Mem. Inst. Butantan
Simp. Internac.
33(3):701-710, 1966

7. ULTRAESTRUTURA DO APARELHO VENENÍFERO DE *APIS* (*HYMENOPTERA, APIDAE*)

C. DA CRUZ LANDIM e E. W. KITAJIMA

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Rio Claro e Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo, Brasil

Introdução

Os acessórios do ferrão são conhecidos nas abelhas com detalhes, desde o trabalho de Bordas(1), que fêz um estudo comparativo dêste órgão em várias espécies de himenópteros. Em *Apis*, como nas demais abelhas providas de ferrão, existem duas glândulas associadas à base dêsse órgão. A principal delas consiste de túbulo longo, fino e convoluto, localizado na parte posterior do abdomen. O túbulo termina apicalmente por uma bifurcação sob a forma de duas pequenas dilatações secretoras. Posteriormente, o túbulo se abre num reservatório, o saco de veneno (2). Esta glândula denomina-se ácida devido ao pH de sua secreção, e é aquela que produz o veneno.

A segunda glândula não se acha ligada ao ferrão, de maneira que a sua secreção possa ser injetada durante a picada, tendo sido denominada glândula básica.

Kerr e Lello (3) sugeriram a possibilidade da glândula ácida em *Bombus* ser secretora em tôda a sua extensão, estando porém a atividade mais intensa restrita à parte apical bifurcada. Sugeriram também que o saco de veneno poderia exercer função secretora. Por outro lado, Autrum e Kneitz (4), verificaram em *Apis*, que a secreção do veneno iniciava-se no final da pupação, pouco antes da emergência, atingindo seu máximo entre 10 a 16 dias de vida da abelha adulta.

No presente trabalho, pretende-se descrever a morfologia e ultraestrutura da parte apical bifurcada (glândula pròpriamente dita), e mediana da glândula ácida e do saco de veneno de pupas prestes a emergir e de abelhas adultas, campeiras.

Material e métodos

a. *Abelhas utilizadas* — 1. Pupas prestes a emergir, de operárias de abelhas híbridas (*Apis mellifera ligustica* e *A. mellifera adansonii*); 2. Operárias campeiras (aproximadamente 30 dias de idade) dos mesmos híbridos.

Pesquisa realizada sob os auspícios da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisas e Organização dos Estados Americanos.

b. *Técnicas histológicas para microscopia eletrônica* — As abelhas foram dissecadas em solução fisiológica (NaCl a 0,7%) tamponada para pH 7,1 com tampão fosfato, tendo sido estas abelhas prèviamente anestesiadas com resfriamento a 0°C durante 15 minutos. As glândulas e o saco de veneno, após sua extração, foram fixados em solução de tetróxido de ósmio (5) ou numa combinação de tetróxido de ósmio e permanganato de potássio (6). A desidratação foi efetuada em acetona e o material fixado, foi incluído em Epon 812 (7). Após serem seccionadas em ultramicrótomo Porter Blum, MT-2, as secções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila, durante 1 hora, e a seguir em hidróxido de chumbo (8), e examinadas em microscópio eletrônico Elmiskop I da Siemens.

Resultados

A. *Glândula ácida* — A fim de facilitar a exposição dos resultados, esta glândula foi dividida em duas porções arbitrárias, respectivamente, a parte apical, bifurcada e a porção mediana. Não se estudou a porção basal, em contacto com o saco de veneno, pois esta não difere histològicamente da região mediana.

1. *Pupas* — Nas pupas, a luz da glândula ácida, na extremidade apical dêste órgão, tem secção de forma estrelada e sua parede é formada de uma espêssa cutícula (ca. 5 μ), de material provàvelmente não esclerotizado, disposto em camadas concêntricas.Em tôrno desta cutícula achavam-se dispostas as células secretoras. Estas apresentavam-se com grandes vacúolos, dando à parte secretora um aspecto rendilhado. Não se observou uma membrana conspícua, limitando tais vacúolos (Fig. 1a). A semelhança do que ocorre em células vegetais, devido à presença dos enormes vacúolos, os núcleos destas células encontravam-se em geral comprimidos em pequenas faixas do citoplasma.

A porção citoplasmática destas células era rica em ribossomas, embora pobre em elementos do retículo endoplasmático (Fig. 1). Nas junções celulares, as membranas justapostas se apresentavam sinuosas nas secções, e em alguns pontos formavam alças. O espaço entre estas membranas justapostas achava-se preenchido por um substância densa, e em certas regiões elas se espessavam, o que talvez pudesse representar desmossomas, muito embora não tivessem um aspecto característico destas estruturas celulares. Nesta fase, os mitocôndrios ocorriam em pequeno número, uniformemente distribuídos nas células e se caracterizavam por abundantes cristas. Zonas de Golgi foram raramente observadas e em nenhum caso pôde-se identificar as vesículas de secreção, usualmente a elas associadas.

Dois tipos de núcleos foram constatados nestas células. Um grande, aproximadamente esférico, que representaria o núcleo da célula secretora de localização mais periférica e outro, menor, localizado próximo aos canalículos intracelulares ou à cutícula que reveste a luz da glândula. Nos núcleos maiores, notavam-se vários nucléolos bem desenvolvidos e um retículo de material cromático (Fig. 1). Disperso no nucleoplasma, apresentava-se grande número de grânulos densos, semelhantes aos ribossomas. Os núcleos pequenos não apresentavam nenhuma característica marcante. Aparentemente, os núcleos pequenos e os maiores estavam contidos nas mesmas células, isto é, nesta fase não se percebiam membranas divisórias compartimentando o citoplasma pertencente a cada tipo de núcleo. As células desta porção, como as da parte mediana e as do saco de veneno, apresentavam uma série de canalículos intracelulares. Tais canalículos

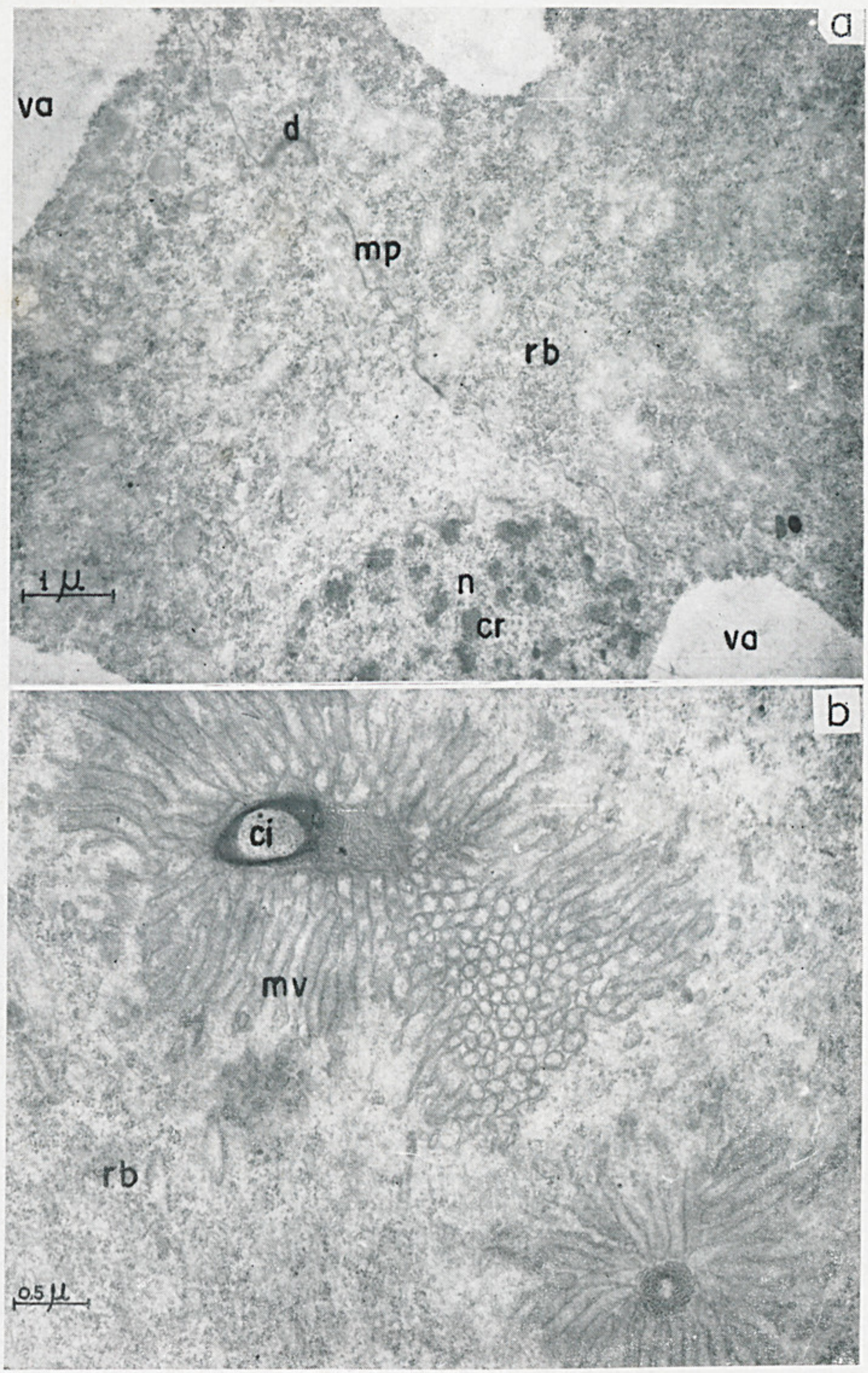

Fig. 1a — Micrografias da porção apical da glândula ácida da pupa, vendo-se grandes vacúolos (Va) sem membrana limitante, um retículo pouco desenvolvido (r) mas numerosos ribossomas (rb). As membranas separatórias das células (mp) têm espessamentos que podem ser tomados como desmossomas (d). Os canalículos intercelulares (ci) apresentam microvilosidades (mv) ao seu redor. Material fixado em Palade.

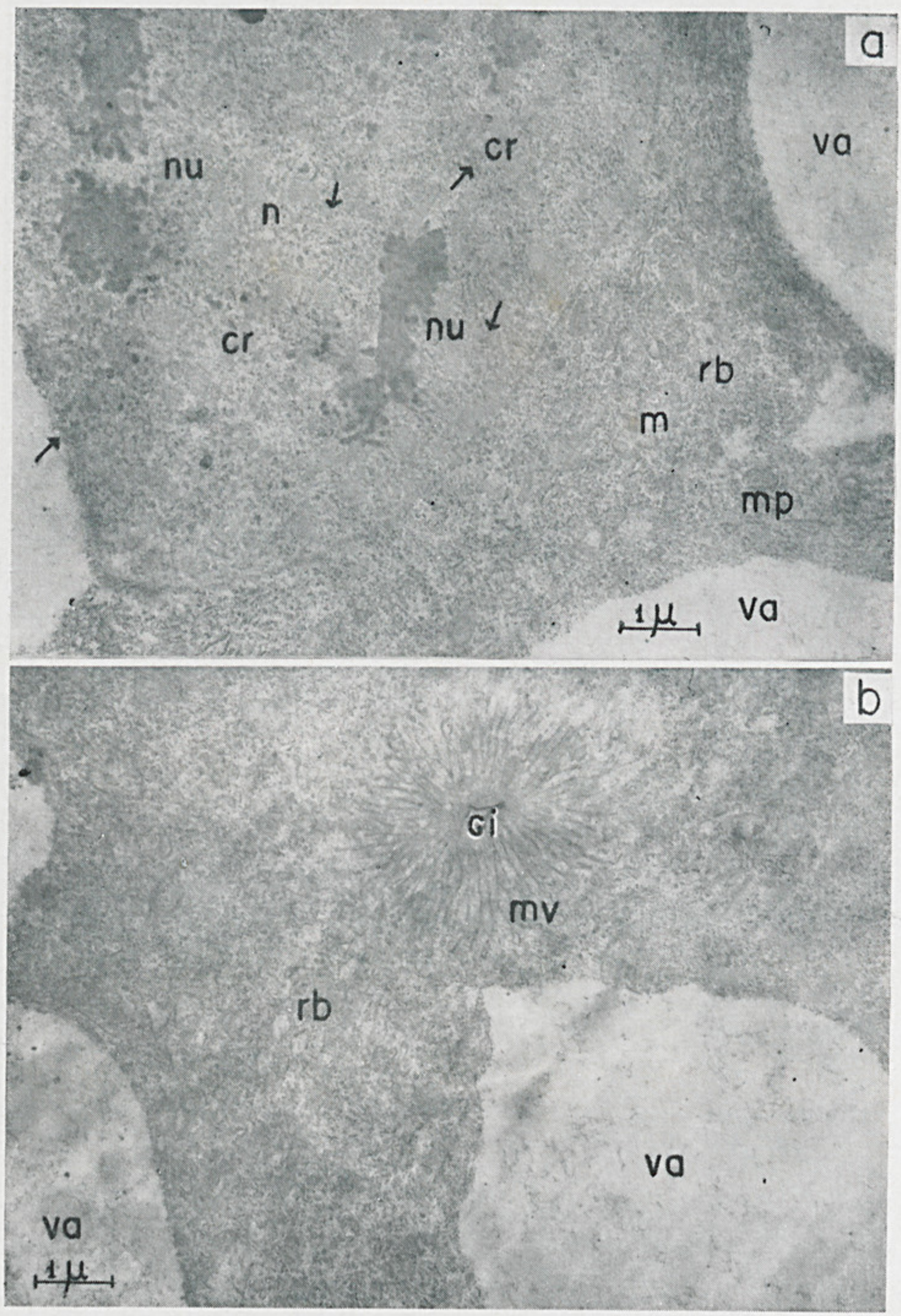

Fig. 1 — Micrografias da porção apical da glândula ácida de pupa, vendo-se os grandes vacúolos (Va) cheios com material pouco denso, os núcleos (n) comprimidos no citoplasma entre os vacúolos, canalículos intercelulares (ci) com microvilosidades (mv) ao seu redor, numerosos ribossomas (rb) e poucas lamelas do retículo (r). Material fixado em Palade.

possuíam uma parede densa, possìvelmente de quitina esclerotizada, disposta em camadas concêntricas e em sua luz ocorria uma substância granular de densidade média. Dois tipos de canalículos puderam ser distinguidos: um de diâmetro maior e de paredes mais espêssas, localizado preferencialmente próximo à luz da glândula (Fig. 2a); e outro mais fino, de paredes mais delgadas. Êstes últimos possìvelmente representavam ramificações menores dos primeiros e se caracterizavam por serem de menor calibre e se acharem envolvidos por microvilosidades da célula (Fig. 1 e Fig. 2a). Estas microvilosidades mediam cêrca de 1 μ de comprimento e 20-25 mμ de diâmetro e entre elas não se pôde notar nenhum material denso.

A região mediana da glândula ácida da pupa apresentava um aspecto muito semelhante ao descrito para a zona apical. As únicas diferenças encontradas foram quanto à presença de pequenas vesículas de cêrca de 30 mμ de diâmetro, contendo material relativamente denso, aparentemente associadas às microvilosidades em tôrno dos canalículos intracelulares. Os vacúolos eram bem menores do que os da região apical.

2. *Abelhas campeiras* — A porção apical da glândula dêstes indivíduos apresentava-se semelhante à da pupa, mas diferenciava-se pelo fato do citoplasma apresentar-se extremamente vesiculado e pela ausência dos vacúolos (Fig. 2a). Tais vesículas provàvelmente representariam elementos do retículo endoplasmático agranular alargados, mas com um conteúdo de baixa densidade.A zona citoplasmática, adjacente às microvilosidades apresentava-se menos densa e livre de orgânulos celulares, talvez refletindo um acúmulo de secreção, não organizada nesta região (Fig. 2a). Freqüentemente observou-se um alargamento do espaço entre as microvilosidades adjacentes, na porção basal, formando-se pequenas bôlsas. Todavia, a diferença mais marcante, quando comparada esta região das abelhas adultas com a das pupas, era a ausência quase total dos enormes vacúolos, ocorrendo êstes, em tamanho e número bem reduzido e próximos à luz da glândula, condição semelhante à verificada na região mediana da glândula da pupa. Nesta fase é possível perceber uma membrana plásmica divisória, próxima aos canalículos maiores.

Em abelhas campeiras, as células da região mediana da glândula apresentavam-se com sinais evidentes de degeneração, pràticamente sem orgânulos celulares distintos, restando sòmente identificáveis o núcleo e as vilosidades em tôrno dos canalículos. O resto do espaço intracelular achava-se preenchido por vesículas de forma e dimensões irregulares. Estruturas em forma de lamelas concêntricas aparecem freqüentemente nestas células e provàvelmente correspondem aos parassomas (p), que surgem caracterìsticamente em células em vias de degeneração (Fig. 2b).

B. *Saco de veneno* — Distinguem-se duas regiões no saco de veneno: a porção apical, onde desemboca a glândula ácida, formada de células relativamente altas e a zona basal, próxima ao ducto excretor, constituída de células bem baixas. A cutícula, revestindo êste saco, era muito espêssa, principalmente na parte basal, onde mostrava organização típica do exoesqueleto de insetos. Na parte apical, esta cutícula assemelhava-se à da glândula ácida. As células do saco de veneno ostentavam também canalículos intracelulares e pequenos núcleos próximos à cutícula e aos canalículos.

Na pupa, as células do saco de veneno diferenciavam-se das da glândula ácida por apresentarem invaginações da membrana plásmica associadas a mitocôndrios, na zona cortical. Nesta célula, pequenos bastonetes ou grânulos densos,

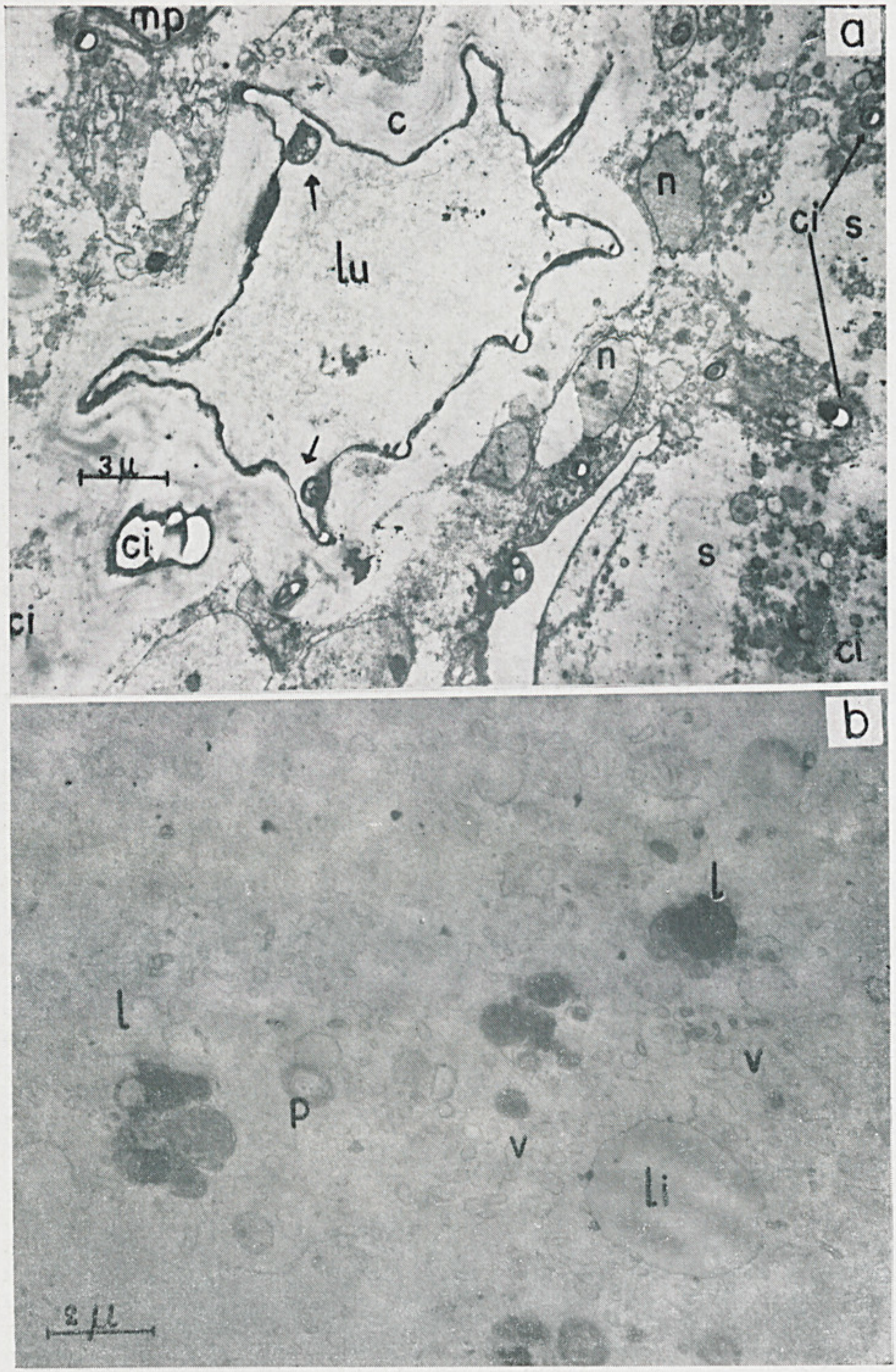

Fig. 2 — Glândula ácida de abelha campeira. a) Vista geral de um corte transversal da glândula, vendo-se a luz (lu) contendo material pouco denso, a cuticula (c) disposta em camadas concêntricas e o aspecto bastante deteriorado da célula. Notar que existem dois tipos de canalículos intercelulares (ci), sendo que os mais próximos à cuticula não têm microvilosidades ao redor. Os pontos marcados com *s* correspondem a depósitos de secreção. b) Detalhe da célula mostrando estruturas parecidas com os lisossomas (l) e estruturas lamelares concêntricas (p).

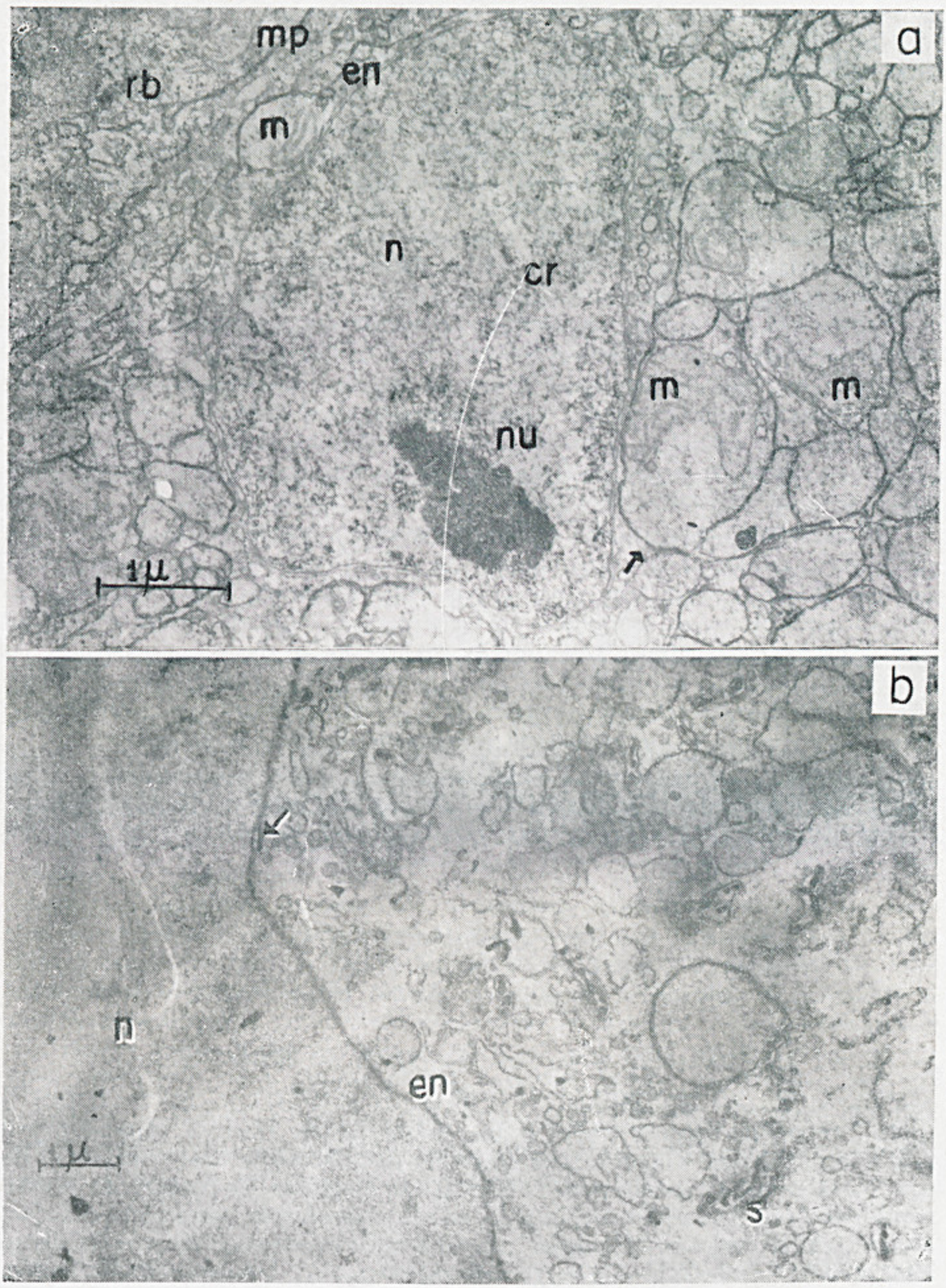

Fig. 3 — Saco de veneno. a) Vesículas contendo mitocôndrios em degeneração no interior. b) Origem de secreção a partir do núcleo. Bastões densos (bd) vêem-se primeiro entre as membranas do envoltório nuclear (en) e depois no interior de vesículas (v) no citoplasma.

de dimensões variadas (75-100 mμ × 100-400 mμ), foram encontrados (Fig. 3b). Êstes ocorriam livres no citoplasma, agrupados ou individualmente no interior de vesículas e também freqüentemente no espaço perinuclear (Fig. 3b). Mitocôndrios, de forma atípica, foram encontrados em células de abelhas adultas. Êstes mitocôndrios apresentavam-se com poucas cristas, e um substrato muito denso e embora alguns ocorressem normalmente no citoplasma, outros apareciam freqüentemente em diversas fases de degeneração, encerrados em vesículas (Fig. 3a). Além destas vesículas contendo mitocôndrios, numerosas outras, contendo um material de baixa densidade ocorrem nestas células. Tais vesículas parecem aumentar à medida que envelhece a abelha e, presumìvelmente, originam-se do retículo endoplasmático. Na base das microvilosidades que circundam os canalículos intracelulares, freqüentemente observam-se pequenas e numerosas vesículas e também gotículas densas, provàvelmente de natureza lipídica. As paredes dos canalículos, por outro lado, ocasionalmente mostravam interrupções semelhantes àquelas descritas na glândula hipofaríngea de *Apis* (9).

Estruturas consideradas como lisossomas foram freqüentemente encontradas nestas células do saco de veneno. Tais orgânulos eram limitados por uma membrana simples e continham grânulos densos e lamelas concêntricas em seu interior. Nas células da região mediana do saco de veneno foram encontradas diferentes fases de evolução destas estruturas.

A musculatura que envolve o saco de veneno, bastante desenvolvida, dispunha-se tanto circular como longitudinalmente. As fibras desta musculatura eram do tipo estriado, embora não apresentassem tôdas as características de uma musculatura estriada típica. As células musculares eram alongadas tendo miofibrilas apenas na porção central. Tais fibrilas mostravam, a espaços proximados de 3 μ, linhas densas que corresponderiam à linha Z (10). Lateralmente às miofibrilas, elementos do retículo endoplasmático e mitocôndrios foram observados. Tal tipo de musculatura é encontrado comumente em vísceras de insetos.

Traquéias, com armação helicoidal de quitina, foram freqüentemente encontradas nas células da glândula ácida e do saco de veneno. Membrana basal, espêssa, de densidade mediana estava invariàvelmente presente nas células glandulares e do saco de veneno, bem como nas musculares.

Discussão

Tôda a glândula ácida, da pupa de *Apis*, parece ter atividade secretora, confirmando e até reforçando as observações de Autrum e Kneitz (4). Porém, em abelhas de 30 ou mais dias de idade, a glândula ácida acha-se degenerada, restando parcialmente intacta apenas a porção apical. Estas observações sugerem que o processo degenerativo destas glândulas progride da parte basal para a apical. O veneno produzido pela abelha durante a fase final da pupação e primeiros dias da vida adulta é armazenado no saco de veneno até o momento do uso. Geralmente as operárias de *Apis* picam uma vez só porque, ao fazê-lo, perdem o ferrão, essa talvez seja a causa da degeneração precoce da glândula ácida. Em *Bombus* (3) mesmo nas abelhas campeiras, tôda a glândula é secretora, mas esta abelha não deixa o ferrão ao picar. Fenômeno similar ocorre no saco de veneno, onde principalmente as células apicais passam por processos degenerativos.

Particularmente notável é a ausência pràticamente total do complexo de Golgi, neste sistema venenífero, pois sua importância nos fenômenos de secreção

é bastante conhecida (5).Esta ausência talvez seja explicável pelo fato de a secreção ser armazenada, intracelularmente, em enormes vacúolos na fase pupal, pois o complexo de Golgi teria mais função como concentrador da secreção.

Nas abelhas adultas, aparentemente haveria a secreção de substâncias diferentes daquelas produzidas durante a pupação e eliminadas nos primeiros dias da vida adulta.

Os bastonetes ou grânulos no saco de veneno, que migrariam do espaço perinuclear para o citoplasma, poderiam representar uma destas substâncias. O envolvimento do núcleo em atividades secretoras já foi relatado em hipotálamo de rato associado à neurosecreção (11). Também as vesículas associadas ou não a mitocôndrios, poderiam conter outro tipo de secreção, embora mais pareçam um resultado de degeneração celular.

O conteúdo dos enormes vacúolos encontrados em células das glândulas ácidas de pupa representaria uma secreção ainda não eliminada. Possìvelmente nas fases subseqüentes da existência da abelha, tal secreção seria lançada para a luz da glândula, sendo armazenada aí ou no saco de veneno, pois em células de abelhas adultas, em vias de degeneração, não há sinal de acúmulo desta secreção.

É provável que a glândula ácida produza uma parte do veneno, ao qual são adicionadas posteriormente outras substâncias, secretadas pelo saco de veneno. Estas últimas, poderiam determinar a especificidade do veneno de cada espécie de abelha, uma vez que se originam em íntima relação com o núcleo.

Evidentemente os canalículos intracelulares devem funcionar como um sistema coletor da secreção. Tais canalículos facilitariam a eliminação da secreção aumentando a superfície polarizada (12, 9). As dobras da superfície celular em forma de microvilosidades que envolvem os canalículos, principalmente nas suas ramificações menores, proporcionariam uma superfície maior para a eliminação da secreção. É provável ainda que, principalmente na glândula ácida, em que a secreção parece ser mais fluida, parte do solvente possa ser reabsorvido pelas microvilosidades antes da secreção passar para a luz do canalículo, o que representaria uma economia de água para a célula.

A origem dos canalículos intracelulares parece ser diferente da das células secretoras. Freqüentemente, adjacentes à cutícula e aos canalículos, estão células achatadas e de núcleo pequeno. As membranas separatórias entre estas células e as secretoras não são visíveis nas abelhas jovens, mas tornam-se evidentes nas abelhas campeiras. Isto reforça a teoria (4) da origem independente das células secretoras e formadoras da cutícula e canalículo. Neste caso a cutícula seria uma verdadeira íntima.

As presentes observações confirmam também o ponto de vista de que os canalículos intercelulares estão, na realidade, topològicamente fora das células secretoras e portanto sua denominação é incorreta (12). Tais canalículos apresentam-se tìpicamente separados da célula secretora por uma membrana plásmica, normal ou dobrada em forma de microvilosidades.

O aparecimento de estruturas consideradas como parassomas e lisossomas, além da extensa vacuolização do citoplasma, anomalias no núcleo, etc., devem representar inegàvelmente, sinais flagrantes da degeneração das células glandulares e do saco de veneno nos indivíduos adultos.

A musculatura em volta do saco de veneno deve estar associada à injeção do veneno na vítima, durante o ato da picada.

Summary

Electron microscope studies were made on acid gland and venom sac of *Apis* workers. Workers of *Apis* are studied in the pupal phase and adult foragers (30 days older). In pupa all lenght of acid gland and the apical portion of venom sac was secretory and probably was in great activity. In adult workers the cells of acid glands and the venom sac degenerate. The degeneration was less intense in the apical portion of the acid gland.

In pupa acid gland cells, appear enormous vacuoles that possibly contain the secretion of this phase. In adults this vacuoles practically desappear. It was suggest that the adults secrete another type of substances. In the venom sac dense material in form of rods or small granules free or within vesicles seem to be the secretion. These materials appear in the cell always associated with the nucleus, first located in the perinuclear space.

The venom sac is provided with a powerful striated musculature, that probably add in the venom injection.

Bibliografia

1. BORDAS, M. L., *Ann. Sci. Nat. Zool.*, **19**, 1, 1895.
2. SOTELO, J. R., and PORTER, K. R., *J. biophys. biochem. Cytol.*, **5**, 327-342, 1959.
3. KERR, W. E., and LELLO, E., *J. N.Y. enthomol. Soc.*, **70**, 190-214, 1962.
4. AUTRUM, H. VON, und KNEITZ, H., *Biol. Zbl.*, 593-602, 1959.
5. PALAY, L. S., in L. S. PALAY (Editor), *Frontiers in Cytology*, New Haven, Yale, Univ. Press., 1958, pp. 305-342.
6. MILLONIG, G., *J. Cell Biol.*, **11**, 736-739, 1961.
7. McALEAR, J. H., *Ann. Histochem.*, Suppl. 2, 261-276, 1962.
8. MILLONIG, G., in BUFFA (Editor), *From Cell to Molecules, Symposium on Electron Microscopy*, Roma, 1964, pp. 347-362.
9. BEAMS, H. W., and KING, R. L., *J. Morphol.*, **53**, 223-241, 1932.
10. FORBES, A. R., *Mem. entomol. Soc. Canada*, **36**, 1-75, 1964.
11. KAWABATA, I., *J. Cell. Biol.*, **26**, 101-113, 1965.
12. BEAMS, H. W., and ANDERSON, E., *J. Morphol.*, **109**, 159-171, 1961.