

Arquivos de Zoologia

ARQ. ZOOL. S. PAULO, 17 (3): 113-166, ests. 1-39

26.IX.1968

HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DAS ABELHAS (HYMENOPTERA, APOIDEA) ¹

CARMINDA DA CRUZ LANDIM ²

ABSTRACT

This is a study of the four types of salivary glands normally occurring in bees. Current histochemical techniques were used to study variation of protein, polysaccharides, nucleic acids and lipids, during the secretory cycle. Ultrastructural techniques were used to follow the cellular organelles through the elaboration and elimination of secretory products. Much quantitative variation was found in all substances studied, between glands and between stages of the same gland.

The thoracic salivary gland of *Melipona* was found to secrete protein, and the head gland lipids. Glycogen was found only in the glands of very young bees, and is thought to be an embryonic remnant.

Electron microscopy showed that the cellular organelles evolve during the secretory cycle according to what is generally known for cells with similar functions. The Golgi apparatus was not seen in *Xylocopa* and *Colletes*, probably because part of the secretion products are stored in vacuoles.

The data permit to derive thoracic salivary gland types 1, 2 and 3 from type 4. Type 1 would result from the disappearance of the central (zymogenic) cells; type 2 by reduction only of the number of these cells; type 3 by disappearance of the peripheral (parietal) cells.

INTRODUÇÃO

No presente trabalho estudamos alguns aspectos da histoquímica e ultraestrutura das glândulas salivares da cabeça e do tórax (glândulas labiais) das abelhas, bem como de seus dutos excretores. Trata-se, até certo ponto, de uma continuação da tese que apresentamos para obtenção do grau de Doutor em 1963. Estudamos, naquela ocasião, comparativamente, a anatomia e a histologia de algumas glândulas das abelhas entre

1. Tese com que se obteve o título de Docente Livre junto ao Departamento de Biologia Geral, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Universidade de Campinas.

2. Departamento de Biologia Geral, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Universidade de Campinas.

as quais as salivares pròpriamente ditas. Os resultados obtidos suscitaram problemas cuja solução não estava no âmbito da pesquisa que realizávamos, mas que procuramos agora esclarecer.

Pudemos, naquela ocasião, verificar que os Apoidea apresentavam pelo menos quatro tipos diferentes de glândulas salivares, bem diversificadas histològicamente. Verificamos também que a secreção para atingir a luz da glândula tinha, em todos os casos, que atravessar uma espêssa barreira cuticular, quase sempre quitinizada.

Em trabalho realizado posteriormente (Cruz-Landim & Akahira, 1966), verificamos ainda que as glândulas salivares apresentam durante a vida das abelhas sociais um único ciclo secretor.

Pareceu-nos interessante:

1. Pesquisar a maneira pela qual a secreção atravessaria a barreira cuticular, uma vez que a microscopia óptica não permite visualizar qualquer estrutura que facilite a passagem, nem da parte da célula, nem da parte da cutícula.

2. Procurar um ponto em comum na organização histològica dos diferentes tipos de glândulas salivares desde que tôdas têm a mesma origem embrionária.

3. Conhecer a morfologia das células secretoras e as modificações que ocorrem nos orgânulos citoplasmáticos, durante o ciclo secretor.

4. Estabelecer, se possível, a natureza da secreção.

Escolhemos a microscopia eletrônica como instrumento de trabalho porque a microscopia óptica já se havia revelado incapaz para resolver algumas destas questões e porque a experiência demonstra que quando procuramos identidade devemos nos aprofundar nos detalhes.

A parte de histoquímica, embora venha aqui relatada em primeiro lugar, surgiu posteriormente como complemento para os dados citològicos obtidos com o microscópio eletrônico.

Os resultados dêste trabalho estão, portanto, contidos em dois capítulos. O primeiro contém dados sôbre a histoquímica das glândulas salivares, especialmente da espécie social estudada (*Melipona quadrifasciata* Lep.), e o segundo sôbre a ultraestrutura das células secretoras.

Os estudos referentes às transformações dos orgânulos celulares durante o ciclo secretor foram feitos sòmente na espécie social, da qual pudemos contar com indivíduos de idades diferentes. Desta estudamos cinco estágios, desde a abelha recém emergida até a abelha campeira.

HISTÓRICO

As glândulas salivares do tórax e salivares da cabeça das abelhas, cujo estudo constitue assunto desta tese, fazem parte do chamado sistema salivar das abelhas, o qual engloba ainda as glândulas mandibulares e hipofaríngeas. As glândulas salivares pròpriamente ditas são também chamadas glândulas labiais porque se originam de uma invaginação do segmento labial do embrião (Nelson, 1915). Nas larvas, recebem o nome de glândulas de sêda e ao que tudo indica secretam o material usado na confecção do casulo para pupação e talvez também algumas enzimas

digestivas. Durante a pupação, essas glândulas, nas abelhas, sofrem uma reorganização completa dando origem às chamadas glândulas salivares do tórax. As glândulas salivares da cabeça, quando presentes, originam-se de evaginações da parede do excretor final das salivares do tórax (Snodgrass, 1956). As glândulas salivares do tórax das abelhas são homólogas às glândulas torácicas dos outros insetos e são de ocorrência geral nessa classe. As glândulas salivares da cabeça parecem ser exclusivas de algumas abelhas não aparecendo em outros insetos.

A anatomia e a histologia das glândulas do sistema salivar das abelhas têm sido desde há muito tempo estudadas. Trabalhos de natureza geral, incluindo estudos comparativos de mais de uma espécie, foram feitos por Schiemenz (1883), Bordas (1895), Heselhaus (1922) e mais recentemente Cruz-Landim (1963, 1965). Nestes dois últimos trabalhos foram examinadas 110 espécies de abelhas pertencentes a seis das oito famílias do grupo Apoidea a fim de estabelecer a linha de evolução seguida pelo grupo quanto a essas glândulas. Quanto às glândulas salivares, os resultados indicam que existem pelo menos quatro tipos morfológicamente diferentes nos Apoidea:

1. Glândulas salivares do tórax formadas por túbulos curtos, não ramificados e glândulas salivares da cabeça, completamente desenvolvidas e funcionais. Este tipo é encontrado exclusivamente nos Apidae.

2. Glândulas salivares do tórax, alveolares e salivares da cabeça, ausentes. Tipo encontrado em grande parte dos Anthophoridae e alguns Halictidae.

3. Glândulas salivares do tórax formadas por túbulos longos e ramificados com ou sem a presença de glândulas salivares na cabeça. Quando presentes as glândulas salivares da cabeça mostram-se sempre rudimentares. Este tipo foi encontrado nos Megachilidae, Andrenidae, quase totalidade dos Halictidae e alguns Anthophoridae.

4. Glândulas salivares do tórax formadas por túbulos curtos não ramificados e ausência completa das glândulas salivares da cabeça. Tipo encontrado nos Colletidae e em *Exomalopsis* (Anthophoridae).

Estes quatro tipos apresentam entre si grande diversidade histológica (Cruz-Landim, 1963). Os túbulos secretores da glândula salivar do tórax do primeiro tipo são formados por células cúbicas juxtapostas em torno de uma luz, portanto, a mesma organização das glândulas tubulares dos vertebrados. A luz é, contudo, limitada internamente por uma espessa, camada cuticular e nas abelhas mais velhas aparecem grandes vacúolos no ápice da célula dando idéia de que este se acha separado do lúmen por um espaço ocupado, talvez pela secreção em estágios anteriores (Cruz-Landim & Akahira, 1966). No segundo tipo, os alvéolos são formados por uma célula secretora envolvida por uma bainha de células baixas. Entre estes dois tipos de células corre um canal cujas paredes são de natureza cuticular. Os túbulos longos e ramificados (3.º tipo) são formados por células dispostas irregularmente ao longo do ducto excretor, isto é, não há uma separação nítida entre a parte glandular e a excretora e nem tampouco um arranjo regular das células em torno do ducto, ficando geralmente a luz colocada excêntrica. Os tubos

do quarto tipo embora morfológicamente sejam parecidos com os primeiros, histológicamente são formados por duas ou três células grandes centrais dispostas em filas, envolvidas por uma bainha de células achatadas. O canal coletor da secreção percorre a zona limitante entre as células. A organização é, portanto, a mesma dos alvéolos das glândulas centrais. Quanto às glândulas salivares da cabeça, presentes nos Apidae, Cruz-Landim (1963) verificou que são alveolares e que os alvéolos, exceto pelo limite cuticular da luz, têm a mesma organização daqueles das glândulas dos vertebrados. Quando presentes em outras abelhas, fora deste grupo, as glândulas salivares da cabeça são rudimentares e apresentam-se como crescimentos irregulares da parede do ducto excretor final dentro da cabeça, sendo portanto, formadas por células mais ou menos baixas em torno de uma luz com forte refôrço cuticular.

Quanto à histoquímica dessas glândulas não encontramos nada na literatura. Existem, entretanto, alguns trabalhos a respeito da composição química e função da secreção. Nas abelhas, êsses trabalhos referem-se quase todos a *Apis mellifera* Linné, e mesmo assim, o maior interesse dos pesquisadores tem sido pela secreção das glândulas hipofaríngeas das operárias (Patel, 1961) e glândulas mandibulares das rainhas (Butler, 1956; Butler, Callow & Johnston, 1959). Nas operárias a glândula hipofaríngea passa por duas fases: uma em que secreta a geléia real, e outra em que secreta enzimas digestivas, especialmente invertase (Iglesent, 1940). A glândula mandibular da rainha produz a chamada substância de rainha, a qual é usada na integração da colônia através do fenômeno da trofolaxis.

As glândulas salivares do tórax são as únicas glândulas das abelhas que têm perfeita homologia com as glândulas de mesma denominação dos demais insetos. Naturalmente a secreção produzida pelas glândulas salivares dos insetos é tão variada quanto seu tamanho e forma, mas, comparativamente, conforme mostrou Wigglesworth (1953), há uma certa uniformidade de funções. Em geral, a saliva é usada para umedecer os apêndices bucais e alimentos a serem ingeridos. Na barata, sua secreção é um líquido aquoso muito fluido, aproximadamente neutro ou levemente alcalino, contendo amilase e invertase (Wigglesworth, 1927). Heselhaus (1922) verificou que nas abelhas solitárias a condição é mais ou menos a mesma, isto é, a secreção das glândulas salivares do tórax é muito fluida e utilizada para umedecer o material de construção dos ninhos. Segundo Simpson (1960, 1962), a secreção das glândulas salivares do tórax de operárias de *Apis mellifera* é um líquido aquoso, muito fluido, quase livre de solutos, usado para dissolver os açúcares do alimento e trabalhar a cêra. Esta secreção, enquanto no interior da glândula, tem pH 6.0 a 6.5, portanto, levemente ácida. Kratky (1931) obtivera resultados semelhantes aos de Simpson (1960), quanto ao pH da secreção, e segundo êste autor, esta contém invertase.

Quanto às glândulas salivares da cabeça, estruturas somente presentes no grupo Apidae, Simpson (1960, 1962) verificou tratar-se de um líquido oleoso de pH 6.5 a 7.0. O mesmo foi verificado para todos os apídeos por Cruz-Landim (1963) que observou ainda a coloração dêsses lipídeos em rosa, pelo sulfato de azul de Nilo, o que indica que se

trata de graxas neutras. Segundo Simpson (1960), a secreção das glândulas salivares da cabeça não entra na composição da coletada na glossa, ficando aderida à parede dos ductos excretores e apêndices bucais. Contudo, o pH da saliva coletada na glossa é alcalino, cêrca de 7.5 (Simpson, 1960).

Cruz-Landim & Puga (1966) estudando lipídeos nas glândulas do sistema salivar de *Trigona (Scaptotrigona) postica* verificaram a presença de gotas lipídicas no interior das células secretoras da glândula salivar do tórax de abelhas campeiras (idosas) e em tôdas as fases (desde a emergência) nas glândulas salivares da cabeça. A quantidade de lipídeos na célula e na luz da glândula salivar da cabeça aumenta à medida que a abelha envelhece.

A ultraestrutura das glândulas salivares dos insetos não foi ainda muito estudada, mas existem alguns trabalhos que serão de grande valia como elementos de comparação e ajuda na interpretação dos nossos resultados.

Beams & King (1932) e Kessel & Beams (1963) descrevem, respectivamente para gafanhoto e barata, um tipo de glândula salivar que parece ser idêntico às glândulas alveolares encontradas nos Anthophoridae. Não podemos ter certeza a êste respeito porque a descrição não está muito clara e os trabalhos não apresentam nenhuma ilustração que elucide o fato. No caso, a parte secretora das glândulas é formada por dois tipos de células: células zimogênicas e células parietais colocadas na base daquelas. Em *Periplaneta americana* as células parietais são percorridas por canaliculos intracelulares em tórno dos quais a membrana plásmica forma numerosas microvilosidades. As células zimogênicas, por outro lado, apresentam ergastoplasma muito desenvolvido e grânulos de secreção no interior (Kessel & Beams, 1963).

A presença de canaliculos intracelulares em diversas glândulas dos insetos é fato já bastante conhecido, desde os primeiros trabalhos de histologia, e o microscópio eletrônico tem mostrado que freqüentemente ao redor dêstes aparecem microvilosidades (Beams & Anderson, 1961). Os canaliculos servem, neste caso, para aumentar a superfície de eliminação da secreção. Segundo Beams & Anderson (1961), o nome de canaliculo intracelulares não é apropriado porque estas estruturas são na realidade exteriores à célula, desde que estão limitadas pela membrana plasmática. Existem canaliculos intracelulares ao redor dos quais não aparecem microvilosidades, e cuja parede é reforçada por material cuticular, como acontece na glândula hipofaríngea de *Apis* (Beams, Tahmisian, Anderson & Devine, 1959) e na glândula mandibular de *Bombus* (Stein, 1962). Neste caso, o reforço cuticular apresenta interrupções em alguns pontos. A secreção se acumula formando massas ao redor dêsses canaliculos.

A presença de microvilosidades, no polo através do qual a secreção deve ser eliminada, é muito comum nas células glandulares de insetos. Jacob & Jurand (1963) e Phillips & Swift (1965) verificaram sua presença no polo apical das células secretoras das glândulas salivares da larva de *Bradysia mycorum* e *Sciara coprophila*, respectivamente.

Jacob & Jurand (1963) verificaram em *Bradysia* que a célula secretora apresenta três zonas distintas. A zona basal contém invaginações da membrana plásmica associadas a mitocôndrios; a zona central, o núcleo, ergastoplasma, Golgi e alguns grãos de secreção; e a zona apical muitos grânulos de secreção e microvilosidades. Os grânulos de secreção se acumulam abaixo das microvilosidades sendo eliminados na sua base, fato também observado por Phillips & Swift (1965) em *Sciara*.

O aparecimento da secreção na célula está, como nas células glandulares dos vertebrados, associada ao ergastoplasma e ao complexo de Golgi (Palay, 1958). As vesículas do Golgi aparecem, freqüentemente, dilatadas, mostrando os produtos de secreção no seu interior (Phillips & Swift, 1965). O amadurecimento dos grânulos de secreção pode muitas vezes sofrer processos complicados como em *Bombus*, onde parte de retículo endoplasmático parece ficar formando uma porção do grânulo (Stein, 1962).

A presença de invaginações da membrana plásmica basal associadas com mitocôndrios indica a observação de substâncias, por essa região da célula, diretamente da hemolinfa. Essas estruturas são especialmente desenvolvidas nas glândulas salivares de afídeos (Moericke & Wohlfarth-Bottermann, 1960; Wohlfarth-Bottermann & Moericke, 1960) que não têm tubos de Malpighi, desempenhando então estas glândulas função excretora. Embora em escala menor essas invaginações da membrana plásmica na parte basal da célula aparecem em quase tôdas as glândulas salivares dos insetos (Phillips & Swift, 1965; Jacob & Jurand, 1963). Em *Periplaneta americana*, o fenômeno é, sobretudo, acentuado nas células do ducto excretor extracelular (Kessel & Beams, 1963). O ducto excretor extracelular tem na luz um refôrço cuticular e abaixo dêste as células apresentam as mesmas invaginações da membrana plásmica associadas com mitocôndrios que, neste caso, segundo os autores, estão ligados à eliminação de material da célula. As membranas separatórias das células apresentam nestes ductos desmossomas septados.

O refôrço cuticular espêso separando as células do lúmen da glândula estende-se, muitas vezes, também à parte secretora, e a secreção tem então que atravessar a cutícula para ser eliminada. Locke (1961) estudando a eliminação de cêra em vários insetos, chegou a conclusão que esta se dá através de canais existentes em poros na quitina para passagem de líquidos; foi também verificada por Cruz-Landim, Stort, Cruz & Kitajima (1965) no órgão tibial dos machos de abelhas do grupo Euglossinae.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Como as abelhas apresentam quatro tipos diferentes de glândulas salivares, tomamos um representante de cada tipo. Portanto, o material usado nesta pesquisa é constituído pelas glândulas salivares das seguintes abelhas:

Espécie	Família	Procedência
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> Lep.	Apidae	Piracicaba, SP
<i>Xylocopa (Neoxylocopa) hirsutissima</i> Maild	Anthophoridae	Rio Claro, SP
<i>Megachile (Pseudocentron) curvipes</i> Smith	Megachilidae	Rio Claro, SP
<i>Colletes rufipes meridionalis</i> Schrottky	Colletidae	Rio Claro, SP

Destas, a primeira é abelha social e as demais são solitárias. Da espécie social somente as operárias foram estudadas e das solitárias somente as fêmeas. No caso das abelhas solitárias, os indivíduos foram coletados enquanto visitavam flôres, e sua idade, portanto, era desconhecida. De *Melipona* estudamos cinco idades diferentes do imago com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento das glândulas. A idade foi determinada aproximadamente, seguindo critério estabelecido por Kerr (informação verbal), o qual se baseia na coloração da pelugem do tórax e das faixas do abdômen. As idades usadas foram:

Estágio 1. Abelhas recém-emergidas, com um dia de idade, pelugem branca e faixas cinza-claro sobre o fundo marrom-claro.

Estágio 2. Abelhas com três a cinco dias de idade, pelugem marrom-claro e faixas amarelo-claro sobre fundo marrom.

Estágio 3. Abelhas com nove a doze dias de idade, pelugem marrom bem escuro e faixas amarelas sobre fundo marrom.

Estágio 4. Abelhas com quinze a vinte dias de idade, pelugem marrom bem escuro e faixas amarelo-vivo sobre fundo marrom-escuro.

Estágio 5. Abelhas campeiras com mais de vinte e cinco dias de idade, coletadas fora da colônia quando voltavam carregadas com pólen e resina. Pelugem marrom bem escuro, já desgastada, e faixas amarelo-vivo sobre fundo preto.

MÉTODOS

As abelhas foram anestesiadas com CO₂ e as glândulas dissecadas sob lupa, em solução fisiológica para insetos, com a seguinte composição:

Na Cl	7,50000 gr.
Na ₂ HPO ₄	2,38800 gr.
KH ₂ PO ₄	2,72280 gr.
Água destilada	1.000 ml.

A. Histoquímica

Foram feitos testes para:

1. Proteína: material fixado em solução de formalina a 8% em solução fisiológica para insetos, cortes em parafina, corados pelo método de Ninhidrina Schiff (Yasuma & Itchikawa, 1953 *apud* Pearse, 1961).

Foram feitas lâminas contrôle, coradas apenas pelo Schiff, sem o tratamento prévio pela Ninhidrina.

2. Polissacarídeos: material fixado em Gendre a 0°C, cortes em parafina corados com Carmin de Best e ácido periódico Schiff (PAS). Do PAS foram usadas duas técnicas diferentes: a) Mc Manus (1948 *apud* Pearse, 1961) oxidação em solução aquosa de ácido periódico a 0,5%, durante 2 minutos; b) Hotchkiss (1948, *apud* Pearse, 1961) oxidação em solução de ácido periódico em metanol a 0,6%, durante 5 minutos, seguida de banho redutor à base de tiosulfato de sódio. Algumas lâminas foram previamente incubadas em solução de saliva (1:1) em tampão fosfato 0,125 M, pH 7, durante uma hora a 36°C, foram também usadas. A presença de quitina na cutícula foi verificada. Lâminas contrôle, incubadas apenas em tampão, nas mesmas condições, através da reação de Schultze (1922, *apud* Pearse, 1961), tendo sido usado diafano' seguido de cloreto de zinco iodado.

3. Ácidos nucleicos: material fixado em Carnoy 3:3:1 ou em glutaraído a 6%; cortes em parafina, corados com: a) verde-metilpironina (material fixado em Carnoy) segundo a técnica Nuraick (1955, *apud* Pearse, 1961); b) azul de toluidina a 1%, pH 6 (material fixado em glutaraldeído): as lâminas foram incubadas com R Nase de saliva, durante uma hora a 60°C (Pearse, 1961); c) alaranjado de acrinina, segundo o método de Bertalanffy & Bickis (1956, *apud* Pearse, 1961). Esta coloração foi usada para exame em microscopia de fluorescência. Usamos material a fresco e fixado em Carnoy.

4. Lipídios: material fixado em formol Ca de Backer, inclusão em gelatina (Pearse, 1961), cortes em micrótomo de congelação, corados com: a) sudan black (solução saturada em álcool a 70%); b) fosfina 3 R a 0,1%, durante 3 minutos para exame com microscopia de fluorescência. Usamos material fixado em formol. Material a fresco, em solução salina também foi usado para exame da fluorescência primária. O pH aproximado da secreção das glândulas salivares foi determinado esmagando-se as referidas estruturas sobre papel indicador de pH Merck.

B. Microscopia Eletrônica

Foram usados os seguintes fixadores: 1) Tetróxido de ósmio a 2% em tampão acetato-veronal 0,1 M, pH 7.4 por 2 horas a 4°C (Palade, 1952), ou em tampão fosfato 0,2 M, pH 7.0 (Millonig, 1964) pelo mesmo tempo; 2) Permanganato de potássio a 0,6% em tampão acetato-veronal 0,1 M, pH 7.4 por 5 a 10 minutos, seguido do fixador de Palade, por duas horas a 4°C (McAlear, 1962); 3) Glutaraldeído, solução a 3% em tampão acetato-veronal 0,1 M, pH 7.4, por uma hora, a 4°C, seguido pelo fixador de Palade por duas horas também a 4°C (Sabatini & *alii*, 1961, modificado). A seguir o material foi lavado em tampão para retirar o excesso de fixador, desidratado em acetona e incluído em Epon 812 (Luft, 1961). A lavagem e desidratação, até acetona 100%, foram feitas a 4°C, em cerca de uma hora. As secções foram obtidas em um ultramicrotomo Porter-Blum MT2, com navalhas de vidro.

Como corantes eletrônicos foram usados o citrato de chumbo (Reynolds, 1963), o hidróxido de chumbo (Millonig, 1961) e o acetato de uranila (Watson, 1958). A coloração dos tecidos usados se revelou bastante difícil, por isso, freqüentemente usamos coloração dupla com acetato de uranila, por uma hora, seguido de citrato ou hidróxido de chumbo por 15 minutos.

RESULTADOS

Inicialmente, procuramos medir o pH da secreção das glândulas salivares. Dissecamos as glândulas e as esmagamos sobre papel indicador de pH de Merck. Em *Melipona*, a secreção da glândula salivar do tórax é mais ácida (pH 6.5 a 7.0), enquanto a da cabeça é mais básica (pH 7.0 a 7.5). Não fizemos medidas da secreção pura, porque essas glândulas, em *Melipona*, não possuem um reservatório e a quantidade de saliva nos ductos é pequena e difícil de coletar. Quanto à saliva coletada na glossa, verificamos que tem pH 7.5, mas já é uma mistura da secreção dos dois pares de glândulas salivares torácicas e da cabeça. A secreção das glândulas salivares do tórax das outras abelhas estudadas apresentou, por êsse processo, pH entre 6.0 e 7.0, tendendo sempre mais para acidez.

Antes de começar pròpriamente a descrição dos resultados, queremos ressaltar que não trata êste capítulo da histoquímica no sentido de determinar a composição química da secreção celular, mas de verificar sua natureza, além de confirmar a presença de determinadas substâncias no interior das células glandulares.

Procuramos uniformizar ao máximo o tratamento aplicado às lâminas a fim de evitar diferenças de coloração independentes do conteúdo celular. Com essa intenção, sempre que possível, coramos as lâminas correspondentes a diferentes estágios ou espécies, em um mesmo frasco.

A. Histoquímica

1. Proteínas. Em *Melipona*, as glândulas salivares do tórax, nos três primeiros estágios, coraram-se fracamente pela ninhidrina-Schiff, ficando o citoplasma uniforme e levemente róseo. O quarto e quinto estágios apresentaram material corado em púrpura na parte apical da célula, enquanto a parte basal permanecia rósea (est. 1, d). O material corado em púrpura, no quarto estágio, era finamente granular, enquanto no quinto, parecia amorfo. Em alguns cortes do quinto estágio encontramos material corado também na luz da glândula.

Em *Xylocopa* (est. 3, b) e *Colletes* (est. 4, b), o citoplasma das células periféricas, as quais denominaremos neste trabalho células parietais, apresentou-se uniformemente róseo, sendo esta coloração um pouco mais forte que a apresentada pelos primeiros estágios da glândula de *Melipona*. As células centrais, que neste trabalho chamaremos zimogênicas, por motivos que se elucidarão no decorrer da exposição, apresentaram coloração mais intensa, sem contudo chegar ao púrpura.

Em *Megachile*, a reação foi fracamente positiva e as células se coraram uniformemente, de maneira semelhante ao que ocorreu nas fases jovens de *Melipona*.

A glândula salivar da cabeça em *Melipona* apresentou em todos estágios coloração levemente rósea, com ninhidrina-Schiff (est. 2, a), enquanto em *Megachile* a coloração foi um pouco mais intensa, mas uniformemente distribuída na célula.

2. Polissacarídeos. A reação de Best, correlacionada com o teste da saliva, demonstrou a presença de glicogênio no estágio 1 e 2 da glândula salivar do tórax de *Melipona*, onde aparecia distribuído uniformemente por toda a célula, sob a forma de pequenos grãos (est. 1, e). As lâminas tratadas com saliva não apresentaram nenhum material corado e as incubadas em tampão coraram-se mais fracamente.

Quanto à técnica de McManus (est. 1, g) e à de Hotchkiss (est. 1, c) evidenciaram a presença de material PAS positivo formando uma linha fina em torno do túbulo secretor e ducto excretor no interior da célula e no revestimento cuticular da luz. A coloração da membrana basal apareceu em todas as fases de desenvolvimento da glândula. Já o material com reação positiva, encontrado no interior da célula, apresentou comportamento menos estável. No primeiro e segundo estágios o material positivo apareceu, de preferência na parte basal da célula, sob a forma de pequenas massas finamente granulares. No terceiro estágio, o material PAS positivo revelou-se ao redor da luz da glândula, sob a forma de pequenos grãos. No estágio 5, o material corado pelo McManus aparecia apenas na região cuticular e na membrana basal. O tratamento com saliva não alterou as características de coloração dos estágios 3, 4 e 5, mas, após esse tratamento, os estágios 1 e 2 praticamente não apresentaram material corado no interior da célula. A coloração pelo PAS do reforço cuticular verificou-se apenas com a técnica de McManus, embora quanto ao restante este reativo tenha se comportado exatamente como o Hotchkiss. No caso de McManus a cutícula aparece corada de rosa, em todas as fases do desenvolvimento glandular.

As glândulas salivares do tórax das outras espécies estudadas não apresentaram material corado pelo Carmin de Best, mas todas elas apresentaram uma linha basal positiva às técnicas de PAS empregadas. O método de McManus corou ainda todos os reforços cuticulares, seja da luz das glândulas, seja dos canalículos intracelulares (est. 3, f; est. 4, a). Em *Xylocopa* e *Colletes* ambos os métodos evidenciaram a presença de material PAS positivo nas células parietais e zimogênicas (est. 3, c). As células parietais apresentavam o material corado ao redor das ramificações menores dos canalículos intracelulares e, nos cortes transversais destes, o material aparecia radiado em torno da luz. Nas células zimogênicas observamos pequenos grãos corados pelos reagentes citados, distribuídos por toda a célula, ao redor do núcleo. A densidade desses grânulos era pequena e a sua coloração não era muito intensa.

O tratamento com saliva não alterou nenhuma destas colorações.

A glândula salivar da cabeça de *Melipona* apresentou material PAS positivo somente no estágio 1, quando as células secretoras são ainda relativamente altas. O material corado se distribuía em pequenos grãos por toda a célula, e sua quantidade pareceu-nos maior que aquela apresentada pela glândula salivar do tórax. Após o tratamento com saliva,

o material ainda se apresentou corado pelo PAS, embora fracamente (mais fraco que nas lâminas incubadas em tampão). Nos estágios seguintes, as células secretoras apresentam-se muito baixas e não se coram por nenhum dos corantes acima mencionados. Os ductos, contudo, apresentam uma linha basal finíssima, corada pelos PAS e o reforço cuticular da luz corado pelo McManus (est. 2, f). Embora essa coloração do reforço cuticular tenha acontecido em quase tôdas as glândulas, o mesmo não se verificou no caso dos alvéolos da glândula salivar da cabeça que, contudo, o tem bem espêsso. Aliás, notamos que a coloração não aparecia sempre que a cutícula era mais espêssa e apresentava côr amarela. Ao examinarmos as glândulas com microscopia de fluorescência verificamos que a cutícula apresentava, tanto nas glândulas salivares do tórax como nas da cabeça, fluorescência natural prateada bem acentuada principalmente a dos ductos. Essa fluorescência aparecia também na membrana dos alvéolos glandulares (est. 2, c).

A glândula salivar da cabeça de *Megachile* apresentou uma membrana basal bem mais espêssa que o comum, corada pelas técnicas de McManus e Hotchkiss. No interior da célula encontramos pequenos grânulos fracamente positivos. O reforço da luz não se corou.

As lâminas tratadas somente pelo Schiff não apresentaram material corado no seu interior em nenhum caso, nem nos presentes testes, nem nos anteriores para proteínas.

A reação de Schultze foi aplicada a tôdas as glândulas com a finalidade de verificar a presença de quitina no revestimento cuticular da luz das glândulas e nos canalículos intracelulares. Verificamos que a coloração pelo cloreto de zinco iodado era muito irregular mesmo numa mesma lâmina. Verificamos, contudo, reação positiva fraca no revestimento interno dos ductos, na luz da glândula e em alguns canalículos intracelulares, mormente aqueles de *Xylocopa* e *Colletes* que aparecem no limite entre as células parietais e zimogênicas.

3. Ácidos nucléicos. Não achamos a coloração com verde-metilpironina muito satisfatória. Em quase tôdas as fases, a glândula salivar do tórax de *Melipona* apresentou o seu citoplasma corado fracamente e de maneira uniforme. Apenas na fase 3, a coloração se intensificou um pouco, mas não alcançou a intensidade esperada pelo conhecimento que já tínhamos do exame ao microscópio eletrônico e que revelava um ergastoplasma muito desenvolvido nesta fase. Tentamos a remoção do RNA usando a RNase. Nos estágios 1, 2, 4 e 5, a pironinofilia do citoplasma que já era baixa desapareceu completamente, mas no estágio 3 conservou-se praticamente inalterada. Quanto aos núcleos coraram-se pelo verde-metila, normalmente. À medida que a glândula envelhece, os núcleos tornam-se menores e então a coloração fica mais intensa. Após a digestão com a RNase da saliva, a coloração dos núcleos pelo menos aparentemente fica mais forte.

O mesmo verificamos para as glândulas das outras abelhas estudadas (est. 3, a).

A coloração em azul de toluidina revelou-se mais favorável que a anterior, dando indicações da basofilia celular mais condizentes com o

nosso conhecimento anterior do material. Em algumas lâminas conseguimos o efeito de Feder & Wolf (1965), isto é, os núcleos corados de verde e o citoplasma de azul. Notamos também que, no estágio 3, quando justamente a coloração do citoplasma era mais acentuada, os núcleos também apareceram mais acentuadamente verdes. Por êste método pudemos verificar que os estágios com menor basofilia citoplasmática eram o primeiro e o último, enquanto o de maior era o terceiro. No quarto estágio, a coloração do citoplasma resumia-se a uma faixa na porção basal da célula e, mesmo assim, fraca.

Quanto às demais glândulas salivares do tórax, notamos que em *Megachile* a coloração do citoplasma era muito fraca, enquanto em *Xylocopa* e *Colletes* as células parietais coravam-se em azul profundo e as zimogênicas em azul claro. Contudo, a cor verde do núcleo foi mais acentuada nas células zimogênicas que nas células parietais.

As lâminas tratadas pela ribonucleose apresentaram sempre basofilia menor, mas ausência total de coloração depois do tratamento só foi verificado nos estágios 1 e 5 das glândulas de *Melipona*.

Só submetemos ao exame da fluorescência as glândulas de *Melipona* das quais tínhamos maior quantidade de material à disposição. A coloração em alaranjado de acridina, tanto de material fresco como previamente fixado em Carnoy, mostrou uma fluorescência alaranjada do citoplasma e verde pálida do núcleo (est. 1, b). Foi possível perceber uma pequena diferença de intensidade na fluorescência, a qual se mostrou mais forte nos estágios 2 e 3. Apesar dessa intensificação nos estágios mencionados, a fluorescência nunca chegou a ser muito forte em nenhuma das fases da glândula.

Os resultados obtidos com as glândulas salivares da cabeça foram idênticas aos que vimos de relatar para as salivares do tórax de *Melipona*. Aliás, neste caso, somente esta abelha foi estudada. A coloração com verde-metila-pironina foi sempre fraca, mostrando-se, contudo, a pironinofilia do citoplasma levemente mais intensa nos estágios 1 e 2, sendo nos demais praticamente negativa. Aliás, como já tivemos oportunidade de dizer depois do estágio 2, as células da glândula salivar da cabeça apresentam-se tão baixas que se torna difícil distinguir a coloração das diferentes partes. A coloração com azul de toluidina exibiu resultados semelhantes ao do corante anterior, evidenciando maior basofilia do citoplasma nos estágios 1 e 2.

Os resultados obtidos com a microscopia de fluorescência também foram similares aos encontrados para a glândula salivar do tórax, isto é, após a coloração com alaranjado de acridina, os núcleos fluoresceram em verde e o citoplasma em alaranjado, nos estágios 1 e 2 (est. 2, e), mas fracamente.

4. Lipídios. As glândulas salivares do tórax de *Melipona* só apresentaram material corado pelo sudan black B no último estágio. Esse material se apresentou sob a forma de pequenos grãos distribuídos no citoplasma, especialmente na parte basal da célula (est. 1, f). A quantidade de grãos por célula na maioria das vezes era diminuta (3 ou 4).

Com azul de nilo em tôdas as fases do desenvolvimento da glândula, o citoplasma se corou em azul pálido, uniformemente. O material fixado com formol e corado com fosfina 3R, examinado com luz ultra-violeta, revelou, contudo, fluorescência prateada fraca por parte dos túbulos secretores (est. 1, a).

Das demais abelhas estudadas só examinamos, sob êste aspecto, *Xylocopa*. Nesta abelha as células zimogênicas apresentaram pequenas gôtas coradas pelo sudan black e as células parietais grânulos finos. O azul de nilo corou em azul essas estruturas.

A coloração, com sudan black, revelou a presença de pequenos grânulos lipídicos no citoplasma das células das glândulas salivares da cabeça, desde o primeiro estágio até o último. No primeiro estágio, êsses grânulos são ainda pouco numerosos, aumentando sempre. Nos últimos estágios, quando as células estão muito baixas, vê-se apenas uma linha preta bordejando a luz do alvéolo. A partir do segundo estágio já começa a aparecer na luz da glândula, e cora-se em azul profundo pelo sudan black (est. 2, b).

O azul de nilo não cora em rosa a secreção no interior do citoplasma, mas cora o material na luz dos alvéolos e ductos, em rosa claro. Nos primeiros estágios (2 e 3), dentro da massa maior de secreção, corada em rosa, aparecem algumas gôtas pequenas coradas em azul. Nos estágios finais tôda a secreção contida na luz é cor de rosa, não aparecendo mais as gotículas azuis.

Foi feito exame de material fresco com luz fluorescente, a fim de verificar se os lipídios secretados tinham ou não fluorescência natural. A secreção da glândula salivar da cabeça na luz alveolar apresenta fluorescência natural, prateada, muito fraca (est. 2, c). Material fixado em formol corado com fosfina 3R revelou fluorescência verde de gotículas situadas tanto dentro da célula como no lúmen.

O ducto excretor final das glândulas salivares de *Xylocopa* cora-se bem pelo sudan black, assim como a secreção em sua luz (est. 3, d), o mesmo observando-se quanto a glândula salivar da cabeça de *Megachile* (est. 3, e).

Resumindo o que ficou dito neste capítulo, apresentamos as tabelas I e II, referentes às glândulas salivares do tórax e da cabeça, respectivamente. As tabelas contêm indicações dos resultados dos testes aplicados e da intensidade da coloração obtida. As tabelas referem-se apenas ao conteúdo citoplasmático das células secretoras, não sendo, portanto, contado como resultados positivos a coloração da membrana basal e refôrço cuticular no caso da técnica de McManus e Hotchkiss. Na Tabela I, a coluna referente aos resultados do tratamento com o verde-metila-pironina refere-se somente ao RNA citoplasmático. Na Tabela II, os resultados da fluorescência com alaranjado de acridina, assinalados na coluna correspondente, referem-se ao citoplasma. Os resultados do sudan black dizem respeito ao citoplasma das células secretoras, mas os resultados dos demais testes para lipídios, referem-se à secreção na luz.

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos para a glândula salivar do tórax

ABELHAS	TESTES									
	Carmin de Best	PAS	PAS após saliva	Ninhydrina Schiff	Azul toluidina	Verde metila pironina	F. nat. ac. nucleicos	Acridina	Sudan black	
1º estágio	++	++	0	+	+	+	+	+	0	
2º estágio	+	+	0	+	+	+	+	+	0	
3º estágio	0	+	+	+	+	+	+	+	0	
4º estágio	0	+	+	+	+	+	+	+	0	
5º estágio	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Xylocopa</i>	0	++	+	+	+	—	—	—	++	
<i>Megachile</i>	0	++	+	+	+	—	—	—	—	
<i>Colletes</i>	0	+	0	+	+	—	—	—	—	

(—) Teste não realizado (0) Negativo (+) Fracamente positivo (++) Positivo (+++) Fracamente positivo.

Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos para glândula salivar da cabeça

ABELHAS	TESTES										
	Carmin de Best	PAS	PAS após saliva	Ninhydrina Schiff	Azul toluidina	Verde metila pironina	Fl. Al. acridina (citopl.)	Sudan black	Azul de Nilo	Fl. natural Lipídios	F. fosfina 3R
1º estágio 2º estágio 3º estágio 4º estágio 5º estágio <i>Melipona</i>	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0
	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+
	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+
	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Megachile</i>	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(0) Negativo (—) Teste não realizado (+) Fracamente positivo (++) Positivo (+++) Fracamente positivo.

B. Microscopia Eletrônica

1. Glândulas salivares do tórax de *Melipona*. As glândulas salivares do tórax de *Melipona* são constituídas por túbulos secretores curtos, não ramificados, cujas paredes são formadas por células mais ou menos cúbicas e cuja luz apresenta um reforço cuticular relativamente espesso. Os ductos se reúnem em grupos de dois ou três para formar o ducto condutor da secreção (Cruz-Landim, 1963). Já dissemos também que, pelo menos em outros meliponídeos (*Trigona* (S.) *postica*) essas glândulas apresentam, durante a vida das operárias, um único ciclo de secreção (Cruz-Landim & Akahira, 1966). O que vimos de relatar sobre a histoquímica destas glândulas revela que durante esse ciclo as células secretoras sofrem alterações no seu conteúdo citoplasmático. A microscopia eletrônica permitiu-nos acompanhar, nas diferentes idades, a evolução dos diferentes orgânulos celulares, a formação da secreção, sua eliminação e os primeiros sinais de degeneração celular. Antes de entrar propriamente na discussão da ultraestrutura dos diferentes estágios da glândula, descreveremos os ductos glandulares, cuja estrutura permanece inalterada durante toda a vida da abelha.

Os ductos coletores da secreção, isto é, aqueles em contato direto com os túbulos secretores, são formados por células relativamente baixas com núcleos achatados, retículos pouco desenvolvidos, mas ricas em mitocôndrios. Os mitocôndrios são pequenos (0,2 a 0,4 μ de diâmetro x 1 μ de comprimento), mas contêm cristas bem desenvolvidas e predominantemente longitudinais (est. 5, a). Zonas de Golgi raramente estão presentes, mas podem ser observadas em algumas preparações. A membrana basal das células do ducto é muito espessa (1,5 a 2,0 μ), formada de material relativamente denso e fibrilar, orientado paralelamente à superfície da célula. A membrana plásmica basal se invagina em vários pontos. Essas invaginações, embora não sejam muito numerosas, nem muito profundas, acham-se associadas com mitocôndrios (est. 6, a). Na parte apical da célula, a membrana plásmica fica aderida firmemente ao revestimento da luz. As membranas de separação das células são muito sinuosas e apresentam característicos desmossomas septados. No caso presente, o espaçamento entre uma ligação e outra é de 25 Å. Além do percurso sinuoso, as membranas divisórias frequentemente formam alças (est. 5, b). Chamamos alças aos pontos em que as membranas das células adjacentes se separam deixando entre si um espaço intercelular maior, preenchido por substância amorfa eletronicamente pouco densa. Os desmossomas e sinuosidades das membranas divisórias servem para reforçar a aderência das células adjacentes, enquanto as alças, provavelmente, servem para a circulação de líquidos intersticiais. A cutícula que reveste a luz acha-se organizada em camadas concêntricas e apresenta-se muito pouco densa. No limite interno aparece uma linha de maior densidade, correspondendo, provavelmente, à camada periférica de lipídios orientados de cutícula (Locke, 1961), ou a uma esclerotização superficial. A espessura da cutícula é aproximadamente 1,5 μ , não sendo, contudo, regular em toda a circunferência da luz. Even-

tualmente, êste revestimento apresenta reforços em espiral semelhante aos das traquéias.

Estágio 1 (zero a 1 dia de idade). Um corte transversal dos túbulos secretores da glândula salivar do tórax de *Melipona*, visto com pequeno aumento (est. 6, b, c) mostra que êste é formado por quatro ou cinco células secretoras dispostas em tórno da luz. A primeira coisa que chama atenção ao examinar tal corte é que a parte apical da célula não se acha aderida ao revestimento da luz, ficando entre ambos um espaço que denominamos espaço subcuticular. O tamanho dêste espaço, ou seja, o grau de afastamento das células em relação à cutícula, é variável, mas geralmente grande neste estágio. A membrana plásmica apical das células está diferenciada em numerosas microvilosidades que se projetam dentro desta cavidade. O comprimento das microvilosidades varia entre 0,3 a 1 μ e o seu diâmetro de 75 a 100 m μ . Não estão inclusas em nenhuma matriz, mas aderido à sua superfície, nota-se material finamente granular (est. 7, a). Em corte transversal nota-se que o interior das microvilosidades contém citoplasma relativamente denso.

A cutícula apresenta-se com as mesmas características daquela do ducto, mas é mais delgada (350 a 700 m μ). Reforços em espiral estão sempre presentes.

A membrana plásmica das células secretoras, neste estágio, não apresenta diferenciações. Por fora desta, fica uma membrana basal bem mais delicada que a do ducto (300 a 500 m μ de espessura). As membranas separatórias das células vizinhas não apresentam nem sinuosidades, nem desmossomas ou alças.

No interior das células secretoras, nota-se a presença de um núcleo alongado, ou arredondado, com a cromatina dispersa em agrupamentos pequenos e um ou dois nucléolos. Ao redor do nucléolo notamos sempre alguma cromatina. A membrana nuclear apresenta poros bem visíveis, principalmente nos materiais fixados em permanganato de potássio. Nesta fase os núcleos acham-se um pouco deslocados para o polo apical da célula. O retículo endoplasmático está relativamente bem desenvolvido, mas o número de ribossomas presentes é pequeno. Êste retículo fica distribuído uniformemente por todo o citoplasma. As zonas de Golgi são numerosas e apresentam-se com a sua forma típica, isto é, lamelas dispostas em pilhas. São raras as dilatações na extremidade dos dictiossomas e poucas e pequenas as vesículas a êles associadas. Nesta fase, o Golgi localiza-se de preferência na parte apical da célula (est. 7, a, b). Os mitocôndrios presentes nestas células são numerosos, mas pequenos (0,25 a 0,35 μ x 0,75 a 1,0 μ) e acham-se distribuídos uniformemente por tóda a célula; suas cristas são bem desenvolvidas e predominantemente longitudinais.

Além dos orgânulos normais da célula, verificou-se a presença de "massas de glicogênio" localizadas de preferência na base da célula. O glicogênio se apresenta com a forma típica estrelada, a qual é mais conspicua nas preparações fixadas com permanganato de potássio (est. 7, b, c). Ao microscópio eletrônico, o glicogênio só é visível neste estágio. Embora raramente, são também visíveis nesta fase alguns grânulos

densos (150 m μ) na proximidade do Golgi, possivelmente de natureza lipídica.

Estágio 2 (3 a 5 dias de idade). A feição geral das células secretoras neste estágio é bastante semelhante à do estágio anterior, a não ser por um perceptível aumento do tamanho dos mitocôndrios e desenvolvimento do retículo endoplasmático, que se apresenta, nesta fase, já como ergastoplasma típico (est. 8, a). No estágio anterior as lamelas do retículo se distribuíam irregularmente pela célula. Nesta fase, pelo menos na zona central, essas lamelas apresentam tendências em se arranjar paralelamente. Algumas lamelas do ergastoplasma acham-se dilatadas formando vesículas, cujo conteúdo julgamos ser a própria secreção ainda dentro do retículo (est. 8, b). As vesículas apresentam ribossomas na superfície e o material no seu interior é de baixa densidade.

A estampa 8, b, é justamente de uma célula localizada na transição da parte secretora para o ducto. É interessante notar que, nesta fase, a maior quantidade de secreção aparece justamente nestas células, enquanto nas células da região secretora propriamente dita, a sua produção é mais incipiente. Verifica-se, também, que a membrana divisória das células, neste caso, apresenta as mesmas dobras e desmossomas que encontramos nas células típicas do ducto e que não aparecem nas células tipicamente secretoras.

Estágio 3 (8 a 12 dias de idade). A estampa 9 (a, b) mostra aumentos pequenos das células secretoras, as quais nesta fase apresentam 3 regiões distintas: a) região basal em mitocôndrios, envolvidos por invaginações da membrana plásmica; b) zona central, que contém ergastoplasma muito desenvolvido, com o arranjo típico em lamelas paralelas; esparsos nessa zona notam-se raros mitocôndrios, no limite superior desta região encontra-se o núcleo e algumas estruturas de Golgi; c) parte apical da célula, que contém numerosos mitocôndrios pequenos e vesículas, provavelmente com secreção. A estampa 9 mostra ainda que as microvilosidades estão, nesta fase, muito mais próximas do revestimento da luz, chegando mesmo a se comprimir à cutícula em certos pontos. Com este pequeno aumento, podemos ainda notar a presença de grânulos densos na zona central da célula.

Um aumento maior mostra que, nesta fase, o retículo é extremamente rico em ribossomas (est. 10). O complexo de Golgi se apresenta sempre vesiculoso, tendo perdido a morfologia mencionada no primeiro estágio. As vesículas encontradas na região do Golgi apresentam tamanho variado e contém no seu interior material pouco denso, o qual foi interpretado como sendo secreção. A periferia da zona ocupada pelo Golgi é mais densa do que a parte central desta, tanto no que concerne aos dictiosomas quanto às vesículas. Em alguns pontos a secreção, aparentemente, não tem membrana envolvente e as lamelas do retículo avançam para o interior. A parte do retículo que entra em contacto com o que julgamos ser secreção é livre de ribossomas (est. 10).

Os mitocôndrios da porção basal da célula são predominantemente arredondados e apresentam muitas cristas. Seu tamanho varia de 0,5 a

2,0 μ de diâmetro. Os mitocôndrios da zona central são ainda arredondados, mas bem menores (0,25 a 0,5 μ de diâmetro), e contêm, freqüentemente, um ou mais grânulos muito densos no seu interior, aderidos à membrana externa. Na zona apical das células os mitocôndrios apresentam-se predominantemente alongados e com cristas longitudinais. São de tamanho pequeno.

Na zona apical da célula as lamelas do retículo não são bem divisíveis, mas entre as secreções e mitocôndrios nota-se grande quantidade de ribossomas (est. 11, a). Aqui a secreção mostra forma granular mais regular e membrana envolvente nítida.

As microvilosidades apresentam-se na fase 3 mais curtas e finas (est. 9, a; est. 11, a) que no primeiro estágio.

As vênzes encontramos cavidades no interior do revestimento da luz do túbulo secretor (est. 11, a), as quais se acham limitadas, internamente, pela mesma linha densa que bordeja a cutícula do lado interno. Provavelmente, trata-se apenas de irregularidades na superfície da cutícula, que no corte parecem incluídas na sua espessura. Contudo, parece claro que neste estágio a cutícula é mais delgada (aproximadamente 200 m μ) e que possui estriações oblíquas em relação a luz (est. 11, a).

Estágio 4 (15 a 20 dias de idade). A principal diferença deste estágio em relação ao anterior consiste no grande acúmulo de secreção, no citoplasma, em detrimento principalmente do Golgi e do ergastoplasma. As vesículas de secreção ocupam, praticamente, toda a zona apical e central da célula, deixando livre apenas a porção basal (est. 11, b).

Na porção cortical da célula ainda encontramos grande quantidade de mitocôndrios volumosos, com cristas bem desenvolvidas, entremeados com o retículo disposto irregularmente.

Não foi possível identificar o complexo de Golgi neste estágio e o ergastoplasma se limita a pequenas ilhas, comprimidas pela secreção.

O núcleo se apresenta ainda arredondado, mas é menor e contém cromatina mais densa no interior. Sua posição é ainda apical.

A secreção se apresenta sob a forma de vesículas com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μ , cheias de material pouco denso, envolvidas por membrana mais ou menos nítida. Entre vesículas encontramos poucos mitocôndrios pequenos, restos do retículo e estruturas formadas por membranas muito densas arranjadas em forma de semi-círculos, ou anéis (est. 12, a, b). A secreção é eliminada pela parte apical da célula, entre as microvilosidades, por ruptura da membrana vesicular (est. 12, a; est. 13, b) encontramos, também, no espaço subcuticular, vesículas de secreção intactas, mitocôndrios e as estruturas lamelares densas citadas acima (est. 12, a). Em corte transversal, as microvilosidades mostram, no seu interior, uma matriz pouco densa (est. 13, a).

Estágio 5 (mais de 25 dias). A eliminação da secreção que apenas teve início no estágio anterior prossegue e à medida que isso ocorre todo o citoplasma apical se torna vesiculoso (est. 14 e 16). As últimas vesículas a serem eliminadas se fundem umas às outras (est. 15) formando grandes massas cujas membranas finalmente se rompem

libertando o conteúdo. Caracteristicamente aparecem no citoplasma apical, entre o que resta da secreção, corpúsculos formados por membranas dispostas concêntricamente umas em torno das outras formando estruturas semelhantes e novos que corresponderiam aos parassomas (est. 15; est. 16, a) de Gabe & Arvy (1961). No início da formação dessas estruturas as membranas acham-se mais separadas umas das outras e o conjunto apresenta pequena densidade (est. 13, b; est. 15). Em fase mais avançada os parassomas apresentam grande densidade eletrônica (est. 15; est. 16, a). O tamanho dessas estruturas é muito variável, mesmo depois de já completamente formadas, variando entre 2 e 4 μ de diâmetro. Ao lado dos parassomas, que provavelmente são resultados da degeneração celular, aparecem estruturas correspondentes aos lisossomas mais ou menos típicos, isto é, orgânulos menores (1 a 1,5 μ) constituídos por grânulos osmiófilos e às vezes também lamelas concêntricas envolvidas por uma membrana.

O núcleo aparece agora pequeno e cheio de grãos de cromatina, isto é, mais denso que no início de desenvolvimento da glândula e com localização central ou apical.

Na zona apical da célula os mitocôndrios são raros e pequenos. Os ribossomas desapareceram completamente e o retículo se apresenta exclusivamente formado por vesículas as quais muitas vezes aparecem mais numerosas sobre o núcleo (est. 16, b). Terminada a eliminação da secreção o espaço subcuticular desaparece (est. 14) fechando-se as microvilosidades nos pontos de contactos celulares, e contra o revestimento da luz.

Em nenhuma fase do desenvolvimento da glândula e nem ainda neste último pudemos verificar a presença de secreção na luz da glândula, provavelmente devido à sua baixa densidade eletrônica.

Durante todo o processo de secreção a parte da célula que menos alterações sofreu foi a parte que ainda neste final apresenta uma quantidade relativamente grande de mitocôndrios envoltos em um retículo liso e irregular (est. 14). Os mitocôndrios são naturalmente menores, mas nesta fase, após a eliminação da secreção, pode-se ver nitidamente que a membrana plásmica basal se invagina e que os mitocôndrios estão associados com as dobras formadas.

2. Glândula salivar do tórax de *Xylocopa*. A glândula salivar do tórax desta abelha apresenta a parte secretora alveolar e formada por dois tipos de células: zimogênicas e parietais. Constituindo cada alvéolo encontra-se uma célula zimogênica central e quatro ou cinco células parietais envolventes, conforme o já descrito no histórico (Cruz-Landim, 1963) e conforme pode ser visto na fig. 1.

Tivemos alguns problemas na fixação deste material, especialmente quanto à célula zimogênica, talvez devido ao acúmulo de secreção no seu interior.

As células parietais estão separadas da célula zimogênica por um canal intercelular de percurso sinuoso. Este canal apresenta-se formado por uma cutícula de, aproximadamente, 350 m μ de espessura e apresenta reforços em anel no interior (est. 17, a). Os reforços apresentam grande

densidade eletrônica e provavelmente são formados por um material diferente do restante da cutícula, ou seja, por uma parte esclerotizada da cutícula. Ao seu redor encontramos sempre as membranas celulares formando microvilosidades. As pontas das microvilosidades tocam o limite interno da cutícula na maioria dos casos, mas em outros aparece um espaço subcuticular, contendo material pouco denso. As microvilosidades ocupam toda a extensão da membrana plásmica apical das células parietais e toda a circunferência da célula zimogênica.

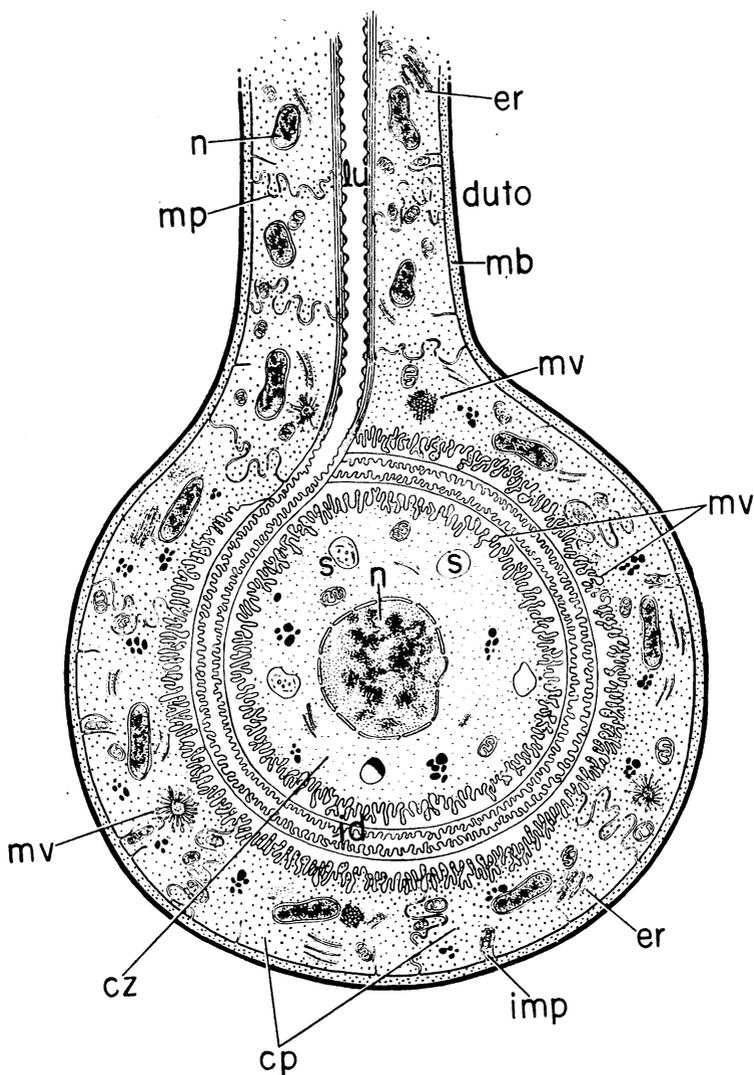


Fig. 1: Esquema da glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima*.

Ao abandonar a célula o canal intercelular forma a luz do ducto do alvéolo e as células parietais formam as suas paredes. As microvilosidades em torno da luz desaparecem então.

As células parietais chamam a atenção pela quantidade de retículo e de mitocôndrios. São células baixas, com núcleos alongados, com poucos grânulos de cromatina no interior. Apresentam alguns grãos de secreção, aparentemente de natureza lipídica. A membrana basal destas células é muito fina.

Pode-se distinguir três zonas nestas células: a) zona basal onde a membrana plásmica forma uma grande quantidade de invaginações associadas com mitocôndrios; b) zona mediana com um ergastoplasma muito desenvolvido com porções constituídas por lamelas juxtapostas e partes vesiculosas; c) zona apical em contato com a célula zimogênica com microvilosidades.

As membranas divisórias entre as células parietais são muito sinuosas e apresentam desmossomas septados como os descritos para os ductos da glândula salivar do tórax de *Melipona*.

A quantidade de secreção no interior destas células é pequena e sempre aparece com a forma de vesículas pouco densas (aproximadamente 2 μ de diâmetro), contendo no interior gotículas de material muito denso, provavelmente lipídios. As vezes as gotículas densas aparecem soltas no citoplasma, em grupos de 2 ou mais.

As células zimogênicas têm um núcleo grande central, com vastas massas de cromatina no interior. O seu retículo é também bastante desenvolvido e rico em ribossomas, quase sempre vesiculoso, raramente com a forma lamelar característica. Esse retículo se distribui de preferência na parte central da célula, ao redor do núcleo.

Em certas regiões o retículo apresenta um arranjo peculiar, isto é, as lamelas apresentam uma tendência para se arranjar radialmente em torno de porções do citoplasma de baixa densidade (est. 17, b). É freqüente que as partes do retículo dirigidas para o centro apresentem dilatações pequenas. Envolvidos nas dobras desse retículo encontramos numerosos mitocôndrios, predominantemente esféricos e com 0,8 a 1 μ de diâmetro. Esses arranjos radiais do retículo aparecem principalmente em regiões próximas ao canalículo intercelular. Em uma fase mais avançada o espaço central fica transformado num enorme vacúolo (est. 18, a) limitado por uma membrana que nada mais é que o próprio retículo. O vacúolo contém material pouco denso de natureza granular (est. 18, b) provavelmente secreção.

Além desses vacúolos observamos nestas células uma grande variedade de estruturas que provavelmente também representam secreção. Há pelo menos cinco tipos diferentes dessas estruturas que denominamos S1, S2, S3, S4 e S5. O tipo S1 é constituído por estruturas semelhantes às já descritas para as células parietais e é pouco freqüente nas células zimogênicas. O tipo S2 talvez constitua uma evolução do primeiro tipo. Trata-se de grânulos de forma irregular, envolvidos por uma membrana muito densa, contendo uma matriz de relativa densidade, esparsa, na qual se acha material bastante denso (est. 19, a), aparentemente de natureza lipídica. Em certas circunstâncias parece que estes grânulos se

desintegram libertando seu conteúdo. O tipo S3 é formado por grânulos esféricos, envolvidos por uma membrana dupla e apresentando no interior manchas de diferentes densidades. Embora a descrição possa parecer semelhante, o conteúdo do tipo descrito acima era aparentemente amorfo, enquanto neste caso é aparentemente granular. O quarto tipo é mais raro e consiste de um corpúsculo esférico de material finamente granular e relativamente denso, envolvido por uma membrana (est. 19, b). O quinto tipo apresenta também uma membrana envoltória em cujo interior aparecem substâncias densas e filamentosas (est. 19, b, c). Este grânulo se parece muito com o encontrado por Locke (1961) em glândulas de cêra de *Apis mellifera*. O terceiro e quinto tipos são mais freqüentes. Além destes aparecem estruturas menos conspícuas cuja descrição é difícil, que denominamos S6.

A secreção se acumula de preferência na periferia da célula zimogênica, na zona de contacto entre esta e as células parietais.

A origem destes grânulos é difícil de precisar, uma vez que não pudemos acompanhar a evolução da glândula no tempo. Contudo, aparecem nas células zimogênicas, partes do retículo, ricas em ribossomas, envolvidas por uma membrana (est. 20, a), portanto, isoladas do restante. Existem algumas evidências, embora não muito precisas, que tais estruturas possam se transformar nos grânulos referidos atrás e até em estruturas semelhantes a lisossomas (est. 20, a) e parassomas (est. 20, b). Também não pudemos observar a maneira pela qual esta secreção é eliminada da célula, embora em certos casos a secreção se acumule na base das microvilosidades, em torno do ducto intercelular e as microvilosidades em torno do lúmen estejam associadas muitas vesículas.

Os mitocôndrios neste estágio da célula são pequenos e pouco numerosos. Acham-se espalhados por toda a célula entre o retículo e a secreção. Áreas de Golgi não são visíveis nem nas células zimogênicas, nem nas parietais.

3. Glândula salivar do tórax de *Megachile*. Na glândula salivar do tórax de *Megachile* é difícil distinguir a parte secretora da parte condutora (ducto) da secreção, visto que toda a glândula é constituída por um conjunto de túbulos longos e ramificados. Ao microscópio óptico as células secretoras parecem apresentar um ducto intracelular excêntrico com percurso sinuoso ao longo do túbulo (Cruz-Landim, 1963).

Na parte dos túbulos mais distantes do ducto excretor da glândula encontramos células que têm no seu interior um ducto intracelular calibroso excêntrico com espessamentos de quitina em espiral (est. 21, a). Em torno desse canal se acumula uma massa de secreção sem membrana limitante. Essa secreção é densa e granulosa e se afasta do ducto na zona limitante das células vizinhas (est. 21, a). Eventualmente observa-se esta secreção no interior da cutícula. Abaixo dessa zona há uma região de densidade menor, visivelmente da mesma natureza que a primeira, apenas menos concentrada (est. 22, a). Nesta zona ainda se notam alguns restos de retículo. O restante da célula é ocupado pelo núcleo, mitocôndrios e um ergastoplasma vesiculoso (est. 22). A membrana basal destas células é espessa e bastante densa.

O ducto excretor desta glândula apresenta na luz um revestimento cuticular no qual se notam duas camadas distintas. Uma mais externa em contacto com a célula, de densidade relativamente baixa e uma interna bem densa. Em certos pontos, no interior desta cutícula, na parte menos densa encontramos massas de material denso que protruem para o lúmen (est. 21, b). Não sabemos se se trata de secreção ou de pontos esclerotizados da cutícula. As células que constituem a parede deste ducto apresentam retículo granular, mas pouco desenvolvido. O restante do citoplasma aparece constituído por uma matriz granulosa na qual encontramos algumas vesículas. A membrana basal do ducto é bem espessa (250 m μ) e tem aspecto estriado perpendicularmente à célula.

4. Glândula salivar do tórax de *Colletes*. A glândula de *Colletes* tem organização semelhante à de *Xylocopa*, a não ser pelo número de células zimogênicas, que no caso presente varia entre 2 e 4. Encontramos também aqui as células parietais divididas em duas zonas. A zona periférica com muitos mitocôndrios envolvidos por invaginações da membrana plásmica e a zona apical rica em ergastoplasma (est. 23, a).

Tanto nas células parietais como nas células zimogênicas o ergastoplasma apresenta-se organizado radialmente em torno de certos pontos (est. 23, b). Contudo a formação de vacúolos não foi observada. São comuns também complicações do retículo junto à membrana separatória das células parietais, bem como a presença de dilatações das lamelas ergastoplásmicas dando origem a vesículas com ribossomas na superfície (est. 24, b).

A célula zimogênica apresenta na parte central numerosos grãos de secreção, entremeados com retículo (est. 24, a). As microvilosidades aparecem ao redor dos ductos intercelulares como em *Xylocopa*. Os mitocôndrios, nas células parietais, muitas vezes, aparecem com forma de alteres.

O ducto desta glândula apresenta a luz com o característico reforço cuticular. As células que formam a parede são ricas em mitocôndrios e têm uma membrana basal muito espessa (350 m μ). Alguns grãos de secreção que aparecem são do tipo S1.

5. Glândula salivar da cabeça de *Melipona*. As glândulas salivares da cabeça nesta abelha são formadas por alvéolos piriformes. Cada alvéolo é formado por numerosas células, aproximadamente cúbicas, quando a abelha é bem jovem, e bem achatadas quando a abelha é mais idosa. Os alvéolos da abelha jovem não apresentam secreção no interior e por isso apresentam-se achatadas. A condição alveolar só é bem visível depois que a secreção começa a ser acumulada no interior da glândula. A glândula salivar da cabeça origina-se do ducto excretor final das glândulas salivares do tórax (Snodgrass, 1925) sob a forma de expansões achatadas, foliáceas. Posteriormente, as células colocadas na extremidade dessas evaginações tornam-se secretoras e provocam um alargamento destas, as quais se tornam globosas. Porisso, mesmo entre os Apidae, existem abelhas em que a separação entre a parte secretora e os ductos coletores não é muito marcada, como em *Bombus* e *Euglossa* (Cruz-Landim, 1963). Neste caso os ductos são alargados e achatados.

Em *Melipona* essas duas partes já são morfológicamente bem distintas e começaremos, como no caso da glândula salivar do tórax, por descrever a ultraestrutura de um ducto.

Os ductos coletores da glândula da cabeça são formados por células muito baixas que aparecem na maioria dos casos como uma estreita bainha de citoplasma em torno do revestimento da luz. Essa bainha se alarga para mais do dobro da espessura na região que contém o núcleo.

Os núcleos são alongados e acompanham a curvatura do ducto. Num mesmo corte transversal geralmente só encontramos um núcleo. O revestimento da luz é muitíssimo espesso (2 a 3 μ), apresenta-se disposto em camadas concêntricas e tem reforços alongados contendo material eletronicamente denso. A membrana plasmática apical da célula é bem visível no limite externo desse revestimento.

O citoplasma das células que constituem o ducto apresenta um retículo liso pouco desenvolvido, numerosos mitocôndrios pequenos e algumas gotas de material lipídico. A membrana plásmica basal destas células não apresenta invaginações. A membrana divisória entre as células dificilmente foi vista e não apresentava, na maioria dos casos, desmossomas.

A membrana basal não é muito espessa e não tem nenhuma estrutura especial.

Estágio 1. Um pequeno aumento da parte secretora da glândula salivar da cabeça de abelhas bem jovens (est. 25) mostra que as células que formam a parede do alvéolo têm altura irregular devido ao fato da cutícula, que reveste a luz, penetrar nas zonas dos contatos celulares até quase a superfície. A luz da glândula mostra-se, assim, também irregular.

A cutícula, nesta fase da glândula, é totalmente diferente do que temos visto até agora. Trata-se de um revestimento de espessura muito variável (0,1 a 2 μ), formado por material de baixa densidade eletrônica e aparentemente amorfo, ou granular. Contudo, este revestimento dá reação positiva para quitina pela reação de Schultze, como vimos atrás. No limite interno desta cutícula aparece, como nos casos anteriores, um lineamento osmiófilo. A cutícula é separada da célula por uma membrana plásmica bem nítida e muitos mitocôndrios se localizam nesta zona de contacto, alguns até fazendo certa saliência na membrana. Em material fixado com glutaraldeído, percebem-se invaginações dessa membrana que penetram fundo no citoplasma (aproximadamente 2 μ de comprimento).

O núcleo destas células é grande, tendendo para a esfericidade e apresenta pouca cromatina no interior.

Os mitocôndrios são numerosos, de tamanho médio, mas as cristas não são muito desenvolvidas. Aparentemente distribuídos por toda célula. Nos mitocôndrios alongados, as cristas são de preferência longitudinais.

O retículo é bem desenvolvido. Em material fixado com permanganato apresenta-se tubular. Aparentemente trata-se de um retículo do tipo liso, isto é, constituído só de membranas, contudo ribossomas livres estão presentes em grande quantidade formando pequenos agrupamentos (poliribossomas), como pode ser visto na est. 26, b.

As formações de Golgi não são muito freqüentes nas células desta fase da glândula, mas quando presentes têm o aspecto típico de lamelas empilhadas com dilatações nas extremidades (est. 18, a). As poucas vesículas que aparecem associadas ao Golgi são diminutas.

Neste estágio o glicogênio aparece em quantidade relativamente grande, até maior do que as presentes na glândula salivar do tórax na mesma fase. Em preparações fixadas em permanganato os grânulos de glicogênio apresentam o aspecto estrelado característico (est. 26, a). Algumas preparações que obtivemos de material fixado com o fixador de Dalton apresentam no interior do citoplasma massas de material aparentemente mal preservado que correspondem em localização, ao glicogênio (est. 26, b). Esta fixação evidenciou também uma enorme quantidade de ribossomas no citoplasma das células secretoras deste estágio.

A membrana basal destas células é fina e não apresenta estrutura especial a não ser talvez uma menor compacidade que nos casos anteriores.

As preparações de material fixado com glutaraldeído revelaram na parte basal da célula um sistema de invaginações da membrana plásmica dando origem a numerosos canais sinuosos contendo no seu interior material pouco denso misturado com partículas densas, aparentemente fragmentos da membrana basal. Os canais têm de 300 a 400 $m\mu$ de parede a parede. Esses canais podem avançar pela célula até a proximidade da cutícula da luz e podem dar origem a vesículas que ficam soltas no citoplasma. Tal estrutura assemelha-se aos canaliculos pinocitóticos, apresentados por células encarregadas de absorção. Observamos várias vezes a penetração de traqueíolas através dessas invaginações da membrana basal.

Estágio 2. As abelhas desse estágio apresentam uma certa variação no aspecto da glândula em relação ao estágio anterior. A primeira diferença notável foi observada no contacto entre a célula e a cutícula o qual se mostra mais irregular que no caso anterior, apresentando a membrana plásmica algumas interrupções e invaginações pouco profundas e alargadas (est. 27, a; est. 28, b). Muitas vezes notam-se pequenos grânulos densos próximos à membrana ou às suas invaginações (est. 27, a).

No interior do citoplasma encontramos um retículo muito desenvolvido que nas preparações fixadas com ósmio e glutaraldeído aparece como um ergastoplasma vesicular muito embora em algumas células ainda mantenha o aspecto do estágio anterior, isto é, com ribossomas formando grupos, isolados do retículo (est. 27, b; est. 28, a).

Outra diferença marcante diz respeito aos mitocôndrios. Podemos distinguir dois tipos desses orgânulos nesta fase: 1) os esféricos, que são mais numerosos, apresentam grande variação de tamanho e poucas cristas; 2) os alongados, bastante raros e com cristas bem desenvolvidas (est. 33, b; est. 34). Os mitocôndrios esféricos de menor tamanho têm aproximadamente 800 $m\mu$ de diâmetro, portanto, muito próximo do tamanho das vesículas presentes neste estágio e no anterior. Alguns

dêstes pequenos mitocôndrios assemelham-se àquelas vesículas por apresentarem no seu interior numerosos fragmentos de suas cristas. Contudo, o que mais nos chamou atenção foi o aparecimento de mitocôndrios gigantes (3,5 a 4,5 μ de diâmetro) com matriz levemente mais densa que os demais (est. 30, b; est. 34) e apresentando no interior fragmentos das cristas. Há tôda uma gama de variação de tamanho entre os pequenos mitocôndrios esféricos e êstes. Alguns mitocôndrios de tamanho intermediário apresentam às vêzes a membrana externa interrompida (est. 34).

O aparecimento de tais mitocôndrios em células glandulares foi observado antes por Yasuda, Ellis & Montagna (1962) e Kawabata (1964), respectivamente, em glândulas sudoríparas e ceruminosas humanas. Kawabata dá a êstes mitocôndrios especiais o nome de "huge mitochondrion".

Em material com glutaraldeído os mitocôndrios pequenos apresentam grânulos densos no seu interior.

Encontramos ainda no citoplasma de células desta fase dois tipos de grânulos que julgamos ser secreção. Um dêles se apresenta sob a forma de pequenos corpos esféricos de 200 a 800 m μ de diâmetro, constituídos de material denso e envolvidos por uma membrana (est. 28, c; est. 34, a). O outro tipo se apresenta sob a forma de vesículas de 0,7 a 1 μ de diâmetro, contendo no interior numerosos e minúsculos grânulos densos (est. 28, c; est. 34, b). Além dêstes, encontramos, embora raramente, grandes glóbulos de material lipídico (2 μ de diâmetro) espalhados pelo citoplasma (est. 28, a).

Embora julguemos que os grânulos densos presentes no citoplasma constituam a secreção destas células não pudemos relacioná-los à sua origem e nem aos pequenos grãos eliminados na parte apical da célula para o interior da cutícula os quais são bem menores que êstes e levemente menos densos, pelo menos assim nos pareceu.

Nesta fase de desenvolvimento da glândula não conseguimos detectar a presença do Golgi. Por outro lado aparecem já estruturas em forma de lamelas concêntricas, semelhantes aos parassomas (est. 28, d).

Estágio 3. O presente estágio é bastante semelhante ao anterior. Ainda encontramos em algumas células a formação de bolsas pela membrana apical, contendo no seu interior pequenos grânulos densos de aproximadamente 200 m μ de diâmetro e que parecem estar sendo eliminados da célula.

O retículo continua muito desenvolvido (est. 35, a) mas o número de grânulos densos parece ter diminuído e seu tamanho aumentado (500 a 850 m μ de diâmetro). Algumas vêzes encontramos êsses grânulos no interior de vesículas cujo conteúdo restante apresenta menor densidade. Umás poucas vêzes julgamos ter percebido restos de cristas nas paredes destas vesículas. O número das vesículas contendo granulações miúdas também diminuiu e nesta fase elas são raras, quase não aparecendo.

Os mitocôndrios nestas células encontram-se distribuídas uniformemente por tôda a célula e são maiores que na primeira fase (1 a 1,5 μ de diâmetro). São de preferência esféricos, apresentam cristas curtas e em pequeno número e matriz pouco densa (est. 31, a).

Aparecem, neste estágio, arranjos concêntricos de membranas que envolvem pequenas porções do retículo. Essas formações são semelhantes às figuras mielínicas dos nervos e às já descritas para as glândulas salivares do tórax. Algumas dessas estruturas tomam às vezes aspectos complicados.

Em alguns alvéolos da glândula as células apresentam aspecto bastante semelhante ao que acabamos de descrever, mas a cutícula apresenta grande quantidade de secreção no seu interior. Esse fenômeno chama bastante a atenção porque ocorre bruscamente. A secreção aparece no interior da cutícula sob a forma de gotas de material muito denso de aspecto lipídico, embora em muitos pontos a estrutura da cutícula em camadas concêntricas ainda não seja visível, a disposição da secreção indica claramente essa organização (est. 31, a). Nesta fase a secreção ainda não atingiu a luz, ou a sua quantidade aí é muito pequena. A impressão que se tem, observando as fotografias 31, a, b, é que a secreção passa da célula para a luz, infiltrando-se através da cutícula pelos interstícios, entre uma camada e outra atingindo-a caminhando em espiral através desses interstícios. A cutícula nesta fase apresenta uma espessura de, aproximadamente, 3 μ .

Estágio 4. Durante este estágio a quantidade de estruturas formadas por membranas concêntricas aumenta bastante. Grandes porções do citoplasma das células são interessadas no processo de formação desses orgânulos e com freqüência as membranas envolvem ou se iniciam em torno dos mitocôndrios (est. 32, b), envolvendo também porções do retículo e outras partes da célula (est. 32, b). A princípio o arranjo dessas lamelas é mais ou menos frouxo e pode-se então perceber nitidamente que são formadas por membranas duplas com espaçamentos de 250 Å. Posteriormente o enovelamento das membranas se aperta e a estrutura se torna bastante densa, como veremos mais tarde, não alcançando contudo a densidade das estruturas semelhantes encontradas nas glândulas salivares do tórax. Muitas vezes, no início, essas formações se assemelham às estruturas de Golgi (est. 33, b, c), ou às lamelas aneliformes (annulate lamellae) descritas por Gross (1966) e Harrison (1966). Essa aparência (est. 32, b; est. 33, a) se deve à tendência dessas membranas para, em certos pontos, se fragmentarem em pequenas vesículas.

Na parte da célula, em contacto com a cutícula, encontramos ainda restos das invaginações da membrana plásmica através das quais foi eliminada a secreção. Essas invaginações que eram alargadas em forma de bolsas apresentam-se agora mais estreitadas (est. 32, a). É interessante notar que sempre abaixo da membrana plásmica aparece uma membrana dupla bastante densa de 100 Å de espessura e 150 Å de espaçamento (est. 33, c), cuja natureza parece semelhante à das membranas que formam os parassomas. Esta mesma membrana aparece também acompanhando as membranas divisórias das células (est. 32, b; est. 33, b) e a membrana plásmica basal. Muitas vezes aparecem duas destas membranas correndo paralelamente (est. 32, b) o que indica tratar-se de um início de formação das estruturas concêntricas, parecendo, por-

tanto, que toda a célula está envolvida no processo. A estampa 32, b, mostra um menor aumento da transição de um alvéolo para um ducto. Pode-se notar aqui secreção no interior da cutícula com a disposição característica e, o que é interessante, toda a membrana plásmica bordejando a cutícula e suas invaginações acompanhadas pela membrana dupla densa subjacente.

Esta fase apresenta-se rica em mitocôndrios os quais são predominantemente alongados e relativamente ricos em cristas que se dispõem, de preferência, longitudinalmente.

Nota-se, ainda, como característico deste estágio, a presença no citoplasma de uma grande quantidade de corpúsculos muito densos, de tamanho variável e contorno irregular, sempre envolvidos por uma membrana. Pode-se perceber que esses corpúsculos originam-se pelo aparecimento, dentro de vesículas de menor densidade, de material denso que aí vai se acumulando (est. 33, a, b, c). Muitas vezes o acúmulo de material denso se inicia em pontos diferentes da vesícula e os glóbulos formados acabam por fundir-se posteriormente, por isso a densidade do material no interior da membrana não é uniforme. Essas estruturas parecem-se bastante com lisossomas.

Nesta fase a secreção já se encontra no lúmen da glândula e tem aspecto amorfo.

Estágio 5. Neste estágio o aspecto da zona basal das células fixadas com glutaraldeído ainda continua o mesmo (est. 35, c), talvez até com o sistema de canálculos um pouco mais desenvolvido. Este estágio, aliás, não apresenta muitas diferenças do anterior. O que podemos ver nas fotos é que o processo de vesiculação do citoplasma e envelhecimento das membranas para formar parassomas se acentua e encontramos então toda sorte de formações concêntricas e corpos multivesiculares (est. 35, b). A estampa 34, b, mostra todo o retículo com o aspecto de membranas aneliformes. A presença de lisossomas, ou seja, de estruturas semelhantes às que têm sido descritas como lisossomas é uma constante e estes aparecem em grande número (est. 36, c) e formando agrupamentos em certos pontos das células (est. 34, a).

O retículo é pouco desenvolvido nesta fase, principalmente a parte referente às membranas. Encontramos, contudo, ribossomas soltos no citoplasma (est. 36, b, c). As invaginações da membrana plásmica apical se estreitaram ainda mais (est. 34, a), e aparecem bastante aprofundadas no citoplasma (1 a 4 μ de comprimento). Em preparações fixadas com ósmio, freqüentemente as invaginações da membrana plásmica basal da célula aparecem formando alças (est. 36, b), as quais, freqüentemente, contêm numerosas vesículas densas de aproximadamente 400 m μ de diâmetro.

Algumas células colocadas justamente na transição do alvéolo para o ducto coletor apresentam na parte apical, numerosas gotas lipídicas de tamanho bastante variado (est. 35, a). Nestes locais de transição para o ducto, a cutícula se apresenta muitíssimo espessa (est. 36, a) e muito densa, como que totalmente impregnada pelo material lipídico. Também aí a cutícula apresenta reforços em espiral. O revestimento da

luz do alvéolo não apresenta essa impregnação mostrando-se a cutícula amorfa e com densidade baixa. Sòmente o lineamento da luz mostra-se denso e parece ter aumentado de espessura.

Pela primeira vez nesta fase notamos nas glândulas salivares da cabeça a presença de desmossomas septados nas membranas divisórias das células e êstes aparecem justamente nas células transicionais, entre o alvéolo e o ducto. Êstes desmossomas são em tudo idênticos aos vistos na glândula salivar do tórax, mas não ocupam tôda a extensão da membrana como lá. No caso presente apenas alguns segmentos da membrana de separação apresentam essas formações de refôrço.

A figura 2 mostra um esquema de um alvéolo da glândula salivar da cabeça de *Melipona*, apresentado à guisa de resumo de nossas observações.

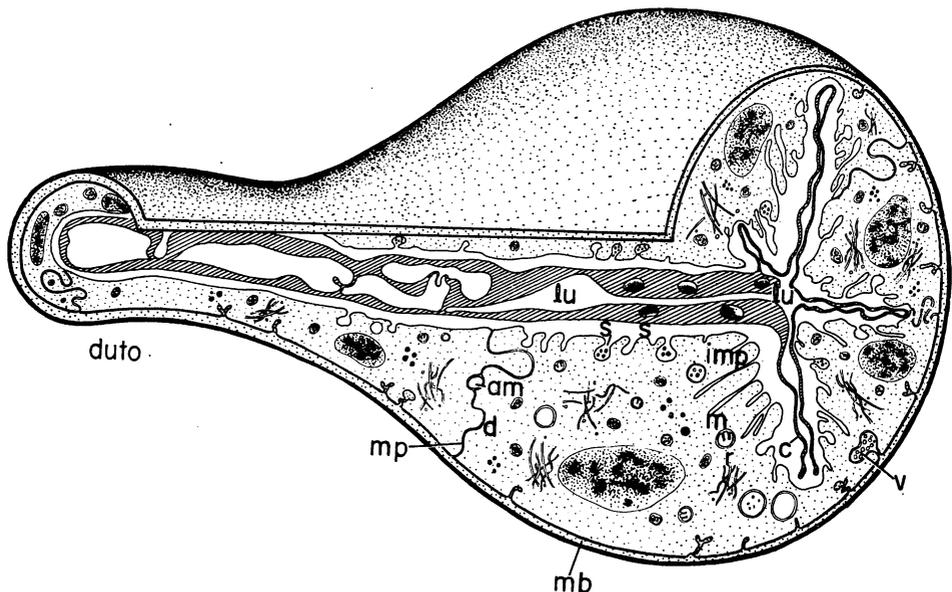


Fig. 2: Esquema geral de um alvéolo da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*.

6. Ducto excretor final da glândula salivar de *Xylocopa*. As abelhas que não têm glândulas salivares na cabeça apresentam o ducto excretor final bastante alargado e achatado (Cruz-Landim, 1963), é êste o caso de *Xylocopa*. Nas abelhas em que as glândulas salivares da cabeça são rudimentares o ducto ainda se conserva alargado e achatado e as glândulas salivares da cabeça surgem como simples expansões foliáceas de sua parede. Porisso, julgamos interessante investigar a morfologia das células que constituem tal ducto.

As características mais marcantes destas células referem-se à presença de grandes gotas lipídicas no citoplasma e à invaginação da membrana plásmica basal (est. 37, a). O material lipídico aparece inicialmente no interior de vesículas que permanecem depois de formadas, envolvidas por um material finamente granular. Essas gôtas podem se

fundir umas às outras formando massas muito grandes (até 4 μ de diâmetro), e muitas vezes, mesmo depois da fusão, ainda se pode perceber a superfície de separação das gotas formadoras devido à presença do material granular (est. 37, b).

A membrana plásmica forma na parte basal da célula uma quantidade grande de canaliculos que muitas vezes aparecem preenchidos por material semelhante à membrana basal, e outras vezes não (est. 37, b). Em corte transversal, essas estruturas aparecem até certo ponto semelhantes às verificadas por Bowers (1964) em células pericárdias de afídeos.

Quanto ao restante as células apresentam núcleos esféricos, com grandes nucléolos freqüentemente vacuolizados, e cromatina pouco concentrada. O retículo aparece vesiculoso e rico em ribossomas. O citoplasma apresenta grandes vacúolos, que pela sua morfologia, parecem ter sido anteriormente ocupados por gotas lipídicas. Os mitocôndrios são raros e pequenos mas apresentam aspecto normal.

O refôrço da luz é bastante espesso e disposto em camadas concêntricas, mas nenhuma diferenciação apical aparece nas células para eliminação da secreção. Contudo a cutícula apresenta projeções que penetram nas células quase alcançando a parte basal.

Nestas projeções, aparentemente a cutícula se arranja sob a forma de camadas paralelas (est. 38). Em tórno dessa cutícula aparece uma porção do citoplasma livre de orgânulos celulares e de baixa densidade eletrônica.

7. Glândula salivar da cabeça de *Megachile*. As preparações obtidas desta glândula mostraram-se muito ruins devido à grande espessura e esclerotização da cutícula, mas fizemos um esquema (fig. 3) que ilustra o seu aspecto geral. Como se vê, o retículo é relativamente pouco desenvolvido e a quantidade de secreção também é pequena, sendo esta aparentemente do tipo lipídico. Os mitocôndrios são bastante numerosos. As células apresentam uma diferenciação na parte basal que consiste no seguinte: externamente aparece a membrana basal que é relativamente fina (100 m μ) e depois da membrana plásmica uma zona densa de aproximadamente 900 m μ de espessura com aspecto estriado, sendo a estriação perpendicular à superfície da célula. Estas células são muito ricas em traqueíolas, e esta parte basal estriada se eleva nos pontos em que as traqueíolas penetram no citoplasma, acompanhando-as, ou mesmo, elevando-se sôzinha, transformando-se em verdadeiros cordões de material denso no interior da célula (est. 39, a). São freqüentes também nestas células vesículas contendo no seu interior feixes de microtúbulos, correndo no sentido paralelo à cutícula (est. 39, b).

DISCUSSÃO

A literatura não contém muitos dados a respeito da histoquímica ou mesmo da função da secreção das glândulas salivares dos insetos, mormente das abelhas.

Sabe-se que, de uma maneira geral, a secreção das glândulas torácicas das abelhas é fluida e aquosa, enquanto a das glândulas da cabeça é oleosa. O mesmo pudemos constatar para *Melipona*. Não fizemos verificação do aspecto da secreção nas outras abelhas estudadas por ser pequena a quantidade de secreção existente na luz dos ductos e de difícil coleta a saliva eliminada pelo orifício das glândulas na glossa.

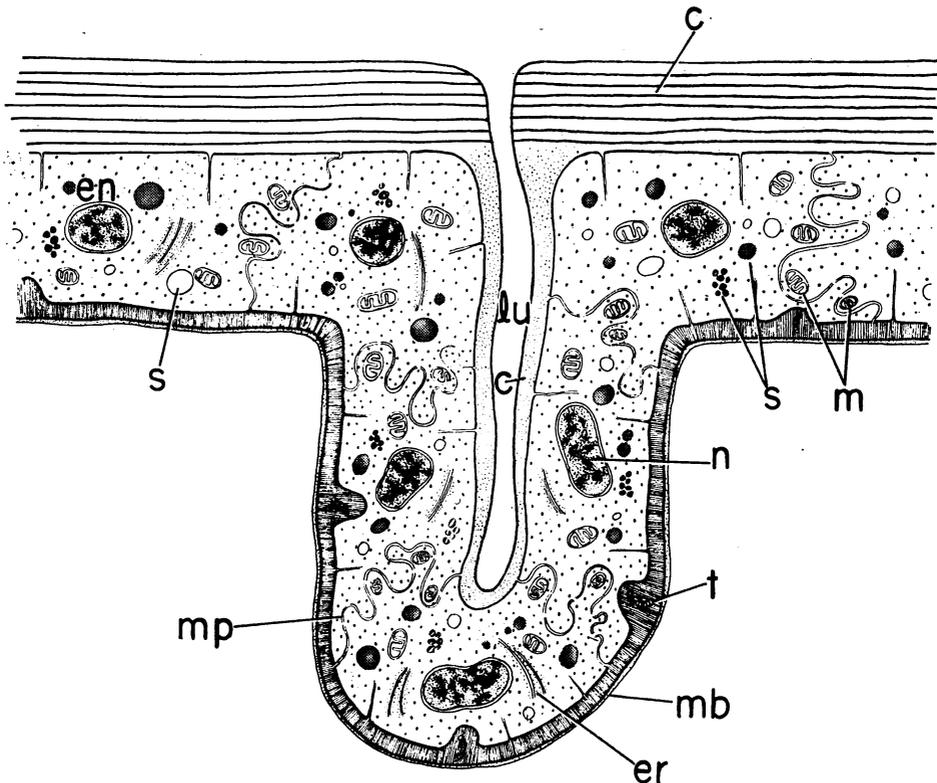


Fig. 3: Esquema da glândula salivar da cabeça de *Megachile*.

Por outro lado, as observações descritas anteriormente deixam claro que as glândulas salivares das abelhas apresentam uma grande variedade morfológica e provavelmente também fisiológica.

Ao que tudo indica (Heselhaus, 1922; Simpson, 1960 e 1962) as glândulas salivares das abelhas não produzem quantidades apreciáveis de enzimas, sendo sua secreção utilizada, principalmente, para o preparo de diferentes materiais, inclusive alimentos. Assim sendo, o grau de desenvolvimento destas glândulas, a nosso ver, está mais ligado ao comportamento da espécie, do que propriamente à digestão dos alimentos a qual fica principalmente a cargo das enzimas produzidas pelo ventrículo. Esse fato explicaria a diversidade morfológica das glândulas; se sua função fôsse exclusiva, ou principalmente, digestiva, esperar-se-ia maior uniformidade.

Dito isso, discutiremos a seguir o significado provável de cada observação realizada segundo a mesma ordem da descrição dos resultados.

A. Histoquímica

Vimos que os resultados das reações histoquímicas não se mostram muito diferentes de glândula para glândula, a não ser pela intensidade. Quase todas as discrepâncias apresentadas nas tabelas I e II podem ser explicadas facilmente.

1. Proteínas. Verificamos que esta reação foi sempre muito fraca, mas nunca esteve ausente. Consideramos que um teste apenas fracamente positivo, assinalado nas tabelas por uma cruz, se deve às proteínas estruturais da célula e não a qualquer produto de secreção. Uma intensificação da coloração (++) foi interpretada como devida à presença de secreção protéica. Essa assertiva parece ser comprovada pela intensificação da coloração nos estágios 2 e 3 da glândula salivar do tórax de *Melipona*, nas células zimogênicas de *Xylocopa*. Também a falta de maior reatividade à ninhidrina-Schiff na glândula salivar da cabeça de *Melipona*, cuja secreção é de natureza lipídica, corrobora essa assertiva.

2. Polissacarídeos. O glicogênio, como se sabe, é material de reserva das células animais, à custa do qual estas obtêm energia para suas múltiplas atividades. Segundo nossa interpretação, a presença dessa substância no início do ciclo de atividade glandular, o qual corresponde também ao fim da sua embriogênese, indica imaturidade da célula. Eventualmente, a energia necessária para a síntese de substâncias plásticas, pela célula, pode ser cedida pelo desdobramento do glicogênio armazenado *in loco*. Esta nossa suposição só poderá ser confirmada por uma investigação da presença desse composto nas glândulas da pupa, mas desde já podemos adiantar que os tecidos larvais e pupais são, de uma maneira geral, ricos desse composto. Por outro lado, achamos que a ausência de glicogênio nas glândulas das outras abelhas estudadas, não significa propriamente falta deste composto, porque nós não examinamos fases jovens dessas glândulas; examinamos somente fases correspondentes àquelas em que o glicogênio também não está presente em *Melipona*.

Apesar do carmin de Best não ser uma coloração específica para glicogênio, os resultados apresentados por este corante na coloração desse composto foram melhores que os obtidos com o PAS.

Parece-nos que os resultados positivos obtidos com o PAS no primeiro estágio correspondem à presença de glicogênio, enquanto os obtidos nos estágios subsequentes em outros lugares da célula correspondem a substâncias diferentes. O material PAS positivo no 3.º, 4.º e 5.º estágios da glândula salivar do tórax parece estar relacionado com a secreção, tanto mais que a reação PAS positiva não foi alterada pelo tratamento com saliva, enquanto a dos estágios anteriores o foi. Assim sendo, a secreção da glândula salivar do tórax de *Melipona* seria uma glicoproteína, desde que dá reação positiva tanto para proteína como para grupamentos glicol. O mesmo pode-se dizer sobre a coloração po-

sitiva obtida na glândula salivar do tórax da cabeça de *Megachile*. Já no caso de *Xylocopa*, a microscopia eletrônica revelou que o local que apresenta reação positiva ao PAS corresponde à zona de microvilosidade, ao redor dos canaliculos intercelulares. Segundo nos parece, essa reação pode ser atribuída, também, à secreção, embora não esteja afastada a hipótese de que seja devida a uma substância semelhante à que constitui a bordadura (mucopolissacarídeos), que em muitos casos forma uma espécie de substância cimentante entre as microvilosidades (Beams & Anderson, 1957). O exame ao microscópio eletrônico não revelou a presença de nenhum material entre as microvilosidades, mas segundo Fawcett (1958) isso pode ser atribuído à baixa densidade eletrônica do material, ou ao fato de os fixadores eletrônicos não preservarem os mucopolissacarídeos. Resta explicar a reação positiva obtida com a coloração do McManus no revestimento da luz das glândulas e seus ductos, mesmo aquêles intercelulares. Como se sabe, as estruturas cuticulares dos insetos apresentam composição química complicada e variável. A variação ocorre tanto com a idade como com a localização. Imms (1957) acha que os dois componentes maiores da cutícula dos insetos são a quitina e as proteínas. O revestimento interno da luz das glândulas e ducto extra- e intercelulares têm a mesma origem e provavelmente a mesma composição que a cutícula que forma o exoesqueleto, à qual se refere Imms (1957). Dizemos que tem provavelmente a mesma composição, quanto aos componentes básicos, ressalvadas as variações quantitativas. Em trabalhos anteriores (Kerr & Cruz, 1961 e Cruz-Landim, 1963), havíamos já verificado a presença de quitina mesmo nos canaliculos intracelulares das glândulas mandibulares (*Trigona*) constatação agora confirmada de maneira mais geral através da reação de Schultze. A quitina é um mucopolissacarídeo nitrogenado e pode ser responsabilizada pela reação positiva à técnica de McManus. Lison (1960) faz uma breve revisão sobre o assunto, relatando experiências de vários autores que obtiveram reação PAS da quitina dos artrópodos e de fungos. A quitina esclerotizada não apresentaria reação positiva senão quando tratada por NaOH a 10%. Isso explica porque a cutícula mais espessa, das abelhas mais idosas, não dá reação positiva com o método de McManus. Poder-se-ia ainda pensar que a reação positiva ao McManus se devesse à impregnação da cutícula pelas secreções glandulares. Não consideramos essa hipótese como provável porque a cutícula se cora em tôdas as fases do ciclo funcional das glândulas (exceto onde a cutícula se apresenta amarela) e em tôdas as glândulas, mesmo quando a secreção não dá reação positiva ao McManus.

Um fato que permaneceu inexplicável para nós, foi o de somente o método de McManus dar resultados positivos e não o de Hotchkiss. O tempo de oxidação e a concentração do ácido periódico é maior no segundo caso que no primeiro e o solvente usado é o álcool metílico.

3. Ácidos nucléicos. Embora tenhamos empregado colorações que coram ambos os tipos de ácidos nucléicos (verde-metila-pironina e alaranjado de acridina) o nosso interesse maior referia-se à avaliação da basofilia do citoplasma, ou seja, seu conteúdo de RNA. Para êsse fim, dentre os métodos empregados, o que se mostrou mais apropriado

foi o azul de toluidina. A intensidade de coloração variou bem de um estágio para outro e concordou plenamente com o grau de desenvolvimento do ergastoplasma observado ao microscópio eletrônico. Assim em *Melipona* a basofilia maior verificou-se no 3.º estágio da glândula salivar do tórax e em *Xylocopa* e *Colletes* nas células parietais. Queremos ainda acentuar que pudemos com esta coloração perceber diferenças de tonalidades entre o citoplasma e o núcleo, embora não tão acentuadas quanto as observadas por Feder & Wolf (1965). O citoplasma corou-se em azul profundo e o núcleo em verde mar. Infelizmente não pudemos perceber a presença de nucléolos nos núcleos para melhor avaliar a "especificidade" do método. Contudo, êsse resultado nos leva a supor que o principal fator para obter a "especificidade" do azul de toluidina é a fixação em aldeídos.

Se o azul de toluidina se revelou o melhor método para avaliar a basofilia, a fluorescência, depois da coloração com alaranjado de acridina, se mostrou de valor praticamente nulo neste particular. A intensidade da fluorescência manteve-se a mesma em tôdas as fases do desenvolvimento das glândulas.

Quanto ao núcleo, pudemos verificar que nas fases mais jovens da glândula de *Melipona* êle se apresentava maior e corado mais fracamente, enquanto nos estágios finais e nas abelhas solitárias a coloração se mostrava mais forte e no caso de *Melipona*, pudemos observar que os núcleos eram correspondentemente menores. Essa condensação do material cromático dentro do núcleo já é conhecida como característica de envelhecimento das células e é assim que aqui a interpretamos.

4. Lipídios. Atribuimos a coloração de alguns pontos, pelo sudan, no interior das células da glândula salivar do tórax de *Melipona*, ao aparecimento das figuras mielínicas observadas ao microscópio eletrônico, e denominadas, por Gabe & Arvy (1961), parassomas. Interpretamos o aparecimento destas estruturas conforme ainda teremos oportunidade de discutir, como sinais de degeneração celular e queremos lembrar aqui que é fato bastante conhecido da microscopia óptica o acúmulo de gordura em células em degeneração.

Na glândula salivar da cabeça de *Melipona*, como era de se esperar, a quantidade de lipídios presentes a julgar pela intensidade de coloração, é bastante grande, mas temos aqui certos pontos que merecem discussão. A secreção destas glândulas, enquanto no interior das células, embora se core pelo sudan black, não se cora, pelo sulfato de azul de nilo, em rosa e nem apresenta fluorescência natural, o que vem a ocorrer mais tarde. Quanto à coloração pelo azul de nilo, esta só ocorre na secreção contida no lúmen da glândula e a coloração em rosa aumenta à medida que a abelha envelhece. No 2.º estágio, apenas algumas gôtas da secreção presente no interior da luz se coram em rosa, ficando o restante da secreção azul, e somente no estágio final tôda a secreção se apresenta rosa. Como sabemos (Harrison & Cain, 1947) a côr rosa dada pelo azul de nilo é indicativa da presença de graxas neutras. A fluorescência natural também só é visível na secreção contida na luz e só aparece a partir do 4.º estágio e, mesmo assim, fraca. Quando tratada por fosfina

3R a glândula se mostra fluorescente desde o 2.º estágio. Estes fatos parecem indicar que a secreção muda de constituição ao chegar à luz da glândula. Embora a microscopia eletrônica tenha revelado que principalmente no 2.º estágio da glândula salivar da cabeça de *Melipona* a cutícula esteja totalmente impregnada por secreção de aspecto lipídico, esta jamais se corou pelo sudan black. Apresentou, isto sim, fluorescência prateada natural, mas esta não pode ser atribuída aos lipídios porque se verificou não só em tôdas as fases da glândula, como também em tôdas as glândulas. Foi mencionado que a cutícula apresenta no seu limite interno uma camada mais densa que poderia ser constituída de lipídios (Locke, 1961), e, então, a estes, poder-se-ia atribuir a fluorescência. Contudo, não estamos muito certos que essa linha corresponda à camada de lipídios do exoesqueleto porque ela se espessa, principalmente, na glândula salivar da cabeça de *Melipona* com o avançar da idade, e também porque em *Xylocopa* e *Colletes* (est. 17 e 22), a parte densa da cutícula aparece justamente formando os reforços em anel. Parece-nos até certo ponto plausível admitir que esta parte densa corresponda à exocutícula, ou seja, à parte em que as proteínas já sofreram processo de curtimento, o que não impede que uma camada de lipídios não evidenciada esteja presente.

Como já frisamos em outra parte dêste trabalho, a intensidade das colorações obtidas nunca foi muito grande e isso pode ser devido tanto ao fato da quantidade do material testado ser reduzido, como a uma possível impropriedade das técnicas empregadas quando aplicadas a tecidos de insetos. No que diz respeito às preparações para microscopia eletrônica verificamos que a contrastação dos tecidos de insetos é sobremaneira difícil embora não saibamos qual a causa. Corantes, para os quais os autores preconizam tratamentos de 15 minutos para obter bom contraste em tecidos de mamíferos, só dão resultados aceitáveis para tecidos de insetos com tratamentos duas ou três vezes mais prolongados aumentando com isso o risco de contaminação. Porisso usamos quase sempre "coloração dupla" com acetato de uranila e um composto de chumbo.

Embora tenhamos dito no início desta parte da discussão que os resultados das reações histoquímicas não se mostraram muito diferentes nas diversas glândulas, não quizemos, com isso, dizer que as diferenças não existam, pelo contrário, achamos que elas devam existir, apenas aconteceu que testamos certos componentes que aparecem basicamente em tôdas as células em maior ou menor quantidade e cuja variação dá uma idéia aproximada do metabolismo celular. Cremos que os resultados teriam sido bem diferentes se nos tivéssemos proposto tentar determinar a composição química da secreção de cada glândula. Neste caso, com certeza, teríamos encontrado variações maiores, tanto isto é verdadeiro que as diferenças maiores encontradas podem ser atribuídas justamente à presença de secreção, ou seja: 1) maior quantidade de proteínas nos dois estágios finais da glândula salivar do tórax de *Melipona*; 2) presença de material PAS positivo no espaço subcuticular e luz dessa mesma glândula nesses mesmos estágios; 3) presença de lipídios em

grande quantidade na glândula salivar da cabeça da mesma abelha; 4) presença de proteínas e lipídios nas células zimogênicas da glândula salivar de *Xylocopa*.

B. Microscopia Eletrônica

A vida das abelhas, especialmente das operárias das espécies sociais, é curta (cêrca de 60 dias) e com etapas bem marcadas pelo tipo de trabalho que desempenham na colônia (a divisão de trabalho em *Melipona quadrifasciata* foi estudada por Kerr & Santos Neto, 1963). O desenvolvimento das glândulas salivares está, segundo supomos, em grande parte, ligado ao comportamento e tipo de atividade desempenhada pela abelha e porisso se desenvolve mais no tempo do que no espaço, isto é, tôdas as células da glândula de abelhas de uma determinada idade se acham no mesmo estágio de desenvolvimento, diferentemente do que ocorre nos vertebrados. Ainda mais, ao que parece, essas glândulas só apresentam durante a vida da operária um ciclo de secreção (Cruz-Landim & Akahira, 1966). No caso das glândulas salivares parece que o seu esgotamento coincide justamente com a fase final da vida do indivíduo. Através da ultraestrutura das células pudemos observar melhor as alterações dos diferentes orgânulos celulares durante o ciclo de secreção, especialmente em *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Porisso, na discussão que se segue, trataremos principalmente desta abelha, só eventualmente nos referindo às demais.

É fácil de verificar pelas figuras, que durante o ciclo de secreção os orgânulos celulares sofrem alterações que dizem respeito principalmente à quantidade, tamanho e localização. Essas modificações são mais acentuadas nas glândulas salivares do tórax que nas da cabeça.

Nas glândulas salivares da cabeça a quantidade de mitocôndrios presentes, bem como seu tamanho e distribuição, permanece a mesma em todos os estágios a não ser pelo aparecimento de mitocôndrios gigantes no 2.º estágio. Já na glândula salivar do tórax os mitocôndrios são a princípio pequenos e distribuídos uniformemente pelas células, mas a partir do 2.º estágio, se localizam principalmente na periferia e ápice da célula deixando a zona central quase livre de sua presença. Especialmente no 3.º estágio os mitocôndrios da parte basal da célula se mostram muito grandes, ricos em cristas e associados com invaginações da membrana plásmica. Os da parte apical da célula conservam-se na base das microvilosidades, enquanto uns poucos se espalham pela célula. Essa mesma associação dos mitocôndrios com invaginações da membrana plásmica, embora em menor escala, ocorre na parte basal das células dos ductos coletores. Como sabemos, essas estruturas são características de regiões responsáveis pela absorção de lipídios e têm sido verificados em vários órgãos dos insetos, como intestino (Forbes, 1964), glândulas salivares (Moericke & Wohlfarth-Bottermann, 1960 e Wohlfarth-Bottermann & Moericke, 1960), ductos das glândulas salivares (Kessel & Beams, 1963), papilas retais (Copeland, 1964), etc., em que receberam o nome de canálculos pinocitóticos. Geralmente, associadas com tais canálculos, encontra-se um grande número de pequenas vesículas as quais se des-

prendem das extremidades dilatadas dessas invaginações. No caso presente não observamos a formação de vesículas nem dilatações das extremidades. O maior desenvolvimento dessas estruturas no 3.^o estágio corresponde com certeza a uma intensificação da absorção de materiais diretamente da hemolinfa, por parte da célula. Wohlfarth-Bottermann & Moericke (1960) e Moericke & Wohlfarth-Bottermann (1960) acreditam que as glândulas salivares de afídeos exercem função de excreção e para tanto têm numerosas invaginações na sua membrana basal. Não está afastada a hipótese de que as glândulas salivares do tórax de *Melipona* e seus ductos exerçam além de outras, também essa função, constituindo uma espécie de glândula sudorípara.

Este mesmo tipo de associação da membrana plásmica invaginada com os mitocôndrios, e até com maior desenvolvimento, encontramos nas células parietais de *Colletes* e *Xylocopa*, estrutura que também se prolonga aos seus ductos coletores.

Não pudemos verificar estruturas semelhantes na zona cortical das glândulas salivares do tórax de *Megachile*, mas notamos logo acima da membrana basal uma zona estriada perpendicularmente à superfície da célula que poderia exercer alguma função na penetração de materiais no interior da célula.

Na glândula salivar da cabeça de *Melipona* esses canais são muito desenvolvidos e aparecem com a mesma amplitude em todos os estágios e contêm no seu interior material denso, granular. Devemos chamar a atenção para o fato de esses canais se apresentarem muito mais conspícuos na fixação com glutaraldeído que em qualquer outra. Não podemos, contudo, concluir que essas estruturas resultem de artefatos, pois Tormey (1964) encontrou grandes diferenças na configuração das membranas celulares do mesmo material, conforme a fixação fôsse em ósmio ou glutaraldeído, parecendo que este último as preserva melhor. No ducto excretor final, intracraniano de *Xylocopa*, e glândula salivar da cabeça de *Megachile*, encontramos também dobras da membrana plásmica formando canais que penetram em toda a região periférica e até mediana das células. Esses canais apresentam paredes densas e são semelhantes aos observados por Bowers (1964) em células pericárdicas de afídeos. Segundo essa autora, tratar-se-ia de estruturas destinadas a microfagocitose, ou mais especificamente, à absorção seletiva de proteínas diretamente da hemolinfa.

A estes canais nunca encontramos associados mitocôndrios, e nem Bowers faz referência a esses orgânulos com função especial ligada aos canais.

O fato das invaginações da membrana plásmica basal da glândula salivar da cabeça de *Megachile* e *Melipona* serem bem semelhantes às do ducto excretor final de *Xylocopa* é um ponto a favor da homologia dessas estruturas.

Na glândula salivar do tórax de *Melipona*, *Xylocopa* e *Colletes* o polo da célula, pelo qual a secreção deve ser eliminada, apresenta numerosas e longas microvilosidades. Inicialmente a presença de microvilosidades foi relacionada com a função de absorção, talvez por terem

estas sido descritas primeiro em células epiteliais do duodeno e do túbulo contornado proximal do rim (Fawcett, 1958). Posteriormente a sua presença foi verificada também em glândulas e justamente na face por onde é eliminada a secreção. Só para citar insetos, microvilosidades no polo secretor de células glandulares foram observadas por Stein (1962), Jacob & Jurand (1963), Beams & Anderson (1961), Phillips & Swift (1965) e Kessel & Beams (1963). Contudo a presença dessa modificação da membrana nunca foi explicada com base na função. Poder-se-ia pensar num aumento da superfície excretora, mas pelo menos no nosso caso e nos que encontramos na literatura, tanto referente a insetos como a outros animais, a secreção é eliminada na base, entre as microvilosidades, sem que estas tomem parte ativa no fenômeno. Na tiróide a secreção é inicialmente eliminada para o interior do folículo, e depois reabsorvida pela célula a fim de ser lançada na circulação. Neste caso seria fácil de explicar a presença de microvilosidades, as quais serviriam para a reabsorção do material no interior do folículo. Kurosumi, em trabalho de 1965a, representa a absorção da secreção por parte das células da tiróide através de canálculos pinocitóticos. A nosso ver a mesma função que as microvilosidades desempenham na tiróide elas desempenham também nas outras glândulas, isto é, uma reabsorção parcial do secretado, talvez água e alguns sais minerais. Pode-se perfeitamente supor que enquanto na luz a secreção possa ser concentrada ou sofrer outras modificações por absorção do excesso de soluto por parte da célula secretora o que resultaria numa economia de água para a célula. Além disso existem algumas evidências de que a secreção na luz da glândula difere um pouco daquela no interior da célula pelo menos assim é quanto à secreção da glândula salivar da cabeça de *Melipona*. Essa função das microvilosidades explicaria o aparecimento em *Xylocopa* de vesículas associadas às microvilosidades semelhantemente ao que ocorre nas regiões de absorção.

— Não observamos eliminação de secreção em *Xylocopa* e *Colletes*, mas verificamos a presença de um espaço subcuticular semelhante ao de *Melipona* também nestas abelhas. Em *Melipona* a secreção é primeiramente eliminada para este espaço por simples dissolução da membrana plásmica apical, extravasando assim o conteúdo das vesículas de secreção (est. 12 e 13) processo que Kurosumi (1965a) denominou eruptócrino ou pinocitose reserva. Posteriormente, a secreção atravessa a cutícula alcançando a luz da glândula.

Não conseguimos perceber na cutícula nenhuma estrutura especial para passagem da secreção. Resta-nos, pois, admitir simplesmente que a cutícula é porosa.

Em *Xylocopa*, a secreção não granular é eliminada inicialmente para o interior de um vacúolo, mas não pudemos relacioná-la com o canálculo intracelular em nossas preparações.

A secreção da glândula salivar da cabeça é eliminada de uma maneira diferente. Nesta glândula não encontramos microvilosidades no polo excretor. Encontramos, por outro lado, invaginações em cujo interior pequenos grânulos esféricos estão presentes, os quais parecem

corresponder à secreção. No interior da célula os grânulos de secreção são 2 ou 3 vezes maiores que os citados acima e mais densos. Embora supondo que se trate do mesmo material, jamais conseguimos observar se aqueles resultam da fragmentação destes e como atravessam a membrana plásmica. Estamos inclinados a admitir que seria pelo mecanismo denominado por Kurosumi, diácrino ou permeação transmembranosa, "transmembranous permeation", isto é, a secreção se difundiria através da membrana invaginada e a função desta invaginação seria simplesmente aumentar a superfície de difusão. Poder-se-ia inquirir porque a secreção aparece no interior da bolsa sob a forma de pequeninas esferas. A secreção, segundo ficou demonstrado, é de natureza lipídica e em meio aquoso tenderia a formar pequenas gotículas, isto é, a se emulsionar. Ao ser eliminada da célula a secreção se vê imediatamente em contacto com a cutícula e se infiltra através dela. Neste caso é possível perceber perfeitamente que se trata de uma infiltração e que esta se dá através dos contatos entre uma camada de deposição e outra, seguindo a secreção uma espiral até chegar à luz. É possível que no caso das glândulas salivares do tórax de *Melipona* e das outras abelhas estudadas o processo de permeação da cutícula seja o mesmo, mas não possa ser observado devido a baixa densidade da secreção naquele caso. Só a marcação com radioisótopos poderia oferecer indicações seguras do processo.

O aparecimento pela primeira vez de secreção na luz, portanto, a possibilidade da abelha utilizar a secreção, ocorre por volta dos 15 dias de idade e corresponde à fase em que a abelha trabalha na colmeia como construtora (Kerr & Santos Neto, 1963). A fase de maior eliminação de secreção corresponde ao início da vida da abelha como campeira, isto é, como forrageira.

Antes de passar adiante, gostaríamos de dizer alguma coisa a respeito da presença de um ducto intercelular em *Xylocopa* e *Colletes*. Achamos que a presença de um tal ducto leva a um aumento da área de eliminação dos produtos das células a qual se torna muito maior do que se houvesse apenas uma luz central.

O retículo endoplasmático não sofre muitas flutuações quanto ao desenvolvimento na glândula salivar da cabeça. Aí a quantidade de ribossomas, o que equivale a dizer a basofilia, se mantém mais ou menos a mesma em todos os estágios, só diminuindo no último. Estes ribossomas nem sempre estão associados às membranas do retículo o qual aparece em grande parte da célula como um retículo liso. Os ribossomas formam então agrupamentos (poliribossomas) que ficam isolados no citoplasma. O retículo liso, segundo consta, está ligado à glicogenólise (Peters & *alii*, 1962) e à síntese de certos lipídios, o que estaria de acordo com a função da glândula. Contudo, em muitas regiões da célula o retículo aparece granular (est. 27 e 28) e neste caso mostra-se formado por vesículas a cuja superfície externa estão aderidos os ribossomas. Esse tipo de retículo aparece mais desenvolvido no 2.º estágio desta glândula, mas qual a causa desse maior desenvolvimento não podemos precisar. Não pudemos associar a secreção, nem no retículo liso, nem ao granuloso, e como já dissemos o Golgi é pouco desenvolvido nesta

glândula só aparecendo no primeiro estágio, com sua forma típica. Entre o primeiro e segundo estágios decorrem 3 a 5 dias e nesse intervalo praticamente toda a secreção da glândula é produzida, tendo nos escapado o processo de sua elaboração. Duas estruturas aparecem, que provavelmente estão ligadas à sua produção: 1) vesículas cheias de diminutos grânulos (est. 27); 2) mitocôndrios gigantes (est. 29 e 30), contudo, não pudemos encontrar o elo entre essas formações. Talvez as vesículas cheias com pequenos grânulos possam ser equiparadas aos corpos multivesiculares de Sotelo & Porter (1959), os quais, segundo Kurosumi (1965b), têm origem a partir de Golgi. Várias são as indicações de que os mitocôndrios possam tomar parte na secreção de lipídios (Berger, 1965; Kawabata, 1964; Yasuda & *alii*, 1962), mas somente o primeiro autor conseguiu demonstrar a sequência de acumulação dos lipídios no interior dos mitocôndrios; Berger (1965) verificou que a matriz mitocondrial praticamente se transformava em material lipídico pelo acúmulo do produto secretado. Os outros dois autores, apesar de terem observado transformações significativas dos mitocôndrios, não puderam correlacioná-las com a produção de secreção. O mesmo se verificou conosco, pois justamente na fase de maior acúmulo de secreção no citoplasma, encontramos os chamados mitocôndrios gigantes os quais são mitocôndrios anormais, contendo no interior uma matriz pouco densa e restos das cristas (est. 29). Não conseguimos, contudo, verificar a quebra ou a descarga da matriz desses mitocôndrios. Somente uma vez (est. 30) observamos um mitocôndrio que afinal era de tamanho intermediário, com a membrana aparentemente interrompida, mas esta observação não pôde ser confirmada por maior número de achados semelhantes.

Em preparações obtidas de material fixado com glutaraldeído encontramos grânulos muito densos no interior dos mitocôndrios. Contudo a presença desses grânulos na matriz já foi verificada em várias circunstâncias e aparece também nas glândulas salivares do tórax.

Na glândula salivar do tórax o desenvolvimento do retículo alcança o máximo no terceiro estágio e se constitui num ergastoplasma típico, isto é, um retículo do tipo granular. Nesta fase o retículo aparece dilatado em certas regiões, mas o material no interior das lamelas é sempre de baixa densidade. Essas dilatações ou vesículas se desprendem do retículo na proximidade do Golgi (est. 10) e têm paredes lisas. Caracteristicamente a face do retículo em contato com a área de Golgi se apresenta livre de ribossomas (est. 10). Muitas vezes essas extremidades lisas do retículo fazem saliências de encontro a massas de secreção próximas à área de Golgi, dando a impressão que mais material está sendo adicionado ao já existente, vindo do interior das lamelas do retículo. Nesta fase o Golgi caracteristicamente apresenta duas zonas: uma zona central constituída por vesículas grandes e lamelas dilatadas, ambas cheias de material pouco denso (esta região é a que está em contato mais direto com o retículo); e uma zona periférica constituída de numerosas vesículas pequenas cheias de material mais denso. Esta disposição dá justamente a idéia do descrito por Zeigel & Dalton (1962) e Kurosumi (1965b), em vários tipos de células que secretam material

protéico. Segundo Kurosumi, neste caso há um transporte da substância secretada, imatura, do lugar inicial de síntese, ou seja, do ergastoplasma para o lugar de condensação (Golgi) por brotamento do retículo e movimento das vesículas. Exatamente o que acabamos de descrever, isto é, as vesículas da região interna da área do Golgi se originam do ergastoplasma por brotamentos de extremidades de superfície lisa e fundem-se com os sacos de Golgi, saindo depois em uma direção reversa como secreção amadurecida.

Na glândula salivar do tórax as células são inicialmente baixas e deixam, entre si e a cutícula, um grande espaço subcuticular. Com o aparecimento de secreção na parte apical da célula, esta tende a aumentar em altura (semelhantemente ao que acontece em certas glândulas dos vertebrados) aproximando-se o seu ápice da cutícula. A eliminação da secreção não provoca volta à altura primitiva.

Nas outras glândulas estudadas estas feições do ciclo celular não puderam ser observados porque estudamos indivíduos de uma idade só, mas tudo leva a crer que ocorrem coisas similares. Em *Xylocopa* não pudemos observar o Golgi, mas nas células zimogênicas pôde se observar regiões onde o retículo se dispõe radialmente (est. 17) com aparente brotamento de pequenas vesículas para o espaço central o qual acaba transformado num grande vacúolo. Neste caso a elaboração da secreção parece requerer maior gasto de energia por parte da célula porque encontramos grande quantidade de mitocôndrios envolvidos nas dobras do retículo. Para a produção de secreção dêsse tipo, provávelmente o Golgi deixa de ser necessário.

Um fato que chama atenção no caso de *Xylocopa*, é a diversidade de secreção que aparece também sob a forma de grânulos. Não pudemos acompanhar a sua elaboração, mas achamos que se trata realmente de produtos diferentes e não de diferentes estágios de amadurecimento de um mesmo produto. Atribuímos, arbitrariamente, apenas baseados no aspecto, aos grânulos S3 e S4 natureza protéica e aos S1, S2 e S5 natureza lipídica. Os grânulos S2 se não são inteiramente lipídicos contêm no seu interior material lipídico, o que se comprova pelo fato de que ao romper-se sua membrana, deixam sôltas no citoplasma gotas dêsse material fibrilar que se parece muito com os chamados filamentos de cêra, verificados por Locke (1961), em células da glândula de cêra de *Apis*. É interessante chamar atenção para o fato de que gotas lipídicas de cafeeiro (Kitajima — informação verbal) apresentam conformação semelhante. Atribuímos a grande variedade de secreção aos hábitos desta abelha. Como é sabido, *Xylocopa* é capaz de fazer buracos na madeira e provávelmente a secreção salivar contêm enzimas que auxiliam êste trabalho. Um fato a favor desta nossa assertiva é que *Colletes* tendo a glândula morfológicamente parecida, mas não tendo os mesmos hábitos, não apresentam tão grande variedade de secreção.

Tendo eliminado a secreção as células começam a apresentar sinais de degeneração, ou seja, autodigestão de alguns componentes celulares especialmente do retículo e mitocôndrios. Nesta fase aparecem orgânulos em forma de impressão digital, formados por arranjos concêntricos de membranas lisas, estruturas a que denominamos parassomas (Gabe &

Arvy, 1961). Os parassomas começam a aparecer na glândula salivar do tórax de *Melipona* a partir do 4.º estágio e na glândula salivar da cabeça do 3.º em diante. Na glândula salivar do tórax a forma destes orgânulos é mais típica, melhor definida porque as lamelas se apõem bem próximas umas das outras formando um conjunto muito denso no interior do qual dificilmente podemos perceber alguma coisa. Já na glândula salivar da cabeça as lamelas se dispõem frouxamente e é possível perceber no seu interior fragmentos do retículo vacuolizado e mitocôndrios (est. 32 e 33), como também a sua continuidade com o restante do retículo da célula. Nesta glândula essas estruturas apresentam uma variedade muito grande de conformações em que muitas vezes está envolvida uma grande parte do citoplasma da célula. Hagenau (1958) considera estruturas semelhantes aos parassomas como partes do retículo endoplasmático e atribui-lhes um papel na formação do ergastoplasma. Contudo, existem na literatura muitas indicações de que estas formações se devem a um processo de degeneração da célula, embora nem sempre irreversível, até pelo contrário, quase sempre reversível. O aparecimento dos parassomas envolvendo mitocôndrios, não pode ser olhado como uma mudança específica para um determinado acontecimento celular, como por exemplo, fim de um ciclo de secreção. O fenômeno foi observado por Forbes (1964) e Kurosumi & *alii*, (1962) em células glandulares normais, de inseto e de mamífero, respectivamente, mostrando que a ocorrência de parassomas nas glândulas após a eliminação da secreção é universal. Mas a primeira descrição desse orgânulo, se assim se pode chamá-lo, é de Farquhar & Rinehart (1954) que notaram a sua presença, como estrutura patológica na pituitária de ratos castrados. Mais recentemente, muitos autores têm feito constatações idênticas em diferentes circunstâncias. Ito (1962) estudando a estabilidade dos componentes membranosos das células após a morte, chegou à conclusão que o primeiro sinal de degeneração do ergastoplasma é o aparecimento de estruturas semelhantes às figuras mielínicas. Enders & Lyons (1964) encontraram essas mesmas estruturas com a diferença de que os arranjos concêntricos, aparentemente, se formam, principalmente, a partir dos mitocôndrios que se alongam e encurvam dispondo-se suas cristas longitudinalmente (também a partir do retículo em certos pontos), em células luteínicas de ratos hipofisectomizados. Finalmente Schaffner & Felig (1965) constataram sua presença em células do fígado de ratos colocados em atmosfera de oxigênio puro, e Montenegro & *alii* (no prelo) observaram o aparecimento de estruturas semelhantes em tecido foliar de plantas de fumo infestadas por uma estirpe do vírus γ da batatinha. Do descrito podemos concluir que apesar dos parassomas apresentarem configurações levemente diferentes de célula para célula e talvez até diferentes origens, a sua presença parece indicar sempre uma reação da célula a uma condição desfavorável.

Não se conhece o papel dos mitocôndrios na formação dos parassomas como foi verificado por nós na glândula salivar da cabeça, Enders & Lyons (1964) e Schaffner & Felig (1965). Eles podem tanto estar fornecendo energia para processos bioquímicos que ocorram ao nível dos parassomas como estarem sofrendo uma transformação degenerativa.

Os parassomas não são as únicas estruturas nas células velhas das glândulas das abelhas. Aparecem também orgânulos parecidos com os lisossomas tanto nas salivares do tórax como nas da cabeça, embora sejam mais numerosos na salivar da cabeça.

Na salivar da cabeça os lisossomas aparecem praticamente só no último estágio, enquanto na do tórax aparecem em grande quantidade desde o penúltimo. Na glândula salivar da cabeça, o que chamamos de lisossomas no 4.º estágio, difere um pouco das estruturas, às quais atribuímos a mesma designação no 3.º estágio. E ainda mais, neste último estágio, em alguns pontos, parassomas pequenos se confundem com os lisossomas ou arranjos concêntricos das lamelas que ocorrem ao redor de lisossomas. Há de fato uma variedade grande de orgânulos que recebem o nome de lisossomas, o mesmo ocorrendo com os parassomas, daí uma certa confusão. No entanto, estamos quase certos que as estruturas presentes no 3.º estágio são realmente lisossomas. Quanto às do 4.º, poderia tratar-se de secreção lipídica diferente da presente no 2.º e 3.º estágios da glândula, ainda mais, porque de preferência êsses corpúsculos densos se localizavam na parte apical da célula. Somente testes histoquímicos poderiam indicar mais seguramente se se tratam ou não de lisossomas.

As demais glândulas estudadas não apresentaram nem parassomas nem lisossomas o que indica que suas células se encontravam ainda numa fase correspondente mais ou menos ao terceiro estágio das glândulas salivares de *Melipona*. Como já dissemos, essas abelhas foram coletadas em flôres enquanto se alimentavam, portanto, enquanto desempenhavam atividade análoga à das operárias de *Melipona* com 20 e 25 dias de idade (Kerr & Santos Neto, 1963).

Apesar disso as células das glândulas de *Melipona* nessas idades se acham mais avançadas no ciclo secretor das abelhas solitárias e ainda mais as operárias com a idade citada estão apenas iniciando a sua atividade de campeiras. Podemos interpretar essas discrepâncias atribuindo às abelhas solitárias um período de produção de secreção muito mais prolongado, ou considerando que por acaso tôdas as abelhas coletadas eram jovens. As operárias das abelhas sociais não precisam desde o início sair para a coleta de alimento, desde que elas o têm estocado na colônia, e que outras abelhas mais idosas o coletam para tôda comunidade. Já no caso das abelhas solitárias, desde a sua emergência o adulto deverá cuidar da sua sobrevivência, sendo portanto plausível encontrar-se abelhas jovens visitando flôres. As duas hipóteses apresentadas acima não são exclusivas, mas antes se completam.

Segundo Simpson (1960 e 1962) a secreção produzida pelas glândulas salivares (especialmente a do tórax) de *Apis* funciona primeiramente como um soluto para a cêra (o que está de acôrdo com o que observamos quanto ao início da eliminação do produto), e posteriormente como soluto para os açúcares a serem ingeridos. Outros autores atribuem funções semelhantes às glândulas homólogas de outras abelhas e outros insetos. Ao admitir esta mesma função para as glândulas de *Melipona*, o que cremos ser razoável, surpeende-nos o fato de que o esvaziamento da célula da secreção coincida justamente com o início da atividade da abelha, tanto mais que estas glândulas não têm um reservatório onde a

secreção possa ser armazenada (apenas uma pequena bolsa achatada, intracraniana no ponto de junção dos ductos das glândulas salivares do tórax com o das glândulas salivares da cabeça, verdadeiro relicto do ducto achatado das abelhas solitárias, com pequeníssima capacidade de armazenar secreção). Simpson demonstrou em *Apis* que as outras glândulas do sistema salivar não colaboram nesta atividade. Só poderíamos, então, explicar esse fenômeno admitindo que as abelhas sociais não têm grande necessidade de dissolver os açúcares para ingestão, porque alimentando-se de nectar, já os encontram dissolvidos ou que as glândulas apresentem depois deste um novo ciclo de secreção.

A ocorrência de um novo ciclo de secreção é um pouco difícil de admitir porque as abelhas correspondentes ao 5.^o estágio não tinham realmente idade certa, tinham apenas mais de 25 dias e foram coletadas enquanto voavam fora da colônia. Estas abelhas tanto poderiam ter 25 como 30 ou 50 dias. Nós fixamos e examinamos para este estudo materiais de mais de 5 abelhas diferentes em cada estágio e seria muita coincidência que todas tivessem a mesma idade exatamente. No entanto, em nenhuma delas encontramos qualquer indício de uma retomada do ciclo secretor. Além do mais, seria estranho, no caso de haver outro ciclo, que todas as células se achassem no mesmo estágio na glândula de maneira a provocar um colapso total na produção de secreção durante um período longo (o ciclo de secreção dura 25 dias, talvez mais) e justamente no período da vida em que aparentemente a abelha precisaria mais do material. Inclina-mos, portanto, à primeira hipótese, isto é, que as abelhas sociais não necessitem da secreção das glândulas salivares para dissolver os alimentos a serem ingeridos.

Quanto à proposição que fizemos na introdução, de procurar inferir da estrutura a origem comum destas glândulas, constatamos que, embora seja certo que todas elas derivam embriologicamente de uma invaginação do segmento labial do embrião (Nelson, 1915) a sua morfologia é muito diferente. O problema da derivação de um tipo para outro não é tão complexo quando consideramos as glândulas salivares da cabeça. Entre elas se não há analogia de estruturas, o que é difícil de dizer visto a precariedade das nossas preparações, pelo menos parece evidente que em ambos os casos e até no ducto de *Xylocopa* o produto de secreção que aparece em maior quantidade é lipídico e que as invaginações da membrana plásmica basal são semelhantes entre si e diferentes das do tórax. As glândulas salivares do tórax de *Colletes*, *Xylocopa* e *Melipona* também apresentam analogia. *Colletes* é destas abelhas a mais primitiva e é fácil de aceitar que as glândulas de *Xylocopa* evolutivamente poderiam se originar de glândulas do tipo apresentado por *Colletes* por redução do número de células zimogênicas. As células parietais dessas glândulas parecem estar encarregadas da absorção dos elementos necessários ao funcionamento da glândula a partir da hemolinfa tal é o desenvolvimento das invaginações presentes na zona cortical destas células enquanto as células zimogênicas parecem ser responsáveis pela secreção, pelo menos a julgar pelo acúmulo desta no seu interior. As células parietais acompanham o ducto do túbulo secretor quando este abandona a célula formando sua parede. Em *Melipona* as células parietais se desenvolveram mais e passaram a executar a sua função. O ducto intercelular de

Xylocopa e *Colletes* passou a constituir a luz do túbulo secretor e as microvilosidades presentes nessas abelhas continuaram em tórno dessa luz como estavam em tórno do ducto intercelular. O desaparecimento das células zimogênicas talvez corresponda a uma simplificação das funções dessa glândula nos apídeos. Nas abelhas solitárias, segundo Heselhaus (1922), sua secreção é usada na construção do ninho e na alimentação. Não queremos, contudo, dar idéia de que a evolução ocorrida nas abelhas quanto a essas glândulas foi assim tão simples e ortogenética. *Colletes* pertence ao grupo das abelhas consideradas mais primitivas e parece não ter dado origem às abelhas que lhe são superiores (Moure, informação verbal) e além disso está muito distante dos Anthophoridae com vários grupos de permeio (Halictidae, Andrenidae e Megachilidae). Contudo, na base do grupo Anthophoridae, encontramos os Exomalopsini, que têm glândulas semelhantes às dos Colletidae

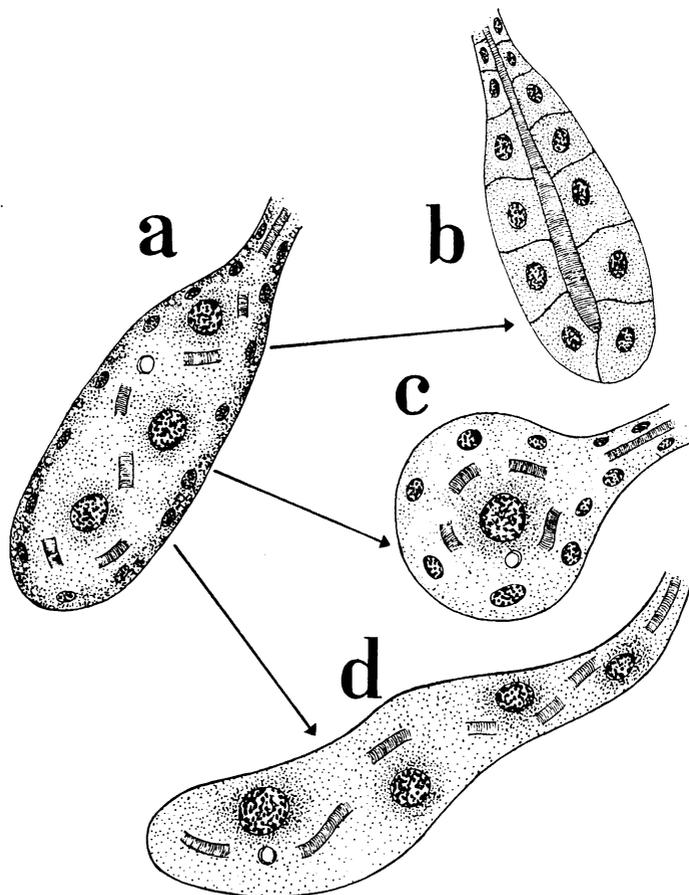


Fig. 4: Provável derivação das glândulas salivares do tórax das abelhas: a, glândula encontrada em *Colletes*; b, glândula encontrada em *Melipona*; c, glândula encontrada em *Xylocopa*; d, glândula encontrada em *Megachile*.

(Cruz-Landim, 1963) e poderiam ter originado as glândulas do tipo encontrado em *Xylocopa* e também o encontrado nos Apidae (est. 39).

Os Megachilidae constituem em todos os sentidos um grupo à parte dentro das abelhas, e também no que se refere às glândulas salivares do tórax, parecendo no entanto, que neste caso as células que desapareceram foram as parietais, ficando as zimogênicas colocadas excêntricamente em relação ao ducto (est. 39).

CONCLUSÕES

Quanto aos quatro pontos que nos propusemos elucidar no início deste trabalho, os resultados obtidos no decorrer do mesmo nos permitem concluir que:

1. A secreção é eliminada da célula através da cutícula sem que, contudo, esta apresente qualquer estrutura especial para isso. A secreção é eliminada por infiltração entre as camadas da cutícula, e o fenômeno só se torna bem visível quando a secreção apresenta natureza e densidade apropriadas. Sugerimos ainda que as microvilosidades no polo secretor das células poderiam servir para a reabsorção de parte do soluto eliminado com os produtos elaborados pela célula, resultando em economia de água para o organismo.

2. As glândulas salivares do tórax estudadas são histologicamente bem diferentes mesmo ao nível do microscópio eletrônico, mas podemos admitir que uma glândula salivar do tipo encontrado em *Colletes* poderia originar, de um lado, o tipo glandular de *Xylocopa*, de outro, o tipo de *Megachile*, e de outro, o de *Melipona*. No primeiro caso tratar-se-ia apenas de uma redução do número das células zimogênicas. No 2.º caso tratar-se-ia de um desaparecimento das células parietais, ficando, a luz da glândula, excêntrica, porque o canalículo intercelular das glândulas tipo *Colletes* contorna as células parietais (est. 4). E no 3.º caso desapareceriam as células zimogênicas ficando as células secretoras.

3. A morfologia das células secretoras difere um pouco do comum pela ausência do Golgi. Somente as células da glândula salivar de *Melipona* apresentaram esse orgânulo celular bem desenvolvido como é geral nos tecidos glandulares. Poderíamos contudo atribuir a ausência do Golgi nas glândulas salivares de *Xylocopa*, *Megachile* e *Colletes*, ao fato do tipo de secreção e maneira de produção não requererem o uso desse orgânulo celular ou a estas células se acharem num estágio mais avançado do que aquele em que esse orgânulo se faz visível em *Melipona*. Já a evolução dos demais orgânulos durante o ciclo secretor foi o esperado, isto é, o desenvolvimento maior do retículo precedeu o aparecimento da secreção, a presença de mitocôndrios maiores ou mais numerosos coincidiu com o aumento da necessidade de energia por parte da célula e o aparecimento de lisossomas e parassomas com o fim do ciclo secretor.

4. A natureza da secreção da glândula salivar do tórax de *Melipona* é provavelmente protéica a julgar-se pela intensificação da coloração com a ninhidrina-Schiff no 4.º estágio, e pela maneira como é secretada e eliminada da célula. A secreção da glândula salivar da cabeça de

Melipona bem como de *Megachile* e do ducto excretor final de *Xylocopa* é de natureza lipídica. Não houve grandes diferenças de glândula para glândula, quanto aos componentes histoquímicos básicos. As diferenças maiores foram justamente quanto à intensidade da reação ao teste para proteínas e lipídios. *Xylocopa* parece produzir diferentes tipos de secreção em sua célula zimogênica.

Além destas conclusões principais, os resultados parecem ter deixado claro que:

1. Provavelmente há um só ciclo de secreção nas glândulas salivares de *Melipona* durante a vida da operária, o qual dura, aproximadamente, 25 dias.

2. O período, no qual uma *Melipona* tem secreção à disposição, se inicia ao redor dos 10 a 15 dias de idade, e, provavelmente, não dura muito mais que uns 20 dias.

3. Nas abelhas solitárias provavelmente o período de secreção (produção e eliminação) é mais longo, se iniciando mais cedo e terminando mais tarde.

4. A presença de glicogênio no primeiro estágio da glândula salivar da cabeça e do tórax de *Melipona* não parece desempenhar nenhuma função no processo secretor da célula, mas pode ser um resto de material embrionário presente no adulto recém-emergido.

RESUMO

As abelhas apresentaram quatro tipos diferentes de glândulas salivares, as quais foram estudadas do ponto de vista histoquímico e ultraestrutural. Procurou-se com o emprêgo das técnicas histoquímicas clássicas determinar variações no conteúdo de proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídios durante o ciclo secretor. Estudou-se a ultraestrutura para analisar as modificações dos orgânulos celulares durante a elaboração e eliminação da secreção.

Os resultados obtidos demonstraram que tôdas as glândulas apresentam os componentes químicos acima referidos mas que a sua quantidade varia bastante de glândula para glândula e de estágio para estágio de uma glândula. A diferença no conteúdo de proteínas e lipídios existente entre a glândula salivar do tórax e da cabeça de *Melipona* foi atribuída à secreção (protéica no primeiro caso, e lipídica no segundo). O glicogênio só apareceu em glândulas de animais bem jovens e foi considerado como provável resquício de material embrionário.

A microscopia eletrônica revelou que os orgânulos celulares evoluem na célula durante o ciclo secretor de maneira semelhante ao já preconizado por vários autores para células com essa função. Em *Xylocopa* e *Colletes* o aparelho de Golgi não foi visto e atribuímos êste fato à maneira pela qual a secreção é produzida, acumulando-se uma parte dela dentro de vacúolos.

Os resultados permitiram ainda aventar com certa base morfológica a derivação das glândulas salivares do tórax dos tipos 1, 2 e 3 a partir do tipo 4. O tipo 1 teria se originado por desaparecimento das células

centrais (zimogênicas). O tipo 2 por redução do número de células zimogênicas. O tipo 3 por desaparecimento das células periféricas (parietais).

AGRADECIMENTOS

Tendo êste trabalho recebido auxílio de várias instituições, não podemos deixar de fazer constar essa colaboração. A pesquisa foi executada nos laboratórios do Departamento de Biologia Geral da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Universidade de Campinas, e na Secção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas. Contou com a colaboração da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisas, Organização dos Estados Americanos e Fundação Rockefeller.

Desejamos ainda agradecer ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, mestre por excelência, que com suas críticas e sugestões, tanto contribuiu para minha formação científica. Ao Eng.º Agrônomo Elliot Watanabe Kitajima, cuja experiência no campo da microscopia eletrônica, posta ao meu dispôr, foi de grande valia no desenvolvimento dêste trabalho e interpretação dos resultados. Ao Dr. Álvaro Santos Costa, por me permitir usar o Laboratório de Microscopia Eletrônica da Secção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas. Ao Prof. Pe. Jesus Santiago Moure, C. M. F., pela classificação dos espécimens usados. Aos meus colegas do Departamento de Biologia Geral, pelo incentivo e colaboração que deram à consecução desta tese. Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral pela colaboração técnica constante e eficiente. Muito especialmente ao Prof. Dr. Antônio Buschinelli, Chefe do Departamento de Biologia Geral desta Faculdade, que tudo fêz para possibilitar e facilitar o meu trabalho.

REFERÊNCIAS

- BEAMS, H. W. & E. ANDERSON
1957: Light and Electron microscope studies on the striated border of the intestinal cells of insects. *J. Morph.* 100 (3): 601-619.
1961: Fine structure of "Intracellular Ductules" in certain glands of the carabid beetle. *Ibidem* 109 (2): 159-171.
- BEAMS, H. W. & R. L. KING
1932: The architecture of the parietal cells of the salivary glands of the grasshopper with special reference to the intracellular canaliculus, Golgi bodies, and mitochondria. *Ibidem* 53 (2): 223-241.
- BEAMS, H. W., T. N. TAHMISIAN, E. ANDERSON & R. L. DEVINE
1959: An Electron microscope study on the pharyngeal glands of the honeybee. *J. Ultrastruct. Res.* 3: 155-170.
- BERGER, E. R.
1965: On the Mitochondrial origin of Oil drops in the double cone inner segments. *Ibidem* 14: 143-157.
- BORDAS, M. L.
1959: Appareil glandulaire de Hyménoptères. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 19: 1-362.
- BOWERS, B.
1964: Coated Vesicles in the Pericardial Cells of the Aphid (*Mysus persicae* Sulz). *Protoplasma* 2: 351-367.
- BUTLER, C. G.
1956: Some further observations on the nature of "queen substance" and of its role in the organization of a honeybee (*Apis mellifera* L.) communication. *Proc. R. Ent. Soc. London (A)* 31: 12-15.
- BUTLER, C. G., R. K. CALLOW & N. C. JOHNSTON
1959: Extration, purification of "queen substance" from queen bees. *Nature, London*, 184: 1871.
- COPELAND, E.
1964: A Mitochondrial pump in the cells of anal papillae of mosquito larvae. *J. Cell Biol.* 23: 253-263.
- CRUZ-LANDIM, C.
1963: Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. Tese de Doutorado. 91 páginas.
1965: Salivary gland System of Bees (Hymenoptera, Apoidea) and the Evolution of the group. (Não publicado).
1967: Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. *Arq. Zool. S. Paulo* 15 (3): 177-290, 96 figs., 9 ests.

- CRUZ-LANDIM, C., A. C. STORT, M. A. CRUZ & E. W. KITAJIMA
1965: Órgão tibial dos machos de Euglossini. Estudo ao Microscópio Óptico e Eletrônico. *Rev. Brasil. Biol.* 25 (4): 323-342.
- CRUZ-LANDIM, C. & F. R. PUGA
1966: Presença de Substâncias Lipídicas nas Glândulas do Sistema Salivar de Operárias de *Trigona* (Hym. Apoidea). *Papéis Avulsos Zool. S. Paulo* 20 (7): 65-74.
- CRUZ-LANDIM, C. & Y. AKAHIRA
1966: Influência da Alimentação no Desenvolvimento de algumas Glândulas de *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Papéis Avulsos Dep. Zool. S. Paulo* 19: 63-78.
- ENDERS, A. C. & W. R. LYONS
1964: Observations on the Fine Structure of Lutein Cells. II. The Effects of Hypophysectomy and Mammotrophic Hormons on the Rat. *J. Cell Biol.* 22 (1): 127-141.
- FARQUHAR, M. G. & J. F. RINEHART
1954: Electron Microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate cats. *Endocrinol.* 54: 516-541.
- FAWCETT, D. W.
1958: *Structural specialization of the cells surface. In Frontiers in Cytology.* S. L. Palay ed. New Haven: Yale University Press.
- FEDER, N. & M. K. WOLF
1965: Studies on Nucleic Acid Metachromasy. II. Metachromatic and Orthochromatic Staining by Toluidine-Blue of Nucleic Acids in Tissue Sections. *J. Cell. Biol.* 27 (2): 327-336.
- FORBES, A. R.
1964: The Morphology, Histology and Fine Structure of the Gut of the Green Peach Aphid, *Myzus persicae* Sulz (Homoptera, Aphidae). *Mem. Entomol. Soc. Canada* 36: 3-75.
- GABE, M. & L. ARVY
1961: *Gland cells. In V. J. Brachet & A. E. Mirsky, Ed., The cell* 5: 1-88. Academic Press, N. York.
- GROSS, B. G.
1966: Annulate Lamellae in the Axillary apocrine glands of Adult Man. *J. Ultrastruct. Res.* 14: 64-73.
- HARRISON, G. A.
1966: Some Observations on the presence of Annulate Lamellae in Alligator and Sea Gull Adrenal Cortical Cells. *Ibidem* 14: 158-166.
- HARRISON, R. G. & A. J. CAIN
1947: Variations in the distribution of lipoids in the adrenal cortex of the albino rat. *J. Anat.* 81 (3): 286-299.
- HAGUENAU, F.
1958: The ergastoplasm: its history, ultrastructure and biochemistry. *Int. Rev. Cytol.* 7: 425-483.
- IGLESENT, H.
1940: Zymotic function of the pharyngeal, thoracic and postcerebral glands of *Apis mellifera*. *Biochem. J.* 34: 1415-1418.
- IMMS, A. D.
1957: *A General Textbook of Entomology.* 894 pp. Methuen & Co. Ltd., London.

ITO, S.

- 1962: Light and Electron Microscopic Study of Membranous Cytoplasmic Organelles. *Symposia of the International Society for Cell Biol. I.* The Interpretation of Ultrastructure, 129-148 pp. Academic Press, New York and London.

JACOB, J. & A. JURAND

- 1963: Electron Microscope Studies on Salivary Gland Cells of *Bradysia mycorum* Frey (Sciaridae). III. The Structure of Cytoplasm. *J. Ins. Physiol.* 9: 849-857.

KAWABATA, I.

- 1964: Electron Microscope Studies on the Human Ceruminous Gland. *Arch. Histol. Jap.* 25 (2): 165-187.

KESSEL, R. G. & H. W. BEAMS

- 1963: Electron Microscope Observations on the Salivary Gland of the Cockroach, *Periplaneta americana*. *Z. Zellforsch.* 59: 857-877.

KERR, W. E. & C. C. CRUZ

- 1961: Funções Diferentes Tomadas pela Glândula Mandibular na Evolução das Abelhas em Geral e em *Trigona (Scaptotrigona) postica* em especial. *Rev. Brasil. Biol.* 21 (1): 1-16.

KERR, W. E. & G. SANTOS NETO

- 1963: Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. V. Divisão de trabalho entre operária de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep. *Insectes Sociaux* 3 (3): 423-430.

KRATKY, E.

- 1931: Morphologie und Physiologie der Drüsen in Kopf und Thorax der Honigbiene. *Z. wiss. Zool.* 139: 120-200.

KUROSUMI, K.

- 1965a: Electron Microscopic Studies on the Morphology of Secretion. *J. Electron Microscopy* 14 (1): 12-26.
 1965b: Golgi Apparatus and its Derivatives, with Special reference to Secretory Granules. In "Intracellular Membranous Structure", 259-276 pp. S. Seno & E. V. Cowdry Ed.

KUROSUMI, K., Y. KOBAYASHI & S. SATO

- 1962: Concentric Lamellar Arrangement of Smooth-Surfaced Endoplasmic Reticulum Found in Some Gland Cells. *Arch. Histol. Jap.* 23 (2): 113-122.

LISON, L.

- 1960: *Histochimie et Cytochimies Animales. Principes et Méthodes* 12: 842. Gauthier-Villars Ed. Paris.

LOCKE, M.

- 1961: Pore Canals and Related Structure in Insect Cuticle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10 (4): 589-618.
 1965: The Structure of septate desmosome. *J. Cell. Biol.* 25: 166-169.

LUFT, J.

- 1961: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414.

MCALEAR, J. H.

- 1962: The question of the organization of substance on cellular membranes. *Ann. Histochim. Suppl.* 2: 261-276.

MILLONIG, G.

1961: A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Cell. Biol.* 11: 736-739.

1964: Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In "From molecule to cell". *Symposium in Electron Microscopy*, 347-362 pp. Ed. P. Buffa Roma.

MGERICKE, V. & K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN

1960: Zur funktionellen Morphologie der Hauptdrüse von *Mysus persicae* Sulz, Aphididae. *Z. Zellforsch.* 51: 157-184.

MONTENEGRO, M. J., E. W. KITAJIMA & A. S. COSTA

Microscopia eletrônica de tecidos foliares infectados por diferentes estirpes do virus Y da batata. *Bragantia* (no prelo).

NELSON, J. A.

1915: *The Embriology of the Honey Bee*, 3: 282 pp. Princeton, Princ. Univ. Press.

PALADE, G. E.

1952: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95: 285-298.

PALAY, S. L.

1958: *The Morphology of secretion*. In *Frontiers in Cytology*, 305-342 pp. S. L. Palay, Ed. New Haven, Yale Univ. Press.

PATEL, N. G., M. H. HAYDAK & T. A. GOCHNAWER

1960: Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*, London, 186 (4725): 633-634.

PEARSE, A. G. E.

1961: *Histochemistry Theoretical and Applied*. X + 998 pp. J. & A. Churchill Ltd., London.

PETERS, V. B., H. M. DEMBITZER, G. W. KELLY & E. BARUCH

1962: *Ergastoplasmic changes Associated with Glycogenolysis. Fifth International Congress of Electron Microscopy*. Acad. Press Inc., N. York, N. Y.

PHILLIPS, D. M. & H. SWIFT

1965: Cytoplasmic Fine Structure of *Sciara* Salivary Glands. I. Secretion. *J. Cell Biol.* 27 (2): 395-409.

REYNOLDS, E. S.

1963: The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *Ibidem* 17: 208.

SABATINI, D. D., K. BENSCH & R. J. BARNETT

1963: Cytochemistry and Electron-microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Ibidem* 17: 19-58.

SCHAFFNER, F. & P. FELIG

1965: Changes in Hepatic Structure in Rats Produced by Breathing Pure Oxygen. *Ibidem* 27 (3): 505-517.

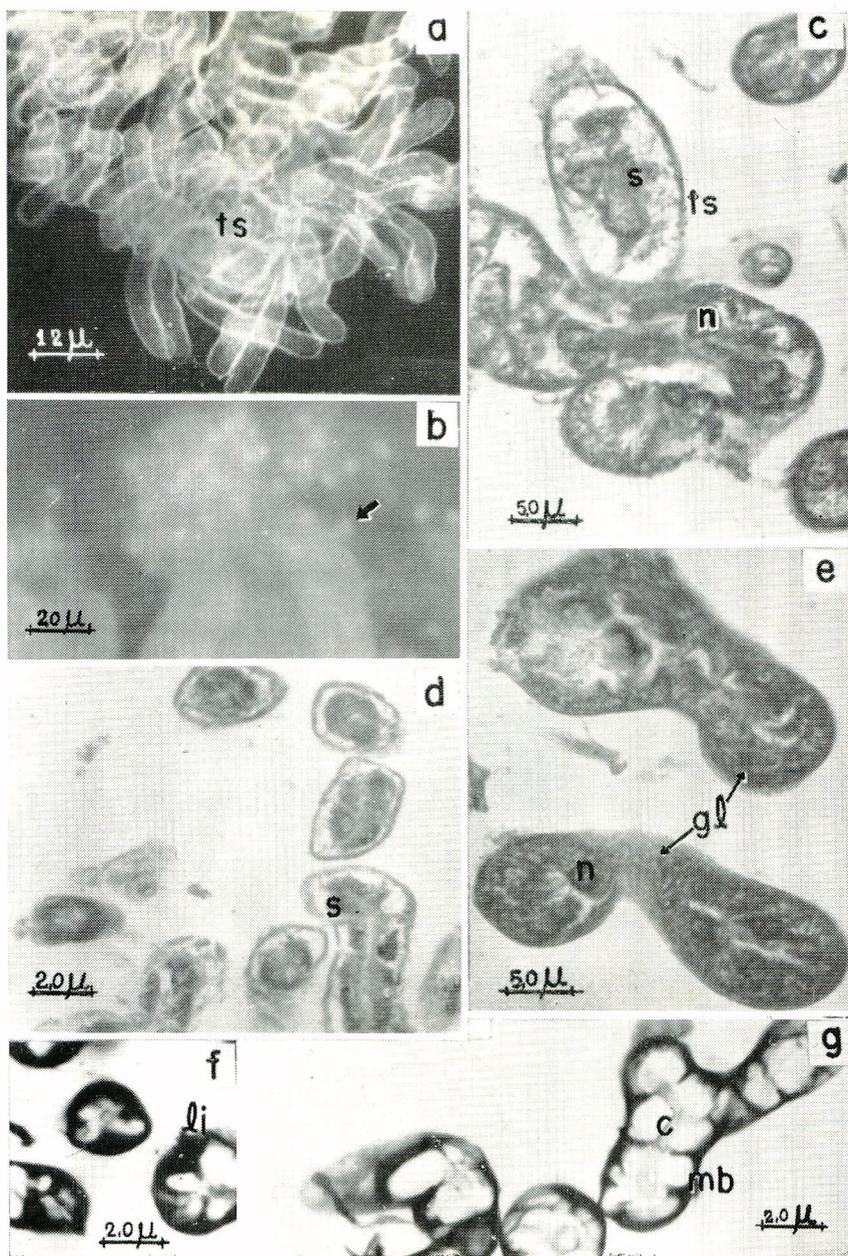
SCHIEMENZ, P.

1883: Über das Herkommen des Futtersaftes und Speicheldrüsen der Biene nebst einem Anhang über das Riechorgan. *Z. wiss. Zool.* 38: 71-135, pls. 5-7.

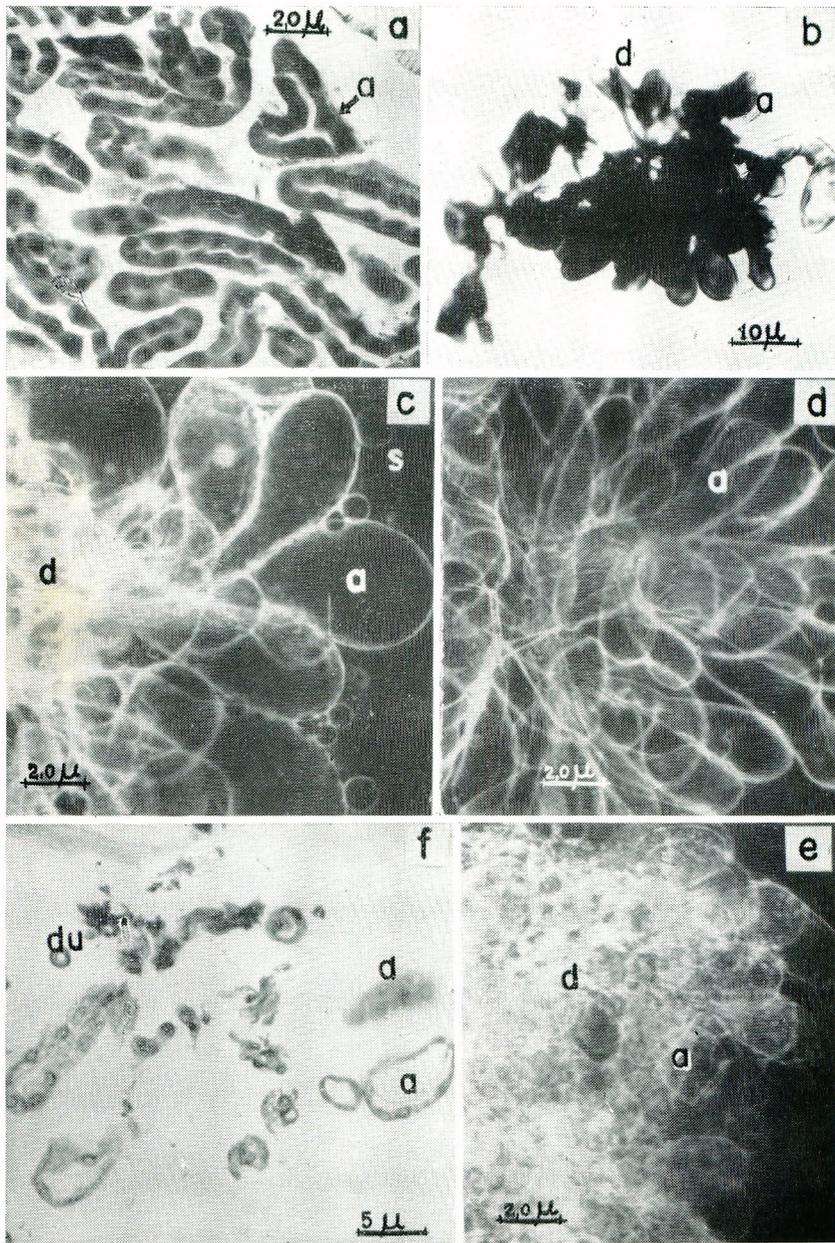
SIMPSON, J.

1960: The functions of the salivary glands of *Apis mellifera*. *J. Ins. Physiol.* 4 (2): 107-121.

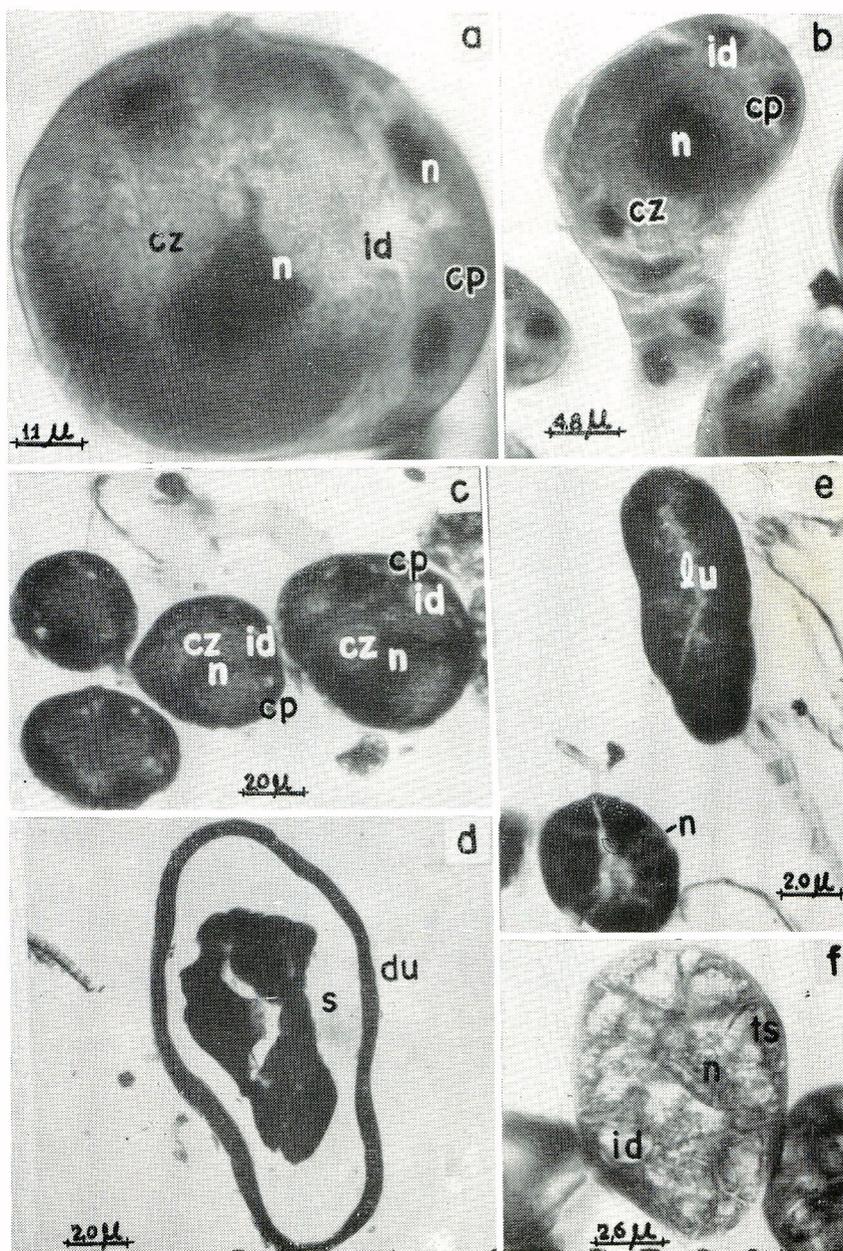
- 1962: The salivary glands of *Apis mellifera* and their significance in caste determination. *Symposia Genetica et Biologica Italica* 10: 173-188.
- SNODGRASS, R. E.
1956: *Anatomy of the Honeybee*. XIV + 334 pp. Comstock Publishing Association, Ithaca, N. Y.
- SOTELO, J. R. & K. R. PORTER
1959: An electron microscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5: 327-342.
- STEIN, G.
1962: Über Den Feinbau Der Mandibeldrüse Von Hummelmännchen. *Z. Zellforsch.* 57: 719-736.
- TORMEY, J.
1964: Differences in Membrane configuration between Osmium Tetroxids-Fixed and Glutaraldehyde-Fixed Ciliary Epithelium. *J. Cell Biol.* 23 (3): 658-664.
- WATSON, M. L.
1958: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 727-729.
- WIGGLESWORTH, W. B.
1927: pH in gut and digestion: cockroach. *Biochem. J.* 21: 791-811 e 22: 150-161.
1953: *The Principles of Insects Physiology*. VIII + 434 pp. E. P. Dutton & Co., Inc. New York.
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, D. E. & V. MOERICKE
1960: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. 3. Mitt. Die Nebendrüse von *Mysus persicae* Sulz, Aphididae. *Z. Zellforsch.* 52: 346-361.
- WOOD, R. G.
1959: Intercellular attachment in the epithelium of *Hydra* as revealed by electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6: 343-351.
- YASUDA, K., R. A. ELLIS & W. MONTAGNA
1962: The fine structural relationship between Mitochondrial and Light Granules in the Human Apocrine Sweat Glands. *Okajimas Fol. Anat. Jap.* 38 (6): 435-483.
- ZEIGEL, R. F. & A. J. DALTON
1962: Speculations Based on the Morphology of the Golgi Systems in Several Types of Protein Secreting Cells. *J. Cell Biol.* 15 (1): 45-54.



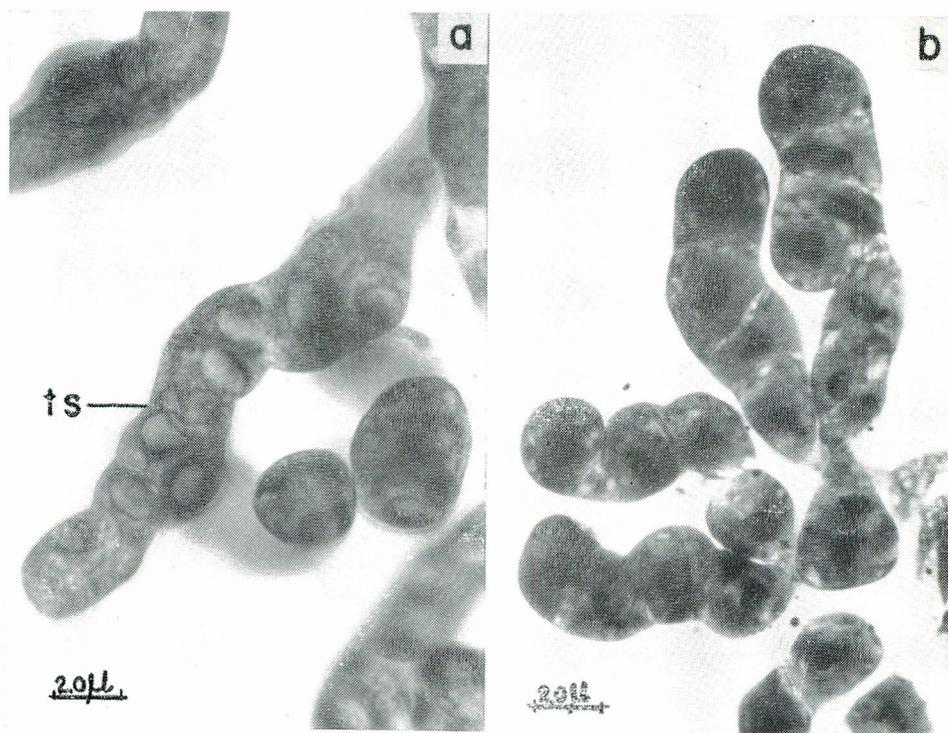
Estampa 1: Glândulas salivares do tórax de *Melipona quadrifasciata*. a, Estágio 5, coloração com Fosfina 3R, vendo-se a fluorescência dos túbulos secretores (ts); b, Estágio 3, coloração com Alaranjado de Acridina, salientando-se a fluorescência dos núcleos; c, Estágio 3, coloração com PAS, notando-se material positivo ao redor do túbulo (membrana basal) e da luz da glândula (secreção = s); d, Estágio 4, coloração com Ninhidrina-Schiff, notando-se maior intensidade de coloração na parte apical da célula; e, Estágio 1, coloração com Carmin de Best, vendo-se o glicogênio (gl) distribuído uniformemente por toda célula; f, Estágio 5, coloração com Sudan Black, notando-se a presença de lipídios (li) na base das células; g, Estágio 5, tratamento com McManus, notando-se resultado positivo na membrana basal (mb) e refôrço cuticular (c).



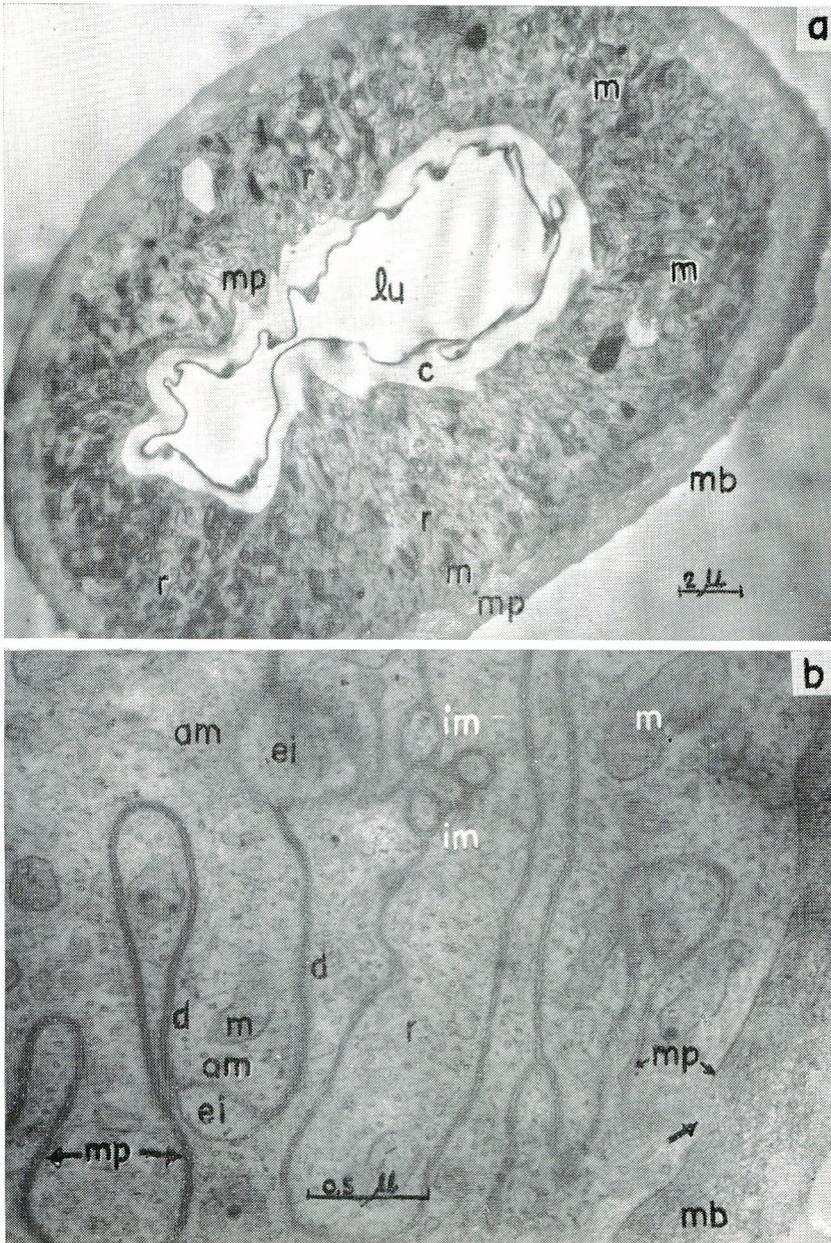
Estampa 2: Glândulas salivares da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. a, Estágio 1, tratamento com Ninhidrina-Schiff e Hematoxilina Delafield, mostrando que a coloração do citoplasma é fraca e uniforme; b, Estágio 3, coloração com Sudan Black, vendo-se os alvéolos (a) totalmente negros; c, Estágio 4, fluorescência, natural, fraca, dos alvéolos (a) e da secreção (s); d, Estágio 3, a fluorescência após coloração com Fosfina 3R é mais acentuada; e, Estágio 2, fluorescência após coloração com Alaranjado de Acridina, podendo-se observar os núcleos. Notar que embora o aumento seja o mesmo, os alvéolos (a) em c são maiores que em d e e, devido à presença da secreção em seu interior; f, Estágio 3, tratamento com McManus, notando-se que a coloração dos ductos (du) é mais acentuada.



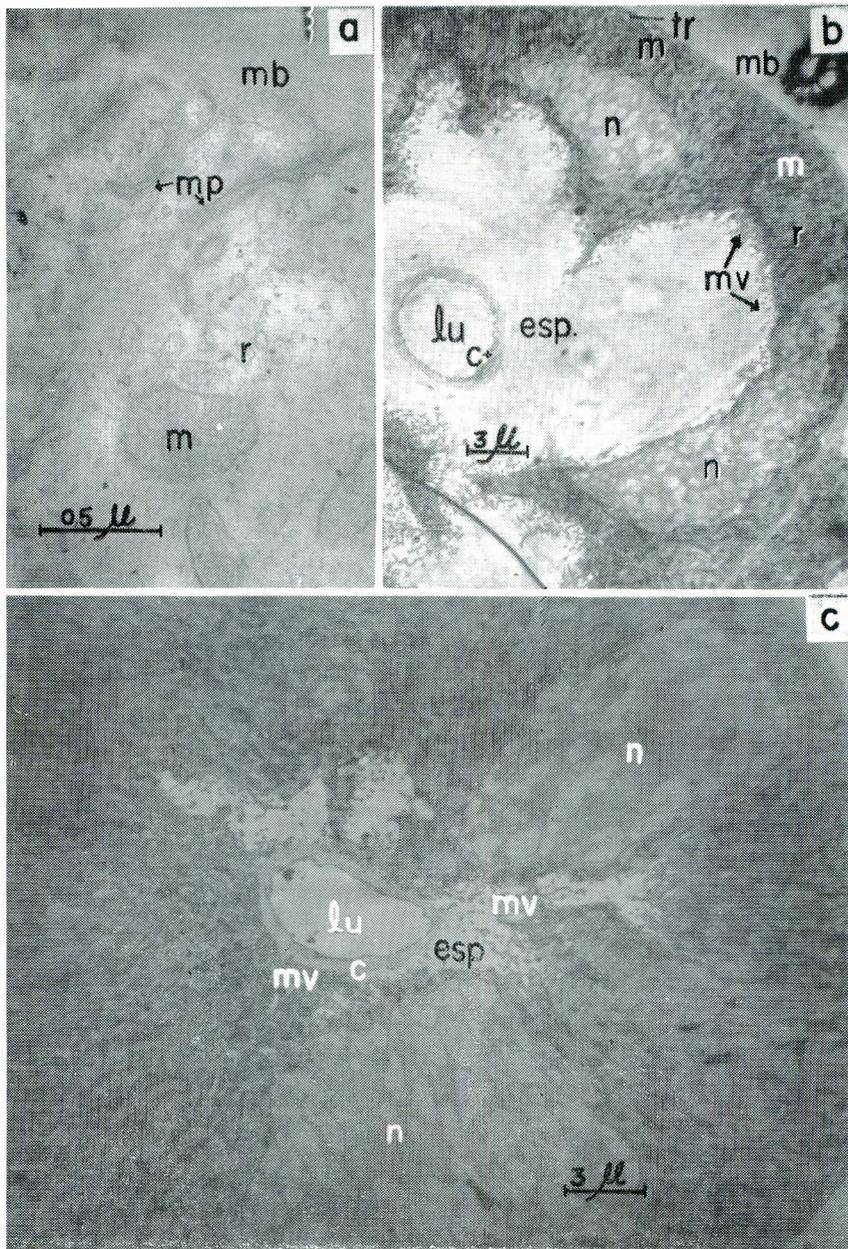
Estampa 3: a, glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima* corada com Verde-metila-pironina. Coloração do citoplasma das células parietais (cp) mais intensa; b, mesma glândula corada com Ninhydrina-Schiff e Hematoxilina Delafield. Coloração da célula zimogênica (cz) mais forte; c, mesma glândula tratada pelo PAS mostrando material positivo granular nas células zimogênica e parietais; d, ducto excretor final da glândula salivar do tórax de *Xylocopa* corado com Sudan Black, vendo-se secreção (s) no seu interior; e, glândula salivar da cabeça de *Megachile curvipes* corada com Sudan Black; f, corte transversal do túbulo secretor da glândula salivar do tórax de *Megachile* tratado pelo McManus, estando visível a membrana basal.



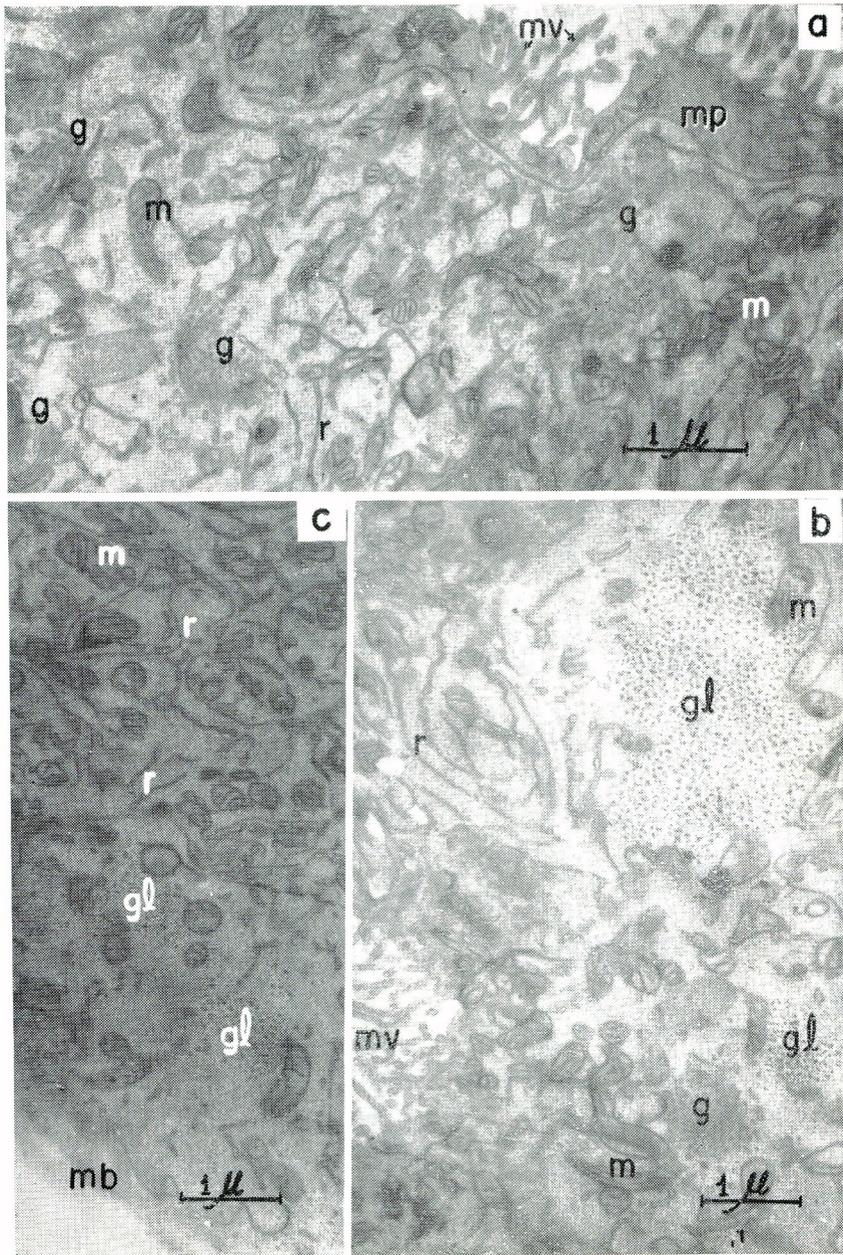
Estampa 4: a, glândula salivar do tórax de *Megachile* tratada pelo McManus. Notar a semelhança com o corte anterior; b, preparação total da glândula salivar do tórax de *Colletes meridionalis* corada com Ninhidrina-Schiff e Hematoxilina Delafield.



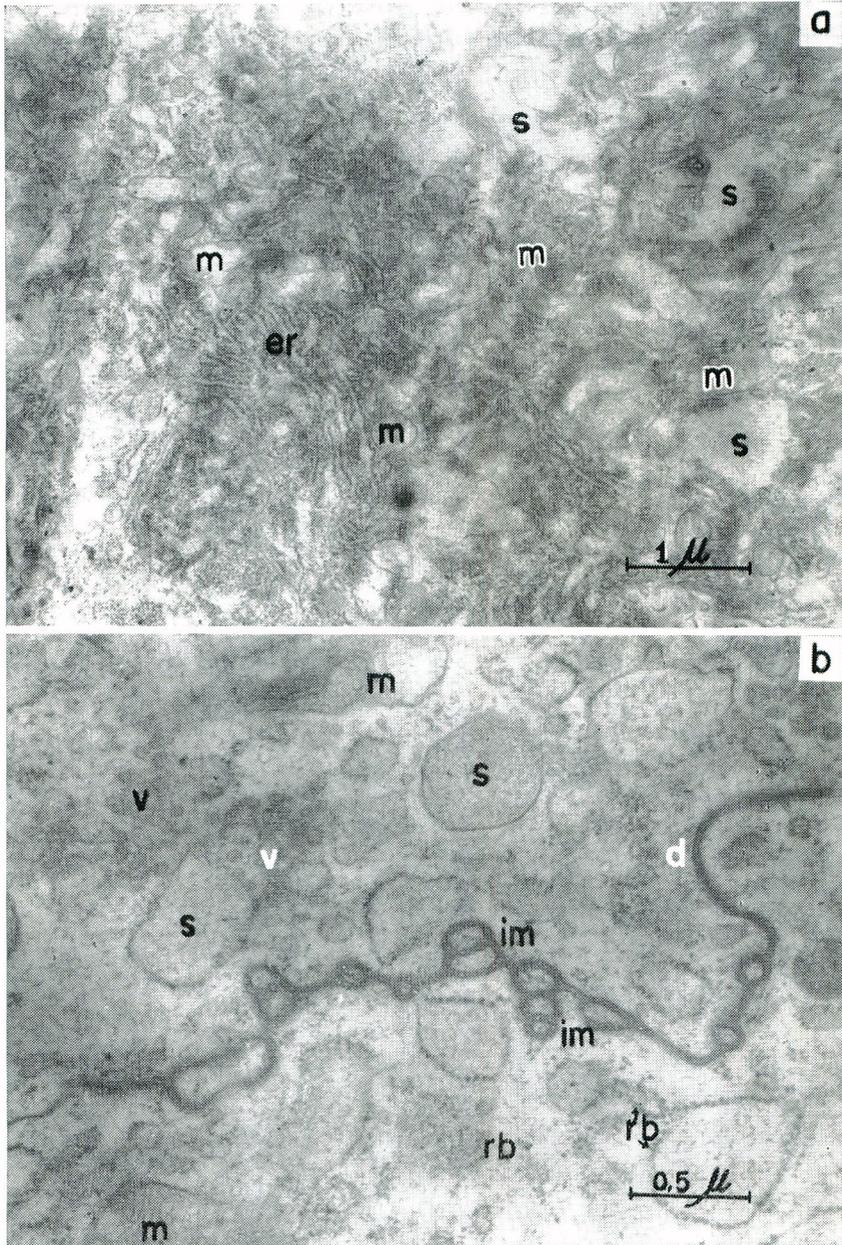
Estampa 5: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio I, material fixado em McAlear. a, corte transversal do ducto excretor visto com aumento pequeno; b, detalhe da membrana separatória entre células vizinhas, vendo-se alças (am), invaginações (im) e desmossomas septados (d).



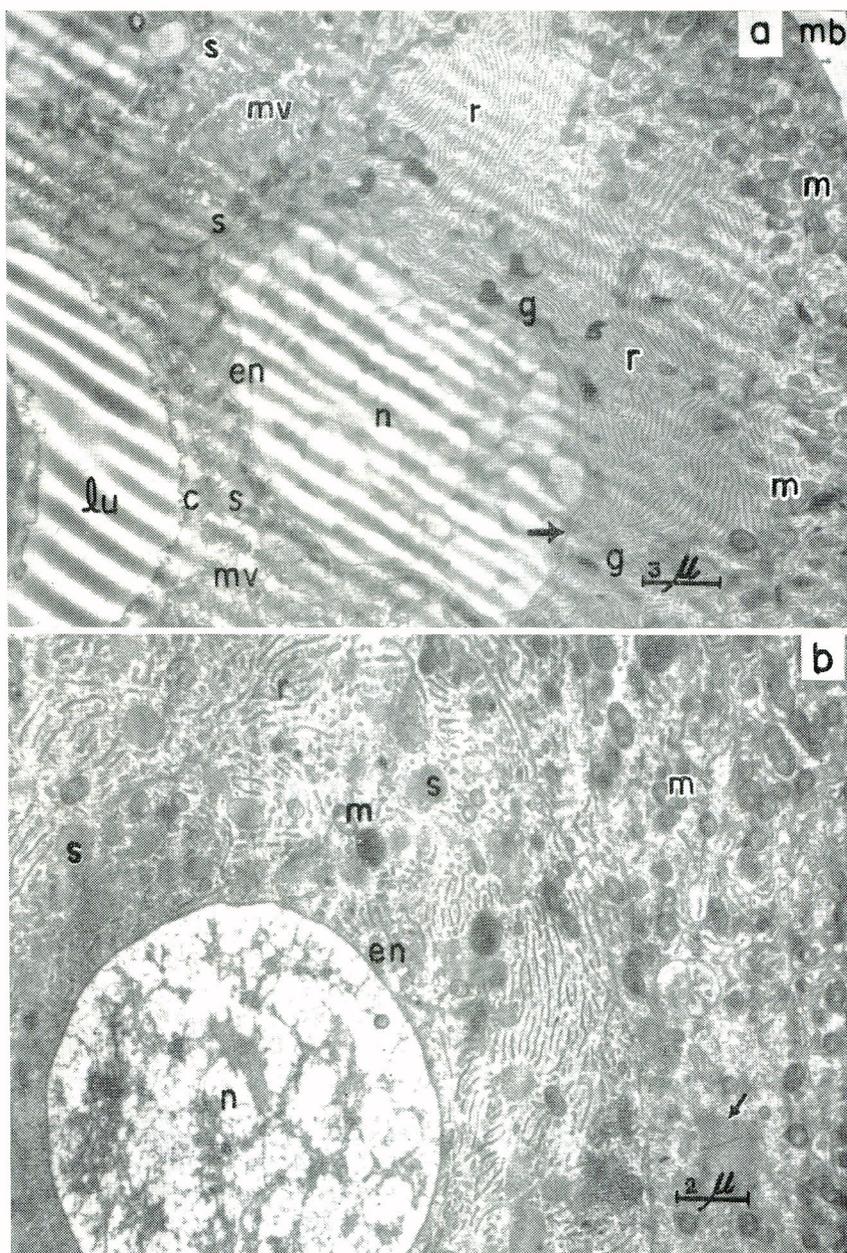
Estampa 6: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 1, material fixado em McAlear. a, parte de uma célula do ducto mostrando invaginações da membrana plásmica basal (imp); b e c, cortes transversais dos túbulos secretores fotografados com pequeno aumento para mostrar as variações de tamanho do espaço subcuticular (esp).



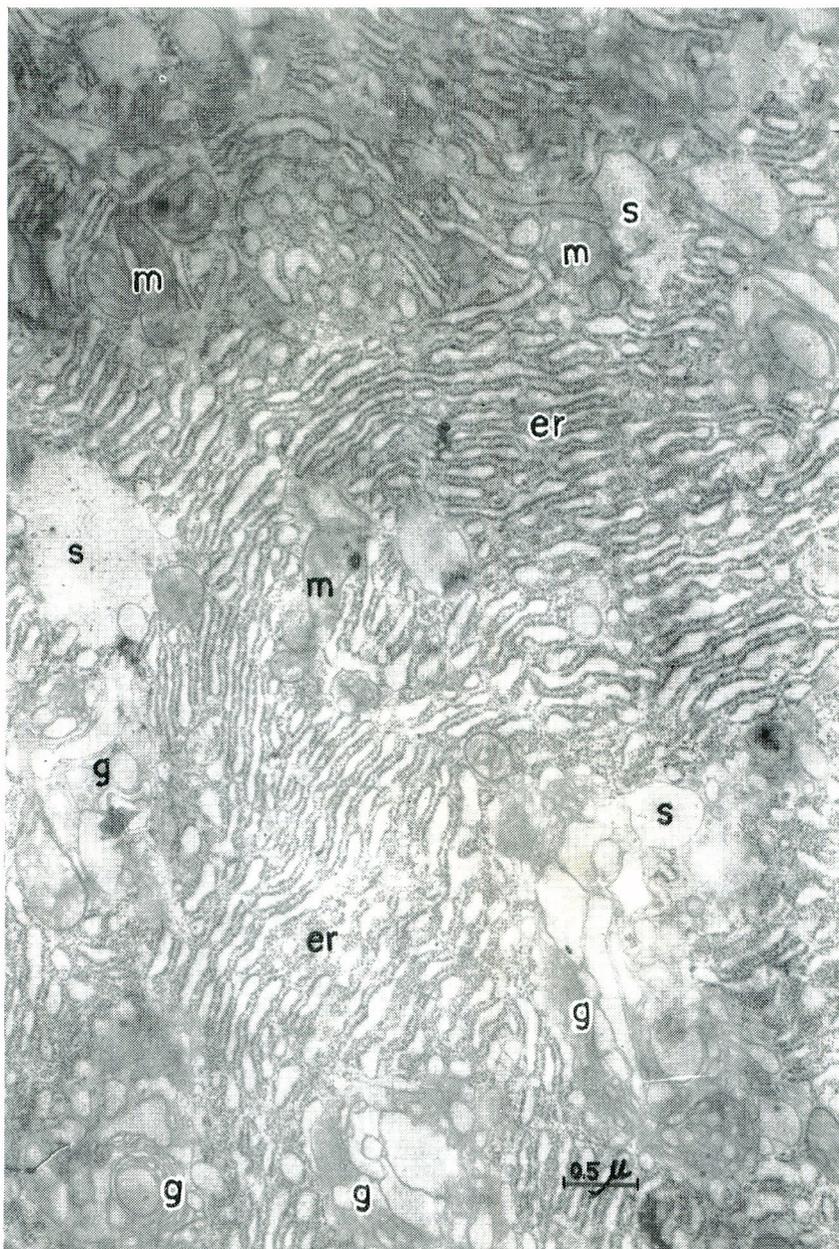
Estampa 7: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadrifasciata*. Estágio I, material fixado em McAlear. a, região apical secretora, vendo-se as microvilosidades (mv), e várias zonas de Golgi (g); b, região apical de outra célula, mostrando uma massa de glicogênio (gl); c, parte basal da célula secretora onde se pode notar que a membrana basal (mb) é aqui bem mais fina que no ducto, a ausência de Golgi e a presença de glicogênio (gl).



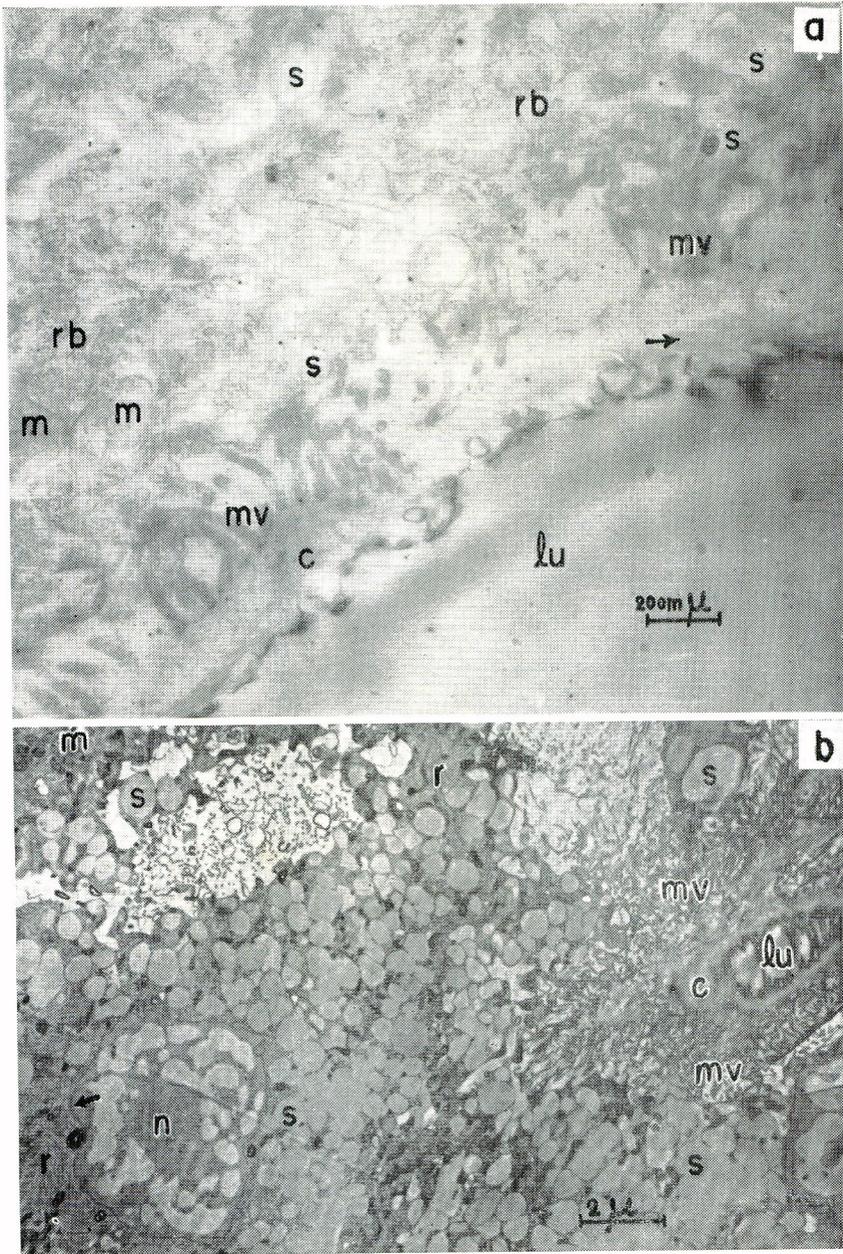
Estampa 8: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 2, material fixado em Palade. a, região central de uma célula secretora, vendo-se um ergastoplasma (er) relativamente bem desenvolvido e mitocôndrios pequenos (m). Áreas de baixa densidade interpretadas como secreções (s) já podem ser observadas; b, células de transição do túbulo secretor para o ducto: mostra organização característica das membranas divisórias. Nota-se a presença de ribossomas (rb) em torno de vesículas (v) e livres no citoplasma.



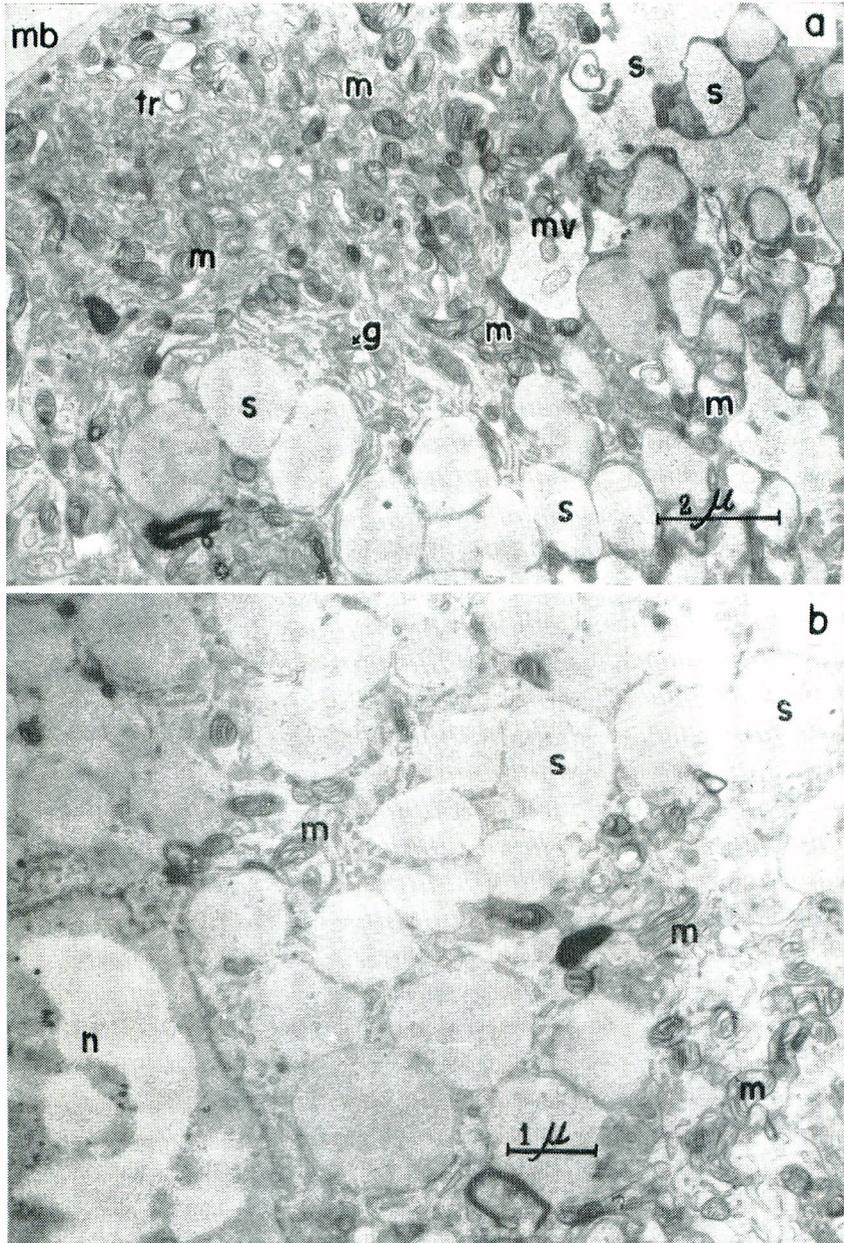
Estampa 9: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 3, material fixado em McAlear. a, pequeno aumento de uma célula secretora, mostrando que a zona basal é ocupada por mitocôndrios (m) grandes e ricos em cristas; a zona central por retículo endoplasmático (r) bem desenvolvido e núcleo (n) e a zona apical por secreção (s), mitocôndrios pequenos e microvilosidades (mv) que quase tocam a cutícula (c); b, zona central de uma célula, mostrando as mesmas características da anterior. A flexa indica corte transversal de microvilosidades.



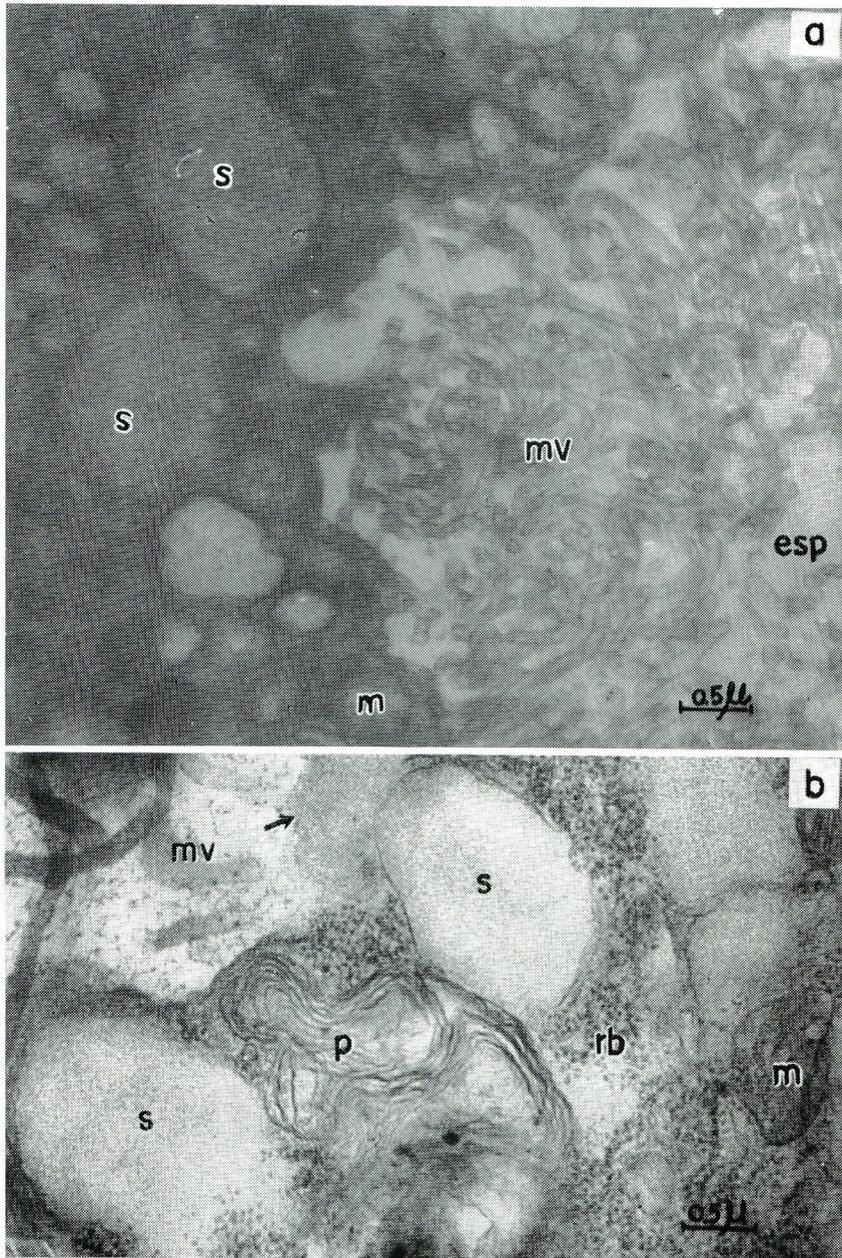
Estampa 10: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 3, material fixado em Palade. Zona central de uma célula secretora vendo-se o ergastoplasma (er) plenamente desenvolvido, mitocôndrios pequenos e algumas áreas de Golgi (g), com suas cisternas alargadas pela presença de secreção. Note-se a maior densidade da periferia das áreas de Golgi e a formação da secreção (s), em contacto com essas áreas.



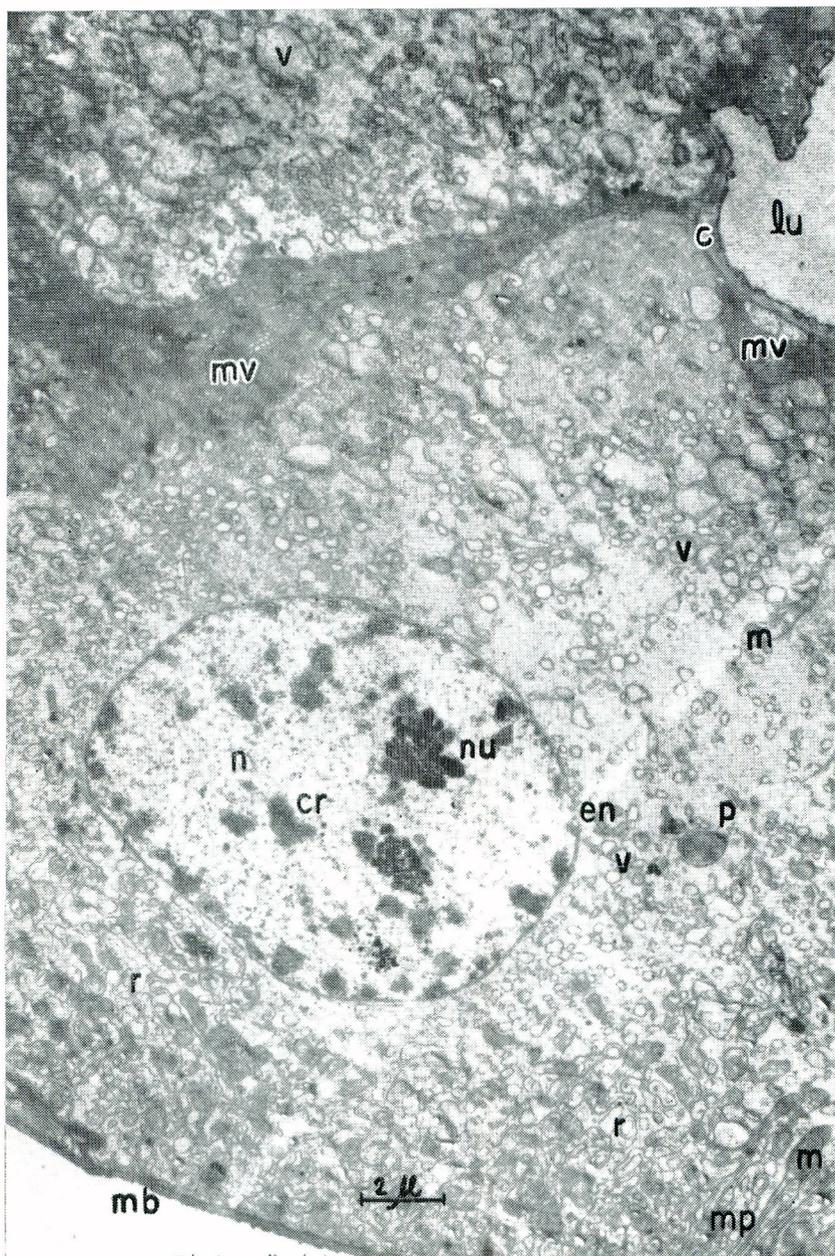
Estampa 11: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. a, Estágio 3, material fixado em Palade. Parte apical da célula mostrando que as microvilosidades estão bem próximas da cutícula (c) e que esta apresenta cavidades no interior e estriações oblíquas à luz (flexa); b, Estágio 4, material fixado em McAlear. Parte apical de células secretoras mostrando a riqueza em secreção (s) nesta fase. A flexa indica poros na membrana nuclear.



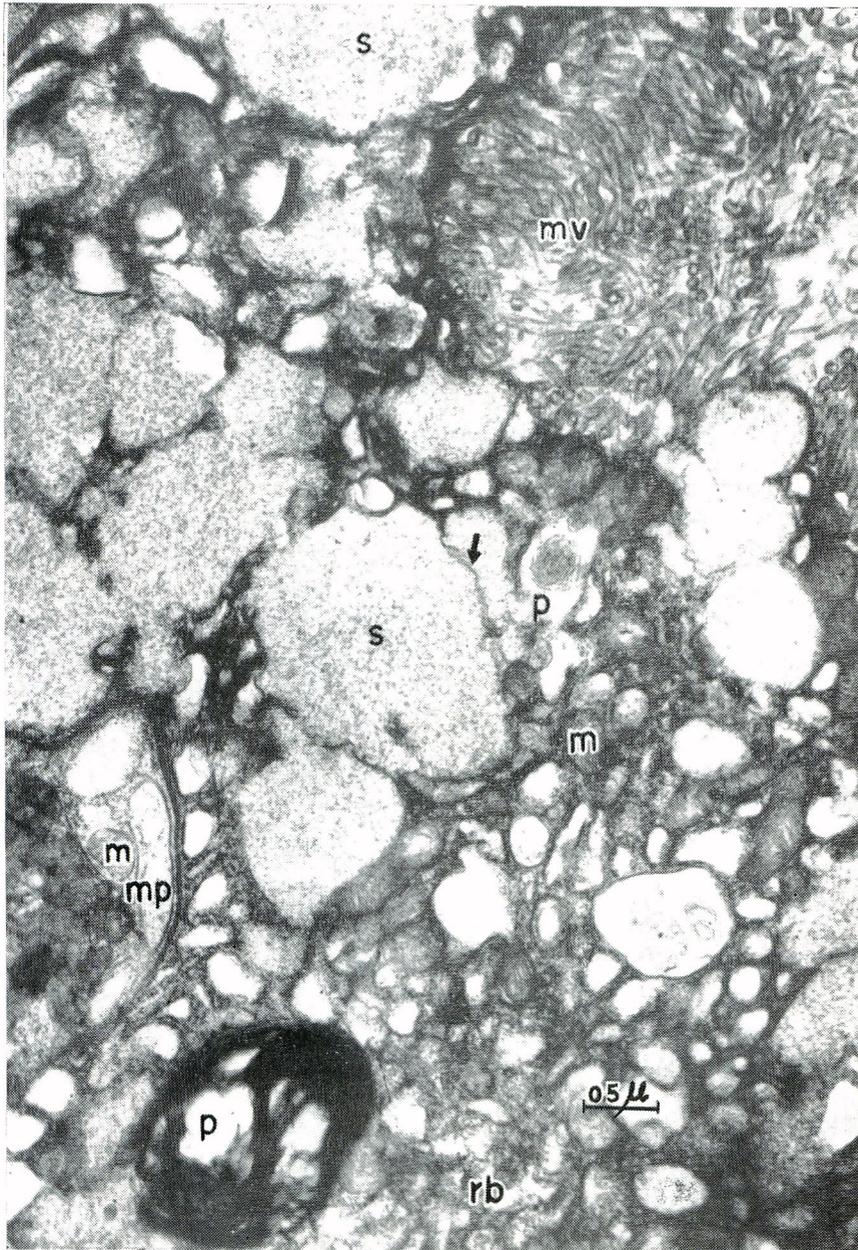
Estampa 12: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 4, material fixado em McAlear. a, nota-se que nesta fase somente a zona periférica da célula se acha livre de secreção; b, zona central da célula, mostrando grande quantidade de vesículas de secreção, entremeadas com mitocôndrios e restos do retículo.



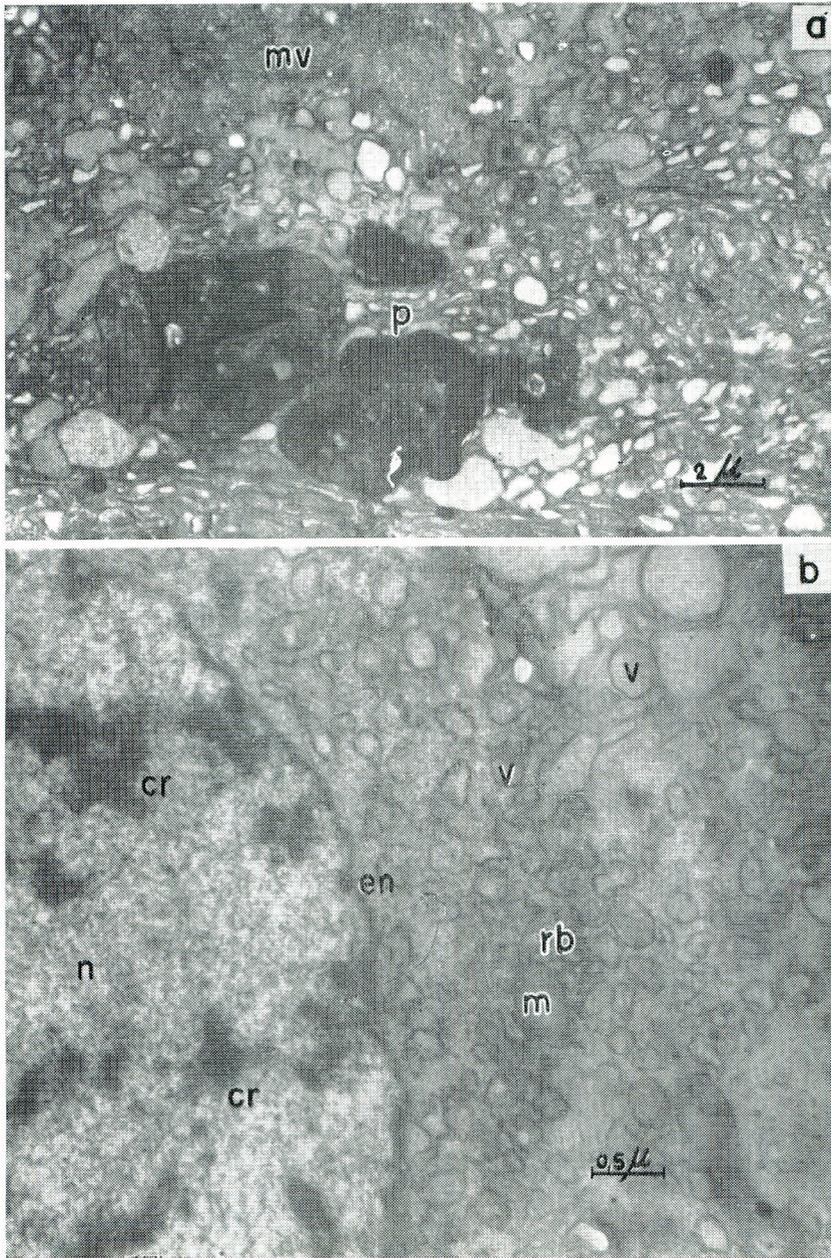
Estampa 13: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 4, material fixado em Palade. a, secreção na zona apical da célula e microvilosidades; b, a flexa indica a liberação da secreção. Note-se a presença de ribossomas (rb) entre a secreção, o aparecimento de parassomas (p) e que a membrana envolvente da secreção é simples e inconspícua.



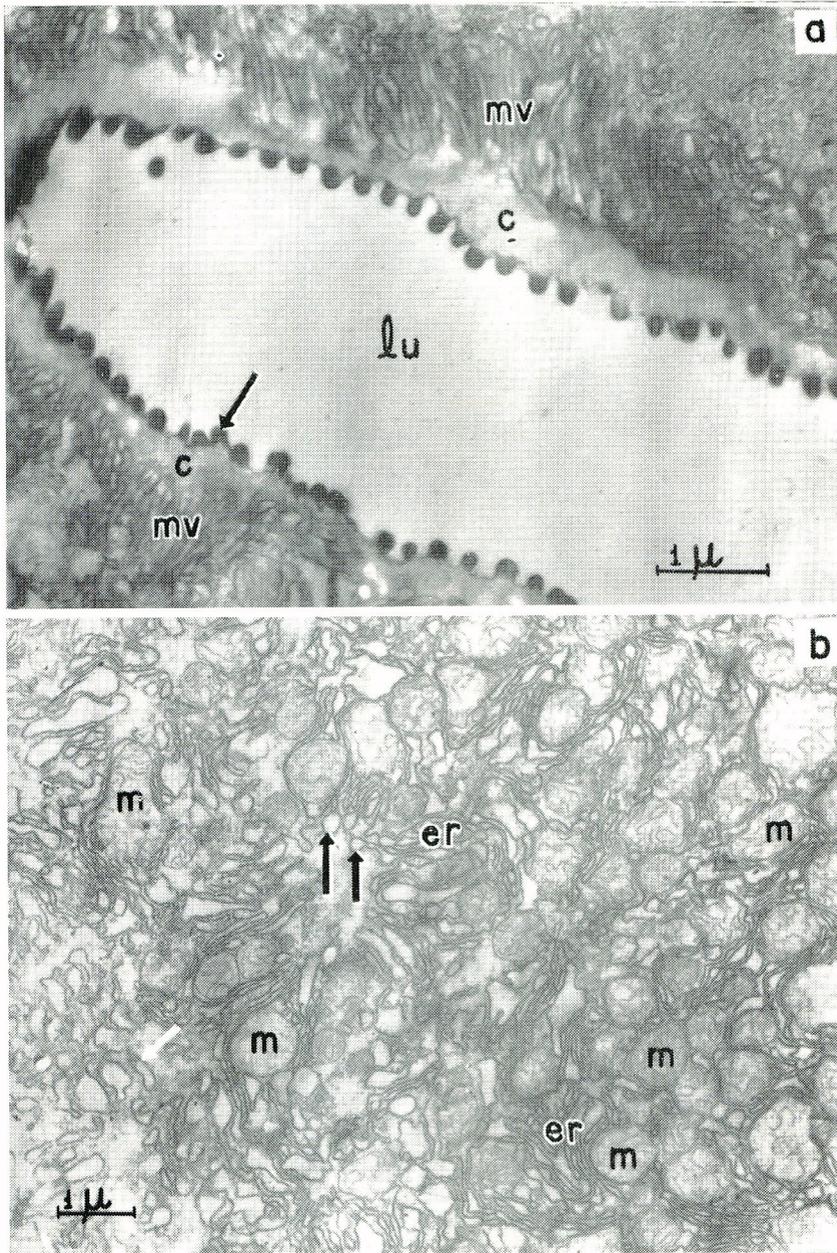
Estampa 14: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 5, material fixado em Palade. A fotografia mostra que após a eliminação da secreção o citoplasma se apresenta muito vesiculado e que as microvilosidades sofrem um colapso.



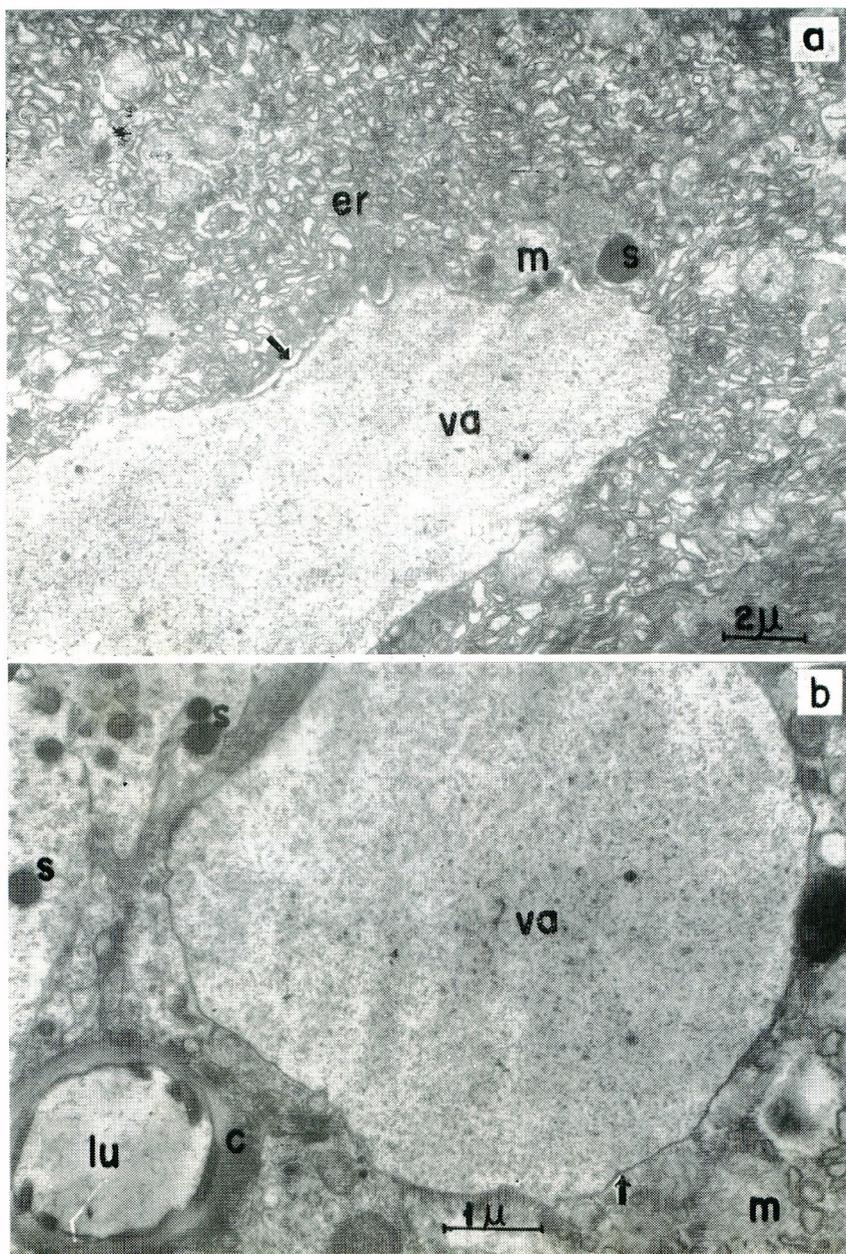
Estampa 15: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadri-fasciata*. Estágio 5, material fixado em Palade. Célula do início do 5º estágio, mostrando ainda alguma secreção no interior, mas sinais bastante evidentes de degeneração do citoplasma (parassomas).



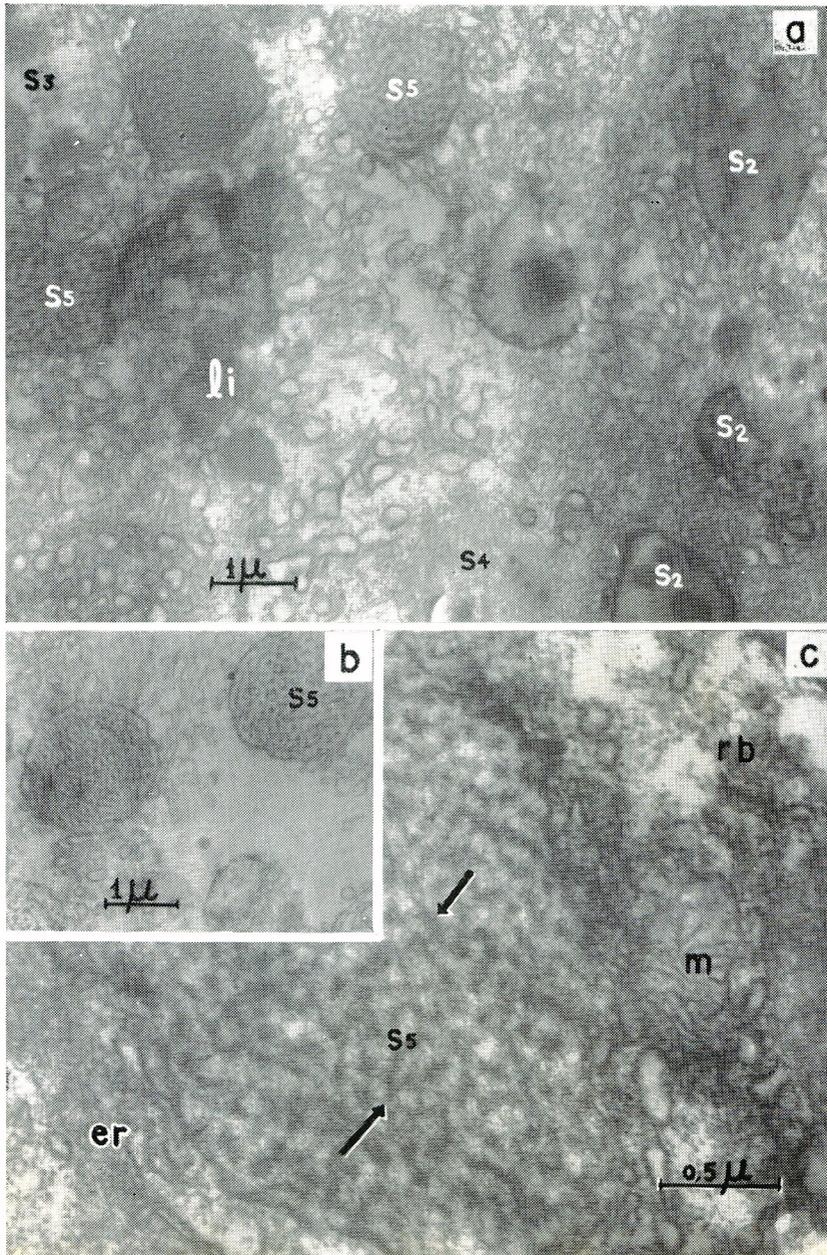
Estampa 16: Micrografia eletrônica da glândula salivar do tórax de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 5, material fixado em Palade. a, zona apical da célula mostrando parassomas (p) muito desenvolvidos; b, zona central da célula mostrando o citoplasma totalmente vesiculado (v). Nota-se a presença de ribossomas (rb) na superfície de algumas vesículas (v).



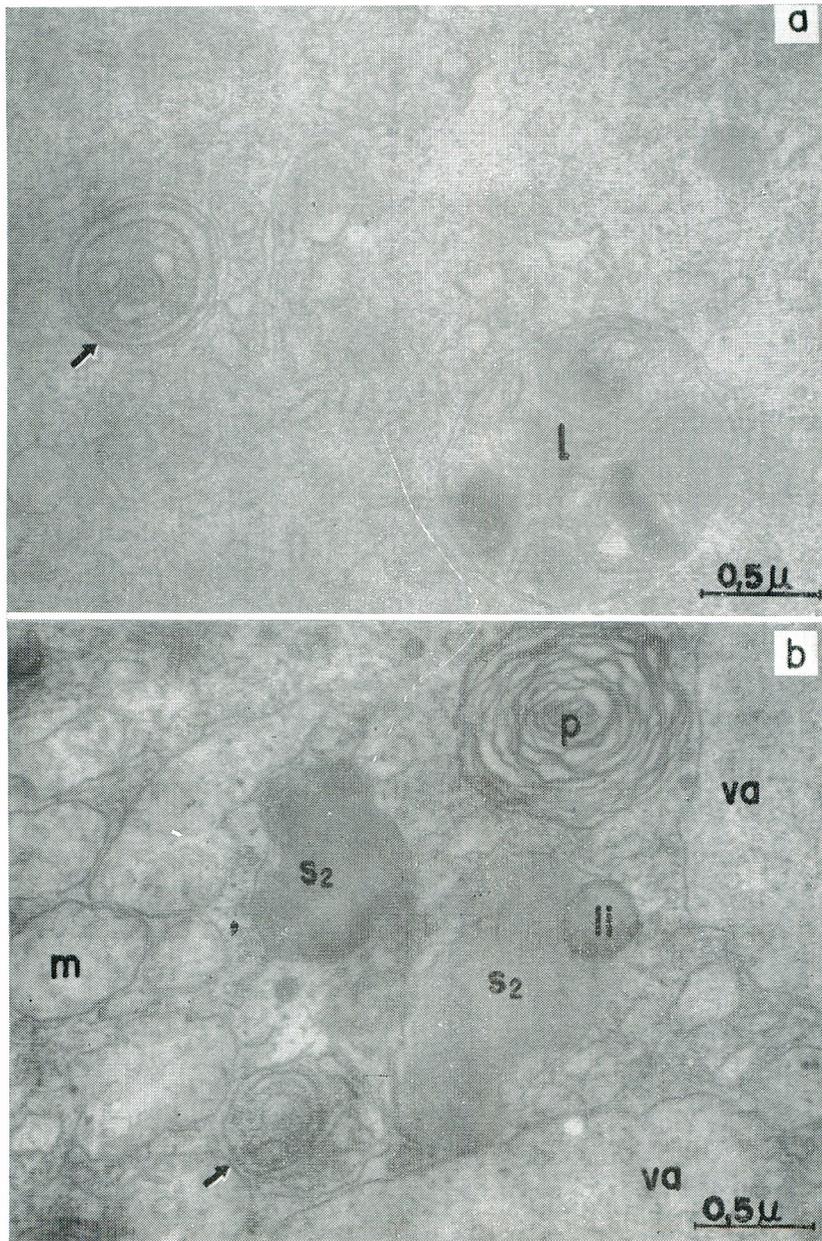
Estampa 17: Glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima*. Material fixado em Millonig. a, ducto intercelular da glândula, vendo-se microvilosidades (mv) logo abaixo da cutícula (c). A flexa indica corte dos reforços em espiral do lúmen (lu), esclerotizados; b, célula zimogênica vendo-se o arranjo característico do ergastoplasma (er) com a formação de dilatações na extremidade das lamelas (flexa preta).



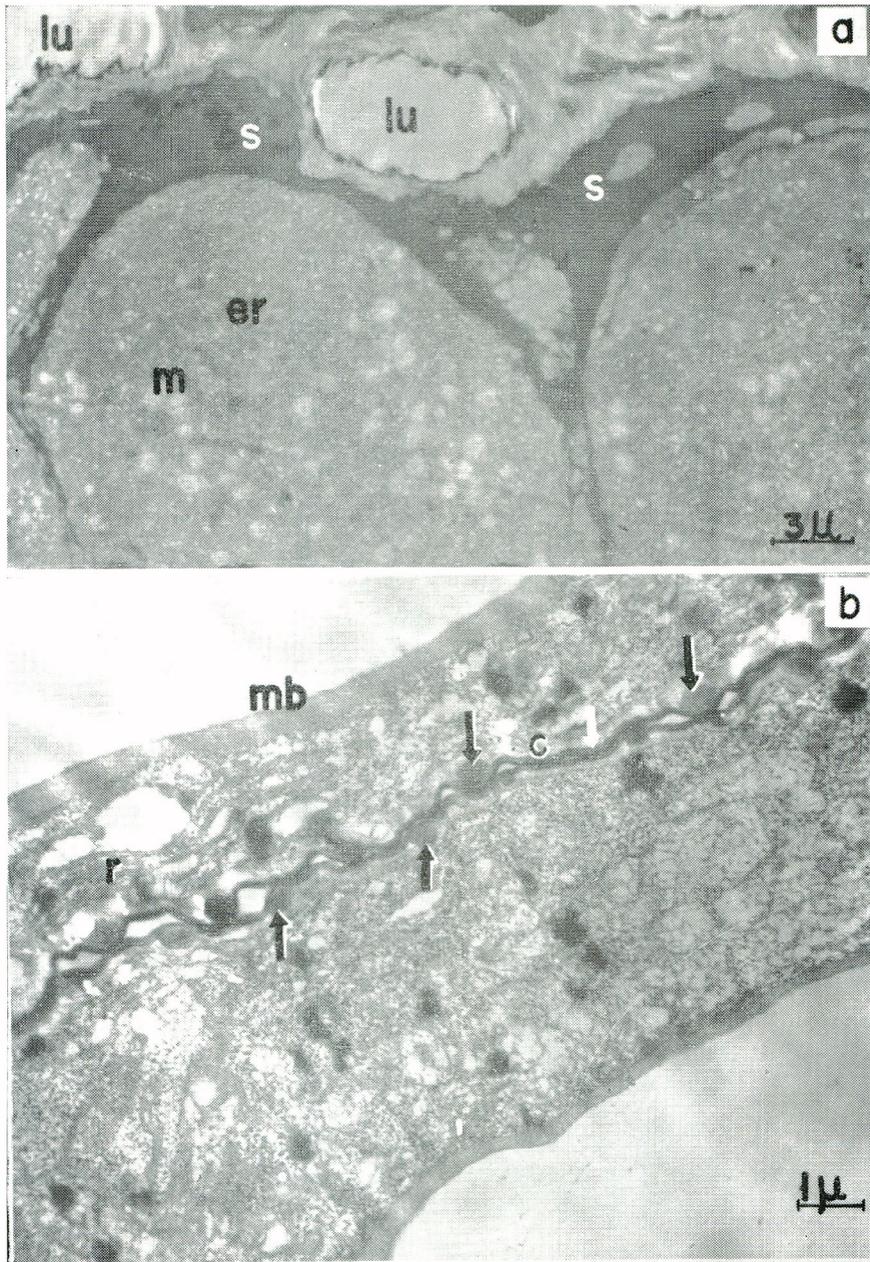
Estampa 18: Glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima*. a, vacúolo (va) formado na zona para onde convergem as lamelas do retículo. Notar que o arranjo radial do retículo ainda é perceptível em certos pontos. A flexa mostra a membrana limitante do vacúolo; b, vacúolo que já terminou o processo de crescimento, junto ao ducto intercelular.



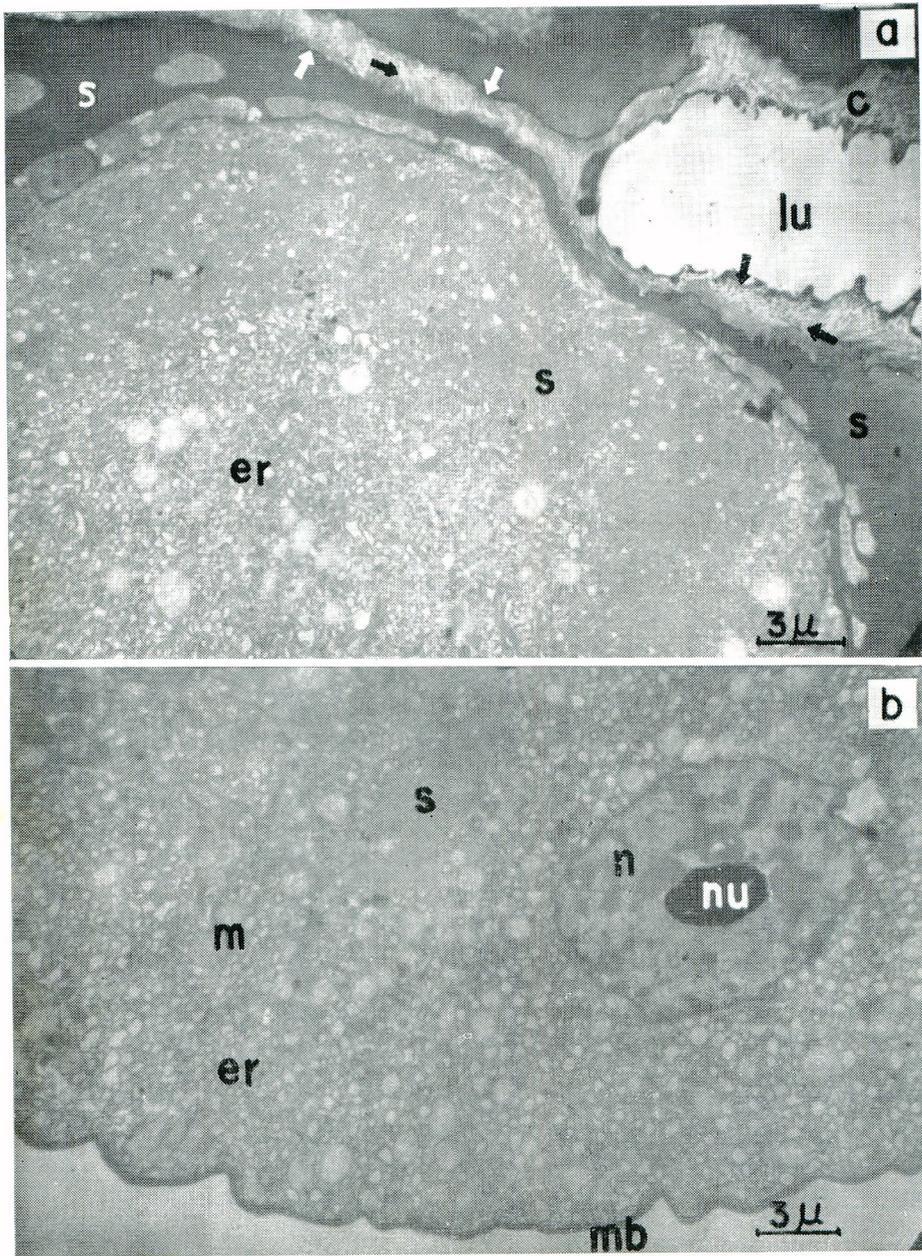
Estampa 19: Glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima*. Vários aspectos da secreção (S1, S2, S3, S4, S5) produzida pela célula zimogênica. Nos grãos S1 pode perceber-se um certo arranjo macromolecular dos constituintes. As flexas em c mostram pontos de maior intensidade.



Estampa 20: Glândula salivar do tórax de *Xylocopa hirsutissima*. Material fixado em Palade. a, célula zimogênica mostrando arranjos especiais do retículo (flexa) e formação de lisossomas (l); b, célula zimogênica na fase de secreção mostrando vacúolos, secreção (S2) e parassomas (p).

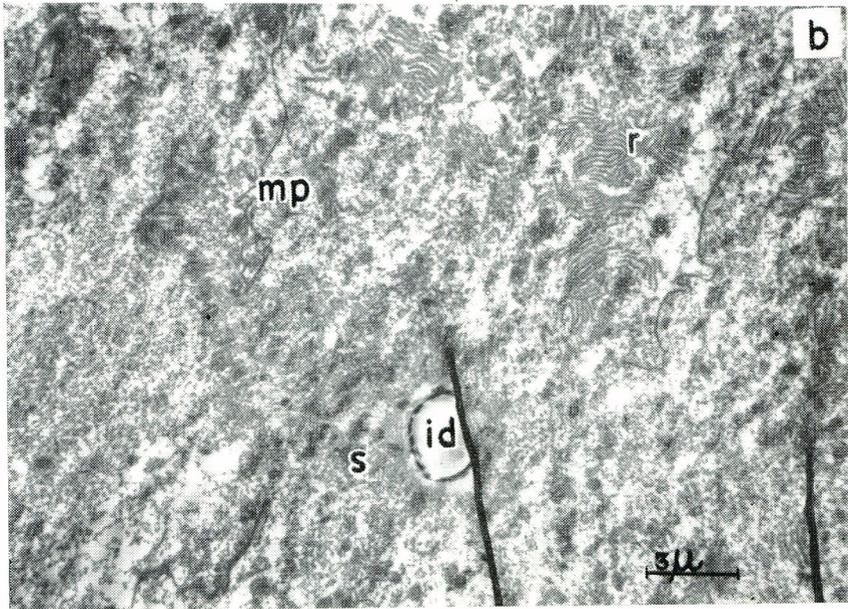
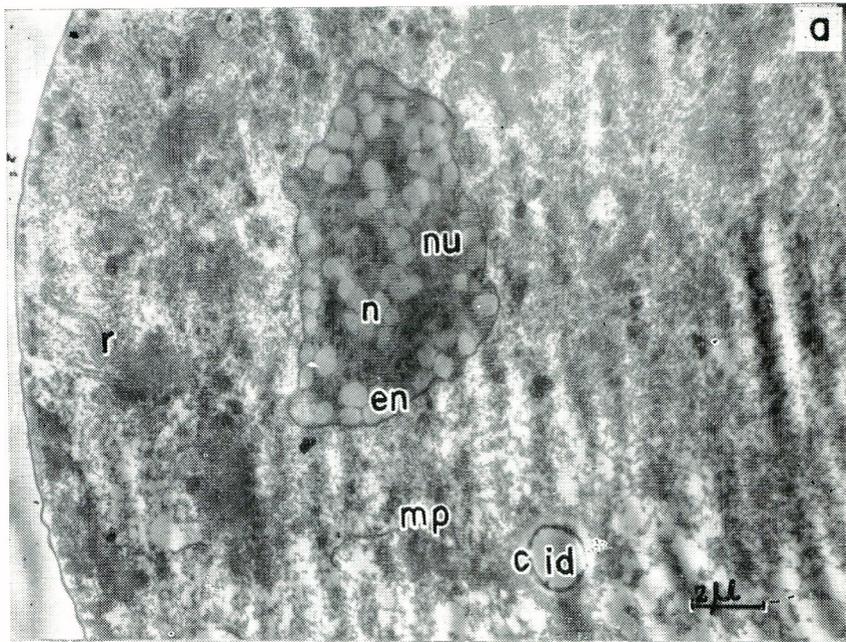


Estampa 21: Glândula salivar do tórax de *Megachile curvipes*. Material fixado em glutaraldeído. a, túbulo secretor mostrando acúmulo de secreção ao redor do lúmen (lu). O restante do citoplasma aparece ocupado por um ergastoplasma vesicular; b, parte final do túbulo notando-se o bordo interno da cutícula mais denso (flexa branca) devido à esclerotização e aparecimento de massas densas no interior desta (flexa preta). O material da membrana basal (mb) apresenta-se sugestivamente perpendicular à superfície da célula.

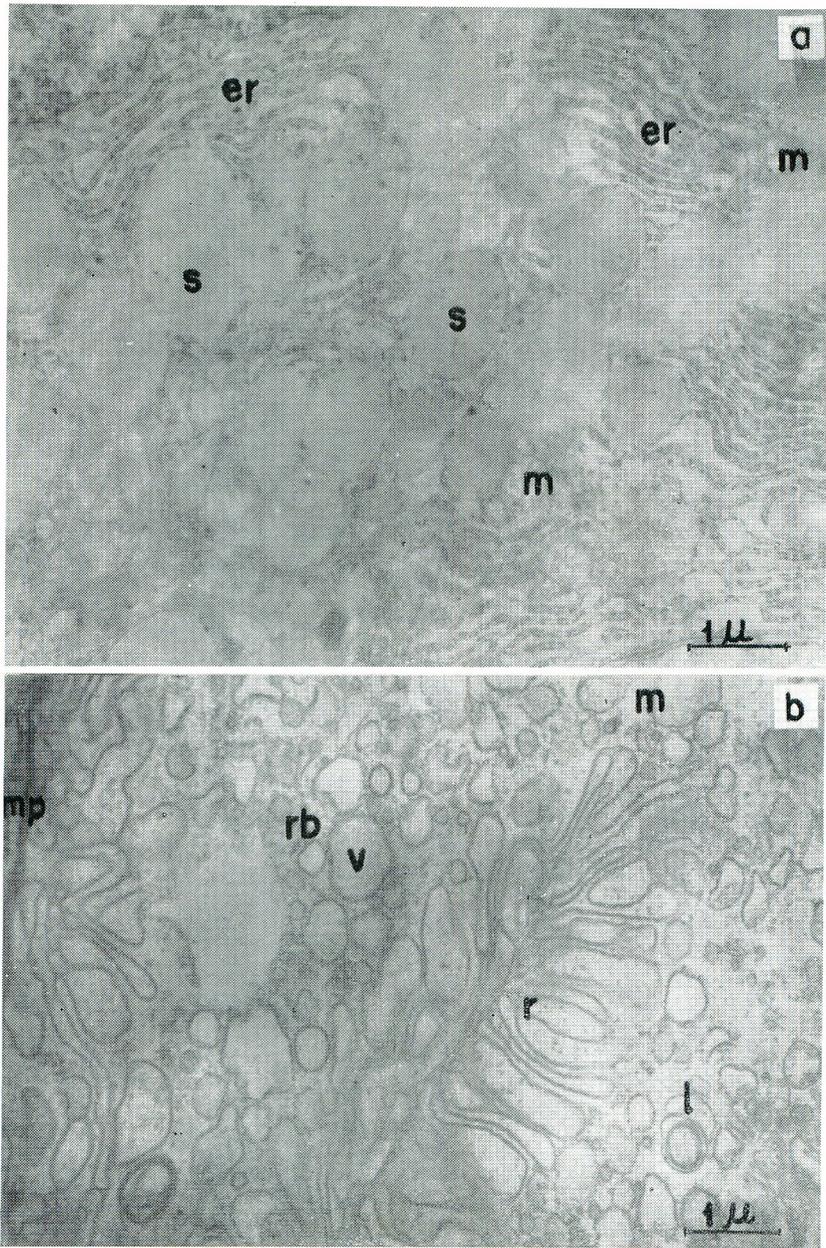


Estampa 22: Glândula salivar do tórax de *Megachile curvipes*. Material fixado em glutaraldeído. a, b, célula secretora mostrando que a secreção está separada da cutícula por uma membrana (flexa branca) e que esta última apresenta veios de material denso no seu interior (flexa preta). Note-se também que a parte apical da célula tem o retículo menos desenvolvido, as vesículas menores, e já contém secreção.

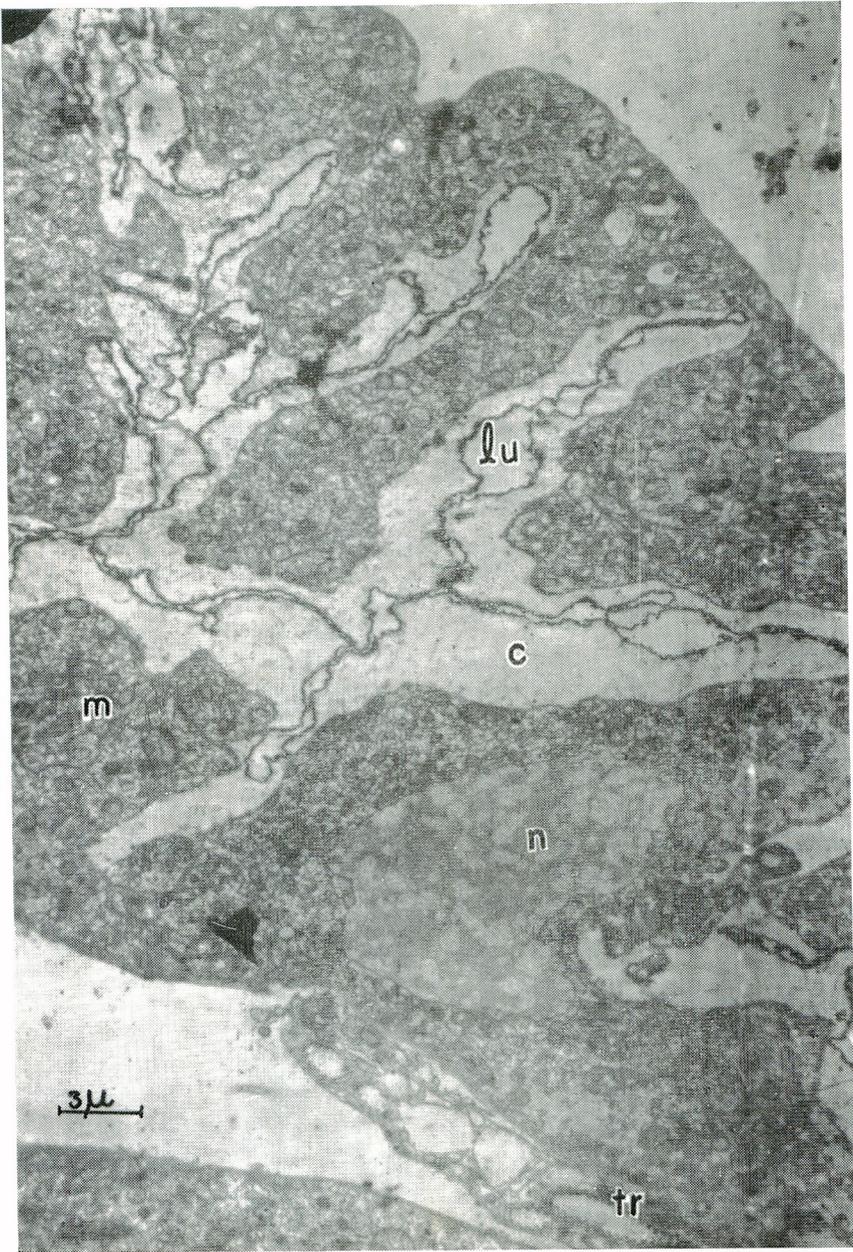




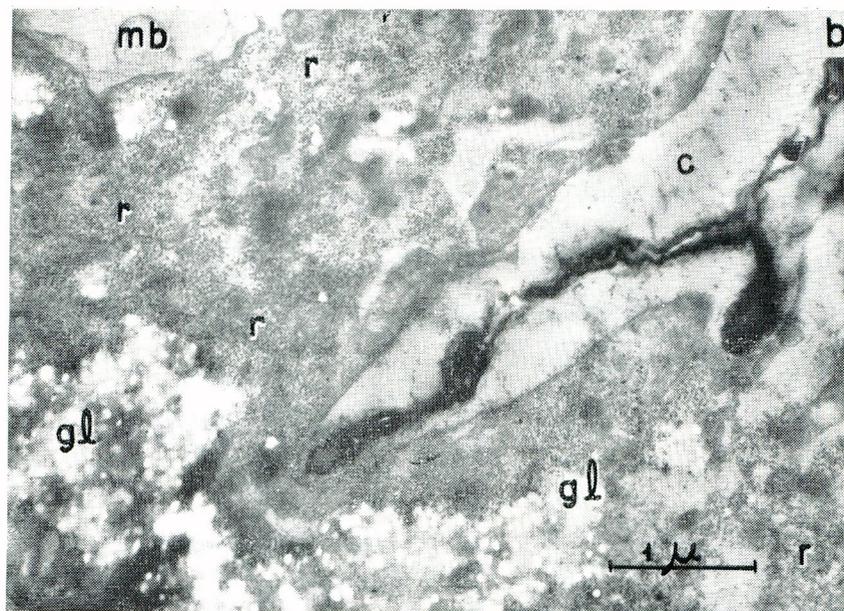
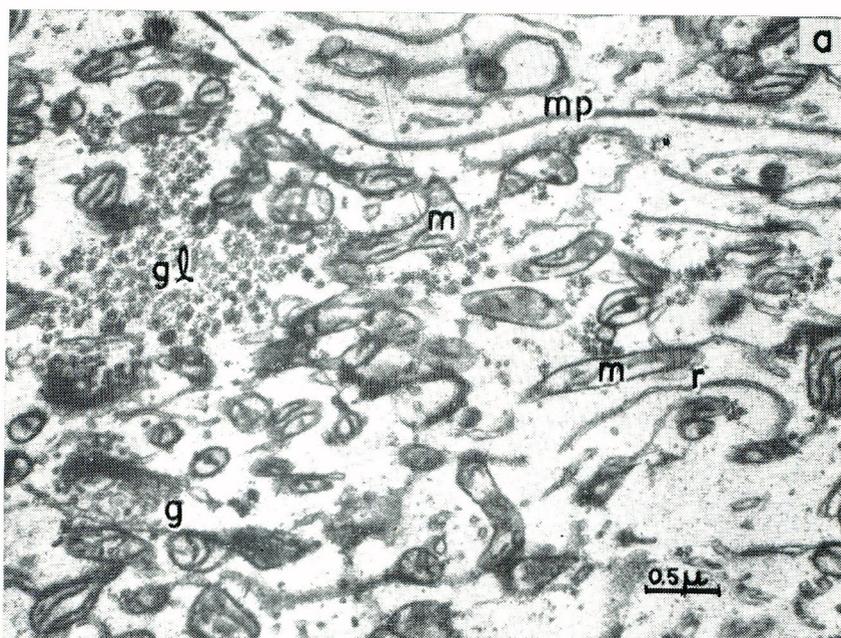
Estampa 23: Glândula salivar do tórax de *Colletes meridionalis*. Material fixado em Millonig. a, vista geral de uma célula parietal vendo-se um corte do ducto intercelular (id); b, limite entre a célula parietal e zimogênica, vendo-se arranjos especiais do retículo.



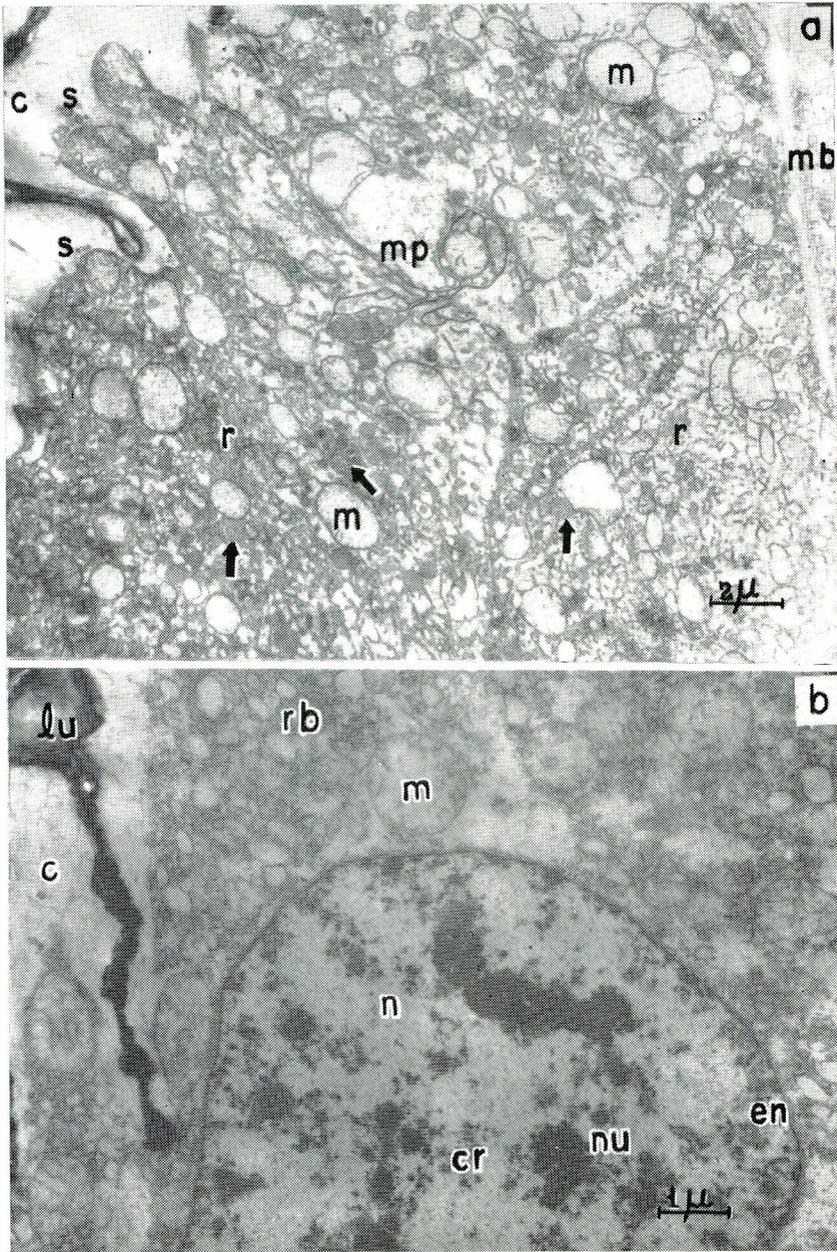
Estampa 24: Glândula salivar do tórax de *Colletes meridionalis*. Material fixado em Palade. a, célula zimogênica mostrando secreção e ergastoplasma; b, ergastoplasma vesiculoso e complicações do retículo (r) liso.



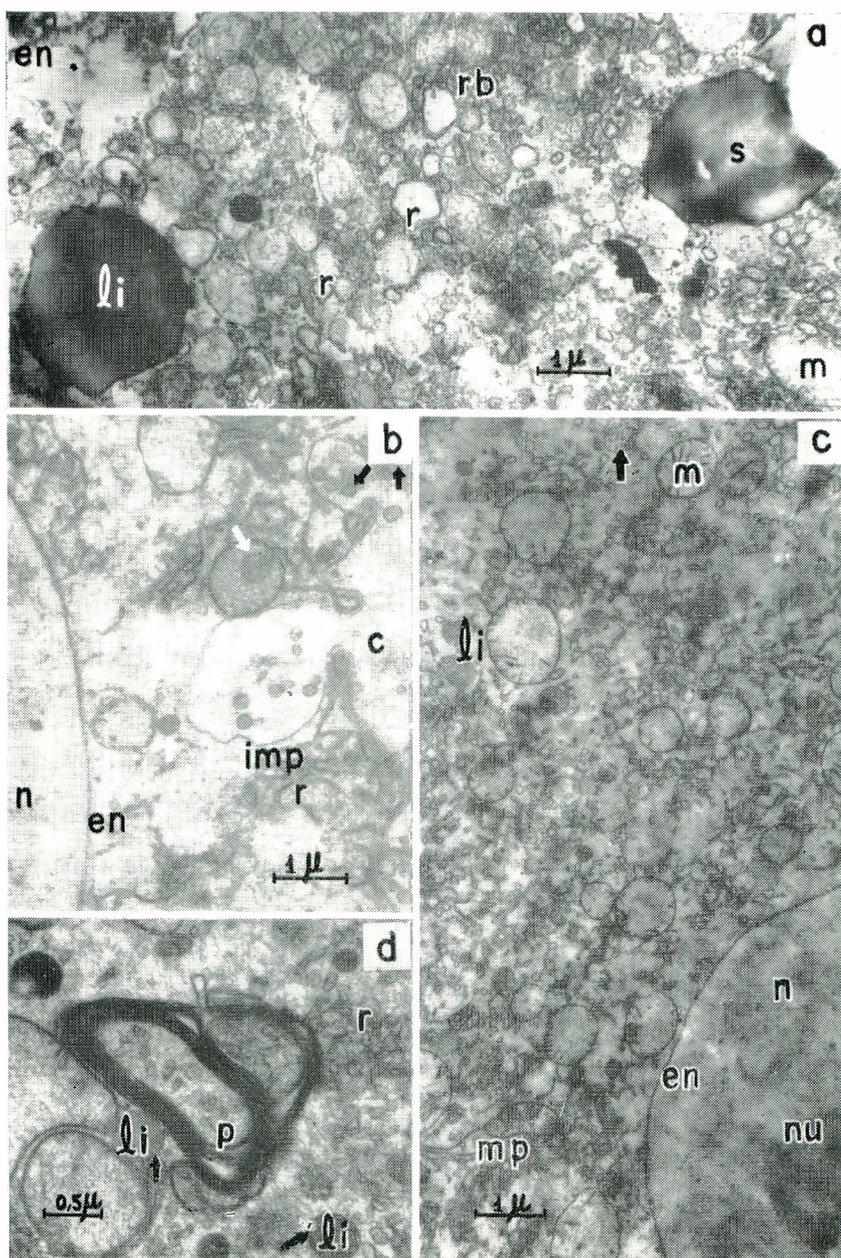
Estampa 25: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 1, material fixado em McAlear. Aspecto geral de um alvéolo secretor nesta fase. Note-se a riqueza em mitocôndrios. Note-se que a cutícula (c) não apresenta estrutura.



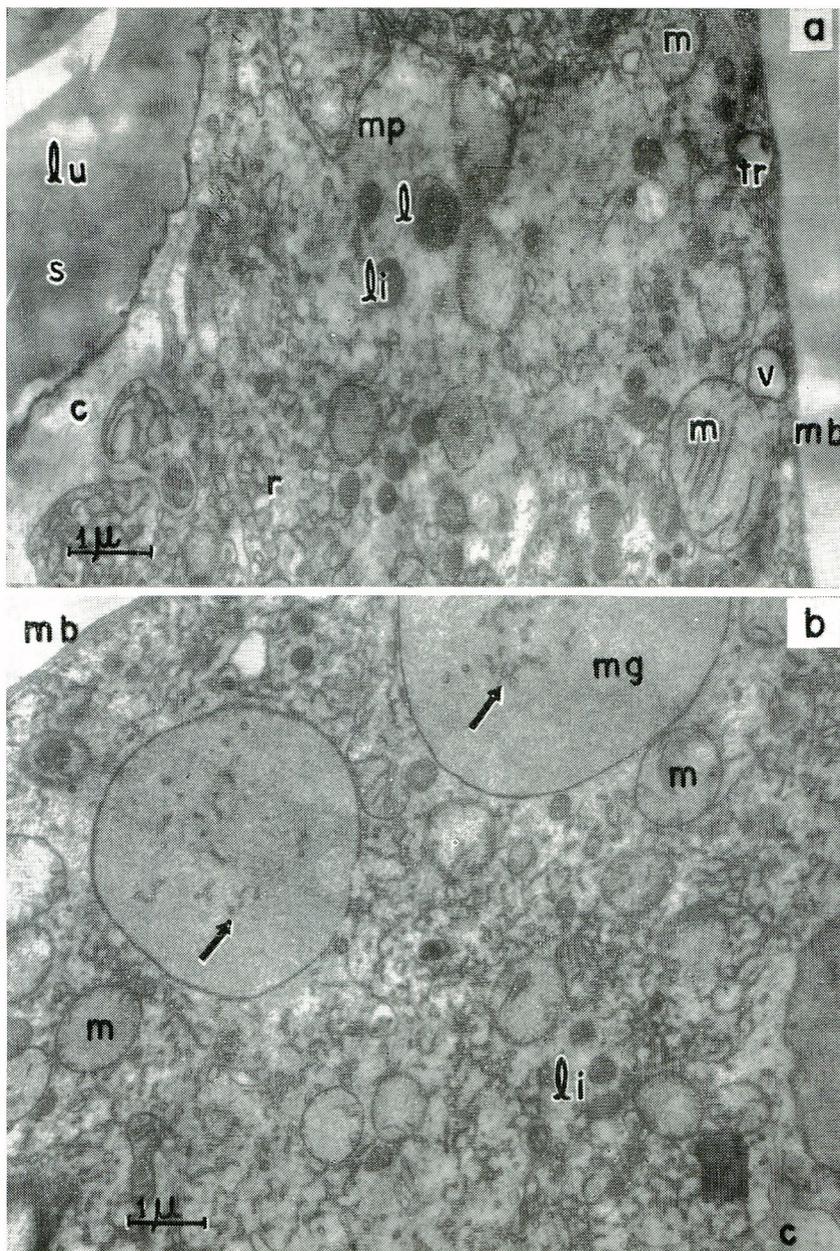
Estampa 26: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 1. a, material fixado em McAlear. Célula mostrando glicogênio (gl) e formação de Golgi (g). Aparentemente a membrana (mp) separatória das células apresenta interrupções; b, material fixado em Palade, mostrando grande riqueza em ribossomas. O material mal fixado (em claro) é provávelmente glicogênio.



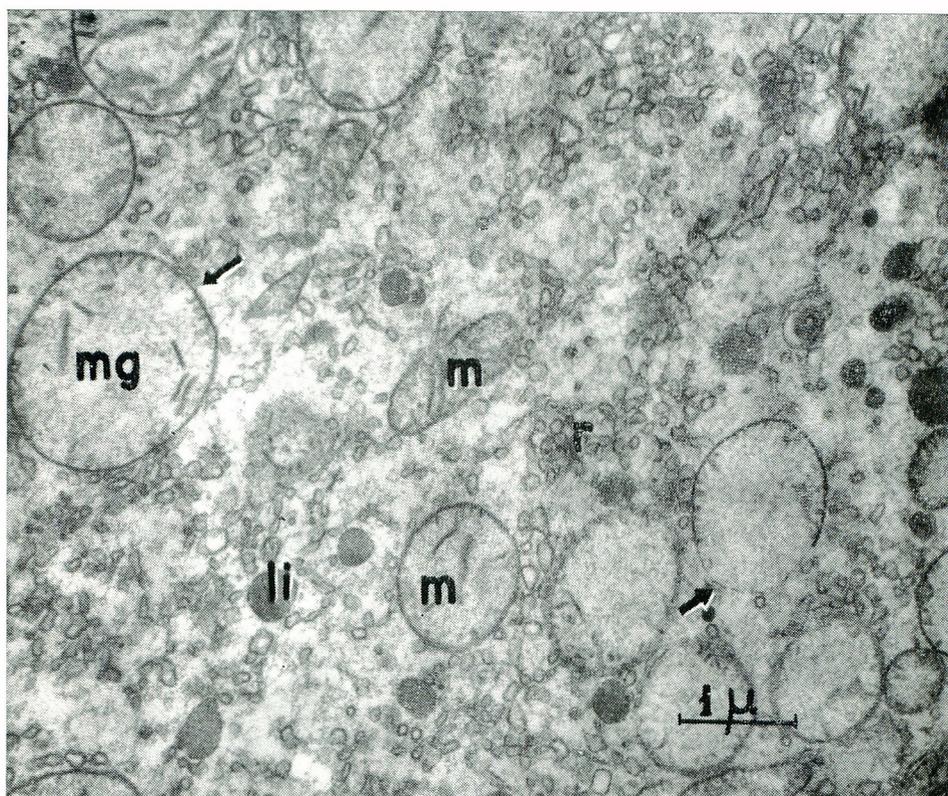
Estampa 27: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 2. a, material fixado em McAlear. Célula secretora vendo-se numerosos corpos multivesiculares (flexa preta) no citoplasma, o início da formação de bolsas (flexa branca) e eliminação das primeiras partículas consideradas como secreção (s); b, material fixado em glutaraldeído mostrando que o citoplasma desta fase também é rico em ribossomas (rb), mas que o retículo é pouco desenvolvido.



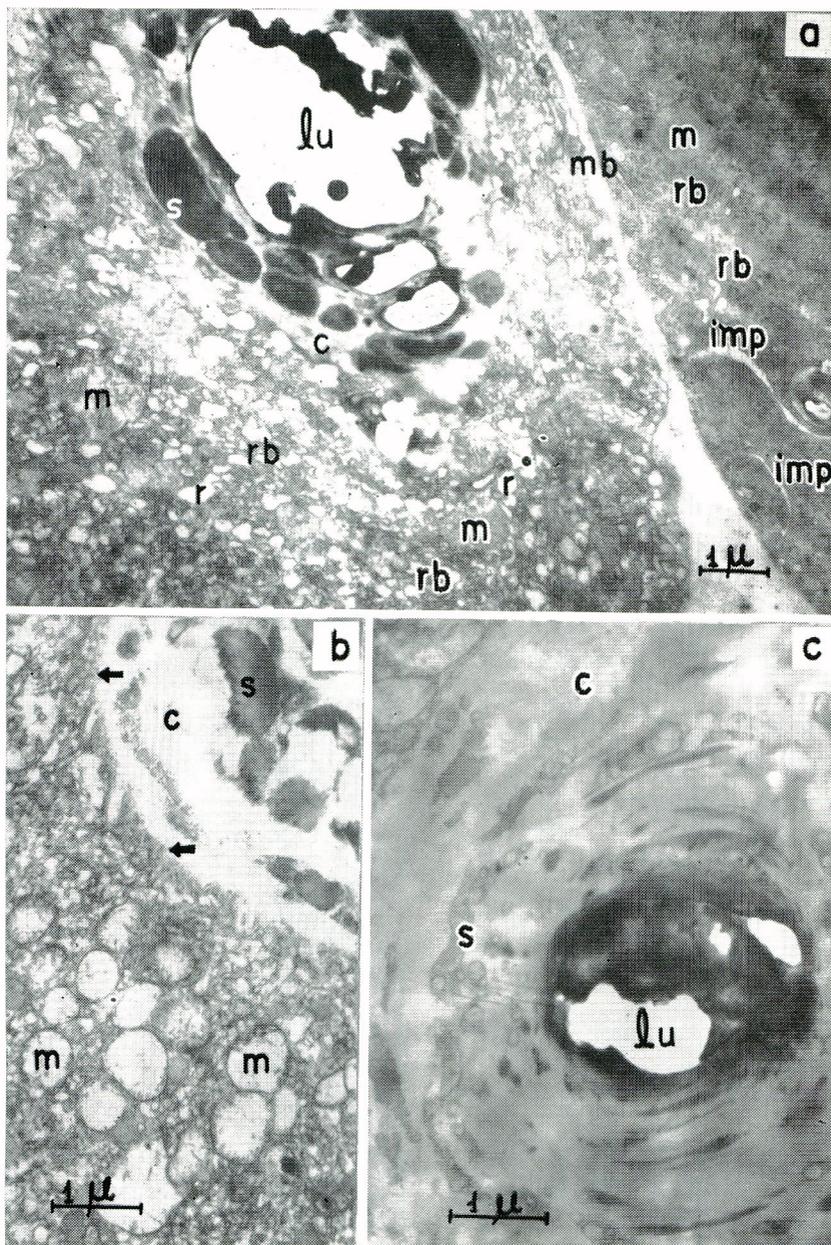
Estampa 28: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 2. a, a figura mostra o retículo (r) alargado, formando vesículas em torno das quais se vêem numerosos ribossomas. Estão presentes também grandes gotas lipídicas (material fixado em Palade); b, material fixado em McAlear, as mesmas bolsas vistas em ilustração anterior mostrando no seu interior pequenas vesículas densas (flexa preta). Fora da membrana das bolsas aparecem as mesmas vesículas, de maior tamanho (flexa branca); c, esta foto mostra os mesmos componentes espalhados pelo citoplasma. Provavelmente trata-se de pequenos grânulos lipídicos (li); d, neste estágio já começam a aparecer os arranjos concêntricos das membranas do retículo que denominamos parassomas (p).



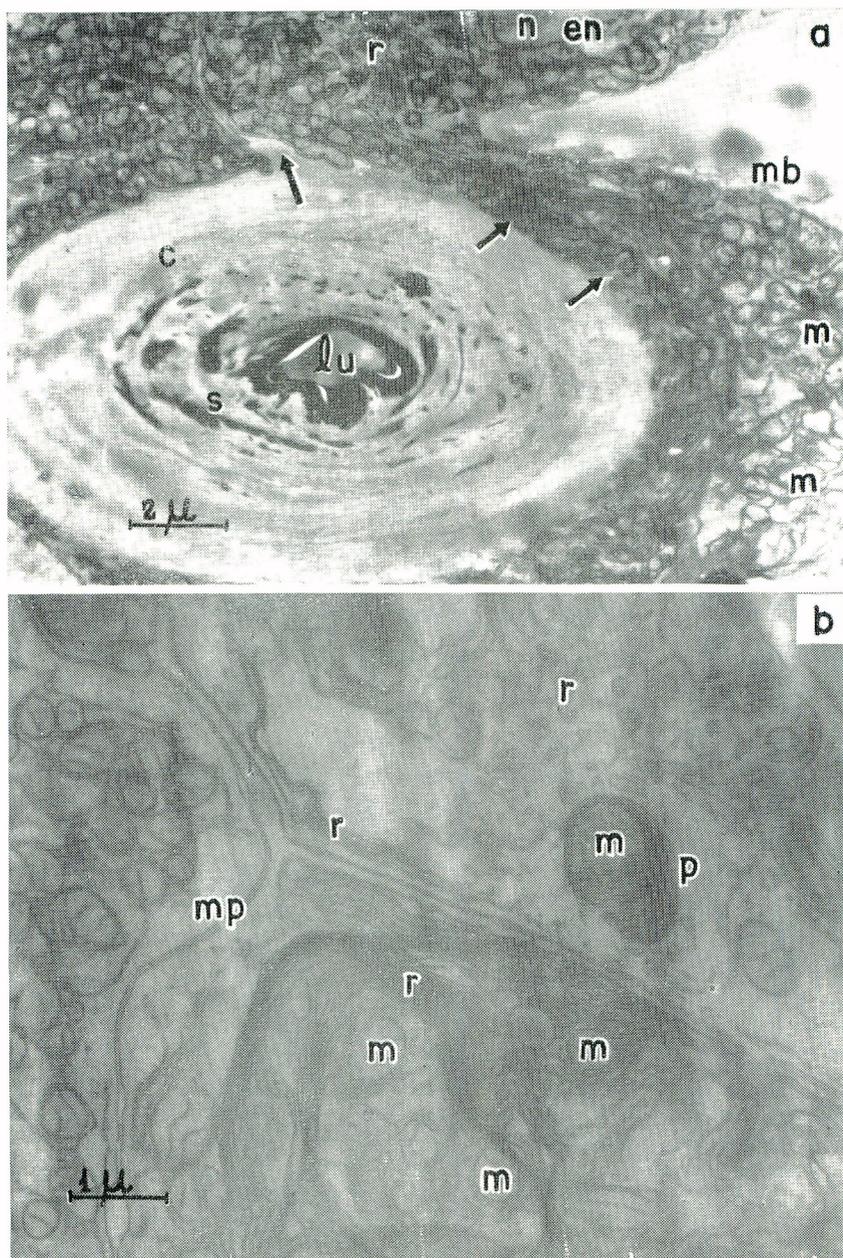
Estampa 29: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 2, material fixado em McAlear. a, o corte ilustra a presença de grande quantidade de grânulos lipídicos (li) na célula secretora; b, mitocôndrios gigantes (mg) mostrando apenas fragmentos de cristas no seu interior (flexa).



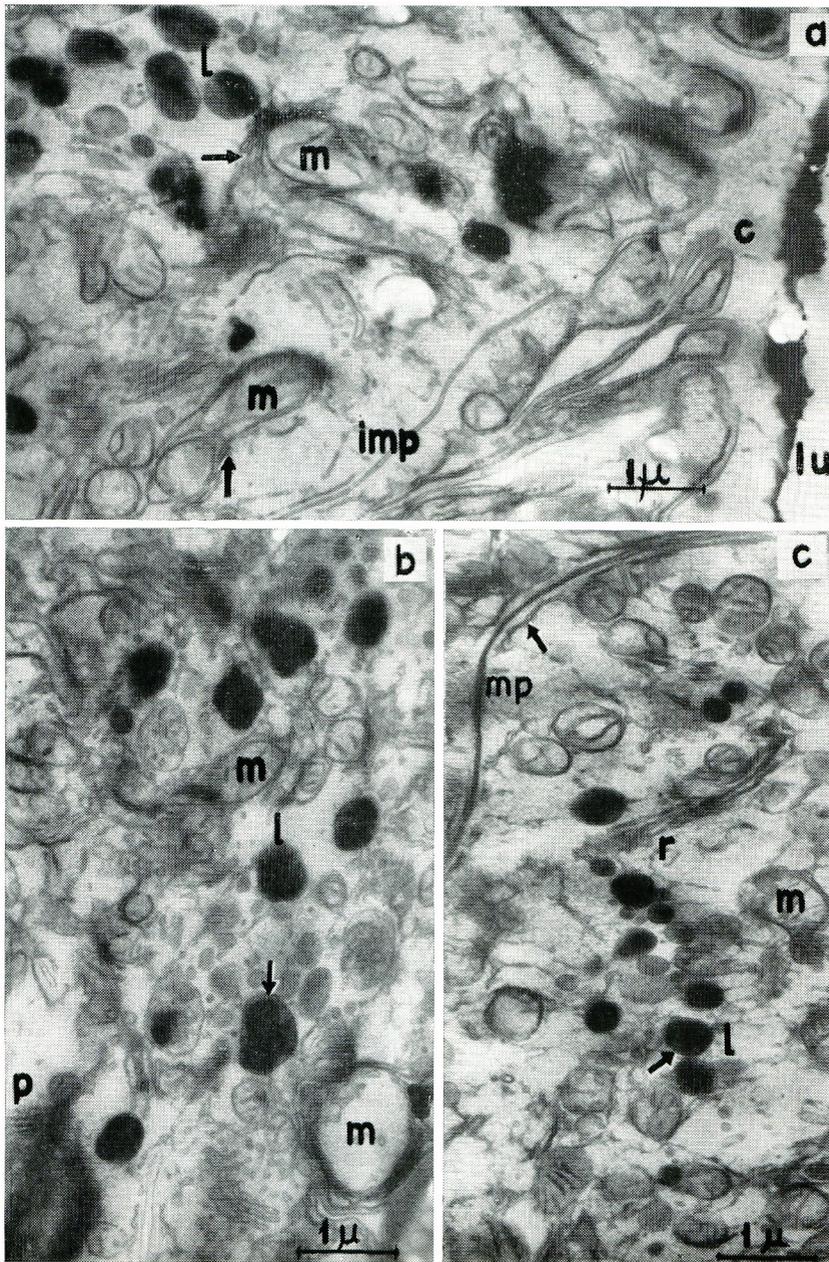
Estampa 30: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 2, material fixado em McAlear. Corte onde se vêem mitocôndrios gigantes (mg) nas células secretoras.



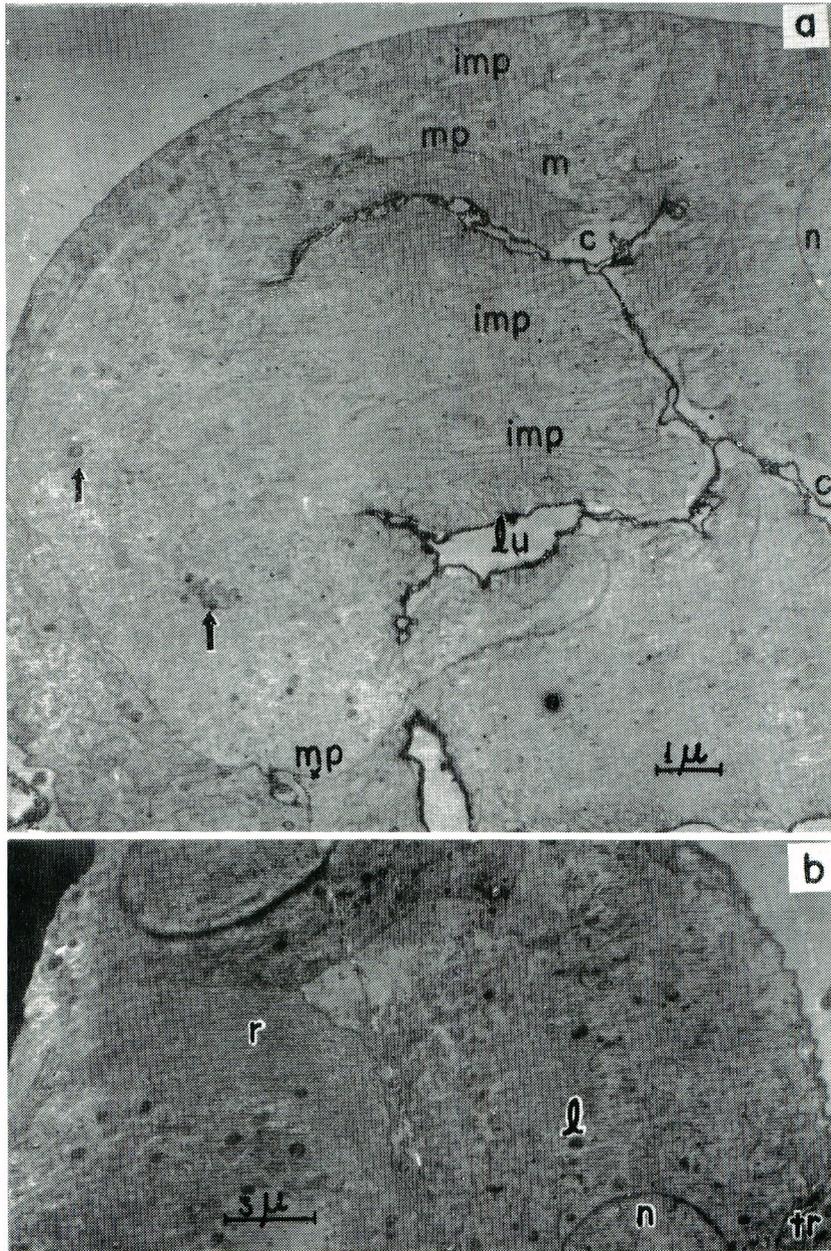
Estampa 31: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 3. a, fixação em glutaraldeído, vendo-se a secreção (s) formando bôlhas no interior da cutícula; b, material fixado em McAlear. As flexas indicam o fechamento das bolsas e a secreção aparecendo no corpo da cutícula (c) primeiro com partículas miudas e depois como grandes gôtas. A ilustração mostra o arranjo concêntrico da secreção acompanhando a estrutura da cutícula.



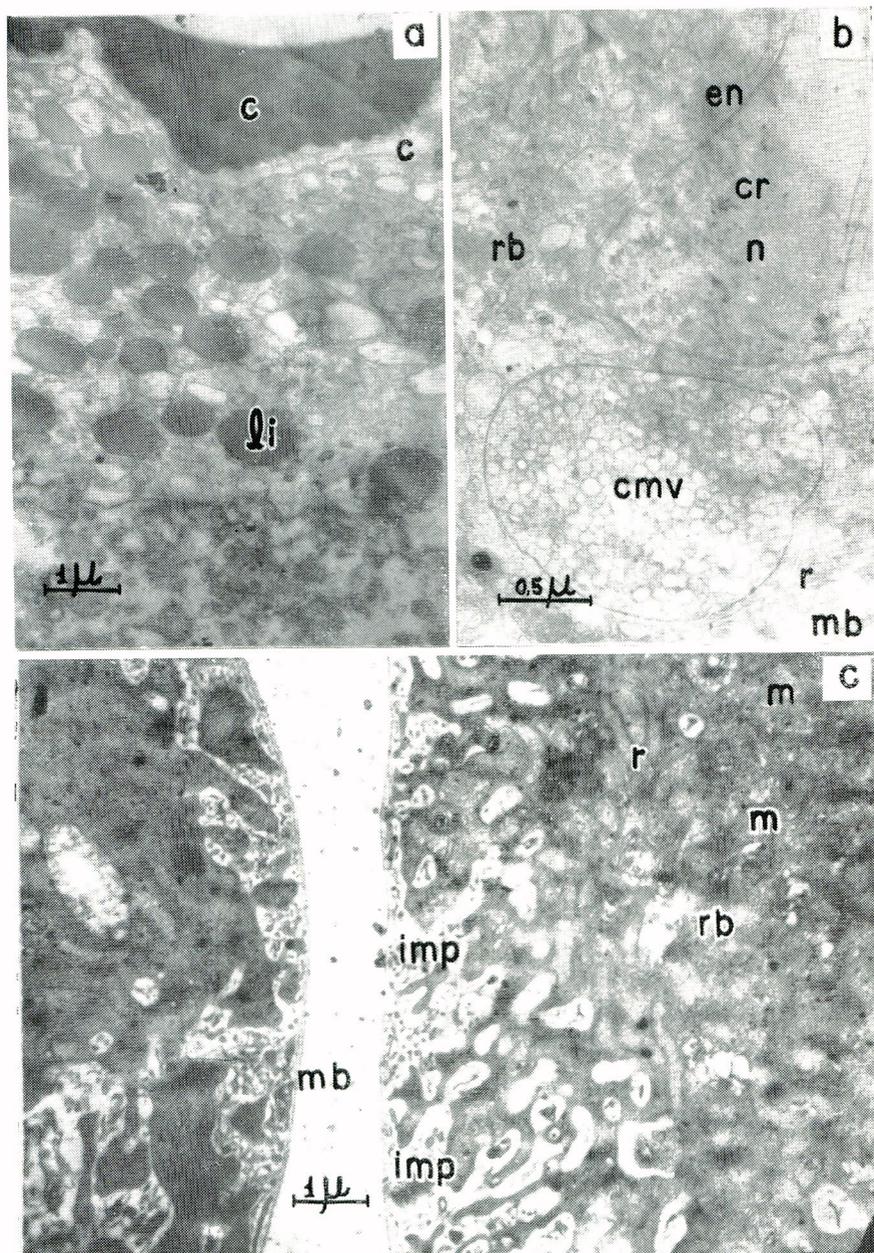
Estampa 32: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 4, material fixado em McAlear. a, corte da transição do ducto para o alvéolo secretor mostrando invaginações da membrana plásmica em vários pontos (flexa). Note-se a presença de secreção entre as camadas da cutícula e no lúmen; b, degeneração generalizada do citoplasma caracterizada pela tendência do retículo (r) para tomar a forma de lamelas concêntricas.



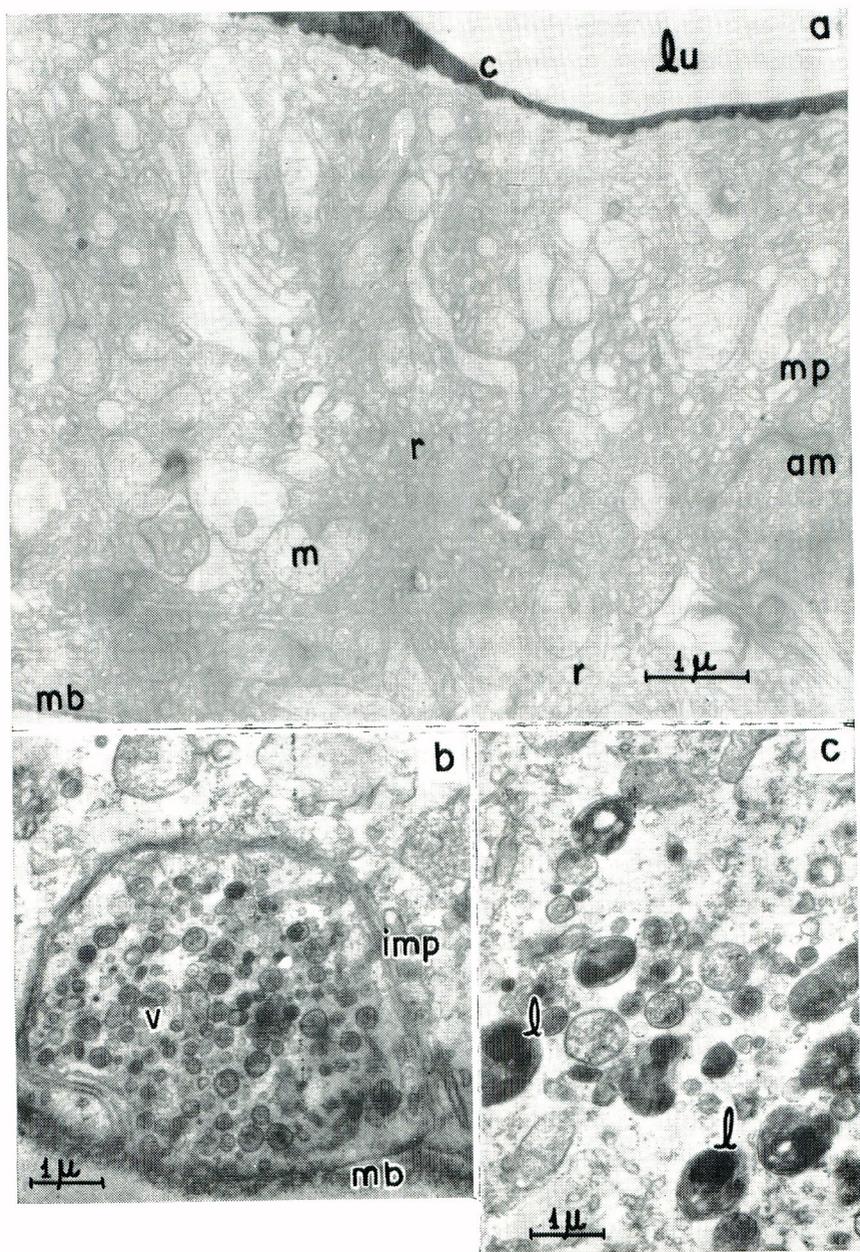
Estampa 33: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 4, material fixado em McAlear. a, note-se a presença de numerosos corpos densos (l) que interpretamos como lisossomas e a formação de lamelas concêntricas em tórno dos mitocôndrios; b, c, aspectos semelhantes ao anterior, mostrando várias fases da formação dos lisossomas (l) e parassomas (p).



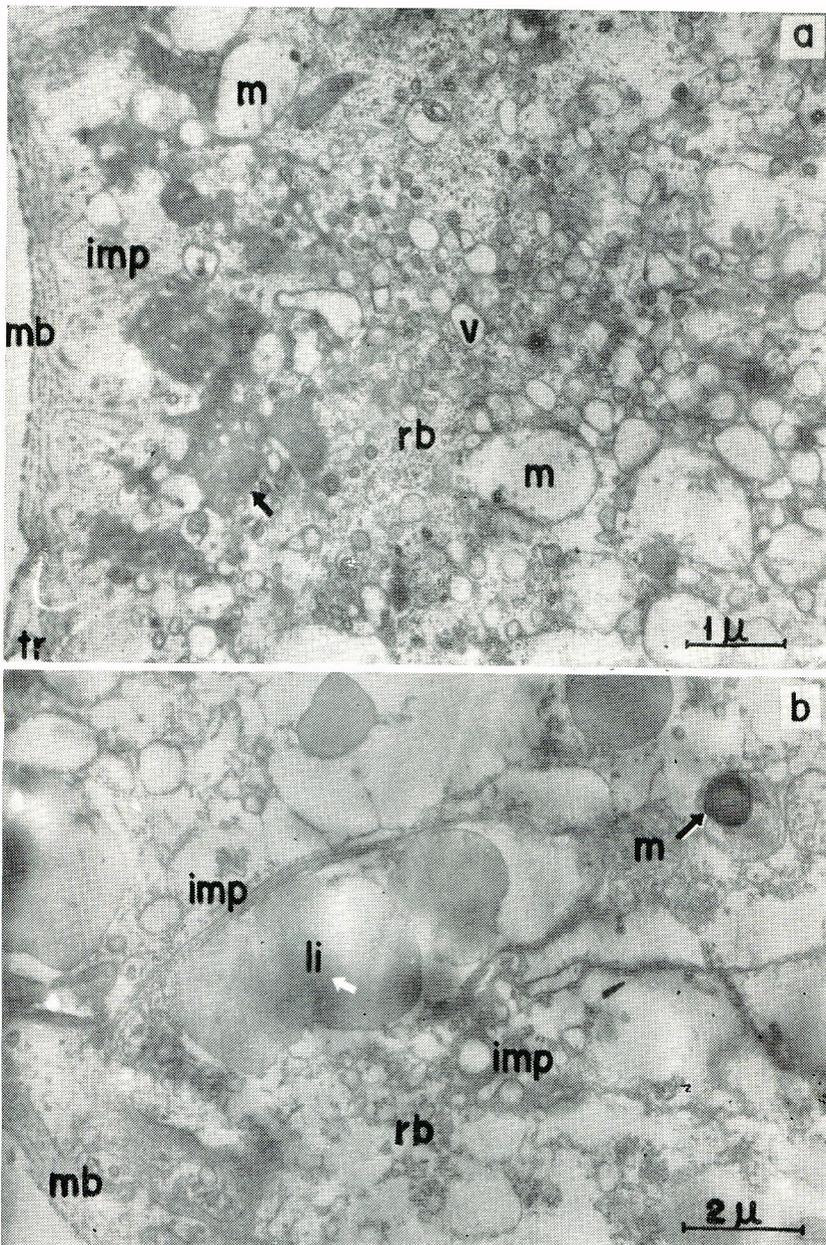
Estampa 34: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 5, material fixado em Palade. Aspectos gerais da célula nesta fase, após a eliminação da secreção. Notar a presença de restos do retículo, de lisossomas e parassomas. As células parecem não se achar tôdas num mesmo estágio, mesmo quando formando um só alvéolo (b). As traqueíolas (tr) estão freqüentemente presentes dentro da célula e a impregnação da cutícula pela secreção também não é rara.



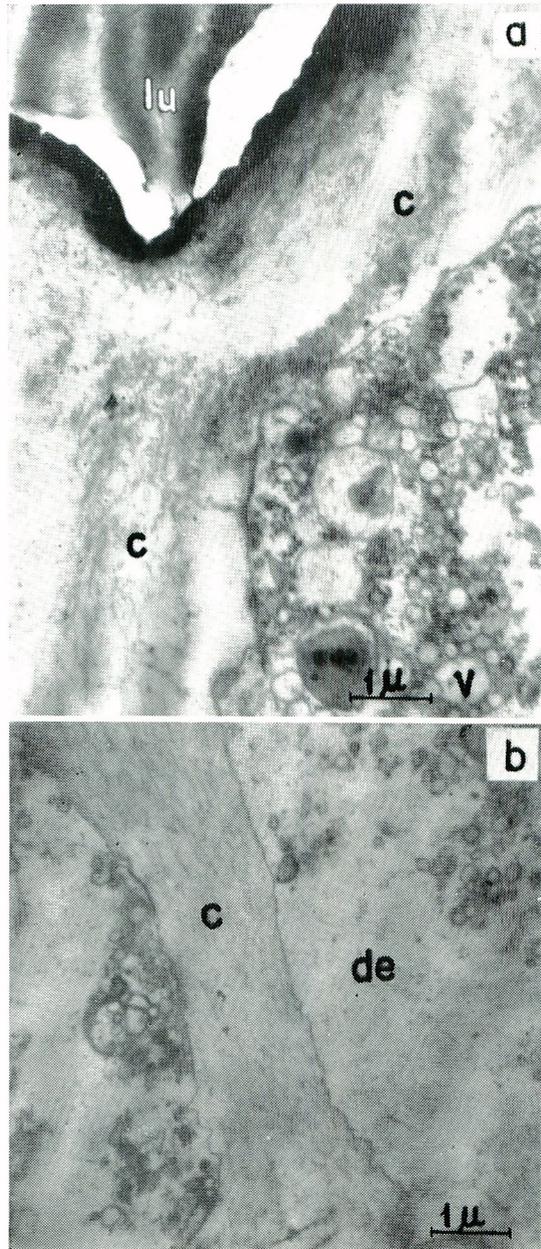
Estampa 35: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio *a* e *b*. Material fixado em Palade. *a*, nesta fase ainda se podem encontrar numerosas gôtas lipídicas (li) no citoplasma das células dos ductos, principalmente na parte apical; *b*, característica desta fase é também a presença de múltiplas vesículas envolvidas por uma membrana dupla (cmv); *c*, material fixado em glutaraldeído, mostrando invaginações da membrana plásmica formando espécie de canaliculos pinocitóticos. Isto ocorre em tôdas as fases e com características semelhantes, sendo mais visível neste tipo de fixação.



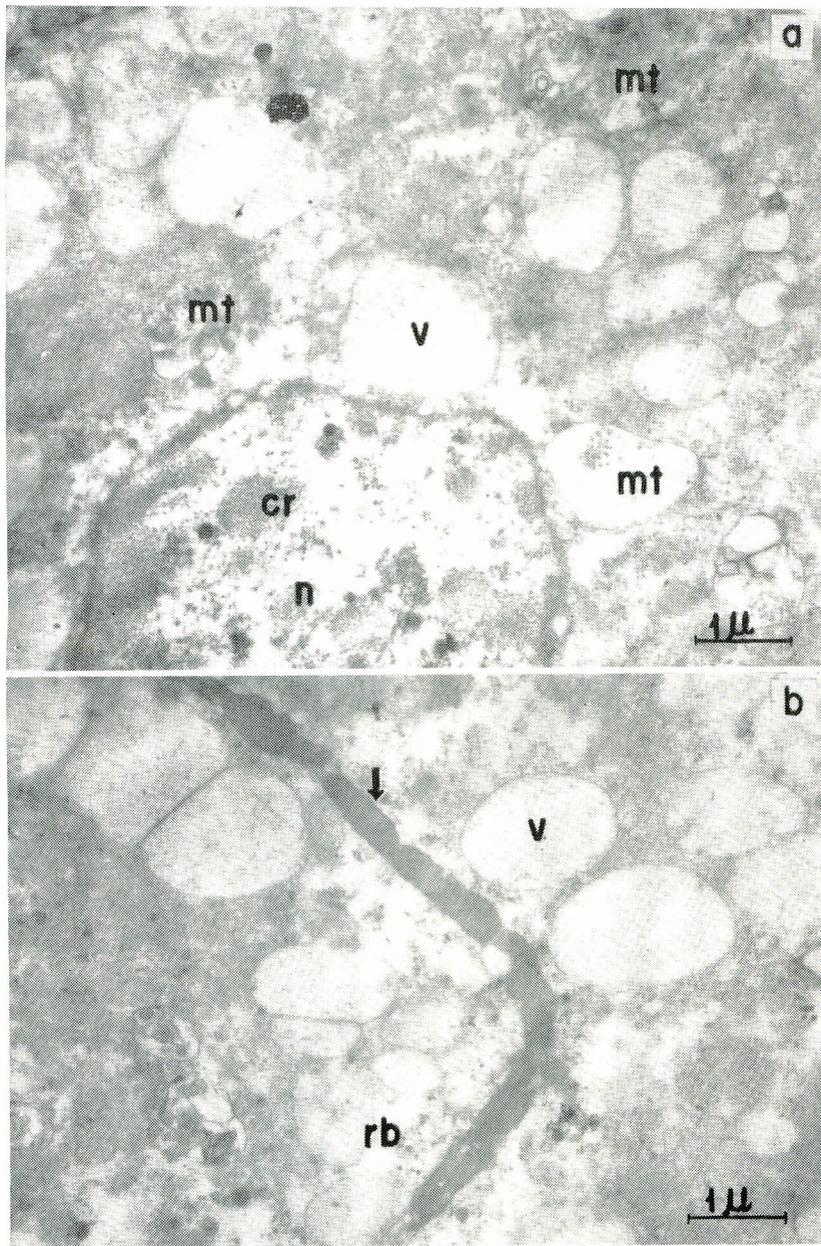
Estampa 36: Micrografia eletrônica da glândula salivar da cabeça de *Melipona quadrifasciata*. Estágio 5, material fixado em Palade. a, citoplasma de célula secretora inteiramente vesiculado; b, invaginação da membrana plásmica basal formando uma alça que mantém no seu interior numerosas vesículas (v) densas; c, vários tipos de lisossomas.



Estampa 37: Ducto excretor final de *Xylocopa*, material fixado em Millonig. a, célula do ducto mostrando citoplasma extremamente vesiculado, mitocôndrios em processo degenerativo (m) e massas de material denso periférico (flexa) de natureza desconhecida. A membrana basal (mb) é estriada paralelamente à superfície celular e apresenta invaginações (imp) onde as estrias se tornam perpendiculares; b, outro aspecto da mesma célula mostrando invaginações da membrana plásmica preenchida com material denso e gôtas lipídicas (li). A flexa preta mostra uma dessas gôtas em formação, com material granular ao redor, enquanto a branca mostra restos de material granular no limite de gôtas fundidas.



Estampa 38: Ducto de *Xylocopa*, material fixado em Palade. A montagem mostra a penetração de projeções da cutícula no interior das células, as quais atingem quase a superfície. Notar que a cutícula parece ser fibrilar e que as fibrilas se dispõem paralelamente ao maior comprimento da projeção. Ao redor da projeção parece existir um depósito (de) de material pouco denso, provavelmente secreção.



Estampa 39: Glândula salivar de *Megachile*. As células contêm citoplasma vesiculoso, sendo que há vesículas com material granular de baixa densidade (v) e vesículas contendo feixes de microtúbulos (mt). As invaginações da membrana basal aparecem como cordões densos (flexa) e quase atingem o ápice da célula.