

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Morfologia neural em operárias de formigas: conexões entre morfologia cerebral e especialização comportamental**

Ana Paula Pereira Raimundo  
*Doctor Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**  
**2025**

**ANA PAULA PEREIRA RAIMUNDO**

**Morfologia neural em operárias de formigas: conexões entre morfologia cerebral e especialização comportamental**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Jose Eduardo Serrao

Coorientador: Cliver F. Farder Gomes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R153m  
2025

Raimundo, Ana Paula Pereira, 1990-  
Morfologia neural em operárias de formigas: conexões  
entre morfologia cerebral e especialização comportamental / Ana  
Paula Pereira Raimundo. – Viçosa, MG, 2025.  
1 tese eletrônica (98 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2025.  
Inclui bibliografia.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.309>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formigas. 2. Cérebro - Morfologia. I. Serrão, José  
Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.796

**ANA PAULA PEREIRA RAIMUNDO**

**Morfologia neural em operárias de formigas: conexões entre morfologia cerebral e especialização comportamental**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

---

Ana Paula Pereira Raimundo  
Autora

---

Jose Eduardo Serrao  
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 26/05/2025 às 19:48:41 e pelo orientador em 27/05/2025 às 08:36:58. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **XK8Y.LR4K.CRBV** e clique no botão 'Validar documento'.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“É justo que muito custe o que muito vale”.  
(Santa Teresa D’Ávila)

## RESUMO

RAIMUNDO, Ana Paula Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Morfologia neural em operárias de formigas: conexões entre morfologia cerebral e especialização comportamental.** Orientador: Jose Eduardo Serrao. Coorientador: Cliver Fernandes Farder Gomes.

O cérebro de insetos é um mosaico de sub-regiões, envolvidas em diferentes funções, que vão desde o processamento de informações sensoriais e de ordem superior à coordenação do comportamento. As sub-regiões do cérebro variam em tamanho e complexidade nos diferentes taxa de insetos. Fatores ambientais, dieta ou comportamentos sociais podem ter implicações independentes no cérebro e no tamanho de seus compartimentos. As categorias de estilo de vida, têm um efeito importante na função cerebral, determinando os recursos e informações de que os cérebros precisam e têm acesso para produzir comportamentos adaptativos. As espécies de formigas caracterizadas por padrões excepcionais de castas e subcastas fornecem modelos importantes para examinar as relações de morfologia, estrutura do cérebro e especialização comportamental em associação com a divisão do trabalho e elementos relacionados a complexidade social. O tamanho do cérebro de operárias de formigas pode variar conforme os desafios ecológicos e se refletir em diferenças na percepção sensorial, processamento de ordem superior e/ou demandas motoras necessárias para o desenvolvimento de tarefas. Estudos intraespecíficos podem fornecer valiosas informações sobre a flexibilidade dos traços cerebrais e os interespecíficos e podem identificar variações morfológicas selecionadas através da evolução. Assim, torna-se importante analisar a morfologia das regiões cerebrais de operárias de formigas levando em consideração o tamanho e conexões das neurópilas, associando estes dados aos hábitos de vida de cada espécie.

Palavras-chave: Formigas; Cérebro; Morfologia

## ABSTRACT

RAIMUNDO, Ana Paula Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Neural morphology in ant workers: connections between brain morphology and behavioral specialization.** Adviser: Jose Eduardo Serrao. Co-adviser: Cliver Fernandes Farder Gomes.

The insect brain is a mosaic of subregions involved in different functions, ranging from sensory and higher-order information processing to behavioral coordination. Brain subregions vary in size and complexity across insect taxa. Environmental factors, diet, or social behaviors may have independent implications for brain size and compartment size. Lifestyle categories have an important effect on brain function, determining the resources and information that brains need and have access to to produce adaptive behaviors. Ant species characterized by exceptional caste and subcaste patterns provide important models for examining the relationships of morphology, brain structure, and behavioral specialization in association with division of labor and related elements of social complexity. Brain size in ant workers may vary according to ecological challenges and may be reflected in differences in sensory perception, higher-order processing, and/or motor demands required for task performance. Intraspecific studies can provide valuable information about the flexibility of brain traits and interspecific ones, and can identify morphological variations selected through evolution. Thus, it is important to analyze the morphology of brain regions of ant workers taking into account the size and connections of the neuropils, associating these data with the lifestyle habits of each species.

Keywords: Ants; Brain; Morphology

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	9
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
<b>CAPÍTULO I: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS (Atta sexdens): CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)</b>	<b>21</b>
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Obtenção dos insetos	24
2.2 Histologia	24
2.3 Análise volumétrica	25
2.4 Sinapses	25
2.5 Análises estatísticas	26
3 RESULTADOS	26
3.1 Tamanho da cápsula cefálica	26
3.2 Histologia	27
3.3 Morfometria	30
3.4 Sinapses	32
3.5 Correlação entre neurópilas e volume cerebral	34
4. DISCUSSÃO	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
<b>CAPÍTULO II: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DA FORMIGA CARPINTEIRA (Camponotus rufipes): CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL</b>	<b>55</b>
RESUMO	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Obtenção dos insetos	58
2.2 Histologia	58
2.3 Análise volumétrica	58
2.4 Sinapses	59
2.5 Análises estatísticas	60
3. RESULTADOS	60
3.1 Tamanho da cápsula cefálica	60
3.2 Histologia	60
3.3 Análise volumétrica	65
3.4 Sinapses	65
4. DISCUSSÃO	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
<b>CAPÍTULO III: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS COM DIFERENTES ESTILOS DE VIDA: CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL</b>	<b>76</b>
RESUMO	76
1. INTRODUÇÃO	77

2. MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1 Obtenção dos insetos	80
2.2 Histologia	80
2.3 Análise volumétrica	81
2.4 Análises estatísticas	81
3. RESULTADOS	82
3.1 Tamanho da cápsula cefálica	82
3.2 Histologia	83
3.3 Análise volumétrica	86
4. DISCUSSÃO	88
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

## I. INTRODUÇÃO GERAL

O cérebro é fundamental para o perfil adaptativo dos animais, pois é a base da capacidade de modificar o comportamento em um ambiente em mudança (Reader & Laland, 2002; Sol *et al.*, 2008). O cérebro de insetos, embora seja pequeno em tamanho, é complexo e fornece informações essenciais para pesquisas em neurociências (Ito *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023). Nestes organismos, ele é um mosaico de sub-regiões, envolvidas em diferentes funções, que vão desde o processamento de informações sensoriais e de ordem superior à coordenação do comportamento (Ito *et al.*, 2014; Kinoshita & Homberg, 2017).

As sub-regiões do cérebro variam em tamanho e complexidade nos diferentes taxa de insetos (Barton & Harvey, 2000; Smaers & Soligo, 2013), com possível ação da seleção natural na arquitetura do cérebro equilibrando as demandas cognitivas experienciadas pela espécie (Laughlin, 2001; Niven & Laughlin, 2008; Navarrete *et al.*, 2011). Neste sentido, fatores ambientais, dieta ou comportamentos sociais podem ter implicações independentes no cérebro e no tamanho de seus compartimentos (Dunbar & Shultz, 2007; Byrne & Bates, 2007; Healy & Rowe, 2007).

As categorias de estilo de vida, diurno/noturno e social/solitário, são organizadas em torno de fatores ecológicos comuns e estratégias de comportamento, e têm um efeito importante na função cerebral, determinando os recursos e informações de que os cérebros precisam e têm acesso para produzir comportamentos adaptativos (Bouchebti & Arganda, 2020).

O cérebro de insetos é dividido em região supraesofágica e subesofágica, a primeira é composta pelo protocérebro, deutocérebro e tritocérebro (Brandt *et al.*, 2005; Scholtz & Edgecombe, 2006; Rybak *et al.*, 2010). As regiões do cérebro que contém corpos celulares de

neurônios são denominadas somata e as contendo os prolongamentos celulares e sinapses são denominadas neurópilas (Brandt *et al.*, 2005; Schröter & Menzel, 2003).

O protocérebro é composto pelos lóbulos ópticos, complexo central e *corpora pedunculata*. Os lóbulos ópticos compreendem a *medula*, *lobula* e *lamina*, e são responsáveis por receber e processar informação sensorial proveniente dos olhos compostos. O complexo central conecta e coordena informações de ambos os hemisférios cerebrais (Brandt *et al.*, 2005; Strauss, 2002) e os *corpora pedunculata* são o centro de processamento neural e armazenamento de informações sensoriais (Farris & Dyke, 2015). O deutocérebro é constituído pelos lóbulos dorsais e antenais, que recebem informações sensoriais vindas dos receptores olfativos antenais (Mobbs, 1982; Rybak, 2012). A neurópila dos lobos antenais é composta por glomérulos, que recebem estímulos olfatórios de neurônios sensitivos presentes nas antenas (Azevedo & Nocelli, 2020). O tritocérebro está localizado na base do cérebro e é extremamente reduzido nos Himenópteras (Mobbs, 1982).

Em insetos sociais, indivíduos especializados em tarefas dentro do ninho tem os lobos ópticos menores do que aqueles que trabalham fora do ninho (Gronenberg & Liebig, 1999; Kamhi *et al.*, 2017). O lobo óptico geralmente é reduzido nas formigas em comparação com outros Hymenopteras, algumas com hábitos subterrâneos podem carecer totalmente desta região (Gronenberg, 1999). Vespas e formigas com hábitos noturnos possuem lobos ópticos menores, quando comparadas as espécies com hábitos diurnos, sugerindo que os insetos noturnos dependem menos de informações visuais (O'Donnell *et al.*, 2013; O'Donnell & Bulova, 2017; Sheehan *et al.*, 2019). O volume do lobo antenal é menos variável em formigas, compreendendo 11% do volume total do cérebro em operárias (Gronenberg, 1999; Gronenberg & Holldobler, 1999), mas em formigas de correição esta região é maior do que em outras formigas, ocupando 14% do volume total do cérebro (Bulova *et al.*, 2016). Em abelhas, o crescimento do lobo antenal e *corpora pedunculata*, parecem estar relacionados ao

polietismo etário, pois são maiores nas forrageiras que naquelas que trabalham dentro da colmeia (Withers *et al.*, 1993; Winnington *et al.*, 1996; Farris *et al.*, 2001). Os *corpora pedunculata* são maiores em espécies de formigas com hábitos noturnos (Sheehan *et al.*, 2019) e menores em espécies subterrâneas (Bulova *et al.*, 2016). Em operárias de vespas, o desenvolvimento dos *corpora pedunculata*, está relacionado com o desempenho de determinadas tarefas e a condição de dominância social (O'Donnell *et al.*, 2004; Molina & O'Donnell, 2007; Molina & O'Donnell, 2008). Por outro lado, o tamanho do complexo central e da região subesofágica não variam entre espécies de formigas com hábitos noturnos e diurnos (Sheehan *et al.*, 2019).

Dentre os animais, as formigas são um bom modelo para examinar as relações entre comportamento, tamanho do corpo e neuroanatomia porque as operárias evoluíram como especialistas em tarefas em vários clados (Hölldobler & Wilson, 1990). As espécies caracterizadas por padrões excepcionais de castas e subcastas fornecem modelos importantes para examinar as relações de morfologia, estrutura do cérebro e especialização comportamental em associação com a divisão do trabalho e elementos relacionados a complexidade social (Muscedere & Traniello, 2012; Gordon *et al.*, 2017; Gordon & Traniello, 2018; Gordon *et al.*, 2018).

O tamanho do cérebro de operárias de formigas pode variar conforme os desafios ecológicos e se refletir em diferenças na percepção sensorial, processamento de ordem superior e/ou demandas motoras necessárias para o desenvolvimento de tarefas (Sulger *et al.*, 2014; Bulova *et al.*, 2016; Kamhi *et al.*, 2016). Em operárias polimórficas, o tamanho do cérebro parece corresponder à ecologia de forrageio e às demandas de processamento sensorial e de alta ordem do desempenho da tarefa (Gronenberg, 2008; Muscedere & Traniello, 2012; Gordon *et al.*, 2017). Assim, o polimorfismo oferece oportunidades para explorar a evolução do cérebro no que diz respeito à seleção para variação morfológica e

comportamental adaptativas (Gronenberg & Riveros, 2009; Riveros *et al.*, 2012; Ilies *et al.*, 2015).

Dentre as formigas, Paraponerinae é encontrada exclusivamente na região Neotropical e amplamente distribuída nas florestas tropicais brasileiras (Arias-Penna, 2007; Baccaro *et al.*, 2015) com um conjunto de traços comportamentais e ecológicos mais similares ao ancestral das formigas, como pouca diferenciação morfológica entre operárias e rainhas e forrageio predador solitário generalista (Peeters, 1997; Wilson & Hölldobler, 2005). Esta subfamília é representada por uma única espécie, *Paraponera clavata*, com atividade de forrageio principalmente noturno (Mccluskey & Brown, 1972), que pode variar entre colônias (Wilson & Hölldobler, 2005). Os ninhos desta espécie estão situados na base de árvores, e forrageiam ativamente no sub-bosque e no dossel de árvores (Fernandes *et al.*, 2015).

Formicinae tem cerca de 3000 espécies descritas (Ward, 2014), sendo o gênero *Camponotus* um dos mais ricos em espécies, encontradas em uma variedade de habitats e microhabitats (Bolton, 1995a), com considerável variação intraespecífica, principalmente no tamanho da cabeça (Kim & Kim, 2006). As formigas do gênero *Camponotus* são consideradas oportunistas e generalistas em relação aos seus hábitos de nidificação e recursos alimentares (Silvestre *et al.*, 2003; Blüthgen & Feldhaar, 2010), elas apresentam uma variedade de estratégias em relação à organização da colônia (Ronque *et al.*, 2018) e ao hábito de forrageio, nas quais algumas espécies possuem hábito diurno e outras, noturnos, e a maioria tem dieta generalista (Bolton, 1973), se alimentando principalmente de exsudatos de plantas e insetos (Oliveira & Brandão, 1991; Del-Claro & Oliveira, 1999 ; Pfeiffer & Lisenmair, 2000 ; Santos & Del-Claro, 2009). Dentre as espécies do gênero, *Camponotus rufipes* (Smith) é poligínica facultativa (Ronque *et al.*, 2016) e apresenta castas dimórficas (Marcolino *et al.*, 2000). Elas possuem hábitos predominantemente noturnos (Ronque *et al.*,

2018), e tem dieta generalista, se alimentando de exsudatos de plantas e insetos e nidificam em troncos mortos, bem como no solo (Ronque et al., 2016).

Myrmicinae possui mais de 6500 espécies descritas com distribuição geográfica global e apresenta variação de grupos funcionais, incluindo as cultivadoras de fungo (Borowiec *et al.*, 2020), como os Attini com um complexo sistema de comunicação, divisão do trabalho e polimorfismo (Wilson, 1980; Caetano *et al.*, 2002; Mehdiabadi & Schultz, 2009; Della Lucia & De Souza, 2011; Della Lucia *et al.*, 2014). Nas espécies do gênero *Atta*, o polimorfismo das operárias leva a uma divisão distinta do trabalho entre as subcastas, em que, as operárias maiores (“soldados”) são especializadas na defesa da colônia, as operárias médias em forrageio e as operárias menores trabalham dentro do jardim de fungo (Holldobler & Wilson, 1990; Lacerda *et al.*, 2010; Wilson, 1980). Dentre as espécies do gênero, as colônias de *Atta sexdens* (Linnaeus) podem conter milhões de operárias divididas em várias subcastas e apenas uma rainha reprodutiva (monoginia) (De Souza *et al.*, 2011) e possuem um dos mais completos sistemas de comunicação dos Formicidae (Caetano *et al.*, 2002). Elas forrageiam principalmente a noite (Orr, 1992) e constroem ninhos subterrâneos (Cardoso *et al.*, 2014).

Estudos intraespecíficos podem fornecer valiosas informações sobre a flexibilidade dos traços cerebrais e os interespecíficos e podem identificar variações morfológicas selecionadas através da evolução. No entanto, estes temas são bastante atuais, com poucos dados na literatura comparando a morfologia do cérebro e tamanho das neurópilas em espécies com diferentes estilos de vida.

## II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barton, R.A., Harvey, P.H. (2000). Mosaic evolution of brain structure in mammals. *Nature*, 405:1055–1058.
- Bolton, B. (1973). The ant general of West Africa: A synonymic synopsis with a keys (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of the British Museum Entomology*, 27: 317-368.
- Bolton, B. (1995). A taxonomic and zoogeographical census of the extant taxa (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History*, 29: 1039-1056.
- Bolton, B., Alpert, G., Ward, P.S., Naskrecki, P. (2006). Bolton's catalogue of ants the world: 1758- 2005.CD-ROM. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Bouchebti, S., Arganda, S. (2020). Insect lifestyle and evolution of brain morphology. *Current Opinion in Insect Science*, 42:90-96.
- Borowiec, M.L., Moreau, C.S. & Rabeling, C. (2020). Ants: phylogeny and classification. In: Starr, C.K.(Ed.): *Encyclopedia of social insects*. – Springer International Publishing, Cham, pp. 1-18.
- Brandt, R., Rohlfing, T., Rybak, J., Kroficzik, S., Maye, A., Westerhoff, M., Hege, H., Menzel, R. (2005). A three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1):1-19.
- Bulova, S., Purce, K., Khodak, P., Sulger, E., O'Donnell, S. (2016). Into the black, and back: the ecology of brain investment in Neotropical army ants (Formicidae: Dorylinae). *Naturwissenschaften*, 103:31.
- Byrne, R.W., Bates, L.A. (2007). Brain Evolution: When Is a Group Not a Group? *Current Biology*, 17, R883–R884.
- Caetano, F.H., Jaffé, K., Zara, F.J. (2002). *Formigas: biologia e anatomia*, Editora Topásio, Araras.
- Campos-Farinha, A. E. (2005). Urban Pests Ants of Brazil. In: Lee, C. Y.; Robinson, W. H. (Ed.). *Proceedings of the Fifth International Conference on the Urban Pests*. Malaysia: Ed. Perniagaan Ph'ng. p. 81-84.

- Cardoso, S.R., Forti, L.C., Nagamoto, N.S., Camargo, R.S. (2014). First-year nest growth in the leaf-cutting ants *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology*. 61:243–249.
- Coggeshall, R.E. (1992). A consideration of neural counting methods. *trends Neurosci*. 15:9-13.
- Della Lucia, T.M.C., De Souza, D.J. (2011). Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In Della Lucia, T. M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*, Editora UFV, Viçosa, pp. 13-26.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci*. 70:14–23.
- De Souza, D.J., Santos, J.F.L., Della Lucia, T.M.C. (2011). In Della Lucia, T.M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, pp. 126-137.
- Dunbar, R.I.M., Shultz, S. (2007). Evolution in the social brain. *Science*. 80 (317), 1344–1347.
- Farris, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2001). Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J Neurosci*, 21: 6395–6404.
- Farris, S. M., Van Dyke, J. W. (2015). Evolution and function of the insect mushroom bodies: Contributions from comparative and model systems studies. *Current Opinion in Insect Science*, Morgantown, v. 12, p. 19-25.
- Gordon, D.G., Traniello, J.F.A. (2018). Synaptic organization and division of labor in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Neuroscience Letter*, 676:46–50.
- Gordon, D.G., Moreau, M., Fourcassie, V., Traniello, J.F.A. (2018). Limited size-related variation in behavioral performance among workers of the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Insectes Sociaux*, 65(3):431–8.
- Gordon, D.G., Ilieș, I., Traniello, J.F.A. (2017). Behavior, brain, and morphology in a complex insect society: trait integration and social evolution in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(11):166.

- Groh, C., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A., & Rössler, W. (2012). Age-related plasticity in the synaptic ultrastructure of neurons in the mushroom body calyx of the adult honeybee *Apis mellifera*. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(15), 3509–3527.
- Gronenberg, W. (1999). Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain Behav Evol* 54:85–95
- Gronenberg, W., Liebig, J. (1999). Smaller brains and optic lobes in reproductive workers of the ant *Harpegnathos*. *Naturwissenschaften*, 86:343-385.
- Gronenberg, W. (2008). Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: strength in numbers. *Myrmecology News*, 11:25–36.
- Gronenberg, W., Riveros, A.J. (2009). Social brains and behavior: past and present. In: Gadau J, Fewell JH (eds) *Organization of insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, pp 377–401.
- Healy, S.D., Rowe, C. (2007). A critique of comparative studies of brain size. *Proc. R. Soc. B-Biological. Sci.* 274, 453–464.
- Hölldobler, B., Wilson, E. (1990). *The ants*. Harvard University Press.
- Ilieş, I., Muscedere, M.L., Traniello, J.F.A. (2015). Neuroanatomical and morphological trait clusters in the ant genus *Pheidole*: evidence for modularity and integration in brain structure. *Brain, Behavior and Evolution*, 85:63–76.
- Ito, K., Shinomaya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homber, U., Jenett, A. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81:755-765.
- Kamhi, J.F., Sandridge-Gresko, A., Walker, C., Robson, S.K., Traniello, J.F. (2017). Worker brain development and colony organization in ants: does division of labor influence neuroplasticity? *Dev Neurobiol*, 77: 1072-1085.
- Kamhi, J.F., Gronenberg, W., Robson, S.K.A., Traniello, J.F.A. (2016) Social complexity influences brain investment and neural operation costs in ants. *Proc R Soc B*, 283:20161949.
- Kempf, W. W. (1961). As formigas do gênero *Pachycondyla* Fr. Smith no Brasil (Hymenoptera: Formicinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 10(1), 189–204.

- Kim, K.G., Kim, B.J. (2006) Molecular phylogeny of *Camponotus* ants in Korea. Entomological Research 36: 48-55.
- Kinoshita, M., Homberg, U. (2017). Insects Brain: minute structure controlling complex behaviors. Brain Evolution by Desing. Springer. 123-151.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Pereira, O.L., Peternelli, L.A., Tótola, M.R. (2010). Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. Bull Entomol Res 100:99–103.
- Lach, L., Parr, C. L., Abbott, K. L. (2009). Ant Ecology. New York: Oxford University Press.
- Laughlin, S.B. (2001) Energy as a constraint on the coding and processing of sensory information. Current Opinion in Neurobiology, 11:475–480.
- Lee, G.M., Thornthwait, J.T., Rasch, E.M. (1984). Picogram per cell determination of DNA by flow cytofluorometry. Anal Biochem 137:221–226.
- Marcolino, M. T., Brandeburgo, M. A. M., Oliveira-Junior, W. P. (2000). Aspectos comportamentais da interação entre formigas *Camponotus atriceps* Smith (Hymenoptera, Formicidae) e abelhas africanizadas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera, Apidae). Naturalia, 25: 321-330.
- Medeiros, F. N. S. (1997). Ecologia comportamental da formiga *Pachycondyla striata* Fr. Smith (Formicidae: Ponerinae) em uma floresta do sudeste do Brasil. Dissertação de mestrado em Ecologia – Faculdade Estadual de Campinas, Campinas. 71p.
- Mehdiabadi, N.J., Schultz, T.R. (2009). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). Myrmecol. News 13, 37–55.
- Molina, Y., O'Donnell, S. (2007). Mushroom body volume is related to social aggression and ovary development in the paper wasp *Polistes instabilis*. Brain Behav. Evol. 70:137-144.
- Molina, Y., O'Donnell, S. (2008). A developmental test of the dominance-nutrition hypothesis: linking adult feeding, aggression, and reproductive potential in the paper wasp *Mischocyttarus mastigophorus*. Ethol. Ecol. Evol. 20:125-139.
- Muscudere, M.L., Traniello, J.F.A. (2012). Division of labor in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* is associated with distinct subcaste- and age-related patterns of worker brain organization. PLoS One. 7(2):e31618.

- Navarrete, A., van Schaik, C.P., Isler, K. (2011) Energetics and the evolution of human brain size. *Nature*, 480:91–93.
- Niven, J.E., Laughlin, S.B. (2008) Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology*, 211:1792–1804.
- O'Donnell, S., Bulova, S. (2017). Development and evolution of brain allometry in wasps (Vespidae): Size, ecology and sociality. *Current Opinion in Insect Science*, 22, 54–61.
- O'Donnell, S., Clifford, M.R., DeLeon, S., Papa, C., Zahedi, N., Bulova, S.J. (2013). Brain size and visual environment predict species differences in paper wasp sensory processing brain regions (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). *Brain Behav Evol* 82:177–184.
- O'Donnell, S., Donlan, N.A., Jones, T. A. (2004). Mushroom body structural plasticity is associated with temporal polyethism in eusocial wasp workers. *Neurosci. Lett.* 356:159-162.
- Orr, M. R. (1992). Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30: 395–402.
- Ott, S.R. (2008) Confocal microscopy in large insect brains: zinc formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal Neuroscience Methods*, 172:220–230.
- Petters, C. (1997). Morphologically “primitive” ants: comparative review of social characters, and the importance of queen-worker dimorphism. In: Choe, J & Cresp, B. (Eds.), *The Evolution of social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.372 – 391.
- Reader, S.M., Laland, K.N. (2002). Social intelligence, innovation, and enhanced brain size in primates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 4436–4441.
- Riveros, A.J., Seid, M.A., Wcislo, W.T. (2012). Evolution of brain size in class-based societies of fungus-growing ants (Attini). *Animal Behaviour*, 83:1043–1049.
- Rodrigues, M. S., Vilela, E. F., Azevedo, D. O., Hora, R. R. (2011). Multiple queens in founding colonies of the neotropical ant *Pachycondyla striata* Smith (Formicidae: Ponerinae). *Neotropical Entomology*, 40(3), 293–299.

- Rybak, J., Kuss, A., Lamecker, H., Zachow, S., Hege, H., Lienhard, M., Singer, J., Neubert, K., Menzel, R. (2010). The digital bee brain: integrating and managing neurons in a common 3D reference system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4:30.
- Rybak J. 2012. The digital honey bee brain atlas. In: *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Dordrecht: Springer, p. 125-140.
- Schmidt, C. (2013). Molecular phylogenetics of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Zootaxa*, 3647(2), 201–250.
- Schmidt, C. A., & Shattuck, S. O. (2014). The higher classification of the ant subfamily Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae), with a review of ponerine ecology and behavior. *Zootaxa*, 3817(1), 1–242.
- Scholtz, G., Edgecombe, G.D. (2006). The evolution of arthropod heads: reconciling morphological, developmental and palaeontological evidence. *Dev. Genes Evol.* 216, 395-415.
- Schröter, U., Menzel, R. (2003). A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. *Journal of Comparative Neurology*, 465(2): 168-178.
- Sheehan, Z.B.V., Kamhi, J.F., Seid, M.A., and Narendra, A. (2019). Differential investment in brain regions for a diurnal and nocturnal lifestyle in Australian Myrmecia ants. *J. Comp. Neurol.* 527, 1261–1277.
- Silva-Melo, A., Giannotti, E. (2010). Nest architecture of *Pachycondyla striata* Fr. Smith, 1858 (Formicidae, Ponerinae). *Insect Soc.*, 57, pp. 17-22.
- Smaers, J.B., Soligo, C. (2013) Brain reorganization, not relative brain size, primarily characterizes anthropoid brain evolution. *Proc Biol Sci* 280:20130269.
- Smith, F. (1858). Catalogue of hymenopterous insects in the collection of the British Museum. Part VI. Formicidae. British Museum, London, 216 pp.
- Sol, D., Bacher, S., Reader, S.M., Lefebvre, L. (2008). Brain size predicts the success of mammal species introduced into novel environments. *Am. Nat.* 172, S63–S71.
- Strauss, R. (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 12, p. 633-638.

- Sulger, E., Mcaloon, N., Bulova, S.J., Sapp, J., O'Donnell, S. (2014). Evidence for adaptive brain tissue reduction in obligate social parasites (*Polyergus mexicanus*) relative to their hosts (*Formica fusca*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113:415–422.
- Ward, P.S. (2014). The phylogeny and evolution ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45:23-43.
- Wilson, E.O., Holldober, B. (2005). The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 102, 7411- 7414.
- Wilson, E.O. (1980). Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 7:143–156.
- Winnington, A. P., Napper, R. M., Mercer, A. R. (1996). Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J. Comp. Neurol.* **365**, 479–490.
- Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1993). Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature*, 364: 238–240.

# **CAPÍTULO I: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS (*Atta sexdens*): CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

## **RESUMO**

O volume cerebral das formigas operárias pode variar em resposta a desafios ecológicos. No gênero *Atta*, o polimorfismo das operárias está associado à divisão do trabalho entre subcastas, baseada no tamanho do corpo. Este estudo avaliou os volumes cerebrais absolutos e relativos do lobo antenal, lobo óptico e cálice do *corpus pedunculatum* nas subcastas de *Atta sexdens*, bem como a intensidade das sinapses nas neurópilas. A hipótese foi que as operárias envolvidas em diferentes tarefas exibiam variações no volume das regiões cerebrais. No soldado, o lobo antenal contém glomérulos esféricos na região periférica, incluindo dois macroglomerulos. O volume relativo do cálice do *corpus pedunculatum* é maior nas operárias lixeiras, enquanto o volume relativo do lobo antenal é maior nas forrageiras e lixeiras. Tanto nas forrageiras quanto nas lixeiras, os volumes do cérebro, cálice do *corpus pedunculatum* e lobo antenal mostram correlação positiva. A presença de macroglomerulos em soldados pode estar relacionada à especialização de tarefas entre as subcastas de operárias de *A. sexdens*. Embora os soldados possuam uma cápsula cefálica maior do que os forrageadores, seus volumes cerebrais são semelhantes, provavelmente devido à gama limitada de tarefas realizadas pelos soldados. Os lobos ópticos maiores nas subcastas de soldados e forrageiras sugerem que tarefas realizadas fora do ninho podem exigir percepção visual aprimorada. Em operárias lixeiras, o volume relativo da neurópila do *corpus pedunculatum* é maior, possivelmente devido a tarefas que exigem aprendizado e memória. As forrageiras exibem um volume relativo maior da neurópila do lobo antenal, o que pode facilitar a detecção de uma gama diversificada de odores. A intensidade das sinapses não diferiu entre as subcastas de *A. sexdens*, sugerindo que pode haver um padrão de intensidade intraespecífico. Os resultados indicam que a plasticidade dos compartimentos cerebrais em operárias de *A. sexdens* é influenciada pelas tarefas desempenhadas por elas, sendo o resultado de investimentos diferenciados em tecido neural entre as operárias polimórficas e está relacionada, possivelmente, a adaptação evolutiva de funções.

**Palavras-chave:** macroglomerulos; cérebro; formiga-cortadeira

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos da alometria e das dimensões cerebrais são importantes para a compreensão dos princípios funcionais e da evolução do sistema nervoso animal, pois eles revelam os padrões gerais e os específicos para cada grupo de organismos (Striedter, 2005; Montgomery et al., 2016). O tamanho relativo do cérebro é um indicador significativo da importância funcional de uma estrutura cerebral, evidenciando-se que as estruturas são funcionalmente independentes e têm evoluído separadamente (Clark et al., 2001; Herculano-Houzel, 2009). Por outro lado, o tamanho absoluto do cérebro evidencia que as estruturas estão funcionalmente relacionadas e têm evoluído de forma coordenada (Clark et al., 2001; Herculano-Houzel, 2009).

Nesse contexto, as formigas são organismos modelos para examinar a relação entre comportamento, tamanho do corpo e neuroanatomia. Estes insetos apresentam espécies com padrões de castas e subcastas, possibilitando o estudo da relação entre a estrutura do cérebro e a especialização comportamental em associação com a divisão do trabalho e elementos relacionados à complexidade social (Hölldobler & Wilson, 1990; Muscedere & Traniello, 2012; Gordon *et al.*, 2017; Gordon & Traniello, 2018; Gordon *et al.*, 2018).

O volume do cérebro de operárias de formigas pode variar de acordo com os desafios ecológicos com diferenças na percepção sensorial, processamento de ordem superior e demandas motoras necessárias para o desenvolvimento de tarefas na colônia (Sulger *et al.*, 2014; Bulova *et al.*, 2016; Kamhi *et al.*, 2016). Em operárias polimórficas, caracterizadas por grupos de indivíduos morfologicamente diferentes, de acordo com o trabalho ou as funções que desempenham (Della Lucia & De Souza, 2011), o volume do cérebro parece corresponder ao comportamento de forrageio e às demandas de processamento sensorial e de

alta ordem do desempenho da tarefa (Gronenberg, 2008; Muscedere & Traniello, 2012; Gordon *et al.*, 2017).

Nas espécies do gênero *Atta* (Myrmicinae), o polimorfismo das operárias está associado a uma divisão do trabalho entre as subcastas, baseada no tamanho dos indivíduos. Em *Atta sexdens*, as operárias maiores (soldados) são especializadas na defesa da colônia, as médias (forrageiras) na coleta de recursos alimentares, e as operárias menores processam material foliar, descartam resíduos (lixeiros), cuidam da cria e trabalham no jardim de fungo (jardineiras) (Wilson, 1980; Holldobler & Wilson, 1990; Lacerda *et al.*, 2010). As operárias menores, desempenhando atividade de remoção do lixo, geralmente são consideradas uma subcasta etária, na qual operárias mais velhas executam essa função (Lacerda *et al.*, 2010; Della Lucia & De Souza, 2011).

Estudos intraespecíficos da estrutura cerebral, em espécies com alto grau de polimorfismo, podem fornecer informações sobre a flexibilidade das regiões cerebrais. Sendo assim, o presente trabalho visa avaliar o volume absoluto e relativo do cérebro e das neurópilas do lobo antenal, lobo óptico e cálice do *corpus pedunculatum* e a densidade de sinapses das subcastas da formiga-cortadeira *A. sexdens* e verificar se operárias envolvidas em diferentes tarefas apresentam variações nestas regiões. Para isso foram testadas as seguintes hipóteses: (i) operárias que executam tarefas diversificadas investem mais em neurópilas de processamento de ordem superior (cálice *corpus pedunculatum*) que os soldados, subcasta especialista na defesa; (ii) operárias que desempenham tarefas fora do ninho investem mais em neurópilas de processamento visual (lobo óptico) que aquelas que desempenham suas tarefas dentro do ninho; (iii) operárias com maiores cápsulas cefálicas tem cérebros maiores em termos absolutos, e (iv) operárias envolvidas em múltiplas tarefas apresentam mais sinapses que aquelas que realizam tarefas específicas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos insetos**

As operárias de *A. sexdens*, atuando como jardineiras, forrageiras e lixeiras foram obtidas de três ninhos mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, no Estado de Minas Gerais (20° 45'S 42° 52'O), enquanto trabalhavam no jardim de fungo, manipulavam lixo e coletavam fragmentos de folhas, respectivamente. As formigas atuando como soldados foram coletadas manualmente no campo, na Universidade Federal de Viçosa, pois colônias mantidas em laboratório não investem na produção de soldados. Logo após a coleta, as formigas foram crioanestesiadas a 4°C por 5 minutos, e a distância interocular [largura da cabeça entre as margens internas dos olhos compostos, utilizada como tamanho da cápsula cefálica (Bulova *et al.*,2016)] de oito espécimes de cada subcasta foi medida, utilizando esteromicroscópio STEMI 2000-C Zeiss com ocular calibrada. Posteriormente, os cérebros foram dissecados em NaCl 125 mM e transferidos para fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,15M, pH 7,2 por 24 h.

### **2.2 Histologia**

Os oito cérebros de operárias de cada subcasta de *A. sexdens* foram desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 15 minutos cada e incluídos em historesina (Leica Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Cortes histológicos com 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM2255 e corados com hematoxilina (20 min) e eosina (30 s). Posteriormente, as amostras foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 e fotografadas usando uma câmera Olympus QColor 3. A área dos cérebros e dos neurópilos do lobo óptico, lobo antenal e cálice do corpo cogumelar foram medidas com o auxílio do software ImageJ.

### 2.3 Análise volumétrica

As medidas geradas no ImageJ foram usadas para determinar o volume absoluto do cérebro e dos neurópilos, de acordo com o método de Cavalieri (Coggeshall, 1992), no qual foram selecionadas 10 seções aleatórias de cada uma das oito repetições de cada subcasta. As áreas médias do cérebro e de cada neurópilo foram medidas e usadas para o cálculo do volume com a fórmula  $V = \bar{a} \times t \times s$ , onde  $V$  é o volume absoluto do cérebro,  $\bar{a}$  a área média do cérebro em cada secção,  $t$  o número total de secções histológicas do cérebro e  $s$  a espessura das secções histológicas. Dada a sua simetria bilateral, as medidas da área dos neurópilos foram obtidas de um hemisfério por cérebro que foi posteriormente duplicado para obter o valor total. Para o cálculo do volume relativo do cérebro e das neurópilas do lobo óptico, do lobo antenal e do cálice do *corpus pedunculatum*, o volume absoluto de cada região, em cada subcasta, foi dividido pelo tamanho da cápsula cefálica (representado pela distância interocular).

### 2.4 Sinapses

Três cabeças de cada subcasta de *A. sexdens* foram transferidas para solução de Zamboni por 1 hora, em seguida os cérebros dissecados e transferidos para tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7,4 (PBS). As amostras foram lavadas com PBS, por três vezes pelo período de 15 minutos, e posteriormente incubados em albumina sérica bovina em PBS contendo Triton-X 100 a 1%. Após 1 hora, foram lavados em PBS e incubados por quatro dias em anticorpo anti-sinapsina (3C11-SYNORF1, DHSB) 1:100 em PBS em temperatura ambiente. Então, as amostras foram lavadas em PBS, por três vezes, durante 15 minutos e incubadas em anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma-Aldrich) 1:250 em PBS por 3 dias, no escuro, em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as amostras foram transferidas para 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1:500 em PBS por 30 minutos para coloração dos núcleos celulares. Posteriormente, as amostras foram desidratadas

em série crescente de etanol, etanol: xilol 1:1 por 10 minutos cada, e em xilol por 1 hora em temperatura ambiente. Logo após, os cérebros foram montados *in toto* com sacarose 50%, com o lado ventral voltado para cima e examinados ao microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 900 Axio Observer 7. A quantificação das sinapses foram realizadas em imagens tridimensionais obtidas em z-stacking com  $x \mu\text{m}$  de espessura a partir da intensidade de fluorescência.

## **2.5 Análises estatísticas**

O volume absoluto do cérebro e das neurópilas do lobo antenal, do lobo óptico e do cálice do *corpus pedunculatum* das subcastas de operárias de *A. sexdens* foram comparados por análise de variância (ANOVA one-way), seguido por teste *post hoc* das médias e teste de Tukey HSD. O tamanho da cápsula cefálica foi comparado usando Modelo Linear Generalizado e teste de Conover-Iman com correção de Bonferroni. A correlação entre o volume absoluto do cérebro e o tamanho da cápsula cefálica, volume absoluto do cérebro e volume absoluto das neurópilas do lobo antenal, do lobo óptico e do cálice do corpo cogumelar foram analisadas usando a correlação de Spearman. O volume relativo do cérebro e o das neurópilas do lobo antenal, lobo óptico e do cálice do corpo cogumelar das subcastas de *A. sexdens* foram comparados usando o Modelo Linear Generalizado e teste de Tukey. A quantidade das sinapses, a partir da intensidade de fluorescência, entre operárias de *A. sexdens* foram comparadas pelo teste de Kruskal- Wallis. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2020).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Tamanho da cápsula cefálica**

As medidas da cápsula cefálica (distância interocular) foram diferentes entre as subcastas de operárias de *A. sexdens*. A subcasta soldado apresentou a maior cápsula cefálica, seguida da subcasta forrageira e das subcastas lixeira e jardineira que foram similares (Fig.1).

A distância interocular média entre as subcastas de *A. sexdens* foi medida como: soldados ( $7,43 \pm 0,451\text{mm}$ ), forrageadoras ( $5,34 \pm 0,686 \text{ mm}$ ), jardineiras ( $4,17 \pm 0,853 \text{ mm}$ ) e removedoras de resíduos ( $4,48 \pm 0,351 \text{ mm}$ ).

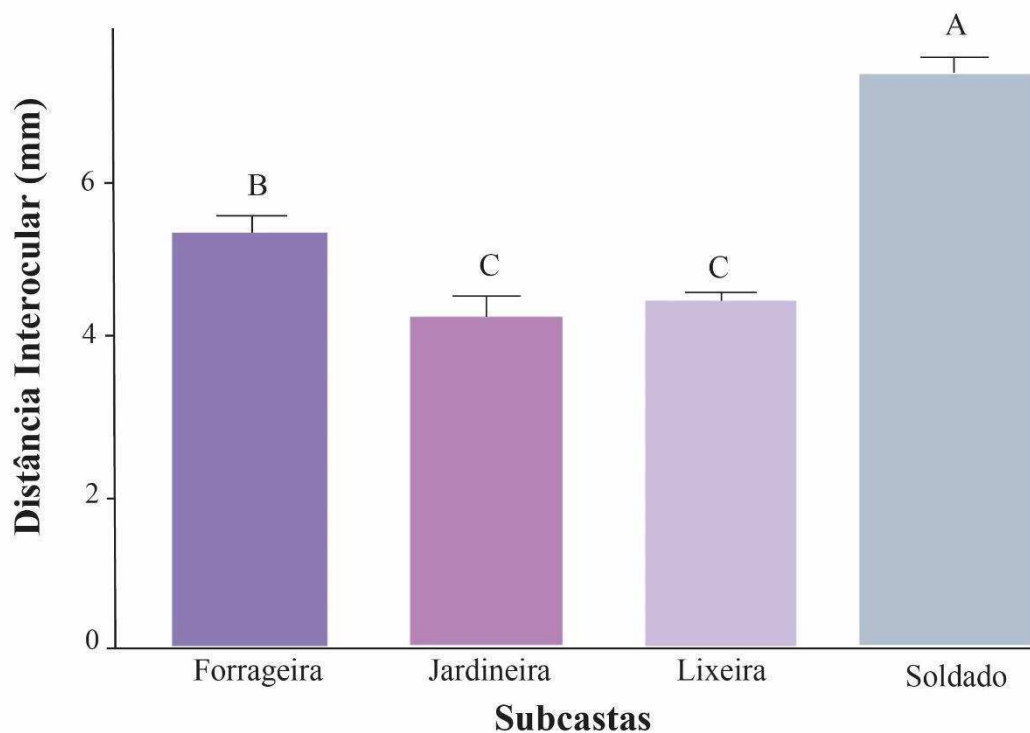


Figura 1: Distância interocular (média  $\pm$  dp) de operárias das subcastas forrageira, jardineira, lixeira e soldado de *Atta sexdens*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 3.2 Histologia

O cérebro de operárias de *A. sexdens* é bilobado e constituído por três regiões ganglionares, formadas por neurópilas bem desenvolvidas e por uma região periférica de subcompartimentos compactos que contém os corpos celulares dos neurônios e algumas células da glia (Fig.2).

No protocérebro, os *corpora pedunculata* formam estruturas pares, compostos pelos cálices lateral e medial (Fig.2), sendo que cada par estava localizado em um hemisfério cerebral. Os cálices apresentaram prolongamentos das células de Kenyon (neurônios) cujos corpos celulares estão localizados na região periférica (Fig.2). Os lobos ópticos apresentaram três sub-regiões de neurópilos sucessivas, sendo elas: lâmina, medula e lóbula, entre as quais ocorreram quiasmas, regiões de cruzamento de axônios entre duas neurópilos (Fig.2). O quiasma exterior estabeleceu a ligação entre a lâmina e a medula e o interior entre a medula e a lóbula.

No deutocérebro, cada lobo antenal apresentou a neurópila formada por glomérulos de tamanhos variados (Fig.2).

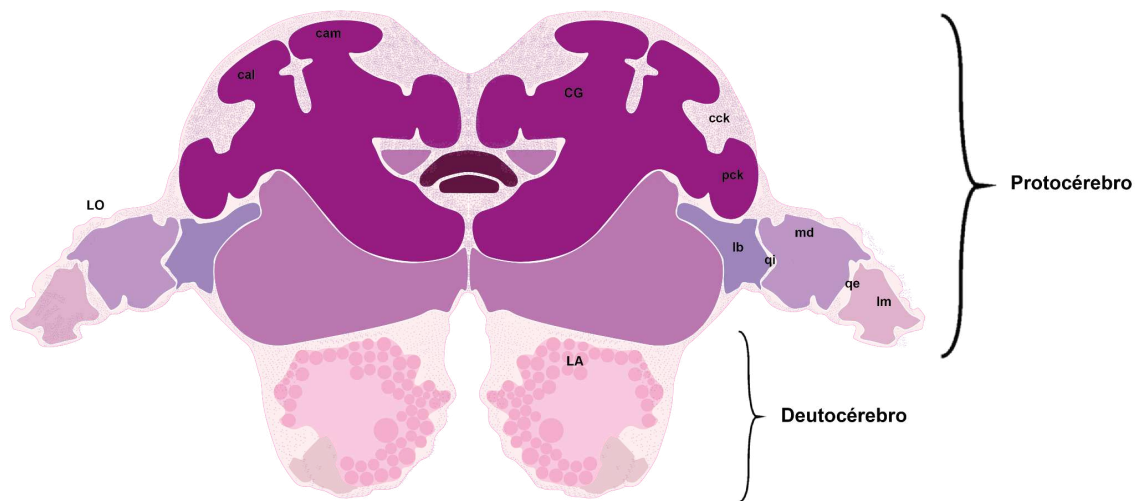


Figura 2: Estrutura geral do cérebro de operárias de *Atta sexdens*, mostrando o protocérebro com os *corpora pedunculata* (CG) apresentando os cálices medial (cm) e lateral (cl) e os prolongamentos das células de Kenyon (ppk) e seus corpos celulares localizados na periferia (cck). Lobo óptico (LO) com as sub-regiões- lâmina (lm), medula (md) e lóbula (lb) com quiasmas interno (qi) e externo (qe). No deutocérebro, os lobos antenais (LA) apresentaram glomérulos esféricos de diâmetros variados.

Os dados morfológicos evidenciaram que os cérebros das subcastas de operárias de *A. sexdens* possuem o protocérebro semelhante (Fig. 3,4, S1 e S2). Entretanto, no deutocérebro, o lobo antenal apresentou variações. Na subcasta soldado, o lobo antenal apresentou

glomérulos esféricos na região periférica, com dois macroglomérulos, medindo cerca de  $1,6 \mu\text{m}^2$ , enquanto a região central foi preenchida por uma neurópila difusa (Fig. 3D). No lobo antenal de forrageiras os glomérulos estão localizados na periferia, mas sem a ocorrência de macroglomérulos e com neurópila central difusa (Fig. S1). Nas jardineiras (Fig.4D) e lixeiras (Fig. S2) também ocorreram os glomérulos esféricos de diferentes tamanhos.

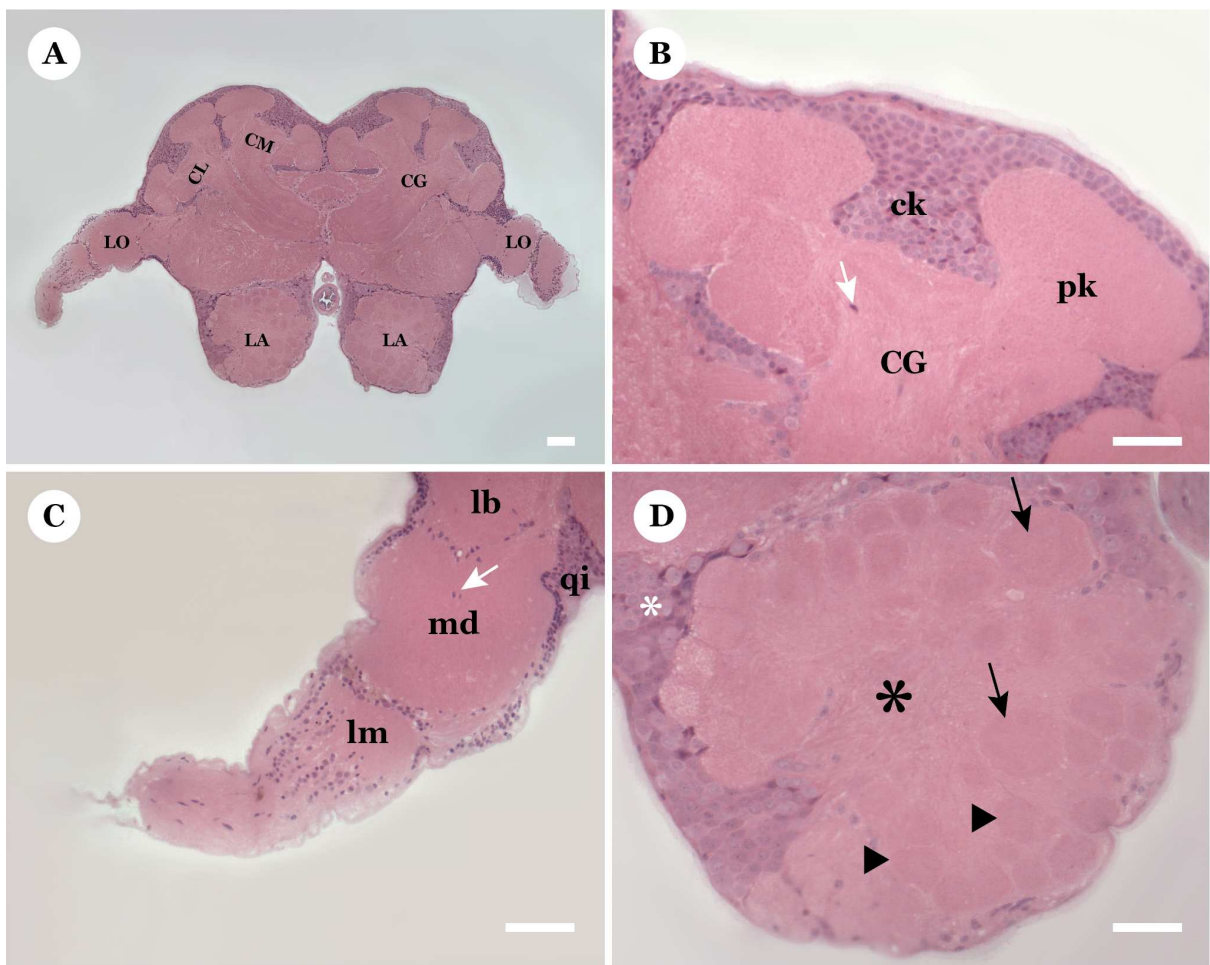


Figura 3: Seções histológicas do cérebro da subcasta soldado de *Atta sexdens*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do *corpus pedunculatum*, com destaque nos prolongamentos (pk) e corpos celulares (ck) das células de Kenyon e células da glia (seta branca). C) Lobo óptico, com destaque nas suas sub-regiões- lóbula (lb), medula (md), lâmina (lm) e as células da glia (setas brancas). Entre a medula e a lóbula há o quiasma interno (qi). D) Lobo antenal evidenciando os glomérulos esféricos (ponta de seta) de diâmetros variados na periferia e região central com emaranhado de neurópilas (asteriscos). A seta preta aponta os macroglomérulos. Cálice medial (CM) e lateral (CL). Barras de escala:30  $\mu\text{m}$ .

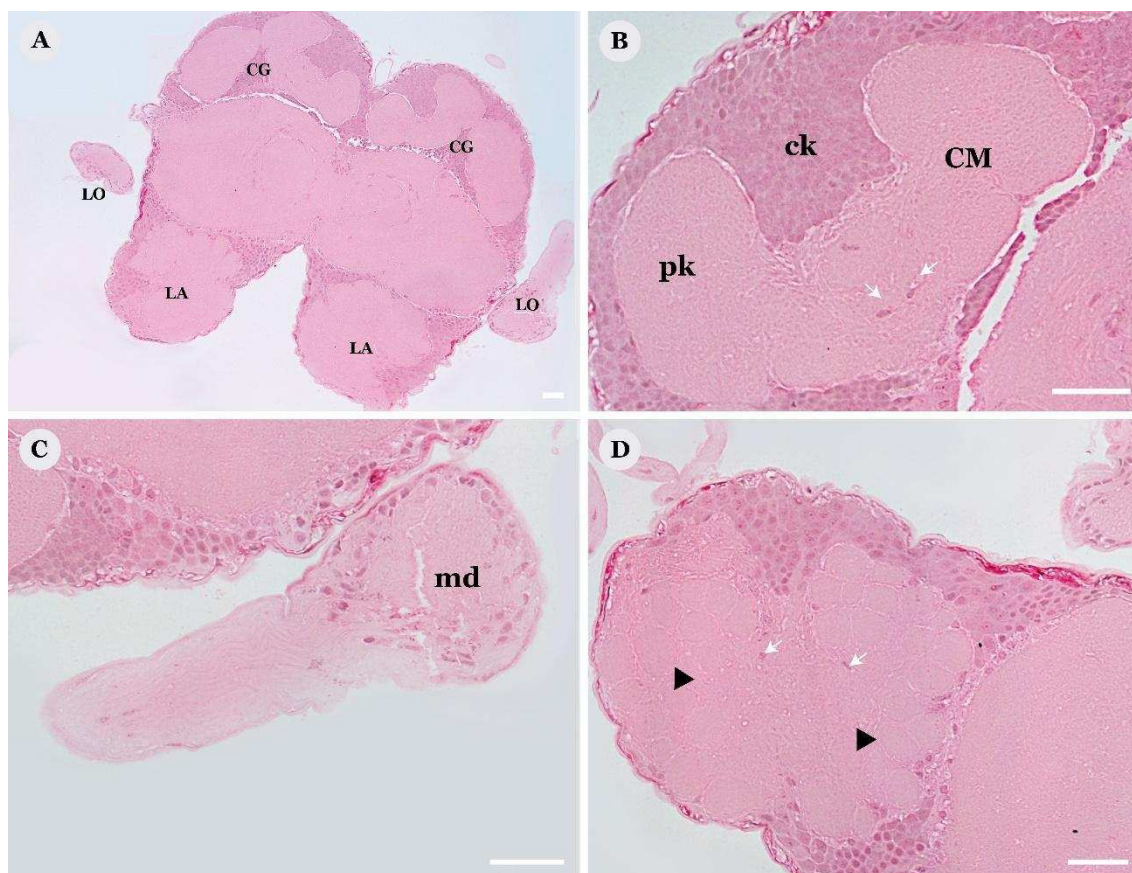


Figura 4: Seções histológicas do cérebro da subcasta jardineira de *Atta sexdens*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do corpo cogumelar, com destaque nos prolongamentos (pk) e corpos celulares (ck) das células de Kenyon. C) Lobo óptico, com destaque na medula (md). D) Lobo antenal, evidenciando os glomérulos esféricos (ponta de seta) de diâmetros variados. As setas brancas indicam as células da glia. Cálice medial (CM) e lateral (CL). Barras de escala:30  $\mu$ m.

### 3.3 Morfometria

O volume absoluto do cérebro foi maior na subcasta soldado do que em jardineira ( $p < 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=3$ ;  $diff = 0,28$ ) e lixeira ( $p < 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=3$ ;  $diff = 0,26$ ) que foram semelhantes ( $p > 0,05$  IC=95%;  $dF=3$ ;  $diff=0,02$ ; Fig.5A). As operárias forrageiras apresentam volume absoluto intermediário, sendo semelhantes aos soldados ( $p > 0,05$ ; IC=95%;  $dF=3$ ;  $diff = 0,18$ ), jardineiras ( $p > 0,05$ ; IC=95%;  $dF=3$ ;  $diff= -0,11$ ), e lixeira ( $p > 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=3$ ;  $diff = -0,09$ ) (Fig. 5A).

O volume do lobo óptico na subcasta soldado foi maior que nas jardineiras ( $p < 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff=-0,008$ ) e lixeira ( $p < 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff=-0,008$ ) (Fig. 5B). No entanto, não houve diferença no volume desse neurópilo entre as subcastas jardineira e lixeira ( $p > 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff= -0,000$ ), forrageira e soldado ( $p > 0,05$  IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff=-0,004$ ), forrageira e lixeira ( $p > 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff=0,004$ ) e forrageira e jardineira ( $p > 0,05$ ; IC= 95%;  $dF=16$ ;  $diff=0,004$ ) (Fig. 5B). Nas demais neurópilas analisadas, cálice do *corpus pedunculatum* e lobo antenal, não houve diferença significativa entre as subcastas (Fig. S3 e S4).

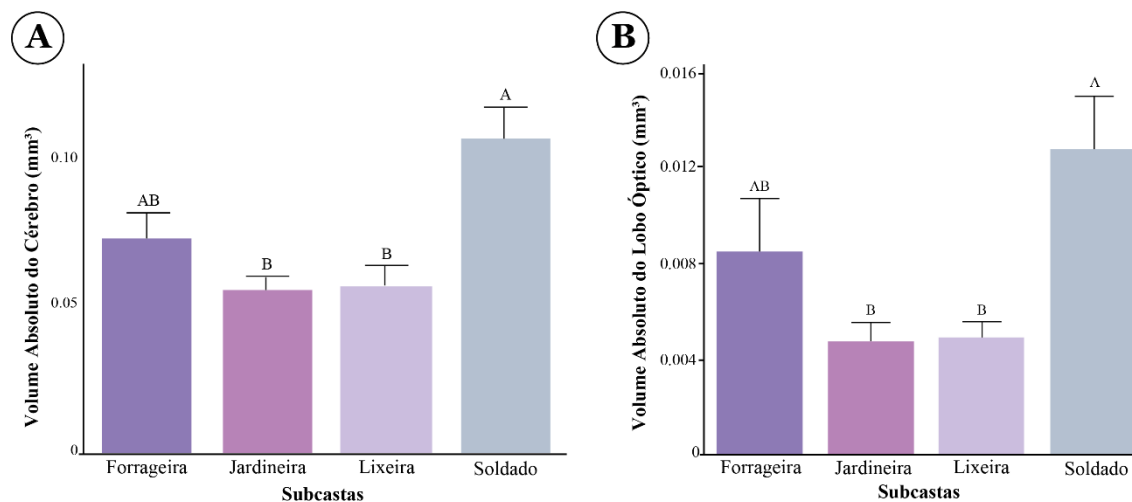


Figura 5: A) Volume absoluto do cérebro (média  $\pm$  dp) e do lobo óptico (média  $\pm$  dp) (B) de operárias das subcastas forrageira, jardineira, lixeira e soldado de *Atta sexdens*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O volume relativo do cérebro de subcastas de *A. sexdens* e o do lobo óptico não apresentaram diferenças entre as subcastas ( $p > 0,05$ ; Fig. S3 e S4). No entanto, o volume relativo do cálice do *corpus pedunculatum* foi maior nas operárias lixeiras que nas demais subcastas ( $p < 0,05$ ; Fig. 6A).

No deutocérebro, o lobo antenal foi maior na subcasta forrageira, seguida pela lixeira ( $p < 0,05$ ) e jardineira e soldado que são semelhantes ( $p < 0,05$ ; Fig.6B), enquanto o volume relativo.

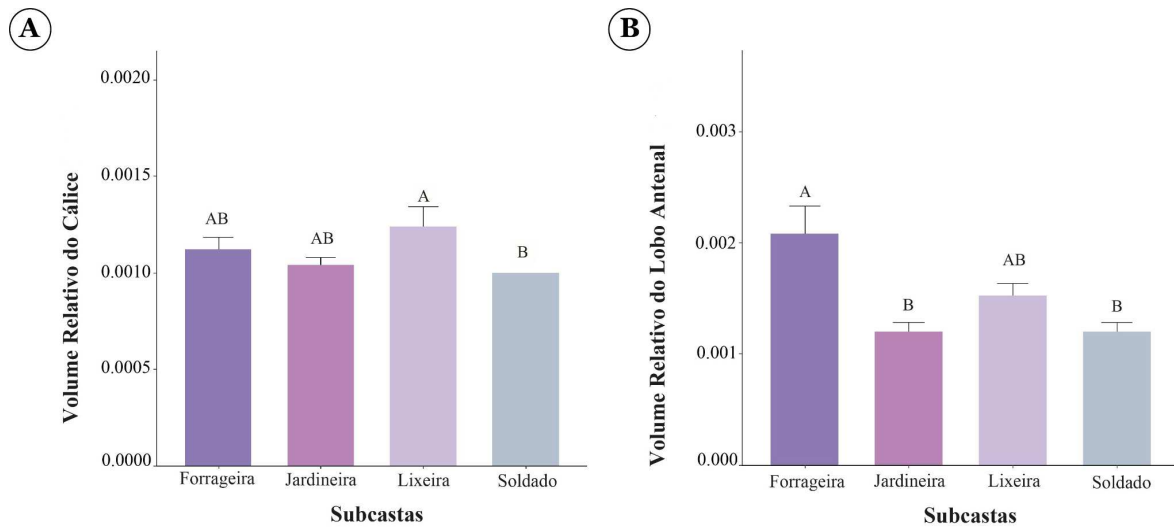


Figura 6: A) Volume relativo do cálice do *corpus pedunculatum* (média ± dp) e volume relativo do lobo antenal (média ± dp) (B) de operárias das subcastas forrageira, jardineira, lixeira e soldado de *Atta sexdens*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 3.4 Sinapses

As análises de intensidade de fluorescência nas neurópilas indicam que não houve diferença na intensidade das sinapses entre operárias de *A. sexdens* ( $p > 0,05$ ;  $\mathcal{D}^2 = 4.9487$ ;  $dF = 1$ ; Fig. 7).

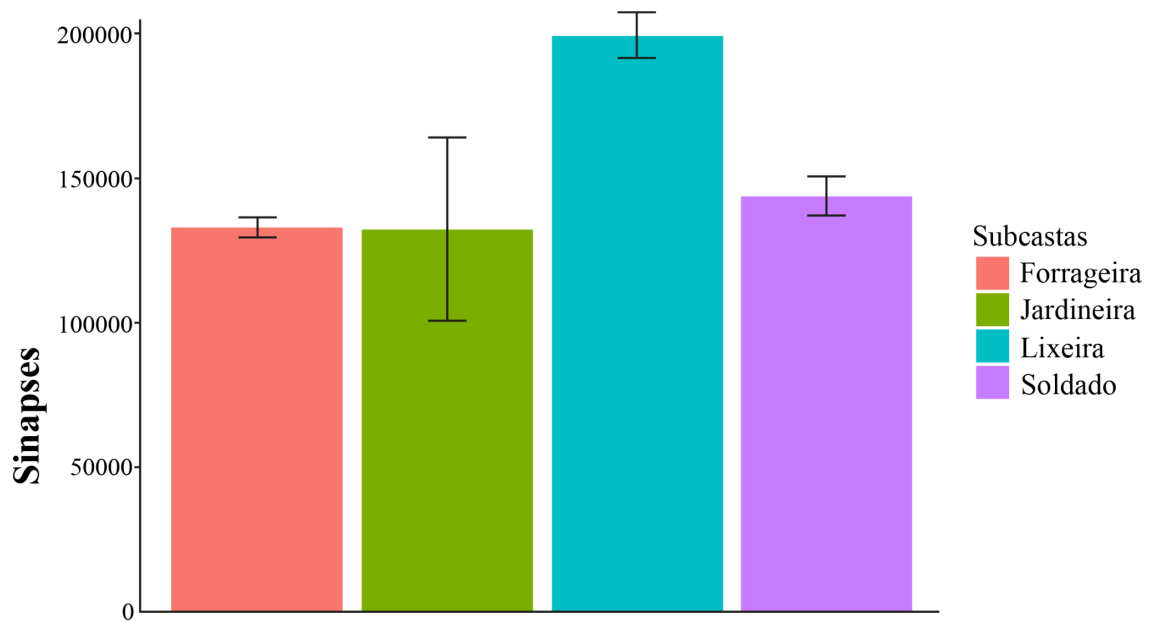


Figura 7: Quantificação das sinapses, através da marcação da proteína sinapsina com o anticorpo 3C11-SYNORF1 no cérebro das subcastas de *Atta sexdens* ( $p > 0,05$ -teste de Kruskal-Wallis).

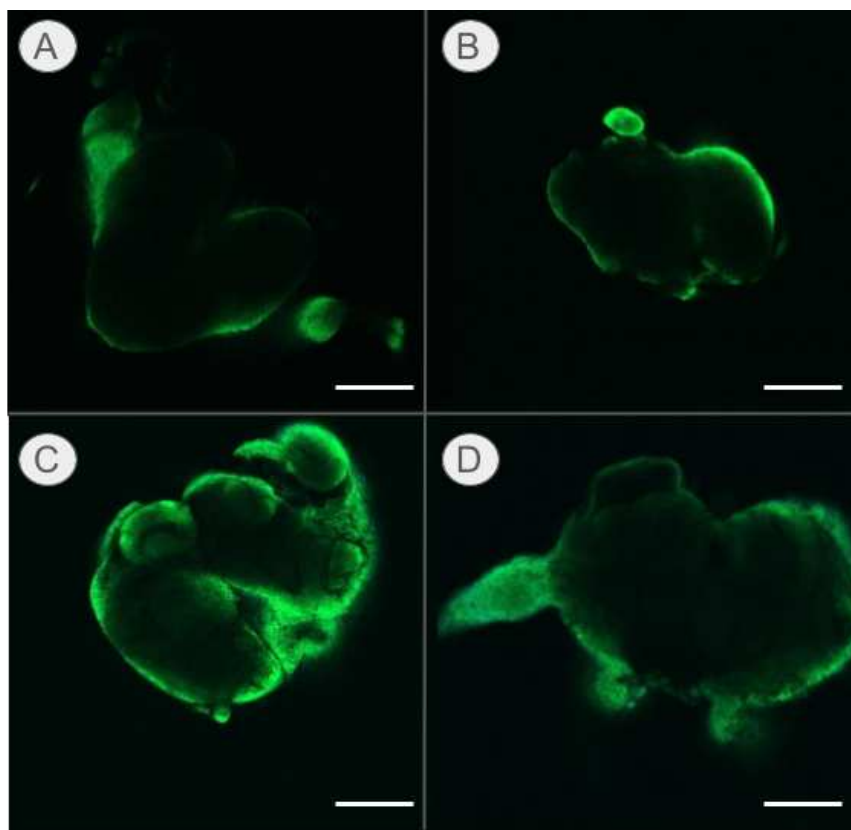


Figura 8: Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser evidenciando a quantidade das sinapses, a partir da intensidade de fluorescência, dos cérebros de operárias de *Atta sexdens*. A) Forrageira, B) jardineira, C) lixeira e D) soldado. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### 3.5 Correlação entre neurópilas e volume cerebral

A correlação positiva entre o volume absoluto do cérebro e as neurópilas das subcastas de *A. sexdens* foi observada apenas em forrageira e lixeira. Na subcasta forrageira a correlação positiva ocorreu entre o volume absoluto do cérebro e o volume do cálice do *corpus pedunculatum* ( $r=0,7$ ;  $p<0,05$ ), enquanto na subcasta lixeira a correlação positiva foi entre o volume absoluto do cérebro e o do lobo antenal ( $r=0,6$ ;  $p<0,05$ ).

## 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigamos a influência do tamanho da cápsula cefálica no tamanho do cérebro de operárias de *A. sexdens*, e como os volumes absoluto e relativo do cérebro e dos neurópilos do lobo antenal, lobo óptico e cálice do *corpus pedunculatum* das subcastas estão associados com a tarefa desempenhada.

Os dados das medidas da distância interocular, usadas como medidas da cápsula cefálica, de acordo com os relatados por Wilson (1980) e em conjunto com o comportamento das operárias de *A. sexdens* no momento da coleta, confirmam as subcastas presentes na casta operária, evidenciando um alto grau de polietismo. A subcasta soldado tem maior cápsula cefálica, seguida da subcasta forrageira, que apresenta tamanho intermediário, e por último lixeira e jardineira, sendo que entre as últimas não há diferenças. Medidas semelhantes foram relatadas nas subcastas de *A. sexdens* por Della Lúcia & De Souza (2011) e Dourado *et al.* (2023).

As análises histológicas revelaram a presença de dois macroglomérulos no lobo antenal da subcasta soldado, um localizado na região periférica e outro próximo à região central do neurópilo. Um macroglomérulo também foi relatado em operárias maiores de *Atta vollenweideri*, na região de entrada do nervo antenal (Kleineidam *et al.*, 2005), porém nossos resultados diferem tanto no número quanto na posição. A formação de macroglomérulo é

resultado de um grande número de terminais de neurônios receptores de odor (Kleineidam *et al.* 2005), resultando em processamento alternativo de informações de odor (Keulber *et al.*, 2010). Assim, a ocorrência de macroglomérulos, somente em operárias maiores, sugere diferenças na percepção sensorial desta subcasta de *A. sexdens*.

O volume absoluto do cérebro das subcastas soldado e forrageira são maiores que em jardineiras e lixeiras, que apresentam menor tamanho corporal. Entretanto, a subcasta soldado apresenta cápsula cefálica maior que as forrageiras, mas o volume cerebral é similar entre elas. Esse fato pode ser explicado pelo repertório restrito de tarefas desempenhadas pelos soldados, não sendo necessário um grande investimento em tecido cerebral para realizá-las. Da mesma forma, o volume absoluto do cérebro da subcasta forrageira é similar àquele das operárias menores (jardineira e lixeira), mesmo sendo o tamanho da cápsula cefálica daquela maior. Essa semelhança pode estar associada à mudança de tarefa que a subcasta forrageira é submetida, uma vez que enquanto jovens atuam como jardineiras e começam a desempenhar atividade de forrageira à medida que envelhecem (De Souza & Della Lúcia, 2011; Lacerda *et al.*, 2010), indicando que essas subcastas podem ter capacidades cognitivas similares.

O tamanho do cérebro de *A. sexdens* também pode ser afetado pela quantidade de células da glia, pois elas são abundantes no cérebro dos insetos e podem contribuir significativamente para o volume cerebral (Freeman, 2012). Segundo Freeman (2014), as células da glia representam entre 5 e 10% da população total de células no sistema nervoso central da *Drosophila*.

O volume absoluto do cálice do *corpus pedunculatum* não varia entre as subcastas de operárias de *A. sexdens*. Mudanças intraespecíficas no volume do cálice do *corpus pedunculatum* são pequenas (Gronenberg & Holldobler 1999). Os *corpora pedunculata* de insetos sociais são ampliados sendo o centro de associação de diversos estímulos, inclusive no que se refere às habilidades de aprendizado e memória (Farris, 2013; Kuwabara *et al.*,

2023). Esse extenso volume do *corpus pedunculatum* em insetos sociais possibilita que eles recebam contribuições mais amplas do lobo óptico (Bressan *et al.*, 2015). A atividade de forrageio parece contribuir para o crescimento do corpo cogumelar, pois mudanças no volume desta neurópila, na formiga *Camponotus floridanus* (Gronenberg *et al.*, 1996) e na abelha *Apis mellifera* (Farris *et al.*, 2001), ocorrem quando as operárias começam a deixar o ninho para forrageio. Em *A. cephalotes* (Muratore *et al.*, 2022; 2023b), a diversidade de tarefas realizadas por operárias médias é possivelmente apoiada por seus *corpora pedunculata* aumentados. No entanto, para operárias de *A. sexdens* aqui analisadas essas mudanças não ocorrem, sugerindo uma possível variação entre espécies.

O volume absoluto do lobo óptico é maior nas subcastas soldado e forrageira, que desempenham suas tarefas fora do ninho, o que pode exigir uma maior capacidade de percepção visual, inferindo que diferenças na ecologia sensorial do local de trabalho afeta o polifenismo do sistema visual em formigas-cortadeiras, como reportado para *Atta cephalotes* (Arganda *et al.*, 2020; Muratore *et al.*, 2022). O maior volume do lobo óptico nestas duas subcastas pode ser consistente com o aumento do número de omatídeos, subunidade fotorreceptiva do olho. Por outro lado, as subcastas lixeira e jardineira, operárias que desempenham tarefas especializadas dentro do ninho, apresentaram volumes dos lobos ópticos menores que os soldados e as forrageiras, suportando a hipótese que o local onde a operária desempenha sua tarefa (dentro ou fora do ninho) induz um desenvolvimento diferenciado do sistema visual (Gronenberg & Liebig, 1999; Kamhi *et al.*, 2017). O ninho de *A. sexdens*, assim como de outras formigas, é um ambiente escuro, onde estímulos visuais não são importantes. O volume menor do lobo óptico também ocorre em operárias menores da formiga *Oecophylla smaragdina* (Formicinae) especializadas no cuidado da cria, que raramente saem do ninho (Kamhi *et al.*, 2017).

A plasticidade na capacidade visual pode estar associada ao desempenho de tarefas em ambientes que variam no nível de luz (Arganda *et al.*, 2020), sendo assim, operárias de *A. sexdens* que desenvolvem atividades em locais com maior iluminação (fora do ninho) investem mais no aparato visual do que aquelas que estão expostas a pouca luz, dentro do ninho. É importante ressaltar que cada região do lobo óptico tem uma função específica, que pode variar em tamanho dependendo dos hábitos de vida de cada espécie. Entretanto, neste estudo não foi possível realizar análises morfométricas dessas regiões, pois os limites entre elas não estavam bem definidos em algumas subcastas.

O volume absoluto do lobo antenal não varia entre as subcastas de *A. sexdens*, região que tende a ser menos variável entre as formigas (Gronenberg 1999; Gronenberg & Holldobler 1999). No entanto, em *Oecophylla smaragdina*, foi observado que operárias maiores tem o volume absoluto do lobo antenal maior do que operárias menores, assim como o número de glomérulos, indicando um alcance olfativo superior (Kamhi *et al.*, 2017). Essa diferença pode estar relacionada a fatores como ecologia, comportamento e organização social das espécies.

O volume relativo dos cérebros das subcastas de operárias de *A. sexdens* não varia, pois subcastas com diferentes tamanhos da cabeça apresentam cérebros semelhantes, contrariando a regra de Haller, que animais menores têm cérebros proporcionalmente maiores do que animais maiores (Rensch, 1948), como reportado em *A. cephalotes*, com as operárias menores apresentando maiores cérebros (Muratore *et al.*, 2022). Assim, mais estudos precisam ser realizados para identificar a causa desta diferença entre as espécies de Attini.

O volume relativo da neurópila do *corpus pedunculatum* é maior em operárias lixeiras de *A. sexdens*. Isso pode ser devido às funções específicas dessa subcasta, responsável pela remoção do lixo e identificação de patógenos, além de serem responsáveis pela transmissão de informações acerca de substratos inadequados, fazendo com que esse substrato não seja

mais levado para o ninho. Estas tarefas desempenhadas pelas lixeiras possivelmente necessitam mais da aprendizagem e memória (Arena & Roces, 2017). A presença de grandes *corpora pedunculata* podem estar associados ao aumento da flexibilidade comportamental (Gronenberg & Riveros, 2009; O'Donnell *et al.*, 2015; Riveros *et al.*, 2012). Farris *et al.*, (2001) demonstraram que, na abelha *A. mellifera*, pelo menos uma parte da mudança de volume dessa neurópila é dependente da experiência. Para explorar essa questão, seria necessário a marcação das células de Kenyon com anticorpos específicos, o que permitiria fazer a contagem e medição do volume dessas células e então fazer uma análise de correlação entre elas e o volume do cálice.

O volume relativo da neurópila do lobo antenal é maior em operárias forrageiras do que nas demais subcastas, indicando que elas investem mais nesta região, possivelmente com maior sensibilidade olfativa. As forrageiras desempenham uma ampla gama de tarefas, como seleção, corte e transporte de folhas, e o comportamento de seguir trilhas, que envolve sinais químicos (Kleineidam *et al.*, 2005; Segre & Taylor, 2019; Kwaku *et al.*, 2020), que possibilitaria a detecção de uma maior diversidade de odores, do que em soldados e jardineiras, que apresentam um repertório comportamental reduzido.

O menor volume relativo do lobo antenal dos soldados, sugere que suas habilidades sensoriais podem ser relativamente fracas, sendo eles mais dependentes da percepção visual do que da olfativa. Segundo Penick *et al.*, (2021), a procura por alimentos exige a capacidade de se orientar para retorno ao ninho, o que requer um processamento cognitivo mais elevado.

Os volumes relativos do lobo antenal aqui observados são similares aos reportados por Muratore *et al.* (2022), em *A. cephalotes*, com o lobo antenal ocupando proporcionalmente ao tamanho corporal uma fração maior do cérebro nas operárias médias (forrageiras), e divergem de Mysore *et al.* (2009; 2010), que observaram que operárias menores de *Camponotus sericeus* e *Camponotus compressus* (Formicinae) possuem mais

glomérulos no lobo antenal com possível melhor discriminação de estímulos olfativos, o que pode ser devido a diferenças entre as espécies analisadas. Segundo Kelber *et al.*, (2010), em *Atta vollenweideri*, o número de glomérulos está relacionado com o tamanho da cápsula cefálica, o que pode estar ocorrendo em *A. sexdens*, resultando em maior tamanho relativo do lobo antenal. Para verificar esse fato, seria necessário quantificar o número de glomérulos presentes no lobo antenal de cada subcasta, o que não foi possível com a técnica aqui utilizada.

Em *A. cephalotes*, análises de volume relativo mostraram que os lobos ópticos são proporcionalmente maiores em operárias maiores e os *corpora pedunculata* e lobos antenais são proporcionalmente maiores em operárias médias (Muratore *et al.*, 2022; 2023a). No entanto, em *A. sexdens*, observamos apenas que os *corpora pedunculata* e lobos antenais são proporcionalmente maiores em lixeiras e forrageadoras.

As análises de correlação mostram que na subcasta forrageira há correlação positiva entre o volume absoluto do cérebro e do cálice do *corpus pedunculatum*, indicando que em *A. sexdens* o tamanho do cálice está atrelado ao volume absoluto do cérebro. As forrageiras desempenham muitas tarefas e a presença de grandes *corpora pedunculata* pode estar associada ao aumento da flexibilidade comportamental (Gronenberg & Riveros, 2009; O'Donnell *et al.*, 2015; Riveros *et al.*, 2012). Da mesma forma, ocorre correlação positiva entre o volume absoluto do cérebro e do lobo antenal na subcasta lixeira, evidenciando que essa neurópila aumenta proporcionalmente com o volume absoluto do cérebro, confirmando a ocorrência de um maior investimento no desenvolvimento da neurópila do lobo antenal por esta subcasta, que, possivelmente, se traduz numa maior sensibilidade olfatória, seja para a identificação de possíveis patógenos (Goes *et al.*, 2020) ou para identificação/transmissão de pistas químicas das plantas, no qual se interrompe o processamento dos fragmentos foliares

de plantas inadequadas para o fungo, descartando-os na câmara de resíduos (Arenas & Roces, 2016a; 2017).

As tarefas desempenhadas por operárias de *A. sexdens* podem ser determinadas por uma interação entre tamanho corporal e idade. Por exemplo, jardineiras e lixeiras têm tamanhos corporais semelhantes, mas suas tarefas provavelmente variam conforme a idade. Também vale ressaltar que a divisão de tarefas não é rígida, havendo flexibilidade na alocação de tarefas dependendo das necessidades da colônia (Lacerda *et al.*, 2013; 2020).

A intensidade das sinapses não varia entre as subcastas de *A. sexdens*, sugerindo uma possível similaridade entre a densidade sináptica dessas subcastas. Segundo Dalgarrondo (2009), cérebros maiores tem maior número de neurônios e as conexões nervosas se tornam mais longas, mas diminui a densidade sináptica. Então, era esperado que operárias com o cérebro de tamanho maior, como as subcastas soldado e forrageira, apresentassem uma menor densidade sináptica, e operárias com cérebros menores uma maior densidade, o que não ocorreu. Segundo Groh *et al.* (2014), o número de complexos sinápticos (microglomérulos), no cálice do *corpus pedunculatum*, marcados com sinapsina é maior em operárias maiores (soldados) de *A. vollenweideri*. Em nossas análises, quantificamos a intensidade das sinapses em todo o cérebro, caso tivéssemos feito a quantificação por regiões específicas, diferenças na intensidade das conexões poderiam ter sido observadas. Outro aspecto identificado por Groh *et al.* (2014) foi que o tamanho dos cérebros das operárias de *A. vollenweideri* não influencia a densidade de sináptica, sugerindo que pode existir um limite para a miniaturização dos cérebros de operárias menores. E é provável que o mesmo se aplique às operárias de *A. sexdens*.

Em conclusão, os resultados mostram que a plasticidade dos compartimentos cerebrais em operárias de *A. sexdens* é influenciada pelas tarefas desempenhadas. Essa plasticidade é resultado de investimentos diferenciados em tecido neural entre as operárias

polimórficas, indicando especialização neurológica e, possivelmente, adaptação evolutiva de funções.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arganda, S., Hoadley, A. P., Razdan, E. S., Muratore, I. B., & Traniello, J. F. (2020). The neuroplasticity of division of labor: worker polymorphism, compound eye structure and brain organization in the leafcutter ant *Atta cephalotes*. *Journal of Comparative Physiology A*, 206, 651-662.
- Arenas A, Roces F. (2016a). Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Animal Behavior*.115: 167–174.
- Arenas, A. & Roces, F. (2017). Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS One*, v. 12, n. 3, p. 1–16.
- Azevedo, P., & Nocelli, R. C. F. (2020). Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. *Revista da Biologia*, 20(1), 10-20.
- Barton, R., Harvey, P. (2000). Mosaic evolution of brain structure in mammals. *Nature* 405, 1055–1058.
- Brandt, R., Rohlfing, T., Rybak, J., Krofczik, S., Maye, A., Westerhoff, M., Hege, H., Menzel, R. (2005). A three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1):1-19.
- Bressan, J.M.A., Benz, M., Oettler, J., Heinze, J., Hartenstein, V. and Sprecher, S.G. (2015) A map of brain neuropils and fiber systems in the ant *Cardiocondyla obscurior*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 166.

- Bulova, S., Purce, K., Khodak, P., Sulger, E., O'Donnell, S. (2016). Into the black, and back: the ecology of brain investment in Neotropical army ants (Formicidae: Dorylinae). *Naturwissenschaften*, 103:31.
- Byrne, R.W., Bates, L.A. (2007). Brain Evolution: When Is a Group Not a Group? *Current Biology*, 17, R883–R884.
- Chapman, R.F. (1998). *The Insects: Structure and Function*, fourth ed. The Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Clark, D.A., Mitra, P.P., Wang, S.S. (2001). Scalable architecture in mammalian brains. *Nature* 411:189–193.
- Coggeshall, R.E. (1992). A consideration of neural counting methods. *trends in Neuroscience*, 15:9-13.
- Dalgalarondo, P. (2009). *A Evolução do Cérebro*. Artmed Editora.
- Della Lucia, T.M.C., De Souza, D.J. (2011). Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In Della Lucia, T. M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*, Editora UFV, Viçosa, pp. 13-26.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*. 70:14–23.
- De Souza, D.J., Santos, J.F.L., Della Lucia, T.M.C. (2011). In Della Lucia, T.M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, pp. 126-137.
- Dourado, L. A., Oliveira, L. L., Raimundo, A. P. P., Cossolin, J. F. S., de Oliveira, J. F., Serrão, J. E. (2023). Hemocyte morphology of worker subcastes of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Arthropod Structure & Development*, 76, 101301.
- Dunbar, R.I.M., Shultz, S. (2007). Evolution in the social brain. *Science*. 80 (317), 1344–1347.

- Durst, C., Eichmüller, S., Menzel, R. (1994). Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behavioral and Neural Biology*, 62(3), 259-263.
- Ehmer, B., & Gronenberg, W. (2004). Mushroom body volumes and visual interneurons in ants: comparison between sexes and castes. *Journal of Comparative Neurology*, 469(2), 198-213.
- Fahrbach, S. E. (2006). Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annual Review of Entomology*, 51, 209-232.
- Farris, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2001). Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *Journal of Neuroscience*, 21: 6395–6404.
- Farris, S. M. (2013). Evolution of complex higher brain centers and behaviors: behavioral correlates of mushroom body elaboration in insects. *Brain Behavior and Evolution*, 82(1), 9-18.
- Farris, S. M., Van Dyke, J. W. (2015). Evolution and function of the insect mushroom bodies: Contributions from comparative and model systems studies. *Current Opinion in Insect Science*, 12: 19-25.
- Farris, S. M. (2016). Insect societies and the social brain. *Current opinion in insect Science*, 15, 1-8.
- Freeman, M.R. (2012). Invertebrate glia. In *Neuroglia* (ed. Kettenmann H, Ransom BR), pp. 18–27. Oxford University Press, New York.
- Freeman, M. R. (2015). *Drosophila* central nervous system glia. *Perspectives in Biology*, 7(11), a020552.

- Goes, A.C., Barcoto, M.O., Kooij, P.W., Bueno, O.C., Rodrigues, A. (2020). How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? *Frontiers in Ecology and Evolution*,
- Gordon, D.G., Traniello, J.F.A. (2018). Synaptic organization and division of labor in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Neuroscience Letter*, 676, 46–50.
- Gordon, D.G., Moreau, M., Fourcassie, V., Traniello, J.F.A. (2018). Limited size-related variation in behavioral performance among workers of the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Insectes Sociaux*, 65(3), 431–8.
- Gordon, D.G., Ilieș, I., Traniello, J.F.A. (2017). Behavior, brain, and morphology in a complex insect society: trait integration and social evolution in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(11), 166.
- Groh, C., Kelber, C., Grubel, K., Rossler, W. (2014). Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. *Proceedings of the Royal Society B* 281, 20140432.
- Gronenberg, W., Heeren, S., Hölldobler, B. (1996). Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Experimental Biology*, 199, 2011–19.
- Gronenberg, W. (1999). Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain Behavior and Evolution*, 54, 85–95
- Gronenberg, W., & Liebig, J. (1999). Smaller brains and optic lobes in reproductive workers of the ant *Harpegnathos*. *Naturwissenschaften*, 86, 343–385.
- Gronenberg, W., & Hölldobler, B. (1999). Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *Journal of Comparative Neurology*, 412(2), 229–240.
- Gronenberg, W. (2001). Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 474–489.

- Gronenberg, W. (2008). Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: strength in numbers. *Myrmecology News*, 11, 25–36.
- Gronenberg, W., Riveros, A.J. (2009). Social brains and behavior: past and present. In: Gadau J, Fewell JH (eds) *Organization of insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, pp 377–401.
- Hansson, B.S., Anton, S. (2000). Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annual Review of Entomology*, 45, 203–231.
- Healy, S.D., Rowe, C. (2007). A critique of comparative studies of brain size. *Proceedings of the Royal Society*, . 274, 453–464.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 31.
- Holldobler, B., Wilson, E. (1990). *The ants*. Harvard University Press.
- Ilieş, I., Muscedere, M.L., Traniello, J.F.A. (2015). Neuroanatomical and morphological trait clusters in the ant genus *Pheidole*: evidence for modularity and integration in brain structure. *Brain, Behavior and Evolution*, 85, 63–76.
- Ito, K., Shinomaya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homber, U., Jenett, A. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81, 755-765.
- Kamhi, J. F., Barron, A. B., Narendra, A. (2020). Vertical lobes of the mushroom bodies are essential for view-based navigation in Australian *Myrmecia* ants. *Current Biology*, 30(17), 3432-3437.
- Kamhi, J.F., Sandridge-Gresko, A., Walker, C., Robson, S.K., Traniello, J.F. (2017). Worker brain development and colony organization in ants: does division of labor influence neuroplasticity? *Developmental Neurobiology*, 77, 1072-1085.

- Kamhi, J.F., Gronenberg, W., Robson, S.K.A., Traniello, J.F.A. (2016) Social complexity influences brain investment and neural operation costs in ants. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20161949.
- Kelber, C., Rössler, W., & Kleineidam, C. J. (2010). Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Developmental Neurobiology*, 70(4), 222-234.
- Kinoshita, M. & Homberg, U. (2017). Insect Brains: Minute Structures Controlling Complex Behaviors. In: Shigeno, S., Murakami, Y. & Nomura, T. (eds) *Brain Evolution by Design. Diversity and Commonality in Animals*. Springer, Tokyo. pp. 123-151.
- Kleineidam, C.J., Obermayer, M., Halbich, W., Rössler, W. (2005). A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chemical Senses*, 30, 383–392.
- Kuwabara, T., Kohno, H., Hatakeyama, M., Kubo, T. (2023). Evolutionary dynamics of mushroom body Kenyon cell types in hymenopteran brains from multifunctional type to functionally specialized types. *Science Advances*, 9(18), eadd4201.
- Kwaku, K.M., Gonick, E.A., Ostapovich, E.M., Weinberg, I.P. (2020). The frequency of leaf transfer in *Atta cephalotes* along horizontal and vertical surfaces near the bases of trees. *Insectes Sociaux*, 67,481–486.
- Lacerda, F.G., Sousa-Souto, L., Della Lucia, T.M.C., de Souza, D.J. (2020). Age Polyethism in *Atta sexdens* (Linnaeus)(Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 67(4), 508-513.
- Lacerda, F. G., Della Lucia, T. M., DeSouza, O., de Souza, L. M., & de Souza, D. J. (2013). Task performance of midden workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 26, 873-880.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Pereira, O.L., Peternelli, L.A., Tótola, M.R. (2010). Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact

- with colony waste from different plant sources. *Bulletin of Entomological Research*, 100, 99–103.
- Laughlin, S.B. (2001) Energy as a constraint on the coding and processing of sensory information. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 475–480.
- Mobbs, P. G. (1982). The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 298(1091), 309-354.
- Montgomery, S. H., Mundy, N. I., Barton, R. A. (2016). Brain evolution and development: Adaptation, allometry and constraint. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20160433.
- Muratore, I.B., Mullen, S.P., Traniello, J.F.A. (2023a). Transcriptomic analysis of mosaic brain differentiation underlying complex division of labor in a social insect. *Journal of Comparative Neurology*, 531(8), 853-865.
- Muratore, I.B., Iliş, I., Huzar, A.K., Zaidi, F.H., Traniello, J.F.A. (2023b). Morphological evolution and the behavioral organization of agricultural division of labor in the leafcutter ant *Atta cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 77(6), 70.
- Muratore, I. B., Fandozzi, E. M., Traniello, J. F. A. (2022). Behavioral performance and division of labor influence brain mosaicism in the leafcutter ant *Atta cephalotes*. *Journal of Comparative Physiology A*, 208(2), 325-344.
- Muratore, I.B., Traniello, J.F.A. (2020). Fungus-growing ants: models for the integrative analysis of cognition and brain evolution. *Frontiers in Behavior Neuroscience*, 14, 599234.
- Mysore, K., Subramanian, K. A., Sarasij, R. C., Suresh, A., Shyamala, B. V., VijayRaghavan, K., Rodrigues, V. (2009). Caste and sex specific olfactory glomerular organization and

- brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Structure & development*, 38(6), 485-497.
- Mysore, K., Shyamala, B. V., Rodrigues, V. (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Structure & Development*, 39(5), 310-321.
- Muscudere, M.L., Traniello, J.F.A. (2012). Division of labor in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* is associated with distinct subcaste- and age-related patterns of worker brain organization. *PLoS One*, 7(2), e31618.
- Navarrete, A., van Schaik, C.P., Isler, K. (2011) Energetics and the evolution of human brain size. *Nature*, 480, 91–93.
- Niven, J.E., Laughlin, S.B. (2008) Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1792–1804.
- O'Donnell, S., Bulova, S. J., DeLeon, S., Khodak, P., Miller, S., & Sulger, E. (2015). Distributed cognition and social brains: reductions in mushroom body investment accompanied the origins of sociality in wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Proceedings of the Royal Society B*, 282(1810), 20150791.
- Paoli, M., Galizia, G.C. (2021). Olfactory coding in honeybees. *Cell and Tissue Research*, 383,35–58.
- Penick, C. A., Ghaninia, M., Haight, K. L., Opachaloemphan, C., Yan, H., Reinberg, D., & Liebig, J. (2021). Reversible plasticity in brain size, behaviour and physiology characterizes caste transitions in a socially flexible ant (*Harpegnathos saltator*). *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1948), 20210141.
- Pfeiffer, K. (2023). The neuronal building blocks of the navigational toolkit in the central complex of insects. *Current Opinion in Insect Science*, 55, 100972.

- Reader, S.M., Laland, K.N. (2002). Social intelligence, innovation, and enhanced brain size in primates. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99, 4436–4441.
- Rensch B (1948): Histological change with evolutionary changes of body size. *Evolution* 2:218–230.
- Riveros, A.J., Seid, M.A., Wcislo, W.T. (2012). Evolution of brain size in classbased societies of fungus-growing ants (Attini). *Animal Behaviour*, 83, 1043–1049.
- Rybak, J., Kuss, A., Lamecker, H., Zachow, S., Hege, H., Lienhard, M., Singer, J., Neubert, K., Menzel, R. (2010). The digital bee brain: integrating and managing neurons in a common 3D reference system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4, 30.
- Rybak, J. (2012). The Digital Honey Bee Brain Atlas. In: Galizia, C.& Eisenhardt, D., Giurfa, M. (eds) *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, Dordrecht. pp. 125-140.
- Scholtz, G., Edgecombe, G.D. (2006). The evolution of arthropod heads: reconciling morphological, developmental and palaeontological evidence. *Development, Genes and Evolution*, 216, 395-415.
- Schröter, U., Menzel, R. (2003). A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. *Journal of Comparative Neurology*, 465(2), 168-178.
- Segre, P.S., Taylor, E.D. (2019) Large ants do not carry their fair share: maximal load-carrying performance of leaf-cutter ants (*Atta cephalotes*). *Journal of Experimental Biology*, 222(12), jeb199240.
- Smaers, J.B., Soligo, C. (2013) Brain reorganization, not relative brain size, primarily characterizes anthropoid brain evolution. *Proceedings of Biological Science*, 280, 20130269.

- Sol, D., Bacher, S., Reader, S.M., Lefebvre, L. (2008). Brain size predicts the success of mammal species introduced into novel environments. *American Naturalists*, 172, S63–S71.
- Strauss, R. (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 633-638.
- Strausfeld, N.J. (2009). Brain and Optic Lobes. In: Resh, V.H. & Cardé, R.T. (eds) *Encyclopedia of Insects*. San Diego, Academic Press, pp. 121-130.
- Striedter, G. F. (2005). *Principles of Brain Evolution*. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, Sunderland.
- Sulger, E., Mcaloon, N., Bulova, S.J., Sapp, J., O'Donnell, S. (2014). Evidence for adaptive brain tissue reduction in obligate social parasites (*Polyergus mexicanus*) relative to their hosts (*Formica fusca*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 415–422.
- Team, R.C. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing <<https://www.R-project.org/>>. (Accessed on June 10, 2016).
- Traniello, J.F.A., Linksvayer, T.A., Coto, Z.N. (2022). Social complexity and brain evolution: Insights from ant neuroarchitecture and genomics. *Current Opinion in Insect Science*, 53, 100962
- Wang, X., Zhai, Y., Zheng, H (2023). Deciphering the cellular heterogeneity of the insect brain with single-cell RNA sequencing. *Insect Science*, 31(2), 314-327.
- Wilson, E.O. (1980). Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 7, 143–156.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

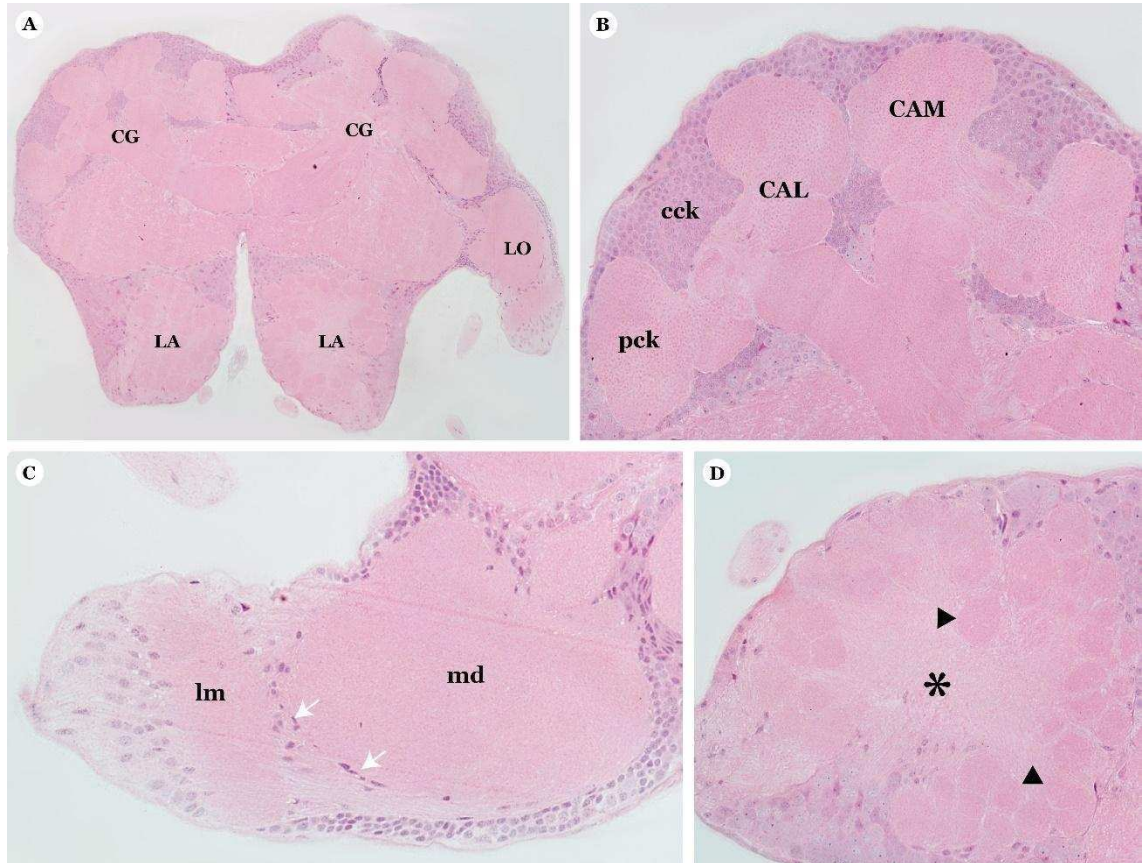


Figura S1: Seções histológicas do cérebro da subcasta forrageira de *Atta sexdens*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do corpo cogumelar (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do corpo cogumelar, com destaque nos prolongamentos (pck) e corpos celulares (cck) das células de Kenyon. C) Lobo óptico, com destaque nas suas sub-regiões- medula (md), lâmina (lm) e as células da glia (setas brancas). D) Lobo antenal evidenciando os glomérulos (ponta de seta) diâmetros variados na periferia e região central com emaranhado de neurópilas. Cálice medial (CAM) e lateral (CAL).

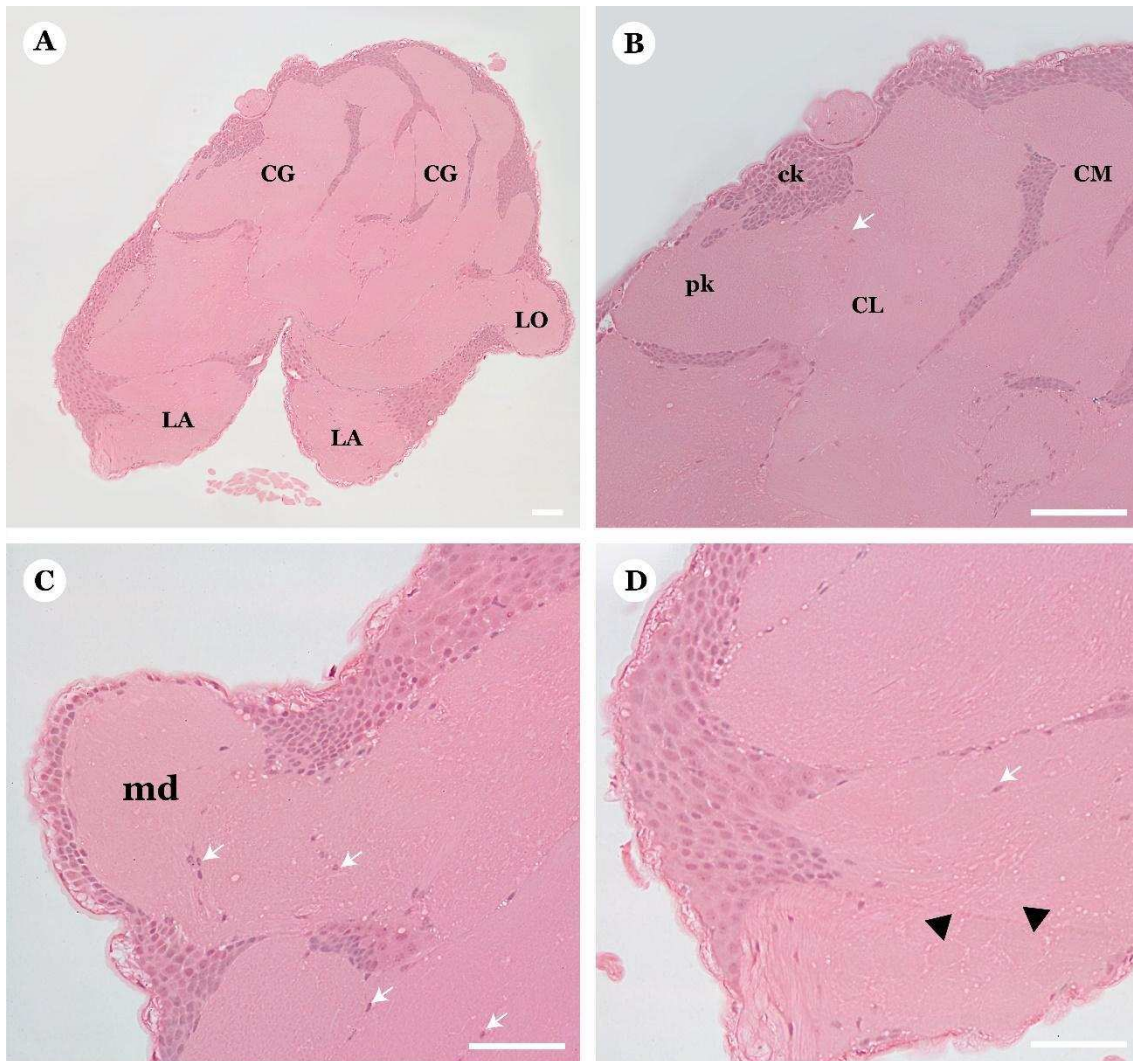


Figura S2: Seções histológicas do cérebro da subcasta lixeira de *Atta sexdens*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do corpo cogumelar, com destaque nos prolongamentos (pk) e corpos celulares (ck) das células de Kenyon. C) Lobo óptico, com destaque na medula (md). D) Lobo antenal, evidenciando os glomérulos esféricos (ponta de seta) de diâmetros variados tanto na periferia quanto na região central. As setas brancas indicam as células da glia. Cálice medial (CM) e lateral (CL)

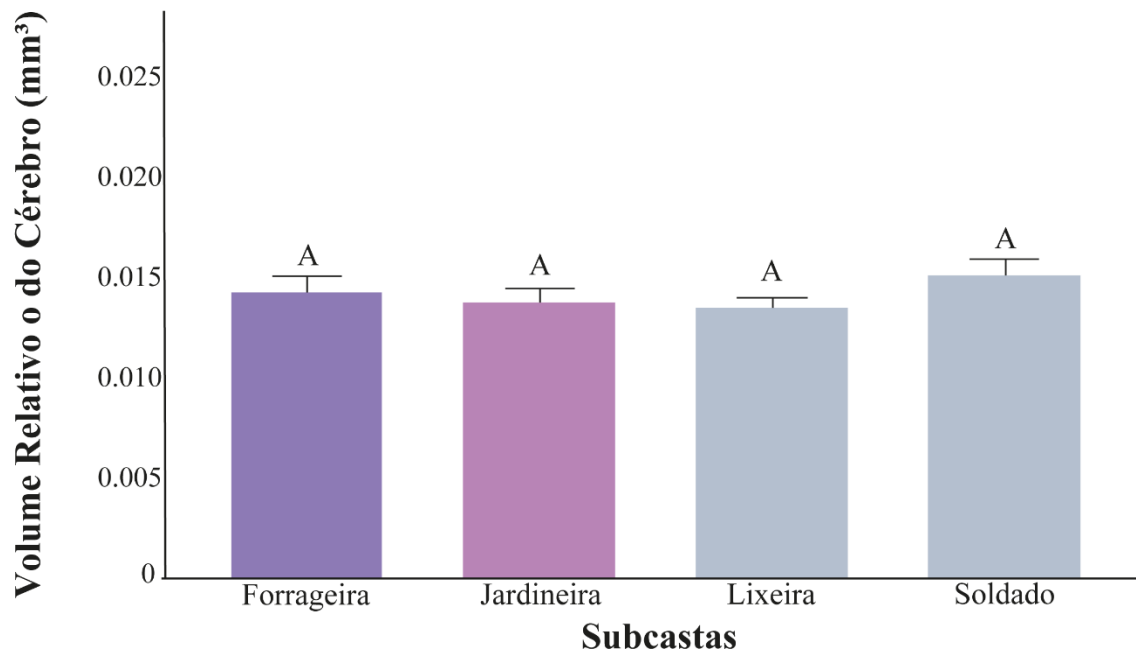


Figura S3: Volume relativo do cérebro (média  $\pm$  dp) de operárias das subcastas forrageira, jardineira, lixeira e soldado de *Atta sexdens*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

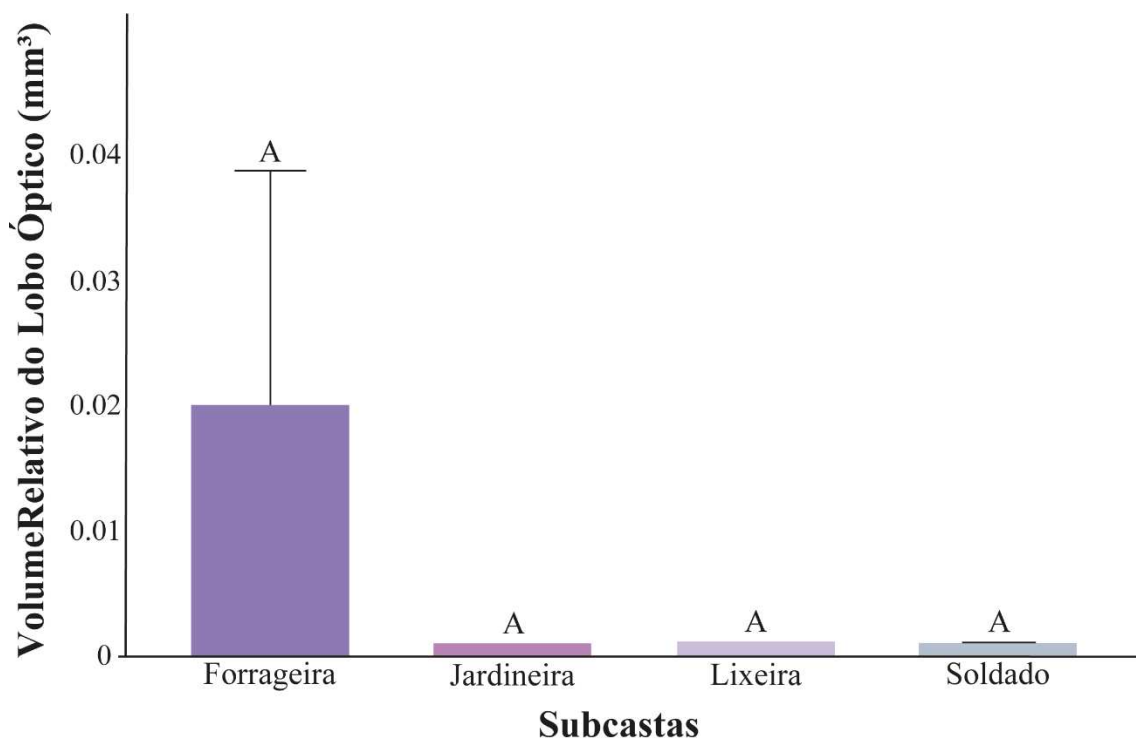


Figura S4: Volume relativo do lobo óptico (média  $\pm$  dp) de operárias das subcastas forrageira, jardineira, lixeira e soldado de *Atta sexdens*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

## CAPÍTULO II: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DA FORMIGA CARPINTEIRA (*Camponotus rufipes*): CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

### RESUMO

O volume cerebral das formigas operárias pode variar em resposta a desafios ecológicos. *Camponotus rufipes* é poligínica facultativa e apresenta castas polimórficas, na qual a operária é composta por duas subcastas, operária maior e operária menor. Este estudo avaliou os volumes cerebrais absolutos e relativos do lobo antenal, lobo óptico e cálice do *corpus pedunculatum* nas subcastas de *Camponotus rufipes*, bem como a intensidade das sinapses nas neurópilas. A hipótese foi que as operárias envolvidas em diferentes tarefas exibiam variações no volume das regiões cerebrais. Os cálices do *corpus pedunculatum* de ambas as subcastas possuem um aspecto microglomerular com algumas células da glia entremeadas à região de neurópila. O lobo óptico de ambas as subcastas são similares. Por outro lado, o lobo antenal das operárias menores são compostos por glomérulos circulares com volume menor e pouca variação do tamanho, enquanto o das operárias maiores apresentam forma irregular, maior volume e maior variação no tamanho. O volume do cérebro de *C. rufipes* foi mais desenvolvido em operárias maiores do que em operárias menores, assim como o volume do lobo antenal. No entanto, não foram observadas diferenças no volume do lobo óptico e do cálice do *corpus pedunculatum*. O volume relativo do cérebro, do lobo óptico, do corpo cogumelar e do lobo antenal foi similar entre as operárias menores e maiores de *C. rufipes*. O maior volume do cérebro da operária maior pode refletir numa maior capacidade de processamento neural. O lobo antenal maior em operárias maiores pode ser devido à quantidade de glomérulos presentes. Nenhuma das neurópilas analisadas foi proporcionalmente maior entre as subcastas de *C. rufipes*, sugerindo que o baixo investimento em volumes proporcionais das estruturas cerebrais em órgãos maiores, pode ser uma forma de evitar o gasto excessivo de energia. Os resultados indicam que manter um perfil cerebral similar pode estar associado a divisão de trabalho flexível, possibilitando que ambas as subcastas sejam capazes de processar uma variedade de demandas sensoriais e cognitivas, independentemente do tamanho corporal.

**Palavras-chave:** lobo antenal; cérebro; formiga carpinteira

## 1. INTRODUÇÃO

A compreensão dos princípios funcionais e da evolução do sistema nervoso animal podem ser acessados com dados de alometria e das dimensões cerebrais, pois eles revelam os padrões gerais e os específicos para cada grupo de animais (Striedter, 2005; Montgomery *et al.*, 2016).

As formigas são organismos modelos para estudar as relações entre comportamento, tamanho do corpo e neuroanatomia, pois o volume do cérebro de operárias de formigas pode variar conforme os desafios ecológicos e se refletir em diferenças na percepção sensorial, processamento de ordem superior e /ou demandas motoras, necessárias para o desenvolvimento de tarefas na colônia (Sulger *et al.*, 2014; Bulova *et al.*, 2016; Kamhi *et al.*, 2016).

Dentre as formigas, os Formicinae tem cerca de 3000 espécies descritas (Ward, 2014), sendo o gênero *Camponotus* um dos mais ricos em espécies, encontradas em uma variedade de habitats e microhabitats (Bolton, 1995a), com considerável variação intraespecífica, principalmente no tamanho da cabeça (Kim & Kim, 2006). As formigas do gênero *Camponotus* são consideradas oportunistas e generalistas em relação aos seus hábitos de nidificação e recursos alimentares (Silvestre *et al.*, 2003; Blüthgen & Feldhaar, 2010), com variedade de estratégias em relação à organização da colônia (Ronque *et al.*, 2018) e ao hábito de forrageio, nas quais algumas espécies possuem hábito diurno e outras noturnos, e a maioria tem dieta generalista (Bolton, 1973), alimentando-se principalmente de exsudatos de plantas e insetos (Oliveira & Brandão, 1991; Del-Claro & Oliveira, 1999 ; Pfeiffer & Lisenmair, 2000 ; Santos & Del-Claro, 2009).

Dentre as espécies do gênero, *Camponotus rufipes* (Smith) é poligínica facultativa (Ronque et al., 2016) e apresenta castas polimórficas, na qual a operária é composta por duas subcastas, operária maior e operária menor (Diniz-Filho et al., 1994). As operárias maiores quase sempre patrulham o ninho e as menores geralmente cuidam da manutenção do mesmo, que envolve cuidado da cria e limpeza (Ronque et al., 2016; 2018). Elas possuem hábitos predominantemente noturnos (Ronque et al., 2018), e tem dieta generalista, se alimentando de exsudatos de plantas e insetos e nidificam em troncos mortos, bem como no solo (Ronque et al., 2016).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o volume absoluto e relativo do cérebro e das neurópilas envolvidas no processamento primário de informações olfativas (lobo antenal) e visuais (lobo óptico), e no processamento secundário de ambos, servindo como centros de integração de vários estímulos, incluindo aqueles relacionados ao aprendizado e à memória (cálice do *corpus pedunculatum*) das subcastas da formiga *C. rufipes* e verificar se operárias envolvidas em diferentes tarefas apresentam variações no volume destas regiões, bem como quantificar a densidade das sinapses nas diferentes subcastas. Para isso foram avaliadas as seguintes hipóteses: (i) operárias com cápsulas cefálicas maiores têm cérebros proporcionalmente maiores, indicando uma relação entre o tamanho da cápsula cefálica e o volume cerebral absoluto; (ii) operárias maiores investem mais na neurópila de processamento olfativo que as menores, devido à gama de sinais olfativos aos quais estão expostas; (iii) operárias que realizam múltiplas tarefas têm um tamanho relativo maior do *corpus pedunculatum* do que operárias que realizam tarefas específicas; (iv) operárias envolvidas em múltiplas tarefas apresentam mais sinapses do que aquelas que realizam tarefas específicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos insetos**

As operárias de *C. rufipes* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Viçosa no Estado de Minas Gerais (20° 45'S 42° 52'O), e a princípio separadas em dois grupos com base no tamanho da cápsula cefálica. Logo após a coleta, as formigas foram crioanestesiadas a 4 °C por 5 minutos, e a distância interocular (largura da cabeça entre as margens internas dos olhos compostos, utilizada como tamanho da cápsula cefálica; Bulova et al. 2016) de oito espécimes de cada subcasta foi medida, utilizando esteromicroscópio STEMI 2000-C Zeiss com ocular calibrada. Posteriormente, os cérebros foram dissecados em solução NaCl 125 mM e transferidos para fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,15 M, pH 7,2 por 24 h.

### **2.2 Histologia**

Os cérebros de operárias maior e menor de *C. rufipes* foram desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 15 minutos de intervalo cada e incluídos em historesina (Leica Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Seções histológicas com 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM2545 e corados com hematoxilina (20 min) e eosina (30 s). Posteriormente, as amostras foram montadas com lamínulas e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 e fotografadas usando câmera Olympus QColor 3. A área dos cérebros e das neurópilas do lobo óptico, lobo antenal e cálice do *corpus pedunculatum* foram medidas com o auxílio do software ImageJ.

### **2.3 Análise volumétrica**

As medidas de área obtidas no ImageJ foram usadas para determinar o volume absoluto do cérebro e dos neurópilos, de acordo com o método de Cavalieri (Coggeshall, 1992), no qual foram selecionadas dez secções aleatórias de cada uma das oito amostras de operárias

menores e maiores. A área média do cérebro e de cada neurópila foram usadas para o cálculo dos respectivos volumes com a fórmula  $V = \bar{a} \times t \times s$ , onde  $V$  é o volume,  $\bar{a}$  a área média,  $t$  o número total de secções histológicas e  $s$  a espessura das secções histológicas. Dada a sua simetria bilateral, as medidas da área das neurópilas foram obtidas de um hemisfério por cérebro. Para o cálculo do volume relativo do cérebro e das neurópilas do lobo óptico, do lobo antenal e do cálice do corpo cogumelar, o volume absoluto de cada região foi dividido pelo tamanho da cápsula cefálica (distância interocular).

## 2.4 Sinapses

Três cabeças de cada subcasta de *C. rufipes* foram transferidas para solução de Zamboni por 1 hora, e os cérebros dissecados e transferidos para tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7,4 (PBS). As amostras foram lavadas com PBS, por três vezes pelo período de 15 minutos, e posteriormente incubados em albumina sérica bovina em PBS contendo Triton-X 100 a 1%. Após 1 hora, foram lavados em PBS e incubados por quatro dias em anticorpo anti-sinapsina (3C11-SYNORF1, DHSB) 1:100 em PBS em temperatura ambiente. Então, as amostras foram lavadas em PBS, por três vezes, durante 15 minutos e incubadas em anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma-Aldrich) 1:250 em PBS por 3 dias, no escuro, em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as amostras foram transferidas para 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1:500 em PBS por 30 minutos para coloração dos núcleos celulares. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, etanol: xilol 1:1 por 10 minutos cada, e em xilol por 1 hora em temperatura ambiente. Logo após, os cérebros foram montados *in toto* com sacarose 50%, com o lado ventral voltado para cima e se examinados ao microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 900 Axio Observer 7. A quantificação das sinapses foram realizadas

imagens tridimensionais obtidas em z-stacking com  $x \mu\text{m}$  de espessura a partir da intensidade de fluorescência.

### **2.5 Análises estatísticas**

Os volumes do cérebro e das neurópilas do lobo antenal, do lobo óptico e do cálice do corpo cogumelar das subcastas de operárias de *C. rufipes*, bem como o tamanho da cápsula cefálica, foram comparados usando Modelo Linear Simples. A intensidade das sinapses entre operárias de *C. rufipes* foram comparadas usando o teste de Kruskal- Wallis. Todas as análises foram realizadas no programa de computador R (R Core Team, 2020).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Tamanho da cápsula cefálica**

As medidas da cápsula cefálica das operárias de *C. rufipes* permitiram a separação de duas subcastas ( $F= 0,3335$ ; IC 95%;  $p<0,05$ ): operária maior, com  $4,85 \pm 0,038$  mm, e operária menor, com distância interocular média de  $2,75 \pm 0,032$  mm.

### **3.2 Histologia**

O cérebro das operárias maiores e menores de *C. rufipes* são semelhantes, com morfologia bilobada e constituído por três regiões: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. Cada região é formada por emaranhados de neurópilos na região central, que abrigam os prolongamentos dos neurônios (axônios e dendritos), enquanto a região periférica é constituída pelos corpos celulares destas células (Fig. 1, 2A).

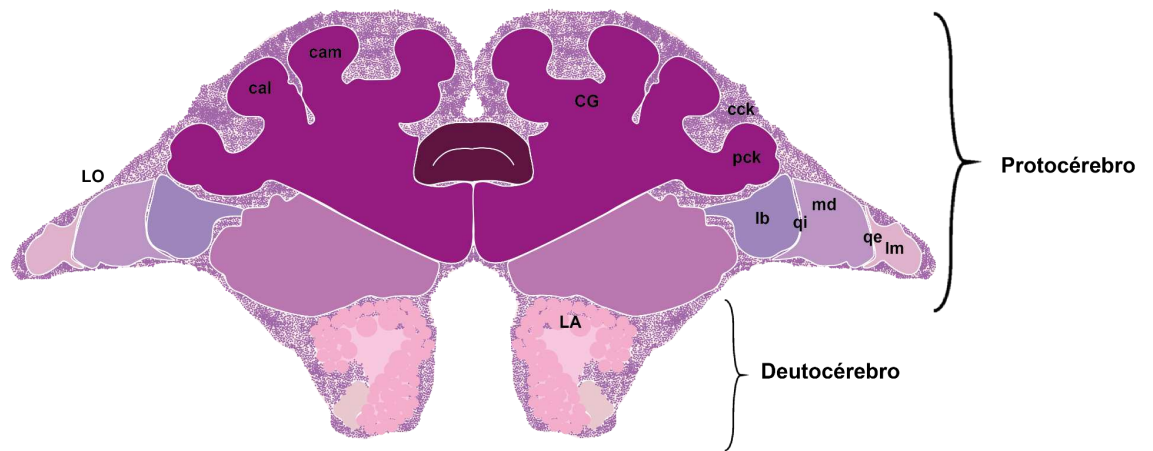


Figura 1: Estrutura geral do cérebro de operárias de *Camponotus rufipes*, mostrando o protocérebro com os *corpora pedunculata* (CG) apresentando os cálices medial (cm) e lateral (cl) e os prolongamentos das células de Kenyon (pck) e seus corpos celulares localizados na periferia (cck). Lobo óptico (LO) com as sub-regiões- lâmina (lm), medula (md) e lóbula (lb) com quiasmas interno (qi) e externo (qe). No deutocérebro, os lobos antenais (LA) apresentaram glomérulos esféricos de diâmetros variados.

No protocérebro, encontram-se os *corpora pedunculata* e os lobos ópticos. O *corpus pedunculatum* é composto pelos cálices medial e lateral e pelos pedúnculos. Os cálices resultam do agrupamento dos dendritos das células de Kenyon, enquanto a região periférica é circundada pelos corpos celulares dessas células (Fig. 2B e 3B). Os cálices do *corpus pedunculatum* de ambas as subcastas possuem um aspecto microglomerular com algumas células da glia entremeadas à região de neurópila (Fig. 2B e 43). O lobo óptico é estruturado em três regiões de neurópilas sucessivas: lamina, medula e lobula, entre as quais ocorrem os quiasmas, regiões de cruzamento de axônios entre duas massas de neurópila (Fig. 2C e 3C). O lobo óptico de ambas as subcastas são similares, com a região da medula exibindo uma forma circular e um volume aparentemente maior em relação às demais áreas. Tanto no cálice quanto no lobo óptico células da glia são encontradas em pouca quantidade (Fig. 2B, 2C, 3B e 3C).

No deutocérebro, localiza-se o lobo antenal, uma estrutura composta por unidades funcionais denominadas glomérulos com tamanhos variados e se encontram dispersos na região periférica do lobo antenal (Fig. 1, 2A). O lobo antenal das operárias menores são compostos por glomérulos circulares com volume aparentemente menor e pouca variação do tamanho (Fig. 3D), enquanto o das operárias maiores apresentam forma irregular, maior volume e maior variação no tamanho (Fig. 2D). As células da glia são encontradas em pouca quantidade em ambas as subcastas (Fig. 2B e 3D)

O tritocérebro está localizado na base do cérebro e é extremamente reduzido em Hymenoptera.

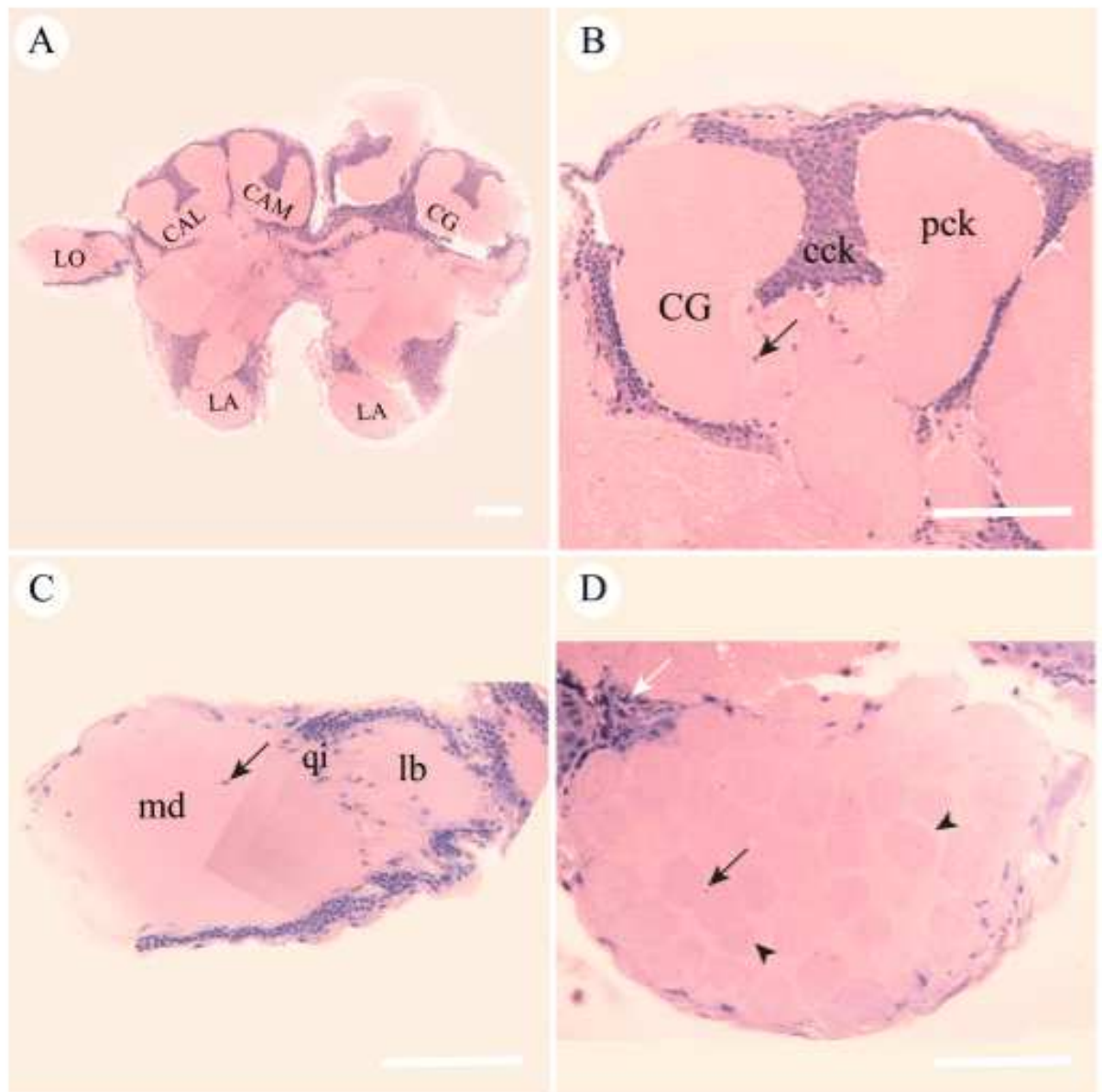


Figura 2: Micrografias de luz do cérebro da subcasta operária maior de *Camponotus rufipes*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do corpo cogumelar, com destaque nos prolongamentos (pck) e corpos celulares (cck) das células de Kenyon. C) Lobo óptico, com destaque nas suas sub-regiões- medula (md), lobula (lb) e a região de quiasma (qi). D) Lobo antenal evidenciando os glomérulos (ponta de seta) de diâmetros e formas variadas. A seta branca evidencia os corpos celulares. Cálice medial (CAM), lateral (CAL), células da glia (seta preta). Barras de escala: 30  $\mu$ m.

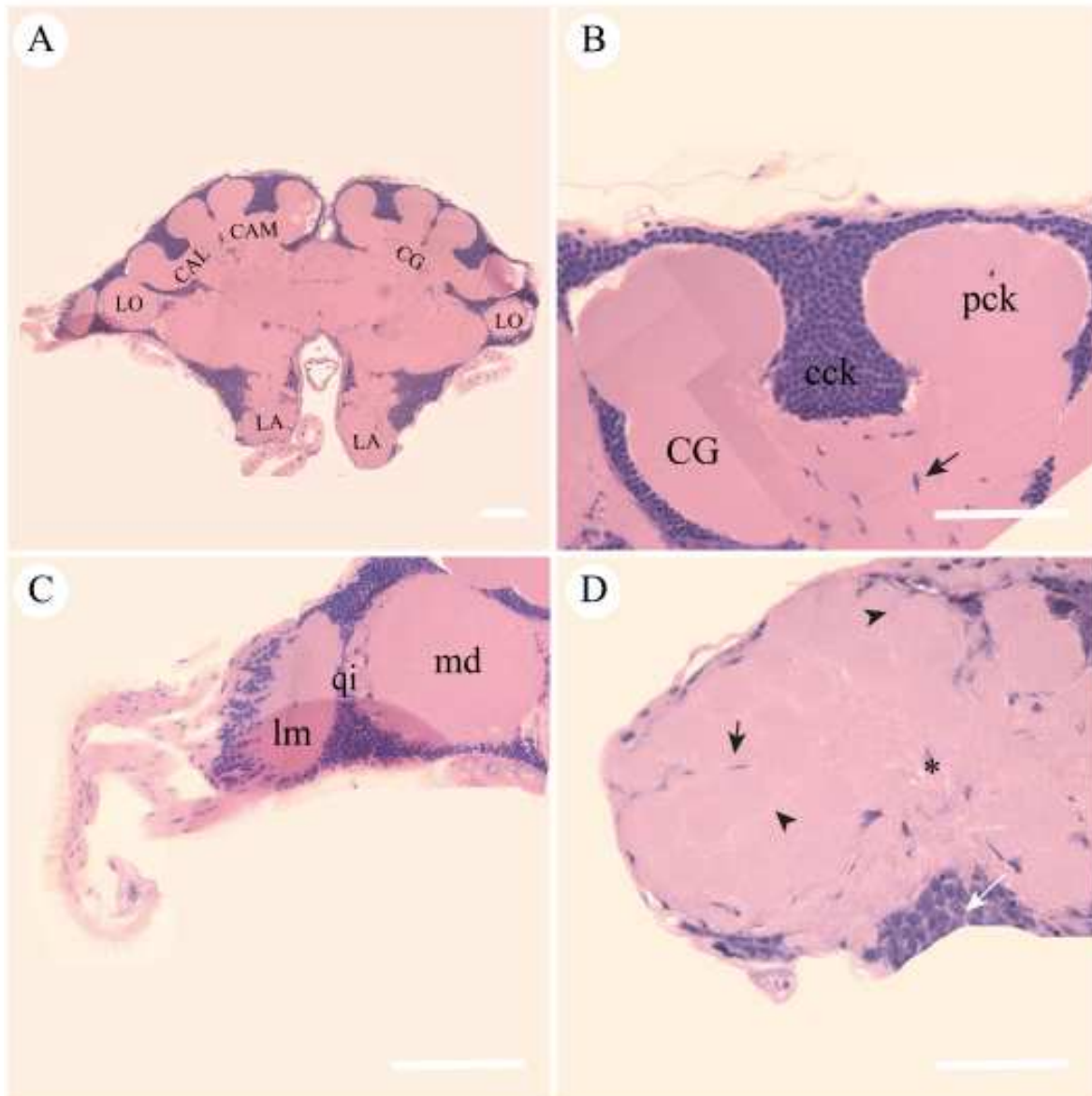


Figura 3: Micrografias de luz do cérebro da subcasta operária menor de *Camponotus rufipes*. A) Cérebro completo, evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). B) Cálice do corpo cogumelar, com destaque nos prolongamentos (pck) e corpos celulares (cck) das células de Kenyon. C) Lobo óptico, com destaque nas suas sub-regiões- medula (md) e lâmina (lm). D) Lobo antenal evidenciando os glomérulos (ponta de seta) de diâmetro e formas semelhantes e a região central com emaranhado de neurópilas (asterisco). A seta branca evidencia os corpos celulares. Cálice medial (CAM), lateral (CAL) e células da glia (seta preta). Barras de escala: 30  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Análise volumétrica

O volume do cérebro de *C. rufipes* foi mais desenvolvido em operárias maiores do que em operárias menores ( $p < 0,05$ ; IC=95%; Fig. 4A), assim como o volume do lobo antenal ( $p < 0,05$ ; IC=95%; Fig. 4B). No entanto, não foram observadas diferenças no volume do lobo óptico e do cálice do *corpus pedunculatum* ( $p > 0,05$ ).

O volume relativo do cérebro ( $F=0.3335$ ;  $p > 0,05$ ; IC=95%), do lobo óptico ( $F=0.1596$ ;  $p > 0,05$ ; IC=95%), do corpo cogumelar ( $F= 3.495$ ;  $p > 0,05$ ; IC=95%) e do lobo antenal ( $F=4.628$ ;  $p > 0,05$ ; IC=95%) foi similar entre as operárias menores e maiores de *C. rufipes* (Tabela 1).

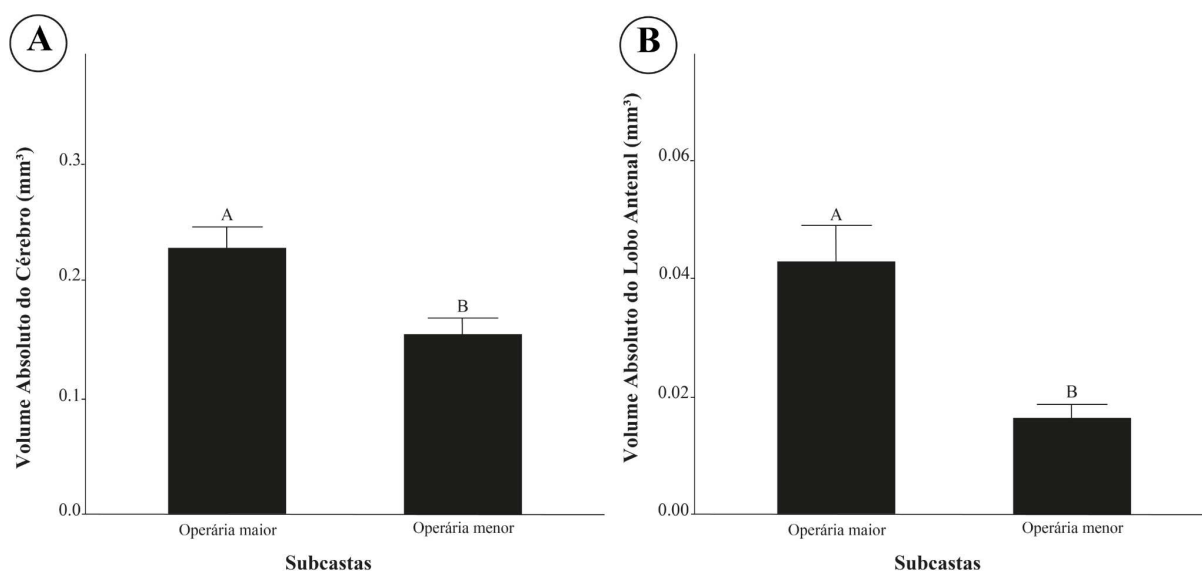


Figura 4: A) Volume absoluto do cérebro (média  $\pm$  dp) e volume absoluto do lobo antenal (média  $\pm$  dp) (B) de operária maior e menor de *Camponotus rufipes*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo Modelo Linear Simples ( $p > 0,05$ ).

### 3.4 Sinapses

As análises de imunofluorescência indicam que não houve diferença na intensidade das sinapses entre operárias de *C. rufipes* ( $\mathcal{Q}^2 = 2.3333$ ; gl = 1;  $p > 0,05$ ; Fig. 5).

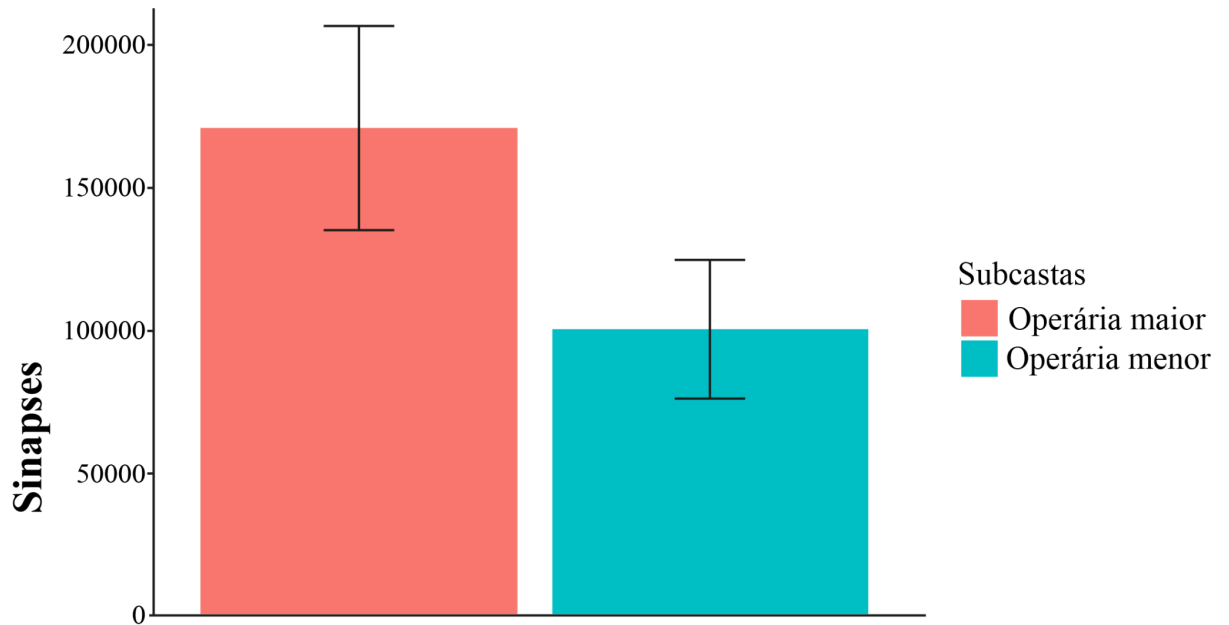


Figura 5: Quantificação das sinapses, através da marcação da proteína sinapsina com o anticorpo 3C11-SYNORF1 no cérebro de operária maior e menor de *Camponotus rufipes* ( $p > 0,05$ -teste de Kruskal-Wallis).

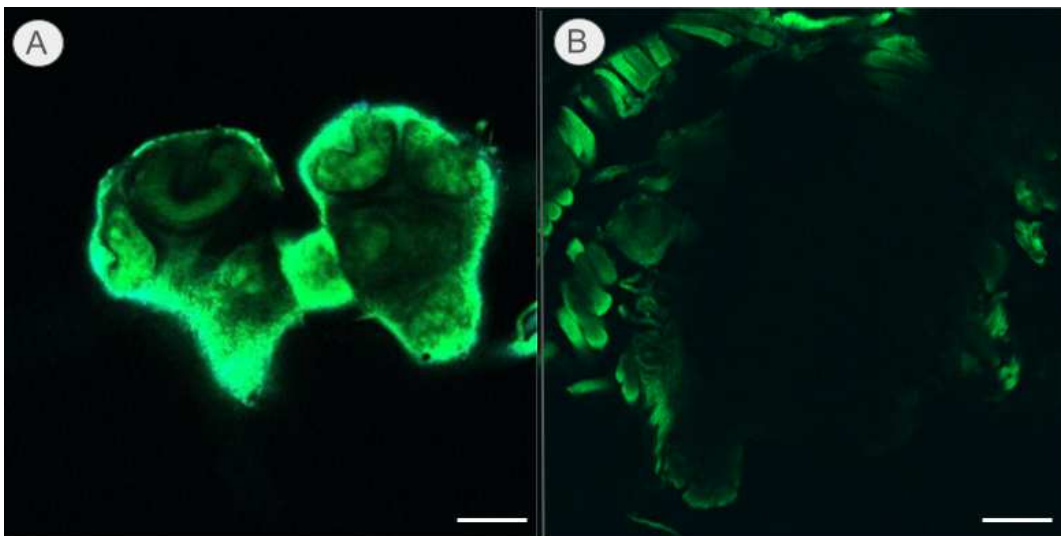


Figura 6: Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser evidenciando a quantidade das sinapses, a partir da intensidade de fluorescência, dos cérebros de operárias de *C. rufipes*. A) operária maior e B) operária menor. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a influência do tamanho da cápsula cefálica no tamanho do cérebro de operárias de *C. rufipes*, além de analisar como o volume absoluto e o volume relativo do cérebro e das neurópilas do cálice do *corpus pedunculatum*, lobo óptico e lobo antenal estão associados com as tarefas desempenhadas, refletindo em um investimento neural diferenciado entre as subcastas.

As medidas da cápsula cefálica confirmam que a casta operária de *C. rufipes* é constituída por duas subcastas, operária maior e operária menor, corroborando com a divisão de subcastas proposta por Diniz- Filho et al., (1994). Os resultados revelam que o volume absoluto do cérebro de operárias maiores é maior que o de operárias menores, indicando que em *C. rufipes* uma cápsula cefálica maior está associada a um maior volume cerebral. Esse aumento pode refletir numa maior capacidade de processamento neural, possivelmente relacionada à realização de tarefas mais complexas, como o forrageio realizado por essa subcasta.

O volume absoluto do cálice do *corpus pedunculatum* não varia entre operária maior e menor de *C. rufipes*, suportando a hipótese de Gronenberg & Holldobler (1999), que mudanças intraespecíficas no volume do cálice do *corpus pedunculatum*, se ocorrer, são mínimas. A atividade de forrageio parece contribuir para o crescimento do *corpus pedunculatum*, pois mudanças no volume desta neurópila na formiga *Camponotus floridanus* (Gronenberg et al., 1996) e na abelha *Apis mellifera* (Farris et al., 2001), ocorrem quando as operárias começam a deixar o ninho para forrageio, mas para operárias de *C. rufipes*, aqui analisadas isso não ocorre, indicando uma possível variação entre espécies.

O volume absoluto do lobo óptico entre as duas subcastas é semelhante, sugerindo que ambas investem de forma parecida na neurópila de processamento visual primário. Esse dado indica que as operárias das duas subcastas podem estar expostas a níveis semelhantes de

intensidade luminosa. Durante a coleta, observamos que ambas as subcastas estavam em atividade de forrageio fora do ninho, corroborando a hipótese de exposição a níveis semelhantes de luz.

Embora o volume absoluto do cérebro seja maior em operárias maiores de *C. rufipes*, as neurópilas do lobo óptico e do cálice do *corpus pedunculatum* não apresentaram diferenças entre as subcastas, indicando que aumento no volume absoluto do cérebro não está associado com diferenças no desenvolvimento das suas neurópilas.

As operárias maiores de *C. rufipes* possuem o lobo antenal maior do que as operárias menores. A análise histológica revela que os glomérulos de operárias maiores possuem volume aparentemente maior, o que pode estar contribuindo para um maior volume do lobo antenal nesta subcasta. Além disso, outro fato que pode estar relacionado com o aumento do volume do lobo antenal em operárias maiores é a quantidade de glomérulos presentes. Segundo Mysore *et al.*, 2009 e Kelber *et al.*, 2010, o número de glomérulos pode variar entre castas morfológicas em formigas, o que sugere que a regulação da expressão do receptor olfativo pode estar ligado ao tamanho do corpo em algumas espécies. Este fato foi relatado em *Camponotus compressa*, *Atta wollenweideri* (Mysore *et al.*, 2009, 2010), *Dorymyrmex spp.* (Godfrey *et al.*, 2021) e *Oecophylla smaragdina* (Babu *et al.*, 2021). Essa diferença no volume da neurópila do lobo antenal em operárias de *C. rufipes* pode impactar na recepção e percepção sensorial, resultando em uma maior sensibilidade olfativa nas operárias maiores, sugerindo que estas podem estar envolvidas em uma ampla gama de tarefas.

Os dados de morfometria demonstram que não há diferença entre os volumes relativos do cérebro e das neurópilas analisadas nas duas subcastas de *C. rufipes*. Embora a subcasta operária maior apresente volume absoluto do cérebro maior, nenhuma das neurópilas aqui analisadas foi proporcionalmente maior. Isso sugere que manter uma proporção semelhante no volume relativo de áreas cerebrais pode garantir funcionalidade suficiente para as

necessidades de ambas as subcastas. O cérebro é um órgão metabolicamente caro (Padamsey & Rochefort, 2023) e o baixo investimento em volumes proporcionais das estruturas cerebrais em órgãos maiores, pode ser uma forma de evitar o gasto excessivo de energia.

A imunomarcção da intensidade das sinapses mostrou que não há diferença entre as duas subcastas de *C. rufipes*, sugerindo uma possível similaridade entre a densidade sináptica, o que, pode influenciar a capacidade de processamento de informações. Este dado ratifica o observado na análise volumétrica, que também revelou similaridade entre o volume das neurópilas das subcastas. O anticorpo anti-sinapsina é um marcador eficaz para sinapses, visto que a sinapsina é uma fosfoproteína que se associa à superfície citoplasmática de vesículas sinápticas que estão envolvidas na regulação de curto prazo da liberação de neurotransmissores (Benfenati et al., 1993), sendo particularmente abundante em regiões de alta densidade sináptica (Klagges et al., 1996; Ott, 2008).

Groh et al. (2014) observaram que o maior número de complexos sinápticos (microglomérulos) no cálice do *corpus pedunculatum*, de operárias maiores (soldados) de *Atta vollenweideri*. Essa diferença poderia estar relacionada ao fato de que, na quantificação aqui realizada, a intensidade das sinapses foi avaliada em todo o cérebro e não em regiões específicas. Outro ponto observado por Groh et al. (2014) foi que o tamanho dos cérebros de operárias de *A. vollenweideri* não afeta a densidade de sinapses, mostrando que pode haver um limite para a miniaturização dos cérebros de operárias menores, provavelmente, o mesmo acontece com operárias de *C. rufipes*.

Os resultados indicam que em *C. rufipes* as subcastas mantenham um perfil cerebral similar, o que pode estar associado a divisão de trabalho flexível, possibilitando que ambas as subcastas sejam capazes de processar uma variedade de demandas sensoriais e cognitivas, independentemente do tamanho corporal. É provável que investimentos diferenciais na

neurópila do lobo antenal desempenhem um papel central na especialização e divisão do trabalho em castas nesta espécie.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babu, M.J., Patil, R.K. (2021). Antennal lobe organisation in ant, *Oecophylla smaragdina*: A Golgi study. *Journal of Bioscience*, 46, 110.
- Brandt, R., Rohlfing, T., Rybak, J., Krofczik, S., Maye, A., Westerhoff, M., Hege, H., Menzel, R. (2005). A three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1), 1-19.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Rossi, M. C., Onofri, F., Sihra, T., & Greengard, P. (1993). Interactions of synapsin I with phospholipids: possible role in synaptic vesicle clustering and in the maintenance of bilayer structures. *The Journal of Cell Biology*, 123(6), 1845-1855.
- Blüthgen, N., & Feldhaar, H. (2010). Food and shelter: how resources influence ant ecology. In: Lach L, Parr CL & Abbott KL (eds). *Ant ecology*. Oxford: Oxford University Press; pp. 115–136.
- Bolton, B. (1995). A taxonomic and zoogeographical census of the extant taxa (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History*, 29, 1039-1056.
- Bulova, S., Purce, K., Khodak, P., Sulger, E., O'Donnell, S. (2016). Into the black, and back: the ecology of brain investment in Neotropical army ants (Formicidae: Dorylinae). *Naturwissenschaften*, 103, 31.
- Coggeshall, R.E. (1992). A consideration of neural counting methods. *Trends Neuroscience*, 15:9-13.
- Das, B., & Gordon, D. M. (2023). Biological rhythms and task allocation in ant colonies. *Current Opinion in Insect Science*, 58, 101062.

- Del-Claro, K., & Oliveira, P.S. (1999). Ant-Homoptera interactions in a Neotropical Savanna: the honeydew producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica*, 31, 135–144.
- Diniz-Filho, J. A. F., Von Zuben, C. J., Fowler, H. G., Schlindwein, M. N., & Bueno, O. C. (1994). Multivariate morphometrics and allometry in a polymorphic ant. *Insectes Sociaux*, 41, 153-163.
- Farris, S. M., Van Dyke, J. W. (2015). Evolution and function of the insect mushroom bodies: Contributions from comparative and model systems studies. *Current Opinion in Insect Science*, 12, 19-25.
- Farris, S. M. (2013). Evolution of complex higher brain centers and behaviors: behavioral correlates of mushroom body elaboration in insects. *Brain, Behavior and Evolution*, 82(1), 9-18.
- Farris, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2001). Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *Journal of Neuroscience*, 21, 6395–6404.
- Freeman, M.R. (2012). Invertebrate glia. In *Neuroglia*, Kettenmann, H. & Ransom B.R. (eds), Oxford University Press, New York, pp. 18–27.
- Freeman, M. R. (2015). *Drosophila* central nervous system glia. *Perspectives in Biology*, 7(11), a020552.
- Godfrey, R. K., Oberski, J. T., Allmark, T., Givens, C., Hernandez-Rivera, J., & Gronenberg, W. (2021). Olfactory system morphology suggests colony size drives trait evolution in odorous ants (Formicidae: Dolichoderinae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 733023.

- Groh, C., Kelber, C., Grubel, K., Rössler, W. (2014). Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. *Proceedings of Royal Society B*, 281, 20140432.
- Gronenberg, W., & Hölldobler, B. (1999). Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *Journal of Comparative Neurology*, 412(2), 229-240.
- Gronenberg, W., Heeren, S., Hölldobler, B. (1996). Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Experimental Biology*, 199, 2011–2019.
- Ito, K., Shinomaya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81, 755-765.
- Klagges, B. R., Heimbeck, G., Godenschwege, T. A., Hofbauer, A., Pflugfelder, G. O., Reifegerste, R., ... & Buchner, E. (1996). Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 16(10), 3154-3165.
- Kamhi, J.F., Gronenberg, W., Robson, S.K.A., Traniello, J.F.A. (2016) Social complexity influences brain investment and neural operation costs in ants. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20161949.
- Kelber, C., Rössler, W., & Kleineidam, C. J. (2010). Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Developmental Neurobiology*, 70(4), 222-234.
- Kim, K.G., Kim, B.J. (2006) Molecular phylogeny of *Camponotus* ants in Korea. *Entomological Research* 36, 48-55.
- Kinoshita, M., Homberg, U. (2017). Insect Brains: Minute Structures Controlling Complex Behaviors. In: Shigeno, S., Murakami, Y., Nomura, T. (eds) *Brain Evolution by Design. Diversity and Commonality in Animals*. Springer, Tokyo. pp. 123-151.

- Kuwabara, T., Kohno, H., Hatakeyama, M., Kubo, T. (2023). Evolutionary dynamics of mushroom body Kenyon cell types in hymenopteran brains from multifunctional type to functionally specialized types. *Science Advances*, 9(18), 4201.
- Mysore, K., Subramanian, K. A., Sarasij, R. C., Suresh, A., Shyamala, B. V., VijayRaghavan, K., Rodrigues, V. (2009). Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Structure & Development*, 38(6), 485-497.
- Mysore, K., Shyamala, B. V., Rodrigues, V. (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Structure & Development*, 39(5), 310-321.
- Mobbs, P. G. (1982). The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, 298(1091), 309-354.
- Montgomery, S. H., Mundy, N. I., Barton, R. A. (2016). Brain evolution and development: Adaptation, allometry and constraint. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20160433.
- Oliveira, P.S., & Brandão, C.R.F. (1991). The ant community associated with extrafloral nectaries in the Brazilian Cerrados. In: Cutler D.F. & Huxley C.R. (eds). *Ant-plant interactions*. Oxford: Oxford University Press; pp. 198–212.
- Ott, S. R. (2008). Confocal microscopy in large insect brains: Zinc–formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 220-230.
- Padamsey, Z., & Rochefort, N. L. (2023). Paying the brain's energy bill. *Current Opinion in Neurobiology*, 78, 102668.

- Pfeiffer, M., & Lisenmair, K.E. (2000). Contributions to the life history of the Malaysian giant ant *Camponotus gigas* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 47,123–132.
- Ronque, M. U. V., Fourcassié, V., & Oliveira, P. S. (2018). Ecology and field biology of two dominant *Camponotus* ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Brazilian savannah. *Journal of Natural History*, 52(3–4), 237–252.
- Ronque, M.U.V., Azevedo-Silva, M., Mori, G.M., Souza, A.P., Oliveira, P.S. (2016). Three ways to distinguish species: using behavioural, ecological, and molecular data to tell apart two closely related ants, *Camponotus renggeri* and *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: formicidae). *Zoological Journal of Linnean Society*, 176, 170–181.
- Rybak, J. (2012). The Digital Honey Bee Brain Atlas. In: Galizia, C., Eisenhardt, D., Giurfa, M. (eds) *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, Dordrecht., pp. 125-140.
- Santos, J.C., & Del-Claro, K. (2009). Ecology and behaviour of the weaver ant *Camponotus (Myrmobrachys) senex*. *Journal of Natural History*, 43,1423–1435.
- Silvestre, R., Brandão, C.R.F., Da Silva, R.R. (2003). Gupo funcionales de hormigas: el caso de los grêmios del Cerrado. In: Fernández F. (ed). *Introducción a las hormigas de La región Neotropical*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; pp. 113–148
- Striedter, G. F. (2005). *Principles of Brain Evolution*. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, Sunderland.
- Sulger, E., Mcaloon, N., Bulova, S.J., Sapp, J., O'Donnell, S. (2014). Evidence for adaptive brain tissue reduction in obligate social parasites (*Polyergus mexicanus*) relative to their hosts (*Formica fusca*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 415–422.
- Team, R.C. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing <<https://www.R-project.org/>>. (Accessed on June 10, 2016).

- Wang, X., Zhai, Y., Zheng, H (2023). Deciphering the cellular heterogeneity of the insect brain with single-cell RNA sequencing. *Insect Science*, 31(2), 314-327.
- Ward, P.S. (2014). The phylogeny and evolution ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 23-43.

# CAPÍTULO III: MORFOLOGIA NEURAL EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS COM DIFERENTES ESTILOS DE VIDA: CONEXÕES ENTRE MORFOLOGIA CEREBRAL E ESPECIALIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

## RESUMO

O cérebro de insetos é um mosaico de compartimentos, cada um envolvido em funções distintas. As categorias de estilo de vida, diurno/noturno e social/solitário têm um efeito importante na função cerebral, determinando os recursos e informações de que os cérebros precisam e têm acesso para produzir comportamentos adaptativos. As formigas exibem espécies caracterizadas por padrões excepcionais de castas e subcastas, tornando-as valiosas para investigar as conexões entre estrutura cerebral e especialização comportamental, particularmente em relação à divisão do trabalho e complexidade social. *Camponotus rufipes* (Smith) é poligínica facultativa, apresenta castas dimórficas e possuem hábitos noturnos. *Paraponera clavata*, possui atividade de forrageio principalmente noturno, com ninhos situados na base de árvores, e forrageiam ativamente no sub-bosque e no dossel de árvores. *Atta sexdens*, possui operárias divididas em várias subcastas, forrageiam principalmente a noite e constroem ninhos subterrâneos. Assim, serão analisadas a morfologia das regiões cerebrais de operárias de *P. clavata*, *C. rufipes* e *A. sexdens*, levando em consideração o tamanho e conexões das neurópilas, associando estes dados aos hábitos de vida de cada espécie. Os volumes absolutos e relativos do cérebro, bem como de todas as neurópilas aqui analisadas, foram diferentes entre *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata*. O cérebro de *P. clavata* foi o maior, seguido por *C. rufipes* e *A. sexdens*. O mesmo foi observado em relação aos volumes absolutos e relativos de todas as neurópilas analisadas. Entretanto, o tamanho da cápsula cefálica entre *C. rufipes* e *A. sexdens* foi similar. Acreditamos que em *A. sexdens* a seleção natural ao nível de colônia reduz os desafios cognitivos enfrentados por operárias individuais que resulta num menor investimento em tecido cerebral. Quanto mais flexível a divisão de trabalho, maior é o cálice do *corpus pedunculatum*. Os dados do volume do lobo óptico ratificam que, quanto menor a exposição à luz, menor é o lobo óptico. O lobo antenal de *C. rufipes* ocupa cerca de 15% do cérebro, 8% em *P. clavata* e 6% em *A. sexdens*, confrontando que o lobo antenal é invariável entre os táxons de formigas. O tamanho relativo das regiões cerebrais pode estar relacionado à importância funcional de cada região no desempenho comportamental dos indivíduos e cada espécie investe de maneira distinta em seus compartimentos cerebrais, conforme as tarefas desempenhadas por suas operárias. Operárias de *P. clavata* tiveram os maiores valores, tanto em relação aos volumes absolutos quanto aos relativos, e provavelmente, é devido a sua maior cápsula cefálica, que possibilita ter um cérebro maior, mas um cérebro maior pode ter menor investimento em determinadas regiões. Os resultados indicam que a morfologia cerebral está associada à organização social e ecológica das espécies. Permitindo uma organização mais dinâmica e adaptável em espécies monomórficas e uma divisão de trabalho mais complexa em espécies polimórficas.

**Palavras-chave:** cérebro; especialização comportamental; formigas

## 1. INTRODUÇÃO

O cérebro de insetos é um mosaico de compartimentos, cada um envolvido em funções distintas, variando do processamento sensorial à integração de informações de ordem superior e coordenação de comportamento (Ito et al., 2014; Kinoshita e Homberg, 2017). A alometria e as dimensões cerebrais são essenciais para entender os princípios funcionais e a evolução do sistema nervoso animal, revelando padrões gerais e específicos para cada organismo (Striedter, 2005; Montgomery et al., 2016).

As categorias de estilo de vida, diurno/noturno e social/solitário, são organizadas em torno de fatores ecológicos comuns e estratégias de comportamento, e têm um efeito importante na função cerebral, determinando os recursos e informações de que os cérebros precisam e têm acesso para produzir comportamentos adaptativos (Bouchebti & Arganda, 2020).

Neste contexto, as formigas são organismos modelos para estudar as relações entre comportamento, tamanho do corpo e neuroanatomia (Hölldobler & Wilson, 1990). Elas exibem espécies caracterizadas por padrões excepcionais de castas e subcastas, tornando-as valiosas para investigar as conexões entre estrutura cerebral e especialização comportamental, particularmente em relação à divisão do trabalho e complexidade social (Hölldobler e Wilson, 1990; Gronenberg, 2008; Muscedere e Traniello, 2012; Gordon et al., 2017; Gordon e Traniello, 2018; Traniello et al., 2022).

O volume cerebral das formigas operárias pode variar em resposta a desafios ecológicos, refletindo diferenças na percepção sensorial, processamento de ordem superior e demandas motoras necessárias para tarefas de colônia (Sulger et al., 2014; Bulova et al., 2016; Kamhi et al., 2016).

Dentre as formigas, Paraponerinae é encontrada exclusivamente na região Neotropical e amplamente distribuída nas florestas tropicais brasileiras (Arias-Penna, 2007; Baccaro et

al., 2015) com um conjunto de traços comportamentais e ecológicos mais similares ao ancestral das formigas, como pouca diferenciação morfológica entre operárias e rainhas e forrageio predador solitário generalista (Peeters, 1997; Wilson & Hölldobler, 2005). Esta subfamília é representada por uma única espécie, *Paraponera clavata*, com atividade de forrageio principalmente noturno (Mccluskey & Brown, 1972), que pode variar entre colônias (Wilson & Hölldobler, 2005). Os ninhos desta espécie estão situados na base de árvores, e forrageiam ativamente no sub-bosque e no dossel de árvores (Fernandes et al., 2015).

Formicinae tem cerca de 3000 espécies descritas (Ward, 2014), sendo o gênero *Camponotus* um dos mais ricos em espécies, encontradas em uma variedade de habitats e microhabitats (Bolton, 1995a), com considerável variação intraespecífica, principalmente no tamanho da cabeça (Kim & Kim, 2006). As formigas do gênero *Camponotus* são consideradas oportunistas e generalistas em relação aos seus hábitos de nidificação e recursos alimentares (Silvestre et al., 2003; Blüthgen & Feldhaar, 2010), elas apresentam uma variedade de estratégias em relação à organização da colônia (Ronque et al., 2018) e ao hábito de forrageio, nas quais algumas espécies possuem hábito diurno e outras, noturnos, e a maioria tem dieta generalista (Bolton, 1973), se alimentando principalmente de exsudatos de plantas e insetos (Oliveira & Brandão, 1991; Del-Claro & Oliveira, 1999 ; Pfeiffer & Lisenmair, 2000 ; Santos & Del-Claro, 2009). Dentre as espécies do gênero, *Camponotus rufipes* (Smith) é poligínica facultativa (Ronque et al., 2016) e apresenta castas polimórficas (Marcolino et al., 2000). Elas possuem hábitos predominantemente noturnos (Ronque et al., 2018), e tem dieta generalista, se alimentando de exsudatos de plantas e insetos e nidificam em troncos mortos, bem como no solo (Ronque et al., 2016).

Myrmicinae possui mais de 6500 espécies descritas com distribuição geográfica global e apresenta variação de grupos funcionais, incluindo as cultivadoras de fungo

(Borowiec *et al.*, 2020), como os *Attina*, com um complexo sistema de comunicação, divisão do trabalho e polimorfismo (Wilson, 1980; Caetano *et al.*, 2002; Mehdiabadi & Schultz, 2009; Della Lucia & De Souza, 2011; Della Lucia *et al.*, 2014). Nas espécies do gênero *Atta*, o polimorfismo das operárias leva a uma divisão distinta do trabalho entre as subcastas, em que, as operárias maiores (“soldados”) são especializadas na defesa da colônia, as operárias médias em forrageio e as operárias menores trabalham dentro do jardim de fungo (Wilson, 1980; Holldobler & Wilson, 1990; Lacerda *et al.*, 2010). Dentre as espécies do gênero, as colônias de *Atta sexdens* (Linnaeus) podem conter milhões de operárias divididas em várias subcastas e apenas uma rainha reprodutiva (monoginia) (De Souza *et al.*, 2011) e possuem um dos mais completos sistemas de comunicação dos Formicidae (Caetano *et al.*, 2002). Elas forrageiam principalmente a noite (Orr, 1992) e constroem ninhos subterrâneos (Cardoso *et al.*, 2014)

Tendo em vista o exposto, as formigas são insetos interessantes para examinar as relações entre comportamento, tamanho do corpo e neuroanatomia, porque as operárias evoluíram como especialistas em tarefas em vários clados. Neste sentido, estudos interespecíficos podem identificar variações morfológicas selecionadas através da evolução. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo determinar se operárias de formigas com diferentes estilos de vida e organização social apresentam variações na morfologia do cérebro. Para tanto, foram testadas as seguintes hipóteses: (i) formigas predadoras investem mais em neurópilas de processamento visual; (ii) operárias de colônias que apresentam castas polimórficas possuem o volume do cérebro reduzido em relação às que apresentam castas pouco diferenciadas;

Assim, serão analisadas a morfologia das regiões cerebrais de operárias de *Paraponera clavata*, *Camponotus rufipes* e *Atta sexdens*, levando em consideração o tamanho e conexões das neurópilas, associando estes dados aos hábitos de vida de cada espécie.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos insetos**

As operárias de *A. sexdens*, atuando como jardineiras, forrageiras e lixeiras foram obtidas de três ninhos mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, no Estado de Minas Gerais (20° 45'S 42° 52'O), enquanto trabalhavam no jardim de fungo, manipulavam lixo e coletavam fragmentos de folhas, respectivamente. As formigas atuando como soldados foram coletadas manualmente no campo, na Universidade Federal de Viçosa, pois colônias mantidas em laboratório não investem na produção de soldados. As operárias de *C. rufipes* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Viçosa e as operárias de *P. clavata* foram coletadas no Município de Caxias no Estado do Maranhão (4° 51'S 43° 21'O). Logo após a coleta, as formigas foram crioanestesiadas a 4 °C por 5 minutos, e a distância interocular (largura da cabeça entre as margens internas dos olhos compostos, utilizada como tamanho da cápsula cefálica; Bulova et al. 2016) de oito espécimes de cada subcasta foi medida (*A. sexdens* possui 4 subcastas, *C. rufipes* 2 e *P. clavata* uma) utilizando esteromicroscópio STEMI 2000-C Zeiss com lente ocular calibrada. Posteriormente, os cérebros foram dissecados em NaCl 125 mM e transferidos para fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,15 1,0M, pH 7,2 por 24 h.

### **2.2 Histologia**

Os cérebros de operárias de *A. sexdens*, *C. rufipes* e de *P. clavata* foram desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 15 minutos de intervalo cada e incluídos em historesina (Leica Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Cortes histológicos com 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM2545 e corados com hematoxilina (20 min) e eosina (30 s). Posteriormente, as amostras foram

montadas com lâminulas e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 e fotografadas usando uma câmera Olympus QColor 3. A área dos cérebros e das neurópilas do lobo óptico, lobo antenal e cálice do *corpus pedunculatum* foram medidas com o auxílio do software ImageJ.

### **2.3 Análise volumétrica**

As medidas geradas no ImageJ foram usadas para determinar o volume absoluto do cérebro e das neurópilas, de acordo com o método de Cavalieri (Coggeshall, 1992), no qual foram selecionadas 10 secções de cada uma das oito formigas de cada subcasta e espécie. A área média do cérebro e de cada neurópila destes cortes selecionados foram medidas e usadas para o cálculo do volume com a fórmula  $V = \bar{a} \times t \times s$ , onde  $V$  é o volume do cérebro,  $\bar{a}$  a área do cérebro em cada secção,  $t$  o número total de secções histológicas do cérebro e  $s$  a espessura das secções histológicas. Dada a sua simetria bilateral, as medidas da área das neurópilas foram obtidas de um hemisfério por cérebro que foi posteriormente duplicado para obter o valor total. Para o cálculo do volume relativo do cérebro e das neurópilas do lobo óptico, do lobo antenal e do cálice do *corpus pedunculatum*, o volume de cada região foi dividido pelo tamanho da cápsula cefálica (distância interocular).

### **2.4 Análises estatísticas**

O volume absoluto do cérebro e das neurópilas do cálice do *corpus pedunculatum*, do lobo óptico e lobo antenal e, bem como a distância interocular de operárias de *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata* foram comparados usando Modelo Linear Generalizado Misto e o teste de Conover-Iman com correção de Bonferroni. Como o número amostral para as espécies foi diferente, adotamos um modelo linear generalizado misto, pois ele permite incluir a repetição como um fator aleatório e fazer as correções estatísticas necessárias para que a análise seja

feita de forma correta. As espécies foram usadas no modelo como variável categórica/determinística e os volumes absolutos e relativos do cérebro, lobo óptico, cálice e lobo antenal, bem como a distância interocular foram utilizadas como variável dependente/aleatória. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2020).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Tamanho da cápsula cefálica**

A distância interocular média de *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata* foram  $5,35 \pm 1,42$  mm,  $3,80 \pm 1,12$  mm e  $6,39 \pm 1,20$  mm, respectivamente. Estas medidas foram semelhantes entre *A. sexdens* e *C. rufipes* ( $p > 0,05$ ;  $\chi^2 = 9.8542$ ; g.l.= 2; Fig. 1), enquanto a de *P. clavata*

diferiu de ambas espécies ( $p < 0,05$ ;  $\chi^2 = 9,8542$ ; g.l.= 2; Fig. 1).

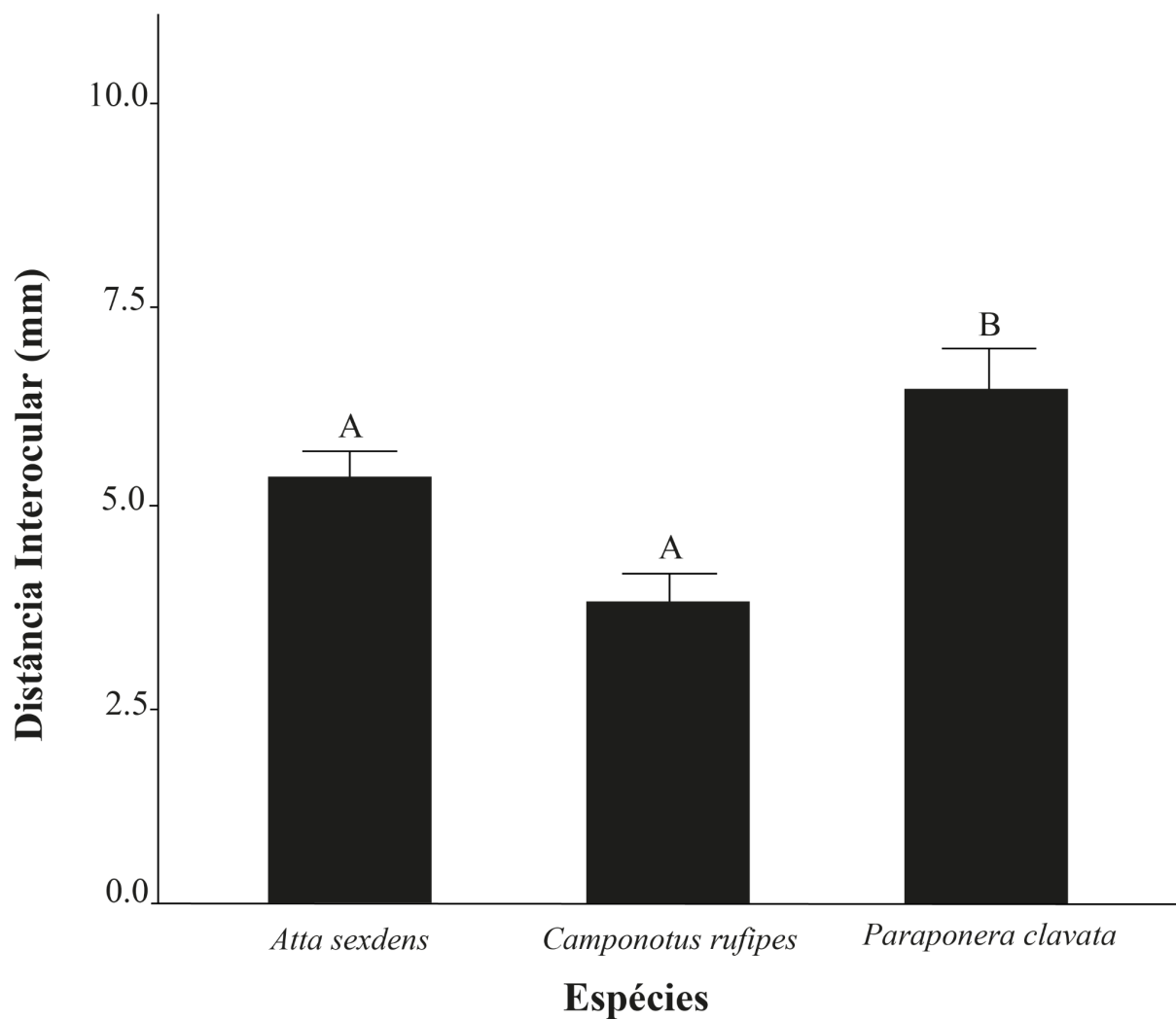


Figura 1: Distância interocular (média  $\pm$  dp) de operárias de *Atta sexdens*, *Camponotus rufipes* e *Paraponera clavata*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as espécies pelo Modelo Linear Generalizado Misto ( $p > 0,05$ ).

### 3.2 Histologia

Os cérebros de *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata* são similares, com morfologia bilobada e constituído por três regiões: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. Cada região é formada por emaranhados de neurópilas na região central, que abrigam os prolongamentos dos neurônios (axônios e dendritos), enquanto a região periférica é constituída pelos corpos celulares destas células (Fig. 2).

No protocérebro, encontram-se os *corpora pedunculata* e os lobos ópticos. Os cálices do *corpora pedunculata* das três espécies possuem um aspecto microglomerular com células da glia (Fig. 2A, 2B e 2C). O lobo óptico é estruturado em três regiões de neurópilas sucessivas: lamina, medula e lobula, entre as quais ocorrem os quiasmas, similares nas três espécies são similares, sendo que em *C. rufipes* (Fig. 2B) a região da medula exibe uma forma circular e um volume aparentemente maior em relação às demais áreas, o mesmo é visto em *P. clavata* (Fig. 2C). O lobo óptico de *P. clavata* parece ser mais desenvolvido do que as demais espécies. As células da glia nesta neurópila também é, aparentemente, mais abundante em *P. clavata* que nas demais espécies (Fig. 2C).

No deutocérebro, localiza-se o lobo antenal, uma estrutura composta por unidades funcionais denominadas glomérulos com tamanhos variados e se encontram dispersos na região periférica do lobo antenal. O lobo antenal das três espécies são similares, podendo variar na quantidade, volume, tamanho e formato dos glomérulos (Fig. 2A, 2B e 2C). As células da glia são encontradas em pouca quantidade em *A. sexdens* (Fig. 2A) e *C. rufipes* (Fig. 2B), no entanto, em *P. clavata* (Fig. 2C) são encontradas em abundância.

O tritocérebro está localizado na base do cérebro e é reduzido em Hymenoptera.

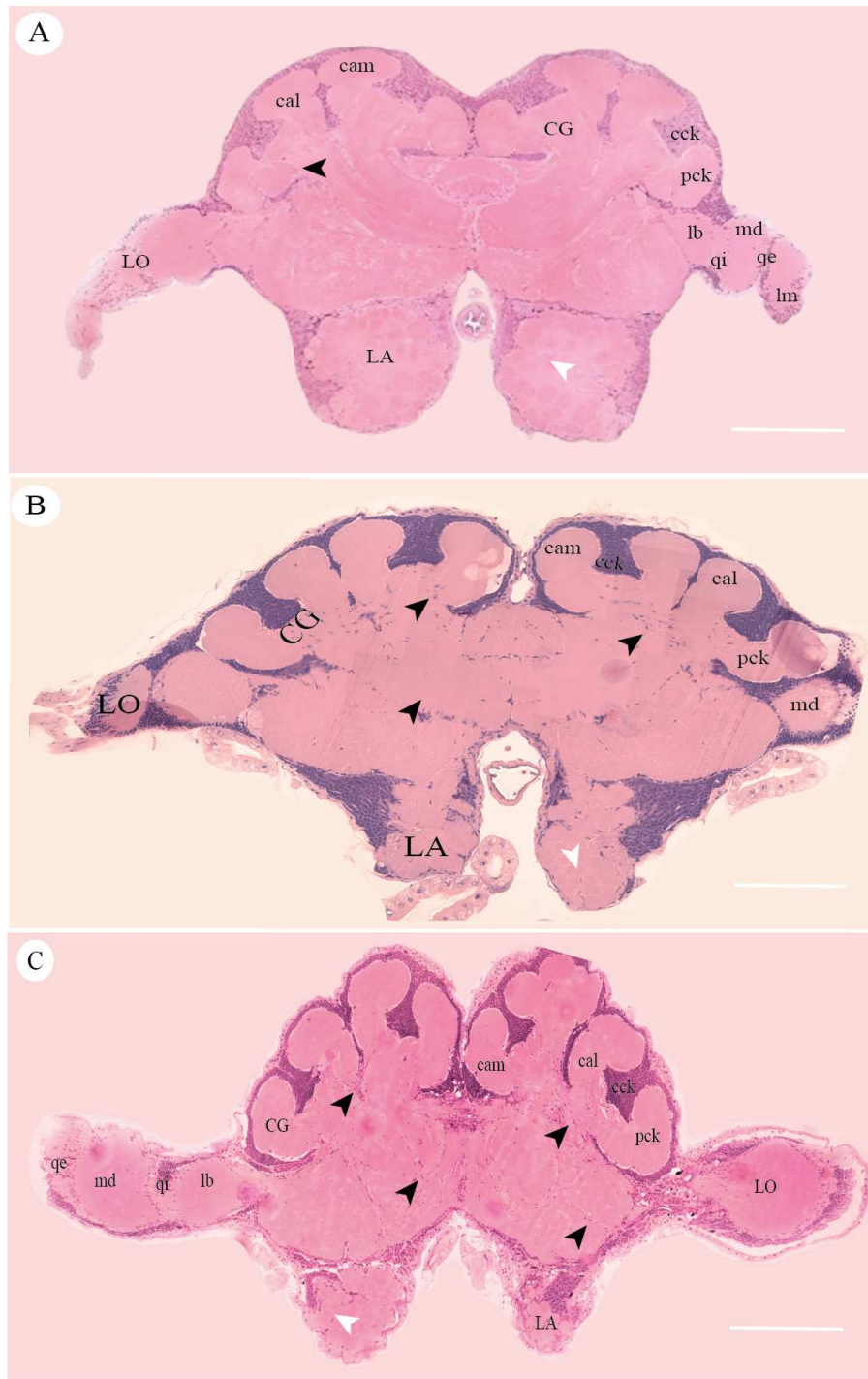


Figura 2: Seções histológicas do cérebro de operárias de *Atta sexdens* (A), *Camponotus rufipes* (B) e *Paraponera clavata* (C), evidenciando as neurópilas do *corpus pedunculatum* (CG), lobo óptico (LO) e lobo antenal (LA). Cálice do *corpus pedunculatum*, com destaque nos prolongamentos (pk) e corpos celulares (ck) das células de Kenyon. Lobo óptico com destaque de suas sub-regiões- lóbula (lb), medula (md) e lâmina (lm) com os quiasmas interno (qi) e externo (qe). Lobo antenal evidenciando os glomérulos esféricos (pontas de seta brancas) de diâmetros variados na periferia e região central com

emaranhado de neurópilas. A ponta seta preta aponta as células da glia. CM - Cálice medial, CL - cálice lateral. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Análise volumétrica

Os volumes absolutos e relativos do cérebro, bem como de todas as neurópilas aqui analisadas, foram diferentes entre *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata*.

O cérebro de *A. sexdens* possui volume de  $0,099\pm 0,042\text{ mm}^3$ , *C. rufipes* de  $0,192\pm 0,051\text{ mm}^3$  e *P. clavata*  $1,376\pm 0,554\text{ mm}^3$  ( $p>0,05$ ;  $\chi^2 = 21.8729$ ;  $gl= 2$ ; Fig. 3A). O volume absoluto do cálice do *corpus pedunculatum* das espécies foi  $0,006\pm 0,002\text{ mm}^3$  em *A. sexdens*,  $0,046\pm 0,012\text{ mm}^3$  em *C. rufipes* e  $0,207\pm 0,089\text{ mm}^3$  em *P. clavata* ( $p<0,05$ ;  $\chi^2 = 26.8007$ ;  $gl= 2$ ; Fig. 3B). O volume do lobo óptico foi  $0,004\pm 0,002\text{ mm}^3$  em *A. sexdens*,  $0,023\pm 0,014\text{ mm}^3$  em *C. rufipes*, e  $0,109\pm 0,060\text{ mm}^3$  em *P. clavata* ( $p<0,05$ ;  $\chi^2 = 26.7857$ ;  $gl=2$ ; Fig. 3C). O volume do lobo antenal foi  $0,006\pm 0,004\text{ mm}^3$  em *A. sexdens*,  $0,030\pm 0,017\text{ mm}^3$  em *C. rufipes* e  $0,120\pm 0,026\text{ mm}^3$  em *P. clavata* ( $p<0,05$ ;  $\chi^2 = 23.5629$ ;  $gl= 2$ ; Fig. 3D).

O volume relativo do cérebro e suas respectivas neurópilas foram obtidos pela razão entre os volumes de cada região e a distância interocular. O volume relativo do cérebro de *A. sexdens* é equivalente a  $0,0018\pm 0,005$ , *C. rufipes*  $0,039\pm 0,006$  e *P. clavata*  $0,201\pm 0,151$  (Fig.4A). O volume relativo do cálice do *corpus pedunculatum* é  $0,001\pm 0,000$  em *A. sexdens*,  $0,013\pm 0,003$  em *C. rufipes* e  $0,027\pm 0,009$  em *P. clavata* (Fig. 4B). Enquanto o volume relativo do lobo óptico é  $0,001\pm 0,000$  em *A. sexdens*,  $0,006\pm 0,002$  em *C. rufipes* e  $0,017\pm 0,008$  em *P. clavata* (Fig. 4C). O volume relativo do lobo antenal em *A. sexdens* foi  $0,002\pm 0,001$ ,  $0,007\pm 0,002$  em *C. rufipes* e  $0,019\pm 0,004$  em *P. clavata* (Fig. 4D).

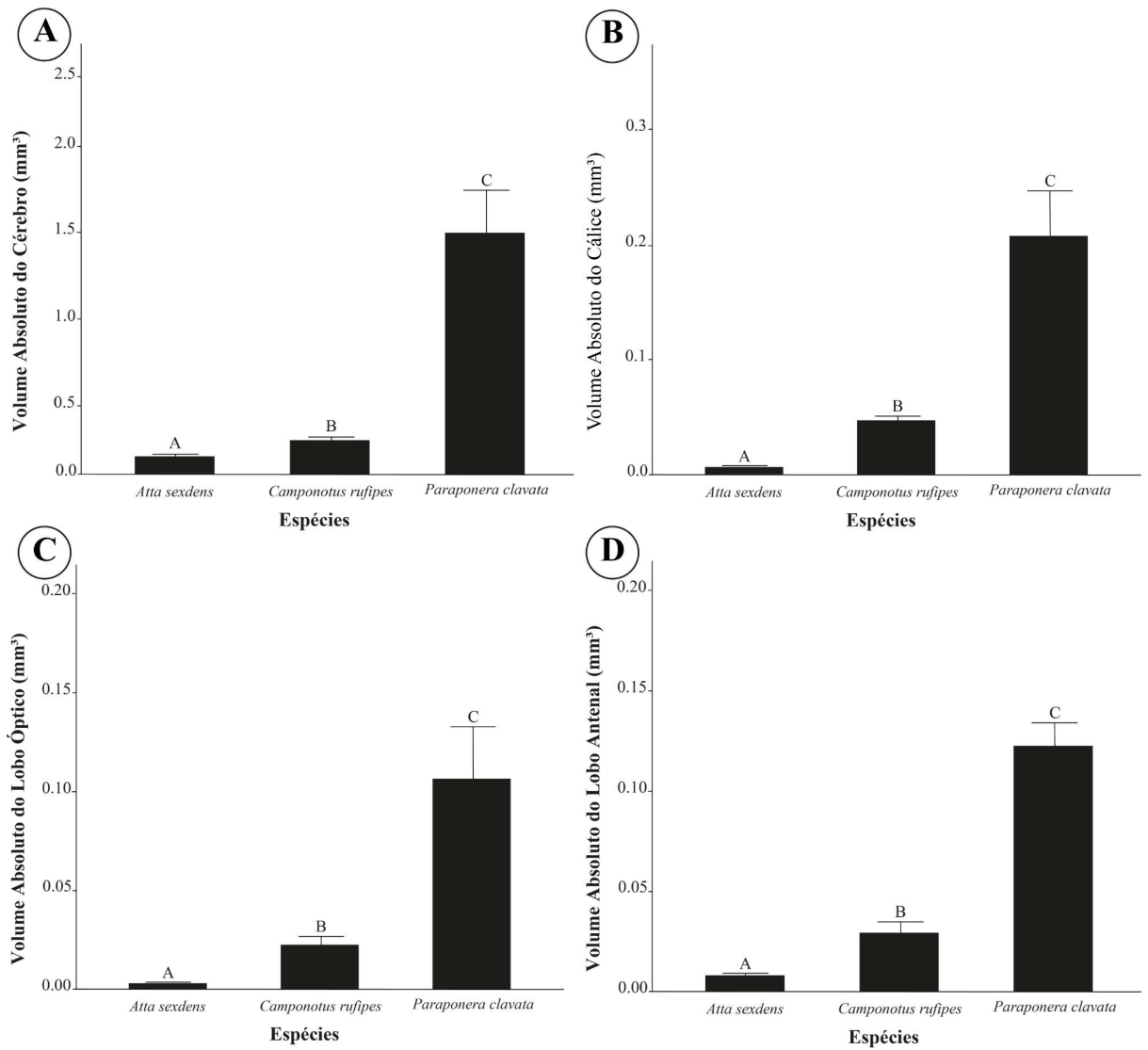


Figura 2: A) Volume absoluto (média  $\pm$  dp) do cérebro, do cálice do *corpus pedunculatum* (B), do lobo óptico (C) e do lobo antenal (D) de operárias de *Atta sexdens*, *Camponotus rufipes* e *Paraponera clavata*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as espécies pelo Modelo Linear Generalizado Misto ( $p > 0,05$ ).

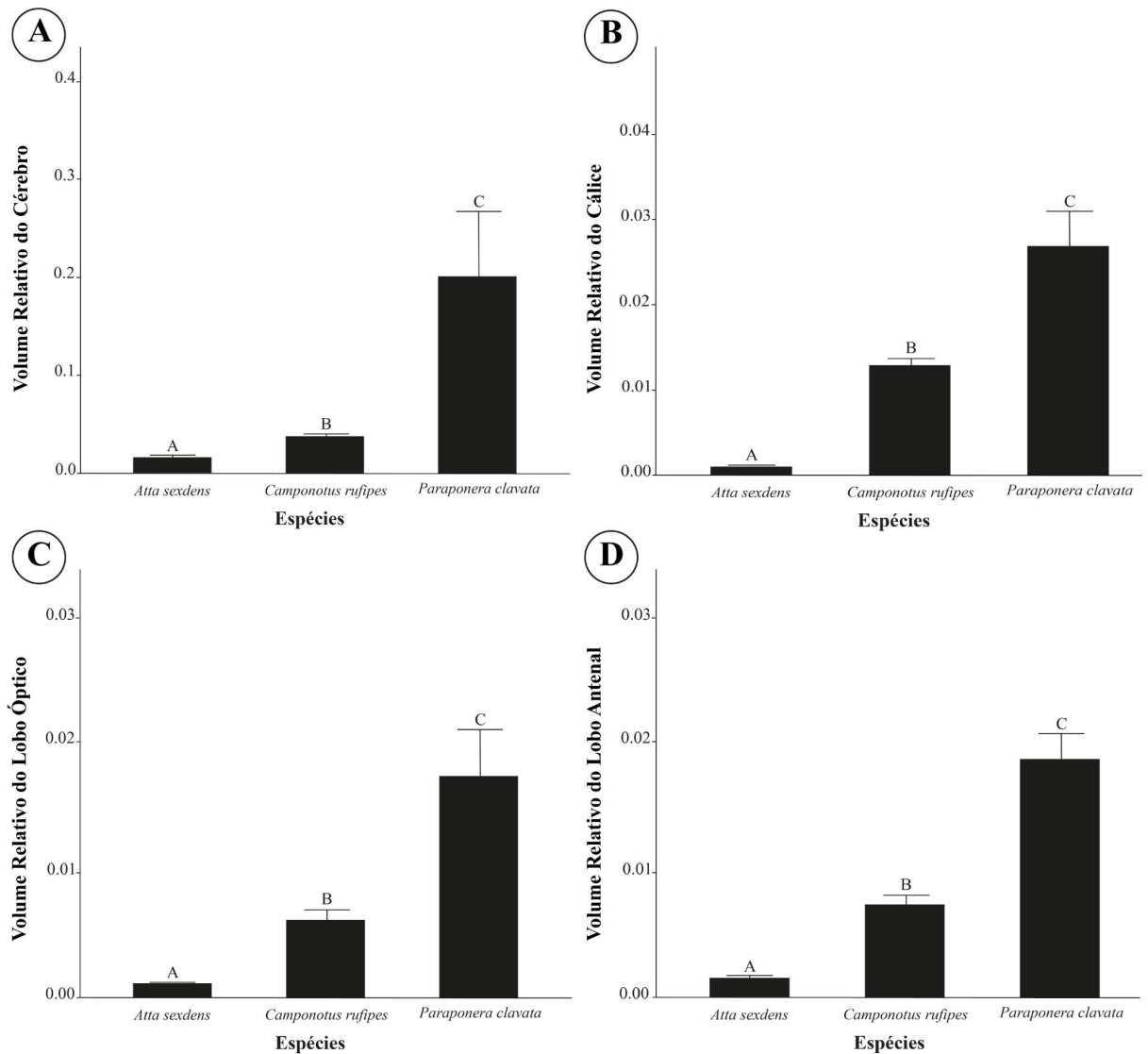


Figura 3: A) Volume relativo (média  $\pm$  dp) do cérebro, do cálce do *corpus pedunculatum* (B), do lobo óptico (C) e do lobo antenal (D) de operárias de *Atta sexdens*, *Camponotus rufipes* e *Paraponera clavata*. Barras com letras diferentes indicam diferenças entre as subcastas pelo Modelo Linear Generalizado Misto ( $p > 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou como o volume absoluto e o volume relativo do cérebro e das neurópilas do cálce do *corpus pedunculatum*, lobo óptico e lobo antenal estão associados com os diferentes estilos de vida e organização social de operárias de *A. sexdens*, *C. rufipes* e *P. clavata*.

As medidas da cápsula cefálica revelam que o tamanho da cabeça de *A. sexdens* e *C. rufipes* são similares, mas menores que de *P. clavata*. Os resultados mostram que o volume absoluto do cérebro de operárias de *P. clavata* é cerca de 14 vezes maior que o de *A. sexdens* e 7 vezes maior que o de *C. rufipes*, indicando que cápsula cefálica maior está associada a um maior volume cerebral nestas formigas. Entretanto, o volume absoluto do cérebro de *C. rufipes* foi cerca de 2 vezes maior que o de *A. sexdens*, mesmo ambas apresentando cápsula cefálica de tamanho similar. Isso sugere que o cérebro de operárias de *C. rufipes* ocupa uma porção maior na cápsula cefálica em comparação com *A. sexdens*, o que pode estar relacionada aos diferentes estilos de vida das formigas, na qual operárias de *A. sexdens*, devido ao polimorfismo mais acentuado, não necessitam investir em um cérebro maior para desempenharem suas funções. A seleção natural atua tanto no nível de indivíduo quanto de colônia para favorecer o comportamento adaptativo de insetos sociais (Feinerman & Traniello (2016). No nível de colônia, a seleção para comportamento adaptativo pode reduzir os desafios cognitivos enfrentados por operárias individuais, resultando em menor investimento em cérebros (Lihoreau et al., 2012; Riveros et al., 2012 ; O'Donnell et al., 2015). Dessa forma, acreditamos que em *A. sexdens* a seleção natural ao nível de colônia reduz os desafios cognitivos enfrentados por operárias individuais que resulta num menor investimento em tecido cerebral.

O volume absoluto do cálice do *corpus pedunculatum* foi diferente entre as três espécies, sendo maior em *P. clavata* e menor em *A. sexdens*, sugerindo que quanto mais flexível a divisão do trabalho entre as operárias, maior o tamanho do cálice do *corpus pedunculatum*. *Paraponera clavata* é monomórfica, com operárias fisicamente semelhantes, que desempenham múltiplas tarefas, permitindo uma organização mais dinâmica e adaptável entre diferentes funções. Por outro lado, *C. rufipes*, possui um dimorfismo com apenas duas subcastas, enquanto *A. sexdens* exibe um forte polimorfismo entre as operárias, com uma

divisão de trabalho mais complexa, contendo subcastas especializadas em tarefas específicas. Em formigas do gênero *Pheidole*, operárias maiores que têm repertórios de tarefas mais amplos e maior nível de flexibilidade comportamental têm os maiores *corpora pedunculata* (Muscedere & Traniello, 2012).

O volume absoluto do lobo óptico entre as três espécies também foi diferente, sendo maior em *P. clavata*, intermediário em *C. rufipes* e menor em *A. sexdens*. Esses dados ratificam que, quanto menor a exposição à luz, menor é o lobo óptico. As operárias de *A. sexdens* vivem em ninhos subterrâneos, em condições de baixa luminosidade, enquanto *C. rufipes* e *P. clavata*, são mais dependentes da percepção visual para forrageio e detecção de presas. Operárias de *Myrmecia* que possuíam hábitos noturnos investiram menos em seus lobos ópticos (Sheehan et al., 2019) enquanto formigas subterrâneas podem carecer completamente desta neurópila (Gronenberg, 1999). Segundo Ehmer & Gronenberg (2004), famílias mais derivadas, como Formicinae e Myrmicinae, possuem os olhos e consequentemente os lobos ópticos reduzidos.

Da mesma forma, o volume absoluto do lobo antenal também variou entre as três espécies, sendo maior em *P. clavata*, intermediário em *C. rufipes* e menor em *A. sexdens*. O lobo antenal de *C. rufipes* ocupa cerca de 15% do cérebro, 8% em *P. clavata* e 6% em *A. sexdens*, confrontando que o lobo antenal é invariável entre os táxons de formigas (Gronenberg, 1999; Gronenberg & Hölldobler, 1999). Com isso, podemos inferir que dentre as três espécies aqui estudadas, *C. rufipes* apresenta o maior volume do lobo antenal, sugerindo que essa espécie seja mais dependente da percepção sensorial do que as demais espécies. O número de glomérulos e seu volume pode variar entre espécies, isso foi observado em diferentes espécies de *Camponotus* (Mysore et al., 2009), o que pode explicar o fato de *C. rufipes* possuir um maior volume do lobo antenal.

Os dados de morfometria demonstram que há diferença entre os volumes relativos do cérebro e de todas as neurópilas aqui analisadas nas três espécies estudadas. O tamanho relativo das regiões cerebrais pode estar relacionado à importância funcional de cada região no desempenho comportamental dos indivíduos (Laughlin et al., 1998; Niven & Laughlin, 2008), indicando uma possível especialização adaptativa das neurópilas aqui analisadas às necessidades comportamentais e ecológicas destas formigas. Assim, cada espécie investe de maneira distinta em seus compartimentos cerebrais, conforme as tarefas desempenhadas por suas operárias.

Em todas as análises realizadas, as operárias de *P. clavata* tiveram os maiores valores, tanto em relação aos volumes absolutos quanto aos relativos, e provavelmente, é devido a sua maior cápsula cefálica, que possibilita ter um cérebro maior, mas isso pode variar, uma vez que um cérebro maior pode ter menor investimento em determinadas regiões. Neste sentido, o cálice do *corpus pedunculatum*, o lobo óptico e o lobo antenal de *P. clavata* são maiores que aqueles de *C. rufipes*, mas todas essas neurópilas ocupam uma proporção maior do cérebro desta última. O cálice do *corpus pedunculatum* ocupa cerca de 23% do cérebro de *C. rufipes* e 15% do de *P. clavata*, o lobo óptico ocupa cerca de 11% de *C. rufipes* e 8% do de *P. clavata*, enquanto o lobo antenal ocupa cerca de 15% do seu cérebro de *C. rufipes* e somente 8% do de *P. clavata*. Embora este estudo não tenha avaliado as células da glia, elas parecem ocorrer em quantidade maior no cérebro de *P. clavata*, e isso pode favorecer para que tenham um maior volume cerebral, mas estudos adicionais quantificando o número de neurônios e células da glia são necessários para elucidar este aspecto.

Os resultados indicam que a morfologia cerebral está associada à organização social e ecológica das espécies. Permitindo uma organização mais dinâmica e adaptável em espécies monomórficas e uma divisão de trabalho mais complexa em espécies polimórficas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias-Penna, T. M. (2007). Distribución del género *Trichacis* Förster, 1886 (Hymenoptera: Platygastroidea) en el neotrópico. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 8(1), 10-14.
- Baccaro, F. B., Feitosa, R. M., Fernández, F., Fernandes, I. O., Izzo, T. J., Souza, J. L. P., & Solar, R. (2015). Guia para os gêneros de formigas do Brasil. Manaus: Editora INPA, 338.
- Blüthgen, N., Feldhaar, H. (2010). Food and shelter: how resources influence ant ecology. In: Lach L, Parr CL & Abbott KL (eds). *Ant ecology*. Oxford: Oxford University Press; pp. 115–136.
- Bolton, B. (1973). The ant general of West Africa: A synonymic synopsis with a keys (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of the British Museum Entomology*, 27: 317-368.
- Bolton, B. (1995). A taxonomic and zoogeographical census of the extant taxa (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History*, 29: 1039-1056.
- Borowiec, M.L., Moreau, C.S. & Rabeling, C. (2020). Ants: phylogeny and classification. In: Starr, C.K.(Ed.): *Encyclopedia of social insects*. – Springer International Publishing, Cham, pp. 1-18.
- Bouchebti, S., Arganda, S. (2020). Insect lifestyle and evolution of brain morphology. *Current Opinion in Insect Science*, 42:90-96.
- Bulova, S., Purce, K., Khodak, P., Sulger, E., O'Donnell, S. (2016). Into the black, and back: the ecology of brain investment in Neotropical army ants (Formicidae: Dorylinae). *Naturwissenschaften*, 103:31.
- Caetano, F.H., Jaffé, K., Zara, F.J. (2002). *Formigas: biologia e anatomia*, Editora Topásio, Araras.
- Cardoso, S.R., Forti, L.C., Nagamoto, N.S., Camargo, R.S. (2014). First-year nest growth in the leaf-cutting ants *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology*. 61:243–249.

- Coggeshall, R.E. (1992). A consideration of neural counting methods. *trends Neurosci.* 15:9-13.
- Della Lucia, T.M.C., De Souza, D.J. (2011). Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In Della Lucia, T. M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*, Editora UFV, Viçosa, pp. 13-26.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* 70:14–23.
- Del-Claro, K., Oliveira, P.S. (1999). Ant-Homoptera interactions in a Neotropical Savanna: the honeydew producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica.* 31:135–144.
- De Souza, D.J., Santos, J.F.L., Della Lucia, T.M.C. (2011). In Della Lucia, T.M.C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, pp. 126-137.
- Ehmer B, Gronenberg W (2004). Mushroom body volumes and visual interneurons in ants: comparison between sexes and castes. *Journal of Comparative Neurology*, 469, 198-213.
- Feinerman, O., Traniello, J.F.A (2016). Social complexity, diet, and brain evolution: modeling the effects of colony size, worker size, brain size, and foraging behavior on colony fitness in ants. *Behavioral Ecology Sociobiology* 70, 1063–1074.
- Fernandes, I. O., Souza, J. P., Baccaro, F.B. (2015). Estado da Arte sobre Filogenia, Taxonomia e Biologia de Paraponerinae. In: Delabie, J. H. C. et al. *As formigas poneromorfas do Brasil*. Ilhéus: Editus. p.43-53.
- Gordon, D.G., Traniello, J.F.A. (2018). Synaptic organization and division of labor in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Neuroscience Letter*, 676:46–50.
- Gordon, D.G., Ilieș, I., Traniello, J.F.A. (2017). Behavior, brain, and morphology in a complex insect society: trait integration and social evolution in the exceptionally polymorphic ant *Pheidole rhea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(11):166.
- Gronenberg, W. (1999). Modality-specific segregation of input to ant mushroom bodies. *Brain Behav Evol* 54:85–95

- Gronenberg, W. (2008). Structure and function of ant (Hymenoptera:Formicidae) brains: strength in numbers. *Myrmecology News*, 11:25–36.
- Gronenberg W, Hölldobler B. (1999). Morphological representation of visual and antennal information in the ant brain. *Journal of Comparative Neurology*, 412, 229-240.
- Hölldobler, B., Wilson, E. (1990). *The ants*. Harvard University Press.
- Ito, K., Shinomaya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homber, U., Jenett, A. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81:755-765.
- Kamhi, J.F., Gronenberg, W., Robson, S.K.A., Traniello, J.F.A. (2016) Social complexity influences brain investment and neural operation costs in ants. *Proc R Soc B*, 283:20161949.
- Kim, K.G., Kim, B.J. (2006) Molecular phylogeny of *Camponotus* ants in Korea. *Entomological Research* 36: 48-55.
- Kinoshita, M., Homberg, U. (2017). *Insects Brain: minute structure controlling complex behaviors*. Brain Evolution by Desing. Springer. 123-151.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Pereira, O.L., Peternelli, L.A., Tótola, M.R. (2010). Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. *Bull Entomol Res* 100:99–103.
- Laughlin, S.B., van Steveninck, R.R.D., Anderson, J.C.(1998). The metabolic cost of neural information. *Nat.Neurosci.* 1, 36– 41.
- Lihoreau, M., Latty, T., Chittka, L. (2012) An exploration of the social brain hypothesis in insects. *Front Physiol* 3:1–7.
- Marcolino, M. T., Brandeburgo, M. A. M., Oliveira-Junior, W. P. (200). Aspectos comportamentais da interação entre formigas *Camponotus atriceps* Smith (Hymenoptera,Formicidae) e abelhas africanizadas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, 25: 321-330.

- Mccluskey, E. S & Brown, W.L. (1972). Rhythms and other biology of giant tropical ant *Paraponera clavata*. *Psyche*, v.79, p.335-347.
- Mysore, K., Subramanian, K. A., Sarasij, R. C., Suresh, A., Shyamala, B. V., VijayRaghavan, K., Rodrigues, V. (2009). Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Structure & Development*, 38(6), 485-497.
- Mehdiabadi, N.J., Schultz, T.R. (2009). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecol. News*13, 37–55.
- Montgomery, S. H., Mundy, N. I., Barton, R. A. (2016). Brain evolution and development: Adaptation, allometry and constraint. *Proc. R. Soc. B* 283, 20160433.
- Muscedere, M.L., Traniello, J.F.A. (2012). Division of labor in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* is associated with distinct subcaste- and age-related patterns of worker brain organization. *PLoS One* 7:e31618.
- Niven, J.E., Laughlin, S.B. (2008). Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J. Exp. Biol.* 211, 1792– 1804.
- O'Donnell, S., Bulova, S. J., DeLeon, S., Khodak, P., Miller, S., Sulger, E. (2015). Distributed cognition and social brains: reductions in mushroom body investment accompanied the origins of sociality in wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Proc R Soc B* 282:20150791.
- Oliveira, P.S., Brandão, C.R.F.. (1991). The ant community associated with extrafloral nectaries in the Brazilian Cerrados. In: Cutler DF, Huxley CR, editors. *Ant-plant interactions*. Oxford: Oxford University Press; p. 198–212.
- Orr, M. R. (1992). Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30: 395–402.

- Petters, C. (1997). Morphologically “primitive” ants: comparative review of social characters, and the importance of queen-worker dimorphism. In: Choe, J & Cresp, B. (Eds.), *The Evolution of social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.372 – 391.
- Pfeiffer, M., Lisenmair, K.E. (2000). Contributions to the life history of the Malaysian giant ant *Camponotus gigas* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc.* 47:123–132.
- Riveros, A., Seid, M., Wcislo, W. (2012) Evolution of brain size in class-based societies of fungus-growing ants (Attini). *Animal Behavior* 83:1043–1049.
- Ronque, M.U.V., Azevedo-Silva, M., Mori, G.M., Souza, A.P., Oliveira, P.S. (2016). Three ways to distinguish species: using behavioural, ecological, and molecular data to tell apart two closely related ants, *Camponotus renggeri* and *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: formicidae). *Zool J Linn Soc.* 176:170–181.
- Ronque, M. U. V., Fourcassié, V., & Oliveira, P. S. (2018). Ecology and field biology of two dominant *Camponotus* ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Brazilian savannah. *Journal of Natural History*, 52(3–4), 237–252.
- Santos, J.C., Del-Claro, K. (2009). Ecology and behaviour of the weaver ant *Camponotus (Myrmobrachys) senex*. *J Nat His.* 43:1423–1435.
- Sheehan, Z. B., Kamhi, J. F., Seid, M. A., & Narendra, A. (2019). Differential investment in brain regions for a diurnal and nocturnal lifestyle in Australian *Myrmecia* ants. *Journal of Comparative Neurology*, 527(7), 1261-1277
- Silvestre, R., Brandão, C.R.F., Da Silva, R.R. (2003). Gupo funcionales de hormigas: el caso de los grêmios del Cerrado. In: Fernández F, editor. *Introducción a las hormigas de La región Neotropical*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; p. 113–148.

- Striedter, G. F. (2005). *Principles of Brain Evolution*. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, Sunderland.
- Sulger, E., Mcaloon, N., Bulova, S.J., Sapp, J., O'Donnell, S. (2014). Evidence for adaptive brain tissue reduction in obligate social parasites (*Polyergus mexicanus*) relative to their hosts (*Formica fusca*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113:415–422.
- Traniello, J.F.A., Linksvayer, T.A., Coto, Z.N. (2022). Social complexity and brain evolution: Insights from ant neuroarchitecture and genomics. *Current Opinion in Insect Science* 53: 100962
- Team, R.C. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing <<https://www.R-project.org/>>. (Accessed on June 10, 2016).
- Ward, P.S. (2014). The phylogeny and evolution ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45:23-43.
- Wilson, E.O. (1980). Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 7:143–156.
- Wilson, E.O., Holldober, B. (2005). The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 102, 7411- 7414.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo comparou a estrutura cerebral de formigas intra e interespecificamente, levando em consideração as tarefas desempenhadas por diferentes subcastas, bem como os estilos de vidas das espécies analisadas. O uso de técnicas de microscopia e morfometria possibilitou identificar que a plasticidade dos compartimentos cerebrais em operárias de formigas é influenciada pela organização social e ecológica das espécies. Essa plasticidade é resultado de investimentos diferenciados em tecido neural tanto em operárias polimórficas como monomórficas. Operárias monomórficas possuem organização mais dinâmica e adaptável, enquanto espécies polimórficas uma divisão de trabalho mais complexa. Como perspectiva, ainda são necessários estudos complementares para uma melhor compreensão de como a divisão de trabalho e os estilos de vidas de diferentes espécies impactam a plasticidade cerebral de formigas.