar 100% da variabilidade encontrada entre as vespas. A variância total obtida com a soma dos três primeiros eixos dos ninhos N1 e N3 foram de 74,3% e 84,71%, respectivamente (Tabelas 7 e 9). Deste modo, o gráfico apresentou uma contribuição considerada adequada para a explicação da variação comportamental encontrada nestes ninhos. No caso do ninho N2, a soma das variâncias encontrada nos três primeiros eixos

foi de 63,44% (Tabela 8). Somando-se as variâncias obtidas no quarto eixo, este valor aumentou 74,13%. Neste caso a análise ficaria mais representativa. Entretanto, as análises gráficas não suportam mais do que três eixos (ou seja, três dimensões). Apesar disto, diversas características encontradas neste ninho, durante as observações, puderam ser constatadas com o auxílio dos gráficos da PCA, obtidos apenas com os três primeiros eixos.

Assim, com o agrupamento dos indivíduos pela PCA e com o auxílio das tabelas de comportamentos, os dados foram comparados de acordo com grau de atividade das glândulas hipofaríngeas.

1.1. Ninho N1

O gráfico obtido com as análises de PCA demonstrou alguns indivíduos isolados dos demais e outros (a maioria deles) agrupados em apenas uma região do gráfico (Figs. 1 e 2). Esta característica foi observada tanto no gráfico que representa o plano formado pelos eixos 1 e 2 (denominado de Plano A), quanto no gráfico que representa o plano formado pelos eixos 1 e 3 (denominado de Plano B), sendo que, juntos, os dois planos representam uma única figura tridimensional (formada pelos eixos 1, 2 e 3) (Fig. 1). No presente ninho, a concentração de secreção das glândulas hipofaríngeas variou de cerca de 0 a 20% e o diâmetro médio das células secretoras variou entre 50 e 70µm (Tabela 1).

Algumas vespas como **N**, **AC** e **AD** apresentaram-se isoladas tanto no Plano A quanto no B (Fig. 1). Esta característica aponta-os como indivíduos de características comportamentais distintas dos demais. A vespa **N** apresentou-se bem ativa na colônia, como uma típica operária, mostrando, de forma significativa, os comportamentos de forrageamento para coleta de líquido, trofalaxia com outros adultos e com as larvas, além de realizar atividades de alimentação das larvas (Tabela 4). Suas glândulas hipofaríngeas apresentaram média de 10,58% (Fig. 1) de secreção e diâmetro celular de 60,34µm (Fig. 2). Portanto, para este indivíduo, ambas as medidas ficaram na média geral, com relação às outras vespas do mesmo ninho.

O indivíduo **AC** está próximo ao indivíduo **N** no Plano B (Fig. 1). Este fato ocorreu, principalmente, pelo grande número de comportamentos de trofalaxia (com larvas e outros adultos) apresentado por ambos. Entretanto, no Plano A, **AC** aparece

isolado devido, principalmente ao elevado número de comportamentos de dominância, além de ser uma das únicas três vespas no ninho a botar ovos (Tabela 4). Esta vespa apresentou-se, portanto, como a dominante da colônia, sendo este fato também observado pelo comportamento de forrageamento ser raro para ela. Com relação às glândulas hipofaríngeas a vespa **AC** apresentou 16,89% de secreção. Já o diâmetro celular médio foi de 70,94µm, sendo este o valor mais alto apresentado entre as vespas estudadas (Fig. 2).

A vespa **AD** apresentou-se relativamente isolada nos Planos A e B (Fig. 1). Esta vespa obteve grande número de comportamentos de dominância, o que explica sua aproximação à vespa **AC**, quando comparada com outras vespas da colônia (Fig. 1). Além deste comportamento, **AD** também realizava de forma expressiva os comportamentos de construção do ninho e trofalaxia com as larvas. Além disto, esta vespa apresentou, por algumas vezes, o comportamento de botar ovos (Tabela 4). As glândulas hipofaríngeas de **AD** apresentaram concentração de secreção muito baixa (1,38%) (Fig. 1), mas o diâmetro celular médio ficou entre os maiores (65,0µm) (Fig. 2).

A vespa **P** apresentou-se isolada no Plano B (Fig. 1), devido ao elevado número de comportamentos relacionado com a coleta de presas. Neste ninho, a vespa **P** foi a que apresentou este comportamento com maior freqüência. Entretanto, no Plano A, esta vespa apresentou-se próxima de **F**, **G**, **R**, **O**, **Z** e **AA** (Fig 1). De forma geral, a vespa **P** apresentou diversos outros comportamentos, entretanto, estes foram realizados com freqüência baixa. Sua proximidade com os outros indivíduos no Plano A foi relacionada com o comportamento de trofalaxia adulto-adulto, já que tanto **P** quanto estas outras vespas realizaram este comportamento de forma relativamente pronunciada. As glândulas hipofaríngeas de **P** apresentaram concentração de secreção de 18,6% e diâmetro celular médio de 65,0µm, ficando, ambos os valores, entre os mais altos da colônia.

Portanto, as vespas F, G, O, P, R, Z e AA formaram um grupo de vespas localizadas na região central do Plano A do gráfico de PCA (Fig. 1). Juntamente com estas, apareceram diversas outras (K, S, U, X, W e Y), sendo que a característica que mais as definiram como um grupo foi o comportamento de trofalaxia adulto-adulto. Entretanto, observando-se o grupo como um todo, atribuiu-se a ele a característica de

generalista, não se observando especialização na realização de alguma tarefa específica. Apenas \mathbf{G} se destacou mais por realizar de forma mais expressiva o comportamento de forrageamento para coleta de líquido e, \mathbf{R} pelo número de comportamentos relacionados com construção. Neste caso, observou-se o maior distanciamento no Plano B para alguns indivíduos como estes (Tabela 4).

De qualquer forma, a concentração de secreção apresentada pelas glândulas hipofaríngeas destas vespas foi muito variável. Foram encontradas desde glândulas com ausência de secreção (caso da vespa \mathbf{R}), até glândulas com cerca de 18% de secreção (Fig. 1). Variação entre vespas próximas, no gráfico, também foi observada com relação ao diâmetro das células secretoras (Fig. 2).

O indivíduo **J** também se manteve próximo a este grupo no Plano A. Entretanto, no Plano B ele apareceu mais distanciado, juntamente com **O** (Fig. 1). Estes indivíduos tiveram alguns comportamentos com freqüência em comum, entretanto, **J** apresentou o comportamento de construção de forma significativa e o comportamento de permanecer imóvel com baixa freqüência (Tabela 4). As glândulas desta vespa apresentaram claros sinais de degeneração, com o citoplasma apresentando vários vacúolos (Fig. 7).

Os indivíduos **A**, **B**, **C**, **D** e **E** ficaram totalmente sobrepostos no gráfico de PCA (Fig. 1). Estes indivíduos eram todos recém-emergidos, não sendo determinados seus comportamentos (Tabela 4). Neste caso a concentração de secreção encontrada foi muito próxima ($\mathbf{A} = 1,36\%$; $\mathbf{B} = 0\%$; $\mathbf{C} = 0\%$; $\mathbf{D} = 2,76\%$ e $\mathbf{E} = 1,18\%$) e o diâmetro celular médio teve uma pequena variação na maioria dos indivíduos ($\mathbf{A} = 53,3\mu$ m; $\mathbf{B} = 49,6\mu$ m; $\mathbf{C} = 54,5\mu$ m; $\mathbf{D} = 58,7\mu$ m e $\mathbf{E} = 58,0\mu$ m).

Próximos a estes indivíduos ficaram **H**, **I**, **L**, **M**, **T** e **V**, sendo estes determinados como os mais sedentários ou como os mais ausentes da colônia devido ao baixo número de comportamentos registrados (Tabela 4). A concentração de secreção encontrada nas glândulas destes indivíduos foi muito variável, sendo encontradas desde glândulas com 1,43% (vespa I) até glândulas com 20,43% de secreção (vespa H) (Fig. 1). Já diâmetro celular médio encontrado nas glândulas destas vespas apresentou variação menor na maioria das vespas ($\mathbf{H} = 58,7\mu m$; $\mathbf{I} = 65,8\mu m$; $\mathbf{L} = 53,0\mu m$; $\mathbf{M} = 55,5\mu m$; $\mathbf{T} = 51,7\mu m$ e $\mathbf{V} = 52,0\mu m$) (Fig. 2).

O agrupamento apresentado pela maior parte dos indivíduos, tanto no Plano A quanto no B, mostrou que o repertório comportamental das vespas desta colônia foi tão

variável que ficou difícil a determinação de outros grupos de indivíduos que tivessem alguma característica comportamental específica. Este fato ocorreu principalmente devido ao baixo número de comportamentos apresentados por estes indivíduos. Ou seja, o pequeno número de comportamentos apresentados não permitiu a determinação de uma característica comportamental única para estes indivíduos.

Devido ao grande número de vespas existentes na colônia durante os períodos de observação e à instabilidade com relação ao controle e manutenção da hierearquia, observou-se neste ninho um número mais baixo de comportamentos de permanecer imóvel do que nos ninhos N2 e N3. Além disto, muitas vespas não estavam presentes em todos os dias de observação, o que acarretou no baixo número de comportamentos registrados para elas.

1.2. Ninho N2

O PCA de N2 mostrou alguns indivíduos que se distanciaram dos demais devido a algumas características comportamentais destacadas. O indivíduo **P** apresentou-se isolado no gráfico, tanto no Plano A, quanto no Plano B (Fig. 3 e 4). As tendências comportamentais desta vespa estavam relacionadas com comportamento de dominância e trofalaxia com as larvas, além de botar ovos (comportamento exclusivo). Estas evidências (principalmente a de botar) indicaram esta vespa como a dominante (Tabela 5).

A concentração de secreção encontrada nas glândulas hipofaríngeas desta vespa foi considerada entre as mais baixas do ninho em questão (11,02%) (Fig. 3), sendo que, a variação geral encontrada entre as outras vespas do mesmo ninho foi entre 10% e 30% (Tabela 2). Com relação ao diâmetro das células secretoras, esta vespa apresentou média de 63,5µm, sendo o maior valor encontrado no ninho (Fig. 4).

Notou-se que o gráfico apontou uma divisão entre indivíduos que contribuíam efetivamente para o desenvolvimento da colônia e indivíduos que estavam menos envolvidos com as atividades do ninho.

Os indivíduos **A** e **J**, que apareceram em posições relativamente similares nos planos A e B do gráfico (Fig. 3), foram considerados os mais sedentários da colônia, apresentando baixos índices de saídas para forrageamento e de outros comportamentos que os indicassem como indivíduos atuantes na colônia (Tabela 5). Para o indivíduo **A**,

o baixo número de comportamentos realizados poderia estar relacionado com sua idade, que foi inferior à das outras vespas ninho (Tabela 2). As concentrações de secreção exibidas pelas glândulas destes indivíduos foram de 11,01% para **A** e 28,02% para **J**, sendo estas diferenças consideradas significantes. Com relação ao diâmetro celular, o indivíduo **A** apresentou 61,5µm enquanto o **J** apresentou 53,0µm. Para as duas vespas, os resultados de concentração de secreção e diâmetro das células secretoras foram inversos.

Também ficaram agrupados nos planos A e B do gráfico de PCA, os indivíduos **B**, **C**, **F**, **I** e **K** (Fig. 3). Este agrupamento deu-se de forma mais consistente no plano B e, a distância maior apresentada no plano A está relacionada com as particularidades de cada indivíduo.

As distâncias presentes entre os indivíduos **I** e **K** em ambos os planos foram praticamente as mesmas (Fig. 3). Observando-se a tabela de comportamentos, notou-se que estes indivíduos não mostraram preferência na realização de alguma tarefa específica, realizando várias delas com freqüência muito parecida entre eles. Além disto, as atividades de forrageamento foram pouco realizadas por estes indivíduos. Com relação às glândulas hipofaríngeas, estes indivíduos apresentaram células com diâmetro muito similar, sendo que **I** obteve o valor de 47,0 μ m e **K**, 47,8 μ m. Já a concentração de secreção encontradas nestas glândulas foi diferente, sendo que **I** apresentou 13,08% e **K**, 27,4%.

O indivíduo **F** ficou muito próximo de **I** no plano B. Diversos comportamentos apresentados por **F** foram semelhantes à **I**, sendo que a distância maior apresentada no plano A deva estar relacionado com o fato do indivíduo **F** realizar um pouco mais as atividades de forrageamento e, também, por ser uma vespa mais subordinada. A mesma situação ocorreu com o indivíduo **B**, que teve alguns comportamentos com freqüência semelhante à **I** e **K**, mas, apresentou com maior destaque o comportamento de forrageamento (principalmente para presas).

O indivíduo C, que se apresentou próximo aos indivíduos B, K, I e F, também mostrou um repertório comportamental bem variado, tendo a freqüência de alguns comportamentos similar aos outros localizados na mesma região. Entretanto, para este indivíduo, destacaram-se as atividades de trofalaxia com as larvas e de forrageamento, o que explicaria a distância apresentada com relação aos outros indivíduos com

comportamentos mais próximos. Entre estes indivíduos, as glândulas hipofaríngeas também não apresentaram semelhanças. As concentrações de secreção encontradas foram: $\mathbf{B} = 24,92\%$; $\mathbf{C} = 10,82\%$; $\mathbf{F} = 0,99\%$; $\mathbf{K} = 27,40\%$. Com relação ao diâmetro das células secretoras, os valores obtidos foram: $\mathbf{B} = 52,4\mu$ m; $\mathbf{C} = 59,4\mu$ m; $\mathbf{F} = 54,3\mu$ m; $\mathbf{I} = 47,0\mu$ m; $\mathbf{K} = 47,8\mu$ m.

Nas glândulas dos indivíduos **A** e **B** encontrou-se alguma secreção, entretanto, o que chamou mais a atenção para estas glândulas foi o grande número e tamanho dos vacúolos no citoplasma. Comportamentalmente, estes indivíduos apresentaram algumas diferenças, sendo **B**, uma vespa que se comportava como uma forrageadora e **A**, uma vespa mais sedentária. No caso de **A**, o menor número de comportamentos também pode estar relacionado com sua idade (Tabela 2). As maiores semelhanças entre elas se deram com relação aos comportamentos realizados com menor expressividade.

Para os indivíduos **B** e **C**, os comportamentos de coleta de presa e trofalaxia com as larvas foram os mais expressivos. Entretanto, estes indivíduos também apresentaram variação na concentração de secreção das glândulas hipofaríngeas (**B** = 24,92% e **C** = 10,82%). O mesmo ocorreu com o diâmetro das células secretoras, que apresentaram diferença de 7µm (**B** = 52,4µm e **C** = 59,4µm).

Os indivíduos **D**, **E**, **G**, **H** e **M** ficaram agrupados em região próxima no plano A. Já no plano B houve o distanciamento dos indivíduos **D** e **E** do grupo (Fig. 3).

Os indivíduos **D** e **E** juntos, se destacaram pelo comportamento de construção, obtendo freqüência similar para os comportamentos de aplicar secreção no ninho e trofalaxia adulto-adulto (Tabela 5). O maior distanciamento apresentado entre estes indivíduos no plano A se deu pela diferenciação com relação ao comportamento de forrageamento, onde **D** apresentou alta taxa de forrageamento para fibra vegetal, além de algumas saídas para coleta de líquido. Já o indivíduo **E** apresentou apenas baixa freqüência de coleta de fibra vegetal. Houve pequena variação na concentração de secreção de suas glândulas, que apresentaram 23,35% para **D** e 18,17% para **E**. Os diâmetros das células secretores apresentaram média de 54,4µm para **D** e 47,7µm para **E**.

Já os indivíduos **G** e **M**, tiveram glândulas com concentração de secreção aproximada ($\mathbf{G} = 16,86\%$ e $\mathbf{M} = 13,26\%$), tendo, também, diversos comportamentos com freqüências semelhantes, destacando-se trofalaxia com larvas e adultos, alimentação das larvas e comportamento de dominância (Tabela 5). As principais diferenças entre estes indivíduos se deram com relação ao comportamento de forrageamento, onde **G** apresentou preferência pela coleta de líquido e fibra vegetal, enquanto **M** apresentou preferência pela coleta de presas. O diâmetro médio das células secretoras de ambas as vespas apresentou variação de cerca de $10\mu m$ (**G** = 45,5 μm e **M** = 55,7 μm).

A vespa **H** apresentou comportamentos muito semelhantes à **G** e **M**, destacandose as atividades de trofalaxia adulto-adulto e larva-adulto. Entretanto, para **H**, destacouse o comportamento de dominância (Tabela 5). No ninho N2 este comportamento só foi superado pela vespa **P**. Nota-se que, apesar da distância, a vespa **H** é uma das que mais se aproxima de **P**, mantendo distância relativamente fixa tanto no plano A quanto no B, podendo ser a possível substituta de **P** na dominância. A concentração de secreção de **H** foi a mais alta da colônia (30,17%). Já o diâmetro celular médio obteve medidas intermediárias (52,1µm), quando comparado a outros indivíduos do ninho.

Juntos, os indivíduos encontrados nesta região (vespas **D**, **E**, **G**, **H** e **M**) foram classificados como generalistas, realizando diversas tarefas diferentes de forma relativamente significativa (Tabela 5). As glândulas destas vespas, porém, não demonstraram um padrão único com relação ao seu desenvolvimento (Figs. 3 e 4).

Os indivíduos L, N e O, apresentaram-se isolados de todos os outros da colônia e entre si no gráfico de PCA, tanto no plano A quanto no B (Fig. 2). Estes foram considerados os indivíduos mais ativos da colônia.

O indivíduo **O**, destacou-se pelo acentuado comportamento de coleta de líquido e trofalaxia adulto-adulto, podendo esta ser considerada como uma vespa especialista nesta tarefa (Tabela 5). Os outros comportamentos desta vespa foram desenvolvidos com freqüência muito baixa, contando com o comportamento de permanecer imóvel no ninho. Além disto, o baixo número de comportamentos totais observados nesta vespa, demonstraram que esta permanecia pouco tempo no ninho. Nesta vespa a concentração de secreção observada foi de 16,19%, e o diâmetro celular médio foi de 60,8µm, não sendo observadas características de degeneração celular.

As vespas L e N tiveram alguns comportamentos com freqüência em comum, entretanto, N se mostrou mais ativa, possuindo a soma total de comportamentos maior que L (Tabela 5). Além disto, diferentemente da vespa L, a vespa N apresentou acentuado número de comportamentos de dominância, o que deve ter determinado a distância apresentada entre as duas vespas no gráfico de PCA (Fig. 3). Estas vespas apresentaram semelhanças com a concentração de secreção ($\mathbf{L} = 21,39\%$ e $\mathbf{N} = 19,09\%$) e diâmetro celular médio ($\mathbf{L} = 55,6\mu$ m e $\mathbf{N} = 53,6\mu$ m). Entretanto, além do comportamento de dominância, \mathbf{N} também realizou comportamentos de alimentação das larvas e trofalaxia com adultos, de forma expressiva, o que explicaria sua relativa distância das outras vespas no gráfico de PCA. Esta vespa apresentou-se como um indivíduo muito ativo na realização das tarefas do ninho. Apesar do desenvolvimento intermediário indicado pela concentração de secreção, suas glândulas apresentavam claros sinais de desgaste. Foram verificadas células com desenvolvimento assincrônico, de modo que, algumas apresentaram-se normais enquanto outras eram diferenciadas, apresentando núcleos bem irregulares (Fig. 7).

1.3. Ninho N3

Neste ninho, observou que a maioria dos comportamentos significativamente relevantes para o desenvolvimento da colônia ficou distribuído entre poucos indivíduos (Tabela 6). Em parte, este fato é decorrente da idade de alguns dos espécimes, que tinham entre zero e dois dias de idade (Tabela 3).

Outra característica marcante deste ninho foi a ausência do comportamento de coleta de fibra vegetal e construção, durante o período de observações (Tabela 6).

O gráfico de PCA apresentou distribuição semelhante dos indivíduos nos planos A e B, sendo apenas constatado um distanciamento maior do indivíduo \mathbf{E} em relação aos indivíduos \mathbf{F} e \mathbf{G} no plano B do gráfico (Fig. 5 e 6). Portanto, a posição relativa dos outros indivíduos permaneceu semelhante no gráfico.

Ficou evidente que o indivíduo **H** foi um dos mais envolvidos com os cuidados com a prole (Tabela 6). Alguns comportamentos como alimentação das larvas, trofalaxia com as larvas e receber e mastigar presas provaram a importância desta vespa para colônia. Além destes comportamentos, observou-se que esta vespa também realizou comportamentos de dominância e oviposição.

Neste ninho, a variação na concentração de secreção das glândulas hipofaríngeas foi mais ampla do que em N2, apresentando valores entre 1% e 29% (Tabela 3). A vespa **H**, que foi considerada a dominante da colônia, apresentou valor entre os mais

baixos (8,95%) (Fig. 5). Esta vespa também apresentou valor entre os mais baixos, referente ao diâmetro celular médio (49,7μm) (Fig. 6).

Em um outro extremo do gráfico, apresentou-se o indivíduo **I** (Figs. 5), que desenvolvia, principalmente, as atividades de forrageamento de líquido, trofalaxia com os adultos e com as larvas, além das diversas viagens infrutíferas (Tabela 6). Esta vespa atuava, portanto, como uma típica operária, contribuindo efetivamente para a manutenção da colônia. As glândulas desta vespa apresentaram desenvolvimento intermediário, tendo 19,99% de secreção e diâmetro celular de 56,5 μ m.

A vespa **G** foi a que mais se aproximou de **I** no plano A (Fig. 5). Ela também se caracterizou por ser um indivíduo bem ativo, embora menos que **I**. Entretanto, a vespa **G** destacou-se por ser a única no ninho envolvida com o forrageamento de presas. O desenvolvimento glandular de ambas as vespas foi muito similar, sendo que **G** atingiu 19,76% de secreção. Entretanto, as células glandulares desta vespa mostraram claros sinais de desgaste, sendo encontrado grande número de vacúolos em seu citoplasma. Sua proximidade com os indivíduos **E** e **F**, no plano A e, com o indivíduo **D**, no plano B, estaria relacionada com uma série de comportamentos que estas vespas realizam com freqüência parecida. Entretanto, o indivíduo **G** se destaca destes outros pelo acentuado comportamento de forragear presas e pelo comportamento de subordinação (Tabela 6).

As vespas $\mathbf{E} \in \mathbf{F}$ ficaram relativamente próximas à \mathbf{G} no plano A (Fig. 5), entretanto, suas afinidades parecem estar mais relacionadas com os comportamentos que estas realizaram com menor freqüência, do que com os comportamentos realizados com maior freqüência. Este fato pôde ser observado pelo maior distanciamento entre estes indivíduos no plano B do gráfico, pois os comportamentos mais realizados por estas vespas não foram coincidentes entre elas. Diferentemente de \mathbf{G} , a vespa \mathbf{E} se destacou pelo grande número de comportamentos de aplicar secreção no ninho e, a vespa \mathbf{F} , pelo grande número de trofalaxia com as larvas. As glândulas hipofaríngeas das duas apresentaram, respectivamente, 11,77% e 24,10% de secreção, possuindo características normais, sem sinais de degeneração. O diâmetro médio apresentado pelas células secretoras foi de 52,9µm para \mathbf{E} e 52,4µm para \mathbf{F} .

Também um pouco isolada das demais, encontrou-se a vespa **J** (Fig. 5). De fato, ela não era uma vespa muito ativa na colônia, porém, entre todos os comportamentos por ela realizados, sobressaiu-se o de dominância, que foi o segundo maior da colônia.

Assim como no ninho N2, esta foi a vespa mais próxima da dominante (Fig. 5) e apresentou a mais alta concentração de secreção da colônia, atingindo 28,64% de secreção. O diâmetro das células secretoras foi o segundo mais alto da colônia, apresentando 58,2µm. Entretanto, durante as observações, percebeu-se que esta vespa passava pouco tempo na colônia, não sendo possível dizer quais as atividades realizadas por ela fora do ninho. Este fato também pôde ser constatado pelo baixo número de comportamentos totais deste indivíduo.

Entre as vespas mais sedentárias desta colônia se enquadraram **A**, **B**, **C** e **D**, sendo **A** e **C**, machos (Fig. 5). As vespas **A**, **B** e **C** foram as que exerceram menos atividades no ninho, entretanto estas eram jovens e ainda não haviam saído do estágio de inatividade apresentado pelas vespas emergidas há pouco tempo. De qualquer forma, observou-se que as glândulas hipofaríngeas destas vespas apresentaram diferenças bruscas com relação à concentração de secreção (Fig. 5). Notou-se que as glândulas de **A** e **C** não apresentaram desenvolvimento significativo, entretanto, **B** apresentou 22,80% de secreção. O indivíduo **D** pôde ser considerado um sedentário típico, não apresentando nenhum comportamento realizado de forma expressiva, com exceção do comportamento de permanecer imóvel (Tabela 3). A concentração de secreção encontrada em suas glândulas hipofaríngeas foi de 19,16% e, o diâmetro celular médio foi de 50,7µm, aproximando-se de **A** e **C**, que apresentaram, respectivamente, 52,7 e 53,7µm.

2. Desenvolvimento glandular geral nas diferentes colônias

Os ninhos N1, N2 e N3 apresentaram algumas características que os diferenciaram entre si. A primeira colônia foi observada entre os meses de fevereiro, março e abril de 2003. Na fase de coleta dos espécimes, ela encontrava-se próxima ao final do ciclo de desenvolvimento. Observou-se, então, que os principais comportamentos realizados pelas vespas estavam relacionados com forrageamento de líquido, não havendo muita coleta de presa e nem de material para construção. Além disto, grande parte das vespas permanecia muito tempo no ninho, saindo pouco para forragear, enquanto as que mais saiam, alimentavam as sedentárias.

Os ninhos N2 e N3 foram observados em janeiro de 2004 e encontravam-se em fase de pós-emergência. Ambos os ninhos foram observados em época de fartura

alimentar, que ocorreu num período mais chuvoso em Rio Claro (Tabela 10). Assim todos os recursos necessários para o desenvolvimento de uma colônia estavam disponíveis.

N2 era uma colônia em plena fase de expansão, com alta taxa de forrageamento de presa e fibra vegetal (Tabela 11). O alto fluxo de alimento aí encontrado mostrou o investimento da colônia para o desenvolvimento da prole, que contava com grande quantidade de alimento disponível a todo tempo. Além disto, a coleta de fibra vegetal também foi verificada, refletindo a alta taxa de crescimento do ninho e, conseqüentemente, da colônia.

O ninho N3 estava na mesma fase que N2, entretanto, no início do período de observação, este ninho passou pelo processo de substituição da vespa dominante, de modo que as relações entre as vespas do ninho ficaram conturbadas. Não foi observado forrageamento para coleta de fibra vegetal (Tabela 11) e apenas um indivíduo estava realizando coleta de presa para alimentar as larvas (Tabela 6). Portanto, não estava havendo nenhum esforço para garantir o progresso da colônia e, além disso, foi observado, inúmeras vezes, o comportamento de larvifagia (Tabela 11).

Além das diferenças encontradas com relação às fases de desenvolvimento de cada colônia, também foram observadas diferenças quanto ao desenvolvimento glandular geral dentro de cada ninho (Fig. 8). Observou-se claramente, que o ninho N1 apresentou indivíduos possuindo desde glândulas sem secreção até glândulas com cerca de 20% de secreção. Já no ninho N2, quase todos os indivíduos apresentaram glândulas com desenvolvimento significativo, variando principalmente entre 10% e 30% de secreção. No ninho N3 o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas variou entre 3% e 29%.
TABELAS

Indivíduo	ldade (dias)	Concentração média de secrecão (%)	Diâmetro celular médio (μm)	Desvio P. do diâmetro
Α	0	1.36	53.25	4.628
В	0	0.00	49.58	4.554
С	0	0,00	54,47	6,750
D	0	2,76	58,67	7,415
Е	0	1,18	57,95	6,830
F	7	10,32	68,60	9,585
G	7	13,57	61,29	7,116
н	8	20,43	58,67	7,415
I	8	1,43	65,80	9,515
J	9	0,14	57,86	3,834
К	9	8,49	55,83	4,513
L	10	9,76	53,03	4,908
М	10	12,88	55,47	4,413
Ν	15	10,58	60,34	4,673
0	18	12,86	?	?
Р	18	18,60	65,00	6,617
Q	20	3,56	57,95	6,830
R	25	0,00	54,30	6,606
S	26	1,21	66,09	7,559
Т	26	12,04	51,70	6,715
U	26	3,60	59,37	7,509
V	27	1,18	52,02	7,944
W	33	1,34	52,32	3,873
Х	35	0,00	59,19	7,802
Y	35	0,00	60,05	3,579
Z	38	3,28	49,58	4,554
AA	40	0,27	61,25	4,570
AB	70	1,37	62,27	5,596
AC	70	16,89	70,94	6,031
AD	92	1,38	65,00	6,617

TABELA 1. Concentração de secreção e diâmetro celular médio em vespas com diferentes idades do ninho N1.

Indivíduo	ldade (dias)	Concentração média de secreção (%)	Diâmetro celular médio (μm)	Desvio P.do diâmetro
A	6	11,01	61,56	13,187
В	15	24,92	52,37	5,730
С	15	10,82	59,41	7,410
D	15	23,35	54,42	5,471
Е	15	18,17	47,65	4,913
F	17	0,99	54,33	5,417
G	17	16,66	45,48	4,714
Н	17	30,17	52,15	5,426
I	17	13,68	47,04	5,019
L	18	28,02	52,92	6,245
K	18	27,4	47,73	6,583
L	28	21,39	55,36	7,389
М	29	13,26	55,65	6,915
Ν	31	19,09	53,57	6,804
0	50	16,19	60,79	6,105
Р	50	11,02	63,46	10,128

TABELA 2. Concentração de secreção e diâmetro celular médio em vespas com diferentes idades do ninho N2.

Indivíduo Idade (dias)		Concentração média de secreção (%)	Diâmetro celular médio (μm)	Desvio P. do diâmetro
А	0	3,55	52,72	5,230
В	2	22,80	61,20	3,590
С	2	1,69	53,67	4,096
D	8	19,16	50,64	7,879
E	9	11,77	52,85	4,892
F	28	24,10	52,40	4,038
G	30	19,76	47,81	2,833
Н	30	8,95	49,56	6,100
I	30	19,99	56,55	7,813
J	34	28,64	58,16	5,679

TABELA 3. Concentração de secreção e diâmetro celular médio em vespas com diferentes idades do ninho N3.

INDIVÍDUOS	Δ	B	C	D	F	F	G	н	1	J	K	1	M	N	0
Forrageamento líquido	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	5	0	0	19	1
Forragemento presa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Forrageamento fibra vegetal	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	1	3
Viagem infrutifera	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	4	1
Trofalaxis adulto-adulto	0	0	0	0	0	12	11	0	0	3	4	2	0	16	6
Receber e/ou mastigar presa	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	2	0	8	0
Trofalaxis larva-adulto	0	0	0	0	0	6	4	0	0	1	4	0	1	14	1
Alimentar larva	0	0	0	0	0	6	2	0	0	0	2	0	0	9	0
Construção	0	0	0	0	0	5	0	0	0	13	0	0	0	1	6
Aplicar secreção no ninho	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Comport. Dominância	0	0	0	0	0	8	2	0	3	3	0	6	0	7	1
Comportamento de subordinação	0	0	0	0	0	3	2	0	1	1	1	1	0	7	1
Botar ovo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Permanecer imóvel no ninho	0	0	0	0	0	80	75	83	115	33	71	98	60	97	166
TOTAL OBSERVADO	0	0	0	0	0	131	106	83	119	57	89	109	61	184	187
continuação															
INDIVÍDUOS	P	0	R	S	т	Ш	V	W	X	Y	7	۵۵	AR	AC	AD
Forrageamento líquido	0	2	5	6	0	3	0	4	2	4	6	8	0	1	5
Forragemento presa	8	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0
Forrageamento fibra vegetal	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Viagem infrutifera	1	0	2	0	0	1	0	0	0	2	3	4	0	1	6
Trofalaxis adulto-adulto	4	3	7	5	1	5	0	9	6	5	8	7	0	7	5
Receber e/ou mastigar presa	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2
Trofalaxis larva-adulto	3	0	10	1	0	1	0	1	1	1	0	4	2	14	11
Alimentar larva	4	0	4	3	0	2	0	4	1	1	1	5	0	4	0
Construção	4	0	12	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	6	15
Aplicar secreção no ninho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1
Comport. Dominância	6	0	7	0	0	0	1	0	2	0	1	9	13	66	33
Comportamento de subordinação	1	2	1	0	5	3	1	1	4	2	4	1	1	0	0
Botar ovo	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
Permanecer imóvel no ninho	98	89	205	30	70	64	75	30	182	183	143	147	64	300	238
TOTAL OBSERVADO	135	97	256	45	77	79	77	49	200	198	167	190	82	412	320

TABELA 4. Número de comportamentos apresentados por cada vespa coletada do ninho N1.

INDIVÍDUOS	Α	В	С	D	E	F	G	Н	I	J	K	L	М	Ν	0	Ρ
Forrageamento líquido	1	2	3	5	0	4	6	3	1	2	2	12	3	13	17	0
Forragemento presa	0	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	1	0	0
Forrageamento fibra vegetal	0	2	0	9	3	0	6	0	0	0	2	3	3	7	0	0
Viagem infrutifera	2	3	4	1	0	0	1	0	1	0	0	2	0	2	3	6
Trofalaxis adulto-adulto	1	3	3	5	6	4	11	10	5	2	5	9	8	13	12	5
Receber e/ou mastigar presa	3	3	3	1	3	4	6	4	7	1	6	4	2	3	0	3
Trofalaxis larva-adulto	2	9	12	6	13	5	17	12	8	4	6	9	8	6	2	14
Alimentar larva	1	2	6	2	5	1	8	6	3	1	4	13	11	12	4	5
Construção	0	2	4	10	10	2	6	7	5	0	2	5	9	9	1	4
Aplicar secreção no ninho	0	1	4	5	7	4	0	3	3	2	2	3	2	9	1	0
Comport. Dominância	1	2	5	3	5	3	7	21	5	0	9	2	10	18	4	39
Comportamento de subordinação	0	4	3	2	1	5	2	1	1	0	3	5	1	2	4	0
Botar ovo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Permanecer imóvel no ninho	84	175	155	191	220	225	169	208	198	200	217	127	151	150	53	217
TOTAL OBSERVADO	95	217	208	240	273	257	239	275	237	212	258	197	217	245	101	296

TABELA 5. Número de comportamentos apresentados por cada vespa coletada do ninho N2.

INDIVÍDUOS	Α	в	С	D	E	F	G	Н	1	J
Forrageamento líquido	0	0	0	0	0	3	3	0	13	0
Forragemento presa	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0
Forrageamento fibra vegetal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viagem infrutifera	0	0	0	4	3	2	3	19	12	6
Trofalaxis adulto-adulto	0	2	0	2	1	6	4	3	15	2
Receber e/ou mastigar presa	0	1	0	0	2	0	2	12	0	6
Trofalaxis larva-adulto	0	1	1	1	4	15	3	20	10	5
Alimentar larva	0	1	0	0	1	1	1	3	1	2
Construção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aplicar secreção no ninho	0	0	0	4	15	3	5	6	1	2
Comport. Dominância	0	0	0	0	6	0	2	91	7	29
Comportamento de subordinação	0	1	0	4	6	6	10	0	7	0
Botar ovo	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Permanecer imóvel no ninho	0	37	46	236	320	208	126	127	117	49
TOTAL OBSERVADO	0	43	47	251	358	244	171	283	183	101

TABELA 6. Número de comportamentos apresentados por cada vespa coletada do ninho N3.

TABELA 7. Autovetores das componentes principais, autovalores (*eingenvalues*), porcentagem de variância e porcentagem de variância acumulada obtidos a partir dos comportamentos apresentados pelas vespas do ninho N1.

	Componentes Principais						
Comportamentos	1	2	3	4			
Forrageamento Líquido	-0,2417	0,3356	-0,2713	-0,2575			
Forrageamento Presa	-0,0713	0,1417	0,4758	0,3758			
Coleta de Fibra Vegetal	-0,1434	0,1142	0,6416	0,0245			
Viagem Infrutífera	-0,2999	0,0837	0,0211	-0,5264			
Trofaláxis Adulto-Adulto	-0,3140	0,3047	-0,0945	0,0203			
Receber/Mastigar Presa	-0,3201	0,0991	-0,0028	0,4314			
Trofaláxis Larva-Adulto	-0,3990	-0,0347	-0,0604	0,0102			
Alimentar Larva	-0,2994	0,3051	-0,0548	0,2474			
Construir	-0,2401	-0,1579	0,4314	-0,3581			
Aplicar Secreção no Ninho	-0,2081	-0,3812	-0,2014	0,2685			
Dominância	-0,3083	-0,3687	-0,0691	0,1613			
Subordinação	-0,1345	0,3898	-0,1798	0,0535			
Botar Ovo	-0,2642	-0,4024	-0,0857	-0,0025			
Permanecer Imóvel	-0,3036	-0,1742	0,0356	-0,1942			
Autovalores	5,623	3,008	1,774	1,092			
Variância (%)	40,164	21,487	12,673	7,798			
Variância Acumulada (%)	40,164	61,651	74,324	82,122			

TABELA 8. Autovetores das componentes principais, autovalores (*eingenvalues*), porcentagem de variância e porcentagem de variância acumulada obtidos a partir dos comportamentos apresentados pelas vespas do ninho N2.

	Componentes Principais						
Comportamentos	1	2	3	4			
Forrageamento Líquido	-0,3931	-0,2768	0,2940	-0,0794			
Forrageamento Presa	-0,0646	-0,0763	-0,0369	0,5353			
Coleta de Fibra Vegetal	-0,3718	0,0997	-0,2418	-0,1736			
Trofaláxis Adulto-Adulto	-0,4504	0,0595	0,2653	-0,0111			
Receber/Mastigar Presa	0,0549	0,2243	-0,1887	0,4296			
Trofaláxis Larva-Adulto	-0,0663	0,4418	0,0100	0,3712			
Alimentar Larva	-0,4266	0,1421	0,1806	0,2623			
Construção	-0,3604	0,3167	-0,2380	-0,1212			
Aplicar Secreção no Ninho	-0,3069	0,0824	-0,3829	-0,3029			
Dominância	-0,0057	0,4317	0,4172	-0,1146			
Botar Ovo	0,1717	0,3391	0,4539	-0,1050			
Subordinação	-0,1825	-0,2813	-0,0425	0,3939			
Permanecer Imóvel	0,1546	0,3884	-0,3604	-0,0041			
Eigenvalue	3,417	3,037	1,793	1,389			
Variância (%)	26,288	23,364	13,789	10,688			
Variância Acumulada (%)	26,288	49,652	63,441	74,129			

TABELA 9. Autovetores dos componentes principais, autovalores (*eingenvalues*), porcentagem de variância e porcentagem de variância acumulada obtidos a partir dos comportamentos apresentados pelas vespas do ninho N3.

	Componentes Principais						
Comportamentos	1	2	3	4			
Viagem Infrutífera	-0,3956	0,1676	0,1225	0,0413			
Forrageamento Líquido	0,0062	0,4870	0,3618	0,0664			
Forrageamento Presa	0,0636	0,1999	-0,1677	-0,8330			
Trofaláxis Adulto-Adulto	-0,0599	0,4939	0,3458	0,1094			
Receber/Mastigar Presa	-0,4113	-0,1346	-0,0724	-0,1797			
Trofaláxis Larva-Adulto	-0,3618	0,1964	0,0689	0,1480			
Alimentar Larva	-0,4007	0,0280	-0,0129	-0,1464			
Aplicar Secreção no Ninho	-0,1129	0,1513	-0,6126	0,1465			
Dominância	-0,4295	-0,1023	0,0068	-0,0620			
Botar Ovo	-0,4081	-0,0919	-0,0145	-0,0525			
Subordinação	0,1015	0,5168	-0,2189	-0,2240			
Permanecer Imóvel	-0,0338	0,2906	-0,5222	0,3664			
Eigenvalue	5,183	2,931	2,051	1,148			
Variância (%)	43,195	24,427	17,093	9,565			
Variância Acumulada (%)	43,195	67,622	84,715	94,280			

$\begin{tabular}{ c c c c c c c } \hline D A & fev/03 & mar/03 & abr/03 & jan/04 \\ \hline 1 & 0,4 & & & 27,7 \\ \hline 2 & & & & 28,2 \\ \hline 3 & & & & 2,0 \\ \hline 4 & & 31,4 & & & \\ \hline 5 & 0,4 & & 13,2 & & \\ \hline 6 & 0,2 & 0,9 & & & \\ \hline 7 & & 0,6 & 2,9 & 18,2 \\ \hline 8 & & 7,3 & & 2,8 \\ \hline 9 & & 8,9 & & 70,0 \\ \hline 10 & & 0,3 & & 29,4 \\ \hline 11 & & 2,8 & 2,5 & & \\ \hline 12 & & 2,3 & 0,9 & & \\ \hline 13 & 4,6 & & & 1,2 \\ \hline 14 & 33,0 & & & \\ \hline 15 & 12,1 & & 0,7 \\ \hline 16 & 6,8 & & & 8,1 \\ \hline 17 & 3,5 & 27,1 & & \\ \hline 18 & 6,1 & & & \\ \hline 19 & 34,4 & & & \\ \hline 20 & & 0,5 & 13,6 & & \\ \hline 21 & 9,3 & 9,1 & 6,0 & \\ \hline 22 & 2,5 & 2,7 & 3,2 & & \\ \hline 26 & & & & 73,1 & \\ \hline 19 & 34,4 & & & & \\ \hline 20 & & 0,5 & 13,6 & & \\ \hline 21 & 9,3 & 9,1 & 6,0 & & \\ \hline 22 & 2,5 & 2,7 & 3,2 & & \\ \hline 23 & & & & & \\ \hline 24 & & & & & & & \\ \hline 24 & & & & & & & & \\ \hline 26 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & & & \\ \hline 10 & & & & & \\ $	ALTURAS DIÁRIAS DE CHUVA (mm)										
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	DIA	fev/03	mar/03	abr/03	jan/04						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	1	0,4			27,7						
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	2				28,2						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	3				2,0						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	4		31,4								
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	5	0,4		13,2							
7 0,6 2,9 18,2 8 7,3 2,8 9 8,9 70,0 10 0,3 29,4 11 2,8 2,5 12 2,3 0,9 13 4,6 1,2 14 33,0 15 15 12,1 0,7 16 6,8 8,1 17 3,5 27,1 18 6,1 19 19 34,4 20 20 0,5 13,6 21 9,3 9,1 6,0 22 2,5 2,7 3,2 23 24 24,5 26 73,1 34,1 28 3,0 28,3 29 3,1 30 31 31 31,1	6	0,2	0,9								
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	7		0,6	2,9	18,2						
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	8		7,3		2,8						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	9		8,9		70,0						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	10		0,3		29,4						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	11		2,8	2,5							
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	12		2,3	0,9							
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	13	4,6			1,2						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	14	33,0									
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	15	12,1			0,7						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	16	6,8			8,1						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	17	3,5	27,1								
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	18	6,1									
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	19	34,4									
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	20		0,5	13,6							
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	21	9,3	9,1	6,0							
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	22	2,5	2,7	3,2							
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	23										
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	24				24,5						
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	25				70.4						
27 34,1 28 3,0 28,3 29 3,1 30 31 Total 113,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1	26				73,1						
28 3,0 28,3 29 3,1 30 31 Total 113,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1	27				34,1						
29 3,1 30 31 Total 113,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1	28		3,0		28,3						
30 31 Total 113,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1	29				3,1						
Total 113,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1	30										
I otal I 13,3 96,9 42,3 351,4 % do ano 8,48 7,25 3,17 20,17 Max 34,4 31,4 13,6 73,1		110.0	06.0	40.0	254 4						
Max 34,4 31,4 13,6 73,1		113,3	90,9 7 05	4∠,3 2 4 7	351,4						
IVIDX 34,4 31,4 13,0 73,1	% do ano Mox	0,40 24 4	1,20 21 4	3,17 12 C	20,17 72 4						
	Fonte: C	34,4 EADLA - E	31,4 Pio Claro	13,0	13,1						

TABELA 10. Quantidade diária de chuva, em milímetro, no município de Rio Claro, nos meses de fevereiro, março e abril de 2003 e janeiro de 2004.

TABELA 11 – Soma dos comportamentos observados nos ninhos N1, N2 e N3. O ninho N1 possuía 37 indivíduos e foi observado por 40 horas. O ninho N2 possuía 16 indivíduos e N3 possuía 10, sendo ambos observados por 35 horas.

NINHOS	N1	N2	N3						
Forragem de líquido	AOLADONA	80	85	20					
Forragem de presa		14	31	17					
Coleta de fibra vegetal		15	30	0					
Viagem infrutífera		28	32	57					
		20	02	01					
		106	100	55					
		120	109	55 02					
		80	144	92					
l ransferir presa de adulto para outro		3	12	10					
Dividir presa com outro aduito		10	21	8					
Mastigar presa	~	14	38	28					
Receber	Presa	16	59	30					
	Líquido	40	73	10					
Oferecer presa para larva		20	51	11					
Oferecer alimento líquido para larva		28	43	12					
Larvifagia		1	2	8					
Oofagia		0	0	0					
Tamborilamento com antenas	0	0	6						
INSPEÇÃO E MANU	TENÇAO DO NINHO	140	236	177					
Verificar células esfregando o gáster		0	1	4					
Iniciar nova célula		4	2	0					
Aumentar células		38	78	ů 0					
Dividir fibra vegetal c/ outro adulto		10	21	0					
Receber fibra vegetal		10	15	0					
Mastigar fibra vegetal		0	45	0					
		9	22	11					
Aplicar secreção ao pedunculo		1	23	11					
Aplicar secreção bucar ao ninho		0	40	32					
Aplical secreção gastral ao hinho		12	0	0					
Destruir ceiulas		0	0	0					
Limpar celulas		2	2	6					
Por agua nas celulas		0	3	0					
Ventilar o hinno		0	0	16					
INTERAÇÃO DE DO	MINÂNCIA								
Comport. de dominância	Vibrar gaster	117	101	80					
	Confronto	4	3	4					
	Ataque físico	47	35	55					
Comport. de subordinação		43	43	60					
Ovipositar		8	3	2					
	AWENTUS	0706	2005	2245					
Permancer imovel no ninno	2/96	3225	2315						
Auto impeza corporal	107	40	179						
Alogrooming	0	1	52						
Dar alarme		26	0	24					
Andar no ninho		133	74	48					
Retirar larvas, sem larvifagia		0	1	0					
Inserir abdome na célula sem botar		0	0	0					

FIGURAS





FIGURA 1. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N1, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores de concentração de secreção glandular (%) de cada indivíduo.





FIGURA 2. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N1, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores dos diâmetros médios das células secretoras de cada indivíduo.





FIGURA 3. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N2, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores de concentração de secreção glandular em porcentagem de cada indivíduo.





FIGURA 4. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N2, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores dos diâmetros médios das células secretoras de cada indivíduo.





FIGURA 5. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N3, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores de concentração de secreção glandular em porcentagem de cada indivíduo.





FIGURA 6. Gráfico da análise de componentes principais (PCA) do ninho N3, gerado a partir dos três eixos mais representativos obtidos nos cálculos de correlação realizados pelo programa PC-Ord. Quanto mais próximos, maior a relação comportamental entre os indivíduos dispostos no gráfico. Os planos A e B, juntos, representam uma única figura tridimensional. Os triângulos indicam a posição exata de cada indivíduo. Também foram adicionados os valores dos diâmetros médios das células secretoras de cada indivíduo.



FIGURA 7. Diferentes aspectos das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* coradas com Verde de Metila-Pironina. (A) Células com características encontradas na maioria dos indivíduos analisados, apresentando coloração periférica mais acentuada e núcleos bem desenvolvidos. (B) Células apresentando grande concentração de vacúolos citoplasmáticos.
(C) Glândulas apresentando células com desenvolvimento assicrônico. ci - citoplasma; n - núcleo; nu - nucléolo; va - vacúolo.



Figura 8. Faixas de atividade glandular encontrado nos três ninhos estudados, medidas pela concentração de secreção glandular. Cada ponto representa as glândulas hipofaríngeas de um indivíduo. Os ninhos apresentavam algumas diferenças entre si: o N1 (n=37 vespas) encontrava-se na fase de final de ciclo na época da coleta das vespas, tendo sido observado entre fevereiro e abril; N2 (n=16 vespas) e N3 (n=10 vespas) são da mesma época (observados de 6 a 13 de janeiro) e encontravam-se em fase de pós-emergência, sendo que N2 era uma colônia bem ativa com crescimento positivo e N3 uma colônia conturbada devido à troca da vespa dominante.

DISCUSSÃO

O ajustamento dos comportamentos numa sociedade de insetos pode envolver vários fatores casuais, como diferenças de hábitos individuais, relacionamento social, estado da cria e recursos disponíveis (alimento e material de construção). Alguns desses fatores afetam, igualmente, todos os membros da colônia, enquanto outros acarretam na diferenciação de comportamento e, posteriormente, determinam a divisão de trabalho, como ocorrem em uma série de sociedades animais (THERAULAZ, 1990).

No presente estudo, observou-se que a divisão de trabalho em sociedades mais primitivas, como *Polistes*, pode ser mais complexa, devido às inúmeras semelhanças que ocorrem entre castas e sexos. Assim, as análises multivariadas foram aqui empregadas para se tentar definir grupos com o máximo de afinidade comportamental existente. Estas análises já foram utilizadas em estudos prévios com outras espécies de Vespidae como *Polistes dominulus* (THERAULAZ *et al.*, 1990 – apud THERAULAZ, 1990) *Ropalidia marginata* (GADAKAR & JOSHI, 1983), assim como em estudos de polietismo na formiga *Neoponera apicalis* (FRESNEAU & DUPUY, 1988).

Após determinar os comportamentos das vespas, observou-se que o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não parece estar estritamente relacionado com uma tarefa social específica, como ocorre em algumas abelhas (COSTA, 2002). Isto ficou caracterizado devido ao fato destas glândulas apresentarem-se bem desenvolvidas em vespas que podem ser consideradas, comportamentalmente, diferentes, assim como algumas glândulas, que tiveram

desenvolvimento muito variado, foram encontradas em vespas consideradas, comportamentalmente, semelhantes. Estas características ocorreram em todos os ninhos estudados.

Pôde-se, no entanto, inferir que as glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não estão envolvidas com as atividades de construção do ninho, devido ao fato do ninho N3 não ter apresentado este comportamento durante todo o período de observação e por seus integrantes apresentarem glândulas hipofaríngeas desenvolvidas. A certeza desta informação só ficou comprometida, porque, mesmo nestas condições, o ninho em questão apresentou inúmeros indivíduos que exerceram a atividade de aplicar secreção no ninho. Assim, a secreção aplicada no ninho poderia também ser a secreção utilizada para umidificar a polpa vegetal colhida para construção. De qualquer forma, as glândulas mais desenvolvidas não estavam presentes nos indivíduos que exerceram este comportamento com maior freqüência, havendo, ainda, glândulas desenvolvidas em vespas que nem exerceram esta atividade. Assim, parece provável que realmente esta não seja a função primordial destas glândulas.

Com o auxílio da análise de componentes principais, certas vespas observadas nos ninhos N1, N2 e N3 puderam ser devidamente classificadas comportamentalmente. Algumas destas foram denominadas de forrageiras típicas, enquanto outras foram consideradas mais generalistas. Também se diferenciaram as vespas sedentárias e as dominantes. Entretanto, mesmo com a definição destes grupos, o desenvolvimento glandular dentro de cada um foi bem variável, sendo este fato constatado tanto com relação à concentração de secreção, quanto ao diâmetro celular médio.

Com relação ao comportamento de forrageamento, algumas vespas coletavam todos os tipos de alimento e materiais para o ninho, enquanto outras pareciam ser especializadas na coleta de apenas um item. Entretanto, em determinadas situações, algumas vespas que apresentaram o comportamento de forrageamento, podem não ser consideradas como indivíduos tipicamente ativos, que atuam efetivamente no desenvolvimento da colônia. Theraulaz (1990) realizou experimentos com vespas confinadas e observou que durante as saídas de forrageamento, cerca de 50% das vespas ficavam inativas a maior parte do tempo, realizando, esporadicamente, coleta de néctar. Além disto, estas mesmas forrageiras continuavam inativas quando voltavam para o ninho, ficando, principalmente, em sua face posterior. Em alguns aspectos, portanto, estas vespas forrageiras poderiam ser comparadas com as sedentárias.

Entre as vespas que possuíam glândulas em estágio de degeneração, também foram observadas características comportamentais distintas. Já em abelhas, os indivíduos que apresentaram glândulas em estágio de degeneração são aqueles envolvidos em atividades de forrageamento, onde o principal fator responsável pela regressão glandular está relacionado com o abandono do cuidado da cria (SILVA DE MORAES & BOWEN, 2000). Em *P. versicolor*, foram encontradas diversas vespas que não apresentaram relação expressiva com a cria e possuíam glândulas ativas. Além disto, em algumas glândulas em estágio de degeneração, foi observada a presença de secreção, mostrando que estas ainda podem realizar alguma atividade secretora.

O indivíduo **A** do ninho N2 também apresentou vacúolos em suas células secretoras, entretanto, este indivíduo era o mais jovem do ninho, com seis dias de idade. Alguns estudos com *Melipona* mostraram que, em alguns aspectos, às glândulas de abelhas em estágio de degeneração se assemelham às glândulas de abelhas recém emergidas, devido à presença de alguns vacúolos citoplasmáticos (CRUZ-LANDIM, 1967; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1986). De qualquer forma, os recém emergidos dos outros ninhos não apresentaram tais características, portanto, o apresentado para as abelhas não se aplicou às vespas aqui estudadas, com exceção do indivíduo **A**.

Por sua vez, os indivíduos recém-emergidos foram os que tiveram desenvolvimento glandular mais semelhante entre si, justamente pela ausência de comportamentos. Em geral, estes indivíduos apresentaram glândulas com baixa concentração de secreção e diâmetro das células secretoras semelhante.

Um fato que ficou claro no experimento, foi no tocante à diferenciação entre as glândulas dos machos e das fêmeas. No ninho N3, foram coletados dois machos com poucos dias de idade adulta. Suas glândulas hipofaríngeas não apresentaram desenvolvimento considerável, entretanto, constatou-se que estes também não haviam realizado nenhuma atividade de forma expressiva. Algumas glândulas de machos, anteriormente adquiridas sem a observação dos comportamentos, eram similares às da maioria das fêmeas, mostrando-se ativas e com acúmulo de secreção. Observou-se também, que durante as análises dos comportamentos, além dos dois machos jovens

coletados, outros machos, que estavam presentes no ninho e depois desapareceram, apresentaram determinados comportamentos muito similares aos das fêmeas.

Giannotti (2002) observou em *Polistes lanio lanio* que os machos permanecem, em média, apenas 10 dias no ninho, mas neste período eles se integram à vida social da colônia e passam a desempenhar determinadas tarefas, inclusive aquelas que envolvem contato com as larvas. Em *Polistes fuscatus* (HUNT & NOONAN, 1979) e *Polistes ferreri* (SINZATO *et al.*, 2003) observou-se que os machos também apresentaram comportamentos típicos das fêmeas. Deste modo, a função das glândulas hipofaríngeas nas fêmeas e nos machos parece ser a mesma, não havendo, portanto, diferenciação sexual relacionada ao seu desenvolvimento. Em *Scaptotrigona postica* foi ainda observado que, os padrões eletroforéticos e a ocorrência de enzimas nos extratos glandulares de machos mostraram vários pontos de semelhança com as operárias, sugerindo função semelhante entre as glândulas de ambos (COSTA, 2002).

Um outro aspecto observado nas colônias estudadas foi também observado por Carneiro (1991) que, analisando as áreas celulares e nucleares das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor*, verificou que o maior desenvolvimento estava presente nas substitutas das fêmeas dominantes, enquanto nas dominantes ativas, o desenvolvimento glandular estava entre os mais baixos. O mesmo foi verificado nas colônias N2 e N3 com as fêmeas que, no gráfico de PCA, ficaram dispostas mais próximas à dominante do ninho, ou seja, as que seriam as prováveis futuras dominantes. Isto sugere que a existência de glândulas hipofaríngeas desenvolvidas é uma das condições que contribuem para a fêmea tornar-se dominante, ao menos inicialmente. No caso de N1 este fato não foi constatado, já que a vespa que mais se aproximou da dominante no gráfico, apresentou glândulas com concentração muito baixa. Entretanto, este ninho estava em fase final de ciclo. Observou-se, portanto, que a hierarquia linear estava muito abalada nesta colônia, sendo que, provavelmente, outras fêmeas com potencial para se tornarem dominantes já haviam saído do ninho para fundar suas próprias colônias (GOBBI, 1977; CARNEIRO, 1991).

Os três ninhos estudados apresentaram suas peculiaridades. As faixas de desenvolvimento glandular, encontradas nas três colônias estudadas, também foram diferentes entre elas, sendo que os maiores índices de desenvolvimento glandular ocorreram no ninho mais promissor (N2). Aparentemente, o desenvolvimento acentuado

das glândulas neste ninho ocorreu devido ao alto fluxo de presas aí observado, que chegou a atingir o dobro dos outros dois ninhos. Esta afirmação está relacionada com o fato da ingestão de proteínas ser importante para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, já que os componentes de sua secreção são glicoprotéicos (ver capítulo 1). Nas abelhas, o principal responsável pela alta produção de secreção das glândulas hipofaríngeas na fase de nutridora é a alimentação rica em pólen, que é a principal fonte de proteínas desses insetos (CRAILSHEIM & STOLBERG, 1989). Deste modo, mesmo com a presença de alguns indivíduos que não realizam comportamentos relacionados com coleta ou mastigação de presas, é perfeitamente possível que quando este alimento é trazido para o ninho, possa haver um fluxo de proteínas entre indivíduos, realizado devido ao comportamento da trofalaxia, tanto entre adultos quanto entre adultos e larvas. Isto, no entanto, seria apenas um motivo para afirmar que a alimentação protéica é fundamental para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, não tendo este fato, necessariamente, alguma relação com sua função.

Entretanto, a aquisição de proteínas por meio de presas capturadas e divididas entre os indivíduos de uma colônia, promove algumas discussões, devido ao aparelho digestório das vespas não ser adaptado para a ingestão de alimento sólido de dimensões muito grandes, já que ocorre um pronunciado estreitamento do corpo entre as regiões do tórax e abdome (HUNT, 1995). No entanto, o comportamento de macerar presas poderia ser um importante meio de aquisição de proteínas, já que, durante esse processo, as vespas poderiam retirar boa parte dos nutrientes da hemolinfa e de células maceradas da presa, antes de oferecê-la para as larvas. Sendo assim, as glândulas hipofaríngeas poderiam ter alguma função na produção de enzimas digestivas. Estudos com estas enzimas revelaram a presença de inúmeras proteases e carboidrases no trato digestório dos insetos. Os pHs mais baixos encontrados no aparelho digestório destes animais estavam em sua região proximal, na maioria dos grupos estudados. Estudos com Hymenoptera foram realizados apenas com larvas de abelhas, sendo que, o pH encontrado ao longo do aparelho digestório foi decrescente, da região anterior para a posterior variando de 6,0 a 5,6 (TERRA & FERREIRA, 1994). No caso de uma vespa adulta, seria compreensível se a digestão de material protéico tivesse início logo na região bucal, já que as vespas não conseguem engolir partículas sólidas grandes. Corroborando com esta hipótese, foi verificado durante as observações que, após a coleta das presas, estas eram mastigadas por tempos relativamente longos. Deste modo, a secreção das glândulas hipofaríngeas poderia atuar na produção de enzimas digestivas, havendo a digestão prévia do alimento antes de repassá-lo para as larvas e, além disto, se realmente ocorre a ingestão da hemolinfa das presas, poderia também haver o aproveitamento maior deste alimento devido a mistura de proteases. Outro fator que também deve ser levado em consideração está relacionado com a morfologia da placa hipofaríngea em *P. versicolor*. Nesta estrutura estão presentes inúmeras projeções cuticulares, que ficam muito próximas às mandíbulas, e podem auxiliar na maceração das presas (ver Fig. 4C e 4D da introdução geral) (BRITTO *et al.*, 2004). Elas atuariam como uma espécie de aparelho triturador de alimento, indicando que a cavidade bucal destas vespas teria importante função na digestão das presas coletadas por elas.

Outra questão relacionada com esta hipótese ocorre no tocante às substitutas da dominante. Nestas fêmeas, a aquisição de proteínas seria um fator fundamental para o rápido desenvolvimento ovariano. Assim, com as glândulas hipofaríngeas atuando na produção de enzimas digestivas, estas vespas poderiam otimizar a aquisição destes nutrientes conforme vão macerando o alimento.

Apesar das glândulas hipofaríngeas de abelhas produzirem enzimas digestivas para carboidratos, como a invertase, Terra & Ferreira (1994) relatam que os hábitos alimentares podem ser mais importantes para a adaptação do trato digestório na produção de novas enzimas, do que a própria filogenia dos insetos.

Segundo Montagner (1964; 1966) é possível que uma glândula, tal como a hipofaríngea, secrete alguma substância que possa proporcionar a melhor assimilação da fonte de alimento. Os resultados atuais levam a crer que talvez as glândulas hipofaríngeas realmente não possuam uma função social específica, como já foi sugerido por Landolt & Akre (1979) para *Vespula* e *Dolichovespula*. Downing & Jeanne (1983) também estudaram as glândulas hipofaríngeas de *Polistes fuscatus*, comparando-as entre vespas dominantes e subordinadas de populações naturais e criadas artificialmente. Nas vespas criadas em laboratório, foram estudados indivíduos mantidos solitários e em pares, para se testar a influência dos comportamentos de agressividade sobre as glândulas. Verificou-se que as glândulas hipofaríngeas não apresentaram diferenças significativas entre as vespas estudadas, concluindo-se que as glândulas hipofaríngeas não devam possuir papel social nas colônias desta espécie.

Assim, apesar das diferenças encontradas entre as glândulas de *Polistes veriscolor*, estas não se mostraram relacionadas com nenhum comportamento específico. Além disto, nas últimas análises, ficou claro que, no ninho N2 (o mais produtivo), as glândulas hipofaríngeas apresentaram maior faixa de desenvolvimento, apesar das diferenças comportamentais. Deste modo, os dados mostram que esta glândula pode ser encontrada com maior ou menor grau de desenvolvimento numa colônia e, que tal glândula não está relacionada com alguma atividade social específica.

Como esta glândula está mais ou menos desenvolvida, independente da idade, sexo ou característica comportamental, a melhor proposta é a de que ela seja uma glândula relacionada a uma atividade essencial, comum a todos os indivíduos da colônia, tal como a ingestão de alimentos. Se assim pensarmos, esta glândula deve estar relacionada à produção de enzimas e/ou muco para ser agregado durante a maceração. A hipótese da produção de enzimas digestivas é, ainda, reforçada pelos resultados obtidos nas análises histoquímicas (Capítulo 1) e ultra-estruturais (Capítulo 3).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- 1. As glândulas hipofaríngeas de *Polistes versicolor* atuam, principalmente, na produção de substâncias glicoprotéicas.
- As características morfológicas, histoquímicas e citoquímicas demonstram que, aparentemente as glândulas não atuam na produção de substâncias de comunicação, como feromônios.
- Não existe relação definida entre o desenvolvimento glandular e a idade das vespas.
- 4. A regressão das glândulas hipofaríngeas parece ser um fator totalmente relacionado com a senescência e o stress pelo qual cada vespa passa durante sua vida, independente da idade propriamente dita. A especialização glandular voltada para alguma atividade social, com posterior regressão e morte programada das células secretoras, assim como ocorre em abelhas, não foi observada em *P. versicolor*. Além disto, a estratégia de regressão parece não ter sentido para estas vespas, já que suas glândulas não são tão grandes quanto à das abelhas e, além disto, o modo de vida de ambas as espécies ocorre de forma totalmente distinta.
- 5. Um fato importante observado nos estudos de *Polistes* desde 1970 é que o sistema social deste gênero é flexível depende das condições ecológicas locais. Esta flexibilidade atribuída ao sistema social destes insetos, também pode ser observada no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, pois as mesmas não

apresentaram um padrão fixo de desenvolvimento e regressão relacionado com algum comportamento social específico.

- As células das glândulas hipofaríngeas de *P. versicolor* não armazenam qualquer tipo de substrato para a produção de sua secreção. A importação dos componentes da secreção deve ser direta e contínua.
- 7. Em muitas espécies de abelhas sabe-se que as glândulas hipofaríngeas estão envolvidas com a produção de alimento para as larvas e outros indivíduos da colônia. Entretanto, esta seria uma característica apomórfica (derivada) herdada nas espécies onde a organização social é mais complexa. Nos Hymenoptera solitários ou nos sociais mais primitivos, acredita-se que a principal função destas glândulas esteja relacionada com a produção de enzimas digestivas, sendo esta sua característica plesiomórfica (primitiva).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZELIUS, B.A. 1992. Section staining for electron microscopy using tannic acid as a mordant: a simple method for visualization of glycogen and collagen. **Micros. Res. Tech.** 21:65-72

AKRE, D. 1982. Social wasps. Em: HERMANN, H.R. (ed.) Social Insects. Academic Press, New York. v.4. pp.1-105

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. 1997. **Biologia molecular da célula.** 3ªed. Editora Artes Médicas Sul Ltda. – Porto Alegre. 1294p.

AMARAL, J.B.; CAETANO, F.H. 2005. The hypopharyngeal glands of leaf cut ants (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiol.** 46(3):515-524

ANGERMÜLLER, S.; FAHIMI, H.D. 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an exellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.**, 14:823-835

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MELLO, M.L.S. 1986. Detecção de atividade fosfatásica alcalina em túbulos de malpighi de *Triatoma infestans* Klug. Cienc. Cult., 38(11):1870-1874.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MELLO, M.L.S. 1997. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. **Cytobios**, 92:23-28

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MELLO, M.L.S. 1998. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. **Cytobios**, 93: 33-42.

BANCROFT, J.D., STEVEN, A. 1990. Theory and Practice of Histological Tequiniques. 3rd ed. Churchill Livingstone, New York, 704p.

BILLEN, J.; MORGAN, E.D. 1998. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. Em: MEER, R.K.V.; BREED, M.D.; WINSTON, M.L.; ESPELIE, K.E. (eds.). Pheromone communication in social insects: Ants, Wasps, Bees and Termites. Westview Press, Boulder. p. 3-33

BORDAS, M.L. 1895. Appareil glandulaires des hyménopteres. Ann. Sci. Nat. Zool., 19:1-362.

BOWEN, I.D. 1997. Apoptosis: an altruistic cell death. Cancer Research Wales Reports, 12-15.

BOWEN, I.D.; BOWEN, S.M. 1990. **Programed cell death in tumours and tissues**. Chapman and Hall, London and New York. 268p.

BOWEN, I.D.; HOLLANDER, J.E.; LEWIS, G.H.J. 1982. Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian Polycelis tenuis. **Differentiation**, 21:160-170

BRAVERMAN, E.R.; BLUM, K.; BLUM, K.; SMAYDA, R.; PFEIFFER, C.C. 1997. The Healing Nutrients Within: Facts, Findings and New Research on Amino Acids. Keats Publishing, New Canaan. 532p.

BRETAUDIERE, J.P.; SPILMAN, T. 1984. Alkaline Phosphatases. Em: BERGMEYER, H.U. Methods of Enzimatic Analysis. 3th ed. Verlag Chemie, Florida. v.4, p.75-82

BRITTO, F.B.; CAETANO, F.H.; SILVA DE MORAES, R.L.M. 2004. Comparative analysis of morphological, structural and morphometric patterns of *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) hypopharyngeal glands. **Neotrop. Entomol.**, 33(3):321-326.

BRITTO, F.B.; CAETANO, F.H. 2005. Histochemical characterization and secretory activity of the hypopharyngeal glands in the primitive social wasp *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera; Vespidae). **Sociobiol.**, 46(3):637-646.

BROWERS, E.V.M. 1982. Measurement of hyporpharyngeal glands activity in the honeybee. **J. Apic. Res.**, 21:193-198.

BROWERS, E.V.M. 1983. Activation of the hypopharyngeal glands of honeybees in winter. J. Apic. Res., 22:137-141

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

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. 2002. Formigas: biologia e anatomia. Topázio, Araras. 131p.

CARNEIRO, A. 1991. Determinação do sistema de substituição de fêmeas dominantes em colônias de *Polistes* (Vespidae, Polistinae). Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 206p. CARPENTER, J.M. 1993. Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): two views of Africa and South America. Em: GOLDBLATT, P. (ed.). **Biological relationships between Africa and South America.** Yale University, New Halen. p. 139-155.

CLARKE, P.G.H. 1990. Development cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat. Embryol.**, 181:195-206.

COLGAN, M. 1993. **Optimum sports nutrition: your competitive edge.** Advanced Research Press, New York. 562p.

COSTA, R.A.C. 1996. Morfologia e funcionamento das glândulas hipofaríngeas em operárias, machos e rainhas de *Scaptotrigona postica* Latreile, 1804 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 110p.

COSTA, R.A.C. 2002. Glândulas hipofaríngeas. Em: CRUZ-LANDIM, C.; ABDALA, F.C. (eds.). Glândulas exócrinas de abelhas. FUNPEC, Ribeirão Preto – SP. 90-109.

COSTA, R.A.C. 2002b. Análise química e enzimática das glândulas hipofaríngeas e alimento larval de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Apinae). Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 151p.

COSTA, A.M.F.; CRUZ-LANDIM, C. 1977. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar dos Apidae (Hymenoptera). **Rev. Brasil. Biol.**, 37(3):649-663.

COSTA, R.A.C.; CRUZ-LANDIM, C. 1999. Electrophoretical polypeptide pattern of hypopharyngeal glands extracts from workers and males of *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Neth. J. Zool.**, 49(3): 157-166.
COSTA, R.A.C.; CRUZ-LANDIM, C. 2000. Comparative study of the ultrastructure and secretory dynamic of hypopharyngeal glands in queens, workers and males of *Scaptotrigona postica* Latreile (Hymenoptera, Apinae, Meliponinae). **Biocell**, 24(1): 39-48.

COSTA, R.A.C.; CRUZ-LANDIM, C. 2001a. Distribution of acid phosphatases in the hypopharyngeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille: an ultrastructural cytochemical study. **Histochem. J.**, 33:653-662.

COSTA, R.A.C.; CRUZ-LANDIM, C. 2001b. Enzimes present in the thoracic gland extracts from workers and males of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiol.**, 37(3b):563-569.

COSTA, R.A.C.; CRUZ-LANDIM, C. 2002. Enzimes in the hypopharyngeal gland extracts from workers of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) related to food storing in the colony. **Sociobiol.**, 40(2):413-420.

COSTA-LEONARDO, A.M. 1981. Ultra-estrutura do ciclo secretor das glândulas mandibulares de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Vespidae). **Rev. Bras. Biol.** 41: 307-316.

CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. 1986. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of hypopharyngeal glands in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **J. Insect Physiol.**, 35:595-602.

CRUZ-LANDIM, C. 1967. Estudo comparativo de algumas glândulas de abelhas (Hym., Apoidea) e respectivas implicações biológicas. **Arq. Zool**., 15:177-290.

CRUZ-LANDIM, C.; COSTA, R.A.C. 1998. Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. J. Comp. Biol., 3(2):151-153

CRUZ-LANDIM, C.; HADEK, R. 1969. Ultrastructure of *Apis mellifera* hypopharyngeal gland. International Union for the Study of Social Insects, 6. Bern. Proceedings. University of Bern. 121-130

CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, M.L.S. 1967. The pos-embryonic changes in *Mellipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym., Apoidea). II. Development of the salivary glands system. **J. Morphol.**, 123:481-502.

CRUZ-LANDIM, C.; SAENZ, M.H.P. 1972. Estudo comparativo de algumas glândulas dos Vespoidea (Hym.) **Papéis Avulsos Zool.**, 24:251-263.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. 1973. Degenerative structures in the hypopharyngeal gland from aging bees (*Melípona quadrifasciata anthidioides* Lep.). **Rev. Biol.**, 9(1-4):157-168.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; COSTA-LEONARDO, A.M. 1986/87. Ultra-estrutura das glândulas hipofaríngeas de *Melípona quadrifasciata anthidioides* (Lep.). **Naturalia**, 11/12:89-96

CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R.D.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; CAVALCANTE, V.M. 2002. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Intranuclear acid phosphatase. **Genet. Mol. Res.** 1(2):131-138.

CUMBER, R.A. 1951. Some obsevation on the biology of the Australian wasp *Polistes humilis* (Fabricio) (Hymenoptera, Vespidae) in North Auckland (New Zeland) with special reference to the nature of the worker cast. **Proc. R. Ent. Soc.** Lond., 26:11-16.

DEBACH, P. 1974. **Biological control by natural enemies**. Cambridge University Press, London. 323p.

DELTOUR, R.; FRANSOLET, S.; LOPPES, R. 1981. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. J. Cell Sci., 47:77-89.

DESEYN, J.; BILLEN, J. 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypophayngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** 36: 49-57.

DIXON, S.E.; SHUEL, R. 1963. Studies in the mode of action of royal jelly in honey bee development. III. The effect o experimental variation in diet on growth and metabolism of honey bee larvae. **Can. J. Zool.**, 41:733-739.

DOWNING, H.A.; JEANNE, R.L. 1983. Correlation of season and dominance status with activity of exocrine glands in *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). J. Kans. Entomol. Soc., 56(3): 387-397.

DOWNING, H.A.; JEANNE, R.C. 1986. Intra and interspecific variation in nest architecture in the paper wasp *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). **Insectes Soc.**, 33:422-443

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. 1973. Muscle Biopsy: a modern approach. W.B. Saunders Company, London. 472p.

EDWARDS, R. 1980. Social wasps: their biology and control. Rentokil, Sussex, UK. 398p.

ENGELS, W. 1990. Social insects: an evolutionary approach to castes and reproduction. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294p.

EVANS, H.E. 1958. The evolution of social life in wasps. **Proc. of International Congress of Entomology**, 10. 449-457.

FORBES, J.; McFARLANE, A.M. 1961. The comparative anatomy of digestive glands in the female castes and the male of *Camponotus pennsylvanicus* De Geer (Formicidae, Hymenoptera). J. N. York Ent. Soc. 69:92-103.

FREE, J.B. 1980. A organização social das abelhas (Apis). EDUNESP, São Paulo (Temas de Biologia, v.13). 79p.

FRENEAU, D.; DUPUY, P. 1988. A study of polyethism in a ponerine ant: *Neoponera apicalis* (Hymenoptera, Formicidae). **Anim. Behav.**, 36:1389-1399.

GADAKAR, R.; JOSHI, N.V. 1983. Quantitative ethology of social wasps: timeactivity budgets and caste differentiation in *Ropalidia marginata* (Lep.) (Hymenoptera, Vespidae). **Anim. Behav**., 31:26-32.

GAMA, V. 1978. Desenvolvimento pós-embrionário das glândulas componentes do sistema salivar de *Camponotus (Myrmotrix) rufipes* (Hymenoptera: Formicidae). **Arq. Zool.**, 29:133-183.

GAMA. V.O. 1985. O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius). **Rev. Bras. Biol.**, 45(3):317-359.

GIANNOTTI, E. 2001. Etograma comparativo de entre *Polistes* e *Mischocyttarus*. **Anais de Etologia (XIX Congresso Bras. de Etologia)**., 27-29.

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

GIANNOTTI, E.; MACHADO, V.L.L. 1999. Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymeoptera, Vespidae). **Rev. Bras. Entomol.**, 43(3/4):185-190.

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

GONTIJO, A.M.M.C. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVATORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental.** Editora da ULBRA, Cidade. p. 247-279.

GRACIOLI, L.F.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; CRUZ-LANDIM, C. 1999. Electrophoretical studies on protein of hypopharyngeal glands of aged *Apis mellifera* (Hymoptera, Apidae) workers induced to return to brood-feeding activity. **Naturalia**, 24:9-17.

GRAF, R.; RAIKHEL, A.S.; BROWN, M.R.; LEA, A.O.; BRIEGEL, H. 1986. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). Cell Tiss. Res., 245:19-27.

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

HALBERSTAD, K. 1980. Eletrophoretische untersuchungen zur sekretionstätigkeit der hypopharynxdrüse der honigbiene *Apis mellifera* L. **Insectes Soc.** 27:61-77.

HAERVEY, W.R., BLANKEMEYER, J.T. 1975. Epithelial structure and function, Em: MARAMOROSCH, K.; SHOPE, R.E. (eds.) **Invertebrate Immunity.** Academic Press, New York. p. 03-22.

HAYAT, M.A. 1972. **Basic electron microscopy techniques.** Van Nostrand Reinhold, New York. 119p.

HUANG, Z.Y.; OTIS, G.W. 1989. Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insectes Soc**., 36(4):264-276.

HUNT, J.H. 1995. Nourishment and evolution of the social vespidae. Em: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. **The social biology of wasps.** 2ed. Cornell University, London. 668p.

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

HUSSEIN, M.A.; BOWEN, I.D.; LEWIS, G.H.J. 1990. The hiostochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larval using a methacrylate embedding technique. **Cell Biol. Internat.**, 14(9)775-781.

JONES, G.W.; BOWEN, I.D. 1980. The fine structural localization of acid phosphatase in pore cells of embryonic and newly hatched *Deroceras reticulatum* (Pulmonata: Stylonimatophora). **Cell Tissue Res.**, 204:253-265.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. 1971. **Histologia básica.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 440p

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

KNECHT, D.; KAATZ, H.H. 1990. Patterns of larval food produciton by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. **Apidologie**, 21: 457-468.

LANDOLT, P.J.; AKRE, R. 1979. Ocurrence and location of exocrine glands in some social Vespidae (Hymenoptera). **Ann. Entoml. Soc. Am.**, 72:141-148.

LAUER, S.M.S. 1975. Etrutura macro e microscópica das glândulas do sistema salivar nas castas de *Bombus atratus* Franklin, 1913 (Hymenoptera, Apidae). Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 74p.

LOVE, R.; STUDZINSKI, G.P.; WALSH, R.J. 1969. Nuclear, nucleolinar and cytoplasmatic acid phosphatases in cultured mammalian cells. **Exptl. Cell Res.**, 58:62-72

MacRAE, E.K.; MEETZ, G.D. 1970. Electron microscopy of the ammoniacal silver reaction for histones in the erythropoietic cells of the chick. **J. Cell. Biol.**, 45:235-245.

MAURIZIO, A. 1959. Breakdown of sugars by inverting enzymes in the pharyngeal glands and midgut of the honeybee. 2. Winter bees (Carniolan and Nigra). **Bee World**, 40(11): 275-283.

McMANUS, J.F.A. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, 158, 202

MOFFITT, P. 1994. A methyl-green-pyronin technique for demonstrating cell death in the murine tumour S180. **Cell Biol. Int.,** 18(6), 677--679

MONTAGNER, H. 1964. Les chimes réactionelles que provoquent et maintiennente les contacts trophallactiques chez les guêpes socials. **C. R. Acad. Sci.**, Paris. 259:4148-4151.

MONTAGNER, H. 1966. Sur lê déterminisme dês castes femelles chez lês Guêpes du gentre *Vespa*. **C. R. Acad. Sci.**, Paris. 263:785-787.

MOSS, D.W. 1984. Acid Phosphatases. Em: BERGMEYER, H.U. Methods of Enzimatic Analysis. 3th ed. Verlag Chemie, Florida. v.4, p.92-106

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

NOIROT, C.; QUENNEDEY A. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. Ann. Rev. Entomol. 19: 61-80.

NUNES, E.T.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. 2006. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phospatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Exp. Parasitol.**, no prelo.

PARDI, L. 1948. Dominance order in *Polistes* wasps. Physiol. Zool., 21:1-13.

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

PEARSE, A.G.E.; SCARPELLI, D.G. 1958. Cytochemical localization of succinic dehydrogenase in mitochondria from *Periplaneta americana*. **Nature**, 181(4610):702-703.

PHILLIPS, S.A.; VINSON, S.B. 1979. Comparative morphology of glands associated with the head among castes of the red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren. J. Georgia Entomol. Soc., 15(2):215-226.

PREZOTO, F. 1996. Ação de Polistes (Aphanilopterus) simillimus Zikan, 1951
(Hymenoptera, Vespidae) no combate as pragas de Zea mays L. Dissertação (Mestrado em Zoologia): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 67p.

PREZOTO, F. 2001. Estudos biológicos e etológicos de *Polistes (Aphanilopterus) simillimus* Zikán, 1951. Tese (Doutorado em Zoologia): Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 112p.

QUENNEDEY, A. 1998. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. Em: HARRISSON, F.W.; LOCKE, M. (eds). Wiley Liss, New York. v. 11(A), p. 177-207.

REEVE, H.K. 1991. *Polistes*. Em: ROSS, K.S.; MATTHEWS, R.W (Eds.). **The social biology of wasps.** Cornell University Press, London, England. p. 99-148.

REYMENT, R. A.; JÖRESKOG, K. G. 1996. Applied Factor Analysis in the Natural Sciences. University Press, Cambridge. 383p.

RICHARDS, O.W. 1971. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Biol. Rev. (Cambridge)**, 45:483-528.

RICHARDS, O.W. 1978. The social wasps of teh Américas excluding the Vespinae. Britsh Museum (Natural History), London. 580p.

RICHARDS, O.W.; RICHARDS, M.J. 1951. Observation on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). **Trans. Ent. Soc. Lond.**, 102:1-170

ROBBINS, E.; BORUN, T.W. 1967. The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication. **Proc. Nat. Acd. Sci. U.S.A.**, 57:409

ROCHA, T. 2004. Caracterização histoquímica e determinação do ciclo secretor da glândula salivar do tórax de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 115p.

RYDER, T.A.; BOWEN, I.D. 1975. A method for fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. J. Histochem. Cytochem., 23:235-237.

SADAVA, D.E. 1993. Cell biology organelle structure and function. Joner and Bartlett Publishers, London. 698p.

SAENZ, M.H.P.; CRUZ-LANDIM C. 1972. Glândulas do sistema salivar em Sphecidae (Hym.). Arq. Inst. Biol., S. Paulo 39(1): 19-26.

SAUNDERS, J.W.; GASSELING, M.T.; SAUNDERS, L.C. 1962. Cellular death in morphogenesis of the avian Wing. **Dev. Biol.**, 5:147.

SCHWEICHEL, J.U.; MERKER, H.J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, 7:253-266.

SILVA DE MORAES, R.L.M. 1998. Morte cellular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 97p.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; BOWEN, I.D. 2000. Modes of cell death in hypopharyngeal glands of honey bee (*Apis mellifera* L.) Cell Biol. Internat., 24(10):737-743.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; CRUZ-LANDIM, C. 1984. Influência da densidade populacional no comportamento dos núcleos das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia**, 9:27-33.

SIMPSON, J.; RIEDEL, I.B.M.; WILDING, N. 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. **Journal of Apic. Res.**, 7(1):29-36.

SINZATO, D.M.S.; PREZOTO, F.; DEL-CLARO, K. 2003 The role of males in a neotropical paper wasp, *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Rev. Bras. Zoociências**, 5(1)89-100.

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

SPRADBERY, J. P. 1965. The social organization of wasp communities. Symp. Zool. Soc. Lond., 14: 61-96.

SZOLDERTZ, M.J.; CRAILSHEIM, K.A. 1993. Comparison of pollen consuption and digestive in honeybee. **J. Apic. Res**., 7(1):877-881.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109(1):1-62.

THERAULAZ, G.; PRATTE, M.; GERVET, J. 1990. Behavioural profiles in *Polistes dominulus* (Christ) wasp societies: a quantitative study. **Behaviour**, 113(3-4):223-250.

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

WEGMAN, R.; TORDET-COIDROIT, C. 1960. Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase by special inibition and activation. J. Histochem. Cytochem., 8:348-349.

WEST-EBERHARD, M. J. 1969. The social biology of Polistine wasps. Misc. Publs Mus. Zool. Univ. Mich., 140: 1-101.

YOKOSHIKAWA, K. 1963. Introductory studies in the life economy of Polistinae wasps. II. Superindividual stage. 2. Division of labour among workers. Japan. J. Ecol., 13:53-56

ZAKERI, Z.; BURSCH. W.; TENNISWOOD, M.; LOCKSHIN, R.A. 1995. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? Cell Death Differ., 2:87-96.

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

ZARA, F.J.; CAETANO, F.H.; CABRERA, A.C.G.; JAFFÉ, K. 2003. Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (*=Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. **Animal Biology**, 53(1):1-16

APÊNDICES

APÊNDICE 1



Marcação das vespas (A e B) e vespas marcadas no ninho (C).

APÊNDICE 2

CÓDIGO DO NINH	O: PERÍO	PERÍODO:às DATA://				
			1			1
	INDIVIDUOS					
ATIVIDADADE FORRAGEADORA						
Forragem de líquido						
Forragem de presa			_			
Coleta de fibra vegetal						
Viagem infrutifera						
ALIMENTAÇÃO						
Trofaláxis adulto-adulto						
Trofaláxis larva-adulto						
Transferir presa de adulto para outro						
Dividir presa com out						
Mastigar presa						
Receber	Presa					
	Líquido					
	Fibra vegetal					
Oferecer presa para la						
Oferecer alimento líquido para larva						
Larvifagia						
Oofagia						
ΙΝΩΡΕΩÃ Ο Ε ΜΑΝΙ/ΤΕΝΩÃ Ο ΡΟ ΝΙΝΙΙΟ						
					I	
Verificar células esfregando o gáster						
Receber fibra vegetal						
Iniciar nova célula						
Aumentar células						
Mastigar fibra vegetal						
Anlicar secreção ao pedúnculo						
Aplicar secreção hucal ao ninho						
Anlicar secreção gastral ao ninho						
INTERAÇÃO DE DOMINÂNCIA						
Comportamento de	Vibrar gaster					
dominância	Confronto					
	Ataque físico					
Comportamento de subordinação						
Ovipositar						
OUTDOS COMDODTAMENTOS						
Dermanaar imával na ninha						
Auto limpeza corporal						<u> </u>
Alogrooming			+			├ ───┤
Dar alarma						<u> </u>
						<u> </u>
Patirar larva sam larvitaria						
Inserir abdome na cálula som botar						
nisen audonie na ceruta selit botat						

Tabela de comportamentos utilizada para as análises dos espécimes (modificada de GIANNOTTI, 2001).

APÊNDICE 3

A análise das componentes principais não é sinônimo de analise fatorial ou análise dos fatores e essa confusão terminológica deve ser evitada. A primeira análise consiste numa transformação linear de "m" variáveis originais em "m" novas variáveis, de tal modo que a primeira nova variável computada seja responsável pela maior variação possível existente no conjunto de dados, a segunda pela maior variação possível restante e assim por diante até que toda a variação do conjunto tenha sido explicada. Na análise fatorial supõe-se que as relações existentes dentro de um conjunto de "m" variáveis seja o reflexo das correlações de cada uma dessas variáveis com "p" fatores, mutuamente não correlacionáveis entre si, sendo "p" menor que "m" (Reyment & Jöreskog, 1996).

A análise das componentes principais é, portanto, uma técnica de transformação de variáveis. Se cada variável medida pode ser considerada como um eixo de variabilidade, estando usualmente correlacionada com outras variáveis, esta análise transforma os dados de tal modo a descrever a mesma variabilidade total existente, com o mesmo número de eixos originais, porém não mais correlacionados entre si. Graficamente pode ser descrita como a rotação de pontos existentes num espaço multidimensional originando eixos, ou componentes principais, que dispostos num espaço a duas dimensões representem variabilidade suficiente que possa indicar algum padrão a ser interpretado.

A análise das componentes principais inicia-se com o cálculo dos autovalores e correspondentes autovetores da matriz de correlações (originada pela matriz de comportamentos original) entre variáveis. O primeiro autovalor a ser determinado corresponderá à maior porcentagem da variabilidade total presente, seguido do segundo autovalor com a segunda maior porcentagem de variabilidade e assim sucessivamente.

Geralmente os dois ou três primeiros autovetores encontrados explicarão a maior parte da variabilidade presente. Quando o primeiro autovetor já explica 90 a 95% da variabilidade, isso deve ser encarado com cuidado e verificado se não estão presentes variáveis com valores de magnitudes muito maiores que as demais. Os autovetores correspondem às componentes principais e são o resultado do carregamento das variáveis originais em cada um deles. Tais carregamentos podem ser considerados como uma medida da relativa importância de cada variável em relação às componentes principais e os respectivos sinais, se positivos ou negativos, indicam relações diretamente e inversamente proporcionais.

A matriz de carregamentos de cada variável nas componentes principais ao ser multiplicada pela matriz original de dados fornecera a matriz de contagens (scores) de cada caso em relação às componentes principais. Esses valores poderão então ser dispostos num diagrama de dispersão, em que os eixos são as duas componentes mais importantes, e mostrar o relacionamento entre os casos condicionados pelas variáveis medidas.

A primeira matriz obtida, resultado das interrelações entre variáveis pode ser interpretada como um procedimento estatístico no qual os dados seriam amostras de populações multidimensionais. Já a segunda matriz, que apresenta as interrelações entre as amostras (ou entre as vespas), no sentido de relação comportamental, não são usualmente passíveis de serem submetidas a testes estatísticos.