

ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE *Paraponera clavata* (FABRICIUS, 1775) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE: PARAPONERINAE)

Brenna O. de Souza^{1*}, Thito T. Andrade², Luíza Carla B. Martins³

1. Estudante de bacharelado em Enfermagem do CESC/UEMA

2. Mestrando em Biodiversidade Ambiente e Saúde pela UEMA

3. Professora Adjunta - UEMA - Departamento de Biologia e Química / Orientadora

Resumo:

A espécie *Paraponera clavata*, é a única representante viva da subfamília Paraponerinae. As glândulas mandibulares consistem, geralmente, em um aglomerado de células secretoras associadas a um reservatório, por onde são eliminadas as secreções desta glândula. Mediante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo analisar histoquimicamente a glândula mandibular de *P. clavata*. Para os testes de histoquímica foram utilizados Mercúrio-Bromofenol para evidenciação de proteínas; PAS (Ácido Periódico Schiff) para a evidenciação de carboidratos; e o corante Azul do Nilo para a evidenciação de lipídios. Com a análise histoquímica da glândula mandibular de *P. clavata*, foi possível identificar a natureza de sua secreção, tendo proteínas como principais componentes. Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que a secreção armazenada em seu reservatório e nos citoplasmas das células é composta de grande quantidade de grupos proteicos e baixa quantidade de lipídios e de carboidratos.

Palavras-chave: Formiga; Glândula Exócrina; Histoquímica.

Apoio financeiro: CAPES, PPGBAS/UEMA

Introdução:

A espécie *Paraponera clavata* (Fabricius, 1775), popularmente conhecida como Tocandira, é a única representante viva da subfamília Paraponerinae. Caracteriza-se pela presença de escrobos antenais em forma de “V” invertido, curvando-se acima e por trás dos olhos. Esta espécie é encontrada apenas na região Neotropical, com ampla distribuição no Brasil e, sobretudo, nos estados onde a fitofisionomia de floresta tropical predomina (Baccaro et al., 2015).

Os representantes de *P. clavata* possuem um tamanho corpóreo relativamente grande (até 2,5cm) e são conhecidos por sua dolorosa picada, cuja dor resultante tem duração de até 24 horas e os sintomas mais frequentes em resposta ao veneno são: febre, tremores, sudorese, náuseas, vômito e arritmia cardíaca (Fernandes et al., 2015).

Aspectos da biologia de *P. clavata*, tais como a nidificação e alimentação, são bem documentados (Jandt et al., 2013). No entanto, estudos de morfologia interna, sobre as glândulas exócrinas, configuram-se ainda escassos na literatura, uma exceção é o aparato de veneno, cuja morfologia e composição química são estudadas em diversos trabalhos (Aili et al., 2017).

Para as formigas é reconhecido um grande potencial de produção de secreções exócrinas, evidenciado em diversos trabalhos, que investigam principalmente a composição química e a funcionalidade das glândulas exócrinas destes insetos, 77 dessas glândulas já foram descritas para o grupo (Billen et al., 2013). Estas glândulas produzem e armazenam feromônios e os colocam para fora do corpo da formiga de forma controlada. As diversas substâncias excretadas exercem diferentes funções, como a marcação de território, acasalamento, formação de trilhas e alarme (Caetano et al., 2002).

As glândulas mandibulares são as mais bem estudadas e compreendidas do sistema salivar. Elas consistem, geralmente, em um aglomerado de células secretoras associadas a um reservatório o qual por meio de um ducto individual, liga-se a uma abertura na base da mandíbula, por onde são eliminadas as secreções desta glândula. A glândula mandibular é geralmente associada a funções de defesa e alarme (Nascimento & Sant’Ana, 2001). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado outras funções atribuídas a essa glândula, como fonte de feromônios sexuais, repelência de outros insetos e inibição de fungos e bactérias (Ayasse et al., 2001; Brough, 1993).

Mediante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo analisar histoquimicamente a glândula mandibular de *P. clavata*.

Metodologia:

Ninhos de *P. clavata* foram localizados na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (04°53'30"S/43°24'53"W) no Município de Caxias, Maranhão, Brasil. Os espécimes utilizados neste estudo foram obtidos através de coletas de indivíduos desses ninhos, e após as coletas, o material biológico foi transferido para o Laboratório de Mirmecologia/LAMIR, do Centro de Estudos Superiores de Caxias/CEC da Universidade Estadual do Maranhão/UEMA. Para a criação das formigas em laboratório, foram confeccionados ninhos artificiais constituídos de caixas plásticas, forradas com parte do solo/substrato coletado nos ninhos originais. Esses ninhos foram mantidos em sala com temperatura (27° ± 2°C) e luminosidade controlada, os indivíduos foram alimentados com uma dieta a base de carboidratos e proteínas a cada dois dias.

Para a preparação das amostras da glândula mandibular, as operárias de *P. clavata* foram crioanestesiadas e suas glândulas mandibulares dissecadas e transferidas para um microtubo contendo solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967). Posteriormente as glândulas foram desidratadas em série alcóolica crescente (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidas em Resina LR White e álcool absoluto (1:1) por 12 horas, as amostras foram, então, embebidas em resina pura por mais 12 horas, em seguida o material foi colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador (LR White). Após a polimerização as amostras foram seccionadas em micrótomo Leica, com secções de 3µm de espessura, e transferidas para lâminas.

Após a preparação das amostras procederam-se os testes de histoquímica, com os seguintes reagentes: Mercúrio-Bromofenol para evidenciação de proteínas; PAS (Ácido Periódico Schiff) para a evidenciação de polissacarídeos e glico-conjugados; e o corante Azul do Nilo para a evidenciação de lipídios. Em seguida as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz com câmera digital acoplada (Olympus BX-60) e com auxílio do programa Q-capture. As imagens foram editadas com o programa Image-Pro Plus Windows Version 4.2 para a mensuração das escalas, e em Adobe Photoshop CS6 para demais edições. As análises histoquímicas foram desenvolvidas no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

Resultados e Discussão:

Os resultados obtidos para o teste histoquímico, com a utilização de Azul do Nilo para evidenciação de lipídios, apresentou reação fortemente positiva em grânulos dispersos no reservatório da glândula mandibular, entretanto, a parte homogênea da secreção armazenada apresentou resultado negativo, bem como, nas células da camada secretora (núcleos e citoplasmas) (Tabela 1; Figura 1 A e B).

O citoplasma das células glandulares e a secreção armazenada no reservatório da glândula foram classificados como fortemente positivos para o teste de evidenciação de proteínas, utilizando mercúrio-bromofenol, o núcleo das células da glândula, entretanto, demonstrou reação positiva neste mesmo teste e os seus nucléolos, reação fortemente positiva (Tabela 1; Figura 1 C).

O teste para a evidenciação de carboidratos, utilizando PAS, foi fracamente positivo apenas para o conteúdo armazenado no reservatório, o núcleo e citoplasma das células secretoras apresentaram resultados negativos (Tabela 1; Figura 1 D).

A baixa detecção de lipídios e carboidratos no reservatório desta glândula corrobora os resultados apresentados por Pavon & Mathias (2006), onde estudaram a glândula mandibular de operárias de *Atta sexdens* (Forel, 1908), entretanto os autores comprovaram a presença de carboidratos e lipídios no citoplasma das células secretoras, fato contrário ao observado no presente estudo.

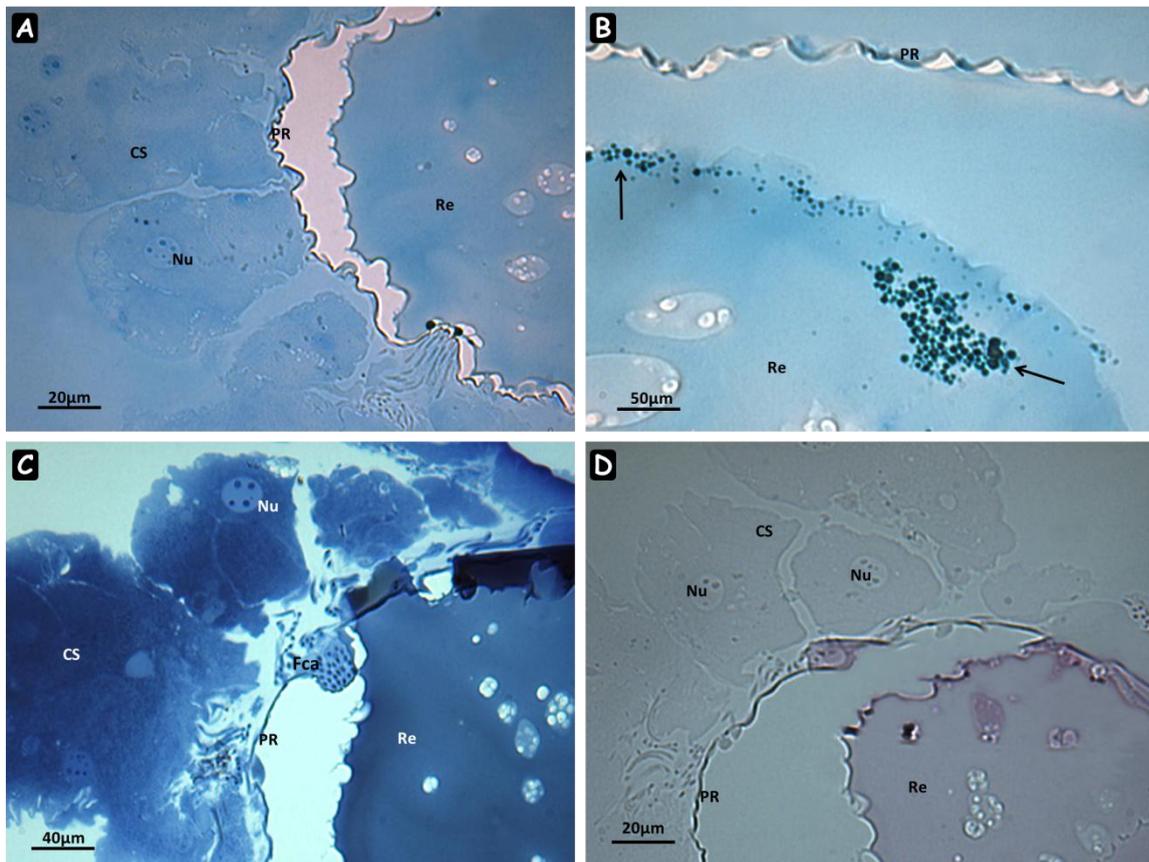
Já a marcante positividade observada na reação de comprovação da presença de proteínas, no citoplasma de células glandulares e no reservatório, é similar aos resultados obtidos por Pavon & Mathias (2004; 2006). Martins & Serrão (2011), ao estudarem a histoquímica das glândulas intramandibulares de formigas derivadas e primitivas, também observaram resultados similares para a espécie *Pachycondyla impressa* (Roger, 1861).

Tabela 1. Resultado da análise histoquímica da glândula mandibular de *Paraponera clavata*.

Estruturas	Lipídios	Carboidratos	Proteínas
Núcleo das células secretoras	-	-	++
Citoplasma das células secretoras	-	-	+++
Reservatório	++*	+	+++

- Ausência de reação, + reação fracamente positiva, ++ reação positiva, +++ reação fortemente positiva. * Observado apenas em pequenos grânulos do reservatório.

Figura 1. Seções histológicas da glândula mandibular de *Paraponera clavata*, com testes histoquímicos. **A)** Citoplasma e núcleo das células da glândula com reação negativa para lipídios (ampliação de 20x). **B)** Grânulos presentes no reservatório (**setas**) com reação positiva para lipídios (ampliação de 40x). **C)** teste histoquímico negativo para a evidência de carboidratos (ácido periódico de Schiff - PAS) no núcleo e no citoplasma das células secretoras e fracamente positivo no reservatório. (ampliação de 20x). **D)** teste histoquímico fortemente positivo para a evidência de proteínas (Mercúrio-bromofenol) no citoplasma da célula glandular e no reservatório; e reação positiva no núcleo da célula glandular. (ampliação de 20x). **CS:** células secretoras, **Nu:** núcleo, **Re:** reservatório, **Fca:** feixe de canalículos, **PR:** parede do reservatório.



Conclusões:

Com as análises histoquímicas da glândula mandibular de *P. clavata*, foi possível identificar os compostos proteicos como os mais abundantes nesse aparato glandular, podendo indicar uma alta capacidade enzimática. Consequentemente, a baixa quantidade de lipídios e carboidratos também foi detectada. Essas informações podem servir de base para outros estudos que visem uma caracterização química mais detalhada das secreções produzidas e armazenadas, além de nortear estudos que investiguem a funcionalidade desta glândula.

Referências bibliográficas

AILI, S.R.; TOUCHARD, A.; PETITCLERC, F.; DEJEAN, A.; ORIVEL, J.; PADULA, M.P.; ESCOUBAS, P. & NICHOLSON, G.M. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. **Journal of Proteome Research**, 1: 1-34. 2017.

AYASSE, M., PAXTON, R.J. & TENGÖ, J. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual Review Entomology**, 46: 31-78. 2001.

BACARRO, F.B.; FEITOSA, R.M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I.O.; IZZO, T.J.; SOUZA, J.L.P. & SOLAR, R. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA, 388p. 2015.

BROUGH, E.J. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a Formicinae ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 42: 306-311. 1993.

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

FERNANDES, I.O.; SOUZA, J.P. & BACCARO, F.B. Estado da arte sobre a filogenia, taxonomia e biologia de Paraponerinae. In: DELABIE, J.H.C. *et al.* **As formigas poneromorfas do Brasil**. Ilhéus: Editus, pp. 43-53. 2015.

JANDT, J.; LARSON, H.K.; TELLEZ, P. & MCGLYNN. To drink or grasp? How bullet ants (*Paraponera clavata*) differentiate

between sugars and proteins in liquids. **Naturwissenschaften**, 100(12): 1109-1114. 2013.

MARTINS, L.C.B. & SERRÃO, J.E. Morphology and histochemistry of the intramandibular glands in Attini and Ponerini (Hymenoptera, Formicidae) species. **Microscopy Research and Technique**, 74: 763–771. 2011.

NASCIMENTO, R.R. & SANT'ANA, A.E. Isolamento e identificação dos semioquímicos de insetos sociais. In: VILELA, E.F. & DELLA LUCIA, T.M.C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: Hollos, pp. 65-71. 2001.

PAVON, L.F. & MATHIAS, M.I.C. Histochemistry and protein profile of the mandibular glands of workers of the ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Cytologia**, 69(2): 225-234. 2004.

PAVON, L.F. & MATHIAS, M.I.C. Study of the mandibular glands of ante workens *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **American Journal of Agricultural and Biological Science**, 1(2): 27-35. 2006.

STEFANINI, M.; DEMARTINO, C. & ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, Sinauer Associates. 1998.