

PAULA ANDRÉA OLIVEIRA SOARES

**ASPECTOS NEUROENDOCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO  
DESENVOLVIMENTO DA FORMIGA *Camponotus (Myrmothryx) rufipes*  
FABRICIUS, 1775 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE, FORMICINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

PAULA ANDRÉA OLIVEIRA SOARES

**ASPECTOS NEUROENDOCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO  
DESENVOLVIMENTO DA FORMIGA *Camponotus (Myrmothryx) rufipes*  
FABRICIUS, 1775 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE, FORMICINAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 31 de julho de 2004.

---

Prof. Jacques Hubert Charles  
Delabie  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Izabel Camargo-  
Mathias

---

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira  
Campos  
(Conselheiro)

---

Prof. Raul Narciso Carvalho  
Guedes

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Orientador)

Aos meus pais, Gilbergues e Maria Ademi.  
Aos meus irmãos Alexandra e Abdon Leonardo.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso. Também ao Departamento de Biologia Geral pelo atendimento cordial mediante as minhas solicitações e necessidades.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Eduardo Serrão, pelos valorosos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e confiança dispensados a mim desde a realização do Mestrado.

Ao meu conselheiro, Professor Dr. Jacques H. C. Delabie, pelo acompanhamento dos primeiros passos da minha vida acadêmica até os dias de hoje, pela amizade, pelo incentivo, pelas sugestões e pela participação na banca examinadora.

Ao meu conselheiro, Professor Dr. Klaus H. Hartfelder, pelo auxílio e sugestões valiosas nas análises de radioimunoensaio, pela cordialidade e atenção dispensada a mim durante o tempo que estive em Ribeirão Preto.

Ao Professor Dr. Lúcio Antonio de O. Campos, pela solicitude encontrada em sua pessoa quando o procurei para o esclarecimento de dúvidas e quando solicitei suas sugestões, pela participação na banca examinadora.

Ao Professor Raul Narciso C. Guedes, pela sua atuação como professor, executando com equidade e sabedoria a sua função e relação com os alunos, pela participação na banca examinadora.

À professora Maria Izabel Camargo-Mathias, pela participação na banca examinadora.

Aos professores que me auxiliaram na criação e manutenção das minhas formigas, a professora Terezinha M. C. Della Lucia, o professor Norivaldo dos Anjos e o professor José C. Zanuncio.

Ao meu grande amigo Adrián, pela sua amizade, sua atenção, generosidade e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Paulo De Marco Jr e a Maria Rodrigues Vianna que também me auxiliaram nas análises comportamentais já no fim desta jornada.

A todos os professores que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e humano.

À Dona Paula, secretária da Entomologia, pela sua presteza e cordialidade em que atende a mim e a todos aqueles que a procuram.

Ao Sr. Manoel, pelo generoso auxílio na coleta dos insetos e pela grande amizade.

Ao Sr. Antonio, Sr. José Cláudio, Sr. Lelis, pela generosidade e cordialidade, típica dos bons mineiros.

Aos meus antigos amigos do laboratório de Mirmecologia, Ivan (Lindi) em consideração aos dias que fomos colegas aqui em Viçosa; à Ana Lucia, colega e amiga muito presente nos últimos anos do meu Doutorado que me deu um grande apoio em muitos momentos; à Cléa, a quem considero mais que amiga, é uma irmã a quem eu dedico plena confiança.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, antigos e recentes, Dihego, Bruno, Cássia, Gustavo. À Carol, amiga batalhadora, estudiosa e prestativa, que me auxiliou em alguns momentos. À Solange, pela sua dedicação, carinho e amizade.

À Davy e Gabriela, pela amizade sincera e pelos papos agradáveis.

Ao Anderson, pela confiança, sinceridade e amizade conquistados nestes últimos tempos.

À Mara, pelos momentos de descontração na hora do almoço e pela amizade.

A Deus, por Ele existir, pelas suas misericórdias que se renovam a cada manhã, pela maravilhosa família que Ele me deu e por me fazer acreditar que “Tudo posso Naquele que me fortalece”.

## **BIOGRAFIA**

Paula Andréa Oliveira Soares, filha de Gilbergues Pereira Soares e Maria Ademi Oliveira Soares, nasceu em São Paulo, SP, em 16 de novembro de 1970. Em dezembro de 1997, licenciou-se em Biologia pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus, BA.

De agosto de 1992 a julho de 1996, trabalhou como bolsista de Iniciação Científica do CNPq no Laboratório de Mirmecologia de Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da CEPLAC, em Ilhéus, BA.

De novembro de 1996 a maio de 1997, trabalhou como bolsista de Iniciação Científica da CAPES no Laboratório Zoobotânico da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus, BA.

De setembro de 1997 a julho de 1998, trabalhou novamente como bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq no Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau da CEPLAC.

Em outubro de 1998, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo tese em 21 de julho de 2000.

Em agosto de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, MG, defendendo tese em 31 de julho de 2004.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA .....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
2.1 Material Biológico .....	13
2.1.1 Coleta e Manutenção .....	13
2.1.2 Obtenção de Insetos Imaturos .....	14
2.1.3 Obtenção de operárias adultas em diferentes idades.....	14
2.2 Análise Morfométrica .....	15
2.3 Radioimunoensaios .....	15
2.3.1 Coleta da hemolinfa .....	15
2.3.2 Hormônio Juvenil .....	21
2.3.3 Ecdisteróides .....	21
2.4 Repertório Comportamental .....	22
3. RESULTADOS .....	24
3.1 Titulação Hormonal .....	24
3.2 Repertório Comportamental .....	27
3.3 Análise Morfométrica .....	31
4. DISCUSSÃO .....	38
4.1 Neuroplasticidade pós-embrionária .....	38
4.2 Neuroplasticidade adulta .....	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
6. APÊNDICE .....	64

## RESUMO

SOARES, Paula Andréa Oliveira, D. S. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2004. **Aspectos neuroendócrinos e comportamentais do desenvolvimento da formiga *Camponotus (Myrmotheryx) rufipes* Fabricius, 1775 (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Conselheiros: Jacques Hubert Charles Delabie, Klaus Hartmann Hartfelder e Lucio de Oliveira Campos.

O desenvolvimento pós-embrionário dos insetos apresenta uma reorganização profunda no sistema nervoso, como uma adequação à futura vida adulta. Porém, a plasticidade do sistema nervoso também ocorre durante a vida adulta devido a plasticidade comportamental, idade, sexo e do status endócrino. Neste estudo, foram avaliadas as mudanças estruturais sofridas no cérebro em representantes das castas reprodutiva e operária de *Camponotus rufipes*, com ênfase nas operárias polimórficas, e confrontadas com a titulação de hormônios morfogenéticos e seu repertório comportamental, visando possíveis relações entre ambos. Os resultados confirmaram a ocorrência de plasticidade neural pós-embrionária, bem como adulta. No entanto, a influência hormonal e comportamental neste fenômeno apresentou perfis distintos principalmente nas subcastas de operárias, sobretudo nas operárias *minor*. Operárias *minor* com três dias de vida adulta apresentaram altos títulos de hormônio juvenil e volume total do cérebro, mas operárias com idades a partir dos sete dias de vida, apresentaram valores decrescentes do volume do cérebro embora com repertório comportamental significativo. No entanto, os altos títulos observados nas operárias *major* de 45 dias e a ausência de certos atos comportamentais não apresentaram qualquer relação com o volume do cérebro, trazendo dúvidas sobre a influência destes na plasticidade cerebral. É possível que as adaptações hormonais e comportamentais sejam cíclicas, visto que o volume total do cérebro das operárias menores apresentou platôs em momentos distintos da vida adulta, possivelmente em resposta a fatores que promovam aprendizagem e memória. O volume da neurópila das subcastas de operárias parece ser correlacionado à idade, sugerindo o aumento de ramificações neuronais e possível atividade sináptica, em resposta à adição de informações processadas ao longo do tempo.

## ABSTRACT

SOARES, Paula Andréa Oliveira, D. S. Universidade Federal de Viçosa, July 2004.

**Neuroendocrine and behavioral aspects of the development in the ant *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae).** Adviser: José Eduardo Serrão. Committee Members: Jacques Hubert Charles Delabie, Klaus Hartmann Hartfelder and Lucio Antonio de Oliveira Campos.

The post-embryonic development of the insects shows a great reorganization in the nervous system, as an adaptation to the future adult stage. However, the plasticity of the nervous system also occurs during the adult life due to behavioral plasticity, age, sex and endocrine status. This work studied the structural changes in the brain of virgin females, queens and workers of *Camponotus rufipes*, with emphasis in the polymorphic workers. Morphogenetic hormones titers and behavioral patterns were analysed, in order to assess their possible relationship and changes in the brain volume. Results showed the occurrence of neuroplasticity during the post-embryonic and adult stages. In contrast, the hormonal and behavioral effects in the brain volume differed mainly in the worker subcasts, mostly in the *minor* workers. *Minor* workers of three days old have high juvenile hormone titers and large brain volume, but in seven-days-old worker the brain volume decrease and the significant behavioral patterns began to occur. However, the high juvenile hormone titers found in the 45-days-old *major* workers and the absence of behavioral patterns does not suggest any relationship with the brain volume, bringing doubts on the influence of behavior and hormone in the brain plasticity. It is possible that hormonal and behavioral adaptations are cyclical, because the total brain volume in the minor workers showed plateaus in different moments of the adulthood, possibly in response to factors that promote learning and memory. Neuropile volume of worker subcasts seems to be affected by age, suggesting the increase of neuronal branches and possible synaptic activities, in response to the addition of information processed during the ant life span.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

## **Neuroplasticidade Pós-embrionária**

A neuroplasticidade é um fenômeno que ocorre naturalmente em muitos vertebrados e invertebrados, promovendo modificações no sistema nervoso desde a vida embrionária até a vida adulta (STRAMBI et al., 1999). Em insetos, embora o desenvolvimento do sistema nervoso durante a vida embrionária de holometábolos e hemimetábolos seja muito similar, o desenvolvimento pós-embrionário característico de holometábolos apresenta uma reorganização mais profunda no sistema nervoso, como uma adequação à futura vida adulta. As estruturas especializadas que se desenvolvem nesta fase precisam estar interligadas anatomicamente e fisiologicamente de modo que respondam adequadamente a um determinado estímulo.

No inseto holometábolo, além do estágio larval ser muito diferente do adulto, os neurônios sensoriais larvais degeneram e são substituídos por neurônios adultos que se desenvolvem a partir dos discos imaginais. Além disso, a maioria dos interneurônios dos adultos é formada somente durante a metamorfose. Contudo, muitos são interneurônios larvais remodelados, os quais podem executar novas tarefas durante a vida adulta, como também acontece com alguns neurônios motores (TISSOT & STOCKER, 2000). Nestes insetos, a reconstrução do sistema nervoso de larva para adulto envolve principalmente a morte celular programada, que elimina neurônios cujas funções se tornarão obsoletas na fase adulta.

Outro evento importante que ocorre durante a construção do sistema nervoso pós-embrionário é a fusão dos gânglios segmentais do cordão nervoso ventral. Esta fusão é promovida pelo encurtamento dos conectivos interganglionares, por onde passam as fibras do trato longitudinal, e também é decorrente de morte celular programada (PINTO, 2001). A fusão destes gânglios, provavelmente, facilita a comunicação entre os neurônios, diminuindo o tempo de interação e condução neuronal, permitindo a execução de diversas atividades do organismo adulto (Amos & Mesce, 1994, citado por PINTO, 2001).

## **Neuroplasticidade Adulta**

A plasticidade do sistema nervoso também tem sido evidenciada durante a vida adulta, justificada por diversos autores devido a plasticidade comportamental, idade, sexo e do status endócrino (CAYRE et al., 1994; FAHRBACH & ROBINSON, 1996; GRONENBERG et al., 1996; CHAPMANN, 1998). Estas alterações podem afetar o volume total ou de regiões do cérebro pelas mudanças no número de células nervosas, de suas ramificações e a frequência de sinapses (STRAMBI et al., 1999). Farhbach & Robinson (1995) sugerem que o número e tamanho de neurônios e seus processos neuronais diminuem, porém há aumento em número e tamanho de elementos não-neuronais.

### **O cérebro**

O cérebro, como o principal centro de associação do organismo, é o órgão mais comumente estudado morfológicamente, onde são observadas as alterações citadas. Tanto no cérebro como nos gânglios do cordão nervoso ventral, os corpos celulares dos neurônios (células de Kenyon) estão distribuídos na região periférica, enquanto a região central é ocupada pelas arborizações terminais dos axônios sensoriais, arborizações dendríticas dos neurônios motores e axônios e arborizações dendríticas dos interneurônios, caracterizando a neurópila (CHAPMANN, 1998).

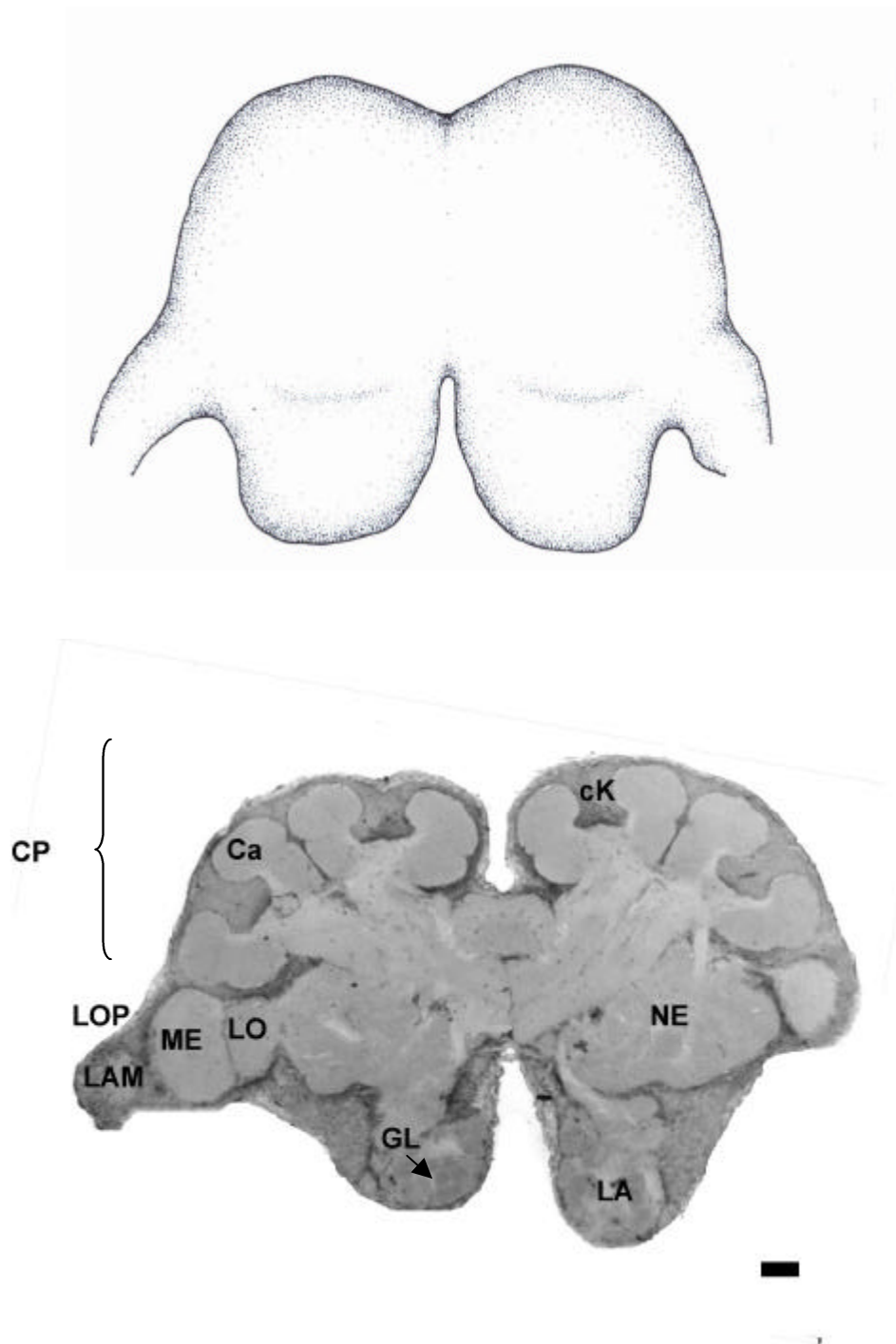
Ocupando uma posição dorsal no cérebro encontra-se uma região bilobulada chamada *corpora pedunculata*, cuja área neuropilar constitui a região dos cálices. Os *corpora pedunculata* estão, provavelmente, relacionados com a aprendizagem, memória e orientação espacial de alguns insetos (STRAUSFELD et al., 1998).

O cérebro compreende ainda uma neurópila visual formada por três massas neuropilares: a lâmina, externa; a medula, mediana e a lobula; interna; e uma neurópila olfatória, formando uma estrutura pareada que recebe axônios do nervo antenal que se contactam a dendritos altamente ramificados de neurônios locais e que produzem impulsos, formando unidades densas e esféricas, chamadas glomérulos (Figura 1).

### **Neurogênese**

Desde a fase embrionária, células progenitoras neurais se comportam como células multipotentes sendo capazes de se dividir simetricamente originando

neuroblastos idênticos e assimetricamente originando neuroblastos e células-mãe ganglionares que originarão neurônios ou células da glia (CAYRE et al., 2002).



**Figura 1** – Vista frontal externa (acima) e interna (abaixo) do cérebro de operária de *Acromyrmex subterraneus molestans*. CP- *corpora pedunculata*, (CA - cálice, CK – células de Kenyon), NE - neurópila, LOP - lobo óptico (LO - lobula, ME - medula, LAM - lamina), LA - lobo antenal (NA - nervo antenal, GL – glomérulos). Barra: 50 m.

Segundo Lu et al. (2000), em *Drosophila melanogaster* (Diptera), células decorrentes de neurogênese tardia podem ter origem de células progenitoras neurais que estão quiescentes desde a fase embrionária e que são reativadas na fase adulta em resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Em *Acheta domesticus* (Orthoptera) adultos, foram observadas células indiferenciadas nos *corpora pedunculata* em processo de divisão, que posteriormente originaram interneurônios corticais (CAYRE et al., 1994). Ainda, em fêmeas adultas de *A. domesticus*, observou-se que os estímulos sensoriais influenciavam a neurogênese quando estes insetos eram criados em ambiente enriquecido com estímulo visual, olfativo, tátil e social, exibindo alta taxa de proliferação de células nos *corpora pedunculata* (SCOTTO-LOMASSESE et al., 2000). Estudos similares realizados em abelhas adultas não mostraram neurogênese nos *corpora pedunculata* (FAHRBACH et al., 1995), um resultado que levou Gronenberg et al. (1996) a concluir que em formigas, como em outros Hymenoptera, a neurogênese provavelmente não ocorre nos indivíduos adultos.

### **Plasticidade Neuronal**

Alterações nas ramificações que constituem os processos dendríticos e axônicos dos neurônios foram observados em alguns insetos adultos. Em *D. melanogaster*, o número de fibras nervosas nos cálices dos *corpora pedunculata* aumentou mais de 20% desde a primeira semana de vida adulta e esse número foi mantido até idade avançada. Porém, indivíduos mantidos em ambiente privado da recepção de estímulos extrínsecos apresentaram número pequeno de fibras nervosas tanto em machos quanto em fêmeas (CHAPMANN, 1998). Em *Apis mellifera* (Hymenoptera), o aumento no volume de vários subcompartimentos do cérebro tem a experiência do inseto como um fator importante de desenvolvimento estrutural (DURST et al., 1994). Comparando o volume da neurópila correspondente aos cálices *versus* o volume da região ocupada pelas células de Kenyon dos *corpora pedunculata* de abelhas operárias com um dia de vida, nutrízes e forrageiras, foram reveladas duas mudanças: o volume ocupado pela neurópila apresentou expansão e na região de células de Kenyon apresentou redução nas operárias forrageiras, sem que o volume total dos *corpora pedunculata* fosse afetado (WHITERS et al., 1993). Isto sugere que as mudanças observadas na neurópila dos cálices refletem mudanças nas arborizações das células de Kenyon, caracterizando o crescimento

das arborizações ou o aumento no número de sinapses (FARHBACH & ROBINSON, 1995).

### **Plasticidade Sináptica**

O aumento no volume do cérebro, e principalmente na região neuropilar, pode refletir a adição de sinapses (sinaptogênese). Este fenômeno tem sido observado em insetos que são expostos a modificações ambientais, estímulos sensoriais e experiências diversas. Em abelhas, um rápido crescimento dendrítico foi observado durante a primeira experiência de vôo (BRANDON & COSS, 1982). Além disso, variações na morfologia de espinhos dendríticos nos *corpora pedunculata* de abelhas operárias foram evidenciados em diferentes estágios do desenvolvimento comportamental: forrageiras exibiram espinhos dendríticos com áreas mais alongadas que operárias recém-emergidas e nutrizes (COSS et al., 1980). O regime de iluminação também mostrou afetar o tamanho e a frequência de sinapses. A privação de determinados comprimentos de onda reduziu o número de sinapses de células fotorreceptoras em abelhas enquanto em *Musca domestica* (Diptera), curtas exposições à luz após longos períodos no escuro induziram o aumento de sinapses na neurópila do lobo óptico destes insetos (CAYRE et al., 1999).

### **Hormônios Morfogenéticos**

As modificações ocorridas no sistema nervoso de insetos jovens ou adultos podem estar associados à ação de hormônios. Dois hormônios morfogenéticos que controlam a metamorfose nos insetos também são produzidos por adultos, os ecdisteróides ecdisona e 20-hidroxiecdisona, assim como o hormônio juvenil. Estes hormônios mostram uma interação complexa e múltipla durante as fases larval e pupal. Em insetos holometábolos, o hormônio juvenil é o mantenedor das características larvais, enquanto a sua ausência no período de sensibilidade desencadeia a metamorfose mediante concomitante presença de ecdisteróides (NIJHOUT, 1994).

Em *Manduca sexta*, que é o modelo mais explorado em estudos sobre metamorfose em insetos, a muda de larva para pupa é precedida por dois picos de secreção de ecdisteróides, sendo que o primeiro pico promove a formação da epiderme, além de causar mudanças dramáticas na fisiologia e comportamento do inseto (NIJHOUT, 1994). A primeira e mais óbvia resposta comportamental é que o inseto pára de se alimentar, expele o conteúdo intestinal e, posteriormente, sai de

sua fonte alimentar a procura de um local apropriado para pupação. O segundo pico de ecdisteróides que começa quase dois dias após o primeiro, é maior e induz a muda que originará a pupa, iniciando o estágio comumente chamado de pré-pupa, durante o qual os discos imaginais crescem e evertem e a nova cutícula começa a ser secretada. Ambos padrões de secreção de ecdisteróide e sua resposta fisiológica têm como causa comum, a ausência de hormônio juvenil na hemolinfa. São conhecidos dois períodos de sensibilidade ao hormônio juvenil em *M. sexta* durante o último instar larval. O primeiro controla o desenvolvimento larva/pupa conduzindo a formação do tegumento, e o segundo controla o desenvolvimento pupa/adulto no que diz respeito à formação do tegumento, derivado de discos imaginais. Assim, a metamorfose normal requer a ausência de hormônio juvenil durante os dois períodos de sensibilidade a ele. O mecanismo pelo qual os ecdisteróides causam esta elaborada ordenação de mudanças fisiológicas ainda não é conhecido (NIJHOUT, 1994; CHAPMANN, 1998).

As glândulas protorácicas são a fonte primária de ecdisteróides nas larvas de insetos e são geralmente inervadas por nervos do gânglio subesofágico e do primeiro e segundo gânglio torácicos. A glândula protorácica não é capaz de armazenar a ecdisona, que é liberada à proporção que é sintetizada. Em todos os insetos, exceto em certos Apterygota, a glândula protorácica sofre morte celular programada durante a metamorfose. Em insetos hemimetábolos a morte celular ocorre rapidamente após a muda para adulto, enquanto nos holometábolos, ela ocorre no estágio pupal. Assim, na maioria dos insetos adultos a presença de ecdisteróides implica na existência de um órgão que o produza ou na participação de enócitos, que além de produzirem hidrocarbonetos cuticulares também parecem produzir ecdisteróides (NIJHOUT, 1994; CHAPMANN, 1998). Os órgãos mais comumente relacionados com a produção de ecdisteróides em adultos são as gônadas, embora existam evidências deste hormônio ocorrendo livremente na hemolinfa em fêmeas ovariectomizadas de alguns Diptera (HAGEDORN, 1985).

O hormônio juvenil é produzido e liberado pelos *corpora allata*, um par de glândulas localizadas de cada lado do esôfago no complexo retrocerebral ligado ao cérebro por dois ou três pares de nervos (HARTFELDER, 2000). A taxa e ritmo de liberação do hormônio juvenil são determinados pela taxa e ritmo de sua síntese, não havendo armazenamento nos *corpora allata*. As áreas em que estas secreções são liberadas são chamadas de áreas neurohemais, ou se há alguma estrutura bem definida formada, órgão neurohemal. Os *corpora allata* são ligados ao cérebro por

um nervo que passa também através dos *corpora cardíaca*, órgão neurohemal de vários hormônios. A inervação dos *corpora allata* consiste tanto de neurônios convencionais como de neurônios neurosecretores que têm seus corpos celulares no cérebro e, em alguns insetos, nos *corpora cardíaca* também. Ambos os tipos de neurônios podem estar envolvidos no controle da atividade secretora dos *corpora allata* (NIJHOUT, 1994).

Atuando sobre muitos aspectos reprodutivos dos insetos, o hormônio juvenil é considerado o mestre regulador da “síndrome de reprodução da fêmea” agindo de forma flexível e estratégica de acordo com o estilo de vida particular a cada inseto. Além do seu papel central na ovogênese, o hormônio juvenil afeta a dispersão e a atividade de vôo, comportamento de chamamento, mudanças no comportamento pós-copulatório da fêmea e o comportamento de oviposição (HARTFELDER, 2000). Diferentemente, em machos, o hormônio envolvido na espermatogênese é o ecdisteróide, embora exista alguma evidência da participação do hormônio juvenil em alguns insetos (NIJHOUT, 1994).

### **Influência Hormonal sobre o Sistema Nervoso**

Durante a metamorfose, o sistema nervoso dos insetos vem sendo utilizado como modelo para o estudo dos mecanismos da ação de hormônios ecdisteróides que têm mostrado controlar a proliferação de células do lobo óptico (CHAMPLIN & TRUMAN, 1998), regular a morte celular programada no sistema nervoso central (ROBINOW et al., 1993) e promover o crescimento de neuritos das células de Kenyon dos *corpora pedunculata* (KRAFT et al., 1998).

Segundo Cayre et al. (2000), fêmeas adultas de *A. domesticus* apresentam mudanças cíclicas no título de ecdisona que ocorrem de acordo com a maturação dos ovócitos, coincidindo com o crescimento das células de Kenyon dos *corpora pedunculata* e, estes eventos em conjunto, promoveriam o remodelamento constante da arquitetura neuronal nestes insetos. Neste caso, é provável que a síntese de ecdisteróides tenha então um papel multifuncional nesta fase, já que foi registrada também nesta ocasião a inibição de células proliferativas nos *corpora pedunculata*. Esta propriedade multifuncional também é demonstrada durante a metamorfose quando ocorre a muda concomitantemente com produção de cutícula pelas células epidérmicas em muitos insetos, com o crescimento de arborizações dendríticas (CHAPMANN, 1998).

Vários estudos vêm sendo realizados no sentido de compreender os mecanismos que desencadeiam a plasticidade dos *corpora pedunculata* através da manipulação da experiência ou exposição ao hormônio juvenil. As flutuações de hormônio juvenil foram mais estudadas em grilos e abelhas. Além de ecdisteróides, o hormônio juvenil também foi evidenciado em fêmeas adultas de *A. domesticus* que, quando alatectomizadas, apresentaram diminuição significativa de células em divisão dos *corpora pedunculata* (CAYRE et al, 1994). Já em operárias de *A. mellifera*, o baixo título de hormônio juvenil está associado ao comportamento executado dentro do ninho, como o cuidado com a cria durante as três primeiras semanas de vida adulta, enquanto alto título atingido após este período está associado com o início do forrageamento (FAHRBACH & ROBINSON, 1995; 1996). Porém, quando operárias foram induzidas a forragear precocemente, mostraram um aumento nos níveis de hormônio juvenil e no volume dos *corpora pedunculata* similar àquelas forrageiras em idade normal, e quando abelhas jovens foram tratadas com um análogo de hormônio juvenil e forçadas artificialmente a permanecer na colméia, imitando as condições hormonais da forrageira sem a experiência de vôo, elas também apresentaram aumento no volume da neurópila dos *corpora pedunculata*, sugerindo que a experiência de vôo e de forrageamento, podem não ser essenciais para o crescimento da neurópila (STRAMBI et al., 1999).

### **Efeito organizacional e ativador dos hormônios**

A influência dos hormônios sobre o desenvolvimento, o cérebro e o comportamento vem sendo explorada atualmente mediante a atribuição de conceitos anteriormente aplicados somente aos vertebrados. Os termos organização e ativação são usados para descrever efeitos hormonais que ocorrem especificamente sobre o comportamento e seus substratos neurais.

Os efeitos organizacionais ocorrem durante um período crítico específico do desenvolvimento, criando mudanças permanentes nos substratos neurais que sustentam o comportamento sendo irreversíveis. Estas mudanças incluem a reorganização de vias neurais pelo estabelecimento de novas sinapses e a alteração do limiar de excitação da resposta neural (ELEKONICH & ROBINSON, 2000). Embora este termo não seja mencionado na literatura competente que trata de hormônios de insetos (NIJHOUT, 1994), existem vários exemplos de polimorfismos mediados por hormônios que implicam em efeitos organizacionais. Na determinação de castas em insetos sociais, por exemplo, o ovo de fêmeas de *A. mellifera* pode

gerar tanto operárias quanto rainhas, desde que a larva seja submetida aos níveis de hormônio juvenil durante os respectivos períodos de sensibilidade a ele (NIJHOUT, 1994).

Os efeitos ativadores por definição, ocorrem em um estágio posterior aos efeitos organizacionais, geralmente durante a vida adulta. Eles modificam a atividade neural de uma via que havia sido previamente preparada pelos efeitos organizacionais, porém são reversíveis. Estes efeitos podem incluir mudanças na produção ou liberação de neurotransmissores ou a regulação de receptores hormonais. Desta forma, os efeitos ativadores podem alterar o comportamento do animal em resposta a uma variedade de mudanças no ambiente ou às condições sociais (ELEKONICH & ROBINSON, 2000). Este efeito pode ser ilustrado através da divisão de trabalho observada em *A. mellifera*, onde operárias mais jovens realizam tarefas como o cuidado com a cria, diferentemente das operárias mais velhas que saem do ninho para forragear, a despeito dos níveis de hormônio juvenil circulante que aumentam à proporção que se dá o desenvolvimento comportamental adulto (ROBINSON et al., 1989; HUANG et al., 1994; HUANG & ROBINSON, 1995; SULLIVAN et al., 2000; PAGE Jr. et al., 2001).

### **Insetos Sociais – Um modelo**

Durante o desenvolvimento de um inseto, os sistemas neurais e motores são remodelados para acomodar transformações comportamentais. Células nervosas e musculares são requeridas para o comportamento larval de modo que atividades como movimento, alimentação e ecdise deverão ser substituídos ou re-especificados por outros que permitirão a emergência do adulto, o andar, voar, acasalar e ovipositar. Assim, a plasticidade do sistema nervoso que acompanha a metamorfose acaba criando um modelo para as formas mais sutis de plasticidade comportamental (TECHNAU & HEISENBERG, 1982; LEVINE & TRUMAN, 1982; BOOKER & TRUMAN, 1987; LEVINE et al., 1995; TISSOT & STOCKER, 2000) sob a ação hormonal (KRAFT et al., 1998; CHAMPLIN & TRUMAN, 1998; WEEKS, 1999, 2003; PINTO et al., 2003), embora o estudo de insetos adultos também possa oferecer numerosas oportunidades para explorar os mecanismos básicos da plasticidade neural fornecendo dados de grande importância que complementarão os resultados obtidos durante o desenvolvimento preimaginal do inseto, como sugerido por Weeks & Levine (1995) e Levine & Weeks (1996).

Neste sentido, os insetos sociais constituem um modelo importante a ser avaliado, pois a divisão de trabalho, aspecto característico do grupo, pode trazer informações adicionais aos estudos sobre a biologia social destes. Dentre os insetos sociais, abelhas e formigas são conhecidas por sua capacidade de aprender e memorizar e ambas apresentam um rico repertório comportamental que muda à proporção que estas amadurecem, realizando diferentes tarefas dentro de um sistema cooperativo social (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

As formigas possuem o mais diferenciado sistema de castas entre os Hymenoptera sociais. A rainha é a única casta reprodutiva na colônia e na maioria das espécies a casta operária é estéril e incapaz de assumir função reprodutiva, ou quando a faz, produz somente machos a partir de ovos não-fertilizados. A casta operária é responsável pela manutenção da colônia e vários fatores podem afetar sua atividade: muitas espécies podem apresentar polimorfismo, onde indivíduos de vários tamanhos podem executar diferentes tarefas; e o polietismo etário, onde formigas que trabalham no interior do ninho quando mais jovens, passam mais tarde a executar tarefas fora dele (DUMPERT, 1978).

### **O Polimorfismo em Formigas**

Os fenômenos hormonais implicam em alterações morfológicas seqüenciais, como no caso da metamorfose, ou alternativas, no caso da diferenciação de castas em formigas. Estas alterações são caracteristicamente denominadas de polifenismo, onde indivíduos morfológica e comportamentalmente distintos serão adaptados a diferentes funções na colônia, embora sejam geneticamente idênticos. Durante o desenvolvimento, em algum momento do ciclo metamórfico, indivíduos imaturos totipotentes de formigas, podem dar origem a operárias, soldados ou rainhas, decisão esta que será tomada mediante uma complexa interação entre o ambiente e o sistema endócrino do inseto (NIJHOUT, 1994). Geralmente, uma rainha de formiga se distingue das operárias por apresentar estruturas corporais mais desenvolvidas, como o tórax e o abdômen, além de asas funcionais embora decíduas, quando estas são fecundadas. Como fêmeas estéreis, as operárias possuem ovariolos reduzidos ou nenhum, não possuem espermoteca e o tórax é muito reduzido. Esta é subdividida em castas adicionais ou subcastas, podendo ser designadas de acordo com seu tamanho como menor, média e maior, (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Segundo Wheeler (1986), a determinação de subcastas operárias seguiria uma tendência evolutiva, onde em espécies altamente

polimórficas a determinação de rainhas aconteceria em estágios cada vez mais precoces e distantes daqueles observados para operárias “privilegiando” sempre a diferenciação de rainhas. Tão logo seja determinado o destino de um ovo ou larva, estes sofrerão a influência hormonal própria de cada casta, até que se diferencie dando origem ao indivíduo adulto com seus respectivos fenótipos. Em formigas, o crédito do polimorfismo entre operárias é dado a fatores tróficos, onde operárias adultas têm tamanho maior em função de seu histórico nutricional, cujo aumento quantitativo e qualitativo da dieta alimentar provoca o aumento endógeno do título de hormônio juvenil (NIJHOUT & WHEELER, 1982).

A despeito de tantas semelhanças e diferenças morfológicas inter e intraespecíficas desenvolvidas e adaptadas ao estilo de vida de cada grupo, está a presença de asas na casta reprodutiva e sua ausência na casta estéril de formigas. O trabalho de Abouheif & Wray (2002) evidenciou a influência ambiental e genética sobre o polifenismo de asas em formigas, onde a expressão de vários genes determinou a presença de asas funcionais na rainha ou interrompeu a produção de asas em soldados e operárias. A expressão desses genes é conservada nas castas aladas avaliadas de *Pheidole morrisi*, *Neoformica nitidiventris*, *Crematogaster lineolata* e *Myrmica americana*. No entanto, discos imaginiais rudimentares são encontrados entre as espécies que apresentam diferenças na morfologia e na expressão de genes nas larvas de operárias, permitindo que estas retenham a capacidade de configurar asas a rainhas e machos.

O polimorfismo está estreitamente ligado à divisão de trabalho e entre todos os Hymenoptera sociais, as formigas possuem o mais complexo sistema de castas operárias e os gêneros dimórficos e polimórficos têm sido os mais bem sucedidos a exemplo dos dois maiores gêneros de formiga, *Pheidole* e *Camponotus* (WHEELER, 1986). Operárias de espécies como *Solenopsis invicta* e *Atta* spp. (Myrmicinae), *Eciton* spp (Ecitoninae) dentre outras, também são altamente polimórficas (HÖLDOBLER & WILSON, 1990).

### **O Gênero *Camponotus***

Vulgarmente chamadas de “carpinteiras”, as formigas do gênero *Camponotus*, pertencentes aos Formicinae, nidificam das mais variadas formas: em galhos e troncos ocos de árvores, em bulbos de Orquidaceae, epífitas, cartão vegetal (HÖLDOBLER & WILSON, 1990) e também em montes de matéria orgânica e embaixo de pedras. Apresentam ninhos facultativamente polidômicos e poligínicos,

segundo a espécie, e o estado das colônias varia de dezenas a centenas de indivíduos. São generalistas, se alimentando de substâncias açucaradas e de origem animal.

Outra característica desse gênero de Formicidae é sua abundância em determinados ambientes. Wilson (1976) afirma que *Camponotus* é um gênero que existe desde o final do Oligoceno e agora é um dos maiores de todos os gêneros de formigas e o que apresenta a mais ampla distribuição geográfica. É também um dos mais diversificados ecologicamente. A biomassa das espécies é muito grande, mas, devido ao grande tamanho das operárias e da área relativamente extensa ocupada por cada colônia a densidade de colônias é mais baixa que a dos outros gêneros prevaletentes que são *Pheidole* e *Crematogaster*.

Todas as características citadas portanto, fazem de *Camponotus* um bom modelo para análise neuroetológica comparativa, pois podem existir diferenças funcionais e provavelmente estruturais no cérebro que contrastam o comportamento nas subcastas de operárias desta espécie. Assim, estas também podem ser utilizadas em estudos que avaliam a plasticidade neural e sua possível regulação por hormônios.

Mediante o exposto, a execução deste trabalho teve por objetivos determinar a ocorrência de neuroplasticidade no cérebro de *Camponotus rufipes* para testar a hipótese de que os hormônios morfogenéticos e o repertório comportamental são os responsáveis por este fenômeno.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Material biológico

#### 2.1.1 Coleta e Manutenção

Para obtenção de ninhos de *Camponotus rufipes* foram capturadas fêmeas recém acasaladas após revoada ocorrida no mês de novembro de 2001, depois que mais de 40 ninhos com operárias e rainhas em plena atividade foram coletados em tentativas sem sucesso para obter ninhos representativos.

A verificação das fêmeas fecundadas é possível, pois sabe-se que após o vôo de acasalamento a fêmea fecundada fica livre de suas asas e sai em busca de um local para fundar a colônia (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Desta forma, foram capturadas 6 fêmeas desaladas, 5 oriundas do Campus da Universidade Federal de Viçosa e 1 da Mata do Paraíso, em Viçosa, MG.

Cada fêmea foi acondicionada em um tubo de ensaio (15 cm x 2,3 cm) vedado com algodão e contendo algodão umedecido com água depositado no fundo do tubo (Figura 2). Uma gota de mel foi colocada em cada tubo. Os tubos foram envolvidos com papel cartão preto na tentativa de simular as condições de escuro que o ninho apresenta naturalmente. Os tubos foram mantidos em câmara de criação a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e acompanhados diariamente para verificação de posturas que ocorreram, em média, dois dias após as fêmeas terem sido coletadas. Os primeiros adultos emergiram entre 30 e 40 dias após a postura. Posteriormente, com a adição de novos indivíduos à colônia, foram confeccionados ninhos maiores (29 cm x 19 cm) com recipientes plásticos com tampa. Os ninhos tiveram os fundos cobertos com gesso e foram montados conectando dois recipientes através de uma mangueira. Para circulação do ar e melhor visibilidade, as tampas foram cobertas com tela plástica. Cada ninho, então, era composto por dois recipientes onde um correspondia à área de nidificação, este isolado da luz através de cobertura com papel escuro, e o outro à arena de forrageamento (Figura 3). Os ninhos foram mantidos no Insetário da UFV, a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As formigas foram alimentadas com mel,

larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) e água suprida em um tubo de vidro vedado com algodão e disposto na arena de forrageamento. Foram colocadas pequenas caixas de madeira (8,5 cm X 3 cm) dentro dos ninhos que serviram de abrigo para a rainha e a acomodação de ovos, larvas e pupas.

Quatro meses após a coleta das rainhas, os ninhos apresentavam os grupos representativos de operárias polimórficas *minor*, *media* e *major*. Estas foram selecionadas e medida a cápsula cefálica tomando-se a maior largura da cabeça e não incluindo os olhos (Figura 4).

### **2.1.2 Obtenção de Insetos Imaturos**

Fêmeas e machos imaturos em diferentes fases do desenvolvimento pupal e soldados adultos também foram obtidos, embora em ninhos em condições naturais encontrados no Campus da UFV. Os exemplares foram selecionados de acordo com a seguinte pigmentação dos olhos e do corpo: Pré-pupa (PP), pupa de olho despigmentado (OD), de olho fracamente pigmentado (OFP), de olho mediamente pigmentado (OMP), de olho pigmentado e corpo despigmentado (CD), corpo mediamente pigmentado (CMP), emergindo (EM) e adultos (AD). Não foi obtido o número suficiente de pupas de fêmeas para todas as análises e por esta razão, foram submetidas somente à titulação hormonal.

Na ocasião em que foram coletados ninhos em condições naturais foi encontrado também um ninho com alta densidade de fêmeas aladas, desaladas e outras com somente um par de asas. Alguns destes espécimens também foram coletados dado este curioso evento, e submetidos à análise morfométrica e titulação hormonal. Assim, ao total foram submetidos à análise morfométrica, indivíduos imaturos da casta operária e reprodutiva e operárias adultas com diferentes idades; e submetidos ao radioimunoensaio para titulação de hormônio juvenil, todos os indivíduos adultos representantes de cada casta, e ao radioimunoensaio para titulação de ecdisteróides, os indivíduos imaturos.

### **2.1.3 Obtenção de operárias adultas em diferentes idades**

Para a aquisição de operárias com diferentes idades, pupas com avançada pigmentação do corpo, foram separadas das demais, juntamente com algumas operárias em pequenas caixas de madeira com passagem de ar (caixas usadas para o aprisionamento e transporte de rainhas de abelhas), cobertas com lâmina de vidro e mantidas dentro do ninho, para que fosse possível a observação diária daquelas

que emergiam, as quais eram marcadas no abdômen ou tórax com tinta não-tóxica Testor (Figuras 5 e 6a, b). Este procedimento permitiu a coleta dos indivíduos adultos nas seguintes idades: 1, 3, 7, 15, 45 e 120 dias.

## **2.2 Análise Morfométrica**

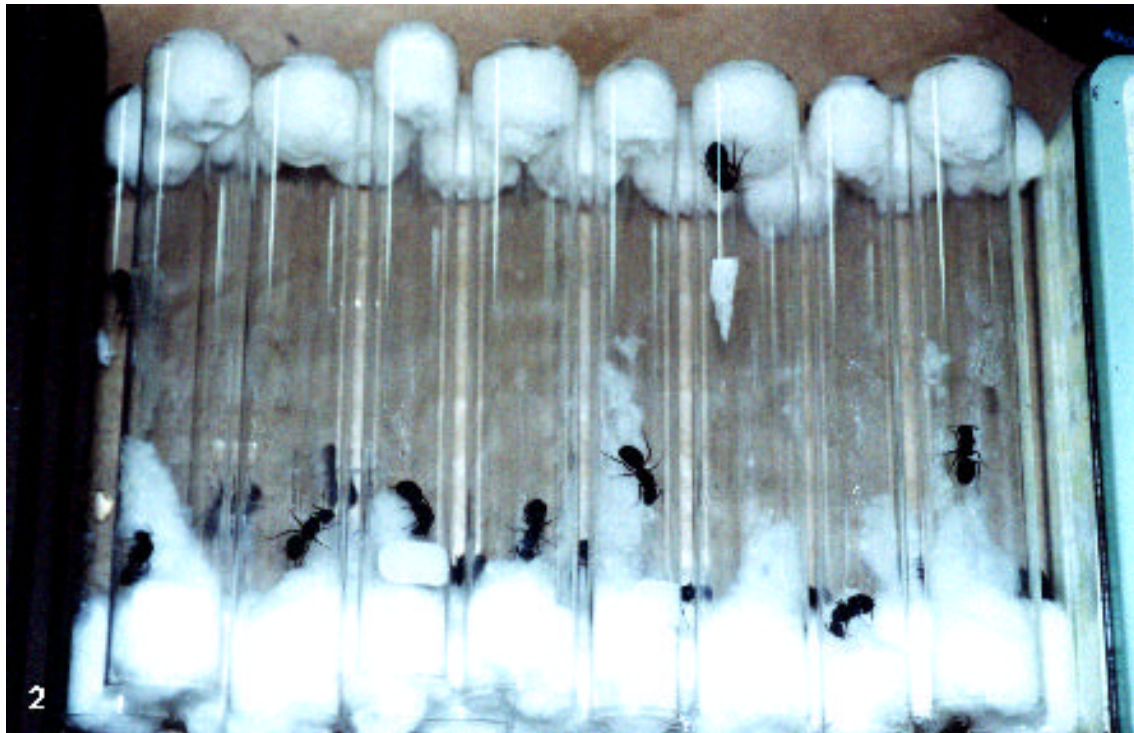
Foram analisados 5 cérebros de cada estágio do desenvolvimento e de cada idade das operárias adultas.

Os espécimens foram dissecados em solução fisiológica para insetos 0,1M, pH 7,4 e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. As peças foram desidratadas em série crescente de etanol, embebidas e incluídas em historesina JB-4, de acordo com as instruções do fabricante. O material foi submetido à secções seriadas de 7 $\mu$ m com navalhas de vidro e posteriormente coradas em hematoxilina e eosina. Estas secções tiveram sua área medida com o auxílio do programa de computador Image-Pro Plus<sup>®</sup> e foram usadas para determinar o volume do cérebro pelo método de Cavalieri, como descrito por Coggeshall (1992). Os dados foram submetidos à análise estatística de variância pelo teste de Tukey quando apropriada, com nível de significância de 5% e análise de regressão a 1%. A figura 6 mostra as regiões do cérebro selecionadas para análise.

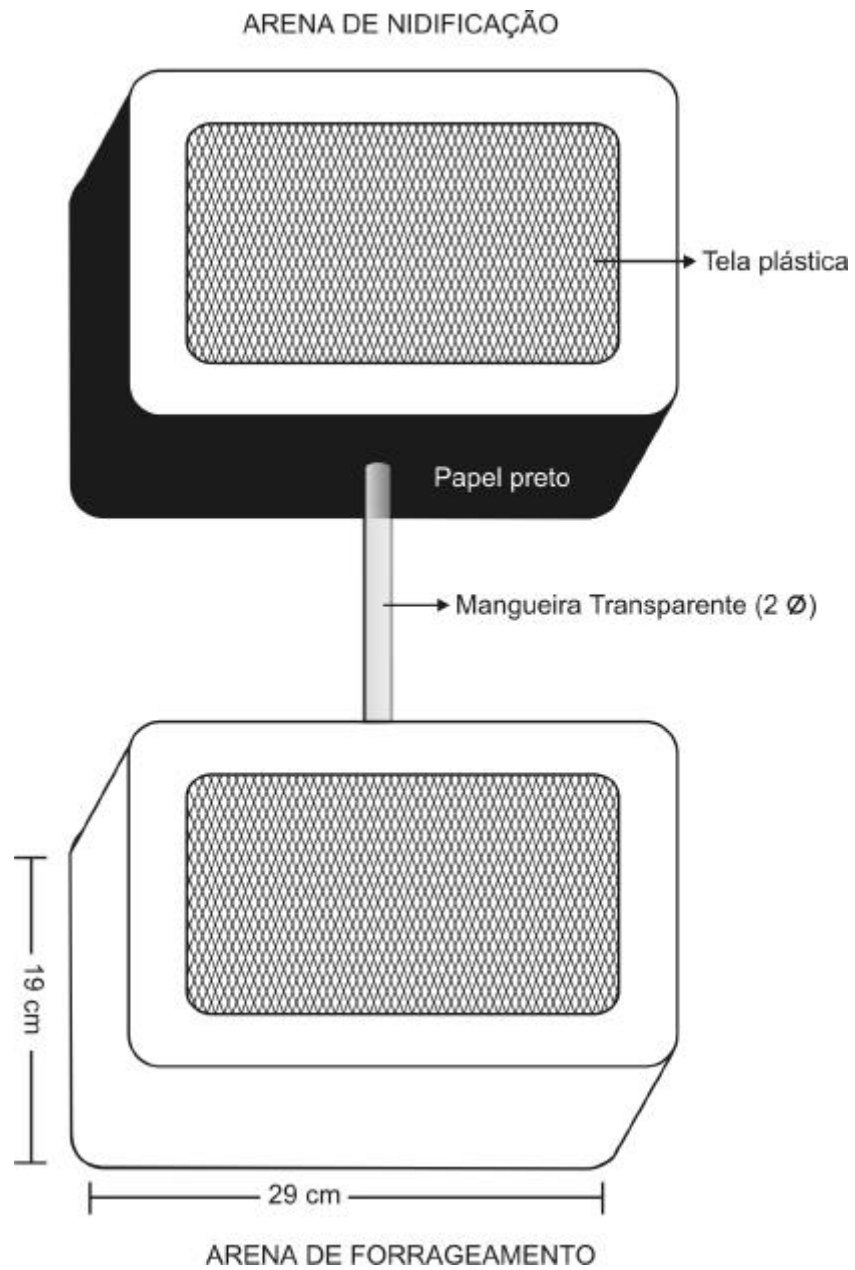
## **2.3 Radioimunoensaios**

### **2.3.1 Coleta da hemolinfa**

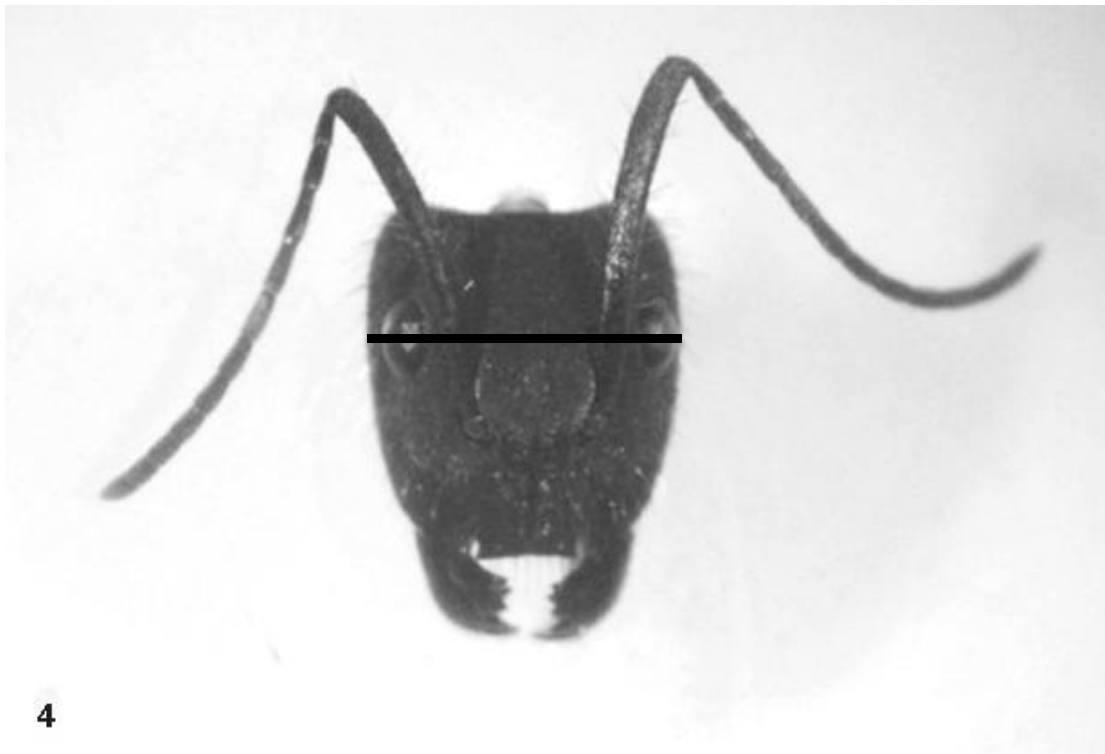
Através de um pequeno corte no abdômen das formigas, a hemolinfa foi extraída com o auxílio de micropipeta graduada de 1-5  $\mu$ L (Sigma). Para a titulação de hormônios em rainhas e soldados adultos foram coletadas amostras de cada espécimen, enquanto para operárias foi necessário coletar um conjunto de amostras que consistiu de aproximadamente 10 indivíduos, das quais se extraiu 5  $\mu$ L de hemolinfa, em média. Posteriormente à coleta, todas as amostras de hemolinfa foram dissolvidas em 500  $\mu$ L de acetonitrila, conservadas e armazenadas a -80°C.



**Figura 2** - Tubos de ensaio adaptados para acondicionamento de rainhas de *Camponotus rufipes*.



**Figura 3** - Esquema do ninho artificial para criação de *Camponotus rufipes*.



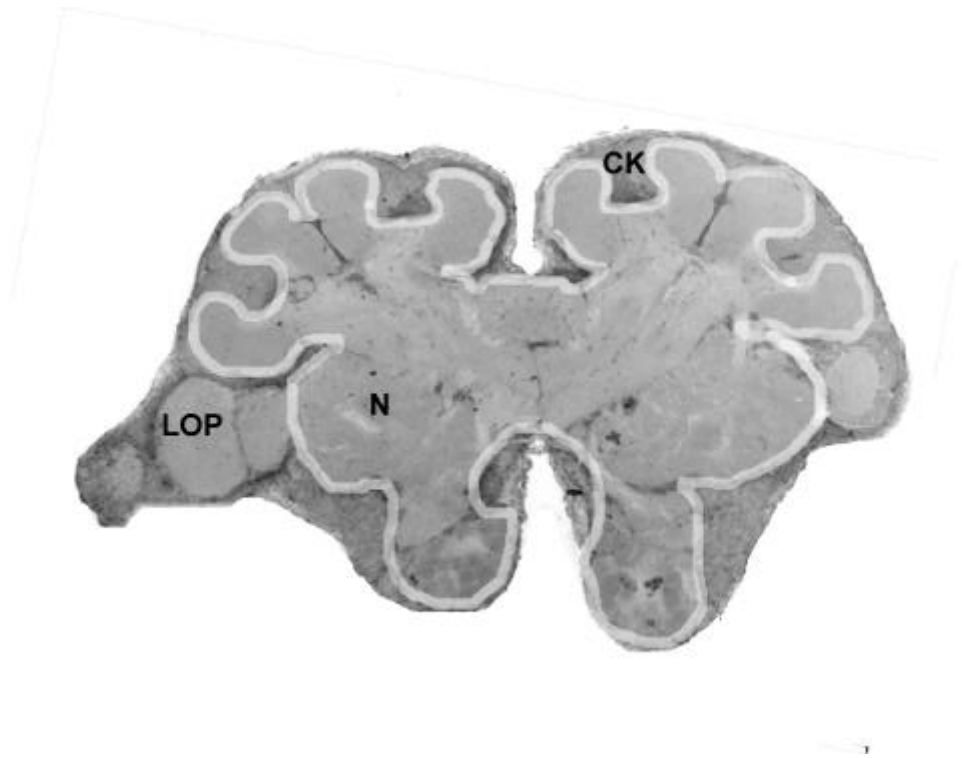
**Figura 4** - Cápsula cefálica de operária *major* de *Camponotus rufipes*. Destaque para a área medida corresponde a 1,8 mm.



**Figura 5** – Caixa de madeira para aprisionamento e transporte de rainhas de abelhas adaptadas para pupas de operárias de *Camponotus rufipes*.



**Figuras 6 (A e B)** – Visão parcial do ninho mostrando operárias de *Camponotus rufipes* marcadas com tinta não-tóxica (seta).



**Figura 7** – Regiões do cérebro selecionadas para análise morfométrica. Área contornada internamente, neurópila (N); Área externa, exceto lobo óptico (LOP), células de Kenyon (cK).

Os radioimunoensaios foram realizados no Laboratório de Genética da Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto, SP, sob a co-orientação do Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder, seguindo-se as seguintes metodologias:

### **2.3.2 Hormônio Juvenil**

As amostras de hemolinfa foram centrifugadas a 7500 x *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de 5 mL contendo 1 mL de NaCl a 0,9% e 1 ml de hexano, agitados e mantidos em gelo por 10 minutos, seguindo-se centrifugação à 7500 x *g* a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e ao restante de NaCl/acetonitrila foi adicionado 1 mL de hexano, repousando por 10 minutos em gelo seguida de nova centrifugação. O sobrenadante foi retirado e adicionado ao da primeira extração. Em seguida, o volume do hexano foi reduzido por evaporação em centrífuga à vacuo até 100-200 µL e posteriormente transferido para os tubos de radioimunoensaio.

A curva padrão foi obtida de solução hormônio juvenil III (Fluka) diluída em metanol (100 ng/mL). Foram utilizados 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 µL do HJ III e o volume completado com metanol para 100 µL. Às amostras adicionou-se 50 µL do anticorpo anti-hormônio juvenil III titriado (Amersham), seguindo-se a incubação a 4°C durante a noite. As proteínas foram precipitadas por adição de 250 µL de sulfato de amônio saturado seguindo-se repouso durante 30 minutos a 4°C. A seguir as amostras foram centrifugadas a 7500 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi resuspenso com 500 µL de sulfato de amônio a 50% durante 30 minutos a 4°C, seguindo-se nova centrifugação e descarte do sobrenadante. O precipitado foi resuspenso em 20 µL de água destilada e transferido para os tubos de cintilação juntamente com 5 mL de líquido de cintilação HiSafe 3 (Packard). As amostras foram analisadas em contador de cintilação líquida Beckman, com dois ciclos de 2 minutos/amostra. As concentrações foram calculadas comparando-se a curva padrão com os valores das amostras.

### **2.3.3 Ecdisteróides**

As amostras de hemolinfa diluídas em acetonitrila foram mantidas a 4°C por 1 hora. Em seguida, o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação a 10000 x *g* por 10 minutos. Três réplicas do sobrenadante foram transferidas para

tubos de ensaio (20 X 5 mm) e o solvente foi removido por evaporação em centrifugação à vácuo.

A curva padrão foi obtida de 20-hidroxicidisona sintética diluída em metanol (50 ng/mL) sendo utilizados os seguintes volumes desta solução: 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40.

Após a evaporação do solvente das amostras, foi adicionado 100 µL do anticorpo anti-ecdisona titriado e incubado a 4°C durante a noite. Logo após a incubação, foi adicionada às amostras e misturada 200 µL de solução saturada de sulfato de amônio, seguindo-se três extrações conforme descrito acima para a análise de hormônio juvenil. Ao precipitado, foi adicionado 40 µL de água destilada, seguindo-se transferência aos frascos de cintilação líquida contendo 5 mL de líquido de cintilação HiSafe3. Após repouso de 1 hora as amostras foram analisadas em contador de cintilação líquida Beckman.

As concentrações foram calculadas comparando-se a curva padrão com os valores das amostras.

## **2.4 Repertório Comportamental**

As observações comportamentais foram realizadas entre os meses de fevereiro e agosto de 2003 em operárias com idades conhecidas a partir da marcação de indivíduos recém-emergidos como descrito anteriormente.

Inicialmente foram feitas 50 horas de observações comportamentais qualitativas, correspondente à amostragem de todas as ocorrências *ad libitum* sensu ALTMANN (1974), para a definição dos principais atos comportamentais. As observações quantitativas foram feitas em sete sessões com 15 minutos a cada hora durante 24 horas, que seguiram o método de varredura de ALTMANN (1974).

Das seis colônias de *C. rufipes* mantidas em laboratório, apenas duas se adaptaram às condições laboratoriais até o término do levantamento de dados. Estas foram utilizadas nas observações comportamentais quantitativas.

Quinze minutos antes do início de cada sessão, o alimento era oferecido às formigas. As áreas de nidificação e arena de forrageamento permaneceram cobertas com papel celofane vermelho durante as observações para diminuir o estresse causado pela luminosidade do ambiente.

O teste “Qui-quadrado” foi utilizado para a comparação entre categorias comportamentais e idade, enquanto o teste Log Linear foi usado para comparar entre as categorias comportamentais e o polimorfismo das operárias.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Titulação Hormonal

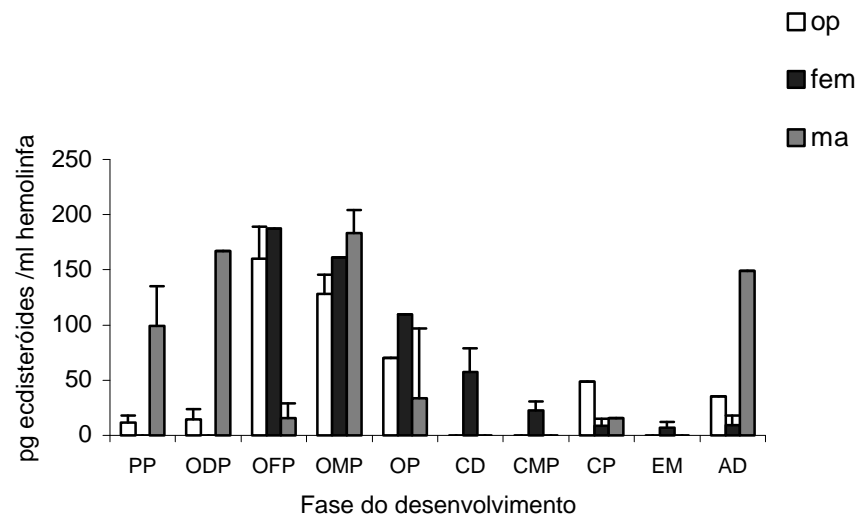
Os títulos de ecdisteróides na hemolinfa de operárias e fêmeas de *C. rufipes* durante o período pupal seguiram um padrão proporcionalmente semelhante de decréscimo no decorrer do desenvolvimento, com maior título de ecdisteróide circulante em pupas de fêmeas de olho fracamente pigmentado seguido de decréscimo progressivo até a vida adulta (Figura 8).

O título de ecdisteróides em machos foi alto em quase todas as fases do desenvolvimento exceto em pupas de olho fracamente pigmentado e de corpo pigmentado. Diferentemente do observado para operárias e fêmeas, que na fase adulta apresentaram acentuado decréscimo no título de ecdisteróides, os machos adultos mostram um elevado título deste hormônio embora na fase anterior, de pupa com corpo pigmentado, tenha ocorrido diminuição (Figura 8).

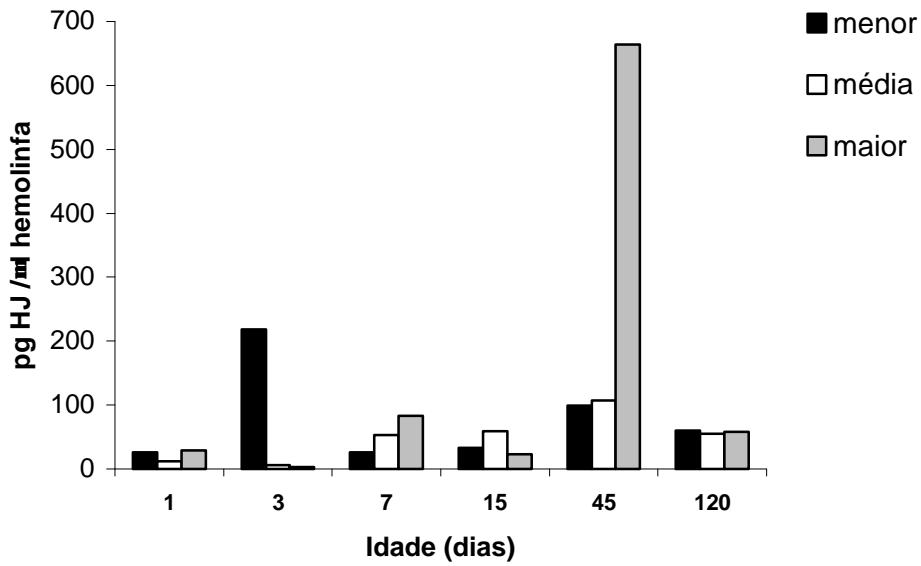
A titulação de HJ nas operárias adultas com diferentes idades indica que as operárias *minor* apresentaram pico de HJ aos três dias de idade, seguindo-se decréscimo e nova elevação, porém em *minor* intensidade aos 45 dias o qual manteve-se próximo até os 120 dias de vida adulta (Figura 9). Nas operárias *media* há uma elevação no título de HJ a partir do sétimo dia de vida adulta com pico aos 45 dias e manutenção até os 120 dias (Figura 9). As operárias *major* também apresentaram um aumento no título de HJ a partir do sétimo dia de vida adulta, seguindo-se queda acentuada aos 15 dias e um pico elevado aos 45 dias, seguindo-se nova queda aos 120 dias de vida adulta (Figura 9).

Os maiores títulos de HJ foram encontrados em operárias *minor* com três dias (217 pg HJ/ $\mu$ L hemolinfa) e operárias *major* com 45 dias de vida (664 pg HJ/ $\mu$ L hemolinfa). Embora operárias *media* não apresentem títulos tão altos de HJ, o menor valor encontrado (6 pg HJ/ $\mu$ L hemolinfa) corresponde aos três dias de vida e o maior (107 pg HJ/ $\mu$ L hemolinfa), aos 45 dias. Todas as operárias com 120 dias de vida adulta apresentaram valores próximos de 57 pg HJ/ $\mu$ L hemolinfa.

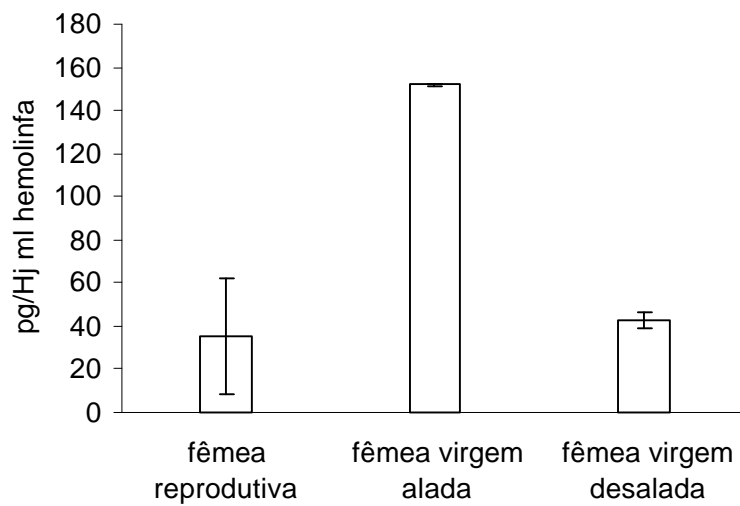
O título de HJ em fêmeas virgens e funcionais apresentou perfis diferentes. Fêmeas em plena atividade reprodutiva (35 pg HJ/ $\mu$ L), fêmeas virgens aladas (152 pg HJ/ $\mu$ L) e fêmeas virgens desaladas (43 pg HJ/ $\mu$ L) (Figura 10).



**Figura 8** – Título de ecdisteróides em operárias, fêmeas e machos de *Camponotus rufipes*, em diferentes fases do desenvolvimento pupal. Pré-pupa (PP), pupa de olho despigmentado (ODP), pupa de olho fracamente pigmentado (OFP), pupa de olho mediantemente pigmentado (OMP), pupa de olho pigmentado (OP), pupa de corpo despigmentado (CD), pupa de corpo mediantemente pigmentado (CP), pupa de corpo pigmentado (CP), emergindo (EM) e adulto (AD).



**Figura 9** - Título de hormônio juvenil em operárias adultas *minor*, *media* e *major* de *Camponotus rufipes* com diferentes idades.



**Figura 10** – Título de hormônio juvenil em fêmeas adultas de *Camponotus rufipes* em diferentes estados fisiológicos.

### **3.2 Repertório Comportamental**

As análises de varredura mostraram que 40 atos comportamentais podem ser identificados entre as operárias de *C. rufipes*. Estes foram distribuídos nas seguintes categorias comportamentais: alimentação, comunicação, cuidado parental, defesa, relações agonísticas, exploração, imobilidade e limpeza (Apêndice).

Os atos que determinavam o comportamento alimentar foram avaliados através da observação de trofalaxia, onde os indivíduos que forneciam o alimento permaneciam com as mandíbulas abertas e a busca direta na fonte, constituída por larvas de *Tenebrio molitor* ou mel. A comunicação foi caracterizada pela ocorrência de contato físico através da antenação de uma formiga à outra ou do contato mútuo entre ambas. Na categoria de cuidado parental, levou-se em consideração todos os momentos em que as operárias tinham contato com os imaturos, desde a fase de ovo até a fase pupal, independentemente de estarem se locomovendo ou não. O comportamento de defesa foi identificado quando as formigas permaneciam imóveis em postura de guarda e com as antenas elevadas. As relações agonísticas foram caracterizadas como confrontos entre os indivíduos, determinados pela investida direta de um contra o outro ou através de disputa por larvas ou pupas, onde as formigas seguravam o imaturo pela mandíbula e puxavam, cada uma, em sua direção. Formigas que caminhavam tanto na arena de forrageamento como na área de nidificação tocando ou não o substrato com as antenas foram incluídas na categoria comportamental de exploração. A imobilidade foi caracterizada por formigas que ficavam totalmente imóveis na arena de nidificação ou na arena de forrageamento, isoladas ou agregadas a outras formigas. Atos comportamentais de limpeza caracterizavam-se pela limpeza do próprio corpo ou das companheiras de ninho.

O comportamento das operárias com as idades de um a sete dias não foi analisado, pois estas não totalizaram um número de amostras aceitável para o teste, porquê indivíduos com estas idades ficavam permanentemente agregados a outros logo após a emergência, dificultando a identificação das formigas marcadas. As formigas adultas de oito a 120 dias mostraram não haver relação da idade com o desempenho de qualquer categoria comportamental realizada por *C. rufipes* (Tabela 1). Porém, o tamanho da operária mostrou ser significativo para o cuidado com a

prole, a exploração e a imobilidade dentro dos ninhos, desempenhados por operárias menores, as quais de um total de 1474 observações, apresentaram 4,14% de frequência no cuidado parental, 9,70% na exploração e 6,92% de imobilidade (Tabela 2).

O teste “Log linear” mostrou que as interações somente foram significativas ao confrontar os tamanhos e as categorias comportamentais, constituídas pelo cuidado parental e a imobilidade (Tabela 3).

TABELA 1 – Frequência de atos comportamentais executados por operárias de *Camponotus rufipes* com diferentes idades em condições de laboratório (84 horas de observações quantitativas).

Categorias comportamentais	n	Idade (8-45 dias)	Idade (46-120 dias)	$\chi^2$	gl	p
		1520	2718			
<b>Alimentação</b>		0,07%	0,15%	0,547	1	0,459
<b>Cuidado Parental</b>		1,64%	1,99%	0,623	1	0,429
<b>Comunicação</b>		0,13%	0,15%	0,016	1	0,897
<b>Defesa</b>		0,13%	0,15%	0,016	1	0,897
<b>Relações Agonísticas</b>		0,20%	0,22%	0,025	1	0,873
<b>Exploração</b>		6,71%	6,25%	0,337	1	0,561
<b>Imobilidade</b>		4,21%	3,35%	2,057	1	0,151
<b>Limpeza</b>		0,07%	0,18%	0,962	1	0,326

TABELA 2 - Frequência de atos comportamentais executados por operárias *minor*, *media* e *major* de *Camponotus rufipes* em condições de laboratório resultante de 84 horas de observações quantitativas.

Categorias comportamentais	Operárias			$\chi^2$	gl	p
	n	<i>minor</i>	<i>media</i>			
<b>Alimentação</b>	<b>1474</b>	<b>1382</b>	<b>1382</b>	1,403	2	0,495
<b>Cuidado Parental*</b>	4,14%	0,07%	0,07%	66,751	2	<0,001
<b>Comunicação</b>	0,34%	0,00%	0,07%	2,42	1	0,119
<b>Defesa</b>	0,07%	0,14%	0,22%	1,125	2	0,569
<b>Relações Agonísticas</b>	0,27%	0,22%	0,14%	0,542	2	0,762
<b>Exploração*</b>	9,70%	4,49%	4,85%	40,716	2	<0,001
<b>Imobilidade*</b>	6,92%	1,37%	2,46%	70,582	2	<0,001

\* Diferença significativa entre os grupos de operárias

TABELA 3 – Interações entre os fatores idade (1), tamanho (2) e repertório comportamental (3) de operárias de *Camponotus rufipes* em condições de laboratório (84 horas de observações quantitativas).

<b>INTERAÇÕES</b>			
<b>Idade = 1</b>			
<b>Tamanho = 2</b>	$\chi^2$	gl	p
<b>C. Comportamental = 3</b>			
<b>Alimentação</b>			
1-2-3	0,283	4	0,99
1-3	1,978	6	0,921
2-3	0,973	6	0,986
<b>Cuidado Parental</b>			
1-2-3	1,61	4	0,806
1-3	2,609	6	0,856
2-3	67,084	6	<0,001
<b>Comunicação</b>			
1-2-3	0,958	4	0,916
1-3	2,949	6	0,815
2-3	4,37	6	0,626
<b>Defesa</b>			
1-2-3	1,732	4	0,784
1-3	2,934	6	0,816
2-3	2,128	6	0,907
<b>Relações Agonísticas</b>			
1-2-3	4,356	4	0,359
1-3	4,796	6	0,57
2-3	4,428	6	0,618
<b>Exploração</b>			
1-2-3	0,675	4	0,954
1-3	5,409	6	0,492
2-3	0,774	8	0,999
<b>Imobilidade</b>			
1-2-3	3,62	4	0,459
1-3	5,982	6	0,425
2-3	79,066	6	<0,001
<b>Limpeza</b>			
1-2-3	0,28	4	0,991
1-3	1,936	6	0,925
2-3	2,195	6	0,9

### **3.3 Análise Morfométrica**

Em *Camponotus rufipes* a largura da cápsula cefálica foi  $1,28 \pm 0,16$ mm (n=38) em operárias *minor*,  $1,51 \pm 0,14$  mm (n=47) em *media* e  $1,89 \pm 0,25$  mm (n=31) em *major*. Valores entre parênteses correspondem a média±desvio padrão.

O volume do cérebro de operárias de *Camponotus rufipes* observado durante o desenvolvimento pupal mostrou variação crescente desde a fase de pré-pupa e tomou novas proporções até aquela fase em que os indivíduos estavam em processo de emergência, totalizando 25% de crescimento. Mudanças significativas no volume total do cérebro foram observadas a partir de cinco momentos críticos do processo de desenvolvimento: em pré-pupa ( $3,6 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>), na pupa de olho despigmentado ( $8,7 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>), em indivíduos com olho fracamente pigmentado ( $9,2 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>), em pupas com olho pigmentado ( $9,8 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) e em indivíduos com corpo pigmentado ( $12,8 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) (Figura 11).

Em pupas de machos de *C. rufipes* o volume total do cérebro exibiu valores decrescentes desde a fase pré-pupal ( $4,0 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) até pupas de olho fracamente pigmentado ( $3,38 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>). As fases de pupas com olho mediantemente pigmentado ( $4,52 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) e corpo pigmentado ( $4,88 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) constituem os momentos críticos do desenvolvimento cerebral, já que o volume apresentou proporções significativas de crescimento seguindo-se, decréscimo na fase adulta ( $4,67 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) (Figura 12).

A análise morfométrica do cérebro de operárias polimórficas evidenciou diferenças significativas em indivíduos com três e 45 dias de vida adulta entre os diferentes tamanhos, enquanto nas operárias com um, sete, 15 e 120 dias de vida adulta não foram encontradas diferenças significativas nos volumes dos cérebros entre as operárias *minor*, *media* e *major* (Figura 13). O cérebro de operárias *major* apresentou maior volume ( $14,06 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) em indivíduos com três dias de idade, seguido pelo das operárias *minor* ( $10,96 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>) e *media* ( $8,66 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>). Operárias com 45 dias de vida exibiram valores crescentes de  $7,13 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup>,  $10,68 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup> e  $13,05 \times 10^{-4}$  mm<sup>3</sup> nas operárias *minor*, *media* e *major*, respectivamente.

Os dados de variação de volume do cérebro em função da idade foram submetidos à análise de regressão obtendo-se um ajuste robusto com modelo

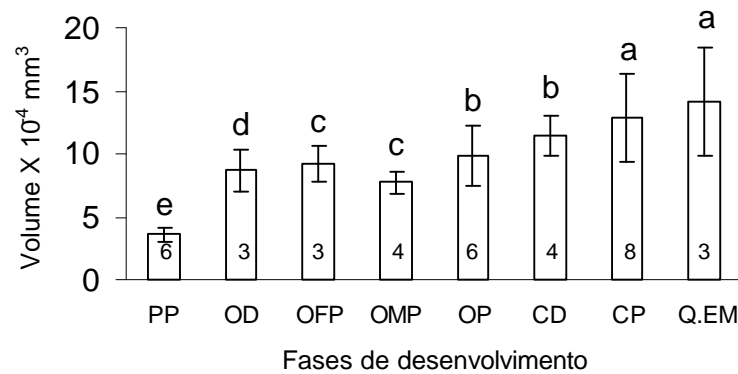
quadrático. A figura 14 mostra que em operárias *minor* o volume do cérebro nos indivíduos adultos com um dia ( $10,03 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ), três dias ( $10,96 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ) e sete dias ( $11,03 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ) de vida adulta apresenta maiores proporções, seguindo uma tendência de queda no 15º dia ( $7,86 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ) e 45º dia ( $7,13 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ) de vida adulta, voltando a crescer quando a operária alcança os 120 dias de vida ( $10,73 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ).

Em operárias *media* e *major*, o volume do cérebro não apresentou variações significativas no decorrer do tempo de vida adulta com volume médio de  $10,76 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$  e  $11,93 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$  nas operárias *media* e *major*, respectivamente (Figuras 15 e 16).

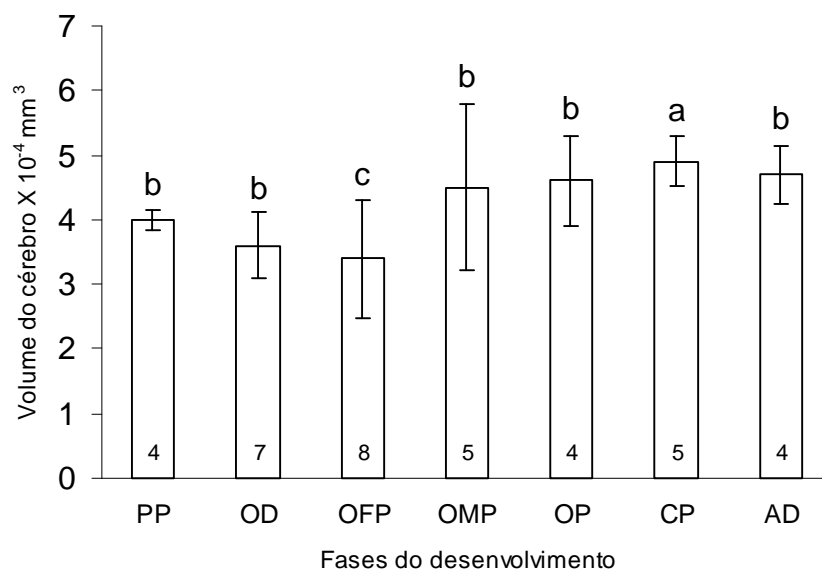
Para a análise morfométrica da neurópila do cérebro, foram avaliados o tamanho e a idade das operárias, separadamente, por não haver efeito de interação entre as idades dentro dos diferentes tamanhos das operárias. Em operária *major*, a neurópila exibiu volume significativamente maior quando comparado a operárias *media* e *minor*, que apresentaram volumes de neurópila estatisticamente semelhantes (Figura 17). Com análise de regressão a 1% foi possível avaliar a ocorrência de mudanças na neurópila do cérebro durante o amadurecimento da casta operária e verificou-se que o volume da neurópila aumenta constantemente à medida que estas atingem maiores idades (Figura 18).

O volume total do cérebro de soldados e fêmeas desaladas, embora com valores diferenciados, não apresentou diferença significativa entre estes dois grupos de insetos (Figura 19).

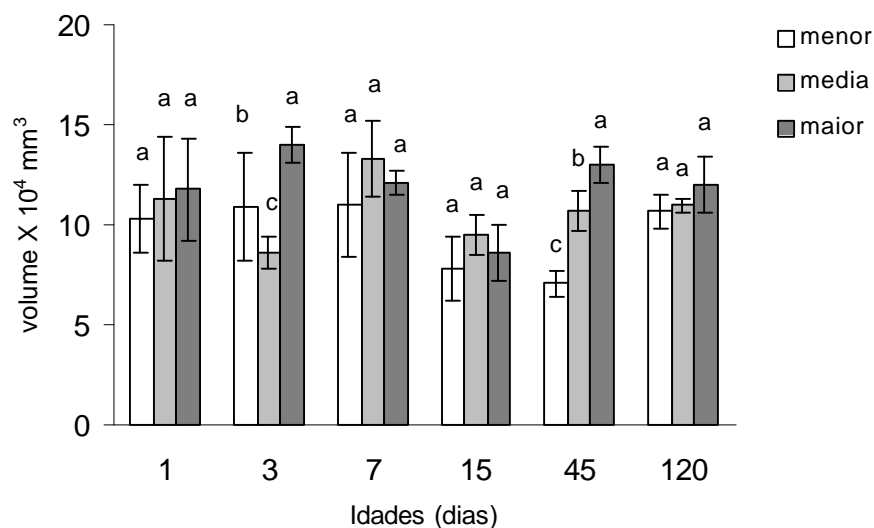
Comparações entre o volume dos cérebros de fêmeas desaladas, fêmeas com um par de asas e soldados contra operárias *major* não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,005$ ), no entanto comparações entre o volume do cérebro destes e o de macho apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,005$ ), pelo teste de Tukey.



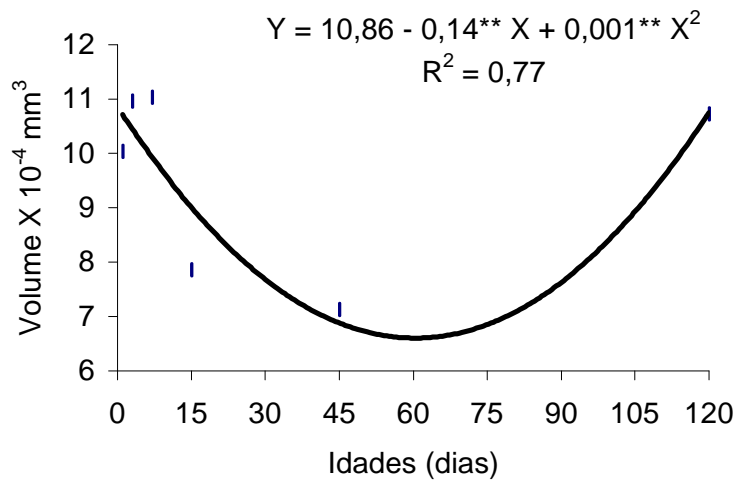
**Figura 11** – Volume do cérebro (média  $\pm$  desvio padrão) em pupas de operárias de *Camponotus rufipes* em diferentes estágios de desenvolvimento. PP – prepupa, OD – olho despigmentado, OFP – olho fracamente pigmentado, OMP – olho mediamente pigmentado, OP – olho pigmentado, CD – corpo despigmentado, CP – corpo pigmentado, Q.EM – quase emergindo. Valores dentro das barras correspondem ao número de amostras. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



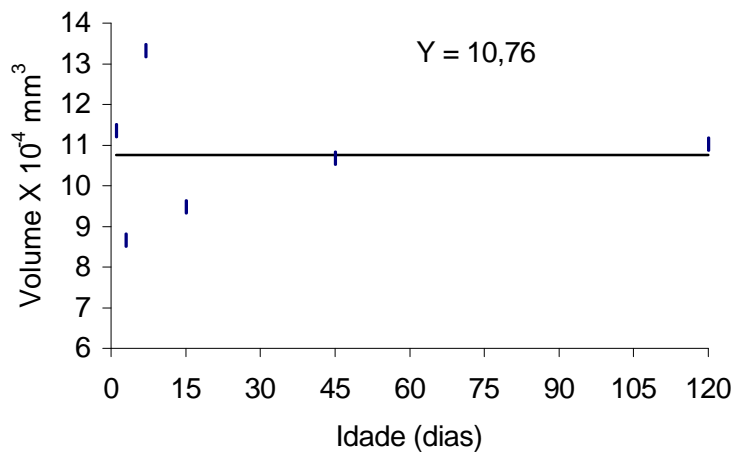
**Figura 12** - Volume do cérebro (média  $\pm$  desvio padrão) em pupas de machos de *Camponotus rufipes* em diferentes estágios de desenvolvimento. PP – prepupa, OD – olho despigmentado, OFP – olho fracamente pigmentado, OMP – olho mediamente pigmentado, OP – olho pigmentado, CP – corpo pigmentado, AD – adulto. Valores dentro das barras correspondem ao número de amostras. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



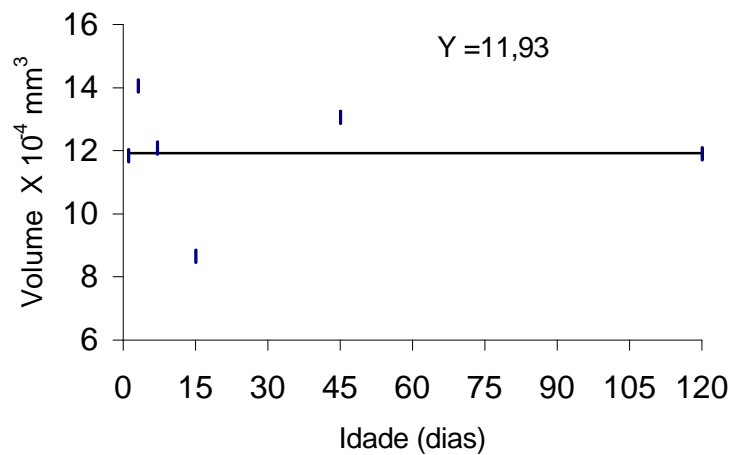
**Figura 13** – Volume do cérebro (média  $\pm$  desvio padrão) em operárias adultas polimórficas (*minor*, *media* e *maior*) de *Camponotus rufipes* com diferentes idades. Barras com mesma letra em uma mesma idade não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Tukey.



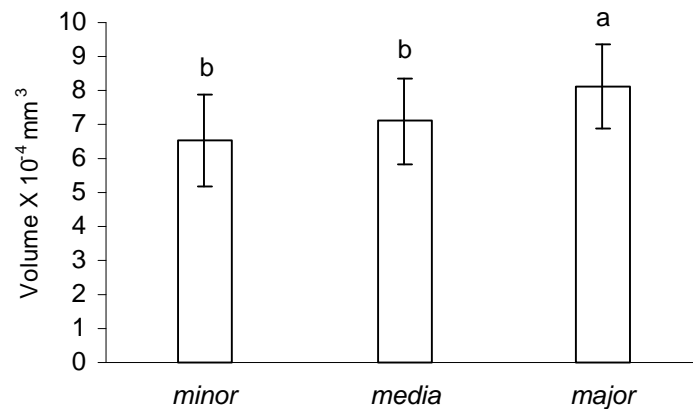
**Figura 14** – Variação do volume do cérebro adulto de operária *minor* de *Camponotus rufipes* em função da idade. Operárias com um dia de vida adulta, n = 5; 3 dias, n = 3; 7 dias, n = 5; 15 dias, n = 3; 45 dias, n = 5; 120 dias, n = 6.



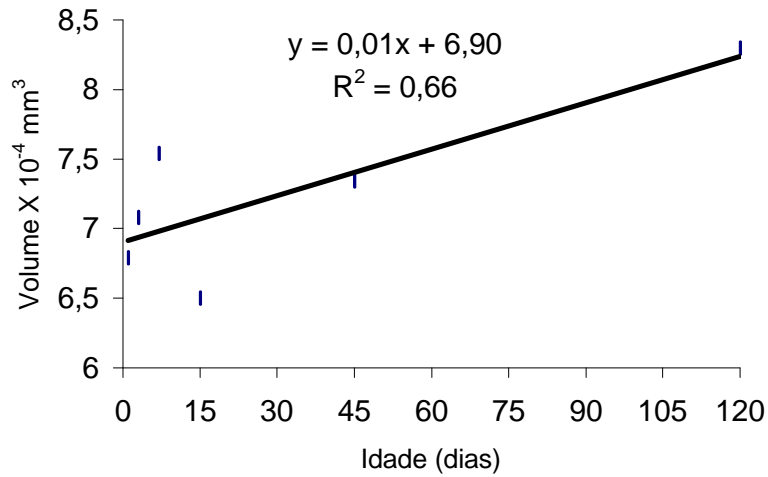
**Figura 15** – Ausência de alterações significativas no volume do cérebro de operária *media* adulta de *Camponotus rufipes* em função da idade. Operárias com um dia de vida adulta, n = 4; 3 dias, n = 7; 7 dias, n = 5; 15 dias, n = 8; 45 dias, n = 6; 120 dias, n = 8.



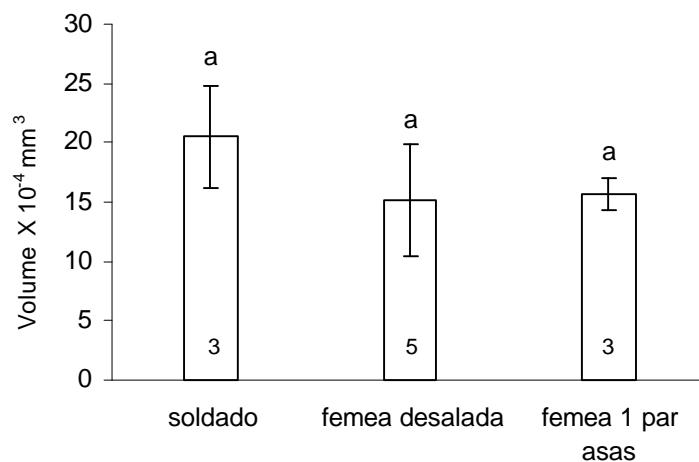
**Figura 16** – Ausência de alterações significativas no volume do cérebro de operária *major* adulta de *Camponotus rufipes* em função da idade. Operárias com um dia de vida adulta, n = 4; 3 dias, n = 3; 7 dias, n = 5; 15 dias, n = 4; 45 dias, n = 5; 120 dias, n = 8.



**Figura 17** – Volume da neurópila (média ± desvio padrão) das operárias adultas *minor*, *media* e *major* de *Camponotus rufipes*. Barras com mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Tukey. n = 18 para cada subcasta de operária.



**Figura 18** – Variação do volume da neurópila do cérebro de operárias adultas *minor*, *media* e *major* de *Camponotus rufipes* em função da idade. n = 18.



**Figura 19** - Volume do cérebro de soldados e fêmeas adultas de *Camponotus rufipes* desaladas. Os valores observados não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ); Valores dentro das barras correspondem ao número de amostras. Teste de Tukey, mas podem decorrer do pequeno número de amostras e de tratamentos submetidos à análise.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Neuroplasticidade pós-embriônica

O remodelamento do sistema nervoso é um fenômeno natural encontrado em vertebrados e invertebrados e, principalmente durante o desenvolvimento, ele é indispensável ao funcionamento e equilíbrio de uma diversidade de outros sistemas do organismo. Durante a metamorfose dos insetos, por exemplo, os sistemas neurais e motores sofrem intenso remodelamento para acomodar transformações comportamentais futuras (LEVINE & TRUMAN., 1982; LEVINE et al., 1995; CONSOULAS et al., 2000; TISSOT & STOCKER, 2000).

Questões sobre como se dá a reorganização do cérebro de um inseto durante o desenvolvimento pós-embriônico são levantadas por alguns autores (TECHNAU & HEISENBERG, 1982; BOOKER & TRUMAN, 1987; LEVINE et al., 1995), evidenciando alguns fatores que contribuem para tal acontecimento, como: reestruturação de fibras nervosas, neurogênese, produção de novas interações sinápticas e morte celular programada. As alterações constantes no volume do cérebro durante o desenvolvimento pupal de operárias e machos de *C. rufipes* podem refletir a influência destes fatores. Em *D. melanogaster*, a neurogênese pós-embriônica cessa nos últimos estádios larvais ou no início do estágio pupal (LEVINE et al., 1995). No entanto, as ramificações das células de Kenyon, que já se encontram na mesma posição e orientação que no adulto, aumentam o número de fibras imaginais enquanto degeneram as fibras larvais, e os corpos celulares permanecem ativos (TECHNAU & HEISENBERG, 1982). Por outro lado, alta taxa proliferativa de células nervosas foi detectada em abelhas principalmente entre o fim da fase larval e o início da fase pupal (VITT & HARTFELDER, 1998). Além disso, os neurônios sensoriais que são adicionados enviam suas projeções para o sistema nervoso central e com isso as conexões estabelecidas podem levar ao crescimento ou aumento de suas arborizações (BURROWS, 1996).

O padrão de reorganização neural durante o desenvolvimento pós-embriônico foi descrito em algumas formigas como *Pachycondyla cafferaria*

(MASSON, 1970), *Acromyrmex octospinosus* (DELABIE *et al.*, 1984) e *A. subterraneus subterraneus* (SOARES & SERRÃO, 2001a). Neste último, na fase final de desenvolvimento, a pupa exibe a neurópila ocupando maior parte do cérebro, enquanto a área ocupada pelas células de Kenyon no cálice e demais regiões diminui. No cérebro de *A. octospinosus* e *A. subterraneus*, a acomodação das células nervosas apresenta constantes alterações morfológicas e morfométricas durante o desenvolvimento, mas nem todas essas alterações são diretamente proporcionais, pois os valores de área e volume não obedecem a uma cronologia, evidenciando uma conspícua plasticidade do cérebro, decorrente do provável aumento ou redução no número de células e de suas arborizações dendríticas e axônicas (SOARES *et al.*, 2004). Além disso, estas mudanças não ocorrem em todas as regiões do cérebro, os cálices dos *corpora pedunculata* sofrem grande variação, apresentando quatro centros de diferenciação celular que persistem por toda a fase pupal (DELABIE, 1984; SOARES & SERRÃO, 2001b).

Em machos de *C. rufipes* o volume do cérebro não seguiu o mesmo padrão de desenvolvimento que em operárias, apresentando queda de volume em dois momentos, incluindo a fase adulta, podendo ser justificados pela morte programada de células nervosas, além da degeneração da neurópila, como demonstrado por Technau & Heisenberg (1982), em *D. melanogaster*. Quanto ao padrão de desenvolvimento cerebral de operárias de *C. rufipes*, o mesmo foi encontrado em pupas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, evidenciando aumento constante no volume do cérebro desde as fases pupais iniciais até a vida adulta, e em machos, cujo volume em adultos apresentou igual redução (SOARES & SERRÃO, 2001a). A redução na estrutura cerebral de machos adultos pode ter função adaptativa, pois sob a perspectiva de alocação de energia, o tecido neural é metabolicamente dispendioso, favorecendo nesta fase inicial da vida dos machos de *C. rufipes* a maturação de testículos e a espermatogênese através da redução da sua atividade cerebral, como sugerido por Julian & Gronenberg (2002) e Gronenberg & Liebig (1999), para a redução do cérebro de rainhas da formiga *Pogonomyrmex rugosus* e *Harpegnathos saltator*, em favor da produção de ovos. Porém, Julian & Gronenberg (2002) avaliaram a hipótese de que a redução do metabolismo e do estresse oxidativo através da redução do cérebro aumenta o tempo de vida de rainhas de formigas. Portanto, é improvável que para machos de formigas esta conjectura seja aceita, pois segundo Hölldobler & Wilson (1990), estes vivem somente até o vôo de acasalamento e realização da cópula.

O remodelamento neural durante a fase pós-embrionária tem mostrado estreita influência de hormônios morfogenéticos. Os ecdisteróides parecem controlar a proliferação celular durante o desenvolvimento do lobo óptico de *Manduca sexta* de duas formas: inicialmente, níveis moderados de ecdisteróides estimulam a proliferação, posteriormente, altos níveis de 20-hidroxicdisona disparam uma onda de apoptose, concluindo a fase proliferativa (CHAMPLIN & TRUMAN, 1998). Ainda em *M. sexta*, os ecdisteróides mostraram ser os responsáveis pelo fenômeno de morte celular programada, promovendo uma progressiva simplificação da musculatura da região abdominal durante a metamorfose, cujo acontecimento é particularmente aparente entre os motoneurônios (ZEE & WEEKS, 2001). Em *D. melanogaster*, a fase de rápida degeneração axonal sem morte celular seguida por regeneração axonal durante a metamorfose, ocorreu mediante aplicação de 20-hidroxicdisona, aumentando consideravelmente o comprimento total de neuritos, bem como o número de ramificações dos *corpora pedunculata* (KRAFT et al., 1998). Em *Melipona quadrifasciata*, os ecdisteróides também participaram de outro evento importante que ocorre durante a construção do sistema nervoso pós-embrionário, a fusão dos gânglios segmentais do cordão nervoso ventral (PINTO, 2001).

Os altos títulos de ecdisteróides durante o período pupal de machos de *C. rufipes* até a vida adulta sugerem um possível requerimento de maior quantidade deste hormônio, provavelmente para a ocorrência de espermatogênese num espaço mais curto de tempo, já que estes são os últimos representantes da casta reprodutiva a serem produzidos. Durante a vida adulta, a fonte conhecida de ecdisteróides em machos é o testículo (HAGEDORN, 1985; NIJHOUT, 1994). O envolvimento dos ecdisteróides na maturação sexual de macho de *A. mellifera* foi estudado por Colonello & Hartfelder (2003), sendo observados altos títulos de ecdisteróides na emergência seguidos de um rápido declínio nos primeiros dias de vida adulta.

A ação dos ecdisteróides sobre pupas de operárias e rainhas de *C. rufipes* parece surtir um mesmo efeito nestas duas castas, ou seja, altos títulos iniciais desencadeiam o desenvolvimento pupal e títulos cada vez mais baixos são encontrados à proporção que o inseto se aproxima da vida adulta, tendência observada também em *A. mellifera* (FELDLAUFER et al., 1985; PINTO et al., 2002) e em *Melipona quadrifasciata* (PINTO et al., 2002). Em *A. mellifera*, os baixos títulos de ecdisteróides encontrados no fim do estágio pupal de operárias e rainhas coincide com o aparecimento de vitelogenina na hemolinfa e com o aumento do título de

hormônio juvenil circulante (BARCHUCK et al, 2002). Estes eventos caracterizam efeitos organizacionais que os ecdisteróides promovem durante esta fase crítica da vida, que inclui dentre outros, o crescimento de arborizações dendríticas e a diferenciação neuropilar (BOOKER & TRUMAN, 1987; LEVINE et AL., 1995; WEEKS, 1999). Portanto, como em pupas de *C. rufipes* foi observado um perfil semelhante de ecdisteróides, é possível que algo semelhante esteja ocorrendo nestas formigas.

A evidência da ação de ecdisteróides na muda pupal neste trabalho também é caracterizada pelo padrão de pigmentação cuticular e do olho, visto que, à proporção que se desenvolvem, as colorações de ambos se intensifica. Segundo BITONDI et al. (1998), em *A. mellifera* estes eventos ocorrem sob condições de baixo título de hormônio juvenil e são precedidos pelo aumento nos ecdisteróides.

#### **4.2 Neuroplasticidade adulta**

Os estudos sobre o desenvolvimento do cérebro durante a vida adulta parecem trazer várias confirmações sobre as possíveis alterações decorrentes de estímulos extrínsecos e intrínsecos e a elaboração comportamental encontrada em insetos sociais, tão bem estudados em abelhas (FAHRBACH & ROBINSON, 1995; 1996; FAHRBACH et al., 1998). Porém, a diversidade de modos como esses estímulos atuam e a diversidade de respostas a eles, também traz consigo, dúvidas sobre os mecanismos envolvidos, que serão discutidos a seguir:

Em subcastas operárias de *C. rufipes*, as idades em que o volume do cérebro mostrou diferenças significativas, coincidiu com aquelas em que foram encontrados os maiores títulos de hormônio juvenil (três e 45 dias de idade), embora não haja sido encontrada relação entre o tamanho do cérebro e das operárias das três subcastas, nem entre os níveis de hormônio juvenil e o tamanho do cérebro. Associado a isto, estas variações no volume do cérebro são significativas somente em operárias *minor* e é muito maior nos primeiros dias de vida adulta e a partir dos sessenta dias.

Os primeiros dias de vida após a emergência de um inseto adulto são cruciais para a integração e socialização dos indivíduos em sua colônia maternal (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990) e é possível que as alterações na estrutura cerebral nesta fase sejam provenientes da aprendizagem durante o reconhecimento de odores dos companheiros de ninho. A identidade de uma colônia de formigas

baseia-se no reconhecimento de companheiras de ninho e é mediada através de substâncias cuticulares, que são transferidas de um indivíduo para o outro durante a trofalaxia que é então, reaplicada sobre sua cutícula através da lambedura do próprio corpo, ou ainda através de lambedura do corpo das outras companheiras da colônia (LENOIR et al., 1999). Este contato entre os indivíduos do mesmo ninho mantém o odor da colônia único e homogêneo (BOULAY & LENOIR, 2001). A trofalaxia e o comportamento de lambedura executada pelas operárias de *C. rufipes*, embora não apresentassem frequência significativa neste trabalho, podem ser seguramente considerados por estes já terem sido observados em outras espécies de *Camponotus* (JAFFÉ & SANCHES, 1984; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; BOULAY, 2001).

Fielde (1903; 1904; 1905) citado por Hölldobler & Wilson (1990), sugeriu que o odor da colônia muda com a idade. Esta observação foi testada por Soroker et al. (1995), que afirmou que a espessura da camada epitelial aumenta com a idade, atingindo seu máximo na primeira semana após a emergência, promovendo concomitantemente, o aumento na quantidade de hidrocarbonetos presentes. Van Der Meer & Morel (1998) confirmaram esta hipótese ao observar uma variação quantitativa dependente da idade na produção e liberação de substâncias implicadas na formação de odor da colônia. Estudos conduzidos com a formiga *Camponotus pennsylvanicus* mostraram que a aceitabilidade de operárias adultas a formigas jovens de outros ninhos, é maior em formigas de zero a cinco dias de idade (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). O mesmo foi demonstrado para abelhas operárias de *Melipona panamica* (Meliponini) de dois a seis dias de idade que foram introduzidas na colônia (INOUE et al., 1999).

Hölldobler & Wilson (1990) sugerem que as operárias de *Camponotus* apresentam uma tendência flexível à aprendizagem de odores de sua própria espécie e que a aprendizagem pré-imaginal pode estar envolvida. Um fenômeno comportamental discutido entre insetos jovens, é a aprendizagem por “imprinting”, que ocorre na maior parte ou exclusivamente durante breves períodos de sensibilidade do ciclo de vida, favorecendo a aquisição de memória. A aprendizagem de odor da colônia é o exemplo mais notável de imprinting que ocorre nos primeiros dias após a emergência do adulto, porém a existência deste período não exclui a possibilidade de atualização da memória (LENOIR et al., 1999).

A habilidade de operárias jovens de *Camponotus japonicus* para discriminar suas rainhas foi examinada por Hara (2003). Estas só conseguiam discernir entre a

rainha de sua colônia e a de outra colônia após os três dias de idade. Associado a isto observou-se que a maturação do cérebro das operárias jovens com idades entre três e oito dias que não haviam reconhecido a rainha, apresentaram atividade mitótica nas células gliais do lobo antenal, indicando que em operárias recém-emergidas, a habilidade para discriminar a rainha coincidiu com a conclusão da proliferação celular no cérebro e que o sistema que capacita a formiga a discriminar, aprender ou perceber o odor não estava completamente maduro em operárias jovens. Portanto, este processo parece estar relacionado com a idade, a fase de aprendizagem de odor e também com o contato social, visto que operárias isoladas após a emergência demoraram a discriminar a rainha.

As informações quimiosensoriais envolvidas no reconhecimento de indivíduos de uma mesma colônia podem ser percebidas por células receptoras do lobo antenal, que constitui a neurópila olfativa primária do cérebro do inseto. Estes recebem impulsos através da antena e transmitem a informação através das projeções neuronais que se dirigem para o cérebro, em particular para os *corpora pedunculata*, região envolvida na aprendizagem do reconhecimento de companheiras de ninho (HARA, 2003). Masson & Arnold (1984), ao observarem o sistema olfatório de abelhas, sugeriram que os estímulos sensoriais que surgem até o oitavo dia após a emergência podem afetar a estrutura do lobo antenal, como também observado por Sandoz et al. (2000). Estudos eletroantenográficos em operárias *major* de *A. octospinosus* mostraram que, desde as primeiras horas de vida adulta, formigas submetidas a três compostos químicos diferentes apresentaram percepção olfativa diferente a cada produto de forma crescente em função da idade (DELABIE, 1984). Estes eventos que envolvem a maturação cerebral devem ser considerados dentro de um contexto de adaptação do inseto ao novo modo de vida adulta e sendo assim, os estímulos recebidos através do sistema olfativo de operárias *minor* de *C. rufipes* nos primeiros dias de vida, estão preparando-as para as atividades de cuidado, exploração e imobilidade, que foram as mais freqüentes em formigas de oito a 120 dias de idade observadas durante as avaliações comportamentais. Desta forma, presume-se que as regiões do cérebro de *C. rufipes* mais afetadas por estes fenômenos sejam a neurópila do lobo antenal e conseqüentemente, os *corpora pedunculata*.

As operárias de *C. rufipes* com idade de um a sete dias de vida adulta permaneceram imóveis próximas à cria ou agregadas a outras formigas adultas. Este comportamento pode estar relacionado com a aprendizagem de odores da

colônia pela redistribuição de hidrocarbonetos cuticulares das companheiras de ninho. Embora em *C. rufipes* a fonte de odor da colônia seja de origem glandular (JAFFÉ & SANCHES, 1984), a possibilidade de contaminação dessa secreção por odores provenientes de outras partes do corpo através de contato também é sugerido. Assim, como a memória de odor da colônia precisa ser plástica, promovendo novas interações e adaptações, a aprendizagem de reconhecimento pelo odor pode não estar limitada aos primeiros dias de vida, podendo ser reforçada e contínua durante toda a vida adulta (LENOIR et al., 1999; HARA, 2003), como foi sugerido para *Camponotus fellah* (BOULAY et al., 2001). Deste modo, todos estes fatores podem estar promovendo modificações estruturais no cérebro e também mudanças no padrão hormonal de operárias de *C. rufipes* em diferentes momentos da vida adulta.

A redução do cérebro num determinado momento da vida adulta apresentado pelas operárias menores de *C. rufipes* à proporção que estas amadureceram pode ser produto de fatores que, provavelmente, não seguem os mesmos critérios observados para redução de cérebro de machos adultos comentados anteriormente à despeito da função adaptativa sob a perspectiva de alocação de energia. No entanto, esta redução parece não afetar o volume da neurópila, já que este aumenta progressivamente com a idade das formigas. Neste caso, o número ou o tamanho das células de Kenyon pode estar sendo afetado em detrimento do aumento no tamanho ou no número de suas ramificações. A ocorrência de morte neuronal nestes insetos durante este período da vida é discutível, pois as evidências de morte celular em muitos insetos holometábolos são observadas logo após a emergência do adulto, decorrente de neurônios larvais que persistem durante a metamorfose para serem usados nos momentos finais de emergência, células estas que são em sua maioria motoneurônios, que estão sendo reespecificados no processo de adaptação do inseto a vida adulta (ROBINOW et al., 1993; LEVINE et al., 1995; CONSOULAS et al., 2000; WEEKS, 1999). A morte celular de neurônios durante a vida adulta de insetos parece ser influenciada por células da glia, que têm dentre outras funções, interagir com neurônios influenciando sua atividade (BURROWS, 1996). Porém, as evidências de morte destas células estão mais comumente ligadas à neurodegeneração, como em *D. melanogaster*, em que os processos gliais formam dobras com várias camadas ao redor dos neurônios e axônios, aumentando à proporção que o inseto envelhece (KRETZSCHMAR et al, 1997), causando a morte dos neurônios. Como os somata das células gliais estão distribuídos na região

cortical e na neurópila do cérebro (KRETZSCHMAR & PFLUGFELDER, 2002), é improvável que este evento ocorra no cérebro de *C. rufipes*, pois neste trabalho foi observado um aumento no volume da neurópila ao longo do desenvolvimento, o que não seria possível se houvesse morte celular de células da glia.

Em operárias *media* e *major* de *C. rufipes*, apesar do volume da neurópila ter aumentado com a idade, o volume total do cérebro não apresentou qualquer alteração. Como os dados comportamentais nestas subcastas não apresentaram desempenho relevante nas atividades, é presumível dizer que esta ausência de atividade não afetou o volume total do cérebro, mas que estímulos estão sendo processados e aprendidos promovendo alterações nas fibras nervosas, assim como nas operárias *minor*. Ao estabelecer relações entre os dados encontrados em abelhas com os encontrados em formigas, algumas diferenças foram observadas. Em abelhas, o volume total do cérebro permanece constante, enquanto em formigas o cérebro inteiro aumenta em tamanho; em abelhas, o volume das células de Kenyon diminui com a idade, enquanto em formigas diminui somente em relação ao volume total do cérebro. A suspeita de que os efeitos dos estímulos visuais sobre o cérebro de abelhas sejam indicadores de neuroplasticidade é decorrente das tarefas que requerem aprendizagem visual (DURST et al., 1994), enquanto que em formigas este evento pode ser estimulado pela experiência sensorial que afeta a região de impulso olfatório. Esta suspeita foi confirmada por Gronenberg et al. (1996), que analisando a região do colar de *Camponotus floridanus*, região responsável pela recepção de impulso visual, observaram que esta é menor e menos distinta do que em abelhas.

Variações no cérebro de insetos adultos vêm sendo exploradas, indicando a influência de estímulos externos relacionados com a experiência e/ou influência de hormônios. Em *A. mellifera*, espinhos dendríticos de interneurônios da região dos cálices dos *corpora pedunculata* com densas ramificações, foram encontrados com mais frequência em abelhas forrageiras de que em recém-emergidas e nutrizas, possivelmente porque abelhas forrageiras recebem uma maior gama de estímulos sensoriais devido à constante coleta de pólen e néctar, enquanto as nutrizas trabalham predominantemente na colméia, na manutenção e cuidado com a cria (COSS et al., 1980). O mesmo foi observado para subcompartimentos do cérebro que recebem impulso visual e olfativo (DURST et al., 1994). Sugestões de que o estímulo visual e o contato social poderiam estar envolvidos na plasticidade cerebral nos insetos sociais também foram testados por Fahrbach et al. (1998) em abelhas

de diferentes idades criadas isoladamente e na ausência de luz. Porém, o volume dos *corpora pedunculata* revelou um aumento significativo durante a transição para o forrageamento indicando ser independente da experiência de vôo, do estímulo visual e também do contato social. A investigação da participação de hormônios neste processo mostrou que baixo título de hormônio juvenil está associado ao comportamento executado dentro do ninho nas três primeiras semanas de vida adulta, enquanto alto título atingido após três semanas de idade está associado com o início do forrageamento (FAHRBACH & ROBINSON, 1995; 1996). Porém, quando operárias foram induzidas a forragear precocemente, mostraram um aumento nos níveis de hormônio juvenil e no volume dos *corpora pedunculata* similar àquelas forrageiras em idade normal, e quando abelhas jovens foram tratadas com um análogo de hormônio juvenil e forçadas artificialmente a ficar na colméia, imitando as condições hormonais da forrageira sem a experiência de vôo, elas também apresentaram aumento no volume da neurópila dos *corpora pedunculata* (STRAMBI et al., 1999). Estes últimos dados confirmam que a experiência de vôo e de forrageamento, não foram essenciais para o crescimento da neurópila. Uma observação pertinente, é que o hormônio juvenil parece não representar um fator indutor de alterações comportamentais em todos os grupos de insetos sociais. Em *Ropalidia marginata*, vespa primitivamente eusocial que apresenta polietismo etário, não foi observada diferença significativa para o início da execução de atos comportamentais por operárias mediante aplicação tópica de hormônio juvenil (AGRAHARI & GADAGKAR, 2003).

Em *C. floridanus*, desde a fase de pupa até 10 meses de idade, o volume total do cérebro aumentou aproximadamente 20%, principalmente na região dos lobos antenais e na neurópila dos *corpora pedunculata*, causando neste último a redução da região de células de Kenyon e o aumento do volume da neurópila. Além disso, operárias *minor* mantidas sob regime de ociosidade através da ausência de contato com a cria e de atividades de forrageamento, exibiram menor desenvolvimento de subcompartimentos do cérebro, quando comparadas a indivíduos com atividades normais (GRONENBERG et al., 1996).

Já em *Acheta domesticus*, os estímulos sensoriais influenciaram a neurogênese em fêmeas que, criadas em ambiente enriquecido com estímulo visual, olfativo, táctil e social, exibiam alta taxa de proliferação de células nos *corpora pedunculata* mesmo na ausência de hormônio juvenil (SCOTTO-LOMASSESE et al., 2002). Porém a participação dos ecdisteróides também foi detectada durante a

neurogênese (CAYRE et al., 2000). Supostamente, ambos teriam também uma outra função nestes insetos, expressar comportamento de oviposição, através de efeitos ativadores gerados no substrato neural constituído pelos *corpora pedunculata* (ELEKONICK & ROBINSON, 2000).

Os picos de hormônio juvenil apresentados em operárias *minor* de *C. rufipes* com três dias e maiores com 45 dias de vida adulta, mostraram um padrão que reflete o polimorfismo das castas de operárias, sugerindo uma regulação independente nestas. Os resultados obtidos com a análise comportamental de *C. rufipes* anularam a possibilidade de haver relação deste perfil hormonal com as tarefas executadas ao longo do ciclo de vida adulta, pois o desempenho de tarefas dentro do ninho não obedeceu àquelas observadas para formigas que apresentam polietismo etário. Além disso, as operárias *minor* mostraram ser as maiores responsáveis pela execução das tarefas mais freqüentes. Em *C. floridanus*, as operárias *minor* cuidam da cria no interior do ninho até a 10<sup>a</sup> semana de idade, deixando o ninho após este período e iniciando então o forrageamento (GRONENBERG et al., 1996). Desta forma, talvez a ausência de interação entre a idade e a execução de atividades em *C. rufipes* possa ser decorrente das avaliações não terem sido feitas durante o período de transição comportamental, embora Gronenberg et al. (1996) também não tenham feito observações no cérebro de formigas na décima semana. Esta suposição também pode explicar o aumento no volume do cérebro de operárias *minor* de *C. rufipes* a partir dos 60 dias de vida adulta.

Diferente daquilo que foi encontrado aqui com as operárias de *C. rufipes*, Jaffé & Sanches (1984) observaram que as operárias *minor* e *media* participam de atividades como forrageio, coleta e recrutamento, enquanto as operárias *major* e soldados se dedicam à defesa do ninho. Não obstante, Diniz-Filho et al. (1994), mostraram através de métodos estatísticos que as operárias de *C. rufipes* apresentam somente duas subcastas, operárias *minor* e *major*. Além disso, Hölldobler & Wilson (1990) afirmam que operárias *media* são simplesmente indivíduos que estão na zona de sobreposição da curva de freqüência entre operárias *minor* e *major*, embora as *media* possam executar muitas vezes todas as tarefas da colônia. Medidas de cápsula cefálica aqui obtidas estão de acordo com a afirmativa de Hölldobler & Wilson (1990). Porém, estas evidências não justificam os títulos relativamente baixos de hormônio juvenil encontrados em operárias *media* quando comparados a operárias *minor* e *major* e a baixa freqüência de atos

comportamentais apresentados por elas. A despeito da baixa frequência de atos comportamentais, está a possibilidade de estas apresentarem plasticidade comportamental, onde aquelas operárias especializadas em determinadas tarefas podem ter sido requeridas para executar uma outra, podendo não ter sido notadas nas avaliações comportamentais.

A determinação hormonal de castas abre caminhos para algumas especulações sobre os diferentes perfis hormonais encontrados nas operárias polimórficas de *C. rufipes*. O polimorfismo entre operárias de formigas geralmente é aceito como sendo dependente de fatores tróficos, ou seja, a operária atinge determinado tamanho quando adulta de acordo com seu histórico nutricional (NIJHOUT & WHEELER, 1982). A possibilidade de que o hormônio juvenil atuasse nessa variação do tamanho foi testada por Nijhout & Wheeler (1983), que observaram que a aplicação tópica de altas doses de metopreno, um análogo de hormônio juvenil, em larvas da formiga *Pheidole bicarinata* induziu o desenvolvimento de soldados e que doses crescentes, produziu operárias menores. Em ambos os casos, as larvas eram maiores que as larvas-controle. Assim, o aumento no tamanho do adulto estava correlacionado com a extensão da vida larval, cujo mecanismo de atraso metamórfico causado pela presença de hormônio juvenil permitiu que a larva tivesse um tempo extra, no qual ela poderia se alimentar e crescer, resultando em adultos maiores. Deste modo, os perfis hormonais independentes apresentados pelas subcastas de operárias de *C. rufipes* podem ser resultado da regulação hormonal a que foram submetidas desde a fase larval, persistindo até a vida adulta.

O perfil hormonal encontrado nas operárias de *C. rufipes* pode ainda ser decorrente de outros fatores. A regulação endócrina na produção de feromônios tem sido muito estudada em Blattodea, Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (TILLMAN et al., 1999). Em *A. mellifera*, o uso de metopreno induz a produção de dois componentes do feromônio de alarme, o 2-heptanona e o isopentil acetato, e essa produção aumenta com a idade (ROBINSON, 1985). Assim, embora as informações sobre este aspecto fisiológico sejam escassas em insetos sociais, a possibilidade adicional de que o perfil hormonal encontrado nas operárias de *C. rufipes* seja justificado pela sua influência na síntese de ácido fórmico, feromônio de alarme encontrado nas formigas do gênero *Camponotus*, ou a participação de outro componente, pode ser aventada, já que a percepção química é um dos principais meios de comunicação entre as formigas e que os feromônios podem ser usados

tanto para repelir inimigos como para alertar as companheiras de ninho (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

As diferenças no volume total do cérebro das diferentes castas de *C. rufipes* podem ser decorrentes da sua funcionalidade. Embora os soldados tenham a cápsula cefálica bastante desenvolvida, o tamanho do cérebro aparentemente não a acompanhou. A generosa cápsula cefálica dos soldados tem por objetivo, além de guardar o cérebro, acomodar grandes músculos responsáveis pelos movimentos da mandíbula, tão necessária nos mecanismos de defesa e proteção da colônia (GRONENBERG et al., 1997), não havendo assim a necessidade, do ponto de vista funcional, de um cérebro avantajado, já que a defesa constitui sua principal atividade. As fêmeas por sua vez, somente desempenham o papel de reprodutoras, embora neste estudo somente fêmeas virgens desaladas tenham sido observadas. Apesar de esta ser a principal tarefa executada pelas fêmeas, o comportamento daquelas que acasalam pode mudar durante a transição de fêmea virgem para rainhas em postura, pois fêmeas aladas voam somente uma vez para acasalar, e mesmo que acasalem com vários machos, perdem suas asas e escavam seus ninhos, onde permanecem. A evidência da ocorrência de mudanças no volume do cérebro de fêmeas virgens e acasaladas foi estudada por Julian & Gronenberg (2002), que observaram que esta mudança comportamental promove a redução do cérebro de fêmeas maduras das formigas *Messor pergandei* e *Pogomyrmex rugosus*. Desta forma, embora não tenha sido observado o volume do cérebro de fêmeas reprodutivas de *C. rufipes*, é provável que o caráter reducional do cérebro nestas também seja encontrado, já que apresentam igual transição comportamental. Este evento também foi observado em operárias jovens da formiga *Harpegnathos saltator* que se tornaram reprodutivas (gamergates) e passaram a fazer postura, além de adquirir outros hábitos comuns à rainha (GRONENBERG & LIEBIG, 1999). O volume do cérebro de diferentes populações de fêmeas de *A. mellifera* também foi testado, onde fêmeas virgens, fêmeas naturalmente acasaladas, inseminadas artificialmente e fêmeas maduras apresentaram diferenças singificativas crescentes na região da neurópila dos *corpora pedunculata*, nesta ordem (FAHRBACH & ROBINSON, 1996). Dados adicionais que elevam a importância de interações comportamentais ainda foram observados em associações de múltiplas fundadoras da vespa *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae), que apresentam hierarquia de dominância e cujas diferentes estratégias reprodutivas necessitam diferentes tipos de comportamentos. Neste caso, o volume do lobo antenal em associações

com múltiplas fêmeas foi observado um aumento significativo em comparação à única fêmea fundadora. Além disso, o volume do colar dos *corpora pedunculata*, foi significativamente maior em fêmeas dominantes (EHMER et al., 2001).

Diferentemente do perfil encontrado em operárias de *A. mellifera*, as mudanças no volume do cérebro de rainhas ocorrem mais cedo, entre o 9º e 13º dia de vida adulta e não mostrou associação com altos níveis de hormônio juvenil, que em rainhas é mantido somente no primeiro dia pós-emergência. No entanto, especula-se que as mudanças que ocorrem nos *corpora pedunculata* de operárias e rainhas aconteçam em função da sua necessidade em orientar-se em direção ao ninho após o vôo de forrageamento e o vôo de acasalamento, respectivamente (FAHRBACH & ROBINSON, 1996).

O título de hormônio juvenil encontrado nas fêmeas de *C. rufipes* com diferentes estados fisiológicos pode apresentar uma regulação temporal na síntese de vitelogenina, onde o possível amadurecimento dos ovários pode estar ocorrendo durante o período pré-copulatório sob a presença de altos níveis de hormônio juvenil circulante, mantidos desde o fim do desenvolvimento pupal. Porém, a atuação do hormônio juvenil sobre a reprodução em insetos sociais é discutível uma vez que este hormônio apresenta efeitos diversos entre os Hymenoptera. Ele tem efeito gonadotrópico sobre rainhas de *Polistes* e *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) e também sobre formigas como em *Solenopsis invicta*. Contudo, não existe evidência de que o hormônio juvenil atue como gonadotropina em *A. mellifera*. Além disso, ele não atua como gonadotrópico em todas as espécies de formigas (ROBINSON & VARGO, 1997). Nas espécies de *Diacamma* (Ponerinae), reconhecidas por alguns autores como sendo primitivamente eusocial, não apresentam rainhas, e sim operárias “gamergates” que são hierarquicamente dominantes (PEETERS, 1993). Estas não apresentam níveis detectáveis de hormônio juvenil. Ao invés disso, em operárias não reprodutivas, o título de hormônio juvenil está positivamente correlacionado com a idade, bem como o perfil de hidrocarbonetos (CUVILLIER-HOT et al., 2001). Além disso, o tratamento com hormônio juvenil inibe a reprodução em rainhas de outras duas espécies de formigas, *Lasius niger* Linnaeus, (1758) (SOMMER & HÖLLDOBLER, 1995) e *Camponotus aethiops* Latreille, (1798) (BLOCH et al., 2000). Por outro lado, em *S. invicta*, espécie que apresenta alto grau de complexidade social, existem evidências da ação do hormônio juvenil na fisiologia de reprodução, pois fêmeas aladas prontas para o vôo de acasalamento são freqüentemente impedidas de revoar pela rainha da colônia mediante liberação de

feromônio de dealação ao mesmo tempo em que inibe o desenvolvimento dos seus ovários (VARGO & LAUREL, 1994). Alguns estudos demonstraram que estes eventos estão sendo influenciados pelo hormônio juvenil, pois a aplicação tópica deste hormônio em fêmeas aladas promove a dealação e desenvolvimento ovariano (BURNS et al., 2002) enquanto o isolamento de fêmeas da presença da rainha promove ambos fenômenos seguidos da produção de hormônio juvenil (BRENT & VARGO, 2003). Este mecanismo sugere que o hormônio juvenil pode atuar diretamente sobre o sistema nervoso provocando tal comportamento. Esta hipótese havia sido testada anteriormente por Boulay et al (2001), que ao encontrar altos níveis de dopamina no cérebro de *S. invicta*, sugeriu que o feromônio de dealação diminuía o título de hormônio juvenil através da diminuição dos níveis de dopamina.

Quanto ao título de hormônio juvenil encontrado em fêmeas desaladas de *C. rufipes*, a suposição de que ocorra o fenômeno de dealação como em *S. invicta*, é enfraquecida pela falta de registros deste acontecimento em outras espécies na literatura. Porém, os baixos títulos encontrados em fêmeas desaladas contra os altos títulos observados em fêmeas virgens aladas da mesma colônia, apontam para algum mecanismo inibitório na produção de rainhas. Embora não efetivamente comprovados, os aspectos hormonais relatados em formigas menores adultas de *C. rufipes* parecem característicos de efeitos ativacionais, caso estejam influenciando o perfil de hidrocarbonetos cuticulares e a produção de feromônios, promovendo alterações neurais e elaboração dos atos comportamentais já discutidos anteriormente. Porém, caso a regulação hormonal esteja afetando os perfis hormonais encontrados em operárias polimórficas, estes podem caracterizar efeitos organizacionais, já que foi discutida a possibilidade de títulos hormonais mantidos durante a vida larval estarem sendo conservados durante a vida adulta. Ainda que não tenhamos investigado a ocorrência de neurogênese nos adultos, este suposto acontecimento mediado pela influência de hormônio juvenil também poderia ser caracterizado como efeito organizacional, pois evidências recentes indicam que muitas células dos *corpora pedunculata* podem persistir após a metamorfose dos insetos (LU et al., 2000).

Quanto às diferenças apresentadas no volume do cérebro entre operárias, soldados, fêmeas e machos, estes resultaram da natural variação individual de cada grupo.

Em tempo, as nossas investigações confirmaram a ocorrência de neuroplasticidade em formigas imaturas e também em adultas de *C. rufipes* e nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

O perfil hormonal pode estar relacionado com o desenvolvimento do cérebro pupal, embora os altos títulos mostrados no início e seu posterior declínio no fim do desenvolvimento pupal coincidam com o crescente desenvolvimento do cérebro de operárias e machos. Em operárias polimórficas o perfil hormonal é muito confuso, embora timidamente crescente no decorrer da idade. Operárias *minor* com três dias de vida imaginal apresentaram altos títulos de hormônio juvenil e volume total do cérebro, mas operárias com idades a partir dos sete dias de vida pós-emergência, apresentaram valores decrescentes do volume do cérebro embora com repertório comportamental significativo. Os altos títulos observados nas operárias *major* de 45 dias e a ausência de atos comportamentais não apresentaram qualquer relação com o volume do cérebro, trazendo dúvidas sobre a influência destes na plasticidade cerebral. Por outro lado, a interferência de outros fatores não mensurados como a participação de hidrocarbonetos e feromônios, importantes no reconhecimento e na comunicação entre companheiras de ninho, associados à aprendizagem e manutenção da memória podem estar promovendo uma constante sustentação do processamento de informações em função da adaptação destas a novas experiências. É possível ainda que estas adaptações sejam cíclicas, visto que o volume total do cérebro das operárias *minor* apresentou platôs em momentos distintos da vida adulta, possivelmente em resposta aos fatores supra citados ou a outros ainda desconhecidos. Assim, embora o volume do cérebro de operárias *minor* tenha sido destacada, a plasticidade da neurópila das subcastas de operárias de *C. rufipes* parece ser afetada pela idade, sugerindo o aumento de ramificações neuronais e possível atividade sináptica, em resposta à adição de informações processadas ao longo do tempo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUHEIF, E.; WRAY, G.A. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. **Science**, v. 297, p. 249-297, 2002.
- ALTMANN, J. Observational study of behaviour: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, p. 227-267, 1974.
- BARCHUCK, A.R.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**, v. 2, p. 1- 9, 2002. Disponível em: <<http://www.insectscience.org/2.1>>.
- BLOCH, G.; WHEELER, D.E.; ROBINSON, G.E. Endocrine influences on the organization of insects societies. **Hormones, Brain & Behavior**. v. 3, p. 195-235, 2002.
- BITONDI, M.M.G.; MORA, I.M.; SIMÕES, Z.L.P.; FIGUEIREDO, V.L.C. The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 499-507, 1998.
- BOOKER, R.; TRUMAN, J.W. Postembryonic neurogenesis in the CNS of the Tobacco Hornworm, *Manduca Sexta*. I. Neuroblast arrays and the fate of their progeny during metamorphosis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 255, p. 548-559, 1987.
- BOULAY, R.; HOOPER-BUI, L.M.; WOODRING, J. Oviposition and oogenesis in virgin fire ant females *Solenopsis invicta* are associated with a high level of dopamine in the brain. **Physiological Entomology**, v. 26, p. 294-299, 2001.

- BOULAY, R.; LENOIR, A. Social isolation of mature workers affects nestmate recognition in the ant *Camponotus fellah*. **Behavioural Processes**, v. 55, p. 67-73, 2001
- BRENT, C.S.; VARGO, E.L. Changes in juvenile hormone biosynthetic rate and whole body content in maturing virgin queens of *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 967-974, 2003.
- BRANDON, J.G.; COSS, R.G. Rapid dendritic spine stem shortening during one-trial learning: the honeybee's first orientation flight. **Brain Research**, v. 252, p. 51-61, 1982.
- BURNS, S.N.; TEAL, P.E.A.; VANDER MEER, R.K.; NATION, J.L.; VOGT, J.T. Identification and action of juvenile hormone III from sexually mature alate females of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 357-365, 2002.
- BURROWS, M. **The neurobiology of an insect brain**. Oxford. Oxford University Press, 682p, 1996.
- CAYRE, M.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. Neurogenesis in a adult insect brain and its hormonal control. **Nature**, v. 368, p. 57-59, 1994.
- CAYRE, M.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; CHARPIN, P.; TERNAUX, J.P. Dual effect of ecdysone on adult cricket mushroom bodies. **European Journal Neuroscience**, v. 12, p. 633-642, 2000.
- CAYRE, M.; MALATERRE, J.; SCOTTO-LOMASSESE, S.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 132, p. 1-15, 2002.
- CHAMPLIN, D.T.; TRUMAN, J.W. Ecdysteroid control of the cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca Sexta*. **Development**, v. 125, p. 269-277, 1998.

- CHAPMANN, R.F. **The Insects – Structure and Function**. Cambridge. Cambridge University Press, 770p, 1998
- COGGESHALL, R.E. A consideration of neural counting methods. **Techniques**, v. 15, n. 1, p. 9-13, 1992.
- COLONELLO, N.A.; HARTFELDER, K. Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. **Apidologie**, v. 34, p. 257-267, 2003.
- CONSOULAS, C.; DUCH, C.; BAYLINE, R.J.; LEVINE, R.B. Behavioral transformations during metamorphosis: remodeling of neural and motor systems. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 571-583, 2000.
- COSS, R.G.; BRANDON, J.G.; GLOBUS, A. Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. **Brain Research**, v. 192, p. 49-59, 1980.
- CUVILLIER-HOT, V.; COBB, M.; MALOSSE, C.; PEETERS, C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 485-493, 2001.
- DELABIE, Jacques Hubert Charles. **La communication chimique chez la fourmi champignoniste *Acromyrmex octospinosus*; polymorphisme et development du systeme antennaire**. Dissertação (Tese de Doutorado). Troisieme Cycle, Univ. Paris VI , Paris, 1984.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; VON ZUBEN, C.J.; FOWLER, H.G.; SCHLINDWEIN, M.N.; BUENO, O.C. Multivariate morphometrics and allometry in a polymorphic ant. **Insects Sociaux**, v. 41, p. 153-163, 1994.
- DURST, C.; EICHMÜLLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behavior and Neural Biology**, v. 62, p. 259-263, 1994.

- DUMPERT, K. **The social biology of ants**. The Pitman Press, London. 298p. 1978.
- EHMER, B.; REEVE, H.K.; HOY, R.R. Comparison of brain volumes between single and multiple foundress in the paper wasp *Polistes dominulus*. **Brain, Behaviour and Evolution**. v. 57, p. 161-168. 2001.
- ELEKONICH, M.M.; ROBINSON, G.E. Organizational and activational effects of hormones on insect behavior. **Journal of Insect Physiology**. v. 46, p. 1509-1515, 2000.
- FAHRBACH, S.; ROBINSON, G.E. Behavioral development in the honey bee: toward the study of learning under natural conditions. **Learning & Memory**, v. 2, p. 199-224, 1995.
- FAHRBACH, S.; ROBINSON, G. Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. **Development Neuroscience**, v. 18, p. 102-114, 1996.
- FAHRBACH, S.; MOORE, D.; CAPALDI, E.A.; FARRIS, S.M.; ROBINSON, G.E.. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. **Learning & Memory**, v. 5, p. 115-123, 1998.
- FELDLAUFER, M.F.; HERBERT JR, E.W.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M.J.; LUSBY, W.R. Makisterone A – The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 597-600, 1985.
- GRONENBERG, W.; HEREN, S.; HÖLLDOBLER, B. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2011-2019, 1996.
- GRONENBERG, W.; PAUL, J.; JUST, S.; HÖLLDOBLER, B. Mandible muscle fibers in ants: fast or powerful? **Cell Tissue Research**, v. 289, p. 347-361, 1997.

- GRONENBERG, W.; LIEBIG, J. Smaller brains and optic lobes in reproductive workers of the ant *Harpegnathos*. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 343-345, 1999.
- HAGEDORN, H.H. The role of ecdysteroids in reproduction. In: G.A. KERKUT; L.I. GILBERT eds. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. vol 8, 1985, p. 205-262.
- HARA, K. 2003. Queen discrimination ability of ant workers (*Camponotus japonicus*) coincides with brain maturation. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 62, p. 56-64.
- HARTFELDER, K. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 157-177, 2000
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Cambridge, MA: Belkap Press of Harvard University Press, 732p, 1990.
- HUANG, Z.-Y.; ROBINSON, G.E.; BORST, D.W. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. **Journal of Comparative Physiology**, v. A 174, p. 731-739, 1994.
- HUANG, Z.-Y.; ROBINSON, G.E. Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. **Journal of Comparative Physiology**, v. B 165, p. 18-28, 1995.
- INOUE, T.; ROUBIK, D.W.; SAKAGAMI, S.F. Nestmate recognition in the stingless bee *Melipona panamica* (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux**, v. 46, p. 208-218, 1999.
- JAFFÉ, K.; SANCHES, C. Comportamiento alimentario y sistema de reclutamiento en la hormiga *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Científica Venezolana**, v. 35, p. 270-277, 1984.

- JULIAN, G.E.; GRONENBERG, W. Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queens ants. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 60, p. 152-164, 2002.
- KRAFT, R.; LEVINE, R.B.; RESTIFO, L.L. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone enhances neurite growth of *Drosophila* mushroom body neurons isolated during metamorphosis. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 21, p. 8886-8899, 1998.
- KRETZCHMAR, D.; PFLUGFELDER, G.O. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. **Brain Research Bulletin**, v. 57, p. 121-131, 2002.
- LENOIR, A.; FRESNEAU, D.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation. In: Detrain, C., Dendeubourg, J-L., Pasteels, J.M. (Eds.), **Information Processing in Social Insects**. Birkhauser Verlag, Basel Boston Berlin, p. 219-237, 1999.
- LEVINE, R.B.; TRUMAN, J.W. Metamorphosis of the insect nervous system: changes in morphology and synaptic interactions of identified neurons. **Nature**, v. 299, p. 250-251, 1982.
- LEVINE, R.B.; MORTON, D.B.; RESTIFO, L.L. Remodeling of the insect nervous system. **Current Opinion of Neurobiology**, v. 5, p. 28-35, 1995.
- LEVINE, R. B.; WEEKS, J. C. Cell culture approaches to understanding the actions of steroid hormones on the insect nervous system. **Development Neuroscience**, v. 18, p. 73-86, 1996.
- LU, B.; JAN, L.; JAN, Y. Control of cell divisions in the nervous system: Symmetry and asymmetry. **Annual Review of Entomology**, v. 23, p. 531-556, 2000.
- MASSON, C. Mise en évidence, au cours de l'ontogenèse d'une fourmi primitive (*Mesoponera cafferaria* F. Smith), d'une prolifération tardive au niveau des cellules globuleuses ("Globulicells") des corps pédonculés. **Z. Zellforsch Mikrosk Anat.** v. 106, p. 220-231, 1970.

- MASSON, C.; ARNOLD, G. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. **Journal of Insect Physiology**, v. 30, p. 7-14, 1984.
- NIJHOUT, H.F.; WHEELER, D.E. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. **The Quarterly Review of Biology**, v. 57, n. 2, p. 109-133, 1982.
- NIJHOUT, H.F. **Insect Hormones**. New Jersey. Princeton University Press. 267p., 1994.
- O'DONNELL, S.; DONLAN, N.A.; JONES, T.A. Mushroom body structural change is associated with division of labor in eusocial wasp workers (*Polybia aequatorialis*, Hymenoptera: Vespidae). **Neuroscience Letters**, v. 356, p. 159-162, 2004.
- PAGE JR., R.E.; PENG, C.Y.S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 695-711, 2001.
- PEETERS, C. Monogyny and polygyny in ponerine ants with or without queens. In: **Queen number and sociality in insects** (L. Keeler Ed), Oxford University Press, Oxford, p. 235-261, 1993.
- PINTO, L.Z. **Hormônios morfogenéticos no desenvolvimento pós-embrionário de *Melipona quadrifasciata***. Tese de doutorado. Ribeirão Preto, 112 p., 2001.
- PINTO, L.Z.; HARTFELDER, K. H.; BITONDI, M.M.G.; SIMÕES, Z.L.P. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 783-790, 2002.
- PINTO, L.Z.; LAURE, M.A.F.B.; BITONDI, M.M.G.; HARTFELDER, K.; SIMÕES, Z.L.P. Ventral nerve cord remodeling in a stingless bee (*Melípona quadrifasciata anthidioides*, Hymenoptera, Apidae) depends on ecdysteroid fluctuation and programmed cell death. **International Journal of Developmental Biology**, v. 47, p.000-000 (Short communication), 2003.

- ROBINOW, S.; TALBOT, W.S.; HOGNESS, D.S.; TRUMAN, J.W. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. **Development**, v. 199, p. 1251-1259, 1993.
- ROBINSON, G.E. Effects of a juvenile hormone analogue on honey bee foraging behavior and alarm pheromone production. **Journal of Insect Physiology**, v. 31, n. 4, p. 277-282, 1985.
- ROBINSON, G.E.; PAGE JR., R.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. **Science**, v. 246, p. 109-112, 1989.
- ROBINSON, G.E.; VARGO, E.L. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 559-583, 1997.
- SANDOZ, J.C.; LALOI, D.; ODOUX, J.F.; PHAM-DELEGUE, M.H. Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. **Animal Behavior**, v. 59, p. 1025-1034, 2000.
- SCOTTO-LOMASSESE, S.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; CHARPIN, P.; AUGIER, R. AOUANE, A.; CAYRE, M. Influence of environmental stimulation on neurogenesis in the adult insect brain. **Journal of Neurobiology**, v. 45, p. 162-171, 2000.
- SCOTTO-LOMASSESE, S.; STRAMBI, C.; AOUANE, A.; STRAMBI, A.; CAYRE, M. Sensory inputs stimulate progenitor cell proliferation in an adult insect brain. **Current Biology**, v. 12, p. 1001-1005, 2002.
- SOARES, P. A. O.; SERRÃO, J. E. Morphometric analysis of the brain in the castes of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera; Formicidae) during postembryonic development. **Sociobiology**, v. 37, n. 3B, p. 627-632, 2001a.
- SOARES, P.A.O.; SERRÃO, J.E. Morphological study of the brain of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* during the postembryonic development. **Sociobiology**, v. 38, n. 3A, p. 421:429, 2001b.

- SOARES, P.A.O.; DELABIE, J.H.C.; SERRÃO, J.E. Neuropile organization in the brain of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) during the post-embryonic development. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 4, p. 635-641, 2004.
- SOMMER, K.; HÖLLDOBLER, B. Colony founding by queen association and determinants of reduction in queen number in the ant *Lasius niger*. **Animal Behavior**, v. 50, p. 287-294, 1995.
- SOROKER, V.; VIENNE, C.; HEFETZ, A. Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera, Formicidae). **Journal Chemical Ecology**, v. 21, p. 365-378, 1995.
- STRAMBI, C.; CAYRE, M.; STRAMBI, A. Neural plasticity in the adult insect brain and its hormonal control. **International Review of Cytology**, v. 190, p. 137-173, 1999.
- STRAUSFELD, N.J.; HANSEN, L.; LI, YONGSHENG; GOMEZ, R. S.; ITO, K. Evolution, Discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. **Learning & Memory**, v. 5, p. 11-37, 1998.
- SULLIVAN, J.P.; JASSIM, O.; FAHRBACH, S.; ROBINSON, G.E. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior**, v. 37, p. 1-14, 2000.
- TECHNAU, G.; HEISENBERG, M. Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 295, p. 405-407, 1982.
- TILLMAN, J.A.; SEYBOLD, S.J.; JURENKA, R.A.; BLOMQUIST, G.J. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 481-514, 1999.

- TISSOT, M.; STOCKER, R.F. Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate neurons throughout the stages. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 89-111, 2000.
- VANDER MEER, R.K.; MOREL, L. Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer R.K., Bredd, M.D., Winston, M. Espelie C. (eds). **Pheromone communication in social insects: ants, waps, bees and termites**, p. 79-103, 1998.
- VARGO, E.L.; LAUREL, M. Studies on the mode of action of a queen primer pheromone of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, n. 7, p. 601-610, 1994.
- VITT, H., HARTFELDER, K. Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera; Apidae). **International Journal Insect Morphology and Embryology**, v. 27, n. 4, p. 1-4, 1998.
- WEEKS, J. C.; LEVINE, R. B. Steroid hormone effects on neurons subserving behavior. **Current Opinion of Neurobiology**, v. 5, p. 809-815, 1995.
- WEEKS, J.C. Steroid hormones, dendritic remodeling and neuronal death: Insights from insect metamorphosis. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 54, p. 51-60, 1999.
- WEEKS, J. C. Thinking globally, acting locally: steroid hormone regulation of the dendritic architecture, synaptic connectivity and death of an individual neuron. **Progress Neurobiology**, v. 70, p. 421-442, 2003.
- WHEELER, D.E. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. **The American Naturalist**, v. 128, n. 1, p. 13-34, 1986.
- WHEELER, D.E. & NIJHOUT, H.F. Soldier determination in *Pheidole bicarinata*: effect of methoprene on caste and size within castes. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 11, p. 847-854, 1983.

WHITERS, G. S.; FARHBACH, S. E.; ROBINSON G. E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**, v. 364, p. 238-240, 1993.

WILSON, E.O. Which are the most prevalent ant genera? **Studia Entomologica**, v. 19, n. 1, p. 187-200, 1976.

ZEE, M.C.; WEEKS, J.C.. Developmental change in the steroid hormone signal for cell-autonomous, segment-specific programmed cell death of a motoneuron. **Developmental Biology** , v. 235, p. 45-61, 2001.

## 6. APÉNDICE

Formulário utilizado nas análises comportamentais de *C. rufipes* com as categorias e atos comportamentais relacionados. As operárias menor, média e maior foram registradas no formulário através de um círculo, um triângulo e um quadrado, respectivamente.

<b>Categorias Comportamentais</b>	1 <sup>ª</sup> h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Atos comportamentais												
<b>Alimentação</b>												
1. Trofalaxia (recebendo)												
2. Trofalaxia (fornecendo)												
3. Alimentando-se de larva												
4. Alimentando-se de mel												
<b>Comunicação</b>												
5. Antenando outra formiga												
6. Formigas antenando-se mutuamente												
<b>Cuidado parental</b>												
7. Parada sobre imaturos												
8. Manipulando ovos												
9. Manipulando larvas												
10. Manipulando pupas												
11. Manipulando recém-emergido												
12. Transportando ovos												
13. Transportando larvas												
14. Transportando pupas												
15. Auxiliando na emergência												
16. Parada segurando ovos												
17. Parada segurando larva												
18. Parada segurando pupa												
<b>Defesa</b>												
19. Guardando o ninho												
<b>Relações agonísticas</b>												
20. Segurando a perna de outra formiga												
21. Mordendo o abdômen do indivíduo												
22. Investindo contra o indivíduo												
23. Disputando larva												
24. Disputando pupa												
<b>Exploração</b>												
25. Andando na arena de forrageamento												
26. Andando na arena de nidificação												
27. Inspeccionando o substrato parada												
28. Inspeccionando o substrato andando												

<b>Imobilidade</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
29. Parada na arena de nidificação isoladamente												
30. Parada na arena de nidificação agreg. a outras												
31. Parada na arena de forrageam. isoladamente												
32. Parada na arena de forrageam. agreg. a outras												
<b>Limpeza</b>												
33. Autolimpeza 1° par de pernas												
34. Autolimpeza antena + 1° par de pernas												
35. Autolimpeza 2° par de pernas												
36. Autolimpeza 3° par de pernas + abdome												
37. Autolimpeza ânus												
38. Allogrooming												
39. Carregando indivíduo morto												
40. Carregando lixo												

<b>Categorias Comportamentais</b>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Atos comportamentais												
<b>Alimentação</b>												
1. Trofalaxia (recebendo)												
2. Trofalaxia (fornecendo)												
3. Alimentando-se de larva												
4. Alimentando-se de mel												
<b>Comunicação</b>												
5. Antenando outra formiga												
6. Formigas antenando-se mutuamente												
<b>Cuidado parental</b>												
7. Parada sobre imaturos												
8. Manipulando ovos												
9. Manipulando larvas												
10. Manipulando pupas												
11. Manipulando recém-emergido												
12. Transportando ovos												
13. Transportando larvas												
14. Transportando pupas												
15. Auxiliando na emergência												
16. Parada segurando ovos												
17. Parada segurando larva												
18. Parada segurando pupa												
<b>Defesa</b>												
19. Guardando o ninho												
<b>Relações agonísticas</b>												
20. Segurando a perna de outra formiga												
21. Mordendo o abdômen do indivíduo												
22. Investindo contra o indivíduo												
23. Disputando larva												
24. Disputando pupa												
<b>Exploração</b>												
25. Andando na arena de forrageamento												
26. Andando na arena de nidificação												
27. Inspeccionando o substrato parada												
28. Inspeccionando o substrato andando												

<b>Imobilidade</b>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
29. Parada na arena de nidificação isoladamente												
30. Parada na arena de nidificação agreg. a outras												
31. Parada na arena de forrageam. isoladamente												
32. Parada na arena de forrageam. agreg. a outras												
<b>Limpeza</b>												
33. Autolimpeza 1° par de pernas												
34. Autolimpeza antena + 1° par de pernas												
35. Autolimpeza 2° par de pernas												
36. Autolimpeza 3° par de pernas + abdome												
37. Autolimpeza ânus												
38. Allogrooming												
39. Carregando indivíduo morto												
40. Carregando lixo												