

PAULA ANDRÉA OLIVEIRA SOARES

DESENVOLVIMENTO DO GÂNGLIO CEREBRAL DE  
*Acromyrmex subterraneus subterraneus* FOREL, 1893  
(HYMENOPTERA; FORMICIDAE; MYRMICINAE)

Tese 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  
2000

Aos meus pais, Gilbergues e Maria Ademi.

Aos meus irmãos, Alexandra e Leonardo.

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade da realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Professor José Eduardo Serrão, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança depositada em mim.

À Professora Silvia das Graças Pompolo, pelas valiosas sugestões dadas durante este trabalho e pela liberação do Laboratório de Citogenética.

À Professora Terezinha M. C. Della Lucia, pela liberação do Insetário, bem como do material biológico utilizado neste trabalho.

Ao Professor Jacques H. C. Delabie, pelos ensinamentos durante o estágio em Iniciação Científica e Aperfeiçoamento no Laboratório de Mirmecologia do CEPEC/CEPLAC, pela amizade, pelo incentivo, pelas sugestões e pela participação na banca examinadora.

À Professora Izabel Regina S. C. Maldonado pela participação na banca examinadora.

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

À Deus, por Ele existir e por ter me dado uma família maravilhosa que sempre me apoiou nas decisões mais importantes da minha vida.

Aos amigos que deixei na Bahia: Joelma, Adelina, Nadir, Jacira, Walderison, Júnior, James, Cícero, Karina, Luzia, “bado”, Adriana, Cintia e outros, pelos momentos de confraternização que passamos juntos.

Ao pessoal do Laboratório de Mirmecologia da CEPLAC com quem convivi durante anos, o Crispim e o Zé Raimundo.

Ao Ivan que chegou este ano para se juntar a nós nesta caminhada.

Aos amigos que fiz aqui, Romilda, Débora e Myriam Coracini, Adrián, Cristina, Marcelo, Cláudia e Romero, Walkymário, Rômulo, Alberto, Carlos, Ivênio, Myriam e Miguel, Stênio. À galera da quarta “light”, Beto, Harley, Rodrigo, Helena, Onice, Harvey, Carol, Camila, Walkyria, Eduardo Petrilli, João e tantos outros que tornaram agradável a vida por aqui.

À turma do Laboratório de Citogenética, Estevão, André, Cynthia, Anderson, Bruno e principalmente à Eliane, um coração sábio e generoso e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Prof. Marco, Prof. Clóvis, o Gustavo.

Ao Adrián, colega e amigo, pelo auxílio na análise estatística.

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

À Ritinha que, já no final da caminhada compartilhou comigo dos mesmos anseios “pré e pós-defesa”.

Ao meu grande amigo e irmão Uly, em quem eu depus toda confiança durante este tempo, pelo carinho e pela amizade.

À Jorge “bacana”, um amigo especial que sempre teve sua mão estendida e um coração enorme pronto para ajudar.

À Cléa. Juntas nós descobrimos o grande valor de uma amizade, ao dividir o mesmo teto e as “cargas” leves e pesadas das nossas vidas. Valeu amiga!!!!

A todos que, de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## BIOGRAFIA

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

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

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

De setembro de 1997 a julho de 1998, trabalhou como bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq no Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da CEPLAC, em Ilhéus, BA.

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

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações gerais sobre as formigas do gênero <i>Acromyrmex</i> .....	1
1.2. Aspectos citológicos e morfológicos do desenvolvimento pós- embrionário .....	3
1.3. Citogenética - aplicações e técnicas .....	5
CAPÍTULO 1 .....	8
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CÉREBRO DE OPERÁRIAS DE <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> FOREL, 1893 (HYMENOPTERA; FORMICIDAE) DURANTE O DESENVOLVIMEN- TO PÓS-EMBRIONÁRIO .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.1. Obtenção do material biológico .....	12
2.2. Análise microscópica .....	14
2.3. Amostragem de células em divisão .....	14
3. RESULTADOS .....	17

	Página
4. DISCUSSÃO .....	26
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	31
CAPÍTULO 2 .....	33
ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO CÉREBRO EM DIFERENTES CASTAS DE <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (HYMENOPTERA; FORMICIDAE; MYRMICINAE) DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO .....	33
1. INTRODUÇÃO .....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.1. Material biológico .....	36
2.2. Análise morfométrica .....	37
3. RESULTADOS .....	38
4. DISCUSSÃO .....	44
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	49
CAPÍTULO 3 .....	52
ATIVIDADE MITÓTICA NO CÉREBRO DE <i>Acromyrmex</i> <i>subterraneus subterraneus</i> FOREL, 1893 (HYMENOPTERA; FORMICIDAE) DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS- EMBRIONÁRIO .....	52
1. INTRODUÇÃO .....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	55
2.1. Obtenção do material biológico .....	55
2.2. Análise microscópica .....	56
3. RESULTADOS .....	58
4. DISCUSSÃO .....	66
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	71
2. RESUMO E CONCLUSÕES .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## RESUMO

SOARES, Paula Andréa Oliveira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2000. **Desenvolvimento do gânglio cerebral de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Conselheiras: Silvia das Graças Pompolo e Terezinha M. C. Della Lucia.

O objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia do cérebro de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, durante o desenvolvimento pós-embrionário, acompanhando seu crescimento através da observação de suas estruturas internas e suas dimensões, bem como da atividade proliferativa de suas células. As alterações encontradas durante o desenvolvimento do cérebro foram relacionadas com a possível influência de hormônios morfogenéticos e aspectos futuros do comportamento de cada casta de *A. s. subterraneus*, já que no cérebro desta, por se tratar de um inseto social, existem subcompartimentos supostamente responsáveis pela memória e aprendizagem. O material biológico foi obtido de colônias mantidas no Insetário da Universidade Federal de Viçosa. Em todas as análises, os indivíduos foram classificados por idade, de acordo com a intensidade da cor do olho e do corpo, a saber: pré-pupa, também chamada larva pós-defecante; pupa de olho despigmentado; pupa de olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea clara); pupa de olho mediantemente pigmentado (marrom); pupa de corpo pigmentado (cutícula amarelada) e indivíduos adultos. Na análise morfológica e

mitótica, só foram utilizadas pupas de operárias maiores e, na análise morfométrica, também foram utilizadas pupas de machos e rainhas. Para descrições morfológicas, foram realizados exames histológicos. Quatro grupos de células foram observados: as células de Kenyon, os neuroblastos precursores destas, as células da glia e um último, identificado como interneurônios. A morfologia do cérebro de *A. s. subterraneus* em desenvolvimento mostra padrões fixos na sua estrutura desde o estágio de pré-pupa, indicando alterações mitóticas principalmente na região dos corpora pedunculata, e morfológicas, quando da ocupação do cérebro pela neurópila. Além disso, a atividade proliferativa de células nervosas durante a fase pupal mostra uma certa flutuação e, em diferentes fases, apresentam sítios de divisão diferentes. Comparações da área do cérebro mostram que, em operárias e machos, a área total apresenta maior desenvolvimento no estágio adulto. Em rainhas, a variação do crescimento não é significativa nos diferentes estágios, sugerindo um crescimento proporcional das estruturas internas do cérebro. Com a análise citogenética, observou-se que grande quantidade de prófases e metáfases ocorreram desde a fase de pré-pupa até a fase de corpo pigmentado, mas aquelas metáfases consideradas “ótimas” para análise citogenética foram encontradas nas fases de pré-pupa e pupas de olho despigmentado.

## ABSTRACT

SOARES, Paula Andréa Oliveira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, July of 2000. **Brain development in *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Committee Members: Silvia das Graças Pompolo and Terezinha M. C. Della Lucia.

The purpose of this work was to study the brain morphology in *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, during the post-embryonic development, following its growth by means of morphometric analysis of its inner structures as well as the cell proliferation activity. The changes found during the brain development were associated with a possible morphogenetic hormone role and future behavior aspects in each *A. s. subterraneus* caste, because in this ant, such as other social insects, the brain has subcompartments which are commonly associated with learning and memory. The ants were obtained from nests placed in the Federal University of Viçosa. There were examined workers, queens and males of different developmental stages. The pupal stages were judged by the color of their eyes: unpigmented, light red, dark red and black. Adults of the three castes and prepupae of workers were also examined. However, only workers were used for morphological and proliferative analysis. Standard histological methods showed four groups of cells: Kenyon cells, neuroblasts, glial cells and interneurons. The morphology of the brain during the development indicated unchanged patterns

in its structure from prepupae until adult, demonstrating mitotic activity mainly in the mushroom bodies. The morphological variations were related with the neuropile growth. In addition, the mitotic activity during the pupae development showed some variations among the pupal stages, because different stages have different brain places where cell division occurs. Morphometrical data showed that in workers and males the greater was found in adult. In queens, the growth variation was not significant among the examined stages, suggesting a proportional growth of the inner structures of the brain. The cytogenetical analysis that the greater number of prophases and metaphases occurs from the prepupae until black eyes pupae, but those metaphases considered useful for cytogenetic studies were found in prepupae and unpigmented eyes pupae only.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações gerais sobre as formigas do gênero *Acromyrmex*

Entre as 120.000 espécies descritas da ordem Hymenoptera, estão as formigas compreendendo mais de 8.000 espécies. As formigas são consideradas verdadeiros insetos sociais (eusociais), pois apresentam as seguintes características: cuidado com a prole, castas reprodutivas, superposição de gerações e divisão de trabalho (WILSON, 1971). As operárias de formigas Myrmicinae, subfamília a que pertencem as formigas cortadeiras, geralmente não apresentam ocelos. O clipeo é, na maioria das vezes, bem desenvolvido. Tais insetos apresentam um ou dois segmentos, que são o pecíolo e o pós-pecíolo, ambos entre o alitrongo e o gáster. As operárias são ápteras e a rainha e o macho são alados, mas perdem as asas logo após o vôo nupcial, quando se processa a fecundação. São holometabólicas, isto é, possuem metamorfose completa, abrangendo quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Nas formigas *Acromyrmex octospinosus* ocorre ainda um estágio larval suplementar em rainhas ou machos (TORRE-GROSSA et al., 1981).

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) possuem o hábito de cortar e transportar fragmentos de vegetais

diversos, flores e sementes para seus ninhos subterrâneos. Tais hábitos tornam essas formigas pragas das áreas cultivadas, das florestas e das pastagens da América do Sul, América Central e da América do Norte. As espécies de *Acromyrmex* ocupam, cada vez mais, lugar de importância em áreas de pastagens e de reflorestamento, pois podem, algumas vezes, superar as saúvas em abundância (DELLA LUCIA, 1993).

A caracterização de *Acromyrmex* pode ser resumida da seguinte maneira: operárias maiores apresentam quatro a cinco pares de espinhos no tórax e são menores que os soldados das saúvas (8-10mm), que geralmente medem 12-15 mm de comprimento, embora ambos os gêneros possuam indivíduos de 2-3 mm. O ninho de *Acromyrmex* geralmente não apresenta monte de terra solta na sede aparente (DELLA LUCIA, 1993). Segundo Emery, citado por GONÇALVES (1961), esse gênero é um dos mais difíceis de serem identificados na família Formicidae, em razão do grande polimorfismo entre operárias.

Das 63 espécies conhecidas, 20 espécies e 9 subespécies foram constatadas no Brasil, as quais foram estudadas por MAYHÉ-NUNES (1991), concluindo-se que esse gênero encontra-se, filogeneticamente, entre *Atta* e *Trachymyrmex*.

Dentre as espécies do gênero *Acromyrmex*, encontra-se *A. subterraneus subterraneus* Forel (1893), vulgarmente chamada de “caiapó”, distribuída nos estados de SP, AM, CE, RN, MG, RJ, MT, PR, SC e RS (GONÇALVES, 1961; MAYHÉ-NUNES, 1991). Essa subespécie faz os maiores e mais populosos formigueiros dentro desse gênero e se adapta facilmente em terrenos cultivados ou abandonados (GONÇALVES, 1961). Além dessa subespécie, existem outras duas: *A. s. brunneus* e *A. s. molestans*, com ocorrência constatada no Brasil, tendo distribuição semelhante e compartilhando uma extensa área geográfica (RJ, MG, ES e BA) (MAYHÉ-NUNES, 1991).

Embora diversos trabalhos tenham sido realizados com algumas espécies do gênero *Acromyrmex*, muito mais resta a ser feito, pois vários

aspectos básicos de sua taxonomia, biologia, comportamento, ecologia e morfologia permanecem completamente desconhecidos. A aquisição desses conhecimentos é importante para diminuir os danos provocados por essas formigas nas diversas culturas (ANTUNES, 1999).

As formigas em geral oferecem uma ampla variação de adaptações comportamentais e estilo de vida, que são congruentes com várias diferenças morfológicas entre as espécies (GRONENBERG, 1999). Elas têm atraído o interesse de neuroanatomistas e neuroetologistas, dado a possível relação de determinados subcompartimentos do cérebro com a aprendizagem e memória do inseto (STRAUSFELD et al., 1998).

Todas essas características fazem das formigas um material biológico viável às inferências sobre as relações morfométricas e volumétricas do cérebro com a idade e a função exercida pelo representante da casta de uma colônia. Assim, o acompanhamento do crescimento do cérebro de um inseto que apresenta diversos padrões de comportamento, pode refletir diferenças estruturais e funcionais, além de mostrar o padrão de desenvolvimento desse órgão.

## **1.2. Aspectos citológicos e morfológicos do desenvolvimento pós-embrionário**

O aumento no volume de estruturas internas de um inseto é limitado pela cutícula, embora em larvas de holometábolos com cutícula mole, ocorra um possível crescimento. Bem como na epiderme, o aumento no tamanho de um órgão interno pode resultar de um aumento no tamanho ou no número de células ou, às vezes, de ambos. Assim, o crescimento dos insetos pode ser avaliado através do aumento de peso, crescimento da cutícula, crescimento alométrico e de tecidos (PARRA e HADDAD, 1979). Durante esse período de transformações radicais nos tecidos do inseto que o permite passar de larva à vida imaginal, a larva de último estágio deixa de se alimentar e fica totalmente imóvel. Um dos primeiros sinais das modificações drásticas sofridas pelos

tecidos dos Hymenoptera, caracteriza-se pelo estabelecimento da conexão entre os intestinos médio e posterior, quando o tubo digestivo da larva é fechado e os dejetos alimentares acumulam-se a nível do intestino médio, numa massa única chamada mecônio. Esse evento ocorre simultaneamente com a eversão da antena pupal. O início da morfogênese pupal está correlacionada com a eliminação do mecônio no fim do estágio larval. Entre a eliminação do mecônio e a ecdise pupal, os insetos são chamados “pre-pupa”. Após, aproximadamente, 5 dias da muda do inseto, inicia-se a fase pupal. Na operária maior de *Acromyrmex octospinosus*, os últimos estágios duram 25 dias, a 26°C (DELABIE, 1984). Os padrões gerais de crescimento de determinadas regiões do cérebro têm sido previamente investigados pela morfometria do cérebro de larvas e pupas de rainha, macho e operária de *Apis mellifera* (Lucht-Bertram, 1962, citado por VITT e HARTFELDER, 1998), mostrando que divergências no crescimento alométrico de diferentes regiões do cérebro se manifestam principalmente durante o último ínstar larval.

Em muitos insetos holometábolos, existe uma extensiva reconstrução do sistema nervoso durante a metamorfose e os neuroblastos persistem durante o período larval. O cérebro torna-se consideravelmente expandido, principalmente devido ao desenvolvimento dos lóbulos ópticos e antenal, em relação à antena dos insetos adultos e o aparecimento dos olhos compostos (CHAPMANN, 1998). Simultaneamente com a progressão da morfogênese do sistema nervoso da região da antena, se desenvolvem as estruturas do Sistema Nervoso Periférico (DELABIE, 1984).

O Sistema Nervoso Central dos insetos é formado de diferentes tipos de células, todas com origem ectodérmica, mas que sofrem diferenciações no decorrer da metamorfose pela proliferação dos neuroblastos (VITT e HARTFELDER, 1998). Mas, segundo BROOKER e TRUMAN (1987), nem todas as células geradas por essa atividade pós-embriônica proliferativa completarão diferenciação, sendo integradas no desenvolvimento de estruturas do cérebro do adulto. Assim, dois tipos de neuroblastos, com padrões de divisão distintos, são reconhecidos. O tipo I ocorre nos lobos ópticos e corpora

pedunculata, produzindo novos neuroblastos por divisões simétricas. Por divisão assimétrica, cada neuroblasto origina um novo neuroblasto e uma célula ganglionar. A célula ganglionar, por sua vez, divide-se originando 2 neurônios. O tipo II ocorre por todo o córtex cerebral e, caracteristicamente, sempre divide-se assimetricamente, originando um neuroblasto e uma célula ganglionar que, por sua vez, origina dois neurônios (WHITE e KANKHEL, 1978).

Segundo MASSON (1970), em formigas da subfamília Ponerinae, *Pachycondyla cafraria*, os primeiros dois dias do período pré-pupal são melhor caracterizados pela intensa atividade mitótica de ambos os níveis de células nervosas do deutocérebro e do centro de associação protocerebral, assim como a neuroglia e as células epidérmicas. Após esse período, a multiplicação celular decresce rapidamente e, três dias depois, a atividade mitótica existente na pré-pupa diminui, exceto nas células de Kenyon dos corpora pedunculata.

### **1.3. Citogenética - aplicações e técnicas**

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução, como tendo grande aplicação nos estudos de mecanismos de especiação e variabilidade genética. A descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo. Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância, quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA, 1988). Dentre os grupos mais analisados cariotipicamente, está a ordem Hymenoptera, que ocupa um lugar de destaque na citogenética animal (GOMES, 1995). Essas diferenças entre indivíduos podem ocorrer devido a rearranjos cromossômicos ao longo de gerações e cuja frequência pode flutuar sazonal, altitudinal e, ou, geograficamente (ROTHFELS, 1980). Esses

rearranjos, além de gerar polimorfismos cromossômicos, podem alterar o padrão de expressão gênica, o que influencia o processo evolutivo das espécies (SHAW et al., 1980). Como os primeiros estudos citogenéticos em Hymenoptera consistiam basicamente na determinação do número cromossômico, as técnicas convencionais de esmagamento se tornavam inviáveis, por possibilitarem somente a observação de divisões meióticas. Assim, com o passar do tempo, os resultados obtidos por meio de novas técnicas trouxeram novas informações, promovendo uma reavaliação da citogenética de muitos grupos de insetos (HOSHIBA e ONO, 1984). Quando se pretende realizar estudos sobre a evolução de determinados grupos, do ponto de vista citogenético, é de vital importância o emprego de técnicas que ofereçam confiabilidade na caracterização dos cariótipos. Os estudos citogenéticos em Hymenoptera têm obtido grande avanço por meio de emprego de técnicas modernas e com a utilização de tecidos apropriados (GOMES, 1995).

Uma das limitações dos estudos citogenéticos é que as análises são realizadas em células com atividade mitótica e, como os himenópteros são holometabólicos, as mitoses estão restritas às fases jovens do desenvolvimento, especialmente larvas e pupas. Esses estudos utilizam pupas novas chamadas “larvas pós-defecantes” ou pré-pupas, e as metáfases são observadas a partir de lâminas preparadas com a massa cerebral do inseto, pré-tratado com colchicina e citrato de sódio, possibilitando o acúmulo de maior número de células em metáfase. Tal procedimento foi definido por IMAI (1966), utilizando formicídeos. Hoje, adaptado à citogenética de abelhas (MENEZES, 1997; MOREIRA, 1997; BRITO, 1998), vespas (GOMES, 1995; SCHER, 1996; ARAÚJO, 1998) e coleópteros (MAFFEI et al., 2000), com êxito.

IMAI (1966) estabeleceu alguns critérios para a observação de cromossomos mitóticos através da citogenética, utilizando o cérebro do inseto durante o estágio pré-pupal, quando a cabeça e a região do pronoto tornam-se transparentes e a atividade mitótica torna-se mais intensa; e meióticos, utilizando o testículo de pupa, em que os olhos encontram-se fracamente

pigmentados; e ovário de pupa, onde os olhos apresentam uma pigmentação escarlate.

Apesar de existirem esses critérios, não se tem nenhuma informação sobre a natureza exata das células estudadas, já que o cérebro de um inseto é um complexo formado pela união de vários gânglios: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. Além disso, as informações sobre estudos citogenéticos referem-se especialmente às mitoses encontradas na fase de pré-pupa. Entretanto, não é sempre que essa fase do desenvolvimento pode ser reconhecida ou está presente nos insetos estudados.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são:

- Relacionar dados morfométricos do cérebro com a idade e a função exercida pelo representante de cada casta de uma colônia;

- Acompanhar o crescimento pós-embriônico do cérebro de *A. s. subterraneus*, aliado à procura sistematizada das metáfases necessárias ao estudo citogenético, a fim de determinar qual região do gânglio cerebral, nas diferentes fases do desenvolvimento, é mais favorável a esses estudos;

- Confrontar os resultados acima a fim de estabelecer possíveis relações morfológicas e citogenéticas que existam durante o desenvolvimento do cérebro de *A. s. subterraneus*.

## CAPÍTULO 1

### ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CÉREBRO DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex subterraneus subterraneus* FOREL, 1893 (HYMENOPTERA; FORMICIDAE) DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

#### 1. INTRODUÇÃO

O cérebro dos insetos tem sido alvo constante de estudos de pesquisadores interessados em decifrar os mistérios desse órgão relacionados com categorias do comportamento (DURST et al., 1994; FAHRBACH e ROBINSON, 1995), principalmente em insetos sociais, onde estão incluídas as formigas, que compreendem aproximadamente 9.000 espécies (JAFFE e PEREZ, 1989). Representantes das formigas cortadeiras como, por exemplo, *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), podem formar colônias com mais de 20 milhões de operárias, organizadas em um complexo sistema de castas polimórficas (WILSON, 1971) e *Acromyrmex* sp. que, segundo Emery, citado por GONÇALVES (1961), é um dos mais difíceis de serem identificados na família Formicidae, em razão do grande polimorfismo entre as operárias.

A morfologia do sistema nervoso de formigas foi estudada em detalhes em diversas espécies, *Acromyrmex octospinosus* (Myrmicinae) (DELABIE, 1984); *Odontomachus bauri*, *Ectatomma ruidum* (Ponerinae), *Cephalotes atratus*, *Trachymyrmex urichi*, *A. octospinosus*, *A. rugosus*, *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), (Myrmicinae), *Pseudomyrmex termitarius*, *P. gracilis*, *P. flavidulus* (Pseudomyrmecinae), *Gigantiops destructor*, *Camponotus rufipes* (Formicinae) (JAFFE e PEREZ, 1989); *C. floridanus* (GRONENBERG et al., 1996); *Myrmecia simillima* (Myrmeciinae), *E. ruidum*, *Harpegnathos saltator*, *Mystrium rogeri*, *Amblyopone* sp, *O. bauri*, *Pachycondyla villosa*, *Paraponera clavata*. (Ponerinae), *Cerapachys biroi* (Cerapachyinae), *Aphaenogaster boulderensis*, *A. sexdens*, *Cataulacus* sp. (Myrmicinae), *Myrmecocystus mimicus*, *Oecophylla smaragdina*, *C. rufipes* e *C. floridanus* (Formicinae) (GRONENBERG, 1999; GRONENBERG e HOLLDOBLER, 1999).

O cérebro dos insetos é o principal centro de associação do organismo, recebendo impulsos dos órgãos dos sentidos na cabeça e via interneurônios do cordão nervoso ventral. Tanto no cérebro como nos gânglios do cordão nervoso ventral, os corpos celulares dos neurônios estão distribuídos na região periférica. Já a região central é ocupada pelas arborizações terminais dos axônios sensoriais, arborizações dendríticas dos neurônios motores e axônios e arborizações dos interneurônios. Essa região é chamada neurópila (CHAPMAN, 1998).

Das três partes que constituem o cérebro, o protocérebro é o mais volumoso e ao mesmo tempo o mais complexo. Este recebe os nervos dos lóbulos ópticos, centros ocelares, corpo central, ponte protocerebral e corpora pedunculata, enquanto as distintas neurópilas podem representar importantes centros de associação (RACCAUD-SCHOELLER, 1980). O protocérebro é bilobulado e contínuo lateralmente com os lóbulos ópticos, ocupando uma posição dorsal no interior da cabeça. Essa região bilobulada do protocérebro é chamada corpo cogumelar ou corpora pedunculata, e está possivelmente relacionada com a aprendizagem, memória e orientação espacial em alguns insetos (Dujardin, 1850; Vowles, 1964a; Mizunami et al., 1993, citados por

STRAUSFELD et al., 1998). Cada um desses lóbulos consiste de uma região de neurópila chamada cálice, que compreende três regiões concêntricas de neurópila, conhecidas como lábio, colar e região basal, e uma região de interneurônios dispostos periféricamente, denominados células de Kenyon (FAHRBACH e ROBINSON, 1995).

O deutocérebro consiste de uma região de neurópila contendo arborizações terminais de neurônios mecanosensoriais e também arborizações dendríticas dos neurônios motores que controlam os músculos antenais. O tritocérebro está localizado abaixo do deutocérebro e é extremamente reduzido nos himenópteros. Seus lados são unidos pela comissura subesofágica, e constituem o centro pré-oral (CHAPMAN, 1998).

O Sistema Nervoso Central dos insetos é formado de diferentes tipos de células, todas com origem ectodérmica, mas que sofrem diferenciações no decorrer da metamorfose pela proliferação de células indiferenciadas, os neuroblastos (VITT e HARTFELDER, 1988). Mas, segundo BROOKER e TRUMAN (1987), nem todas as células geradas por essa atividade pós-embrionária proliferativa completarão diferenciação, e portanto, sendo integrada em regiões do cérebro do adulto. Assim, dois tipos de neuroblastos, com padrão de divisão distintos, são reconhecidos. O tipo I ocorre nos lóbulos ópticos e corpora pedunculata, produzindo novos neuroblastos por divisões simétricas. Por divisão assimétrica, cada neuroblasto origina um novo neuroblasto e uma célula ganglionar. A célula ganglionar, por sua vez, divide-se originando dois neurônios. O tipo II ocorre por todo o córtex cerebral e, caracteristicamente, sempre divide-se assimetricamente, originando um neuroblasto e uma célula ganglionar que, por sua vez, origina dois neurônios (WHITE e KANKHEL, 1978).

Essa atividade proliferativa do cérebro dos insetos é típica das formas imaturas. Embora, em alguns insetos adultos, tenha sido demonstrada divisão celular em *Acheta domesticus*, que é um inseto hemimetábolo (CAYRE et al., 1994) e em um holometábolo, o besouro *Aleochoa curtula* (Bieber e Fuldner, 1979, citados por FAHRBACH et al., 1995), como uma interessante exceção

dessa generalização. A neurogênese também foi investigada em adultos de abelha com o objetivo de constatar sua ocorrência como uma possível explicação para a neuroplasticidade comportamental (FAHRBACH et al., 1995). A diferenciação pós-embrionária de regiões do cérebro do inseto adulto está estreitamente relacionada com aspectos funcionais de casta e divisão de trabalho em insetos sociais (FAHRBACH et al., 1995).

O conhecimento da morfologia do sistema nervoso central dos insetos sociais, através da observação de mudanças que ocorrem nas estruturas neurais durante sua vida pré-imaginal, é importante para a elucidação dos mecanismos que envolvem o cérebro e sua relação com o comportamento. Assim, o presente trabalho tem como objetivo descrever a morfologia do cérebro de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* durante seu desenvolvimento pós embrionário.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do material biológico

Os espécimens foram obtidos de ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, de acordo com a metodologia descrita por DELLA LUCIA et al. (1987). Para obtenção de pré-pupas, foram coletadas larvas que apresentavam o intestino médio ainda cheio de resíduos alimentares (meconium). A presença do meconium é de fácil observação, visto que ele forma uma única estrutura de cor escura no corpo do animal uniformemente branco (DELABIE, 1984). Em *A. s. subterraneus*, essa estrutura foi observada através da linha longitudinal dorsal, pela sua transparência (Figura 1 (A)). Esses indivíduos foram separados em um copo plástico (500 ml) contendo parte do fungo do qual eles se alimentam e também algumas operárias adultas, de modo que o novo ambiente se mantivesse com as mesmas condições físicas do ninho original. Passados um a dois dias, as larvas pós-defecantes foram coletadas (Figura 1 (B)). Esses indivíduos foram considerados pré-pupas, pois, segundo Weber (1972), citado por DELABIE (1984), em *Acromyrmex octospinosus*, a fase pré-pupal equivale aos cinco dias finais da vida larval, compreendida entre a expulsão do meconium e a muda pupal.

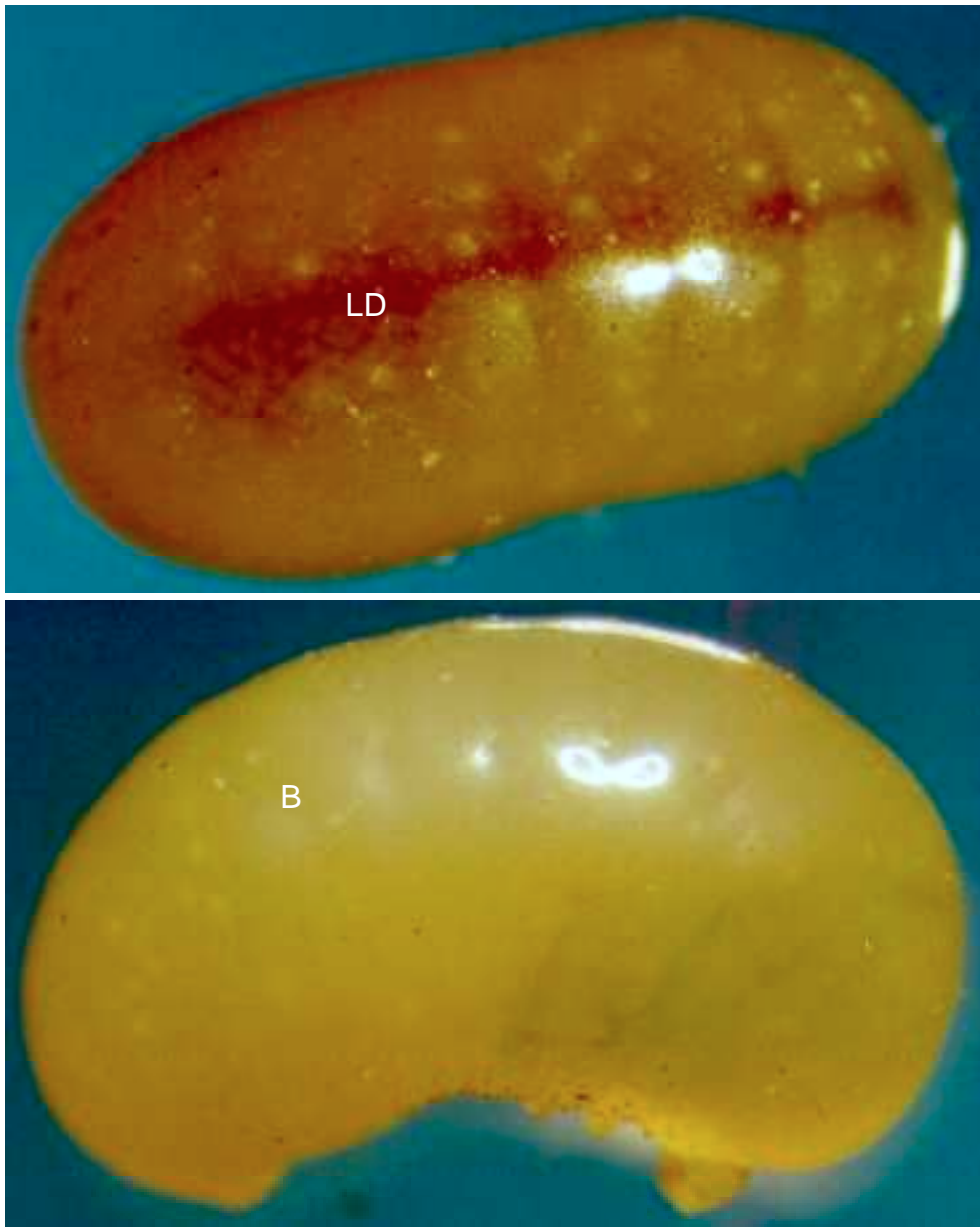


Figura 1 - Larva de operária maior de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (A). Notar a linha longitudinal dorsal (LD) que permite a observação do mecônio e aspecto de pré-pupa de operária maior (B) de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Barra de escala = 2,5 cm).

Durante o desenvolvimento da formiga *Trachymyrmex septentrionalis*, os olhos compostos tornam-se pigmentados antes de outras partes do corpo em todas as castas (WEBER, 1966). O mesmo acontece com *A. s. subterraneus*. Assim, as pupas foram coletadas diretamente dos ninhos e os indivíduos foram classificados por idade, de acordo com a intensidade da pigmentação dos olhos e do corpo, a saber: olho despigmentado, olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea clara), olho mediamente pigmentado (pigmentação marrom), corpo pigmentado (cutícula amarelada) (Figuras 2 (A e B) e 3 (A e B)). Operárias maiores adultas (8-10 mm) também foram coletadas.

## **2.2. Análise microscópica**

As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica para insetos 0,1 M, pH 7,4 e os cérebros fixados em Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 24 horas. As peças, após a fixação, foram desidratadas em série crescente de etanol (70, 90 e 95%), seguindo-se embebição e inclusão em historesina JB-4 ou LEICA, realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após esse tratamento, seguiu-se o procedimento de rotina para a obtenção de cortes histológicos. As secções foram feitas com 7  $\mu$  de espessura com navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina-bórax e montadas em lâminas. As lâminas prontas foram cobertas com lamínula, observadas e fotografadas em fotomicroscópio. Algumas fotografias foram tiradas com contraste de fase.

## **2.3. Amostragem de células em divisão**

Na contagem de células em divisão foram analisadas secções longitudinais do cérebro de cinco indivíduos para cada estágio de desenvolvimento.

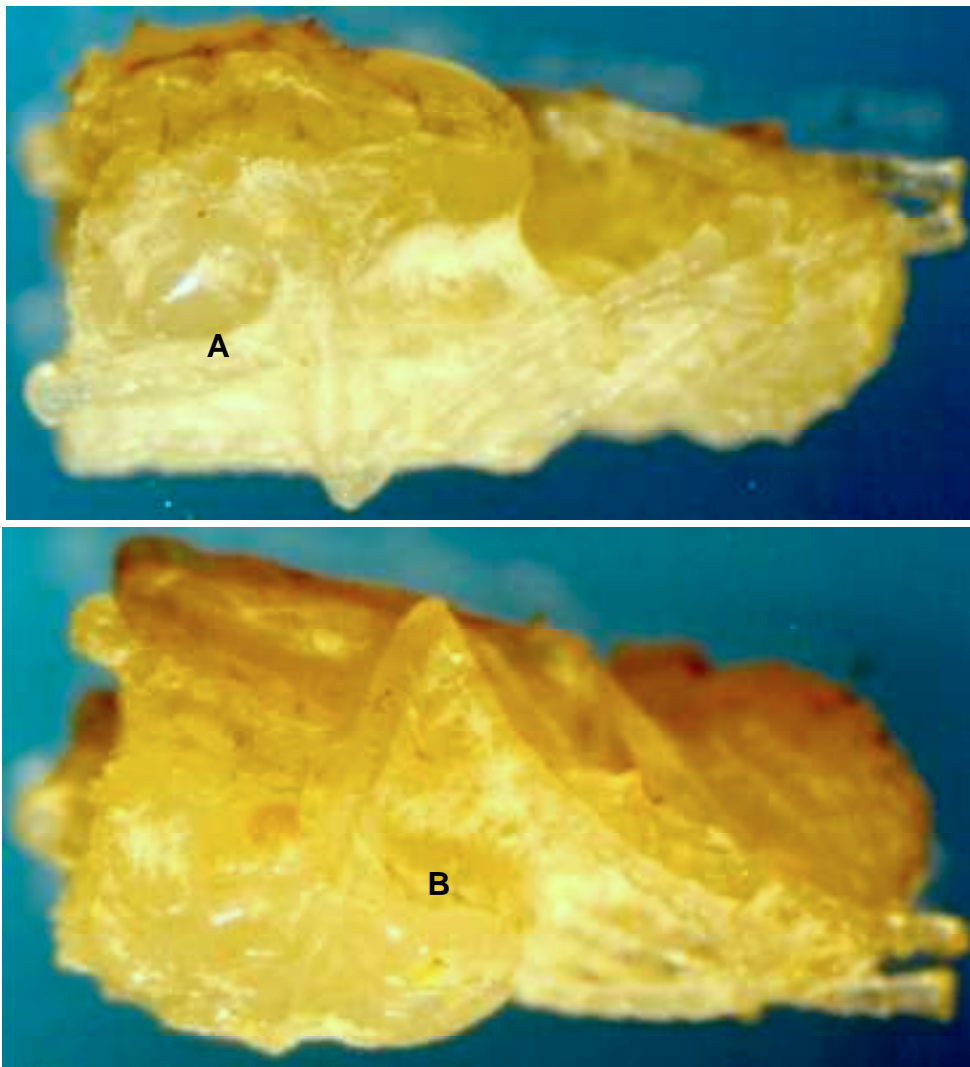


Figura 2 – Pupas de *A. s. subterraneus* com olho despigmentado (A) e olho fracamente pigmentado (B), respectivamente (Barra de escala = 2,5 cm).

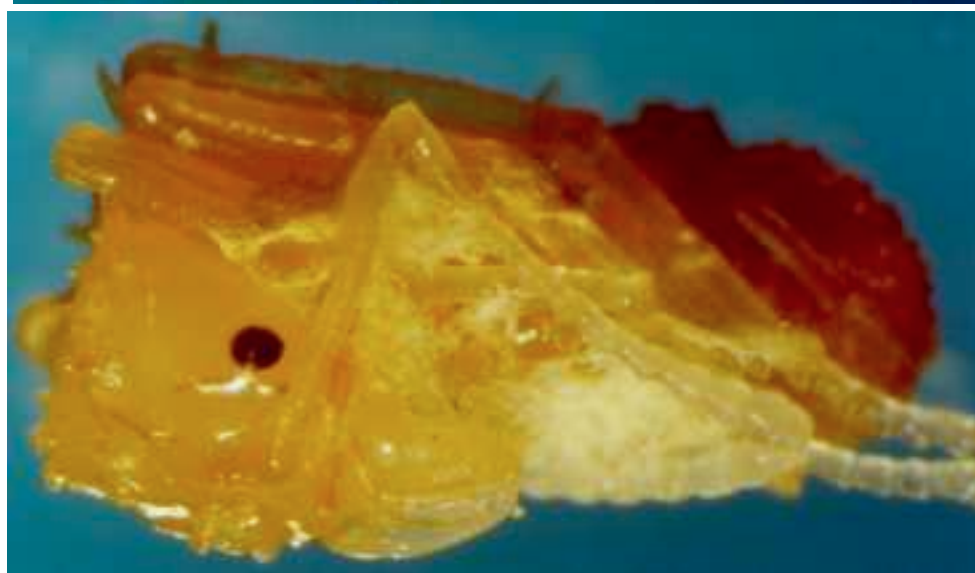
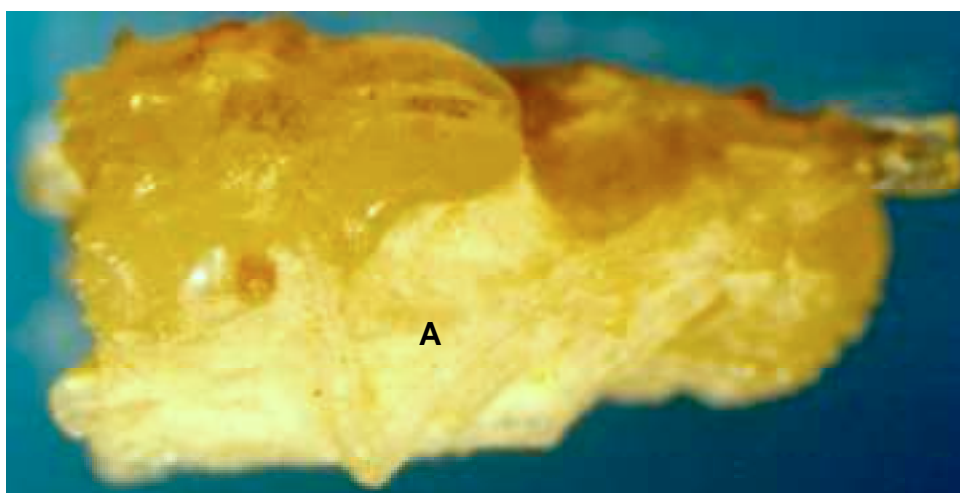


Figura 3 – Pupas *A. s. subterraneus* de olho mediantemente pigmentado (A) e corpo pigmentado (B), respectivamente (Barra de escala = 2,5 cm).

### 3. RESULTADOS

As secções do cérebro em todos os estágios de desenvolvimento mostraram que as regiões mais coradas correspondem às células de Kenyon dos corpora pedunculata e região basal do lóbulo óptico.

Desde a fase de pré-pupa, cada cálice apresentou uma região concêntrica de atividade mitótica bem definida correspondente aos neuroblastos. Essas células têm aspecto globoso e o citoplasma apresenta coloração mais fraca, enquanto seus núcleos e cromossomos vistos em metáfase estão corados fortemente (Figura 4 (A)). Em pupas com olho despigmentado, todas as áreas do cérebro vistas no inseto adulto já podem ser identificadas, a não ser a ocupação do córtex cerebral pela neurópila, que é menor, e pelas células de Kenyon, que são maiores (Figura 4 (B)). Nas pupas com olho fracamente pigmentado, as regiões de neurópila apresentam-se com aspecto homogêneo. As células de Kenyon enviam seus axônios como um pacote de fibras paralelas através de um talo comum ou pedúnculo (Figuras 5 (A e B), que depois se ramificam, caracterizando os lóbulos  $\alpha$  e  $\beta$  (Figuras 4 (B) e 6). Núcleos achatados do epitélio são vistos circundando o gânglio, correspondendo à membrana envoltória do cérebro, o perineurium (Figuras 5 (A e 12). Já as poucas camadas irregulares de células que circundam toda a neurópila podem corresponder às células da glia

(Figura 5 (A)). Um outro grupo de células, localizadas abaixo dos corpora pedunculata e entre os pedúnculos, destacadas pelo aspecto de seus núcleos, de coloração fraca, maiores e de aparência mais globosa que as células em divisão encontradas nos cálices, são vistas também na base do lóbulo óptico e delimitando a neurópila deutocerebral (Figuras 7 (A e B)). Essas células foram vistas em várias fases do desenvolvimento, vindo a adquirir aspecto semelhante aos interneurônios dos corpora pedunculata, porém um pouco maiores, em pupas de corpo pigmentado e operárias adultas (Figuras 8 (A e B)).

Em pupa de corpo pigmentado, os cálices e os lóbulos antenal e óptico estão bem definidos, têm forma arredondada e a neurópila já ocupa a maior parte do cérebro. A porção ocupada pelas células de Kenyon no cálice e demais regiões diminui (Figura 8 (A)).

Em pupas com olhos fracamente pigmentados e olhos mediantemente pigmentados, as divisões celulares são vistas apenas nos cálices (Figuras 5 (B) e 9), mas em quantidade significativamente maior nos indivíduos com olhos mediantemente pigmentados.

Em pupas de corpo pigmentado, as divisões celulares são vistas novamente em outras regiões do cérebro, como lóbulo antenal e base do lóbulo óptico; porém em número reduzido.

Finalmente, no adulto, divisões celulares não são vistas em nenhuma região. O lóbulo antenal é mais alongado com esparsas camadas de células contornando-o (Figura 8 (B)).

Em pré-pupa, em cada região concêntrica dos cálices foram encontradas células em divisão. Já nas demais regiões como corpo central, base dos lóbulos ópticos e lóbulo antenal, a divisão celular ocorre com menor frequência. Nessa fase, os lóbulos antenais têm suas bases alargadas e a neurópila ocupa pouco espaço. A Figura 10 sumariza os resultados obtidos para contagem de células em divisão nas diferentes regiões do cérebro.

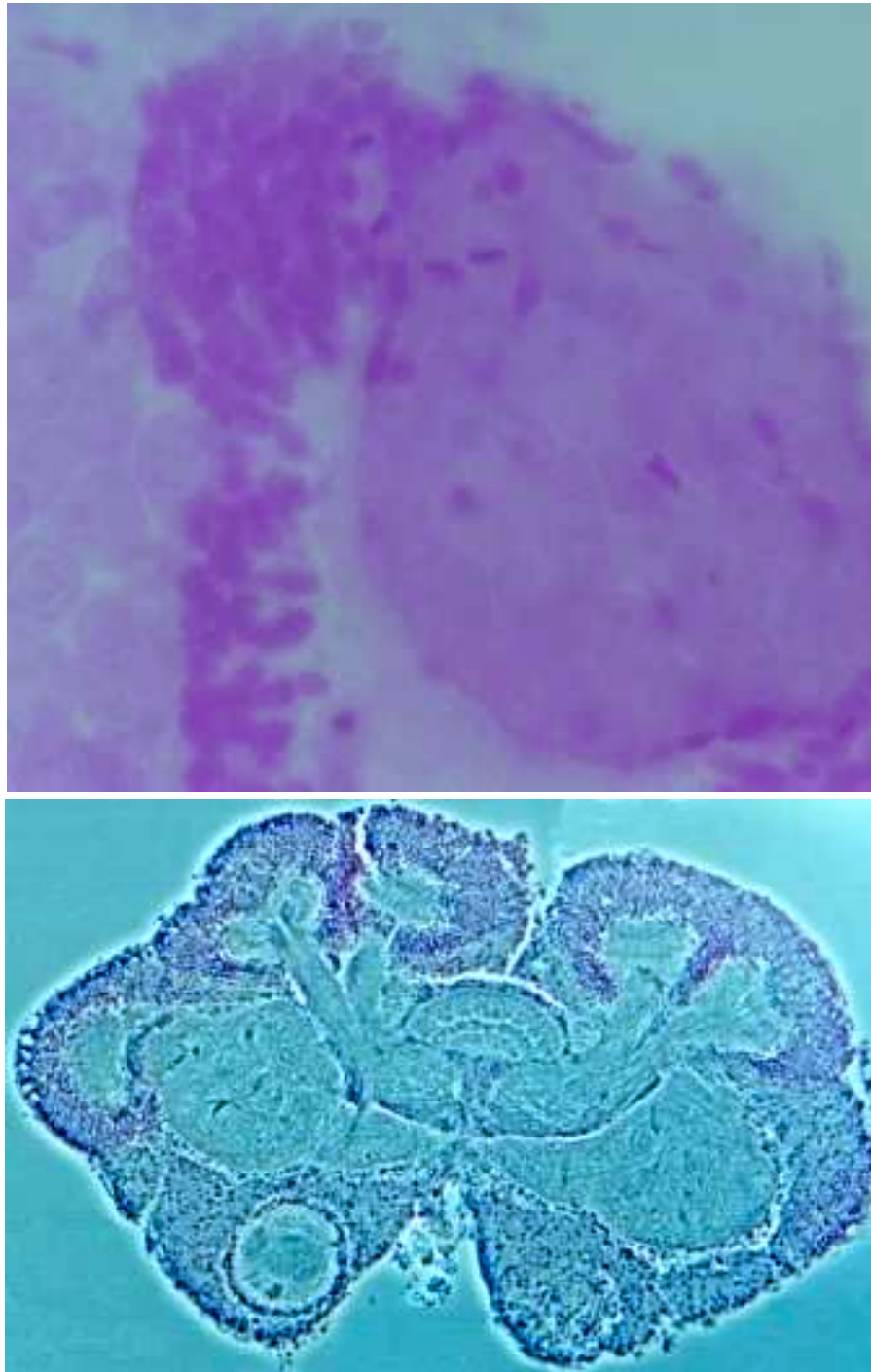


Figura 4 - Corte longitudinal dos corpora pedunculata de pré-pupa (A) de *A. s. subterraneus*, mostrando uma região concêntrica de neuroblastos (C2) em atividade mitótica (seta) e células de Kenyon contornando-a (C1) (Barra de escala = 10  $\mu$ m); e corte longitudinal do cérebro de pupa (B) de olho despigmentado de *A. s. subterraneus*; células de Kenyon (CK), cálice (CA), pedúnculo (P), corpo central (CC), lobo beta (BL), neurópila (N), lóbulo antenal (LA) (Fotografia tirada com lente de contraste ou fase).

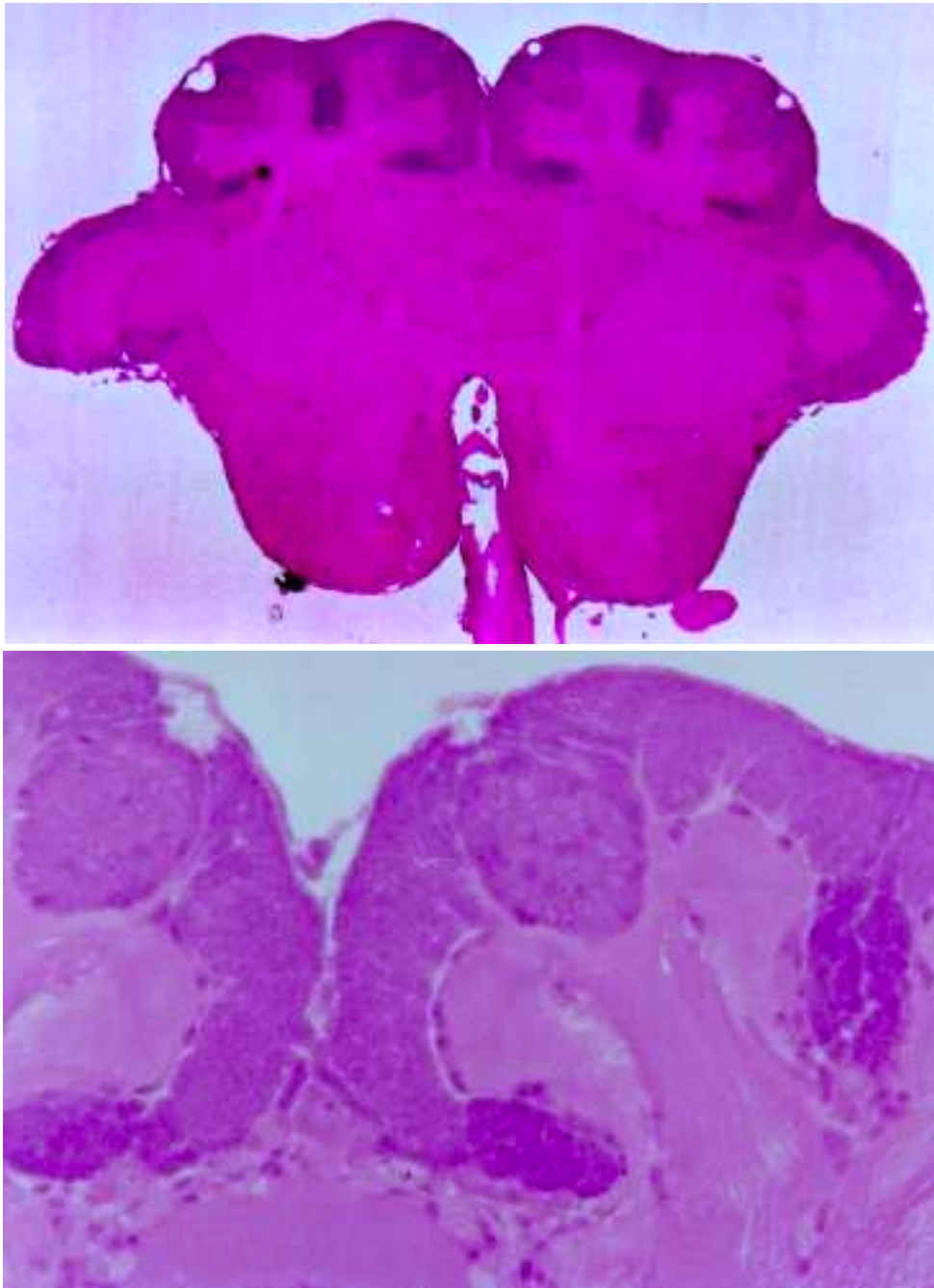


Figura 5 – Corte longitudinal do cérebro de pupas (A) de *A. s. subterraneus* com olho fracamente pigmentado, mostrando regiões concêntricas (RC) de divisão celular no cálice (CA) dos corpora pedunculata, o lobo  $\beta$  (BL), corpo central (CC), neurópilas (N) do lóbulo antenal (LA) e o lóbulo óptico (LO) (Barra de escala = 50  $\mu$ m); e corte longitudinal do cérebro de pupa (B) com olho fracamente pigmentado, mostrando os feixes de fibra paralelas do pedúnculo (P), CC (corpo central), BL (lobos  $\beta$ ), N (neurópila), LO (lóbulo óptico), LA (lóbulo antenal), GL (células da glia), PE (perineurium) (Barra de escala = 25  $\mu$ m).

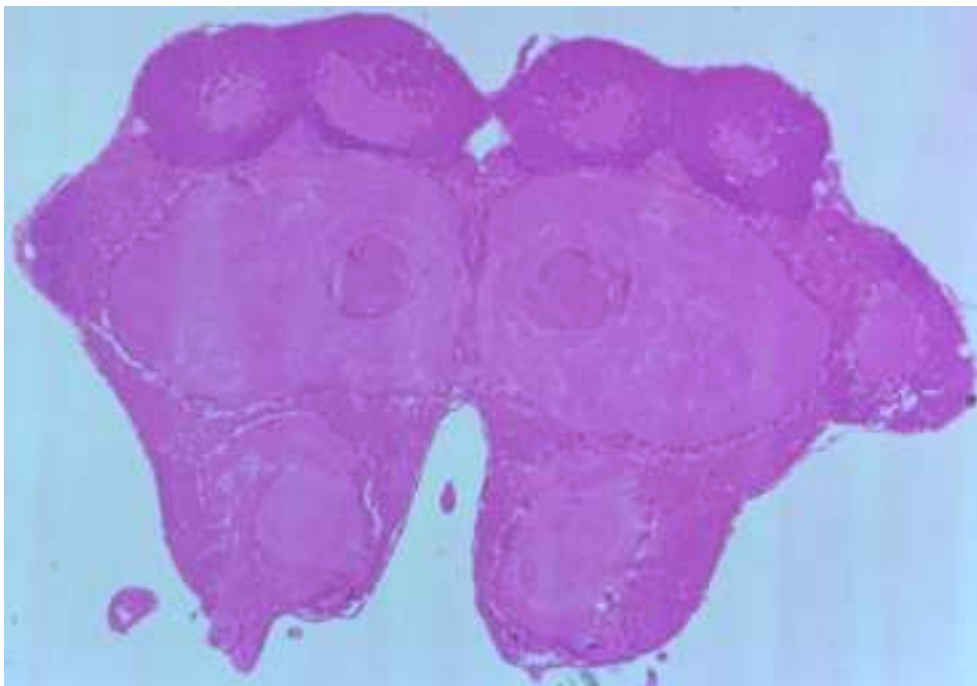


Figura 6 - Corte longitudinal da porção posterior do cérebro de pupa de olho fracamente pigmentado de *A. s. subterraneus*, possibilitando a visão dos lobos  $\alpha$  (AL); lóbulo óptico (LO), neurópila (N), lóbulo antenal (LA) (Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ).

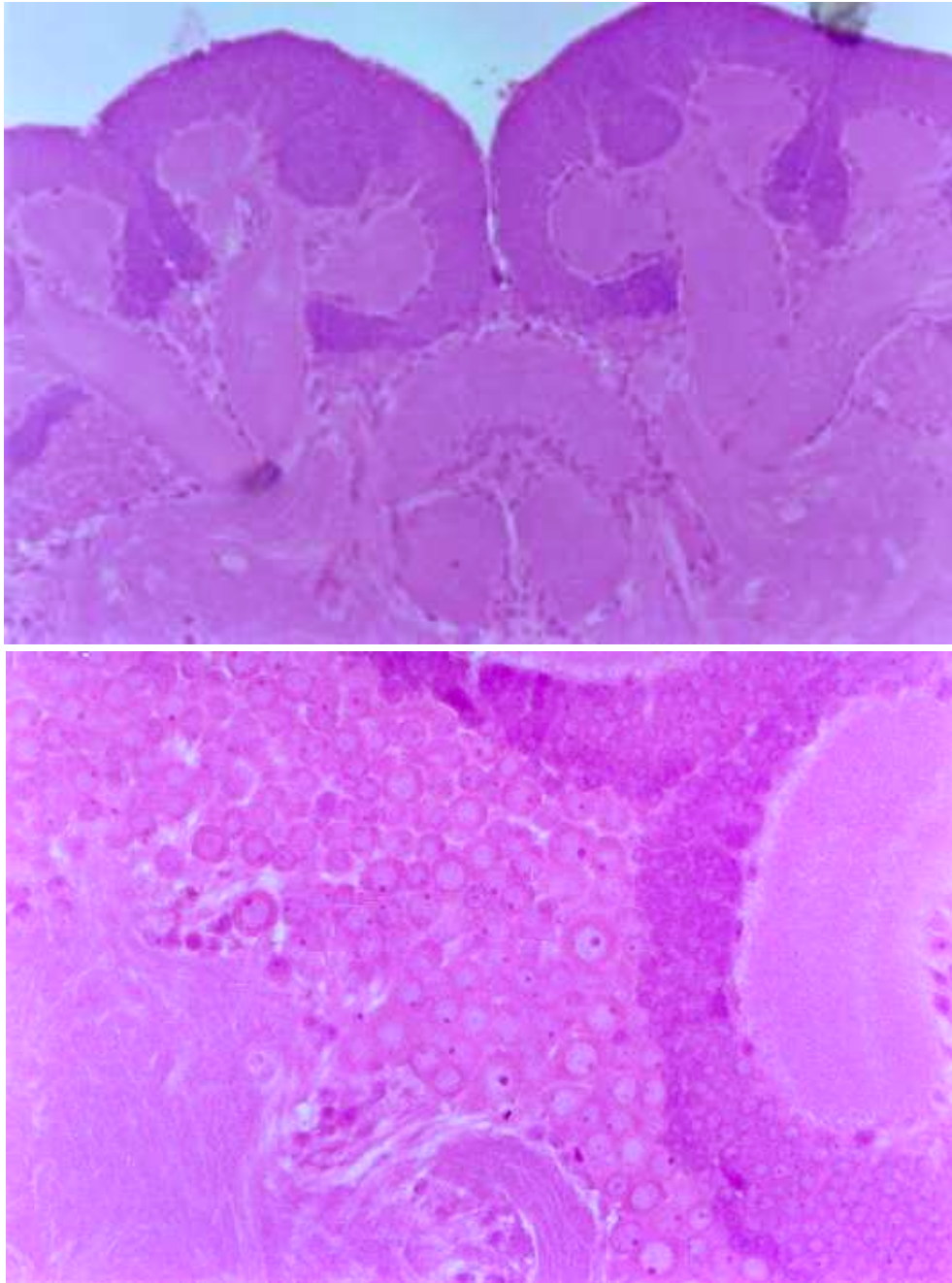


Figura 7 - Corte longitudinal (A), mostrando os três tipos de células encontrados no cérebro de pupa de olho mediantemente pigmentado de operária maior de *A. s. subterraneus*, C1 (neuroblastos), C2 (células de Kenyon), C3 (interneurônios); e células de Kenyon (C2) dos corpora pedunculata (B), células nervosas com aspecto globoso (interneurônios) (C3) e neurópila (N), de pupa de olho mediantemente pigmentado de operária maior de *A. s. subterraneus* (Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$ ).

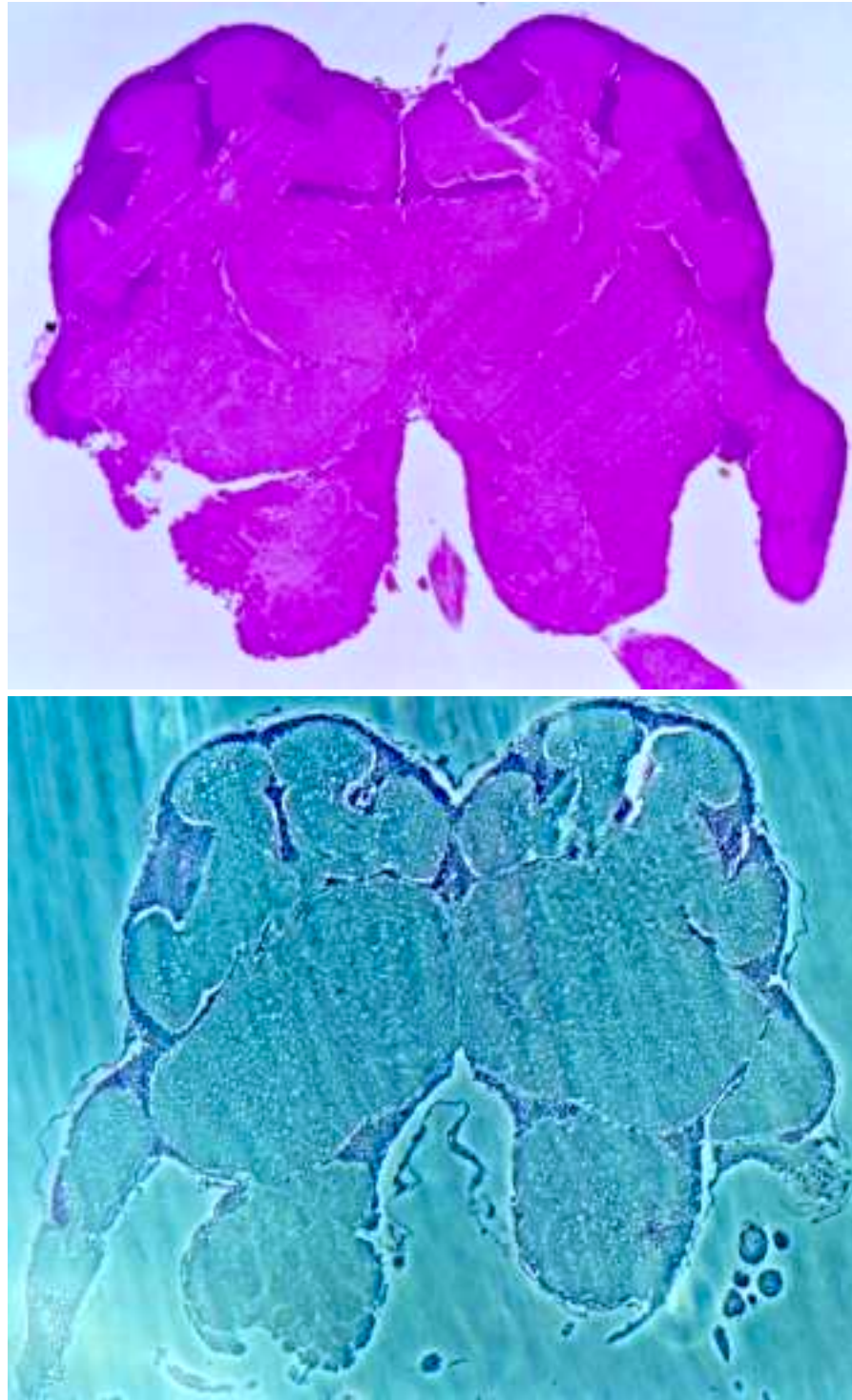


Figura 8 – Corte longitudinal do cérebro de pupa de corpo pigmentado (A) e adulto (foto tirada com lente de contraste ou fase) (B) de *A. s. subterraneus*, mostrando a ocupação do córtex cerebral pela neuropila (N), cálice (CA), células de Kenyon (CK), lóbulo antenal (LA) e lóbulo óptico (LO) (Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ).

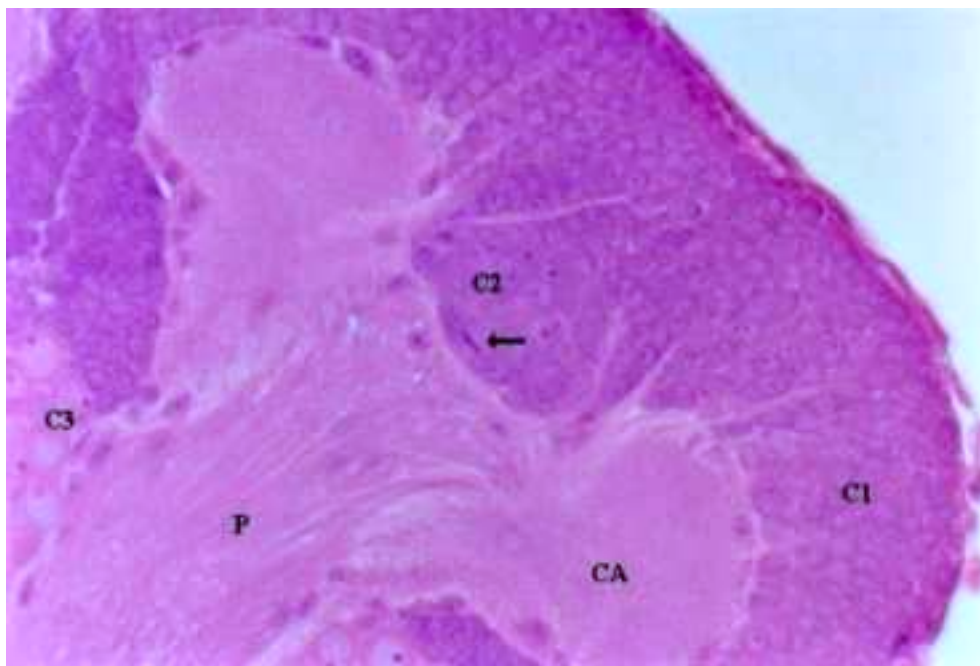


Figura 9 – Corte longitudinal do cérebro de pupa de olho mediantemente pigmentado de *A. s. subterraneus*, mostrando um terceiro grupo de células (C3), localizado logo abaixo dos corpora pedunculata (interneurônios); a seta indica a região de atividade mitótica, C2 correspondente aos neuroblastos e C1 corresponde às células de Kenyon, pedúnculo (P), cálice (CA) (Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ).

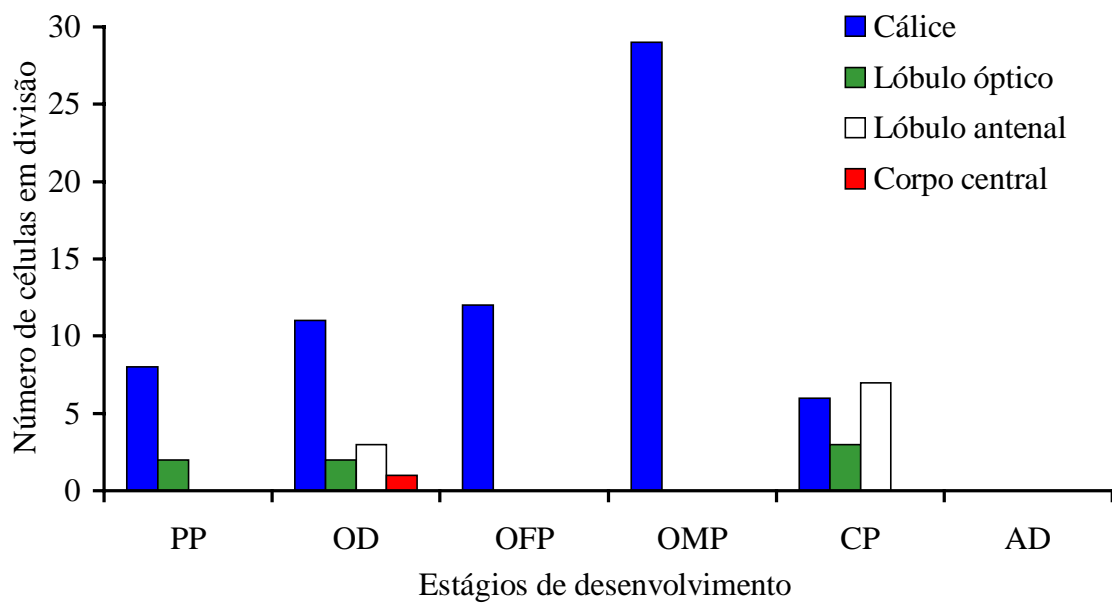


Figura 10 - Número de células em divisão em diferentes regiões do cérebro de operária maior de *A. s. subterraneus* durante o desenvolvimento pupal; pré-pupa (PP), pupa de olho despigmentado (OD), pupa de olho fracamente pigmentado (OFP), pupa de olho mediamente pigmentado (OMP), pupa de corpo pigmentado (CP) e adulto (AD).

#### 4. DISCUSSÃO

A estrutura do cérebro de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *A. octospinosus* (DELABIE, 1984) é bastante semelhante ao observado em outros Hymenoptera (GRONENBERG, 1999). Em Lepidoptera (PEARSON, 1971), e em *Drosophila* (Ito et al., 1998, citados por STRAUSFELD, 1998), é descrito um terceiro lóbulo, o  $\gamma$ , o qual não foi observado em *A. s. subterraneus*, no presente estudo. Os lóbulos dos corpora pedunculata constituem as maiores regiões de impulso nervoso do sistema, mas também recebem impulsos adicionais e elevam o feedback de neurônios voltados para o cálice. Em todos os insetos, os corpora pedunculata recebem impulso dos neurônios que carregam informações dos lóbulos antenais. Dentro do cálice, cada um desses neurônios se comunica com um grande número de células de Kenyon (CHAPMAN, 1998). Em abelhas, o cálice também recebe impulso direto dos lóbulos ópticos, enquanto os impulsos visuais parecem ser ausentes ou inconspícuos em outras ordens de insetos (STRAUSFELD, 1998). Outros grupos de neurônios, conhecidos como neurônios feedback, arborizam em ambos os lóbulos e no cálice. Muitos interneurônios se dirigem primariamente para outras partes do protocérebro, incluindo o corpo central. Este pode ser visto entre os pedúnculos dos cálices, logo abaixo dos corpora pedunculata. Muitas de suas células produzem neuropeptídeos, provavelmente usados

como neurotransmissores (CHAPMAN, 1998). Apesar de não terem sido utilizadas técnicas específicas para o rastreamento das arborizações dos neurônios, a morfologia do cérebro, em especial a região do cálice dos corpora pedunculata, é bastante semelhante àquela descrita para abelhas (FAHRBACH e ROBINSON, 1995) e vespas (GRONENBERG, 1999), sugerindo que os fenômenos acima podem estar ocorrendo em *A. s. subterraneus*.

Estudos realizados com a formiga *Pachycondyla cafraria* desde a fase pré-pupal até a vida adulta, mostraram a existência de dois grupos celulares que diferem pelo tamanho e pela atividade mitótica. Essa dualidade seria mantida até os últimos momentos da pupação. O primeiro grupo, localizado no centro do cálice, seria composto de células globosas com núcleos grandes, enquanto o segundo grupo contornaria o primeiro grupo e formaria pequenas células todas idênticas. Pouco a pouco, as células pequenas invadiriam a região dos corpora pedunculata até chegar à vida adulta. Já as células maiores diminuiriam seu volume até finalmente tomarem a forma das demais (MASSON, 1970), como aconteceu com *A. s. subterraneus*. Em *Drosophila melanogaster*, TECHNAU e HEISENBERG (1982) observaram que, desde o primeiro ínstar larval, os corpora pedunculata são bem discerníveis, dispostos na mesma posição e orientação que no adulto, sugerindo que o desenvolvimento desta região do cérebro consiste na adição de células de Kenyon e no alongamento de seus axônios, promovendo assim, o crescimento da neurópila central. Em larvas de *A. s. subterraneus*, essas características são perfeitamente similares (dados não mostrados). Segundo Technau, citado por LEVINE et al. (1995), a reorganização da neurópila ocorreria através da quebra das fibras dos neurônios intrínsecos, que formariam novas fibras. Os neuroblastos proliferam durante a vida larval e sua progênie se diferencia, durante a transição larva/pupa, em outros neurônios; ou morrem, por morte celular programada. Os neuroblastos persistentes continuam proliferando na vida adulta. Níveis modestos de divisão celular também foram detectados nos corpora pedunculata de adultos do besouro *Aleochoa curtula* (FAHRBACH et

al., 1995) e no grilo *Acheta domesticus* (CAYRE et al., 1994). A neurogênese em adultos de formigas (GRONENBERG et al., 1996) e abelhas (FAHRBACH et al., 1995) foi investigada com o objetivo de se explicar a plasticidade comportamental e neural desses insetos, já que tal plasticidade poderia ocorrer devido à proliferação de células nervosas. Entretanto, esses autores não encontraram indícios de divisão celular nos adultos, o que também foi demonstrado neste estudo.

O padrão de reorganização neural durante o desenvolvimento pós-embrionário tem sido descrito em algumas espécies de insetos (EDWARDS, 1969; TECHNAU e HEISENBERG, 1982) e os hormônios morfogenéticos [(hormônio juvenil (HJ) e 20-hidroxiecdisona (20-HE)] são citados como possíveis mediadores desse processo (CAYRE et al., 1994; RESTIFO, 1995). Uma razoável suposição para o remodelamento estrutural e funcional dos neurônios está ligada às diferenças entre a capacidade comportamental de larvas e adultos (LEVINE et al., 1995). Em abelhas, essa regulação parece estar presente, devido à pequena atividade mitótica observada no cérebro no último ínstar larval, que coincide com quantidades mínimas de HJ presentes na hemolinfa desses insetos (VITT e HARTFELDER, 1998). Witthoft (1967), citado por VITT e HARTFELDER (1998), mostrou que, durante a fase pupal, ocorre neurogênese considerável, encontrando 32.000 células no cálice dos corpora pedunculata de pré-pupa e, aproximadamente, 340.000 em adultos de *Apis mellifera*. O mesmo ocorre nas células do lóbulo antenal que, durante a fase de pré-pupa, são em torno de 5.000 vindo a totalizar, quando pupas, 15.000. Apesar de não ter sido feita a contagem de células no cérebro das formigas, é facilmente perceptível um aumento no tamanho do cérebro quando se compara pré-pupa e adulto (dados não mostrados), o que sugere intensa atividade proliferativa durante a pupação.

A atividade proliferativa de células nervosas observada em *A. s. subterraneus* durante a fase pupal mostrou uma certa flutuação e, em diferentes fases, apresentou sítios de divisão diferentes, embora na região dos cálices dos corpora pedunculata fosse sempre frequente. Em holometábolos,

na ausência de HJ, o nível de ecdisteróides na hemolinfa eleva-se, iniciando assim, o programa pupal. Em *Manduca sexta* (Lepidoptera; Sphingidae), durante a pupação (que dura em torno de 20 dias), o nível de ecdisteróides tem seu ponto crítico registrado em torno do 10<sup>o</sup> dia, ou seja, na metade do período pupal, coincidindo com o crescimento de arborizações dendríticas do cérebro. A partir do 12<sup>o</sup> dia, o nível decai vertiginosamente (CHAPMAN, 1998). Essa variação no título de hormônio pode ser o responsável pela oscilação e distribuição de divisão celular no cérebro de *A. s. subterraneus*, quando o seu predomínio se dá num aparente momento de transição correspondente às pupas de olho mediantemente pigmentado, que pode-se considerar a fase crítica do desenvolvimento. Concomitantemente a esse acontecimento, é possível que, através da proliferação de células nervosas, ocorra, conseqüentemente, o alongamento de arborizações dendríticas e axônicas, promovendo o crescimento do cérebro.

As divisões ocorrem principalmente nas regiões concêntricas do cálice, formando quatro centros de diferenciação, o que também foi observado em *Apis mellifera* por FARRIS et al., (1999). Nessa região estão os neuroblastos do tipo I que, após sucessivas divisões, simétricas e assimétricas, migram para a periferia dos centros de diferenciação, onde se encontram as demais células diferenciadas. Em outros insetos, aparentemente não tem sido investigada a ocorrência de mitoses em outras regiões do córtex cerebral, senão os corpora pedunculata e o lobo antenal. Em larvas de *Apis mellifera*, o crescimento do lóbulo antenal não é pronunciado como nos corpora pedunculata, embora o padrão de flutuação de atividade mitótica seja similar nas duas regiões, com uma aparente diminuição da atividade proliferativa na última fase alimentar (VITT e HARTFELDER, 1998).

Durante a pupação de *A. s. subterraneus*, dentre as células proliferantes, podem estar aquelas decorrentes da gliogênese. Embora os dados sobre esse fenômeno sejam poucos, ecdisteróides têm mostrado estimular a proliferação de células da glia durante o desenvolvimento metamórfico de *Manduca sexta* (KIRSCHENBAUM et al., 1995), sendo descrita

também em adultos de *Locusta migratória* e *Periplaneta americana* (Cayre et al., 1996a, citados por STRAMBI et al., 1999). Entretanto, como as divisões celulares concentram-se na região de diferenciação dos cálices, as mitoses observadas devem ser de neuroblastos.

Assim, quatro tipos celulares foram observados no cérebro de *A. s. subterraneus*: as células de Kenyon diferenciadas dos corpora pedunculata, os neuroblastos precursores das células de Kenyon, as células da glia e um último grupo de células presentes abaixo dos cálices dos corpora pedunculata, base do lóbulo óptico e em torno da neurópila deutocerebral que têm o mesmo aspecto dos interneurônios dos corpora pedunculata, embora maiores nas fases mais jovens, correspondendo assim, também a células de Kenyon.

O remodelamento neural em qualquer fase do desenvolvimento parece ter uma estreita relação com o nível de hormônios morfogenéticos, mas sua influência permanece desconhecida. Como os hormônios são os maiores reguladores de eventos celulares, desencadeando expressão gênica, um caminho para chegar às respostas pode estar na análise de mecanismos moleculares envolvidos na regulação (RESTIFO et al., 1995; LEVINE et al., 1995).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O conhecimento da morfologia do sistema nervoso central dos insetos sociais, através da observação de mudanças que ocorrem nas estruturas neurais durante sua vida pré-imaginal, é importante para a elucidação dos mecanismos que envolvem o cérebro e sua relação com o comportamento. Neste trabalho, descreveu-se a morfologia do cérebro de operárias maiores de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* durante sua atividade pós-embrionária.

As pupas foram classificadas por idade de acordo com a pigmentação dos olhos e corpo, a saber: olho despigmentado, olho fracamente pigmentado, olho mediantemente pigmentado e corpo pigmentado e operárias adultas também foram analisadas. Para obtenção de pré-pupas, observou-se indivíduos que já tinham eliminado os resíduos alimentares (mecônio) do seu intestino médio.

A morfologia do cérebro de *A. s. subterraneus* em desenvolvimento mostra padrões fixos na sua estrutura desde o estágio de pré-pupa, indicando alterações mitóticas principalmente na região dos corpora pedunculata, e morfológicas, quando da ocupação do cérebro pela neurópila. A massa neuropilar tem aspecto de feixes unidos paralelamente quando em direção ao cálice formando o pedúnculo, o corpo central, os lóbulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e o lóbulo óptico

no protocérebro e o lóbulo antenal no deutocérebro. Essa conformação é encontrada também em outros grupos de formigas.

Quatro tipos de células foram observadas: as células de Kenyon, os neuroblastos precursores destas, as células da glia e um grupo de células não identificadas, localizadas logo abaixo dos cálices dos corpora pedunculata, consideradas como interneurônios.

A proliferação de células encontrada nos corpora pedunculata, foi observada nos grupos concêntricos em cada cálice, formando, portanto, quatro agrupamentos. Essas células têm aspecto globoso e o citoplasma apresenta coloração mais fraca, enquanto seus núcleos e cromossomos vistos em metáfase estão corados fortemente. A atividade proliferativa de células nervosas vista em *A. s. subterraneus* durante a fase pupal mostra uma certa flutuação e, em diferentes fases, apresentou-se sítios de divisão diferentes. Mitoses se distribuem em pequena quantidade no lóbulo óptico, corpo central e lóbulo antenal, mas são freqüentes nos corpora pedunculata de pupas em todas as fases, sendo mais acentuada naqueles com olhos mediantemente pigmentados. Essas flutuações podem estar relacionadas com a quantidade de hormônios morfogenéticos (HJ e 20-HE) na hemolinfa desse inseto durante a metamorfose, como visto em outros insetos.

Em pupas de corpo pigmentado, a neurópila já ocupa a maior parte do gânglio cerebral enquanto as células de Kenyon se restringem a porções periféricas, principalmente nos cálices. No inseto adulto, as estruturas internas já estão formadas, não sendo encontradas células em divisão.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO CÉREBRO EM DIFERENTES CASTAS DE *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA; FORMICIDAE; MYRMICINAE) DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

#### 1. INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera constituem, biologicamente, um grupo muito interessante, pois exibem grande diversidade de hábitos e de complexidade de comportamentos que culminam na organização social de vespas, abelhas e formigas (BORROR et al., 1992).

Todas as formigas são insetos sociais dotados de um amplo repertório comportamental particularmente complexo (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). As formigas também oferecem ampla variação de adaptações comportamentais e estilo de vida que são congruentes com várias diferenças morfológicas entre as espécies (GRONENBERG, 1999). Esses insetos têm atraído o interesse de neuroanatomistas e neuroetologistas, dada a possível relação de determinados subcompartimentos do cérebro com a aprendizagem e a memória do inseto (STRAUSFELD et al., 1998). Todas essas

características fazem das formigas material biológico viável às inferências sobre as relações morfométricas do cérebro com a idade e a função exercida pelo representante da casta de uma colônia. Assim, o acompanhamento do crescimento do cérebro de um inseto que apresenta diversos padrões de comportamento pode refletir diferenças estruturais e funcionais, além de mostrar o padrão de desenvolvimento deste órgão.

Das três partes que constituem o cérebro, o protocérebro é o mais volumoso e, ao mesmo tempo, mais complexo. O protocérebro recebe os nervos dos órgãos visuais, e as massas neuropilares distintas podem representar importantes centros de associação: lóbulos ópticos, centros ocelares, corpo central, ponte protocerebral e corpora pedunculata. Este último tem sido uma das estruturas mais estudadas em virtude de indicar estreita relação com a memória e aprendizagem dos insetos. O deutocérebro é composto essencialmente de dois centros antenais ligados por uma comissura. O tritocérebro está localizado abaixo do deutocérebro e é extremamente reduzido nos Hymenoptera. Seus lados são unidos pela comissura subesofágica; eles constituem o centro pré-oral (CHAPMAN, 1998).

Estudos realizados com abelhas e formigas sugerem que a plasticidade comportamental, além da idade, estimulam a plasticidade neural. Por exemplo, o que acontece com a neurópila dos cálices dos corpora pedunculata de *Apis mellifera*, que é significativamente expandida e a região das células de Kenyon, (também significativamente reduzida), quando estas deixam de operar como nutrizes e passam a atuar como forrageiras, seja em condições naturais ou por indução (FAHRBACH e ROBINSON, 1995, 1996; GRONENBERG et al., 1996).

A atuação do hormônio juvenil também é discutida e sua participação nesses eventos é constante (FAHRBACH e ROBINSON, 1995,1996; STRAMBI et al., 1999).

O aumento no volume de estruturas internas de um inseto é limitado pela cutícula, embora em larvas de holometábolos com cutícula mole, ocorra um possível crescimento. Assim como na epiderme, o aumento no tamanho de

um órgão interno pode resultar de um aumento no tamanho ou no número de células ou, às vezes, em ambos. Em muitos insetos holometábolos, existe extensiva reconstrução do sistema nervoso durante a metamorfose, em que os neuroblastos persistem durante o período larval. Dessa forma, o cérebro expande-se durante a pupação, principalmente devido ao desenvolvimento dos lóbulos ópticos (CHAPMANN, 1998). Assim, o crescimento dos insetos pode ser avaliado através do aumento de peso, crescimento da cutícula, crescimento alométrico e de tecidos (PARRA, 1979). Os padrões gerais de crescimento de determinadas regiões do cérebro de *A. mellifera* têm sido previamente investigados pela morfometria do cérebro de larvas e pupas de rainha, macho e operária (Lucht-Bertram, 1962, citado por VITT e HARTFELDER, 1998), mostrando que divergências no crescimento de diferentes regiões do cérebro se manifestam principalmente durante o último instar larval.

Através da análise morfométrica do cérebro de *A. s. subterraneus*, objetiva-se, neste trabalho, observar o padrão do desenvolvimento do cérebro de operárias maiores, rainhas e machos durante seu desenvolvimento pós-embriônico, a fim de se estabelecer possíveis relações estruturais com aspectos comportamentais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

Os espécimens foram obtidos de ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, de acordo com a metodologia descrita por DELLA LUCIA *et al.* (1987).

Apenas as rainhas de *A. s. molestans* foram coletadas em condições naturais, por não haver representantes de sua casta em laboratório, e somente foram utilizadas no estudo pré-pupas de operárias maiores de *A. s. subterraneus*, por haver apenas aqueles representantes da casta, naquele estágio, em laboratório.

As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Para obtenção de pré-pupas, foram coletadas larvas que apresentavam o intestino médio ainda cheio de resíduos alimentares (mecônio). A presença do meconium é de fácil observação, visto que ele forma uma única estrutura de cor escura no corpo do animal uniformemente branco (DELABIE, 1984). As larvas foram separadas em um copo plástico (500ml) contendo parte do fungo das quais elas se alimentavam e também algumas operárias adultas, de modo que o novo ambiente se mantivesse com as

mesmas condições físicas do ninho original. Passados um a dois dias, as larvas pós-defecantes foram coletadas. Esses indivíduos foram considerados pré-pupas, pois segundo Weber (1972), citado por DELABIE (1984), em *Acromyrmex octospinosus*, a fase pré-pupal equivale aos cinco dias finais da vida larval, compreendido entre a expulsão do meconium e a muda pupal.

Durante o desenvolvimento da formiga *Trachymyrmex septentrionalis*, os olhos compostos tornam-se pigmentados antes de outras partes do corpo em todas as castas (WEBER, 1966). O mesmo acontece com *A. s. subterraneus*. Assim, as pupas foram coletadas diretamente dos ninhos e os indivíduos foram classificados por idade, de acordo com a intensidade da pigmentação dos olhos e do corpo, a saber: olho despigmentado, olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea clara), olho mediamente pigmentado (pigmentação marrom) e corpo pigmentado (cutícula amarelada). Operárias maior, rainhas e machos adultos também foram analisados.

## **2.2. Análise morfométrica**

Os cérebros de cinco indivíduos por classe de idade foram extraídos e fixados em Paraformaldeído, a 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Posteriormente, sua área foi medida com o auxílio de uma câmera digital SONY CCD-IRIS acoplada a um estereomicroscópio OLYMPUS-SZH 10. O mesmo procedimento foi seguido para o cálculo de volume, através do método de Cavalieri, segundo COGGESHALL (1992), utilizando-se um microscópio ótico OLYMPUS BX60. Todas as medidas foram feitas utilizando o programa de análise de imagem Image-Pro Plus<sup>®</sup>. A análise de imagem com auxílio de computador pode melhorar a precisão das medidas de caracteres morfométricos em relação àquelas obtidas com o uso de ocular micrométrica (CLARKE et al., 1986), eliminando erros na transcrição de valores, já que estes são gravados diretamente no computador e automaticamente analisados. Na análise estatística, utilizou-se o teste de Tukey, a 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

Comparações da área do cérebro mostram que, em operárias, a área total é maior no estágio adulto, embora olho mediantemente pigmentado apareça como uma fase crítica do desenvolvimento, que corresponde à fase em que há um aumento significativo nas suas proporções, provavelmente decorrente de uma maior atividade mitótica, coincidente com os resultados observados no Capítulo 1. A fase de pré-pupa não apresentou diferença significativa, quando comparada à fase de indivíduos de olho despigmentado e fracamente pigmentado (Figura 1). Em rainhas, a variação do crescimento não é significativa nos diferentes estágios, sugerindo um crescimento proporcional das estruturas internas do cérebro, embora indivíduos de olho fracamente pigmentado e corpo pigmentado tenham mostrado pequenos picos de desenvolvimento quando visualizados na Figura 2. Já em machos, pupas de olho fracamente pigmentado, olho mediantemente pigmentado, e adulto, os dados não diferem significativamente entre si; contudo, as de olho despigmentado e corpo pigmentado que apresentam a menor e maior área respectivamente diferem estatisticamente entre si e em relação aos outros estágios (Figura 3). Nestes, as fases críticas estão representadas nos indivíduos de olho fracamente pigmentado e, principalmente, de corpo pigmentado, que apresentam um valor significativo igual a 0,315 e 0,413 mm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 3).

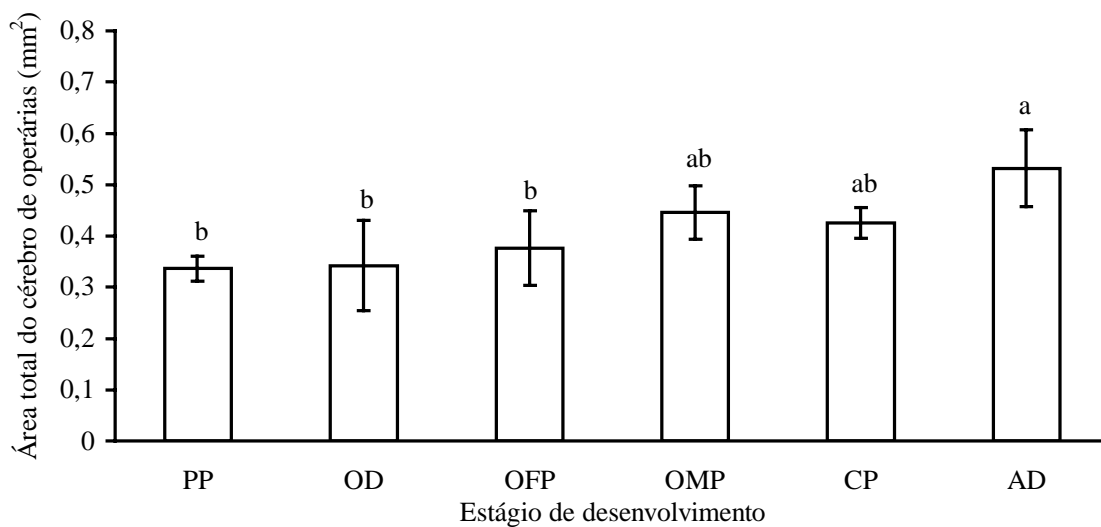


Figura 1 - Área total do cérebro de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em diferentes estágios do desenvolvimento. Barra com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

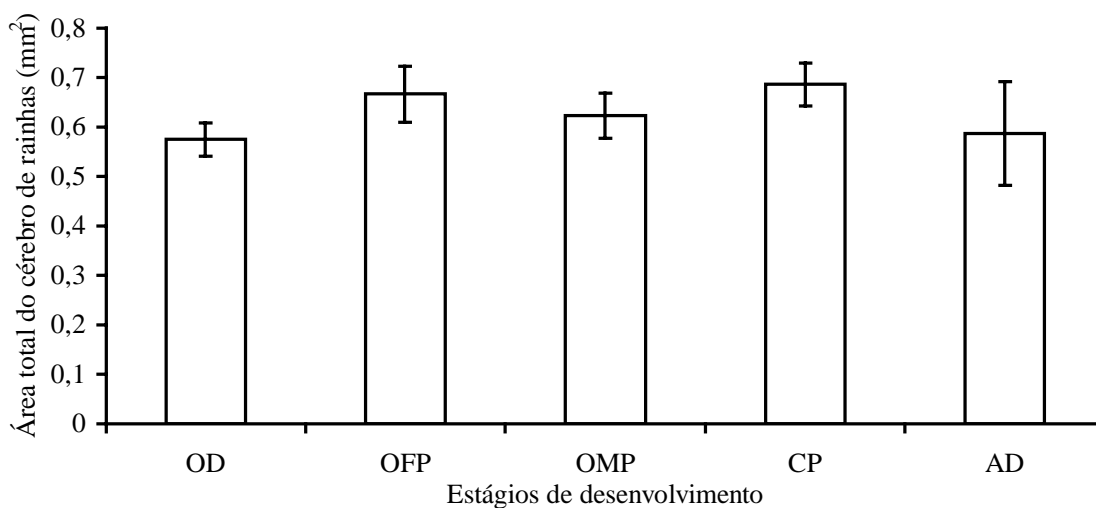


Figura 2 - Área total do cérebro de rainhas de *Acromyrmex subterraneus molestans* em diferentes estágios do desenvolvimento. A variação do crescimento do cérebro em rainhas não é significativa.

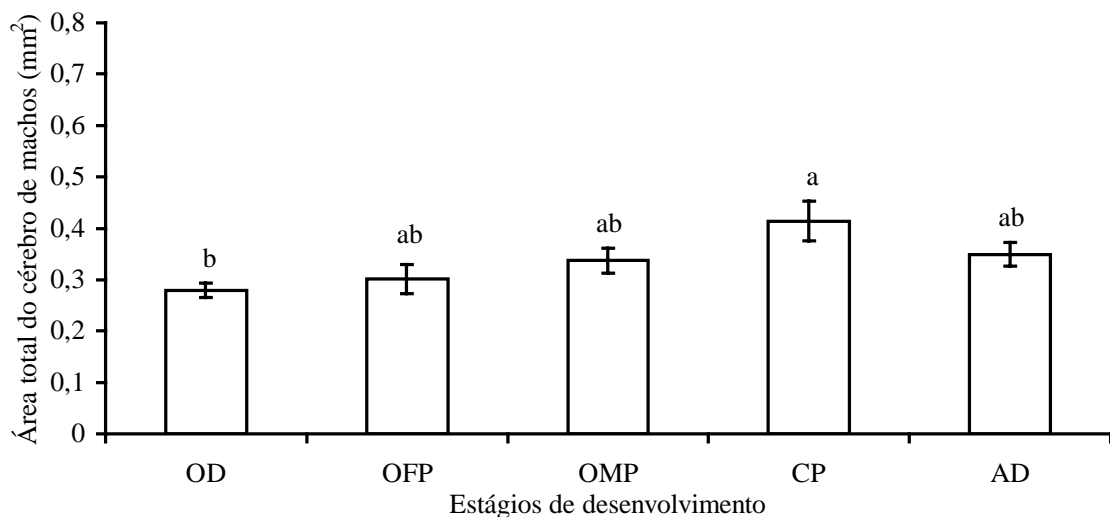


Figura 3 – Área total do cérebro de machos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em diferentes estágios do desenvolvimento. Barra com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na comparação entre castas nos estágios de olho despigmentado, olho fracamente pigmentado e corpo pigmentado, a área total do cérebro de rainha é maior diferindo dos demais, apresentando mesmo tamanho apenas quando rainhas adultas são comparadas com operárias adultas (Figura 4).

Operárias de olho despigmentado, olho fracamente pigmentado e corpo pigmentado têm o mesmo padrão de desenvolvimento do cérebro que machos. Dessa forma, em todas as castas de olho medianamente pigmentado, a área do cérebro difere entre si, sendo a maior área ( $0,622 \text{ mm}^2$ ) observada em rainhas, e a menor ( $0,337 \text{ mm}^2$ ) em machos (Figura 4).

O volume do cérebro de operárias calculado durante o desenvolvimento indicou pequenas variações. Da fase pré-pupal para pupa de olho despigmentado, o volume do cérebro aumenta acentuadamente, vindo a tomar novas proporções quando adulto, totalizando 49% de crescimento entre o estágio de pré-pupa e a vida adulta (Figura 5).

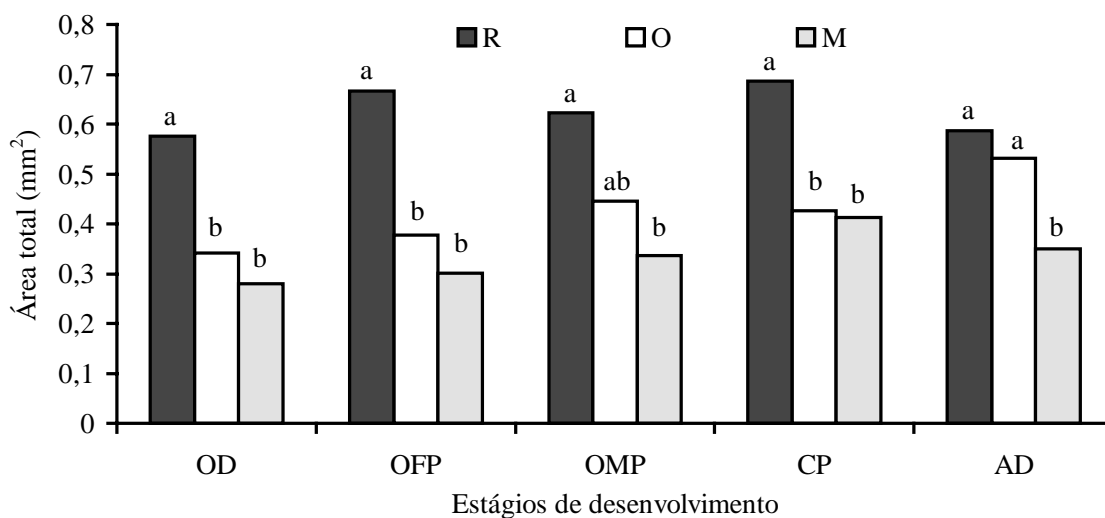


Figura 4 - Área total do cérebro de rainha (R), operária (O) e macho (M) de *Acromyrmex subterraneus* em diferentes estágios de desenvolvimento. Barra com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

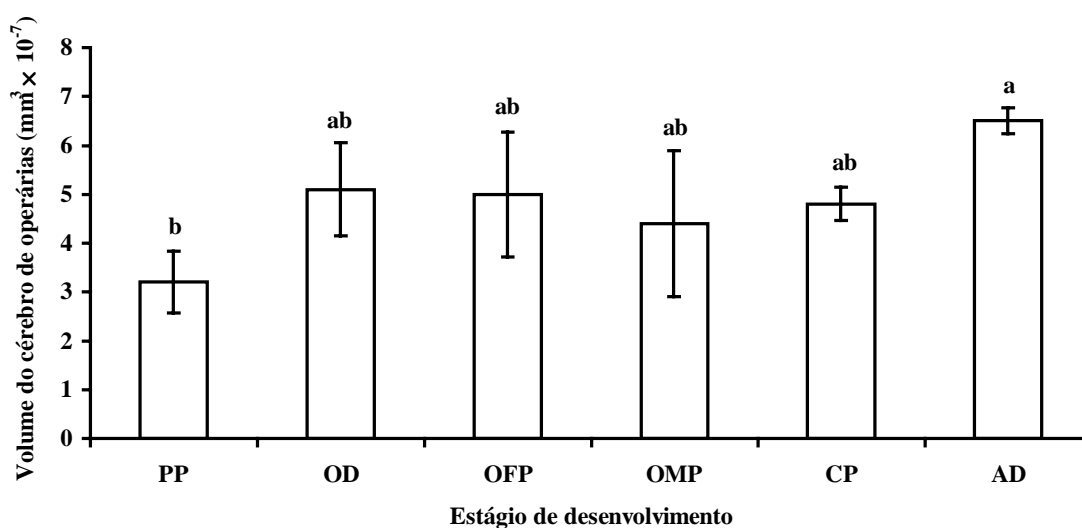


Figura 5 - Volume do cérebro de operárias de *Acromyrmex subterraneus* em diferentes estágios do desenvolvimento. Barra com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O volume do protocérebro corresponde, em média, a 75% do volume total do cérebro, enquanto o deutocérebro corresponde a 25%. Esses valores ocorrem desde pupas com olho despigmentado até a vida adulta, indicando um crescimento proporcional de ambas as partes do cérebro (Figuras 6 e 7).

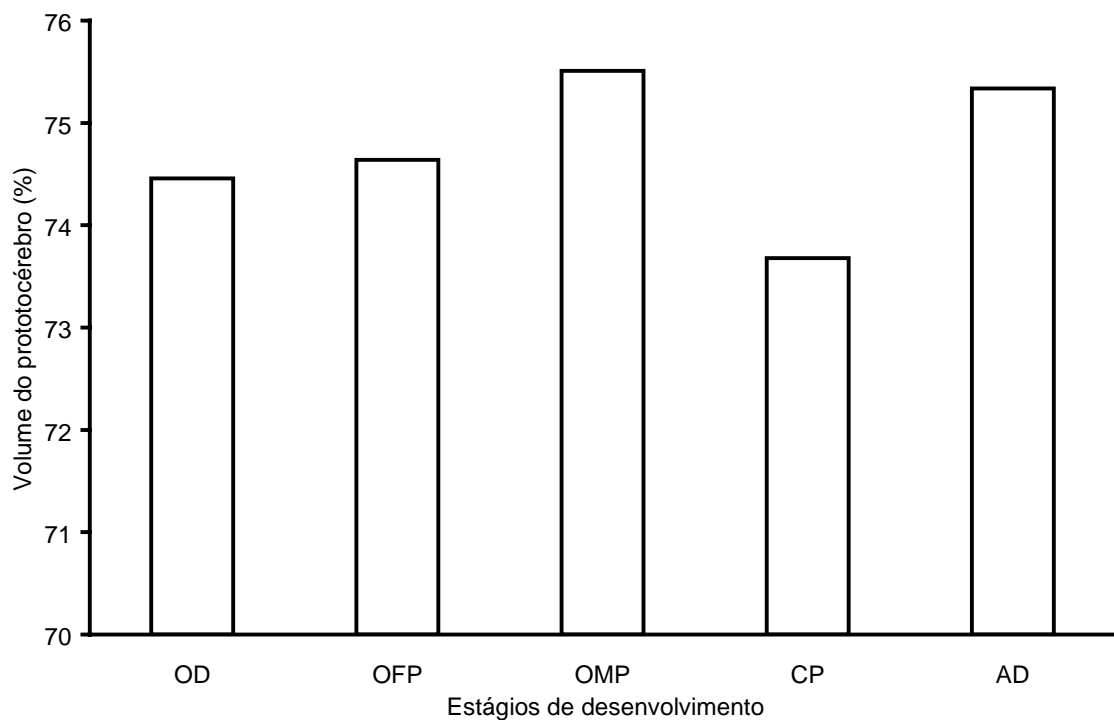


Figura 6 - Percentual do volume do protocérebro de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em diferentes fases do desenvolvimento.

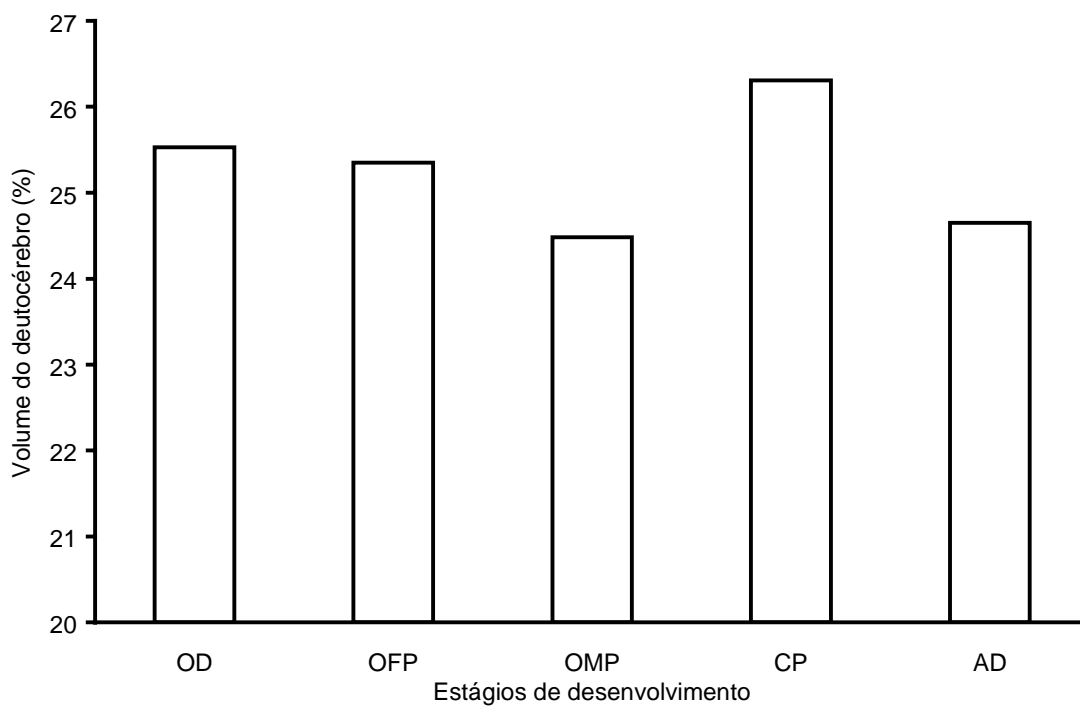


Figura 7 - Percentual do volume do deutocérebro de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em diferentes fases do desenvolvimento.

#### 4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de estruturas internas do cérebro durante a pupação pode refletir futuros aspectos do comportamento comuns à rainha, operária e macho. Embora os dados, que correspondem à área total do cérebro de operárias e rainhas adultas de *A. s. subterraneus*, não tenham mostrado diferenças significativas, em formigas, os corpora pedunculata de operárias são maiores que em outras castas (GRONENBERG et al., 1996). De modo semelhante, em *Apis mellifera*, os corpora pedunculata dos machos são menores que em operárias (Jonescu, 1909, citado por STRAMBI et al., 1999), o que pode ocorrer também com macho de *A. s. subterraneus*, considerando que a área total do cérebro é significativamente menor que nas demais castas. Nos machos de *A. s. subterraneus*, os lóbulos antenais e, principalmente, os lóbulos ópticos podem ser os responsáveis por uma considerável reorganização neural na fase de pupação, já que durante a vida adulta, esses indivíduos dependem do reconhecimento de sinais químicos e da visão para a realização do acasalamento. A rainha de *A. subterraneus*, como tantas outras, não possui comportamento elaborado, tendo como função principal a postura de ovos, e o crescimento do seu cérebro ( $0,587 \text{ mm}^2$ ) proporcional ao das operárias ( $0,531 \text{ mm}^2$ ), pode ser em função do tamanho do seu corpo.

JAFFE e PEREZ (1989), estudando o cérebro de algumas espécies de formiga da tribo Attini com sistema de casta operária polimórfica, observaram que muitas espécies sociais têm sistema de comunicação química mais complexo e maior desenvolvimento dos corpora pedunculata e lobos olfatórios; contudo, essa tendência parece reverter em *Atta laevigata* (F. Smith, 1858): indivíduos dessa espécie são geralmente menos desenvolvidos neuralmente. Os autores ainda se referem à diferenciação neural em castas de operárias de diferentes espécies como não sendo uniformes, ou seja, cada espécie evoluiu diferentes padrões de diferenciação entre as castas de operárias. Isso indica uma correlação positiva entre o tamanho de estruturas cerebrais e a aprendizagem. Dessa forma, o mesmo pode ocorrer com castas reprodutivas, a despeito do seu comportamento.

Na formiga *Camponotus floridanus*, o volume total do cérebro de operárias aumenta de 15 a 20% entre a emergência e a idade de 10 dias. Além disso, a mudança no volume difere entre os diferentes compartimentos do cérebro e especialmente o lóbulo antenal e os corpora pedunculata cresceram mais do que o restante do cérebro (GRONENBERG et al., 1996). Em *A. s. subterraneus*, do estágio mais jovem (pré-pupa) até a vida adulta, o cérebro dobrou seu volume e embora esse crescimento fosse pronunciado, o protocérebro e o deutocérebro mostraram um crescimento proporcional. As mudanças que ocorrem na forma e nas proporções do cérebro de *A. s. subterraneus*, num momento em que este se expande, podem estar acontecendo em decorrência da proliferação de células nervosas e o prolongamento das suas fibras axônicas e dendríticas, ou também, pela sua acomodação em determinadas regiões do cérebro. Já, num momento em que o cérebro é visto regredindo em seu tamanho, no decorrer e, principalmente, ao final da vida pós embrionária, como aconteceu com a área do cérebro de rainhas e machos, pode ser em consequência da degeneração de células nervosas. Em *Manduca sexta*, as células nervosas começam a se dividir em diferentes períodos do desenvolvimento larval. As divisões mais rápidas ocorrem no fim do estágio larval, que pode corresponder àquela fase de

transição de larva para pupa (pré-pupa). Algumas dessas células morrem antes e durante o desenvolvimento pupal. O crescimento de arborizações dendríticas se dá durante a pupação, coincidentemente com um período em que o título de ecdisteróide tem o seu nível mais alto. Logo após a eclosão, quando o nível desse hormônio é acentuadamente baixo, ocorre a degeneração de neurônios (CHAPMAN, 1998). Assim, os mecanismos fisiológicos que atuam durante o desenvolvimento de *A. s. subterraneus* podem ser semelhantes aos desenvolvidos por *Manduca* e, talvez, outros insetos holometábolos, alterando apenas o hormônio produzido e o momento de sua liberação, de acordo com a característica biológica de cada espécie.

Mudanças na forma de um inseto somente ocorrem quando da sua muda e todos os mecanismos fisiológicos desencadeantes do desenvolvimento larval e pupal apontam para um grupo de reguladores, os hormônios morfogenéticos: hormônio juvenil e ecdisteróides. Eventos como a produção de cutícula em insetos holometábolos, durante qualquer estágio de desenvolvimento, depende de o hormônio juvenil estar presente ou não durante o chamado período crítico. Esse período geralmente ocorre quando o ecdisteróide inicia a próxima muda. Assim, em hemimetábolos, se o HJ estiver presente durante o período crítico, o inseto retém suas características larvais, se não, o inseto torna-se adulto. Em holometábolos, na ausência de HJ, o programa pupal é iniciado.

Em Lepidoptera, é produzido o 3-hidroxiecdisona; em *Apis* e Heteroptera, o principal ecdisteróide é o makisterona A (CHAPMAN, 1998); em *Drosophila*, o 20-hidroxiecdisona (20HE) (RESTIFO et al., 1995). Várias formas de hormônio juvenil são conhecidas, de acordo com o comprimento da cadeia carbônica (C18 = HJ I, C17 = HJ II, C16 = HJ III e C19 = HJ 0). Em muitos insetos, o HJ III é o único hormônio juvenil observado, enquanto os HJ 0, HJ I e HJ II existem somente em Lepidoptera (Schooley et al., 1984, citado por STRAMBI et al., 1999).

Somente em estudos recentes, os efeitos dos hormônios sobre o sistema nervoso têm sido examinados, e uma atenção particular tem sido dada

a esses efeitos associados a alguns aspectos do comportamento, como a divisão de trabalho e o polietismo etário, em abelhas (STRAMBI et al., 1999). Em operárias de *A. mellifera*, a atuação do hormônio juvenil é discutida como possível reguladora da neurogênese durante o desenvolvimento larval (VITT e HARTFELDER, 1995), observando-se uma grande proliferação de células nervosas durante a fase pré-pupal, tanto nos corpora pedunculata quanto nos lóbulos antenais. Além disso, seu nível na hemolinfa aumenta com a idade, observados em abelhas recém-emergidas, nutridoras e forrageiras, ao mesmo tempo que a neurópila dos corpora pedunculata do cérebro aumenta seu volume (FAHRBACH e ROBINSON, 1996). Em *Apis*, em contraste com operárias, as rainhas apresentam maior nível de hormônio juvenil nos seus primeiros dias de vida adulta, vindo a declinar e permanecer baixo durante o resto da vida. O volume da neurópila do cérebro de rainhas virgens também é menor, quando comparado com acasaladas, e estas, embora não-significativamente, com aquelas que realizaram várias posturas (Fahrbach et al., 1995a, citados por STRAMBI et al., 1999). Isto pode ser explicado, já que em fêmeas adultas de vários insetos, o hormônio juvenil estimula o crescimento de oócitos, a síntese de vitelogenina e sua absorção pelos oócitos, promovendo o desenvolvimento ovariano (STRAMBI et al., 1999), podendo justificar também o desenvolvimento da neurópila. O nível de hormônio juvenil circulante em zangões é muito baixo no seu 1<sup>o</sup> dia de vida, mas atinge altos níveis quando da sua primeira experiência de vôo coincidente com o aumento de volume da neurópila, voltando a diminuir nos dias seguintes (FAHRBACH et al., 1997). Em *C. floridanus*, mudanças no volume da neurópila dos corpora pedunculata relacionadas com as tarefas executadas e o cuidado com a prole foram observadas: a atividade de forrageamento parece contribuir significativamente para o desenvolvimento dos corpora pedunculata (GRONENBERG et al., 1996). Assim, a neuroplasticidade nesses insetos pode estar sob influência da idade, do sexo, do status endócrino e da experiência. Em todos esses casos, a expansão da neurópila dos cálices do corpora pedunculata tem uma correlação negativa com as células de Kenyon. Além

disso, nem em abelhas (FAHRBACH et al., 1995), nem em formigas (GRONENBERG et al., 1996), o aumento no tamanho dos corpora pedunculata é uma consequência da neurogênese; isto pode ser um resultado de crescimento axonal e, ou, dendrítico. Como os resultados do Capítulo 1 mostram que, em *A. s. subterraneus* não ocorre neurogênese em indivíduos adultos e na pupa de corpo pigmentado a taxa de mitose é bastante baixa, pode-se sugerir que o aumento da área do cérebro em operárias adultas é resultado do crescimento axonal e, ou, dendrítico. Nesse sentido, o aumento da área do cérebro da fase de pré-pupa de olho fracamente pigmentado para a fase de pupa de olho mediantemente pigmentado, assim como o aumento do volume, quando da passagem de pré-pupa para pupa de olho despigmentado, e novamente, em pupa de corpo pigmentado para adulto, podem estar relacionados com diferentes títulos de hormônios morfogenéticos nesses estágios.

Mudanças comportamentais induzidas por hormônios são evidências das ações dos hormônios sobre o sistema nervoso. É provável que a elucidação das interrelações entre o desenvolvimento do cérebro e sua regulação por hormônios seja possível, através de experimentos clássicos onde se faz a análise quantitativa dos hormônios na hemolinfa desses insetos durante o desenvolvimento pós-embrionário.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Através da análise morfométrica do cérebro de *A. s. subterraneus*, objetivou-se, neste trabalho, observar o padrão do desenvolvimento cerebral de operárias maiores, rainhas e machos, a fim de estabelecer possíveis relações estruturais que ocorram durante seu desenvolvimento pós-embrionário com aspectos comportamentais.

As pupas foram coletadas diretamente dos ninhos e os indivíduos foram classificados por idade, de acordo com a intensidade da pigmentação dos olhos e do corpo, a saber: olho despigmentado, olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea), olho mediantemente pigmentado (pigmentação marrom), corpo pigmentado (cutícula amarelada). Operárias maiores, rainhas e machos adultos também foram coletados. Para o cálculo de volume, usou-se o método de Cavalieri, segundo COGGESHALL (1992), utilizando-se um microscópio ótico OLYMPUS BX60. Todas as medidas de área foram feitas, utilizando o programa de análise de imagem Image-Pro Plus®.

Comparações da área do cérebro mostram que, em operárias, a área total apresenta maior desenvolvimento no estágio adulto, embora olho mediantemente pigmentado apareça como uma fase crítica do desenvolvimento; isto é, fase em que há um aumento significativo nas proporções do cérebro. A fase de pré-pupa não apresentou diferença significativa, quando comparada a

indivíduos de olho despigmentado e fracamente pigmentado. Em rainhas, a variação do crescimento não é significativa nos diferentes estágios, sugerindo um crescimento proporcional das estruturas internas do cérebro, embora indivíduos de olho fracamente pigmentado e corpo pigmentado tenham mostrado pequenos picos de desenvolvimento. Já machos, pupas de olho fracamente pigmentado, olho mediantemente pigmentado, e adulto não diferem significativamente entre si; contudo, as de olho despigmentado e corpo pigmentado possuem diferentes padrões de desenvolvimento entre si e em relação a outros estágios. Nestes, os pontos críticos podem ser observados nos indivíduos de olho fracamente pigmentado e, principalmente, de corpo pigmentado, que apresentam um valor mais significativo. Entre castas de olho despigmentado, olho fracamente pigmentado, e corpo pigmentado, a área total do cérebro de rainha difere dos demais, apresentando mesmo tamanho apenas quando rainhas adultas são comparadas com operárias adultas. Operárias de olho despigmentado, olho fracamente pigmentado e corpo pigmentado têm o mesmo padrão de desenvolvimento que machos. Dessa forma, em todas as castas de olho mediantemente pigmentado, a área do cérebro difere entre si. O volume do cérebro de operárias, calculado durante o desenvolvimento, indicou pequenas variações. Da fase pré-pupal para pupa de olho despigmentado, o volume do cérebro aumenta acentuadamente, vindo a tomar novas proporções quando adulto, totalizando 49% de crescimento entre a fase pré-pupal e a vida adulta. O protocérebro ocupa 75% e o deutocérebro 25% do volume total do cérebro em todos os estágios do desenvolvimento pupal, mostrando um crescimento proporcional de ambas as partes do cérebro.

O desenvolvimento de estruturas internas do cérebro durante a pupação pode refletir futuros aspectos do comportamento comuns em rainha, operária e macho.

Como em outros insetos holometábolos, eventos relacionados com o desenvolvimento do sistema nervoso, mostram estar relacionados com o título de hormônios morfogenéticos na hemolinfa; em *A. subterraneus*, os mesmos mecanismos reguladores podem ser sugeridos.

É provável que a elucidação das interrelações entre o desenvolvimento do cérebro e sua regulação por hormônios seja possível, através de experimentos clássicos, onde se faz a análise quantitativa dos hormônios na hemolinfa desses insetos durante o desenvolvimento pós-embrionário.

## CAPÍTULO 3

### ATIVIDADE MITÓTICA NO CÉREBRO DE *Acromyrmex subterraneus* *subterraneus* FOREL, 1893 (HYMENOPTERA; FORMICIDAE) DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

#### 1. INTRODUÇÃO

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução, tendo grande aplicação nos estudos de mecanismos de especiação e variabilidade genética. A descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo. Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA, 1988). Essas diferenças entre indivíduos podem ocorrer devido a rearranjos cromossômicos ao longo de gerações, cuja frequência pode flutuar sazonal, altitudinal e, ou, geograficamente (ROTHFELS, 1980). Esses rearranjos, além

de gerar polimorfismos cromossômicos, podem alterar o padrão de expressão gênica, o que influencia o processo evolutivo das espécies (SHAW et al., 1980). Dentre os grupos mais analisados cariotipicamente, está a ordem Hymenoptera, que ocupa um lugar de destaque na citogenética animal (GOMES, 1995).

Como os primeiros estudos citogenéticos em Hymenoptera consistiam basicamente na determinação do número cromossômico, as técnicas convencionais de esmagamento se tornavam inviáveis, por possibilitarem somente a observação de divisões meióticas. Assim, com o passar do tempo, os resultados obtidos por meio de novas técnicas trouxeram novas informações, promovendo uma reavaliação da citogenética de muitos grupos de insetos (HOSHIBA e ONO, 1984).

Quando se pretende realizar estudos sobre a evolução de determinados grupos, do ponto de vista citogenético, é de vital importância o emprego de técnicas que ofereçam confiabilidade na caracterização dos cariótipos. Os estudos citogenéticos em Hymenoptera têm obtido grande avanço, por meio de emprego de técnicas modernas e com a utilização de tecidos apropriados (GOMES, 1995).

Uma das limitações dos estudos citogenéticos é que as análises são realizadas em células com atividade mitótica e, como os himenópteros são holometabólicos, as mitoses estão restritas às fases jovens do desenvolvimento, especialmente larvas e pupas. Esses estudos utilizam pupas novas chamadas “larvas pós-defecantes” ou pré-pupas, e as metáfases são observadas a partir de lâminas preparadas com a massa cerebral do inseto, pré-tratado com colchicina e citrato de sódio, possibilitando o acúmulo de maior número de células em metáfase. Tal procedimento foi definido por IMAI (1966), utilizando formicídeos. Hoje, adaptado à citogenética de abelhas (MENEZES, 1997; MOREIRA, 1997, BRITO, 1998), vespas (GOMES, 1995; SCHER, 1996; ARAÚJO, 1998) e coleópteros (MAFFEI et al., 2000), com êxito.

IMAI (1966), estabeleceu alguns critérios para a observação de cromossomos mitóticos através da citogenética, utilizando o cérebro do inseto

durante o estágio pré-pupal, quando a cabeça e a região do pronoto tornam-se transparentes e a atividade mitótica torna-se mais ativa; e meióticos, utilizando os testículos de pupa, em que os olhos encontram-se fracamente pigmentados; e ovários de pupa, onde os olhos apresentam uma pigmentação escarlate.

Apesar de existirem esses critérios, não se tem nenhuma informação sobre a natureza exata das células estudadas, já que o cérebro de um inseto é um complexo formado pela união de vários gânglios: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro.

Das três partes que lhe constituem, o protocérebro é o mais volumoso e ao mesmo tempo mais complexo. O protocérebro é bilobado e contínuo lateralmente com os lóbulos ópticos, ocupando uma posição dorsal na cabeça. Essa região bilobada do protocérebro é chamada corpora pedunculata, e está possivelmente relacionada com a aprendizagem, memória e orientação espacial de alguns insetos (Dujardin, 1850; Vowles, 1964a; Mizunami et al., 1993, citados por STRAUSFELD et al., 1998). Cada um desses lobos consiste de uma região de neurópila chamada cálice que compreende três regiões concêntricas de neurópila conhecidas como lábio, colar e região basal, e uma região de interneurônios dispostos periféricamente, denominados células de Kenyon.

O deutocérebro consiste de uma região de neurópila contendo arborizações terminais de neurônios mecanosensoriais do escapo antenal, do pedicelo e talvez do flagelo da antena e, também, contém arborizações dendríticas dos neurônios motores que controlam os músculos antenais. O tritocérebro está localizado abaixo do deutocérebro e é extremamente reduzido nos himenópteros (CHAPMAN, 1998).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é a procura sistematizada das metáfases necessárias ao estudo citogenético durante o desenvolvimento pós-embrionário do cérebro de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, a fim de se determinar qual a região do gânglio cerebral, nas diferentes fases do desenvolvimento, é mais favorável a esses estudos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do material biológico

Os espécimens foram obtidos de ninhos de *A. s. subterraneus*, mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, de acordo com a metodologia descrita por DELLA LUCIA et al. (1987). Somente formas jovens de operárias maiores foram utilizadas no estudo. Para obtenção de pré-pupas, foram coletadas larvas que apresentavam o intestino médio ainda cheio de resíduos alimentares (meconium). A presença do meconium é de fácil observação, visto que ele forma uma única estrutura de cor escura no corpo do animal uniformemente branco (DELABIE, 1984). As larvas foram separadas em um copo plástico (500 ml) contendo parte do fungo das quais elas se alimentam e também algumas operárias adultas, de modo que o novo ambiente se mantivesse com as mesmas condições físicas do ninho original. Um a dois dias após, as larvas pós-defecantes foram coletadas. Esses indivíduos foram considerados pré-pupas, pois segundo Weber (1972), citado por DELABIE (1984), em *Acromyrmex octospinosus*, a fase pré-pupal equivale aos cinco dias finais da vida larval, compreendido entre a expulsão do meconium e a muda pupal.

Durante o desenvolvimento da formiga *Trachymyrmex septentrionalis*, os olhos compostos tornam-se pigmentados antes de outras partes do corpo em todas as castas (WEBER, 1966). O mesmo acontece com *A. s. subterraneus*. Assim, as pupas foram coletadas e classificadas por idade de acordo com a intensidade da pigmentação dos olhos e do corpo, a saber: pré-pupa, pupa de olho despigmentado, pupa de olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea clara), pupa de olho mediamente pigmentado (pigmentação marrom), pupa de corpo pigmentado (cutícula amarelada) e operárias adultas.

As características encontradas nas pupas de *A. octospinosus* (DELABIE, 1984) indicam que, de acordo com a pigmentação dos olhos e do corpo de pupas de *A. s. subterraneus*, aquelas de olho despigmentado correspondem a pupas com dois dias de vida, olho fracamente pigmentado a três dias, olho mediamente pigmentado a seis dias e corpo pigmentado, de 15 a 16 dias de vida.

## **2.2. Análise microscópica**

As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular e no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Os cérebros de três indivíduos de cada estágio foram extraídos e submetidos à preparação de cromossomos mitóticos, segundo a técnica descrita por IMAI et al. (1988), sendo que, em alguns indivíduos, a região dos cálices dos corpora pedunculata foi separada do resto do cérebro na fase de pré-pupa com o objetivo de se observar a região de maior ocorrência de mitoses. Essa técnica consiste em pré-tratamento do material com colchicina e citrato de sódio, o que possibilita um acúmulo de maior número de células em metáfase. O tempo de exposição do material à colchicina varia de acordo com o inseto estudado. No caso de *A. s. subterraneus*, os cérebros ficaram em colchicina por uma hora. As lâminas foram analisadas e as divisões celulares

foram quantificadas em todos os estágios de desenvolvimento onde foram encontradas. Entre essas metáfases, também observou-se aquelas que eram consideradas “adequadas” para a análise citogenética. Esse procedimento foi conduzido com o auxílio de um microscópio LEICA e fotografadas, com um fotomicroscópio OLYMPUS BX60, sob objetiva de imersão de 100 x. Os filmes utilizados foram HQ e KODACOLOR.

Os negativos foram revelados com revelador DEKTOL e fixados com fixador KODAK. A ampliação e cópia foram feitas em papel KODABROME II RC F3, usando os mesmos reagentes acima citados.

A montagem do cariótipo foi feita de acordo com a nomenclatura de IMAI (1991), que divide os cromossomos em dois grupos de acordo com sua morfologia: Cromossomos  $\bar{M}$  (cromossomo meta ou submetacêntrico) e Cromossomos A (cromossomo acrocêntrico).

### 3. RESULTADOS

As preparações mostram nitidamente a presença de 3 tipos celulares de acordo com as características do núcleo. No primeiro tipo, os neuroblastos, que correspondem àquelas células em divisão; no segundo tipo, as células de Kenyon, onde o núcleo é grande e com predomínio de cromatina descondensada e no terceiro tipo, o núcleo apresenta-se pequeno e com cromatina muito condensada, o qual pode ser considerado como células da glia (Figuras 1 (A e B) e 2). As células correspondentes aos interneurônios com aspecto globoso e maiores, descritas no Capítulo 1, não puderam ser encontradas por estarem dispersas, devido ao procedimento para preparação das lâminas.

Os resultados indicam que grande quantidade de prófases e metáfases, ocorreram desde a fase de pré-pupa até a fase de corpo pigmentado, embora os picos de divisão tenham ocorrido em pupas de olhos despigmentados e de olhos mediantemente pigmentados (Figura 3). Dentre essas divisões celulares, a presença de metáfases se mostrou constante desde a fase de pré-pupa até a fase de olho fracamente pigmentado ( $\bar{X} = 28$ ) (Figura 3); em olho mediantemente pigmentado, elas ocorreram três vezes menos (Figura 3). Em indivíduos de corpo pigmentado, entre as divisões, não foram encontradas metáfases (Figura 3) e, em adultos, não foi encontrada nenhuma

célula em divisão, confirmando a ausência de neurogênese nesses insetos (Figuras 1 (A) e 3), embora seus núcleos apresentassem padrão de prófase. As demais regiões do cérebro de pré-pupa apresentaram mais prófases e metáfases que o cálice (Figura 4), embora a diferença não seja significativa (45% das divisões ocorrem nos cálices e 55% ocorrem no resto do cérebro); dessas divisões, 17 e 30% estão em metáfase, nos cálices e demais regiões, respectivamente (Figura 4). Durante a análise dessas preparações, foi possível observar que a maioria das células em divisão do cálice, permaneceram agrupadas e muitas vezes sobrepostas (Figura 1 (B)), sugerindo ser um fator limitante. Já as células das demais regiões, espalharam-se, facilitando a contagem e a análise morfológica dos cromossomos. As metáfases consideradas “ótimas” para análise citogenética, ou seja, aquelas em que os cromossomos se encontravam condensados de forma que possibilitasse a visão da sua morfologia através dos centrômeros, foram encontradas nas fases de pré-pupa (Figura 5 (A)) e pupas de olho despigmentado, perfazendo 10% do número total de metáfases encontradas em todo o cérebro. A Figura 5 (B) mostra células em intérfase e em fase inicial de prófase em pré-pupa. Foram encontradas metáfases com padrões diferentes de condensação em pupas de olho fracamente pigmentado (Figura 6 (A)). A Figura 6 (B) mostra núcleos de pupa de olho mediamente pigmentado no início de prófase. Em pupa de corpo pigmentado, são observados núcleos interfásicos correspondentes a neurônios e provavelmente a células da glia na Figura 2.

*Acromyrmex subterraneus subterraneus* apresentou  $2n = 38$  cromossomos (10 M e 28 A) (Figura 7).

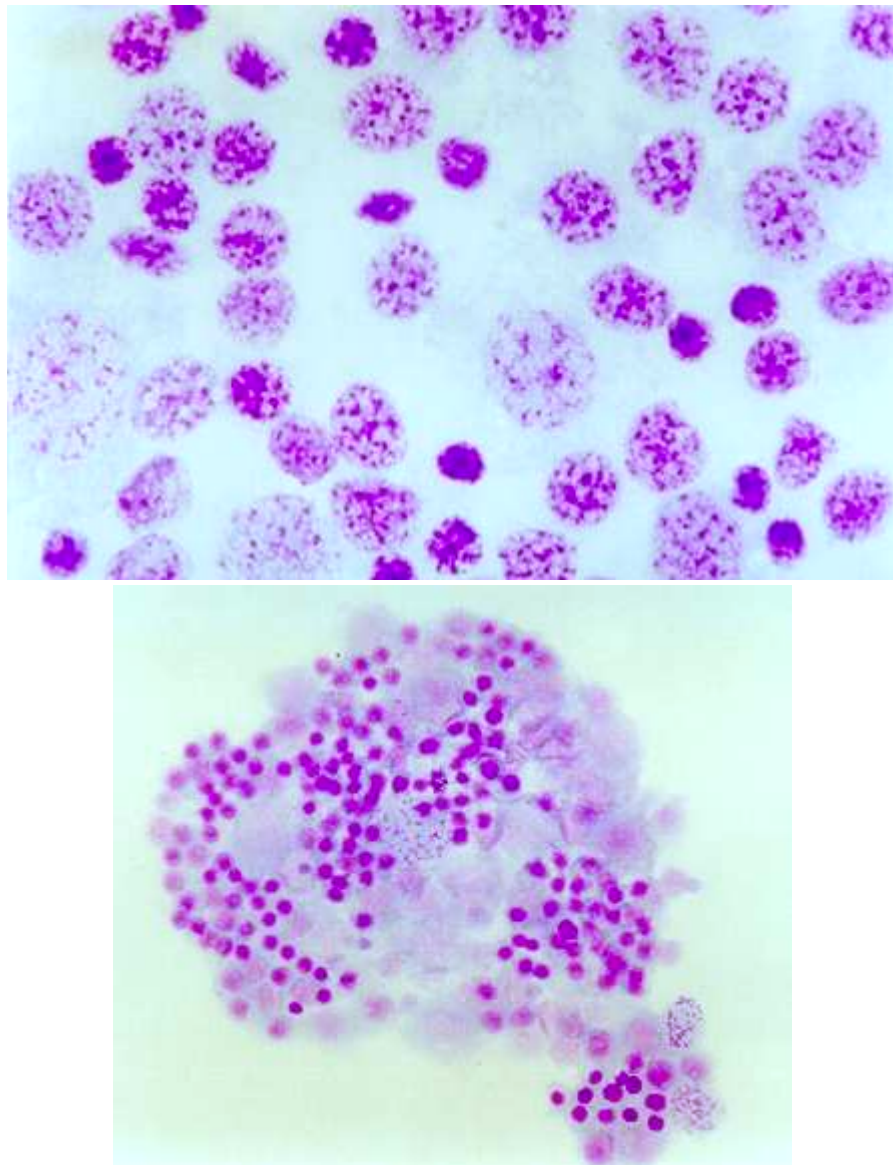


Figura 1 - Padrão dos núcleos (A) de células de Kenyon (CK) e células da glia (GL) do cérebro de operária adulta de *A. s. subterraneus*; células (B) da glia (GL) e metáfases (setas) encontradas nos cálices dos corpora pedunculata de pré-pupa de operária maior de *A. s. subterraneus* (Barras de escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

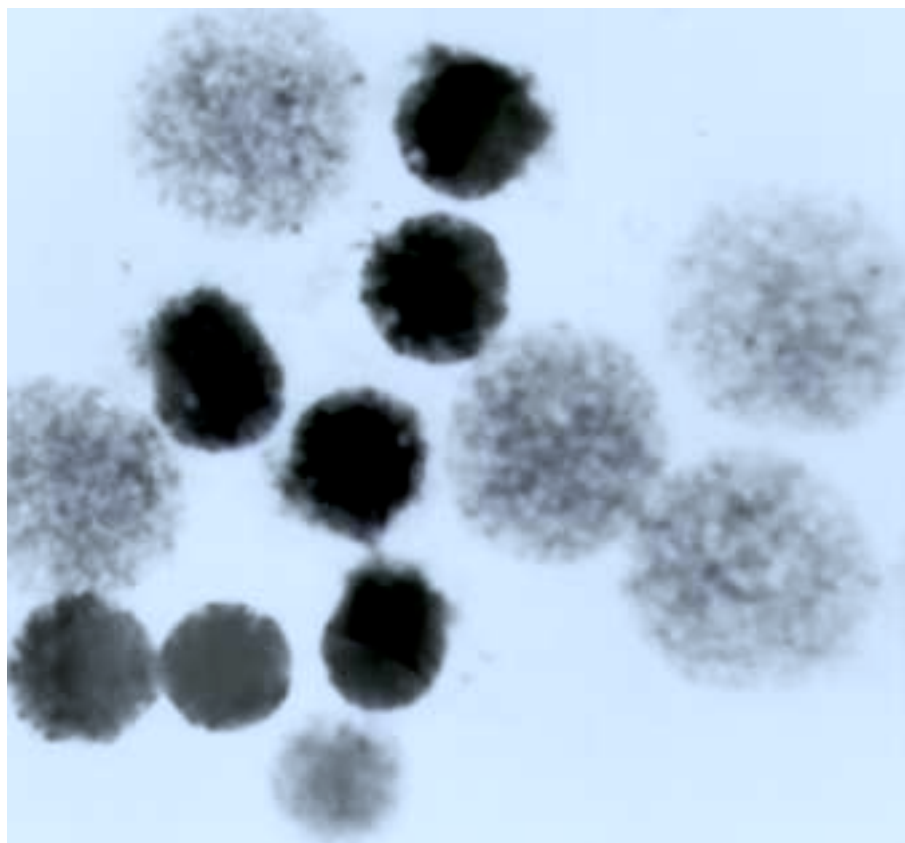


Figura 2 - Núcleos interfásicos de células da glia (GL) e células de Kenyon (CK) encontrados em pupa de corpo pigmentado de *A. s. subterraneus* (Barras de escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

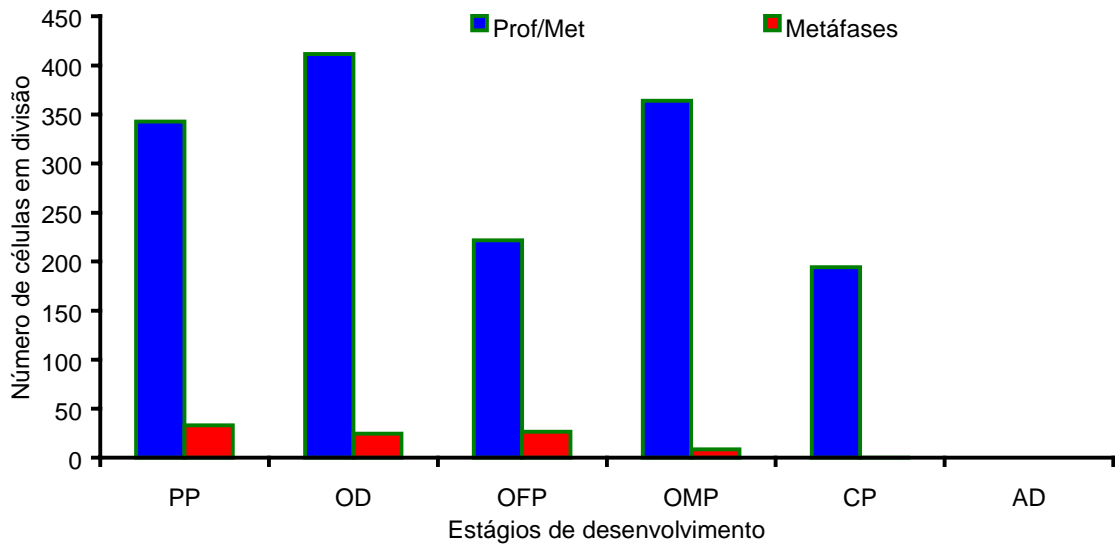


Figura 3 - Número de células em divisão em diferentes fases do desenvolvimento pupal de *A. s. subterraneus*.

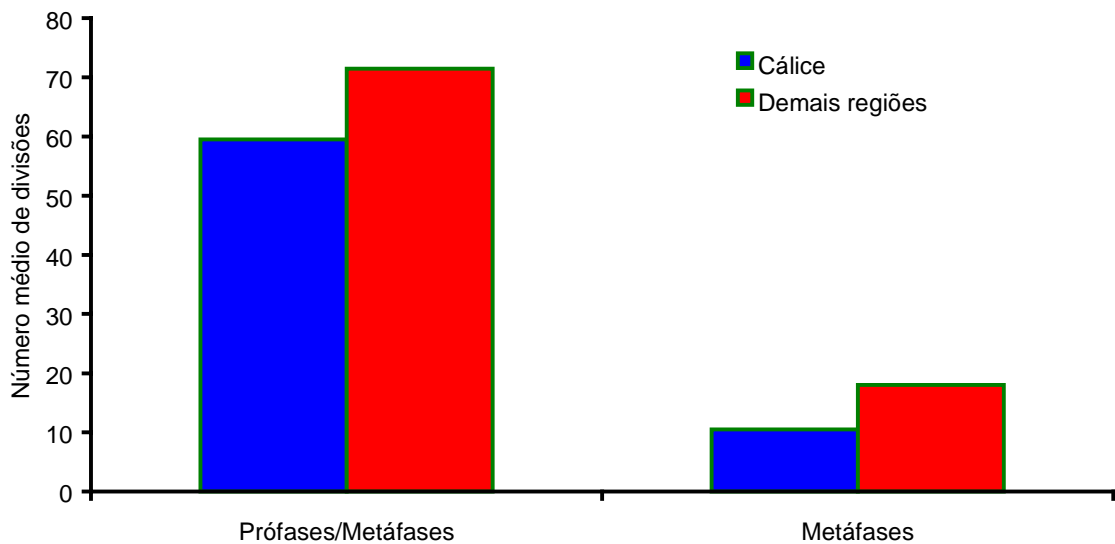


Figura 4 - Número médio divisões (prófases e metáfases) e metáfases encontradas no cálice dos corpora pedunculata e nas demais regiões do cérebro de *A. s. subterraneus*.

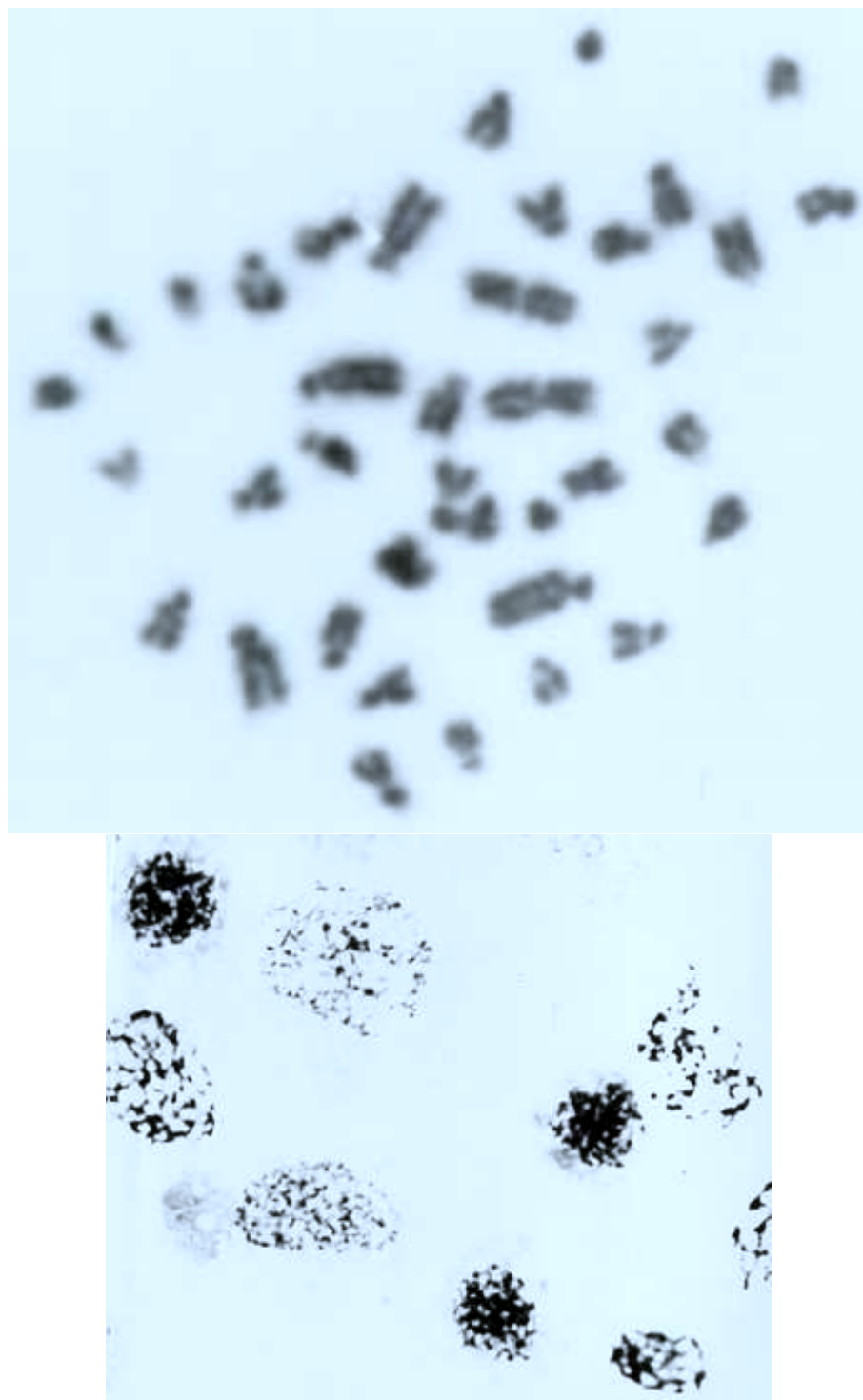


Figura 5 - Metáfase ideal para montagem (A) de cariótipo encontrada em pré-pupa de operária maior de *A. s. subterraneus*; fases do ciclo celular (B), intérfase (I) e fase inicial de prófase (P), observadas em pré-pupa de operária maior de *A. s. subterraneus* (Barras de escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

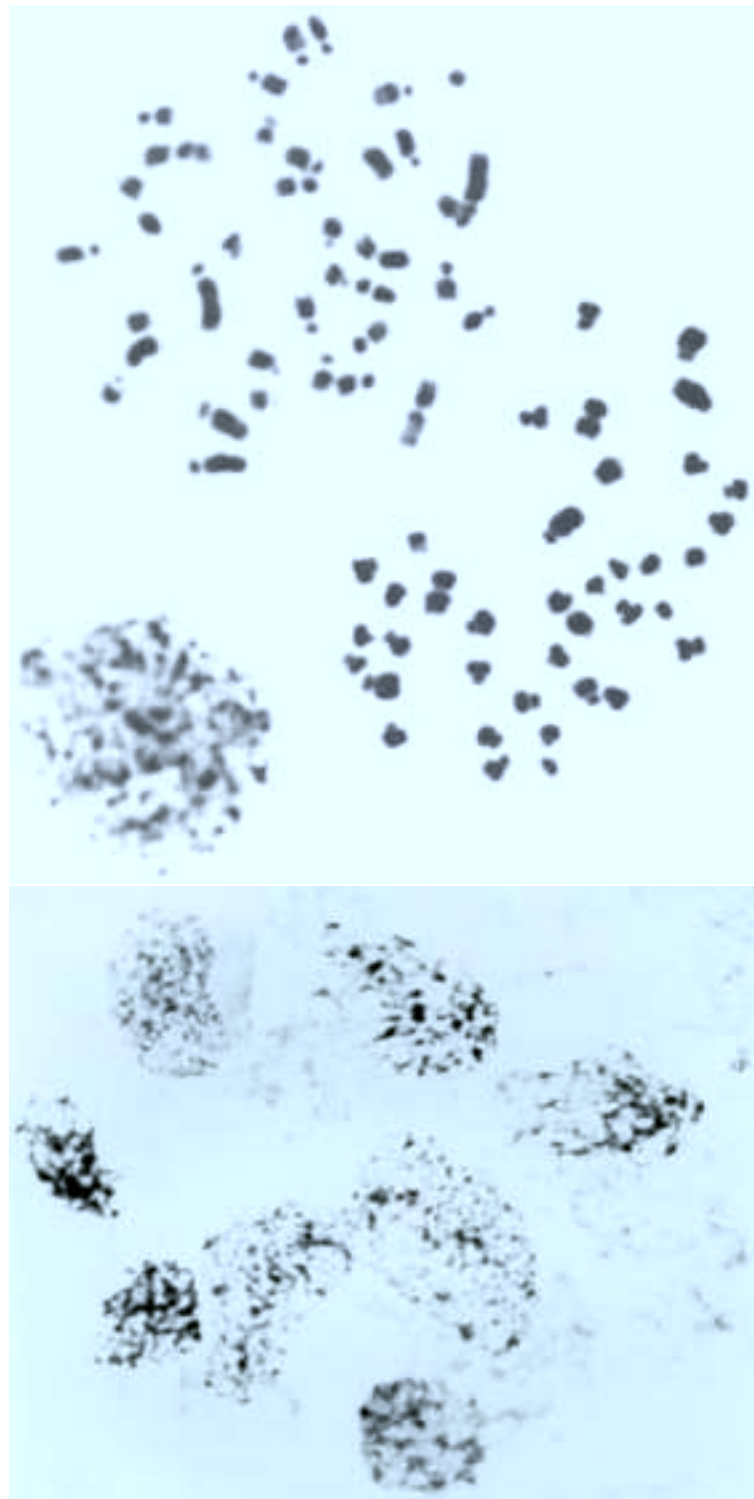


Figura 6 - Metáfases com diferentes padrões de condensação (A), observadas em pupa de *A. s. subterraneus* com olho fracamente pigmentado; núcleos em fase inicial de prófase (B) em pupa de *A. s. subterraneus* com olho mediamente pigmentado (Barras de escala = 5  $\mu\text{m}$ ).

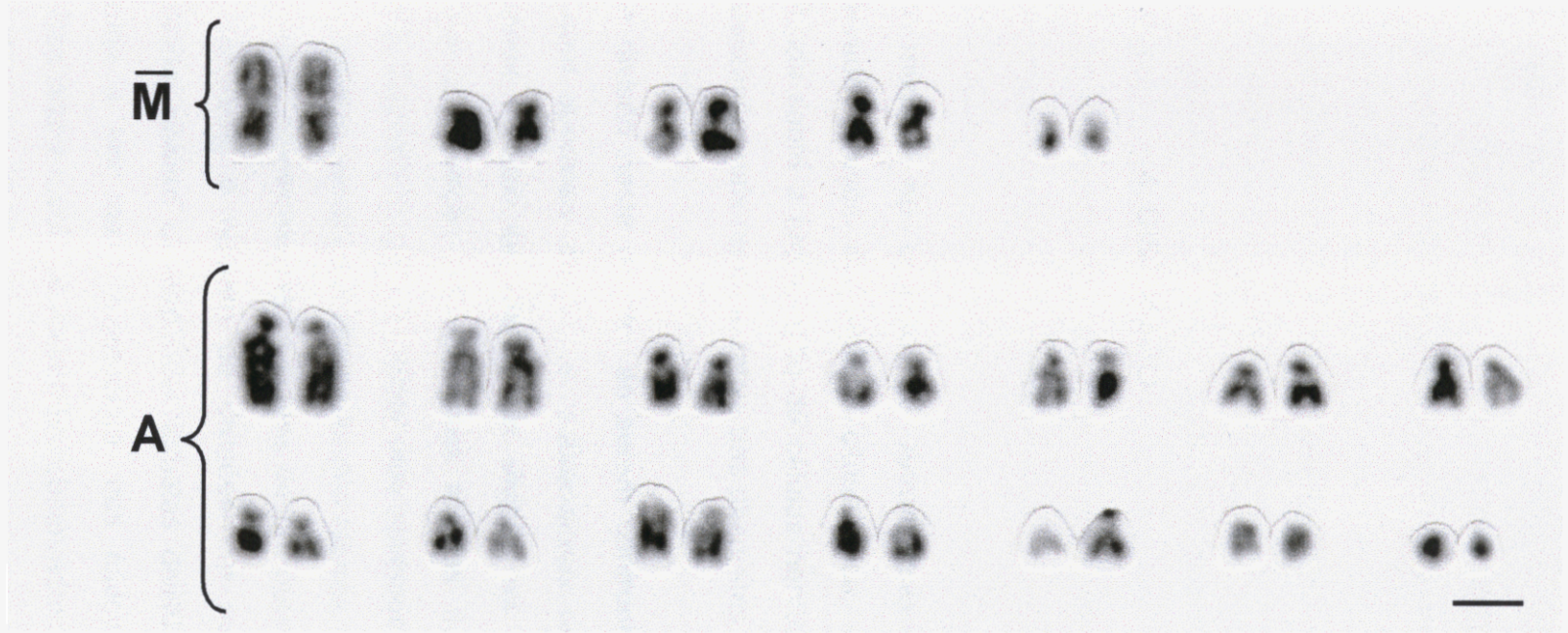


Figura 7 - Cariótipo de *A. s. subterraneus*  $2n = 38$ . 10 metacêntricos e submetacêntricos (M) e 28 acrocêntricos (A) (Barras de escala =  $5 \mu\text{m}$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

A atividade mitótica no cérebro de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, observada através da análise citogenética, permitiu uma inferência mais profunda sobre a proliferação de células nervosas, visto que possibilitou uma visualização mais representativa das diferentes fases do ciclo mitótico.

Os picos de divisão neste estudo, ao serem confrontados com os resultados obtidos com operárias de *A. s. subterraneus* no Capítulo 1, mostram que o grande número de células em divisão na fase de olho despigmentado e sua observação em diferentes regiões do cérebro do indivíduo (Figura 7 (B), Capítulo 1), podem refletir uma atividade mitótica mais distribuída por todo o cérebro nessa fase. Na região dos cálices, essa atividade mitótica é mais freqüente, ocorrendo desde a fase de pré-pupa até pupa de corpo pigmentado; enquanto o número de divisões em pupas de olho mediantemente pigmentado, podem corresponder àquelas divisões que estão ocorrendo, unicamente e em maior quantidade, nos cálices. Ao serem comparados com a área total e o volume do cérebro observados no Capítulo 2, esses valores não são compatíveis, pois os picos correspondentes à fase crítica do desenvolvimento que é a fase em que há um aumento significativo nas suas proporções, provavelmente decorrente de uma maior atividade

mitótica, observados na área total do cérebro de operárias, acontecem em indivíduos com olho mediantemente pigmentado e adultos e no volume do cérebro, acontecem em indivíduos de olho despigmentado e adultos. Os resultados encontrados durante a análise citogenética mostram que as fases em que há maior frequência de mitoses é a de olho despigmentado e olho mediantemente pigmentado. Assim, esses eventos podem estar sendo regidos por acontecimentos distintos, ou seja, o aumento da área ou do volume em determinada fase do desenvolvimento pode estar acontecendo não só em função de uma atividade mitótica, mas também por um aumento nas proporções celulares, ou ainda, em virtude da acomodação de células recém diferenciadas em determinadas regiões do cérebro.

Na região dos cálices, existem dois grupos de células que diferem entre si pelo seu tamanho e atividade mitótica. Essas células foram observadas no cérebro de *A. s. subterraneus*. Um desses grupos se localiza no centro de cada cálice dos corpora pedunculata: são células maiores com núcleos grandes que correspondem aos neuroblastos. Segundo VITT e HARTFELDER (1998), essas células sofrem várias divisões no decorrer da vida larval e pupal de insetos holometábolos, desaparecendo progressivamente. O outro grupo contorna essa região de células indiferenciadas, menores, ocupando grande parte do corpora pedunculata. Essas são chamadas células de Kenyon e correspondem ao corpo celular dos neurônios. Como todas essas células encontram-se agrupadas quando da preparação de lâminas para citogenética, as incisões feitas no tecido e sua posterior fixação podem não ser suficientes para sua total separação, provavelmente em virtude de algumas células estarem altamente interconectadas através de suas fibras axônicas e dendríticas. Embora essa região represente um sítio mitótico em quase todas as fases do desenvolvimento, o aproveitamento de suas metáfases é, aparentemente, muito pequeno. Mas, considerando que, nas demais regiões do cérebro, a proporção de metáfases é dobrada, a probabilidade de se encontrar aquelas que são realmente úteis, é obviamente maior. Essas regiões do cérebro

correspondem à base do lóbulo óptico e lóbulo antenal e as divisões decorrem das células de Kenyon que os contornam.

A utilização do tecido cerebral de indivíduos mais jovens pode ser a mais adequada em virtude de suas fibras neuropilares serem menos desenvolvidas, facilitando sua dissociação. Assim, a adaptação de técnicas de preparação pode ser muito útil, visto o elevado número de mitoses observadas em pupas de olho mediantemente pigmentado. A separação das células na região dos cálices poderia ser feita, por exemplo, com uso de enzimas como a tripsina, a hialuronidase ou a colagenase, muito utilizado para cultura de células em insetos (BAINES, 1996).

Outras técnicas utilizadas por IMAI (1966) mostram algumas limitações. Uma delas é a obtenção de cromossomos mitóticos por esmagamento. Esse método é favorável àquelas espécies de formiga que têm número cromossômico pequeno (*Pheidole pallidula*  $2n = 24$ , *Monomorium pharaonis*  $2n = 22$ , *Crematogaster laboriosa*  $2n = 26$ ), não dando resultados satisfatórios para espécies que têm mais de 40 ou 50 cromossomos, pois as figuras mitóticas tendem a não ficar bem isoladas e os cromossomos ficam empilhados, impossibilitando a análise do cariótipo. Outro método é o de ressecamento ou secagem. Este é mais usado em tecidos de mamíferos, aplicado com algumas adaptações para formigas. Essa técnica é apropriada para espécies com cariótipo numeroso, pois as metáfases se espalham muito mais que no método de esmagamento, possibilitando a observação de cromossomos muito finos e a contagem correta do número cromossômico. Mas tem a desvantagem de não poder utilizar formigas de tamanho pequeno, pois é necessária uma grande quantidade de células mitóticas. No decorrer de vários trabalhos, Hirotsami T. Imai desenvolveu uma versão melhorada da técnica de secagem ao ar (IMAI et al., 1977). Essa técnica revelou metáfases convencionais de alta qualidade com padrão de Banda-C, sem tratamento subsequente. Além de formigas, esse mesmo procedimento foi aplicado para outros insetos, como *Drosophila ananassae* e nematóides, como *Paragonimus ohirai* (IMAI et al., 1988).

Embora os dados de IMAI (1966), IMAI et al. (1977; 1988) sugiram que a alta freqüência de mitoses seja exclusiva de indivíduos na fase de pré-pupa, os resultados deste trabalho indicam que não só na pré-pupa, mas também em fases avançadas do desenvolvimento pupal, há proliferação de células nervosas. Nesse caso, pupas de olho despigmentado também poderiam ser utilizadas, já que nessas duas fases foram encontradas as melhores metáfases. Entretanto, as razões biológicas para isso permanecem obscuras.

Os critérios utilizados para a escolha dos insetos na fase de pré-pupa, diferem entre as formigas e outros himenópteros. Algumas formigas apresentam nesse estágio, um casulo de cor marrom claro, contendo na extremidade posterior uma mancha escura correspondente ao mecônio, como é o caso da Ponerinae *Pachycondyla cafraria* (MASSON, 1970). Em *A. s. subterraneus*, o mecônio forma uma única estrutura de cor escura no corpo uniformemente branco, como em *A. octospinosus* (DELABIE, 1984), e como sua forma pupal será do tipo exarada, ou seja, seus apêndices estarão livres e visíveis, não possuindo casulo e sim, uma película, o mecônio será eliminado para o meio, não ficando depositado. Daí a necessidade de isolar essas larvas com intestino cheio, acompanhando o momento de sua defecação. Em abelhas, essa fase corresponde à fase dita “larva alongada” (Jung-Hoffman, 1968, citado por DELABIE, 1984) e sua obtenção é ainda mais prática por suas larvas estarem encerradas nos favos, que, em virtude da rejeição do mecônio acumulados em suas paredes, tornam-se escurecidos. Desse modo, a intensidade da cor dos favos pode indicar a idade aproximada do animal. Além da observação do mecônio, o momento em que os esboços apendiculares são visíveis, também pode ser utilizado como critério para definição dessa fase. Em *A. octospinosus*, esses dois fenômenos são praticamente simultâneos, sendo, no entanto, a segunda característica menos evidente (DELABIE, 1984). Nesse estágio, também é possível observar pela transparência, a formação das regiões cefálica e torácica (IMAI, 1966; DELABIE, 1984; IMAI et al., 1988). Em *A. s. subterraneus*, essa característica não foi evidenciada.

O número cromossômico em três espécies do gênero *Acromyrmex*, do Uruguai, foi estudado por Goñi et al. (1983), citado por FADINI e POMPOLO (1994), encontrando um cariótipo de  $2n = 38$  cromossomos. FADINI e POMPOLO (1994) também detectaram o mesmo cariótipo nesse gênero, incluindo a subespécie *A. s. subterraneus*, sendo também evidenciada em nossos estudos.

Embora a escolha clássica de indivíduos no estágio de pré-pupa com base na observação da expulsão do mecônio pareça ser, ainda, aquela mais utilizada, e que em pupas com olho despigmentado também tenham sido encontradas boas metáfases, não pode ser descartada a possibilidade de estas serem procuradas em fases avançadas do desenvolvimento.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução, tendo grande aplicação nos estudos de mecanismos de especiação e variabilidade genética. Dentre os grupos mais analisados, está a ordem Hymenoptera, que ocupa um lugar de destaque na citogenética animal. Uma das limitações dos estudos citogenéticos é que são realizados em células com atividade mitótica e, como os himenópteros são holometabólicos, as mitoses estão restritas às fases jovens do desenvolvimento, especialmente larvas e pupas. Tal procedimento foi definido por IMAI (1966), utilizando formicídeos, em que estabeleceu a observação de cromossomos mitóticos utilizando-se o cérebro do inseto durante o estágio pré-pupal. Apesar de existirem esses critérios, não se tem nenhuma informação sobre a natureza exata das células estudadas, já que o cérebro de um inseto é um complexo formado pela união de vários gânglios: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. Assim, objetivou-se neste trabalho acompanhar o crescimento pós-embriônico do cérebro de *A. s. subterraneus*, aliado à procura sistematizada das metáfases necessárias ao estudo citogenético, a fim de determinar qual a região do gânglio cerebral, nas diferentes fases do desenvolvimento, é mais favorável a esses estudos. As

pupas foram coletadas e classificadas por idade, de acordo com a intensidade da pigmentação dos olhos e do corpo, a saber: pré-pupa, pupa de olho despigmentado, pupa de olho fracamente pigmentado, pupa de olho mediantemente pigmentado, pupa de corpo pigmentado. Os cérebros foram extraídos, sendo que a região dos cálices dos corpora pedunculata foi separada do resto do cérebro em alguns indivíduos na fase de pré-pupa, com o objetivo de se observar a região de maior ocorrência de mitoses e submetidos à preparação de cromossomos mitóticos, segundo a técnica descrita por Imai *et al.* (1988). Os resultados mostram que grande quantidade de mitoses ocorreram desde a fase de pré-pupa até a fase de corpo pigmentado, embora os picos de divisão tenham ocorrido em pupas de olhos despigmentados e de olhos mediantemente pigmentados. Dentre essas mitoses, a presença de metáfases se mostrou constante desde a fase de pré-pupa até a fase de olho fracamente pigmentado; nos indivíduos de olhos mediantemente pigmentados, elas ocorreram três vezes menos. Em indivíduos de corpo pigmentado não foram encontradas metáfases. Em adultos não foram encontradas divisões celulares, confirmando a ausência de neurogênese nesses insetos, mas o aspecto das suas células apresentavam padrão de prófase. As demais regiões do cérebro apresentaram mais mitoses que o cálice, embora essa diferença não seja significativa, mas, entre essas mitoses, praticamente o dobro são metáfases. Com a leitura das lâminas em que encontram-se o cálice e as demais regiões do cérebro, é possível observar que as células em divisão do cálice permanecem agrupadas e muitas vezes sobrepostas, sugerindo ser um fator limitante. Já as células das demais regiões espalham-se, facilitando a contagem e a análise morfológica dos cromossomos. As metáfases consideradas “ótimas” para análise citogenética, ou seja, aquelas que se encontravam distendidas, de forma que possibilitasse a visão da morfologia dos cromossomos através dos centrômeros e das cromátides, foram encontradas nas fases de pré-pupa e pupas de olho despigmentado, perfazendo 10% do número total de metáfases. Esses dados indicam que não só na pré-pupa, mas também em fases avançadas do

desenvolvimento pupal, há proliferação de células nervosas, facilitando assim, a busca de metáfases. O cariótipo de *A. s. subterraneus* apresentou  $2n = 38$  cromossomos (10  $\overline{M}$  e 28 A).

## 2. RESUMO E CONCLUSÕES

O cérebro de insetos sociais vem sendo estudado por muitos neuroetologistas interessados em decifrar os mistérios do comportamento social, através do estudo de subcompartimentos supostamente responsáveis pela memória e aprendizagem. Neste trabalho, objetivou-se analisar a morfologia, o padrão de crescimento e a atividade mitótica do cérebro de formiga, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, visando estabelecer possíveis relações entre o desenvolvimento do cérebro, a idade e o sexo do inseto estudado. O material biológico foi obtido de colônias mantidas no Insetário da Universidade Federal de Viçosa. Em todas as análises, os indivíduos foram classificados por idade de acordo com a intensidade da cor do olho e do corpo, a saber: pré-pupa, também chamada larva pós-defecante; pupa de olho despigmentado; de olho fracamente pigmentado (pigmentação rósea); de olho mediamente pigmentado (marrom); de corpo pigmentado (cutícula amarelada) e indivíduos adultos. Na análise morfológica e mitótica, só foram utilizadas pupas de operárias maiores e na análise morfométrica, também foram utilizadas pupas de machos e rainhas, esta última da subespécie *A. s. molestans*. Através de exames histológicos, concluiu-se que: a morfologia do cérebro de *A. s. subterraneus* em desenvolvimento mostra padrões fixos na sua estrutura desde o estágio de pré-pupa, indicando

alterações mitóticas principalmente na região dos corpora pedunculata, e morfológicas, quando da ocupação do cérebro pela neurópila. Além disso, a atividade proliferativa de células nervosas durante a fase pupal mostra uma certa flutuação e, em diferentes fases, apresentam sítios de divisão diferentes. Comparações da área e o volume do cérebro de diferentes castas em diferentes estágios mostraram que, durante o desenvolvimento de *A. s. subterraneus*, o cérebro tem picos de crescimento. Essas flutuações acontecem provavelmente devido ao crescimento de arborizações dendríticas e axônicas, à proliferação de células nervosas, bem como a acomodação destas no interior do cérebro. O padrão de crescimento do cérebro de diferentes castas pode estar relacionado com aspectos futuros do comportamento do inseto. Com a análise citogenética, observou-se que grande quantidade de prófases e metáfases ocorreram desde a fase de pré-pupa até a fase de corpo pigmentado, mas aquelas metáfases consideradas “ótimas” para análise citogenética foram encontradas nas fases de pré-pupa e pupas de olho despigmentado. Mudanças comportamentais induzidas por hormônios são evidências das ações dos hormônios sobre o sistema nervoso. É provável que existam interrelações entre o desenvolvimento do cérebro e sua regulação por hormônios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, E.C. **Efeitos da Avermectina B1a em colônias da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera; Formicidae)**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 42p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- ARAÚJO, S.M.S.R. **Variação cariotípica em populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera; Sphecidae) nas regiões de Viçosa e Porto Firme, MG**. Viçosa, MG: UFV, 1998, 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- BAINES, D. New approaches to insect tissue culture. **Cytotechnology**, v.20, p.13-22, 1996.
- BORROR, D.J., TRIPLEHORN, C.A ., JOHNSON, N.F. **An Introduction to the study of insects**. Orlando: HBC Publishers, 6<sup>a</sup> ed., 1992. 875p.
- BRITO, R.M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- BROOKER, R., TRUMAN, J.W. Postembryonic neurogenesis in CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. I. Neuroblasts arrays and fate of their ptogeny during metamorphosis. **Journal of Comparative Neurology**, v.255, p.548-559, 1987.
- CAYRE, M., STRAMBI, C., STRAMBI, A . Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control. **Nature**, v.368, p.57-59, 1994.

- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University, 1998. 770p.
- CLARKE, G.M., BRAND, G.W., WHITTEN, M.J. Fluctuating asymmetry: A technique for measuring developmental stress caused by inbreeding. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.39, p.145-153, 1986.
- COGGESHALL, R.E. A consideration of neural counting methods. **Techniques**, v.15, p.9-13, 1992.
- DELABIE, J.H.C. La communication chimique chez la fourmi champignoniste *Acromyrmex octospinosus*; Polymorphisme et developpement du systeme antennaire. **These de Doctorat**. Troisieme Cycle. Univ. Paris VI, 251p., 1984.
- DELLA LUCIA, T.M.C., VILELA, E.F., MOREIRA, D.D.O. Criando saúvas em laboratório. **Revista Ciência Hoje**, v.6, p.28-29, 1987.
- DELLA LUCIA, T.M.C., FOWLER, H.G. **As Formigas Cortadeiras**. In.: Ed: TEREZINHA M.C. DELLA LUCIA (ed.), 1993. 262p.
- DURST, C., EICHMULLER, S., MENZEL, R. Developmental and experience lead to increased volume of subcompartments of the honey bee Mushroom Body. **Behavioral and Neural Biology**, v.62, p.259-263, 1994.
- EDWARDS, J.S. Postembryonic development and regeneration of the insect nervous system. **Adv. Insect Physiol.**, v.6, p.97-137, 1969.
- FAHRBACH, S.E., ROBINSON, G.E. Behavioral development in the honey bee: Toward the study of learning under natural conditions. **Learning and Memory**, v.2, p.199-224, 1995.
- FAHRBACH, S.E., STRANDE, J.L., ROBINSON, G.E. Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioral neuroplasticity. **Neuroscience Letters**, v.197, p.145-148, 1995.
- FAHRBACH, S.E., ROBINSON, G.E. Juvenile hormone, Behavioral maturation, and Brain structure in the honey bee. **Developmental Neuroscience**, v.18, p.102-114, 1996.
- FARRIS, S.M., ROBINSON, G.E., DAVIS, R.L., FAHRBACH, SE. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Neurology**, v.414, p.97-113, 1999.

- GOMES, L.F. **Estudos citogenéticos em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera; Sphecidae; Larrinae, Trypoxylonini)**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- GONÇALVES, C.R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil. (Hymenoptera; Formicidae). **Studia Entomológica**, v.4, p.113-180, 1961.
- GRONENBERG, W. Modality-Specific segregation of input to ant Mushroom Bodies. **Brain, Behavior and Evolution**, v.54, p.85-95, 1999.
- GRONENBERG, W., HEEREN, S., HOLLDOBLE, B. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the Mushroom Bodies of the *Camponotus floridanus*. **The Journal of Experimental Biology**, v.199, p.2011-2019, 1996.
- GRONENBERG, W., HOLLDOBLE, B. Morphologic representation of visual an antenar information in the ant brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.412, p.229-240, 1999.
- GUERRA, M. dos S. **Introdução à citogenética geral**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1988. 142p.
- HOLLDOBLE, B., WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 733p.
- HOSHIBA, H., ONO, M. The early emerging male of the japanese paper wasps, *Polistes snelleni* Saussure (Vespidae; Hymenoptera) and its chromosome. **Proc. Japan Acad.**, v.60, p.368-371, 1984.
- IMAI, H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eucaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **Jpn. J. Genet.**, v.66, p.635-661, 1991.
- IMAI, H.T. The chromosome observation techniques of ants and the chromosomes of Formicinae and Myrmicinae. **Acta Hymenopterologica**, v.2, p.119-131, 1966.
- IMAI, H.T., CROZIER, R.H., TAYLOR, R.W. Karyotype evolution in Australian ants. **Chrom. Biol.**, v.59, p.341-393, 1977.
- IMAI, H.T., TAYLOR, R.W., CROSLAND, M.W.J., CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Jpn. J. Genet.**, v.63, p.159-185, 1988.

- IMAI, H.T. A manual for chromosome preparations and staining in ants. **Symposium Biotechnology and Systematics - XIX International Congress of Entomology**, Beijing, 1992.
- JAFFE, K., PEREZ, E. Comparative study of brain morphology in ants. **Brains, Behavior and Evolution**, v.33, p.25-33, 1989.
- LEVINE, R.B., MORTON, D.B., RESTIFO, L.L. Remodeling of the insect nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v.5, p.28-35, 1995.
- MAFFEI, E.M.D., GASPARINO, E., POMPOLO, S.G. Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriopsis connexa* Mulsant (Coleoptera; Coccinellidae; Polyphaga) a predator of insect pests. **Hereditas**, v.132, p.79-85, 2000.
- MASSON, C. Mise en evidence, au cours de l'ontogenese d'une fourmi primitive (*Mesoponera cafraria* F. Smith), d'une proliferation tardive au niveau des cellules globuleuses ("Globulicells") des corps pedoncules. **Z. Zellforsch.**, v.106, p.220-231, 1970.
- MAYHÉ-NUNES, A . J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera; Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética**. Viçosa, MG: UFV, 1991.122p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- MENEZES, M.B.F. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca augustula augustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae)**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MOREIRA, C.M.L.C. **Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae)**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 68p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PARRA, J.R.P., HADDAD, M.L. **Determinação do número de ínstaes em insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1979. 49p.
- RACCAUD-SCHOELLER, J. **Les insects - physiologie, développement**. Masson, Paris, 1980. 296p.
- RESTIFO, L.L. Genetics of ecdysteroid-regulated central nervous system metamorphosis in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) **Eur. J. Entomology**, v.92, p.169-187, 1995.

- ROTHFELS, K.H. Chromosomal variability and speciation in blackflies. In: BLACKMAN, R.L., HEWITT, G.M., ASHBURNER, M. (eds.). **Insect cytogenetics**. London: p.207-224. (Blackwell Scientific Publications, 10), 1980.
- SCHER, R. **Diversidade cariotípica em uma população de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (Hymenoptera; Sphecidae) do Parque Florestal Estado do Rio Doce (MG)**. Viçosa, MG: UFV, 1996, 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SHAW, D., MORAN, C., WILKINSON, C. Chromosome reorganization, geographic differentiation and the mechanism of speciation in the genus *Caledia*. In: BLACKMAN, R.L., HEWITT, G.M., ASHBURNER, M. (eds.). **Insect cytogenetics**. London: 171-194. (Blackwell Scientific Publications, 10), 1980.
- STRAMBI, C., CAYRE, M., STRAMBI, A. Neural plasticity in the adult insect and its hormonal control. **International Review of Cytology**, v.190, p.137-174, 1999.
- STRAUSFELD, N.J., HANSEN, L., YONGSHENG, L., GOMEZ, R.S., ITO, K. Evolution, discovery and interpretations of arthropod Mushroom Bodies. **Learning and Memory**, v.5, p.11-37, 1998.
- TECHNAU, G., HEISENBERG, M. Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v.295, p.405-407, 1982.
- TORRE-GROSSA, J.P., FEBVAY, G., KERMARREC, A. The larval instars of the worker caste in the Attini ant *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera; Formicidae). **Colemania**, V. 1, p.141-147. 1981
- VITT, H., HARTFELDER, K. Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera; Apidae). **International Journal Insect Morphology and Embryology**, v.27, p.1-4, 1998.
- WHITE, K., KANKHEL, D.R. Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. **Developmental Neurobiology**, v.65, p.296-321, 1978.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 548p.