

**LUIZA CARLA BARBOSA MARTINS**

**MORFOLOGIA E HISTOQUÍMICA DE GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES  
EM ESPÉCIES REPRESENTANTES DE ATTINI E PONERINI  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**2008**



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M386m  
2009

Martins, Luiza Carla Barbosa, 1976-  
Morfologia e histoquímica de glândulas intramandi-  
bulares em espécies representantes de Attini e Poncrini  
(Hymenoptera, Formicidae) / Luiza Carla Barbosa Martins.  
- Viçosa, MG, 2009.  
ix, 41f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-41.

1. Formigas - Morfologia. 2. Formigas - Histologia.  
3. Glândulas exócrinas. 4. Formicidae. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

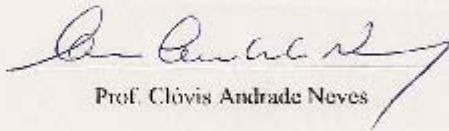
CDD 22.ed. 595.796

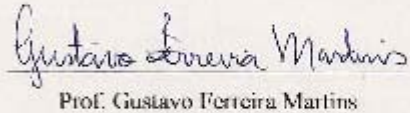
LUIZA CARLA BARBOSA MARTINS

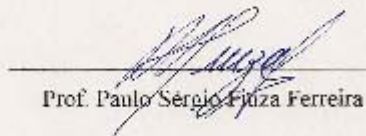
MORFOLOGIA E HISTOQUÍMICA DE GLÂNDULAS INTRAMANDIBULARES  
EM ESPÉCIES REPRESENTANTES DE ATTINI E PONERINI  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)

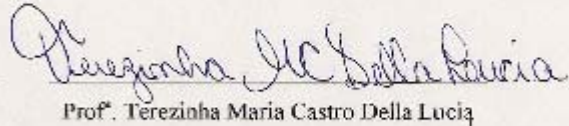
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

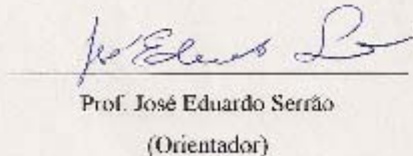
APROVADA: 19 de Dezembro de 2008

  
Prof. Clóvis Andrade Neves

  
Prof. Gustavo Ferreira Martins

  
Prof. Paulo Sérgio Pinza Ferreira

  
Prof. Terezinha Maria Castro Della Lucia

  
Prof. José Eduardo Serrão  
(Orientador)

**“Perseverás até alcançar o êxito”**

(O G Mandino)

**À minha família por todo amor e apoio  
dedicados a mim, em todo o meu caminho...**

Dedico

iii

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a luz de minha vida.

Aos meus pais, Carlos Alves Martins e Maria de Lourdes Barbosa Martins, minha base, meu sustento, meu alento, meu tudo.

Aos meus irmãos, Carmem, Ana Eulália, Norma, Jorge, Zoraide, Luciana, Cícero e todos os meus sobrinhos, que sempre torceram por mim e estavam dispostos a ajudar e me fazer feliz.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Biologia Animal e ao Departamento de Biologia Geral a oportunidade da realização deste trabalho, e as condições oferecidas para a realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), o auxílio financeiro.

Ao meu orientador, Dr. José Eduardo Serrão, os ensinamentos, orientação, confiança e dedicação, os valiosos incentivos e cobranças tão necessárias ao bom desempenho e andamento desse trabalho.

Ao Dr. Jacques H. C. Delabie por ter acreditado e me guiado na realização de meus sonhos e apoiado em diversos momentos.

Aos meus coorientadores Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos e Ph.D. José Cola Zanuncio, o profissionalismo, a disponibilidade e os ensinamentos.

Aos membros da minha banca, Dr. Clóvis Andrade Neves, Ph.D. Paulo Sérgio Fiuza Ferreira, Dr. Terezinha Maria Castro Della Lucia e Dr. Gustavo Ferreira Martins a atenção e colaboração.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, e à Dra. Cláudia Vanetti, o apoio técnico, a disponibilidade e a boa vontade.

Às secretárias da Pós-Graduação em Entomologia da UFV, Maria Paula Aparecida Costa e Miriam Magalhães e secretárias do Departamento de Biologia Geral da UFV, Beth Diana, Rose e Salvadora pelo carinho e atenção com que me atenderam sempre que precisei.

Aos técnicos de laboratório da UFV, Monteiro e Sr. Manoel, pela disponibilidade em todos os momentos, auxílio no desenvolvimento desse trabalho e alegre convivência.

A todos do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC, Cléa, Zé Raimundo, José Crispin, Karina, Ivan Cardoso, Benoit, Lucimeire, Sebastien, Lucileide, Susele e Polly, o apoio, o incentivo, os ensinamentos, e principalmente, a amizade construída.

À Dra. Simone Freitas, pelos conselhos e sugestões que enriqueceram esse trabalho.

À Eltamara e sua filha Gabriela, o carinho, e toda a alegria que vocês me proporcionaram.

À Fábria, Sílvia, Sabrina, Antônia, Raquel, Rafael, Poul, Marcília, Claudinei e Vinícius e, o companheirismo e amizade. Tudo é mais fácil quando vocês estão por perto.

Ao Alex Cunha, companheiro incondicional em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório: Riviane, Wagner, Madu, Dihego, Carolina, Stephani, Débora, Douglas, Cirlei, Edmilson, o apoio, as conversas e os ensinamentos.

Aos professores e amigos da Entomologia e Biologia Celular pelos momentos de aprendizado dentro e fora das salas de aula.

A todos que participaram dos bons e difíceis momentos que tive nessa jornada.

## **BIOGRAFIA**

Luiza Carla Barbosa Martins, filha de Carlos Alves Martins e Maria de Lourdes Barbosa Martins, nasceu em Itabuna, Estado da Bahia, Brasil, em 13 de outubro de 1976.

Em 2004, graduou-se em Ciências Biológicas, Bacharelado com ênfase em Ecologia pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil, defendendo tese em 19 de dezembro de 2008.

Em setembro de 2008, foi selecionada para o Curso de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil.

## ÍNDICE

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	7
2.2. HISTOLOGIA.....	8
2.3. HISTOQUÍMICA.....	8
2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	8
2.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	8
3. RESULTADOS.....	10
3.1 HISTOLOGIA.....	10
3.2. HISTOQUÍMICA.....	22
3.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	26
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## RESUMO

MARTINS, Luiza Carla Barbosa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2008. **Morfologia e histoquímica de glândulas intramandibulares em espécies representantes de Attini e Ponerini (Hymenoptera, Formicidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Lúcio Antônio de Oliveira Campos, José Cola Zanuncio.

O conhecimento da morfologia interna da mandíbula de formigas é importante para a elucidação dos mecanismos que envolvem o sistema exócrino e suas relações com os aspectos comportamentais e filogenéticos nas diferentes subfamílias de Formicidae. Nesse trabalho foi investigada a ocorrência de glândulas intramandibulares em formigas primitivas Ponerini (Ponerinae) e derivadas Attini (Myrmicinae). Nessas formigas foram encontradas glândulas da classe I e III e, células epiteliais secretoras com reservatório. As glândulas intramandibulares apresentam histologia distinta nas espécies estudadas, variando a sua localização, grau de desenvolvimento. Com isso é possível conjecturar que as glândulas das diferentes tribos, produzem substâncias de naturezas distintas, e isso pode indicar funções diversas, dependendo da natureza química de constituintes celulares. A análise cladística utilizando caracteres das glândulas intramandibulares resultou na separação das duas tribos, sugerindo que as diferenças estruturais das glândulas intramandibulares possam contribuir para estudos filogenéticos de Formicidae.

## ABSTRACT

MARTINS, Luiza Carla Barbosa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2008. **Morfology and histochemistry of intramandibular glands in species representation of Attini and Ponerini (Hymenoptera, Formicidae).** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Lucio Antonio de Oliveira Campos, José Cola Zanuncio.

The study of intramandibular glands in ants may provide new insights for the comprehension of the mechanisms of exocrine glands linked with behavior and phylogeny in different Formicidae. In this work the occurrence of intramandibular glands in primitive ants Ponerini (Ponerinae) and derivate ants Attini (Myrmicinae) was investigated. In these ants glands found were of class I, III and secretory epithelial cells with reservoir. The intramandibular glands had different morphology varying according the species, changing its location, development level and intracellular structures. Our findings suggest that the glands of the different ant tribes, produce different substances, and this may indicate different functions, according the chemical nature of cellular products. A cladistic analysis using intramandibular gland characters resulted in the separation of the two tribes, suggesting that structural differences of intramandibulars glands may contribute to phylogenetic studies of Formicidae.

## 1. INTRODUÇÃO

Hymenoptera constitui um grupo de insetos, que exibem diversidade de hábitos e complexidade de comportamentos que culminam na organização social de vespas, abelhas, e formigas, os quais são importantes na manutenção de diversos ecossistemas atuando como pragas, polinizadores, parasitóides e predadores (Wilson, 1971).

As formigas estão presentes na superfície do planeta há mais de 100 milhões de anos (Johnston *et al.*, 2001), são insetos eussociais, uma vez que seus indivíduos (i) apresentam sobreposição de gerações em um mesmo ninho; (ii) cooperam no cuidado com a prole e; (iii) dividem as tarefas de forma tal que um reduzido número de indivíduos se encarrega da reprodução, enquanto outros ajudam em tarefas como forrageio, cuidado com a prole e defesa (Wilson, 1971; Wilson & Hölldobler, 2005).

De acordo com Hölldobler & Wilson (1990), a vida em sociedade facilita a sobrevivência dos insetos, pois torna mais fácil a busca de alimento, melhora as oportunidades de defesa contra os predadores e, inclusive, pode facilitar o cuidado com a prole e a construção de abrigos. Além disso, as formigas são organismos adequados para estudos sobre padrões estruturais, temporais e processos interespecíficos dentro das comunidades, dada a sua abundância e diversidade (Fowler *et al.*, 1991). No entanto, diante da atual situação de degradação ambiental tais como fragmentação, desmatamento e queimada é necessário um estudo detalhado dos Hymenoptera, visando a sua preservação, dada a redução do número de suas espécies ao longo dos anos.

O conhecimento de características fisiológicas e morfológicas do sistema exócrino dos Hymenoptera é importante para a compreensão de aspectos comportamentais e evolutivos desses insetos. Uma das características comuns aos insetos sociais é a diversidade de glândulas exócrinas distribuídas por todo o corpo. O alto número e diversidade dessas glândulas acompanham as várias funções que suas secreções desempenham na vida dos

insetos sociais (Hölldobler & Wilson, 1990; Noirot & Quennedey, 1991; Billen & Morgan, 1998). Atualmente, esta variedade chega a um total de 105 glândulas exócrinas que podem ser distinguidas entre os vários grupos de insetos sociais (Billen, 2008). Algumas glândulas estão presentes em todos os grupos de Hymenoptera, enquanto outras têm ocorrência mais restrita e podem ser encontradas apenas em uma única espécie. A composição química da secreção e/ou da função de várias glândulas é bem documentada, enquanto para outras glândulas há apenas descrição morfológica (Billen, 2008).

As células glandulares podem apresentar-se isoladas ou agrupadas para formar glândulas multicelulares. Nas glândulas estão também presentes porções não secretoras, destinadas a conduzir a secreção produzida até um ponto específico. As glândulas exócrinas são providas de vários tipos de canais, através dos quais a secreção chega ao local de uso, ou de liberação (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

As glândulas dos insetos podem ser incluídas em três classes: A classe I é representada por células da epiderme, que se tornam secretoras, sendo suas secreções liberadas para o exterior do corpo por difusão através da cutícula. As glândulas da classe II são representadas por células cuja secreção também é eliminada para o exterior do corpo, passando através da cutícula, mas, neste caso, como a célula glandular não está em contato com a cutícula, a secreção passa antes para uma célula epidérmica. Nas glândulas da classe III as células secretoras geralmente não se encontram incorporadas à epiderme, embora sejam originadas dela. A célula secretora destacada da epiderme é geralmente esférica e provida de um canal que a liga a um poro na cutícula, onde a secreção é descarregada (Noirot & Quennedey, 1991),.

As células glandulares das classes I e II não possuem estruturas diferenciadas para a liberação da secreção, embora a quantidade de canais-poro da cutícula possa estar aumentada. As células secretoras das glândulas da classe III apresentam mecanismo

complexo de liberação de secreção. A membrana plasmática invagina-se criando um espaço extracelular onde a célula canal se associa e realiza a coleta da substância produzida, conduzindo-a para o exterior. Esse espaço, na maioria das vezes, apresenta-se como um canalículo que, aparentemente, percorre o citoplasma da célula e tem sido denominado canalículo intracelular, embora topologicamente esteja fora da célula. A membrana plasmática que limita esse espaço pode apresentar microvilosidades ou invaginações tubulares que formam um labirinto pericanalicular. (Noirot & Quenedey, 1991; Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

As formigas são especialmente ricas em glândulas exócrinas que variam na sua natureza estrutural, química e complexidade funcional (Billen & Morgan 1998; Caetano *et al.*, 2002), e esta riqueza em glândulas exócrinas talvez seja o grande ponto de seu sucesso biológico. Não é incomum, vez por outra, surgirem artigos mostrando regiões glandulares, onde nunca se imaginava tal estrutura (Caetano, 2007).

A mandíbula dos insetos é resultado da redução e conversão de uma das pernas do seu ancestral ao longo da evolução em um órgão auxiliar da alimentação (Costa-Leonardo, 1978). Nos Hymenoptera, a mandíbula, apresenta numerosas formas e funções, atingindo o seu nível mais elevado de complexidade nas formigas (Hölldobler & Wilson, 1990). Apesar da função original da mandíbula ser mecânica, por estar ligada à captura, trituração e ingestão de alimentos, as glândulas que se desenvolveram ligadas a ela, muitas vezes têm função que pouco ou nada tem a ver com a alimentação (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

Nos Hymenoptera, em geral, encontram-se dois tipos de glândulas mandibulares, as ectomandibulares ou glândulas mandibulares I e as mesomandibulares, intramandibulares ou glândulas mandibulares II. As glândulas ectomandibulares são as mais estudadas e melhor conhecidas, portanto quase sempre é a elas que se refere o conhecimento sob a

rubrica de “glândulas mandibulares”, distinguindo-as das intramandibulares (Cruz-Landim & Abdalla, 2002).

As glândulas intramandibulares enquadram-se na categoria de glândulas tegumentares e diferenciam-se também durante a pupação, juntamente com a diferenciação do tegumento das mandíbulas (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). Essas glândulas foram descritas pela primeira vez em abelha por Nedel (1960) e em formigas (*Atta sexdens rubropilosa*) por Toledo (1967).

Nedel (1960) refere-se à glândula intramandibular em abelhas como células secretoras, esféricas, isoladas, providas de canaliculos independentes (células glandulares tipo III). Costa-Leonardo (1978) estudou as glândulas intramandibulares em vários grupos de abelhas sociais, revelando a presença tanto de células glandulares tipo III, quanto de células epiteliais hipertrofiadas. Ribeiro & Caetano (2000) analisaram esse epitélio hipertrofiado da formiga *Zacryptocerus (=Cephalotes) pusilus*, e descreveram a presença de células epiteliais secretoras tipo I. Schoeters & Billen (1994) analisaram a glândula intramandibular de várias espécies de formigas, sugerindo que a glândula é simplesmente composta por células secretoras tipo III.

Estudos mais aprofundados das glândulas intramandibulares devem ser conduzidos para se determinar as funções destas glândulas (Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Amaral & Caetano, 2006). De acordo com Quenedey (1998) as células glandulares tipo III produzem feromônios de atração e repulsa. Amaral & Caetano (2006) sugeriram que a secreção liberada pelas glândulas intramandibulares estão relacionadas com a produção de enzimas, como também com a produção de muco. A liberação das secreções também pode estar relacionada com aspectos mecânicos para captura de alimentos. Glândulas intramandibulares foram relatadas em várias espécies de formigas, seu papel é incerto, mas pode-se inferir à respeito da função geral, tais como

limpeza e lubrificação das peças bucais (Schoeters & Billen, 1994; Grasso *et al.*, 2004). Pela semelhança de alguns aspectos com as células da glândula mandibular em abelhas, Cruz-Landin & Abdala (2002) propõem para as glândulas intramandibulares a produção de feromônios para a comunicação. Grasso *et al.* (2004), em seu trabalho com o parasita social (*Polyergus rufescens*), relataram que até agora a função das glândulas intramandibulares permanece desconhecida e que sua presença generalizada entre os Formicidae sugere que funcione como uma importante fonte de secreções relacionadas com aspectos gerais da biologia de formiga. Billen & Espadaler (2002) sugeriram que uma possível função para a secreção das glândulas intramandibulares em *Pyramica membranifera*, pode estar relacionada ao seu hábito predador, pois essa espécie possivelmente utiliza alomônios para atração de collembola.

Baseando-se na idéia de que as formigas se originaram de certas vespas solitárias, pode-se deduzir que o progresso de sua evolução se manifeste pelo progresso de sua vida social. As subfamílias de Formicidae não são muito distantes entre si, e provavelmente surgiram a partir dos mesmos ancestrais. Neste sentido, Ponerinae possui características mais basais, enquanto Myrmicinae possui características derivadas (Wheeler, 1910; Kusnezov, 1955; Taylor, 1978; Peeters, 1991; Wilson & Hölldobler, 2005).

O dimorfismo do sexo feminino em Ponerinae é pouco desenvolvido, sendo as rainhas e as operárias muito parecidas, salvo poucas exceções e sua comunicação química é incipiente (Wilson, 1971; Peeters & Crewe, 1984). As larvas são bastante ativas e carnívoras; as colônias são relativamente pouco populosas, há pouca cooperação entre as operárias, características estas semelhantes ao ancestral (Kusnezov, 1955; Peeters & Crewe, 1984; Wilson & Hölldobler, 2005). Provavelmente Ponerinae conservou certos aspectos ancestrais, por tratar-se de características que fornecem vantagens adaptativas, aumentando sua sobrevivência e convivência. Pode-se admitir, então, que a diversificação dentro dos

Ponerinae não a tornou muito distante morfológicamente de seu ancestral; ela parece tão antiga quanto aos outros grupos de formigas já extintos (Grimaldi *et al.*, 1997).

São típicos em Myrmicinae, Dolichoderinae e Formicinae, especializações tais como espécies granívoras, criadoras de pulgões, cultivadoras de fungos, escravagismo e parasitos sociais. A divisão de trabalho entre as operárias se encontra também relacionada com o progresso de sua vida social nas formigas, assim como, o polimorfismo das castas operárias, estruturas do ninho e outros (Wilson, 1971).

O conhecimento da morfologia interna da mandíbula de formigas pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que envolvem o sistema exócrino e suas relações com os aspectos comportamentais e filogenéticos nas diferentes subfamílias de Formicidae. O objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência de glândulas intramandibulares nas formigas primitivas Ponerini (Ponerinae) e derivadas Attini (Myrmicinae), por meio de métodos histológicos, histoquímicos e filogenéticos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

As espécies de Formicidae (casta operária) listadas na Tabela 1 foram obtidas por coletas manuais nos Estados de Minas Gerais e Bahia, e fixadas em solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967). As Attini foram identificadas e cedidas pela Professora Dra. Terezinha M. C. Della Lúcia do Laboratório de formigas cortadeiras da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As Ponerini foram levadas ao laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC), Ilhéus, Bahia, e identificadas pelo Professor Dr. Jacques H. C. Delabie.

Tabela 1. Lista de espécies de formigas analisadas e seus respectivos locais de coleta

<b>Espécies</b>	<b>Local de coleta</b>
<b>Myrmicinae</b>	
<b>Attini</b>	
<i>Acromyrmex subterraneus brunneus</i> Forel, 1911	Paraopeba-MG
<i>Acromyrmex niger</i> (Fr. Smith, 1858)	Viçosa-MG
<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> Santschi, 1925	Teixeiras-MG
<i>Atta bisphaerica</i> Forel, 1908	Teixeiras-MG
<i>Atta laevigata</i> (Fr. Smith, 1858)	Teixeiras-MG
<i>Atta sexdens rubropilosa</i> Forel, 1908	Teixeiras-MG
<b>Ponerinae</b>	
<b>Ponerini</b>	
<i>Hypoponera</i> sp.	Viçosa-MG
<i>Leptogenys arcuata</i> Roger, 1861	Ilhéus-BA
<i>Leptogenys</i> sp.	Ilhéus-BA
<i>Odontomachus haematodus</i> (Linnaeus, 1758)	Itajuípe-BA
<i>Pachycondyla</i> sp.	Ibiciuí-BA
<i>Pachycondyla crassinoda</i> (Latreille, 1802)	Porto Seguro-BA
<i>Pachycondyla harpax</i> (Fabricius, 1804)	Itajuípe-BA
<i>Pachycondyla impressa</i> Roger, 1861	Itajuípe-BA
<i>Pachycondyla stigma</i> (Fabricius, 1804)	Boa Nova-BA
<i>Pachycondyla veranae</i> (Forel, 1922)	Guaratinga-BA
<i>Pachycondyla villosa</i> (Fabricius, 1804)	Itajuípe-BA
<b>Formicinae</b>	
<i>Camponotus rufipes</i> Fabricius, 1775	Itajuípe-BA

## **2.2. Histologia**

No estudo histológico, as espécies previamente fixadas em solução Zamboni, tiveram as mandíbulas removidas. Em seguida, estas foram desidratadas em uma série de concentrações de etanol (70%, 80% e 95%) por 5 minutos em cada concentração e embebidas em historesina Leica. Após a polimerização, as peças foram seccionadas longitudinalmente, com 3 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina.

## **2.3. Histoquímica**

Algumas secções das mandíbulas foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Mercúrio-bromofenol para evidenciação de proteínas, PAS (Ácido Periódico de Schiff) para evidenciação de polissacarídeos e glico-conjugados e azul do Nilo para identificação de lipídios (Pearse, 1985).

## **2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As mandíbulas das formigas foram removidas, desidratadas em séries alcoólicas, transferidas para hexametildilazane (HMDS) durante 5 minutos e secas ao ar livre. A seguir, foram coladas em suportes de alumínio com as faces superiores e inferiores voltadas para cima, metalizadas com ouro (20 nm) e observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## **2.5. Análises filogenéticas**

A comparação das glândulas intramandibulares entre as espécies de formigas analisadas resultou em uma matriz com sete caracteres que foram avaliados para comparações filogenéticas. Os caracteres foram polarizados com base na comparação com

grupo-externo (Watrous & Wheeler, 1981; Maddison *et al.*, 1984; Nixon & Carpenter, 1993).

Os caracteres presentes no grupo-externo foram considerados como plesiomórficos e codificados como (0), (1) e (2). A análise cladística foi realizada usando-se o programa de computador PAUP, versão 4.0b10 (Swofford, 1998) com busca heurística e algoritmo TBR. Os resultados foram analisados com auxílio do programa TreeView, versão 16.6.

Os caracteres das glândulas intramandibulares avaliados foram:

- 1 - tipo do epitélio: achatado (0), cúbico (1), colunar (2);
- 2 - tamanho do núcleo das células epiteliais: grande (0), pequeno (1);
- 3 - glândula tipo III: sem vacúolo (0), muito vacuolizada (1), pouco vacuolizada (2);
- 4 - tamanho do núcleo da célula da glândula tipo III: pequeno (0), grande (1);
- 5 - reservatório glandular: ausente (0), presente (1);
- 6 - outros tipos de células: ausente (0), presente (1);
- 7 - grânulos citoplasmáticos: ausente (0), presente (1).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Histologia

De maneira geral, as glândulas intramandibulares das formigas estudadas podem ser divididas em três categorias: i) glândulas da classe I: caracterizadas por células epidérmicas que se tornam cúbicas ou colunares, ii) glândulas unicelulares da classe III: formadas por células isoladas na cavidade interna da mandíbula, caracterizadas pela presença de canalículos que se abrem em poros na superfície da mandíbula e, iii) células epiteliais secretoras com reservatório, formadas pela hipertrofia das células epidérmicas contendo um amplo reservatório em regiões específicas da mandíbula (Figura 1). Caracteristicamente, os poros das glândulas da classe III estão presentes apenas na face superior da mandíbula (Figuras. 2, 3 e 4). Entretanto, de acordo com a espécie de formiga, há variações na presença e na estrutura dos três tipos glandulares acima, as quais serão descritas a seguir.

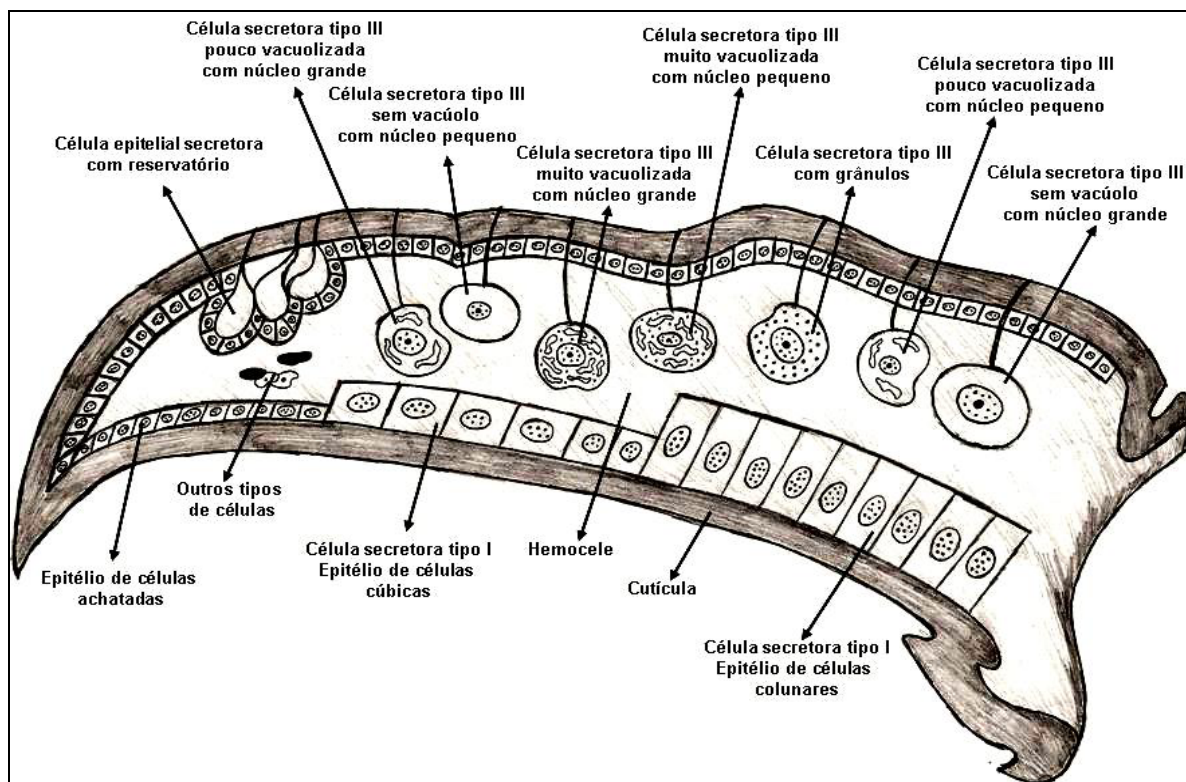
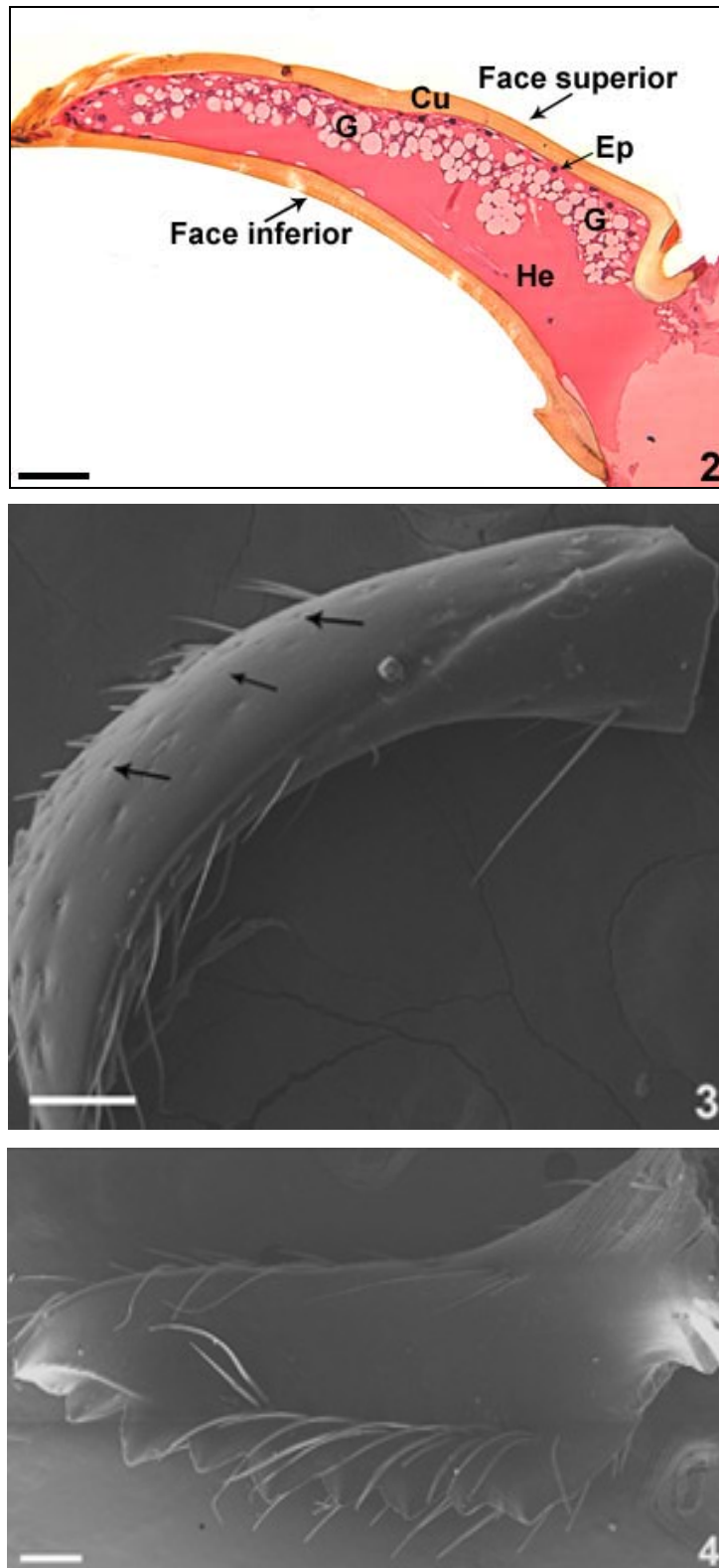


Figura 1: Detalhe das estruturas intramandibulares de formigas. Desenhado sem escala.

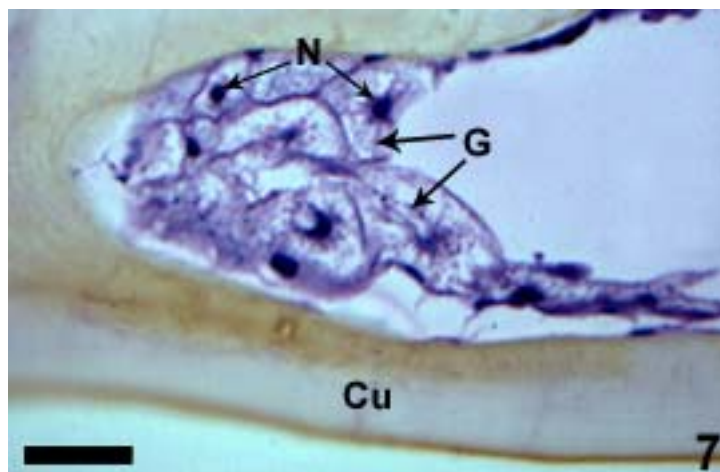
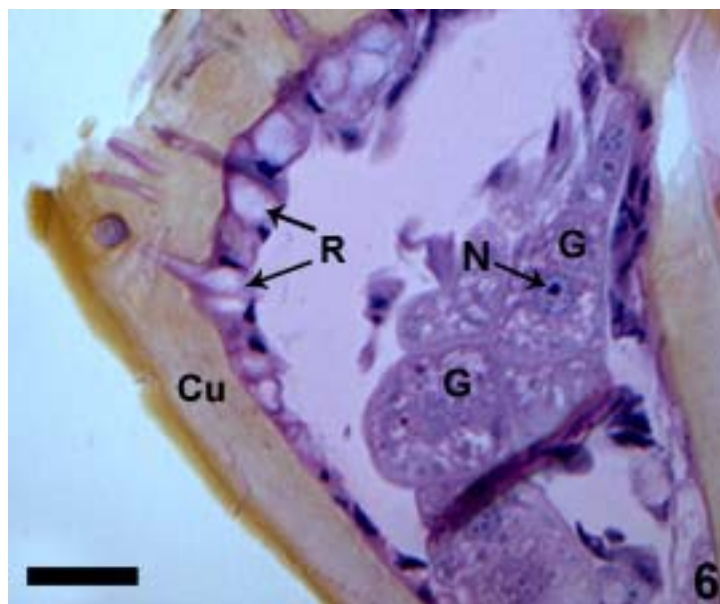
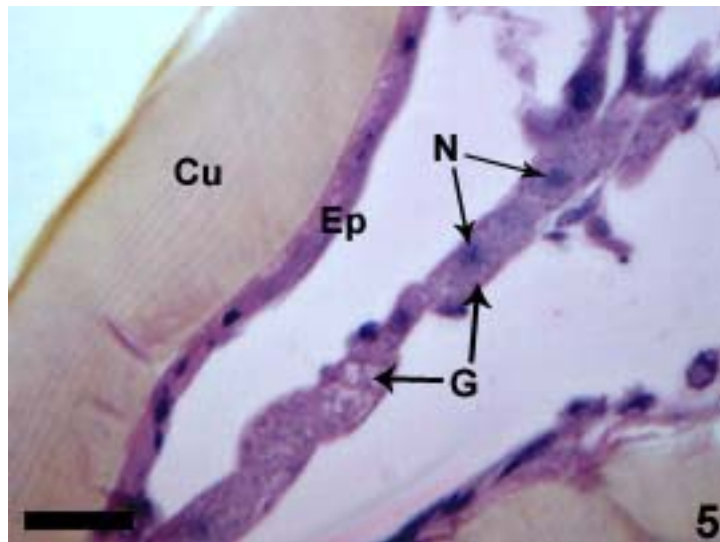


Figuras 2-4: Mandíbulas de formiga. 2: Secção longitudinal da mandíbula de *Leptogenys* sp. Barra= 100  $\mu\text{m}$ . 3: Face superior da mandíbula de *Leptogenys* sp. vistas ao MEV mostrando os poros externos (setas). Barra= 100  $\mu\text{m}$ . 4: micrografia mostrando a face inferior da mandíbula de *Pachycondyla crassinoda* evidenciando a ausência de poros. Barra= 200  $\mu\text{m}$ . Cu: cutícula, Ep: epitélio, G: glândula intramandibular, He: hemocele.

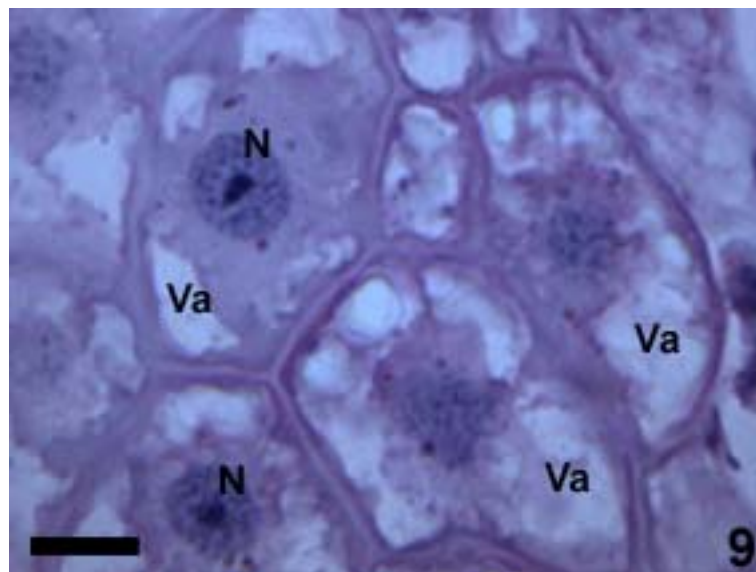
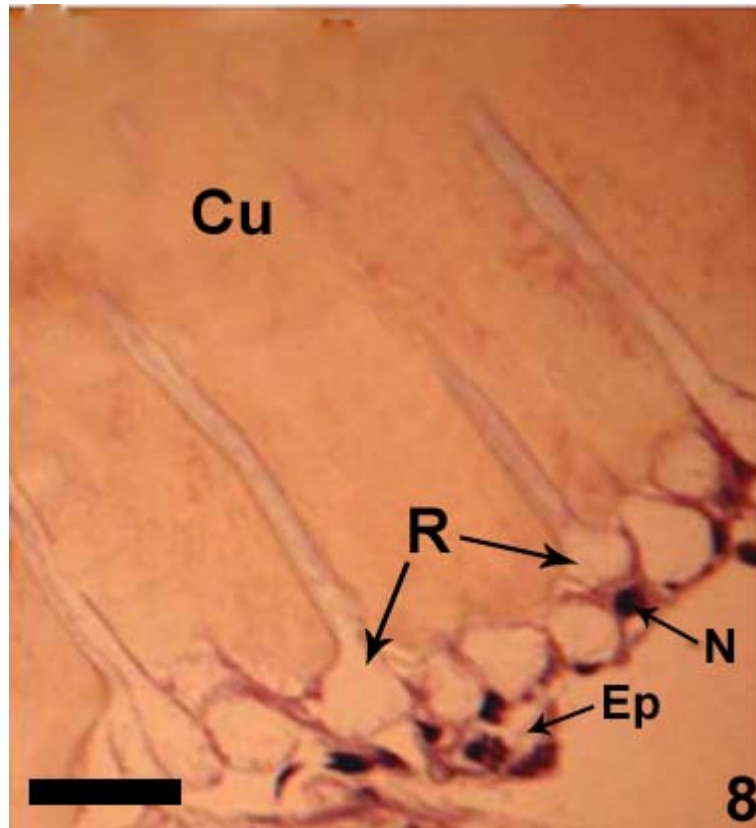
Na Tribo Attini, todas as espécies de *Acromyrmex* e *Atta* estudadas apresentaram a epiderme intramandibular, formada por células achatadas, glândula epitelial com reservatório (Figuras 5 e 6) e glândulas unicelulares com células secretoras tipo III (Figura 7).

Nas células achatadas do epitélio intramandibular de *Acromyrmex*, foram evidenciados núcleos celulares pequenos em relação as suas células correspondentes em *A. subterraneus brunneus* e *A. niger*, enquanto que *A. subterraneus molestans* apresentou células com núcleo mais volumoso. Em certas regiões do epitélio intramandibular as células achatadas tornam-se hipertrofiados, apresentando assim, reservatório. Essa característica glandular, foi identificada em todas as espécies de *Acromyrmex*. Em *A. subterraneus molestans* e *A. subterraneus brunneus* o núcleo da célula secretora tipo III é bem desenvolvido relativamente, e a cromatina é predominantemente descondensada em todas as espécies (Figura 6). As células secretoras tipo III, apresentam-se muito vacuolizadas apenas em *A. niger*, com a presença de núcleo menor em relação às outras espécies (Figura 7). Com exceção de *A. subterraneus brunneus*, as células secretoras tipo III das demais espécies apresentam acúmulo de grânulos secretores no citoplasma. Outros tipos de células, provavelmente hemócitos e trofócitos foram observados no interior da mandíbula de *A. niger* e *A. subterraneus molestans*.

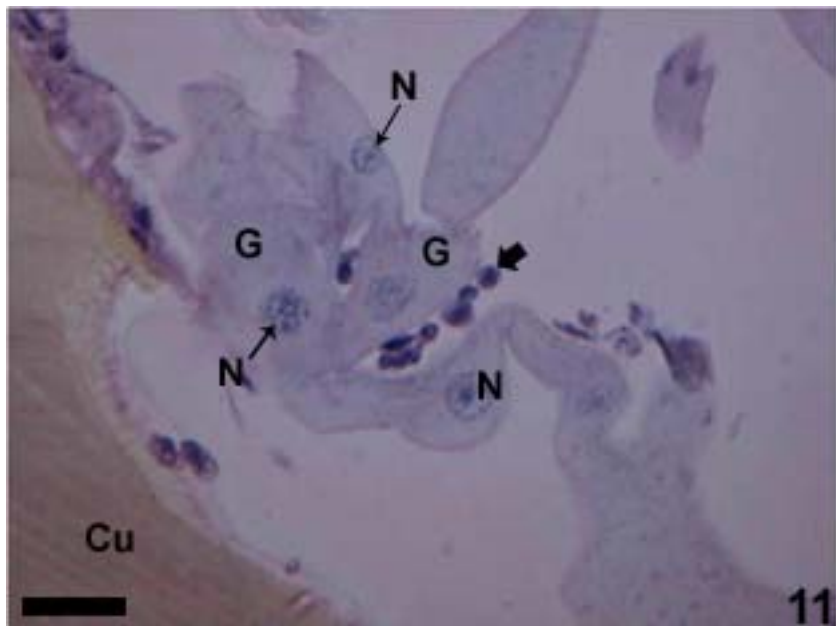
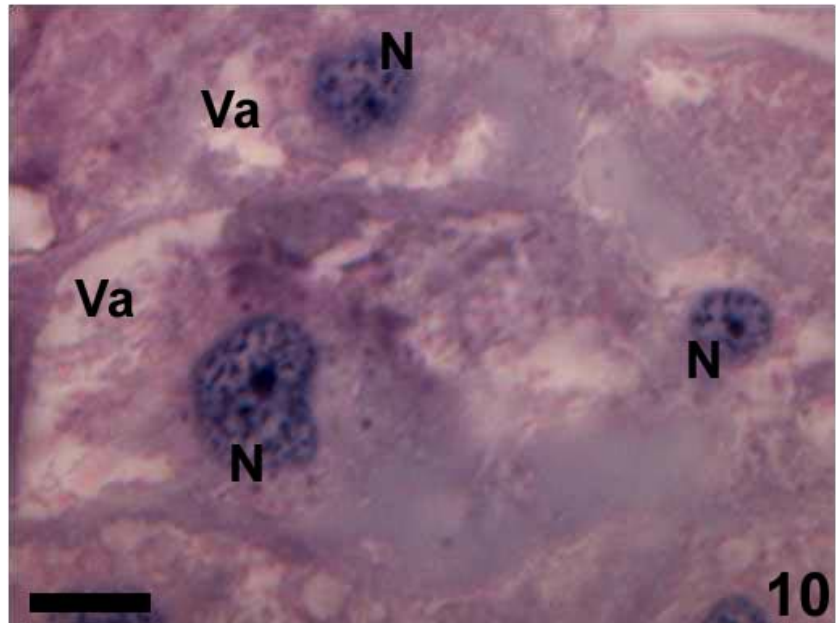
As espécies de *Atta* apresentam células epiteliais secretoras com reservatório (Figura 8). As células secretoras tipo III, apresentam-se muito vacuolizadas em *A. bisphaerica* (Figura 9), pouco vacuolizada em *A. laevigata* e sem vacúolos em *A. sexdens rubropilosa* (Figuras 10 e 11). O núcleo da célula secretora tipo III apresenta predomínio de cromatina descondensada (Figuras. 9, 10, 11) em todas as espécies, e seu volume é menor em *A. laevigata* em relação às demais espécies. Não foi observada a presença de grânulos no citoplasma das células glandulares tipo III nas espécies de *Atta*.



Figuras 5-7: Secções histológicas da mandíbula em espécies de *Acromymex*. 5: Detalhe do epitélio achatado (Ep) em *A.subterraneus brunneus*; 6: Células glandulares com reservatórios (R) e células glandulares tipo III (G) em *A. subterraneus molestans*; 7: células glandulares do tipo III (G) muito vacuolizadas em *A. niger*. Barra: 5µm. N: núcleo, Cu: cutícula.



Figuras 8 e 9: Secções histológicas da mandíbula em espécies de *Atta*. 8: Reservatórios glandulares (R) no epitélio de *A. laevigata*. Barra= 10µm; 9: Células glandulares tipo III muito vacuolizadas (Va) e com núcleo (N) desenvolvido em *A. bisphaerica*. Barra:5µm. Cu: cutícula, Ep: epitélio.



Figuras 10 e 11: Secções histológicas das mandíbulas de espécies de *Atta*. 10: Células tipo III pouco vacuolizadas (Va) em *A. laevigata*. Barra= 10 $\mu$ m. 11: Células glandulares tipo III (G) sem vacúolo e presença de hemócitos (seta larga) em *A. sexdens rubropilosa*. Barra= 5 $\mu$ m. Cu: cutícula, N: núcleo.

Em todas as espécies de *Atta* foram observados outros tipos de células no interior da mandíbula, provavelmente hemócitos e trofócitos no interior da mandíbula (Figura 11). Em todas as espécies de Attini, a saída da secreção é através de poros presentes na face superior da mandíbula.

Dentre os Ponerini, *Hypoponera* sp. apresentou epitélio com células cúbicas caracterizando células secretoras do tipo I (Figura 12) e células secretoras tipo III muito vacuolizadas (Figura 13). Os núcleos das células secretoras tipo I e III apresentam cromatina descondensada e aparência volumosa (Figura 13); grânulos são vistos espalhados por todo o citoplasma das células secretoras tipo III (Figura 14).

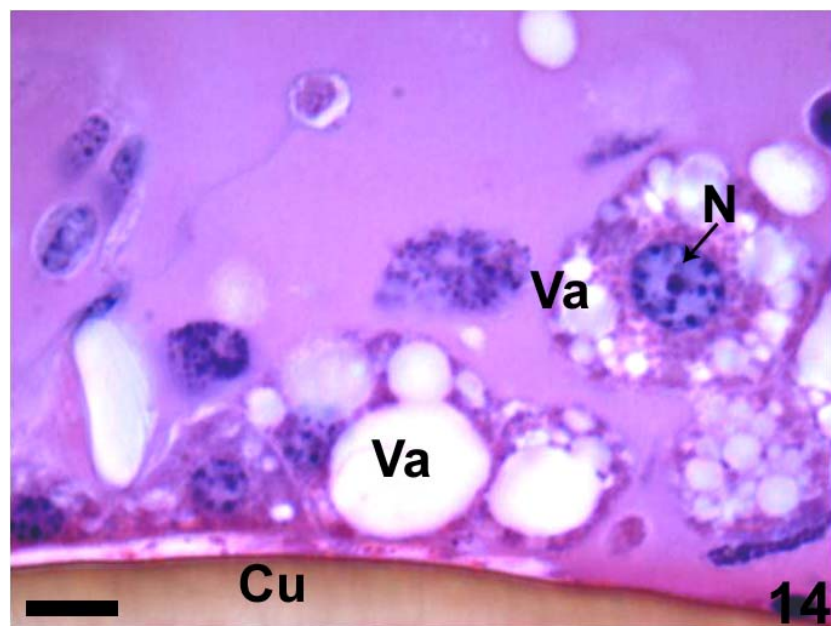
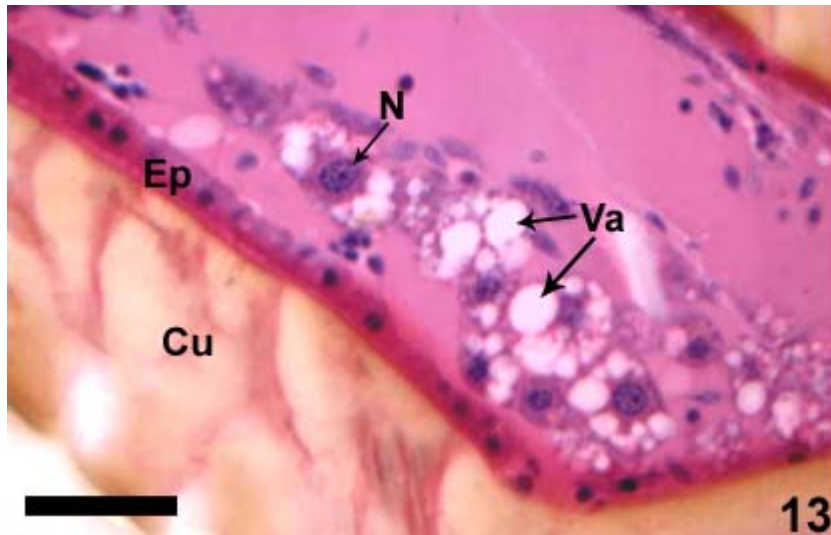
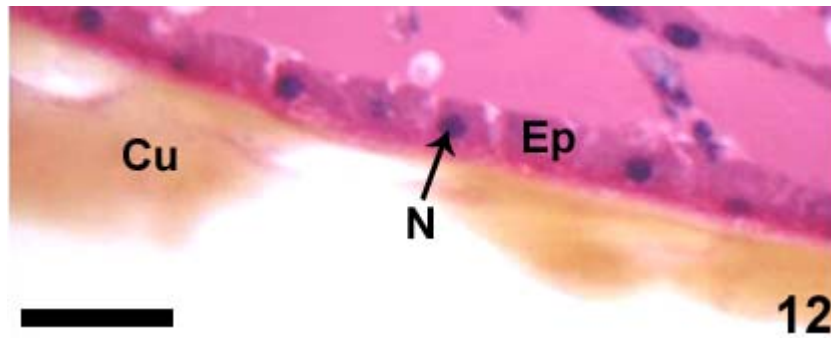
As duas espécies de *Leptogenys* apresentaram epiderme intramandibular achatada com núcleos volumosos e as células secretoras do tipo III são muito vacuolizadas e os respectivos núcleos celulares com cromatina descondensada (Figura 15). Em *Leptogenys* sp. foram vistos grânulos no citoplasma das células secretoras tipo III (Figura 16) e outros tipos de células, provavelmente hemócitos e trofócitos no interior da mandíbula.

Nas espécies de *Pachycondyla* a epiderme é formado por células achatadas em *Pachycondyla* sp. e *P. stigma* (Figura 17), células cúbicas (células glandulares tipo I) em *P. veranae* e *P. villosa* (Figura 18) e células colunares (também células glandulares tipo I), em *P. crassinoda*, *P. harpax* e *P. impressa* (Figura 19). Nas células glandulares do tipo I, o núcleo tem aparência volumosa em todas as espécies estudadas.

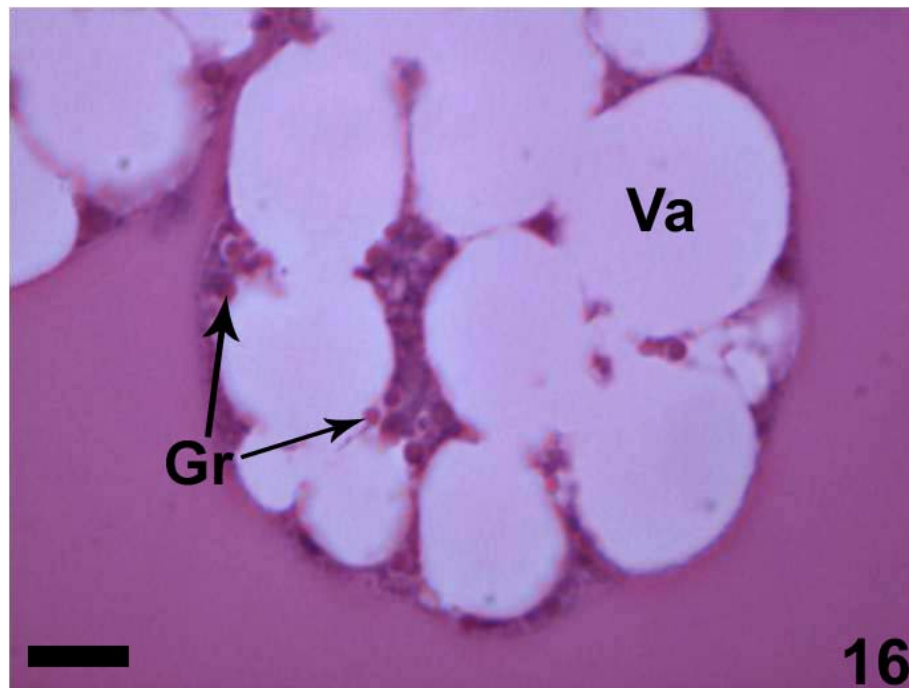
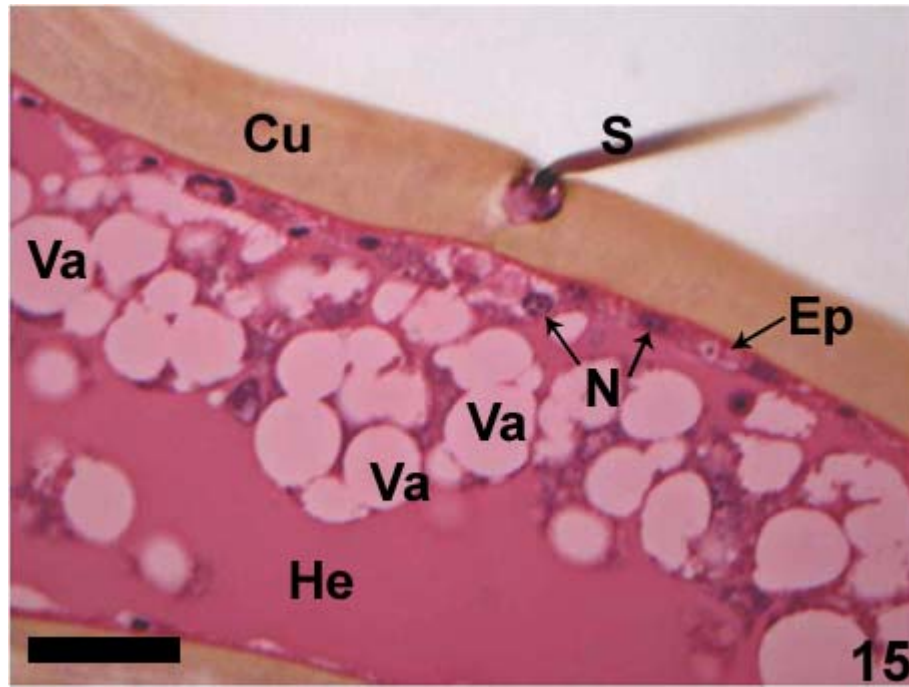
As células secretoras do tipo III, apresentaram-se muito vacuolizadas em *Pachycondyla* sp., *P. crassinoda*, *P. harpax*, *P. veranae* e *P. villosa* (Figuras 17 e 20). Somente em *P. impressa* e *P. stigma* não são vistos vacúolos (Figura 21). O tamanho do núcleo da célula glandular tipo III é menor em *P. crassinoda*, *P. harpax*, *P. stigma* e *P. villosa* em relação núcleo de *Pachycondyla* sp., *P. impressa* e *P. veranae*. Grânulos no citoplasma das células secretoras tipo III foram observados em *P. crassinoda*, *P. harpax* e *P.*

*stigma* (Figura 22). Outros tipos de células, provavelmente hemócitos e trofócitos, foram vistos em *P. crassinoda*, *P. impressa*, *P. stigma* e *P. veranae*. Em todas as espécies de *Pachycondyla*, os núcleos das células secretoras do tipo I e III apresentaram cromatina predominantemente descondensada (Figuras 17 e 19).

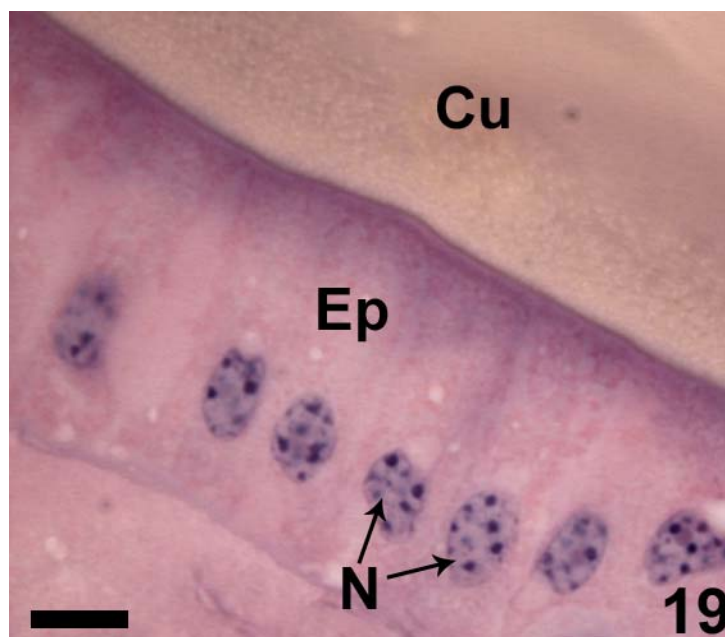
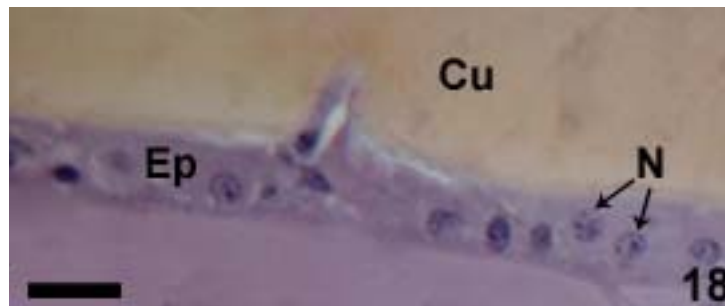
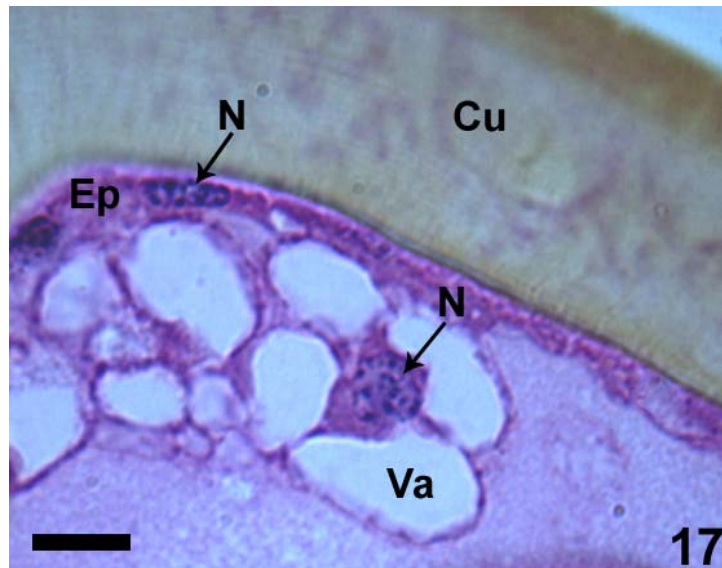
Em nenhuma espécie de Ponerini foram observadas células epiteliais glandulares com reservatório.



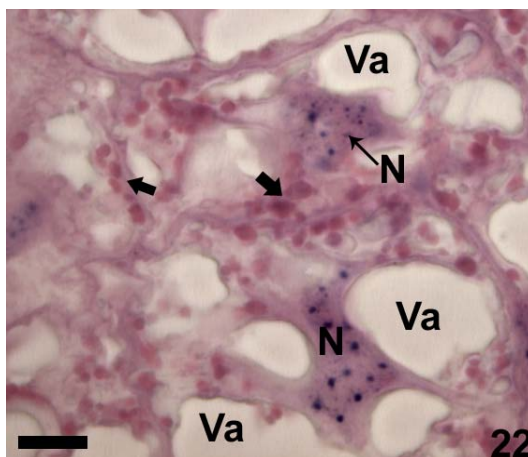
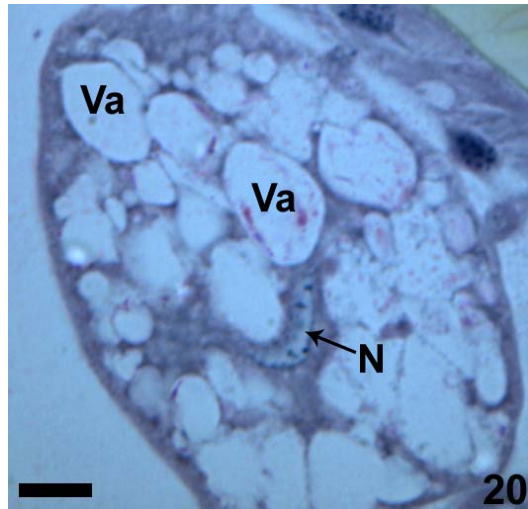
Figuras 12-14: Secções histológicas das mandíbulas de *Hypoponera* sp. 12: Epitélio glandular cúbico (Ep). Barra= 10 $\mu$ m. 13: Célula glandular tipo III muito vacuolizada (Va). Barra= 10 $\mu$ m. 14: Detalhe dos vacúolos (Va) da célula glandular tipo III. Barra= 10 $\mu$ m. Notar núcleos (N) bem desenvolvidos e com cromatina descondensada nos diversos tipos glandulares. Cu: cutícula.



Figuras 15-16: Secções histológicas das mandíbulas em espécies de *Leptogenys*. 15: Epiderme com células cúbicas (Ep) e células glandulares tipo III muito vacuolizadas (Va) em *L. arcuata*. Barra= 10µm. 16: Detalhe da célula glandular evidenciando a presença dos grânulos (Gr). Barra= 10µm. Cu: cutícula, He: Hemocele, N: núcleo, S: sensila.



Figuras 17-19: Secções histológicas das mandíbulas em espécies de *Pachycondyla*. 17: Epiderme com células achatadas (Ep) e células glandulares tipo III muito vacuolizadas (Va) e núcleo grande (N) em *Pachycondyla* sp. Barra= 10 $\mu$ m. 18: Epitélio cúbico (Ep) com núcleo (N) bem desenvolvido em *P. veranae*. Barra= 5 $\mu$ m. 19: Epitélio colunar (Ep) com núcleos grandes (N) em *P. crassinoda*. Cu: cutícula. Barra= 10 $\mu$ m.



Figuras 20- 22: Secções histológicas das mandíbulas em espécies de *Pachycondyla*. 20: glândulas intramandibulares tipo III, muito vacuolizada (Va) e núcleos pequenos (N) com predomínio de cromatina descondensada em *P. harpax*. Barra= 10 $\mu$ m. 21: Células glandulares tipo III (G) sem vacúolo, núcleo amebóide (N) bem desenvolvido em *P. impressa*. Barra= 5 $\mu$ m. 22: Detalhe dos grânulos citoplasmáticos (setas largas) e vacúolos (Va) nas células glandulares tipo III, em *P. crassinoda*. Núcleo grande com cromatina descondensada (N). Barra=10 $\mu$ m.

### 3.2 Histoquímica

O teste histoquímico com mercúrio-bromofenol para proteínas e PAS para evidenciação de carboidratos foi positivo para células secretoras tipo III em todas as espécies de Attini (Figuras 23 e 24). Entretanto, o teste com azul do Nilo não evidenciou lipídios apenas nas células glandulares tipo III em *A. sexdens rubropilosa* (Figuras 25).

Os resultados histoquímicos com azul do Nilo, PAS e mercúrio bromofenol para as seis espécies de Ponerini foram semelhantes para ambas as células secretoras tipo I e III. Sendo assim, a presença de lipídio foi positiva em: *Hypoponera* sp., *P. crassinoda*, *P. veranae* e *P. villosa* (Figura 26). A positividade de carboidrato foi apenas para *P. veranae*, e a marcação de proteína foi negativa somente para esta espécie.

Para as espécies de Ponerini que apresentaram apenas células glandulares tipo III, o teste com azul do Nilo foi positivo em *Pachycondyla* sp., *P. stigma*, *Leptogenys* sp., *L. arcuata* e *O. haematodus*. O PAS foi positivo em *P. stigma* e o teste com mercúrio-bromofenol mostrou a presença de proteínas em *Leptogenys* sp., *L. arcuata* e *O. haematodus* (Figura 27).

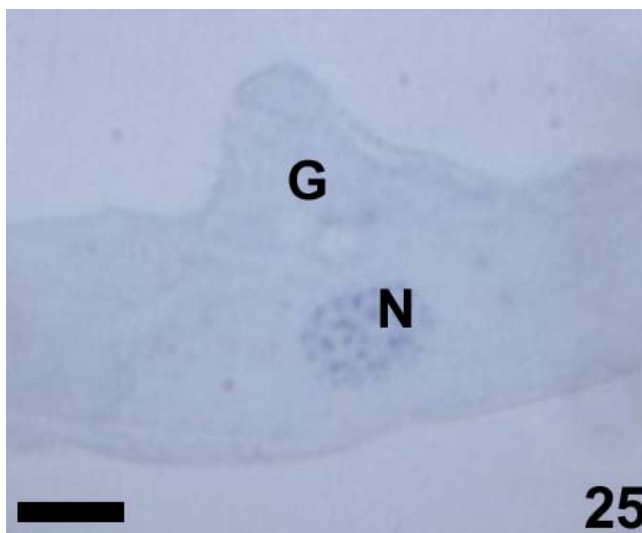
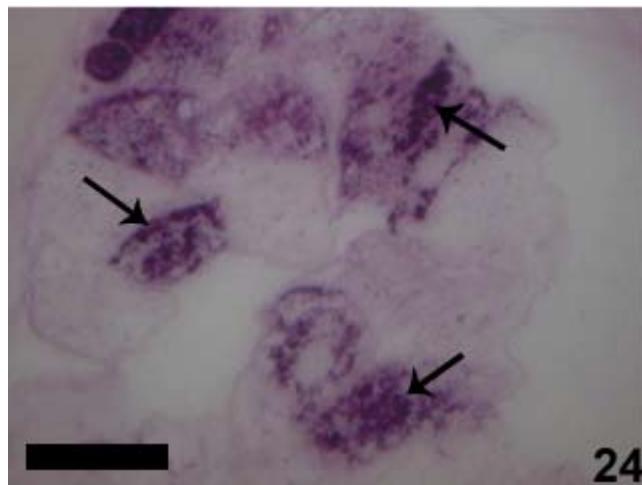
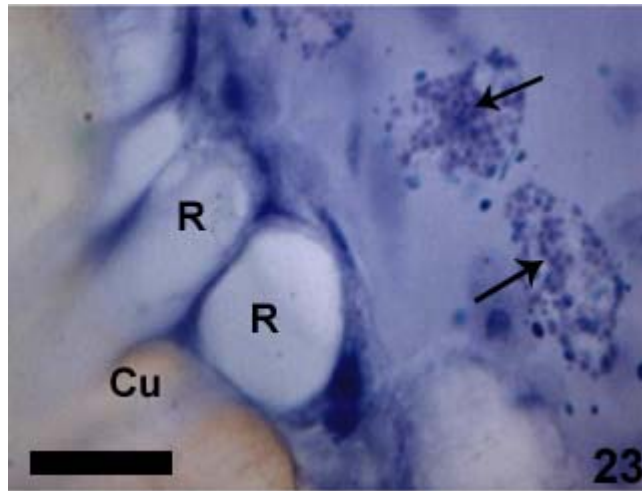
Não foi possível realizar os testes para evidenciar carboidratos em *L. arcuata* e *Leptogenys* sp; e para proteína em *Pachycondyla* sp. e *P. crassinoda*.

Os resultados dos três testes histoquímicos realizados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos nas diferentes glândulas intramandibulares de espécies de formigas Attini e Ponerini

Tribo/Espécie	Células secretoras tipo I			Células secretoras tipo III		
	Lipídio	Carboidrato	Proteína	Lipídio	Carboidrato	Proteína
<b>Attini</b>						
<i>Acromyrmex subterraneus</i>						
<i>brunneus</i>	na	na	na	+	+++	+++
<i>Acromyrmex niger</i>	na	na	na	+	++	+
<i>Acromyrmex subterraneus</i>						
<i>molestans</i>	na	na	na	++	+++	+
<i>Atta bisphaerica</i>	na	na	na	++	+	+
<i>Atta laevigata</i>	na	na	na	+	+++	++
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	na	na	na	-	+	+
<b>Ponerini</b>						
<i>Hypoponera</i> sp.	+	-	+	+	-	+
<i>Leptogenys arcuata</i>	na	na	na	+	nr	+
<i>Leptogenys</i> sp.	na	na	na	+	nr	++
<i>Odontomachus haematodus</i>	-	-	na	+	-	+
<i>Pachycondyla</i> sp.	na	na	na	+	-	nr
<i>Pachycondyla crassinoda</i>	++	-		+	-	nr
<i>Pachycondyla harpax</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Pachycondyla impressa</i>	-	-	+++	-	-	+++
<i>Pachycondyla stigma</i>	na	na	-	+	+	-
<i>Pachycondyla veranae</i>	++	+	-	+	+	-
<i>Pachycondyla villosa</i>	++	-	+	++	-	++

- ausência de reação, + reação fracamente positiva, ++ reação positiva, +++ reação fortemente positiva, na – não se aplica, nr – não realizado.



Figuras 23-25: Secções histológicas das mandíbulas com testes histoquímicos. 23. Reação positiva para proteínas (mercúrio-bromofenol) (seta) em células secretoras tipo III em *Atta laevigata*. Barra= 10 $\mu$ m. 24: Reação positiva para carboidratos (PAS) (seta) em *Acromyrmex subterraneus brunneus*. Barra= 10 $\mu$ m. 25: Reação negativa para detecção de lipídios (azul do Nilo) em *Atta sexdens rubropilosa* Barra= 10 $\mu$ m. Cu: cutícula, G: glândula, N: núcleo, R: reservatório.

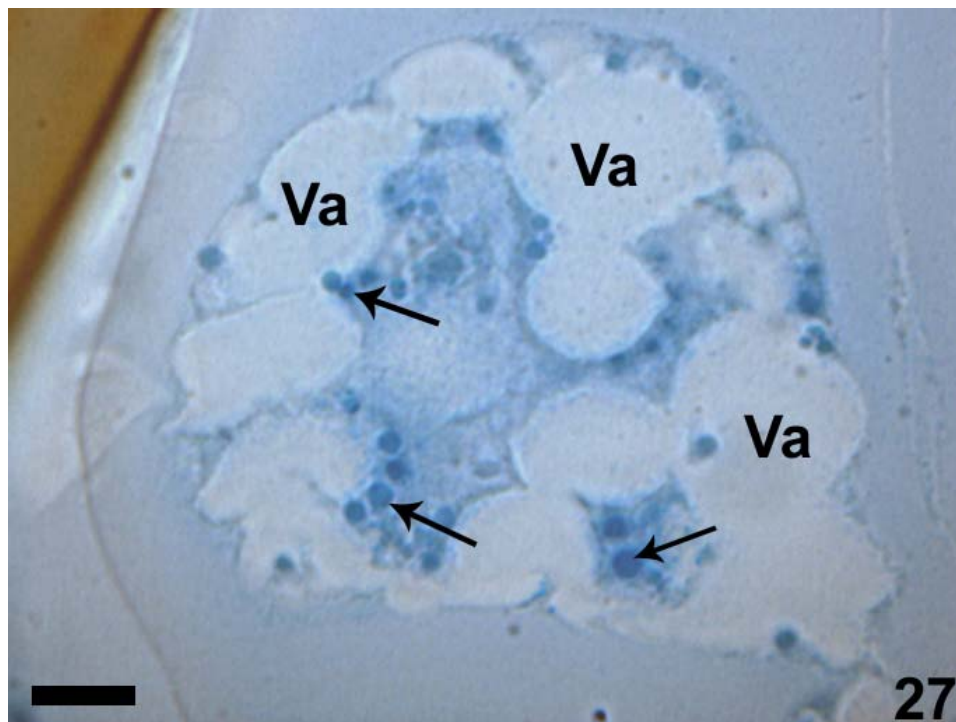
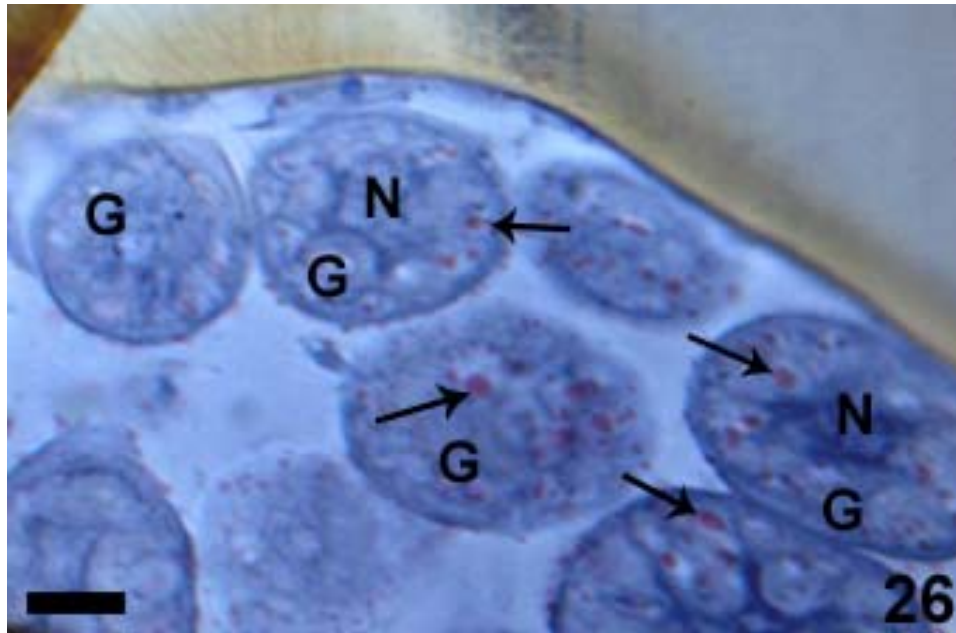


Figura 26 e 27: Secções histológicas das mandíbulas com testes histoquímicos. 26. Reação positiva para lipídio (azul do Nilo) (seta) em células secretoras tipo III em *P. crassinoda*. Barra= 5 $\mu$ m. 27: Reação positiva para proteínas (mercúrio-bromofenol) (seta) em células secretoras tipo III em *Leptogenys* sp. Barra= 10 $\mu$ m. G: glândula, N: núcleo, Va: vacúolo.

### 3.3 Análises filogenéticas

Os caracteres avaliados das glândulas intramandibulares têm a sua distribuição entre as espécies estudadas listadas na Tabela 3. A análise de parcimônia resultou em 75 árvores, sendo a árvore de consenso mostrada na Figura 29.

De acordo com a topologia resgatada, pode-se observar a formação de uma politomia agrupando todas as espécies utilizadas, com exceção de *Camponotus*, que foi utilizado como grupo externo. Essa politomia indica a não resolução desses grupos, não indicando nenhum tipo de padrão a partir de tal ancestral. Apesar da politomia, pode-se observar três clados diferenciados, um contendo espécies de Attini, que é suportado pela presença de glândulas intramandibulares com reservatório (caracter 5) e os outros dois com espécies de Ponerini, sendo o clado *Leptogenys*, *P. crassinola*, *P. harpax* e *P. stigma* suportado pela presença de grânulos citoplasmáticos (caracter 7).

Dentro do clado de Attini, houve o agrupamento de *A. subterraneus brunneus* e *A. laevigata*, com *A. sexdens rubropilosa* como grupo irmão. Para Ponerinae, houve a distinção de dois clados, e dentro de cada um desses clados, houve a presença de nova politomia. As duas espécies de *Leptogenys* estudadas não permaneceram no mesmo clado, assim como as espécies de *Pachycondyla*. Dentre essas espécies, houve o agrupamento de *P. impressa* e *P. veranae* em um clado e *P. crassinola* e *P. harpax* em outro. Para as outras espécies não se pode observar uma resolução, devido à presença de politomias anteriormente citadas.

Tabela 3. Matriz de caracteres e estados de caracteres quanto às características morfológicas intramandibulares das espécies de Attini e Ponerini estudadas

Espécie	Caracteres						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Acromyrmex subterraneus brunneus</i>	0	1	2	1	1	0	0
<i>Acromyrmex niger</i>	0	1	1	0	1	1	1
<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	0	0	2	1	1	1	1
<i>Atta bisphaerica</i>	0	1	1	1	1	1	0
<i>Atta laevigata</i>	0	1	2	0	1	1	0
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	0	1	0	1	1	1	0
<i>Hypoponera</i> sp.	1	0	1	1	0	1	1
<i>Leptogenys arcuata</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Leptogenys</i> sp.	0	0	1	0	0	1	1
<i>Odontomachus haematodus</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>Pachycondyla</i> sp.	0	0	1	1	0	0	0
<i>Pachycondyla crassinoda</i>	2	0	1	0	0	1	1
<i>Pachycondyla harpax</i>	2	0	1	0	0	0	1
<i>Pachycondyla impressa</i>	2	0	0	1	0	1	0
<i>Pachycondyla stigma</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pachycondyla veranae</i>	1	0	1	1	0	1	0
<i>Pachycondyla villosa</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>Camponotus rufipes</i>	0	0	1	1	0	1	1

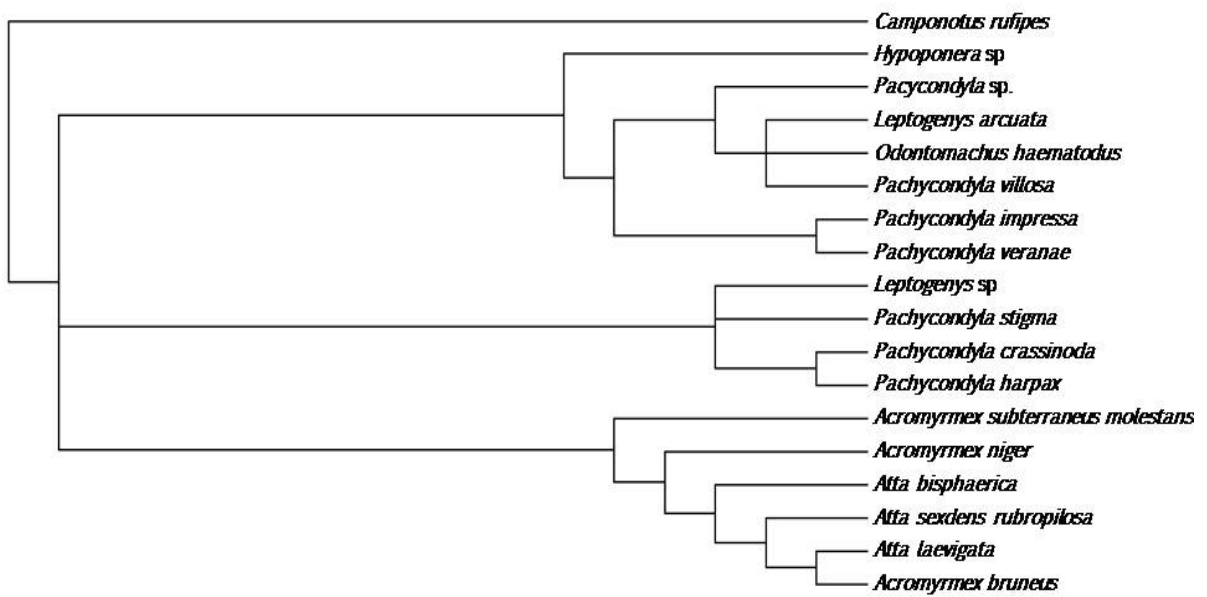


Figura 29- Relações filogenéticas entre espécies das Myrmicinae e Ponerinae baseadas nas características das glândulas intramandibulares.

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as glândulas intramandibulares apresentaram células secretoras tipo I e III segundo classificação de Noirot & Quennedey (1974, 1991) e suas substâncias são liberadas para o meio externo através de poros cuticulares e canais condutores que se abrem nos poros das cutículas, respectivamente, e células epiteliais secretoras com reservatórios, reconhecidas por Amaral & Caetano (2006) e Billen (2008). As glândulas intramandibulares apresentam histologia distinta em todas as espécies estudadas, variando a sua localização, grau de desenvolvimento, estruturas internas e substâncias químicas. Em Formicidae, as glândulas intramandibulares foram relatadas em várias espécies, porém seu papel é incerto (Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Grasso *et al.*, 2004; Amaral & Caetano, 2006,).

A ocorrência de células secretoras tipo I e III em uma mesma região do corpo foram relatadas em abelhas (Costa-Leonardo, 1978; Smith *et al.*, 1993; Wossler & Crewe, 1999; Wossler *et al.*, 2000; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Romani *et al.*, 2002, 2003), vespas (Romani *et al.*, 2005) e formiga (Silva *et al.*, 2006). Este trabalho corrobora os trabalhos acima citados, porém, diferem daqueles realizado por Schoeters & Billen (1994) que afirmam que a glândula intramandibular em formigas é simplesmente composta por células secretoras tipo III em 11 subfamílias de formigas.

Billen & Espadaler (2002) relataram pela primeira vez a ocorrência de célula secretora tipo I (intramandibular) em *Pyramica membranifera* (Myrmicinae: Dacetini). No presente trabalho, algumas espécies de Ponerini apresentaram esse tipo de célula glandular, tais como: *Hypoponera* sp., *P. crassinoda*, *P. harpax*, *P. impressa*, *P. veranae* e *P. villosa*. A glândula tipo I pode estar relacionada com secreções de substâncias para a alimentação, uma vez que *P. membranifera* e as espécies de Ponerinae supracitadas são predadoras (Bolton, 1998), e as espécies de Attini aqui estudadas, que se alimentam de fungos em nenhum caso

apresentou células tipo I. Billen & Espadaler (2002), além de ressaltarem que as células secretoras intramandibulares estão associadas ao hábito predador em Dacetini, sugerem que as células epiteliais glandulares tipo I podem ser fonte de alomônios.

Somente as espécies de Attini estudadas apresentaram células epiteliais secretoras com reservatório, juntamente com células secretoras tipo III, conforme observado por Amaral & Caetano (2006). Estes estudaram a glândula intramandibular de *A. sexdens rubropilosa* e identificaram que a espécie apresenta uma epiderme de células achatadas, com certas regiões hipertrofiadas, caracterizando células epiteliais secretoras com reservatório e as células secretoras tipo III, presentes no interior da mandíbula. A abertura das células glandulares secretoras de diferentes classes em um reservatório comum, pode resultar em liberação de diferentes substâncias na secreção (Staddon, 1979), mas quando classes de células glandulares diferentes não têm um reservatório comum suas secreções podem ter diferenças de volatilidade e / ou no tempo de liberação (Romani *et al.*, 2005).

Em Attini, as células glandulares tipo III apresentam alguns vacúolos e citoplasma contendo proteínas, lipídios e carboidratos, sugerindo alta atividade secretora destas células. A presença de todas essas substâncias químicas provavelmente ocorre pelo fato das Attini possuírem espécies de maior complexidade com respeito ao número de indivíduos por colônia, sofisticação do ninho e divisão de trabalho e utilizarem para sua comunicação quase que exclusivamente, os sinais químicos (Jaffé, 1984b).

Os resultados histoquímicos das células glandulares tipo I e III foram similares para todas as espécies de Ponerini. Em nenhuma das espécies houve a presença de carboidrato e proteína juntos no citoplasma das células glandulares; no entanto, houve predominância de proteína e lipídio nessas células. A reação positiva do mercúrio bromofenol e azul do Nilo evidenciando a predominância de proteína e lipídio respectivamente, no citoplasma nas células secretoras tipo I e III se deve, provavelmente, às proteínas que fazem parte da

maquinaria metabólica da glândula, mostrando a existência de um aparato sintetizante bem desenvolvido. Sendo assim, sugere-se que as glândulas em *Ponerini* liberam substâncias que são de natureza protéica e/ou lipoproteica. Apenas em *P. veranae* e *P. stigma* houve positividade para PAS, porém esta se mostrou fracamente positiva, o que pode ser devido a outros componentes glicoprotéicos que não as substâncias secretadas.

O alto número de glândulas exócrinas acompanha as várias funções que suas secreções desempenham em relação às características morfológicas. De acordo com Quennedey (1998), as células glandulares tipo III produzem feromônios de atração e repulsa. Amaral & Caetano (2006) sugerem que, pelo fato da célula secretora tipo III ter resultado em uma forte positividade para carboidratos e proteínas, a secreção liberada por esse tipo de célula está relacionada com a produção de enzimas, como também com a produção de muco. Schoeters & Billen (1994) afirmaram que as células glandulares tipo III estão diretamente relacionadas com liberação de todas as secreções da glândula intramandibular. Contrariamente, Amaral & Caetano (2006) propõem que as células secretoras presentes no epitélio cuticular da mandíbula (tipo I), são os principais responsáveis para liberação das secreções das glândulas intramandibulares.

No abdômen de abelhas, são encontradas glândulas tipo I e III para liberação hidrocarbonetos, álcoois e ácidos graxos utilizados na comunicação desses insetos (Smith et al., 1993; Wossler & Crewe, 1999; Wossler et al., 2000). Em formigas, hidrocarbonetos cuticulares são utilizados para o reconhecimento de coespecíficos (Hölldobler & Wilson, 1990). Sendo assim Silva et al. (2006) sugeriram que as glândulas antenais tipo I e III de *Dinoponera lucida*, podem desempenhar um papel na produção de pelo menos, alguns destes hidrocarbonetos cuticulares.

Grasso et al. (2004), em seu trabalho com a parasita social *Polyergus rufescens* identificaram a presença de células glandulares tipo III e relataram que até agora a função

das glândulas intramandibulares permanece desconhecida e que sua presença generalizada entre os Formicidae, funciona como importante fonte de secreções relacionadas com aspectos gerais da sua biologia. O fato de todas as Attini e Ponerini aqui estudadas possuírem células glandulares tipo III sugere que provavelmente essa glândula está relacionada com funções comuns aos Formicidae, assim como fisiológicas (alimentação, limpeza e hidratação) e/ou comportamentais (comunicação). Attini e Ponerini são considerados grupos derivados e basais de formigas respectivamente, (Wheeler, 1910; Kusnezov, 1955; Taylor, 1978; Peeters, 1991; Wilson & Hölldobler, 2005). A evolução de sua comunicação é uma adaptação das colônias para explorar recursos tróficos no habitat (Fowler *et al.*, 1991). Para as duas tribos estudadas, existem dois tipos de marcação de trilha distinta: trilha exploratória, e trilha de recrutamento (Wilson, 1963). A primeira é encontrada em formigas de correição entre as Ponerinae e Dorylinae e são depositadas mais ou menos continuamente, por operárias que estão explorando na vanguarda, e a segunda, encontrada em Myrmicinae, Dolichoderinae e Formicinae (Wilson, 1971). As trilhas de recrutamento são depositadas somente por operárias que estão retornando ao ninho após a descoberta de alimento. Provavelmente essas substâncias possuem concentrações e compostos químicos diferentes.

Alguns estudos em formigas utilizam estruturas específicas para elaboração de novas hipóteses em evolução e filogenia (Gotwald, 1969; Hermann, 1969; Hashimoto, 1991a, 1991b, 1996 e Perrault, 1999). Diante dos resultados aqui encontrados, sugere-se que as diferenças estruturais das glândulas intramandibulares possam contribuir para estudos filogenéticos de Formicidae. No entanto, algumas dessas diferenças podem estar envolvidas com a idade e o estado fisiológico do inseto, como por exemplo, a vacuolização das células glandulares intramandibulares, influenciando na colocação das espécies dentro da árvore filogenética. Apesar da ocorrência de politomias na análise filogenética indicarem uma não

resolução dos grupos de Attini e Ponerini, os cladogramas separaram as duas tribos pertencentes às duas subfamílias, e isso pode ser causado pela presença de características como, a presença exclusiva de células epiteliais secretoras com reservatórios nas Attini, e os diferentes tipos de células epiteliais nas Ponerinae. Sugere-se que trabalhos futuros sejam realizados, utilizando um número maior de caracteres morfológicos intramandibulares, com padronização do estado fisiológico, idade e hábitos alimentares, a fim de se obter uma resolução mais definida para a separação desses grupos. Possivelmente naturezas químicas de constituintes celulares possam suportar de forma mais eficiente a resolução desses grupos estudados, conforme observado em vespas Bethyridae (Goulbault *et al.*, 2008).

A morfologia, ultra-estrutura e fisiologia das glândulas intramandibulares já foram estudadas em várias espécies de Hymenoptera (Nedel, 1960; Toledo, 1967; Costa-Leonardo, 1978; Schoeters & Billen, 1994; Ribeiro & Caetano, 2000; Billen & Espadaler, 2002; Cruz-Landin & Abdalla, 2002; Grasso *et al.*, 2004; Amaral & Caetano, 2006), mas nenhum trabalho compara as estruturas intramandibulares em subfamílias distintas com ferramentas cladísticas. Os resultados encontrados nas espécies de Attini sugerem que por fazer parte de uma subfamília mais derivada, a presença dos dois tipos de células secretoras intramandibulares (com reservatórios, e a tipo III) juntas no interior da mandíbula, e a positividade para os três testes histoquímicos, ocorra provavelmente devido à maior especialização das castas. Essas características histoquímicas poderiam contribuir para divisão do trabalho dentro da colônia, o recrutamento em massa e o forrageio em grupos. Nesse sentido, essas glândulas poderiam produzir substâncias necessárias para liberação de sinais químicos fundamentais para sua comunicação. Em contrapartida, as espécies de Ponerini por não apresentarem castas bem definidas, e possuírem recrutamento por contato físico e forragearem individualmente, talvez não desenvolveram mecanismos

comportamentais de recrutamento por sinais químicos, e conseqüentemente, não apresentam células secretoras com reservatório, por não depender de uma comunicação efetiva.

Neste trabalho a glândula tipo III, foi identificada em duas tribos consideradas filogeneticamente distintas, Ponerini considerada primitiva e Attini derivada (Wheeler, 1910; Kusnezov, 1955; Taylor, 1978; Peeters, 1991; Wilson & Hölldobler, 1995). Provavelmente, essa glândula se manteve nos grupos mais derivados, o que pode implicar que assim como não houve mudanças do tipo glandular, possivelmente não houve mudanças funcionais dessa glândula. E uma resposta para as prováveis divergências em relação à função das glândulas exócrinas, seriam as glândulas tipo III agindo conjuntamente com o tipo I, como é o caso da maioria das Ponerinae; e as glândulas tipo III agindo conjuntamente com as células epiteliais secretoras com reservatório em Attini, e assim, desempenharem diferentes funções.

Com os resultados morfológicos e histoquímicos das diferentes glândulas intramandibulares, é possível conjecturar que essas glândulas de Attini e Ponerini produzem substâncias de naturezas distintas, e isso pode indicar funções diversas, dependendo da natureza química (substâncias glandulares) e ocorrência das glândulas (tipos).

## **5. CONCLUSÃO**

O estudo das glândulas intramandibulares em Attini e Ponerini, por meio de métodos histológicos, histoquímicos e filogenéticos, possibilitou concluir que há três tipos de glândulas intramandibulares em formigas, cuja presença varia de acordo com a Tribo e podem ser utilizados como caracteres de valor filogenético.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J.B. & CAETANO, F.H. The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Micron**, 37:154-160. 2006.

BILLEN, J. & MORGAN, E.D. Pheromone communication in social insects – sources and secretions. In: Vander Meer, R.K, Breed, M.D, Espelie, K.E, Winston, M.L (eds) **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview, Boulder, Colo, pp 3-33. 1998.

BILLEN, J. & ESPADALER, X. A novel epithelial intramandibular gland in the ant *Pyromicu membranifera* (Hymenoptera, Formicidae). **Belgian Journal of Zoology**, 132: 175-176. 2002.

BILLEN, J. A importância das glândulas exócrinas na sociedade de insetos. In: VILELA, E. *et al.* (eds.). **Insetos Sociais: da biologia à aplicação**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 442p. 2008.

BOLTON, B. Monophyly of the Dacetone tribe-group and its component tribes (Hymenoptera, Formicidae). **Bulletin Natural History Museum of London (Entomol.)**, 67:65-78. 1998.

CAETANO, F.H. O Estado da arte da morfologia interna de formigas. **O Biológico**, 69:189-193. 2007.

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

COSTA-LEONARDO, A.M. Glândulas intramandibulares em abelhas sociais. **Ciência e Cultura**, 30:835-838. 1978.

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

FOWLER, H.G.; FORTI, L.C.; BRANDÃO, C.R.F.; DELABIE, J.H.C. & VASCONCELOS, H.L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Editora Manole. p.131-209. 1991.

GOTWALD, W.H.J. Comparative morphological studies of the ants, with particular reference to the mouthparts. **Agricultural Experimental Station Memoir** (Cornell University, Ithaca), 408:1-150. 1969.

GOUBAULT, M.; BATCHELOR, T.P.; ROMANI, R.; LINFORTH, R.S.T.; FRITZSCHE, M.; FRANCKE, W. & HARDY, I.C.W. Volatile chemical release by bethylid wasps: identity, phylogeny, anatomy and behavior. **Biological Journal of the Linnean Society**, 94: 837-852. 2008.

GRASSO, D.A.; ROMANI, R.; CASTRACANI, C.; VISICCHIO, R.; MORI, A., ISIDORO, N. & LE MOLI, F. Mandible associated glands in queens of the slave-making ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, 51:74-80. 2004.

GRIMALDI, D.; AGOSTI, D. & CARPENTER, J.M. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera, Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. **American Museum Novitate**, 3208:1-43. 1997.

HASHIMOTO, Y. Phylogenetic study of the family Formicidae based on the sensillum structure on the antennae and labial palpi (Hymenoptera, Aculeata). **Japanese Journal of Entomology**, 59:289-294. 1991a.

HASHIMOTO, Y. Phylogenetic implications of the spur structure of the hind tibia in the Formicidae (Hymenoptera). **Japanese Journal of Entomology**, 59:289-294. 1991b.

HASHIMOTO, Y. Skeletomuscular modifications associated with the formation of an additional petiole on the anterior abdominal segments in aculeatae Hymenoptera. **Japanese Journal of Entomology**, 64:340-356. 1996.

HERMANN, H.R. The Hymenopterous poison apparatus: evolutionary trends in three closely related subfamilies of ants (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, 4:123-141. 1969.

HOLLOBLER, B. & WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge, Belknap/Harvard University Press. 732p. 1990.

JAFÉ, K. Evolución de los sistemas de comunicación química en hormigas (Hymenoptera, Formicidae). **Folia Entomologica Mexicana**, 61:189-203. 1984b.

JOHNSON, C.; AGOSTI, D.; DELABIE, J.H.C.; DUMPERT, K.; WILLIAMS, D.J.; VON TSCHIRNHAUS, M. & MASCHWITZ, U. *Acropyga* and *Azteca* ants (Hymenoptera, Formicidae) with scale insects (Sternorrhyncha, Coccoidea): 20 million years of intimate symbiosis. **American Museum Novitates**, 3335:18p. 2001.

KUSNEZOV, N. Evolución de las hormigas. **Dusenía**, 6:1-34. 1955.

MADDISON, W.P.; DONOGHUE, M.J. & MADDISON, D.R. Outgroup analyses and parsimony. **Systematic Zoology**, 33:83-103. 1984.

NEDEL, O.J. Morphologie und Physiologie der Mandibeldrüse einiger Bienen Arten (Apidae). **Z. Morph. Okol, Tiere**. 49:139-83. 1960.

NIXON, K.C. & CARPENTER, J.M. On outgroups. **Cladistics**, 9:413-426. 1993.

NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: Some comments on terminology and classification. **Annals of Society Entomologic of France**, 27:123-128. 1991.

NOIROT, C. & QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, 19:61-80. 1974.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill Livingstone. 2:624p. 1985.

PEETERS, C. The occurrence of sexual reproduction among workers. **Biological Journal of the Linnean Society**, 44:141-152. 1991.

PEETERS, C. & CREWE, R.M. Insemination controls the reproductive division of labour in a Ponerine ant. **Naturwissenschaften**, 71:50-51. 1984.

PERRAULT, G.H. L'architecture thoracique associée à la jonction pronoto-mesothoracique des ouvrières de fourmis. Intérêt pour la phylogénie du groupe (Hymenoptera, Formicidae). **Annales de la Société entomologique de France (N.S.)**, 35:125-163. 1999.

QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. **Microscopy Anatomy of Invertebrates**, 11A:177-207. 1998.

RIBEIRO, M & CAETANO, F.H. **Cytochemistry for visualization of the Golgi complex in the in the intramandibular gland of old major workers oh *Zacryptocerus pusillus* (Hymenoptera, Formicidae).** *ICEM 14 Cancum*. 749-750p. 2000.

ROMANI, R.; ISIDORO, N. & BIN, F. Male antennal glands in *Bombus pascorum* Sap: Morphology, possible function and comparison with Hymenoptera Aculeata. **Insect Soc Life**, 4:115-123. 2002.

ROMANI, R.; ISIDORO, N.; RIOLO, P. & BIN, F. Antennal glands in male bees: Structures for sexual communication by pheromones? **Apidologie**, 34:603–610. 2003.

ROMANI, R.; ISIDORO, N.; RIOLO, P.; BIN, F.; FORTUNATO, A. & BEONI, L. A new role for antennation in paper wasps (Hymenoptera, Vespidae): Antennal courtship and sex dimorphic glands in antennomeres. **Insectes Sociaux**, 52:96-102. 2005.

SCHOETERS, E. & BILLEN, J. The intramandibular gland, a novel exocrine structure in ants (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**, 114:125-131. 1994.

SILVA, S.M.; GUSS, C.P.M.; DELABIE, J.H.C.; MARIANO, C.S.F.; ZANUNCIO, J.C. & SERRAO, J.E. Sensilla and Secretory Glands in the Antennae of a Primitive Ant:

*Dinoponera lucida* (Formicidae, Ponerinae). **Microscopy Research and Technique**, 69:885-890. 2006.

SMITH, R.K.; SPIVAK, M.; TAYLOR, O.R.; BENNET, C. & SMITH, M.L. Maturation of tergal gland alkene profiles in European honey bee queens, *Apis mellifera* L. **Journal of Chemical Ecology**, 19:133-142. 1993.

STADDON, B.W. The scent glands of Heteroptera. **Advances in Insect Physiology**, 14:351-354. 1979.

STEFANINI, M.; DEMARTINO, C. & ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, 216:173-174. 1967.

SWOFFORD, D.L. PAUP: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)** Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1998.

TAYLOR, R.W. *Nothomyrmecia macrops* : a living-fossil ant rediscovered. **Science**, 201: 979-985. 1978.

TOLEDO, L.F.A. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arquivo do Instituto Biológico**, 34:321-329. 1967.

WATROUS, L.E. & WHEELER Q.D. The out-group comparison method of character analysis. **Systematic zoology**, 30:1-11. 1981.

WHEELER, W.M. **Ants: their structure, development and behavior**. Columbia University Press, New York. 1910.

WOSSLER, T.C. & CREWE, R.M. Mass spectral identification of the tergal gland secretions of female castes of two African honeybee races (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, 38:137-148. 1999.

WOSSLER, T.C.; VEALE, R.M. & CREWE, R.M. How queen-like are the tergal glands in workers of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata*? **Apidologie**. 31:47-54. 2000.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, MA. Harvard Univ.Press. 1971.

WILSON, E.O.; HOLLDÖBLER, B. Eusociality: Origin and consequences. **PNAS**, 102. (38). 2005.

WILSON, E.O. The social biology of ants. **Annual Review of Entomology**, 8:345-68. 1963.