

**KENNER MORAIS FERNANDES**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DIGESTIVAS E  
REGENERATIVAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Melipona  
quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA; APIDAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

KENNER MORAIS FERNANDES

**ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DIGESTIVAS E  
REGENERATIVAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Melipona  
quadrifasciata anthidioides* (HYMENOPTERA; APIDAE)**

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

APROVADA: 21 de setembro de 2009.

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Coorientador)

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(Coorientador)

---

Prof. Gustavo Ferreira Martins

---

Prof. Vinicius Albano Araújo

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Orientador)

“Hoje entendo bem meu pai. Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

(Mar sem fim, Amyr Klink, pág 76-77)

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV pela oportunidade e a Capes pelo apoio financeiro;

Ao meu orientador Clóvis Andrade Neves pela confiança, paciência e amizade;

Aos meus co-orientadores e conselheiros, Prof. José Eduardo Serrão, Sergio Oliveira de Paula, Gustavo Ferreira Martins e Lúcio Antônio Campos, pelo auxílio e valiosas sugestões na condução e finalização deste trabalho;

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural, Sergio, Izabel, Lino e Adilson pelo apoio, auxílio e orientações;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Estrutural, que sempre estiveram à disposição quando precisei;

A Prof.<sup>a</sup> Silvia das Graças Pompolo, por permitir a utilização do laboratório de Citogenética.

As Sergetes: Marli, Carol, Susu, Michele, Dani, Daiane, Maytê, Kiki, Fabiola, Diane, Diego e Juliana, por todos os momentos divertidos e inesquecíveis que me proporcionaram;

Aos farelos da sala de justiça: Lilian, Arlete, Jane, Fernandim, Odair, Rômulo, Sirlene, Katiane, Claudinha, Bife, Silvita, Josemar, Marcília, Maria Fernanda, Dani Valente, Camilo, Marilane, Renato Nunes, Matheus, Daniel, Paulo, Lucas, Fabiano e Vinicius, pelo companheirismo e ensinamentos. Em especial ao Alex, pela amizade, auxílio e valiosos conselhos;

Aos amigos de Valadares que tanto me ensinaram no decorrer da minha história, Zé Luiz, Ygho Pereira, Amilcar, Amim, Chipam, Nedão, Russell, Fabio Inha, Rony, Cachorro, Boca, Renatinho Macarrão, Gerson, Marquim porteiro, Thiago Dentão, Rico, Saulo, Osmar,

Moacir, Carlim, Netinho, Leozera, Fanu, Bolinha, Vinicius do Bar, Coxinha, Neguim, Pedrim, Netim cabeça, Nilson Pezão e toda turma do bairro São Pedro;

Ao amigo e companheiro Marcos Jorge Junior que participou ao meu lado de todas as vitórias e derrotas dos últimos seis anos;

Ao Prof. Max Pereira Gonçalves, mais que um professor, um amigo com quem interagi tantos anos e com quem participei de lutas que me trouxeram experiências e amadurecimento;

Aos meus antigos professores e amigos, Edmilson Amaral, Estevaldo Conde, Nelson Saunders, Márcio Mendes, Waleska Bretas, pessoas de valor, com grande senso de amizade. A história já mostrou que muitos homens de valor nem sempre foram reconhecidos na sua época;

A minha família, principalmente ao meu tio Paulo, que sempre me apoiou incondicionalmente e a minha tão amada avó, Vitória Medeiros que além de ser minha segunda mãe, sempre foi uma pessoa fantástica a qual procuro sempre me espelhar;

Aos meus pais Celso e Maria Eugênia, e irmãos, Kennedy e Keysianne, pessoas que sempre foram exemplos de coragem, amor, determinação e perseverança;

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	6
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
4 - RESULTADOS.....	9
5 - DISCUSSÃO.....	12
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
7 - CONCLUSÕES GERAIS.....	31

## RESUMO

FERNANDES, Kenner Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Análise quantitativa de células digestivas e regenerativas do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera; Apidae)**. Orientador: Clóvis Andrade Neves. Co-orientadores: José Eduardo Serrão e Sérgio Oliveira de Paula.

As abelhas possuem importância econômica pelo seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas, na produção de mel, cera e própolis. As abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) destacam pela especificidade como agentes polinizadores de diversas espécies vegetais nativas, se destacando a espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Kerr et al., 1996). Sendo assim, conhecimentos sobre a biologia dessa espécie pode facilitar seu manejo e conservação. O intestino médio é o local onde ocorre a digestão e a absorção de praticamente todos os nutrientes ingeridos pelos insetos. O epitélio é formado por três tipos celulares: as células digestivas ou principais, as células regenerativas e as células endócrinas. O tempo de desenvolvimento do ovo até imago não difere muito entre as castas, a longevidade é bastante desigual. Em operárias de várias espécies de abelhas sem ferrão, o tempo de vida após a emergência está em torno de 50 dias, enquanto em rainhas pode chegar a 7 anos. Alguns autores afirmam que, embora seja comum a ocorrência de mitoses em células regenerativas em exemplares adultos de vários grupos de insetos, isto não ocorre nos Hymenoptera. Sendo assim, espera-se que a longevidade dos indivíduos da ordem Hymenoptera esteja diretamente relacionada com o número de células regenerativas no momento da emergência para fase adulta, sendo definido a pupação. Embora existam estudos sobre as células digestivas e regenerativas do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*, no presente trabalho associamos a histologia clássica com a técnica que consiste em observar o intestino médio em montagem total, permitindo uma melhor análise das células digestivas, regenerativas e

possíveis mitoses. Observamos variações ao longo do intestino médio e entre as castas com relação às células digestivas e ninhos de células regenerativas. As variações no tamanho e na quantidade de células digestivas e regenerativas entre as regiões do intestino médio de um mesmo indivíduo e entre as castas demonstram possíveis diferenças fisiológicas entre segmentos deste órgão no processo digestivo. O número de células regenerativas variou pouco entre as castas, mesmo comparando com rainhas de 3 anos, mostrando que possivelmente existe uma renovação nos ninhos de células regenerativas. Entretanto foi observada apenas uma imagem de mitose, dentre todos os exemplares analisados permitindo concluir que o mecanismo de renovação das células do epitélio digestivo possa prescindir desse processo. Os mecanismos que regem a manutenção e renovação das células regenerativas no intestino médio de Hymenoptera permanecem pouco conhecidos. O presente estudo sugere que as células regenerativas de *M. quadrifasciata anthidioides* podem ser células-tronco, mesmo tendo sido evidenciado pouca mitose, e que não existe uma relação direta entre o número de células regenerativas e a longevidade dos indivíduos.

## ABSTRACT

FERNANDES, Kenner Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september, 2009. **Quantitative analysis of digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera; Apidae)**. Adviser: Clóvis Andrade Neves. Co-Advisers: José Eduardo Serrão and Sérgio Oliveira de Paula.

Bees have economic importance for their role as crops pollinators, production of honey, wax and propolis. The stingless bees (tribe Meliponini) are specific pollinators of many native plant species, most notably the species *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Kerr et al., 1996). Thus, a deeper understanding of the biology of this species may facilitate a better management and conservation of them. Digestion and absorption of virtually all nutrients ingested by the insects take place in the midgut. The epithelium is composed of three cell types: digestive cells, the regenerative cells and endocrine cells. The development time of egg into imago does not differ greatly between varieties, the longevity being very uneven. In workers of several stingless bees species, life after emergence is around 50 days, while in Queens it can reach 7 years. Some authors state that, although it is common the occurrence of mitosis in regenerative cells in adult specimens of various insect groups, this does not occur in Hymenoptera. Therefore, it is expected that longevity of Hymenoptera individuals is directly related to the number of regenerative cells at the time of emergence to adulthood, set of the pupation. In the present study we associate the classic histology with the technique of observing the midgut in full assembly (whole mount preparation), allowing a better analysis of the digestive cells and regenerative potential mitosis as well. Variations were observed along the midgut and between varieties with respect to the digestive cells and nests of regenerative cells. The variations in size and amount of digestive and regenerative cells from the midgut areas of the same individual and among the varieties can indicate possible

physiological differences between segments of this organ in the digestive process. The number of regenerative cells varied slightly among the varieties, even if compared with queens of 3 years, showing that there is possibly a renewal in the nests of regenerative cells. However it was observed only one image of mitosis, of all samples analyzed. This way it can be concluded that the mechanism of renewal of gut epithelial cells can do without this process. The mechanisms towards the maintenance and renewal of regenerative cells in the midgut of Hymenoptera remain little known. This study suggests that the regenerative cells of *M. quadrifasciata anthidioides* may be stem cells, despite the small number of mitosis, and that there is a direct relationship between the number of regenerative cells and the longevity of individuals.

## 1. Introdução

As abelhas possuem importância econômica pelo seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas, na produção de mel, cera e própolis. As abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) destacam pela especificidade como agentes polinizadores de diversas espécies vegetais nativas, se destacando a espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Kerr et al., 1996). Sendo assim, conhecimentos sobre a biologia dessa espécie pode facilitar seu manejo e conservação.

Os insetos apresentam capacidade adaptativa e reprodutora, o que lhes permite ocupar os mais diversos ambientes. Parte desse sucesso adaptativo se deve à enorme variedade estrutural e a fisiologia do seu trato gastrointestinal que lhes permite utilizar ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Dow, 1986).

O trato digestivo dos insetos é geralmente dividido em três regiões: intestino anterior ou estomodeo, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeo (Chapman, 1998).

O intestino anterior dos insetos é revestido internamente por uma cutícula produzida pelas células epiteliais de revestimento desta região. É composto pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo. Geralmente a faringe é dilatada e, em insetos sugadores apresentam musculatura bem desenvolvida; o esôfago é curto e conecta-se com o papo, que tem a função de armazenar o alimento ingerido. O proventrículo controla a passagem de nutrientes do papo para o intestino médio (Chapman, 1998). Quando o proventrículo é desenvolvido, observa-se uma projeção de sua parte posterior para o interior do intestino médio formando a válvula cárdica (Billingsley & Lehane, 1996).

No geral, o intestino posterior possui a cutícula menos espessa e mais permeável do que o intestino anterior. Acredita-se que possa ocorrer absorção de nutrientes e água nessa região, o que não é evidenciado no intestino anterior. O piloro é a região de transição entre o intestino médio e posterior, e na maioria das vezes é o local onde surgem os túbulos de Malpighi (Chapman, 1998).

O intestino médio é o local onde ocorre a digestão e a absorção de praticamente todos os nutrientes ingeridos pelos insetos (Terra, 1990). Seu limite anterior é a válvula cardíaca e o posterior é o piloro. Geralmente é revestido pela membrana peritrófica ao invés da cutícula observada na outras regiões (Chapman, 1998). É envolto por fibras musculares finas dispostas em duas camadas. O epitélio é formado por três tipos celulares: as células digestivas ou principais, as células regenerativas e as células endócrinas (Neves, 2002; Neves et al, 2003; Cruz-Landim et al. 1996; Cruz-Landim e Mello, 1970).

As células digestivas são cilíndricas, altas e apresentam microvilosidades em sua porção apical; na região basolateral observa-se inúmeras pregas e invaginações. Essas células são responsáveis pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos (Terra, 1990). Apresentam algumas variações ao longo do comprimento do intestino médio, dependendo do momento fisiológico que se encontra ou das funções que exerce em determinada região (Billingsley & Lehane, 1996). O “tempo de vida” das células digestivas dos Hymenoptera é mais curto que o dos indivíduos que as possuem, havendo necessidade de renovação celular ao longo da vida (Cruz-Landim & Moraes, 2000). A renovação destas células está, em parte, sob controle genético, mas depende de uma rede complexa que inclui fatores ambientais e fisiológicos (Cruz-Landim et al., 1996).

Entre as células digestivas da maioria dos insetos encontram-se pequenas células regenerativas que podem se apresentar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares, que são fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Billingsley & Lehane, 1996). Esses conjuntos de células indiferenciadas se

apóiam na lâmina basal e suas superfícies não alcançam a luz. O núcleo volumoso apresenta cromatina dispersa e nucléolo evidente, o citoplasma é pobre em organelas, com exceção de mitocôndrias, que embora numerosas, são pequenas e apresentam poucas cristas, características típicas de células indiferenciadas. Apresentam também ribossomos livres e polirribossomos, além extensos perfis de retículo endoplasmático rugoso e glicogênio (Neves et al., 2003; Cruz-Landim, 1999). Essas células foram denominadas células-tronco (“stem cells”) por Baldwin e Hakim (1991) em *Manduca sexta*.

As abelhas são insetos holometábolos, ou seja, sofrem uma metamorfose completa durante o período de pupação, quando a larva no último instar sofre as alterações necessárias para originar o inseto adulto. Nos holometábolos, durante a metamorfose, o trato gastrointestinal é completamente remodelado, muitas células novas são formadas, enquanto outras morrem e algumas apenas se modificam (Buszczak & Seagraves, 2000, Klapper, 2000). Estas modificações estão ligadas a alterações na alimentação, a qual, em geral, é diferente na larva e no adulto (Gama & Cruz-Landim, 1984).

As abelhas sociais apresentam castas bem definidas, as quais incluem a rainha, responsável pela deposição de ovos, operárias, que fazem a maior parte das tarefas da colônia, e o zangão, responsável por fertilizar a rainha (Giannini & Bego, 1988; Michener, 2000). As operárias possuem polietismo, o qual é determinado por fatores fisiológicos, mas que se adaptam às necessidades da colônia. As diferentes tarefas realizadas pelas operárias são executadas em uma seqüência específica, variando de acordo com a idade ou seu estágio fisiológico. Operárias jovens geralmente alimentam a cria e são chamadas nutridoras, enquanto as mais velhas, que deixam o ninho para coleta de alimentos são as forrageiras (Hebling et al., 1964).

Sabe-se que embora o tempo de desenvolvimento do ovo até imago não difira muito entre as castas, a longevidade é bastante desigual. Em operárias de várias espécies de abelhas

sem ferrão, o tempo de vida após a emersão está em torno de 51 dias, enquanto em rainhas pode chegar a 7 anos (Kerr et al., 1996).

Raes et al (1994) citam a ocorrência de mitoses nos ninhos de células regenerativas em exemplares adultos de *Apis mellifera*, embora não tenham demonstrado nenhuma figura que atestassem esta ocorrência. Por outro lado, Cruz-Landim e Moraes (2000) afirmam que, embora seja comum a ocorrência de mitoses em células regenerativas em exemplares adultos de vários grupos de insetos, isto não ocorre nos Hymenoptera.

Sendo assim, espera-se que a longevidade dos indivíduos da ordem Hymenoptera esteja diretamente relacionada com o número de células regenerativas no momento da emergência. Ou seja, ele seria definido durante a pupação (Cruz-Landim & Moraes, 2000). Entretanto, mesmo durante a metamorfose o número de células observadas em mitose não parece ser suficiente para explicar o grande incremento que ocorre no número de ninhos durante a fase final da metamorfose (Cruz, 2008; Neves, 2002). É possível ainda que possa haver diferenças no padrão de diferenciação das células regenerativas entre as castas, pois figuras inequívocas de mitoses foram observadas recentemente em exemplares adultos de rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* (França, 2006).

Contudo, sabe-se que através do método clássico de contagem de figuras em mitose em cortes rotineiros, há uma tendência em se subestimar a verdadeira fração proliferativa dos tecidos em estudo, pois as células em divisão não são identificadas nas fases G1, S e G2 e, conseqüentemente, não podem ser consideradas (Amorim et al., 2001).

Dentre as técnicas utilizadas para se estimar o índice mitótico de determinados tecidos destacam-se o uso da autoradiografia de células marcadas com isótopos de timidina, o uso de bromohidroxiuridina (BrdU) e a imunohistoquímica (Zudaire et al.,2004).

Ao contrário do observado nos ninhos celulares do intestino médio de *Locusta sp.* (Zudaire et al., 2004), não foi possível detectar positividade para PCNA e nem figuras de mitose, facilmente observadas no intestino anterior de *M. quadrifasciata anthidioides* (Neves,

2002) e outros insetos (Moreira et al. 2008), nas células regenerativas de operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* durante a metamorfose (Cruz, 2008; Neves, 2002; Cruz-Landim et al. 1996). Além disso, estas técnicas não diferem os processos de endoduplicação de mitose, o que parece ser possível com o uso de anticorpos anti-histona H3 (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006).

Por outro lado, em algumas pupas de olhos pretos de *M. quadrifasciata anthidioides* foi comum a observação de células que supostamente atravessavam a espessa membrana basal. Se estas células forem células indiferenciadas que migram para o epitélio intestinal, isso poderia explicar o aumento repentino de células digestivas e regenerativas que ao final da metamorfose (Cruz, 2008).

Sendo assim, permanece uma incógnita, a origem das células regenerativas do intestino médio em adultos de Hymenoptera.

Embora existam estudos sobre as células digestivas e regenerativas do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*, no presente trabalho associamos a histologia clássica com a técnica que consiste em observar o intestino médio em montagem total, permitindo uma melhor análise das células digestivas, regenerativas e possíveis mitoses.

## **2. Objetivos**

Determinar o número e tamanho das células digestivas e regenerativas nas castas e sexos de *M. quadrifasciata anthidioides*, para testar a hipótese que indivíduos longevos apresentam menos núcleos de células regenerativas que aqueles com menor longevidade.

### 3. Material e Métodos

Sete operárias nutridoras, sete forrageiras, quatro machos haplóides, cinco rainhas virgens e três rainhas fisiogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* foram obtidas a partir de ninhos mantidos no apiário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

O intestino médio dessas abelhas foi dissecado em solução salina para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e transferidos para formalina de Carson (Carson et al., 1973) por 24 h em temperatura ambiente. Após a fixação, fragmentos com exatamente 1 mm de espessura das regiões anterior, média e posterior do intestino médio foram abertos e corados com diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 30 minutos, lavados em água destilada, montados com sacarose e analisados em microscópio de epifluorescência. Outros fragmentos foram desidratados em série graduada crescente de etanol, embebidos em historesina (Historesin, Leica), seccionados com 3  $\mu\text{m}$  de espessura, corados com azul-toluidina/bórax e analisados em microscópio de luz. Imagens com resolução 2040x1536 pixel foram obtidas com câmera digital (Q-Color 3, Olympus) acoplada aos microscópios.

Seis imagens (área total = 0,414  $\text{mm}^2$ ) foram selecionadas aleatoriamente obtidas com objetiva de 40X de cada fragmento de cada uma das regiões do intestino médio. As células digestivas e regenerativas foram contadas e o diâmetro dos seus núcleos medidos com auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics). Os valores das medidas dos núcleos refletem a média de vinte núcleos de células digestivas e dez núcleos de células regenerativas selecionados aleatoriamente em cada imagem.

As medidas de média, coeficiente de variância e desvio-padrão foram calculados para descrever as características das células digestivas e regenerativas das diferentes castas

investigadas. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Baseado no resultado desse teste, a comparação intergrupos e intragrupos dos valores médios das medidas foi realizada através do teste t- para as variáveis com distribuição normal e Mann-Whitney quando constatada distribuição não normal (Armitage & Berry, 1994).

## 4. Resultados

O intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* é constituído por um epitélio contendo células digestivas com borda estriada desenvolvida e células regenerativas localizadas entre as células digestivas, isoladamente ou em grupos, em contato com a membrana basal, sendo circundado por uma fina túnica muscular (Fig.1 A).

As células digestivas apresentam núcleos maiores e eqüidistantes se comparados com as células regenerativas. Seus núcleos são esféricos ou ovais, entretanto variações nesse padrão são observadas (Fig.1 B).

Observaram-se diferenças no tamanho dos núcleos e o número de células digestivas e regenerativas varia entre as diferentes regiões do intestino médio de um mesmo indivíduo e entre as castas. A região posterior do intestino médio das operárias nutridoras possui menos células digestivas do que as demais regiões ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, nas operárias forrageiras, na região posterior, esse número é mais elevado ( $P < 0,05$ ), enquanto nas rainhas e nos machos não há diferenças significativas no número de células digestivas entre as regiões.

Nos machos e nas operárias nutridoras não houve diferença no tamanho do núcleo das células digestivas entre as regiões anterior e posterior, que possuem em média  $120 \mu\text{m}^2$ . Nessas regiões eles são maiores do que os da região média que tinham  $77 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ). Nas rainhas virgens os maiores núcleos foram notados na região posterior com  $118 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ), enquanto nas operárias forrageiras e rainhas fisiogástricas não ocorreram diferenças no tamanho dos núcleos das células digestivas entre as regiões.

As células regenerativas estão em menor número na região anterior das operárias nutridoras e na região posterior dos machos, ambos contendo 10 células por ninho ( $P <$

0,05). Nas rainhas fisiogástricas a região posterior se diferenciou das demais regiões por possuir mais células regenerativas, 16 células por ninho ( $P < 0,05$ ). Nas operárias forrageiras e nas rainhas fisiogástricas o número de células regenerativas não variou entre as regiões.

O tamanho dos núcleos das células regenerativas variou entre as regiões. Nas operárias nutridoras e nos machos os maiores núcleos estavam na região posterior com  $34 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ); ao contrário, nas operárias forrageiras, os maiores núcleos de células regenerativas ocorreram na região anterior, com  $18 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ). Nas rainhas fisiogástricas a região média e posterior apresentaram núcleos de células regenerativas do mesmo tamanho ( $23 \mu\text{m}^2$ ) e esses eram maiores do que na região anterior que possui  $17 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ). Nas rainhas virgens não houve diferenças significativas nesse parâmetro entre as regiões do intestino médio.

Entre as castas, as células digestivas são mais numerosas nas regiões anteriores e médias das rainhas virgens 172 células por área ( $P < 0,05$ ). (Fig.2). Por outro lado, as rainhas fisiogástricas e os machos possuem os maiores núcleos de células digestivas quando comparados com as demais castas, em média  $173 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,05$ ). Entre as operárias, as nutridoras possuem os maiores núcleos ( $110 \mu\text{m}^2$ ), podendo ter mais que o dobro do tamanho das forrageiras ( $40 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,05$ ) (Fig.3).

As células regenerativas são mais numerosas na região posterior do intestino médio das rainhas virgens, tendo 17 células por ninho ( $P < 0,05$ ). Entretanto, quando se considera a região anterior, estas são mais numerosas nos machos com 13 células ( $P < 0,05$ ). Na região média não houve variação significativa no número das células regenerativas entre as castas (Fig.4).

As células regenerativas dos machos possuem os maiores núcleos dentre as castas em todas as regiões, acompanhado pela operária nutridora nas regiões anteriores e posteriores. Na região posterior dos machos e das operárias nutridoras foram observados os maiores núcleos

de células regenerativas com  $34 \mu\text{m}^2$ , enquanto nas operárias forrageiras foram os menores,  $10 \mu\text{m}^2$  em média ( $P < 0,05$ ) (Fig.5).

O número de células regenerativas por ninhos varia de cinco a vinte células e não foi possível estabelecer nenhum padrão entre as castas. Foram observados ninhos compostos exclusivamente por células com pequenos núcleos e outros com células contendo núcleos maiores. Entretanto, na maioria dos ninhos, pode-se observar uma grande variação no tamanho dos núcleos (fig.6 A, B, C e D).

Foi evidenciada uma única mitose na região posterior de um fragmento obtido de uma operária nutridora (Fig.6 E). Nas rainhas fisiogástricas, foi encontrado um grande número de células regenerativas isoladas em todas as regiões (Fig.6 F).

## 5. Discussão

Embora existam estudos sobre as células regenerativas do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* (Cruz et al., 2008; França et al., 2006; Martins et al., 2005; Neves et al., 2002; Cruz-Landim et al. 1996), este trabalho se diferencia pelo fato de utilizar a técnica que consiste em observar o intestino médio em montagem total, permitindo uma melhor visualização e quantificação das células digestivas, regenerativas e de possíveis mitoses.

Histologicamente não foram notadas diferenças significativas no intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* entre as castas, como descrito por Cruz et al (2008). A parede desse órgão é constituída por células digestivas, de aspecto colunar com borda estriada desenvolvida. Entre elas podem ser reconhecidos na região basal, os ninhos de células regenerativas. As fibras musculares dispostas em duas camadas, uma interna circular e outra externa longitudinal circundam o intestino médio (Cruz-Landim, 1985; Neves, 2002).

Diferenças regionais foram notadas no epitélio do intestino médio de abelhas (Cruz-Landim et al., 1996) e de outras espécies (Nardi et al., 2002; Pinheiro et al., 2006). As variações no tamanho e na quantidade de células digestivas e regenerativas entre as regiões do intestino médio de um mesmo indivíduo e entre as castas demonstram possíveis diferenças fisiológicas entre segmentos deste órgão no processo digestivo. Essas particularidades entre as regiões do intestino médio são evidenciadas também no desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*, onde o crescimento da região anterior do intestino médio ocorre pelo aumento do tamanho das células, enquanto na região posterior ocorre aumento no número de células (Ray et al., 2009).

Em *Locusta migratória* (Orthoptera) as variações no tamanho dos núcleos das células digestivas e regenerativas do intestino médio foram relacionadas com um processo de diferenciação das células digestivas. Foi notado que as células amplificam seu conteúdo de DNA enquanto se afastam dos ninhos de células regenerativas e se diferenciam. Essa amplificação diferencial do DNA está relacionada com a necessidade de um aumento na síntese de proteínas específicas para a digestão. Esse processo ocorre através de ciclos de endopoliploidia ou politenia, envolvendo os genes necessários para adaptação das células digestivas a determinada dieta (Zudaire et al., 2004). O modo como determinado tipo de dieta ativa o processo de endopoliploidia ou politenia permanece por ser elucidado. Contudo, nossos resultados sugerem que o tipo de alimentação é um fator importante na poliploidia, pois os maiores núcleos foram encontrados nas operárias nutridoras que se alimentam de pólen, enquanto as operárias forrageiras que possuem uma dieta geralmente de néctar possuem núcleos menores, mesmo sendo mais velhas (Kerr et al., 1996). Além da alimentação, essas diferenças morfológicas das operárias podem ter influências do hormônio juvenil, que atua sobre o processo de poliploidia (Dittman et al., 1989) e está em grande quantidade nas operárias forrageiras (Jassim et al., 2000).

Deve ser considerada ainda a possibilidade de que o aumento do volume nuclear das células digestivas esteja relacionado com a reprodução, uma vez que os maiores núcleos destas células foram encontrados nas rainhas fisiogástricas e machos. As necessidades energéticas da reprodução podem determinar o aumento do volume celular e a ocorrência de uma maior produção de substâncias específicas que auxiliem na digestão e absorção de determinados nutrientes que serão utilizados na formação e/ou manutenção dos gametas.

Entre as castas o hormônio juvenil é elevado nas rainhas (Barchuk et al., 2002), o qual pode estar envolvido nas mudanças morfológicas e fisiológicas das rainhas fisiogástricas, como visto em células digestivas de fêmeas de *Aedes aegypti*, que produzem certas isoformas de tripsina exclusivamente durante a ovogênese (Nation, 2002). Embora os machos sejam

indivíduos haplóides, o tamanho dos núcleos não se diferenciou das rainhas fisiogástricas, demonstrando uma possível compensação através do processo de poliploidia, igualando a quantidade de DNA. As variações das células digestivas observadas ao longo do intestino médio de todas as castas refletem a necessidade de adaptações fisiológicas e morfológicas, para que ocorra o processo digestivo. Essas variações foram evidenciadas no intestino médio de larvas *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) e em *Scaptotrigona bipunctata* (Himenóptera), onde foi demonstrado que a região anterior e posterior é distinta, e a região média apresenta valores intermediários (Pinheiro et al., 2003; Shumaker et al., 1993).

Acredita-se que os Hymenopteros tenham uma circulação endo-ectoperitrofica, onde a região posterior seria responsável pela produção de substâncias específicas para digestão, enquanto na região anterior ocorreria a absorção. Esse processo foi postulado em abelhas para explicar a digestão e absorção de pólen (Terra, 1990; Shumaker et al., 1993).

As diferenças encontradas entre as células digestivas das rainhas reforçam a idéia de que a amplificação do genoma em muitos invertebrados ocorre simultaneamente com seu contínuo desenvolvimento (Gregory, 2005). Entretanto esse argumento não pode ser aplicado para operárias, onde as observações parecem demonstrar que a qualidade da dieta é um fator mais importante do que a idade para regular a diferenciação das células digestivas.

Variações no processo de amplificação do DNA em determinadas regiões são observadas em outros tecidos do inseto como nas glândulas salivares e no corpo gorduroso (Butterworth & Rasch, 1986), sempre visando à criação de um sistema que favoreça a intensificação da síntese protéica (Rash and Connelly, 2005).

Dentro de um determinado ninho, as células regenerativas menos diferenciadas são aquelas que possuem os menores núcleos (Ohlstein & Spradling, 2006). Os ninhos de células regenerativas em *Melipona quadrifasciata anthidioides* são compostos de células regenerativas em momentos diferentes do processo de diferenciação. A presença de ninhos constituídos apenas por células com núcleos pequenos, outros com células contendo núcleos

maiores e mesmo com os dois tipos de núcleos na mesma região de um mesmo indivíduo, indicam que o padrão de desenvolvimento dos ninhos é diferente mesmo que eles estejam muito próximos.

Sabe-se que as operárias nutridoras e as rainhas virgens são mais jovens do que as operárias forrageiras e as rainhas fisiogástricas, respectivamente (Kerr, 1996). Como as rainhas virgens, no geral, apresentavam núcleos de células regenerativas menores do que as rainhas fisiogástricas e entre as operárias, estes foram maiores nas nutridoras, podemos concluir que a idade não foi o único fator para influenciar este parâmetro. Esses resultados sugeriram que o tipo de alimento e as condições fisiológicas dos indivíduos são os fatores determinantes para essas variações no processo de desenvolvimento das células regenerativas.

Quando comparadas operárias nutridoras versus campeiras, ou rainhas virgens versus fisiogástricas, os indivíduos mais jovens apresentavam maior quantidade de células por ninho apenas em determinada região. Estudos anteriores comparando o tamanho dos ninhos de células regenerativas do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* destacaram que os maiores ninhos encontravam-se na região posterior do intestino médio das rainhas (França et al., 2006); o mesmo resultado foi obtido quando se comparou o tamanho dos ninhos entre operárias de *Apis mellifera* (Raes et al. 1994). Esses resultados estão de acordo, com Cruz-Landim et al. (1996) que sustentam que o número de células regenerativas diminuem a medida que as operárias se tornam mais velhas. Contudo deve ser destacado que os trabalhos citados foram feitos com medidas de secções histológicas e que consideraram apenas o diâmetro dos ninhos, não levando em consideração o número e o tamanho das células que eles continham.

Nosso estudo indica que o número de células regenerativas por ninho entre as regiões do intestino médio e mesmo entre as castas variou muito pouco e esta diferença foi pequena, mesmo quando se comparou rainhas virgens e fisiogástricas com mais de três anos de vida.

Apesar de ter havido uma diferença significativa no número de células regenerativas da região média do intestino médio da operária nutridora, isto não ocorreu nas outras regiões, indicando que deve haver a renovação de células regenerativas também nos ninhos das operárias forrageiras, já que esses são constituídos por células que possuem núcleos menores e, portanto, mais “jovens” (Zudaire et al., 2004).

Células com volume nuclear semelhante ao das células regenerativas foram freqüentemente observadas fora dos ninhos, principalmente na região posterior do intestino médio das rainhas fisiogástricas. Apesar da semelhança com as células regenerativas não podemos afirmar se são células regenerativas isoladas ou se são células enteroendócrinas, que também são originadas das células regenerativas e possuem tamanho semelhante (Illa-Bohaca & Montuenga, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). Células enteroendócrinas foram observadas em grande quantidade na região posterior do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Neves et al., 2002).

A observação de apenas uma figura de mitose, dentre todos os exemplares analisados o que permite concluir que o mecanismo de renovação das células do epitélio digestivo possa prescindir desse processo, confirmando observações anteriores (Cruz et al., 2008; Neves et al., 2003; Cruz-Landim et al., 1996). Figuras de mitose foram facilmente observadas em *Nasutitermes rotundatus* (Isoptera) (Moreira et al., 2008) e esse processo poderia ser visualizado também, caso ocorresse em *M. quadrifasciata anthidioides*.

Entretanto em *Drosophila melanogaster* figuras de mitoses são raramente observadas, mas a marcação de proteínas relacionadas com processos mitóticos, como anticorpo anti-fosfo-histona H3, sugerem a ocorrência de divisão nas células regenerativas (Micchelli & Perrimon, 2006) e que o número de mitoses nesses indivíduos são baixos sendo aproximadamente 3 mitoses por dia em todo intestino (Jiang et al., 2009). O número de mitoses não seria o suficiente para renovar todo intestino médio, mas talvez seja o necessário para manter os ninhos de células regenerativas.

Os mecanismos que regem a manutenção e renovação das células regenerativas no intestino médio de Hymenoptera permanecem pouco conhecidos. O presente estudo sugere que as células regenerativas de *M. quadrifasciata anthidioides* podem ser células-tronco, mesmo tendo sido evidenciado pouca mitose, e que não existe uma relação direta entre o número de células regenerativas e a longevidade dos indivíduos.

## 6. Referências Bibliográficas

Armitage, P.; Berry, G. Statistical Methods in Medical Research. Oxford: Blackwell Science. 3ª ed., 1994.

Baldwin, K.M., & Hakim, R.S. (1991) Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. Tissue cell. 23: 411-422.

Billingsley, P.F. & Lehane, M.J. (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (ed) Biology of the insect midgut, pp 31-54. Chapman and Hall, London.

Buszczak, M. & Seagraves, W.A. (2000) Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. Curr. Biol. 10: 830-833.

Butterworth, F. M. & Rasch, E. M. (1986) Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*: Distribution of nuclear DNA amounts along the anterior-posterior axis in the larval fat body. The journal of experimental zoology 239: 77-85.

Carson, F.L, Martin, J.H, Lynn J.A. Formalin fixation for electron microscopy. A re-evaluation. American Journal of Clinical Pathology 59: 365-373, 1973.

Chapman, R.F. 1998. The insects: Structure and function, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Cruz-Landim, C. (1985) Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp* 44: 28-41.

Cruz, L.C. (2008) Metamorfose do intestino médio de abelhas: proliferação ou migração celular? Campinas, SP. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Cruz-Landim, C, Silva-de-Moraes, R.L.M. & Serrão, J.E. (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J. Comp. Biol.* 1(1/2): 209-40.

Cruz-Landim, C. & Mello, M.L.S. (1970) Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. IV. Development of the digestive tract. (1). *Bol. Zool. Biol. Marinha*: 27: 229-263.

Cruz-Landim, C. & Moraes, R.L.S.M. (2000) Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro. 48p.

Cruz-Landim, C. (1985) Origin of the peritrophic membrane of the adult *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE). *Rev. Brasil. Biol.*, 45 (3): 207-219.

Cruz-Landim, C. (1999) Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology*, 34(3): 597-603.

Dittmann, F.; Kogan, P. H.; Hagedorn, H. H. (1989) Ploidy levels and DNA synthesis in fat Body cells of the adult mosquito, *Aedes aegypti*: The role of juvenile hormone. *Archives of Biochemistry and physiology* 12: 133-143.

Dow, J.A.T. (1986) Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.*, 19: 187-328.

França, A.A.P.; Dessaune, S.N.; Serrão, S.E.; Neves, C.A. (2006) The Regenerative cell in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini: a comparative study of workers and queens. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23: 401-404.

Gama, V. & Cruz-Landim, C. (1984) Morfologia do tubo digestivo de *Camponotus (Myrmothix) rufipes* (Fabricius, 1975) (hymenoptera, Formicidae) durante a metamorfose. *Naturalia*, 9: 43-55.

Giannini, K.M. & Bego, L.R. (1988) Labor division among workers of *Melipona compressipes fasciculata* with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia. Ser. Zool.* 85: 109-114.

Gregory TR. 2005. Genome size evolution in animals. In: Gregory TR, editor. *The evolution of the genome*. New York: Elsevier. P 3–87.

Hebling, N. J.; Kerr, W. E.; Kerr, F. S. (1964) Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotricha* Moure. *Pap. Av. Zool.* 16: 115-127.

Illa-Bochaca, I. & Montuenga, L. M. (2006) The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2215-2223.

Jassim, O.; Huang, Z.Y.; Robinson, G.E.. (2000) Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology* 46: 243–249.

Jiang, H.; Patel, P.H.; Kohlmaier A.; Grenley, M.O.; McEwen D.G.; Edgar B.A. (2009) Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell* 137: 1343–1355.

Kerr, W. E.; Carvalho, G. A.; Nascimento, V. A. (1996) *Abelha uruçu – biologia, manejo e conservação*. Fundação Acangaú. Belo Horizonte.

Klapper, R. (2000) The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech. Develop.* 95: 47-54.

Martins, G. F.; Neves, C. A.; Campos, L. O.; Serrão, J. E. (2005) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2): 161-168.

Micchelli, C. A & Perrimon, N. (2006) Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439:475-479.

Michener, C.D. (2000) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press: Baltimore.

Moreira, J.; Neves, C. A.; Araújo, V. A.; Araujo, A. P. A.; Cruz, L. C.; Moreira, P. A. ; Rocha, S. L. . Digestive system morphology of the *Nasutitermes rotundatus* Holmgren. *Sociobiology*, 2008 (*in press*).

Nardi, J. B.; Young, A. G.; Ujhelyi, E.; Tittiger C.; Lehane, M. J.; Blomquist G. J. (2002) Specialization of midgut cells for synthesis of male isoprenoid pheromone components in two scolytid beetles, *Dendroctonus jeffreyi* and *Ips pini*. *Tissue & Cell*, 34(4): 221–231.

Nation, J. L. *Insect physiology and biochemistry*. CRC . 485p. 2002

Neves, C. A. (2002) Estudo ontogenético, comparativo e ultraestrutural das células enteroendócrinas FMRFamida-“like” imunorreativas e descrição ultraestrutural do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose. Rio de Janeiro, RJ. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Neves, C. A.; Serrão, J. E.; Gitirana, L. B. (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology* 41: 443-459.

Ohlstein, B. & Spradling, A. (2006) The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439:470-474.

Pinheiro, D. O.; Silva R. J.; Quagio-Grassiotto I.; Gregorio, E. A. (2003) Morphometric Study of the Midgut Epithelium in Larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotropical Entomology* 32(3):453-459

Pinheiro, D. O.; Silva R. J.; Gregório E. A. (2006) Morphometry of the midgut epithelium of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia Xavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 60–62.

Raes, H.; Verbeke, M.; Meulemans, W.; Coster, W. (1994) Organisation and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*L. Apis mellifera*). *Tissue Cell* 26: 231-238.

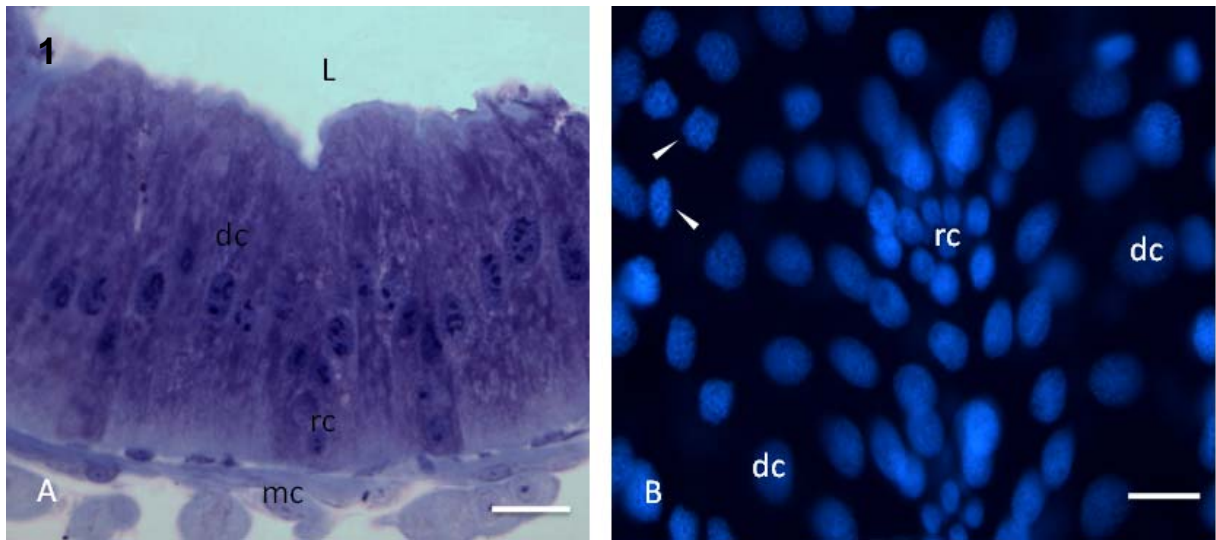
Rasch E. M. & Connelly B. A. (2005) Genome Size and Endonuclear DNA Replication in Spiders. *Journal of Morphology* 265: 209–214.

Raya, K.; Mercedes, M.; Chan D.; Choi, C. Y.; Nishiura. J. T. (2009) Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science* 9:55.

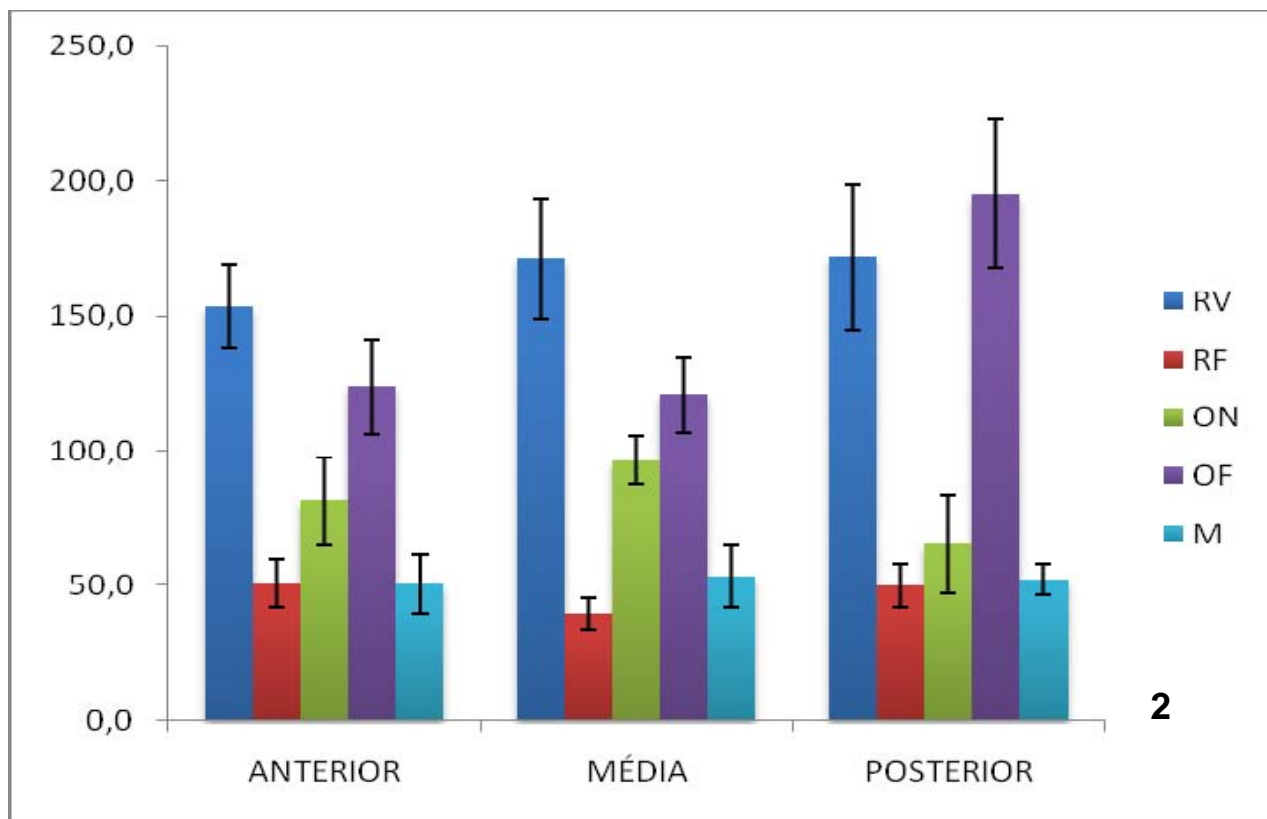
Schumaker, T.T.S.; Cristofolletti, P.T.; Terra, W.R. (1993) Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie* 24: 3-17.

Terra, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 181-200.

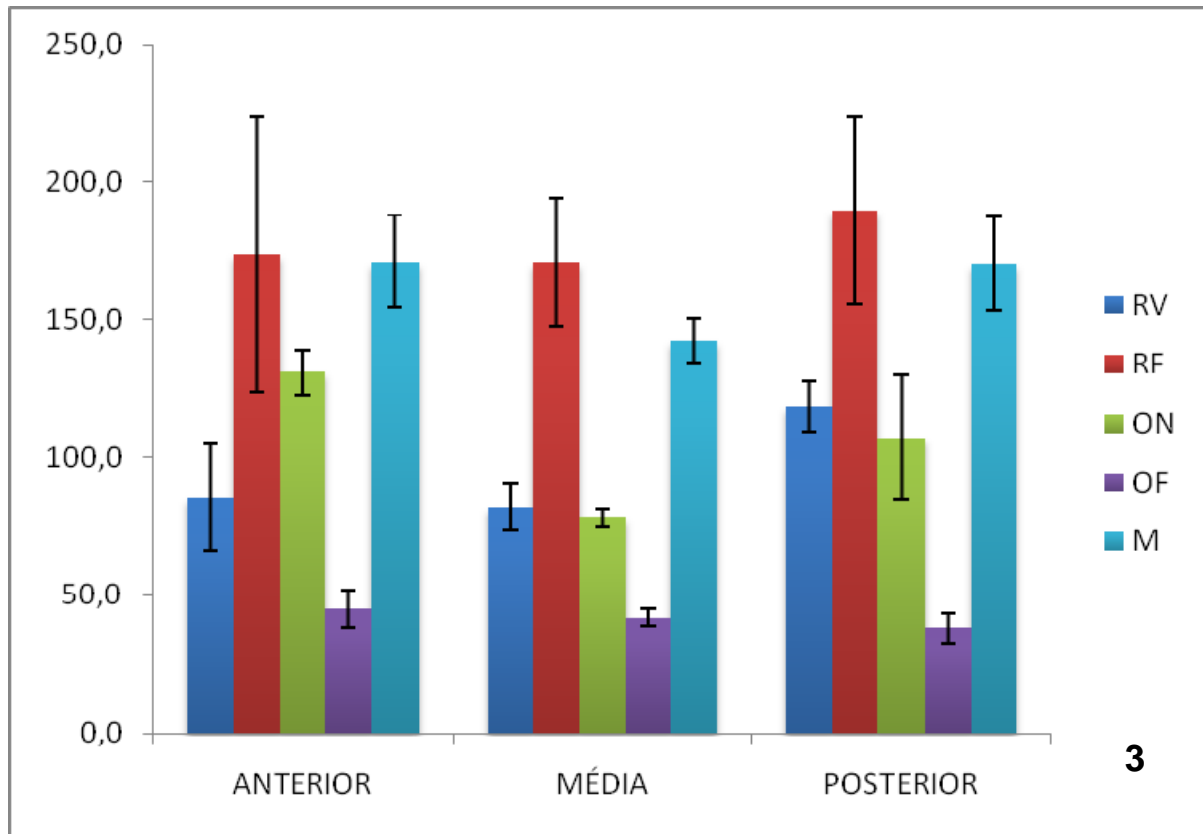
Zudaire, E.; Simpson, S. J.; Illa, I. L.; Montuenga, M. (2004) Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *The Journal of Experimental Biology* 207: 2255-226.



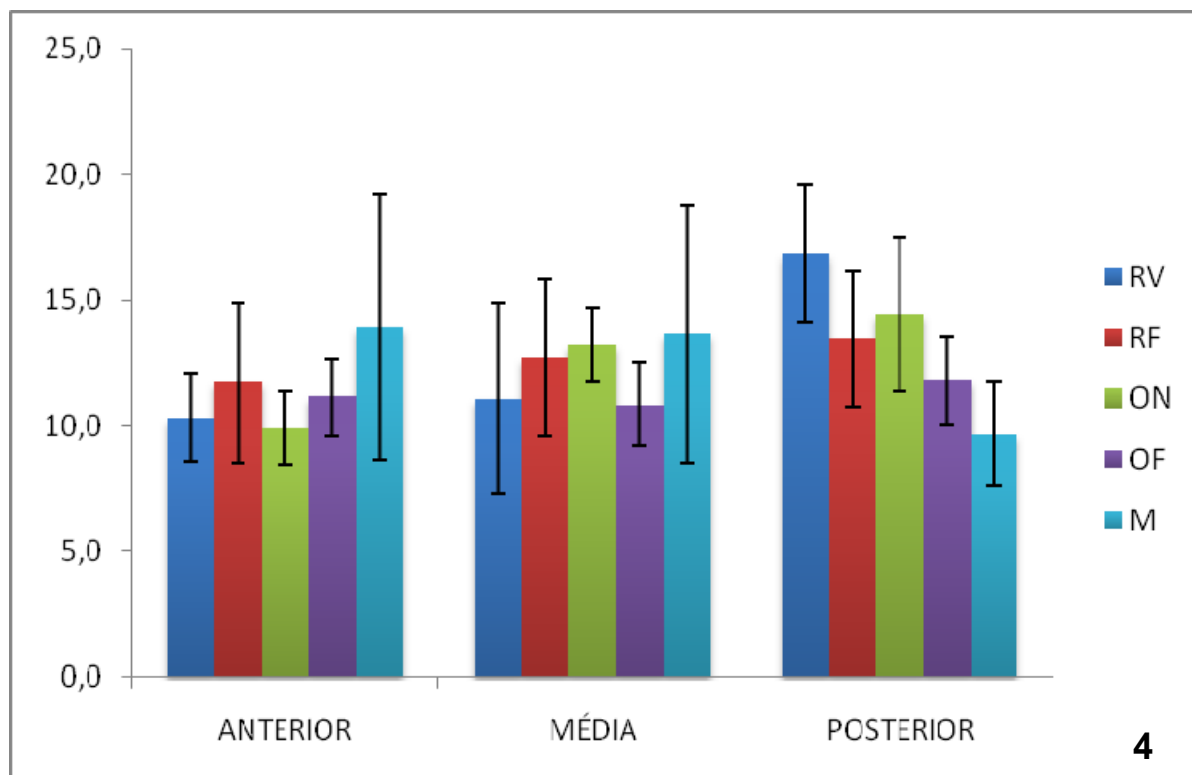
**Fig.1.** Intestino médio de operária nutridora de *M. quadrifasciata anthidioides*.(A) Secção transversal da região anterior, dc - células digestivas, rc - células regenerativas, mc – músculo, L – lúmen. (B) Região posterior de operária nutridora em montagem total evidenciando ninhos de células regenerativas (rn), núcleos de células digestivas (dc) com variações morfológicas (ponta de seta). Barra = 15 µm.



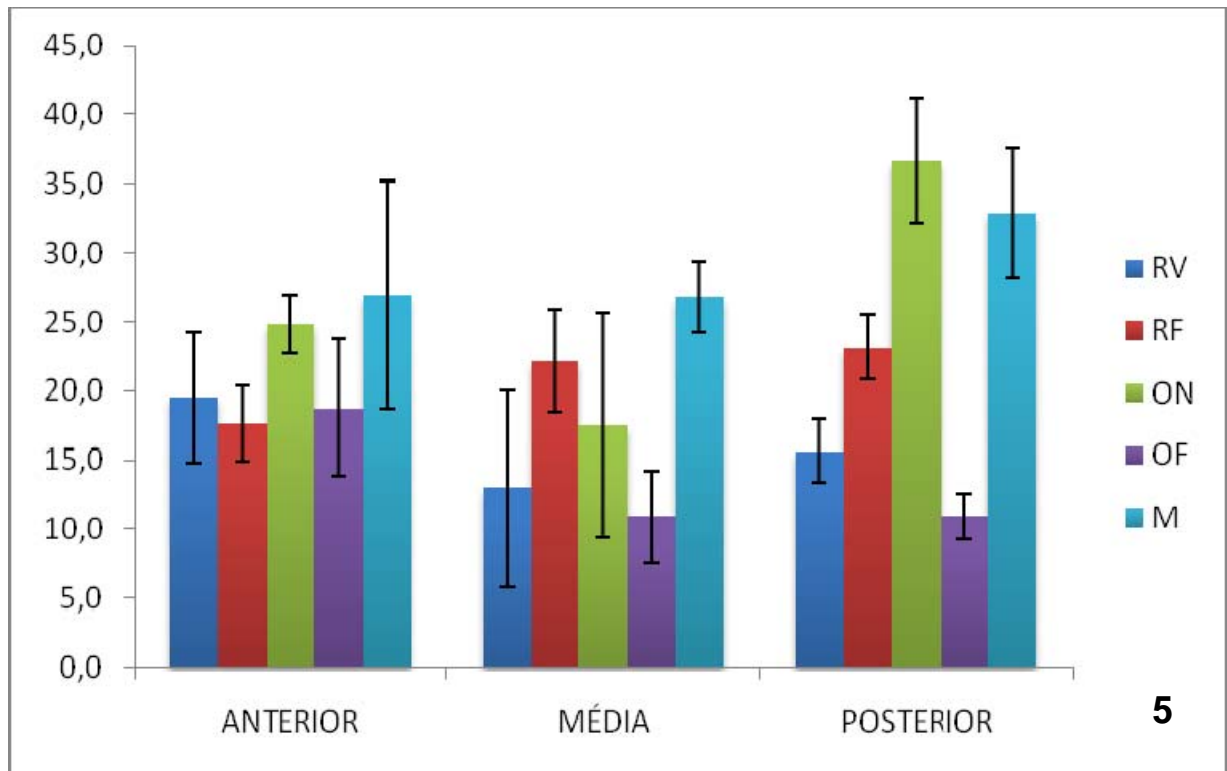
**Fig.2.** Médias do número de células digestivas entre as castas de *M. quadrifasciata anthidioides*. RV – Rainha virgem; RF – Rainha fisiogástrica; ON – Operária nutridora; OF – Operária forrageira; M – Macho.



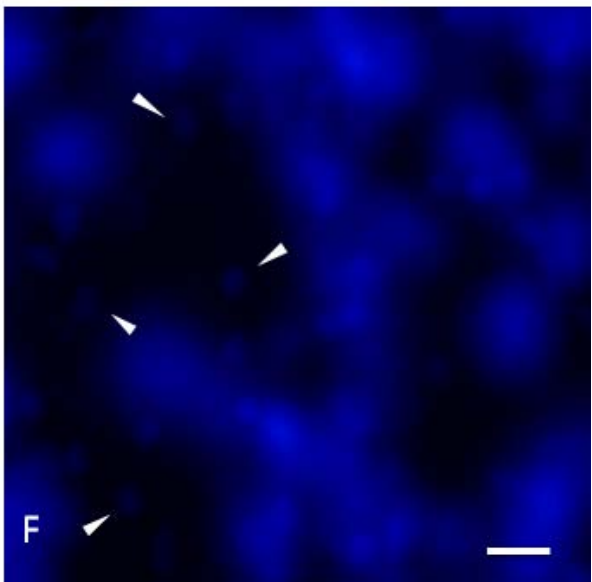
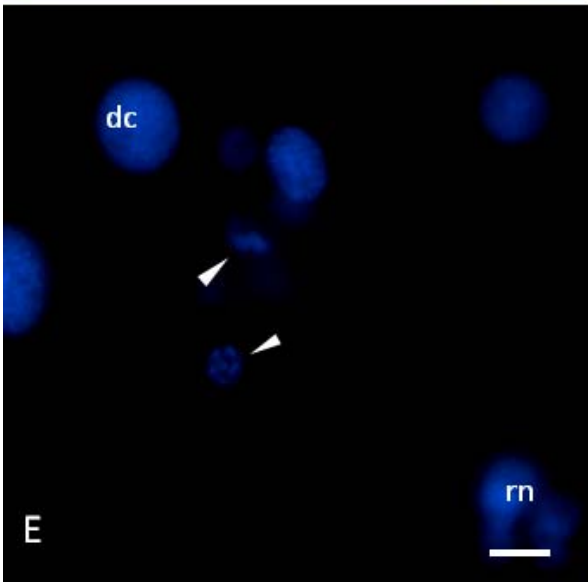
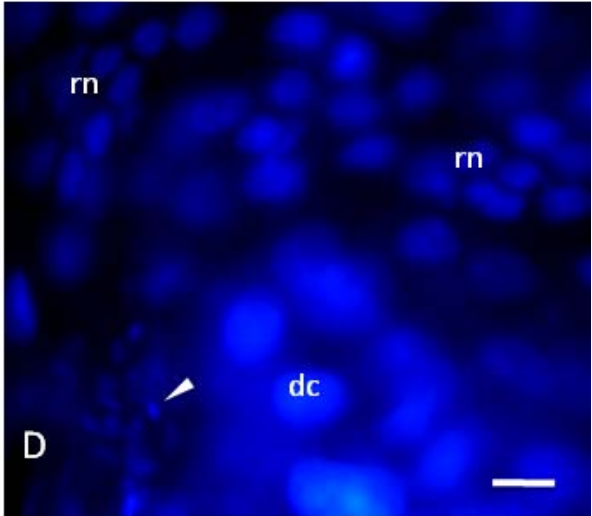
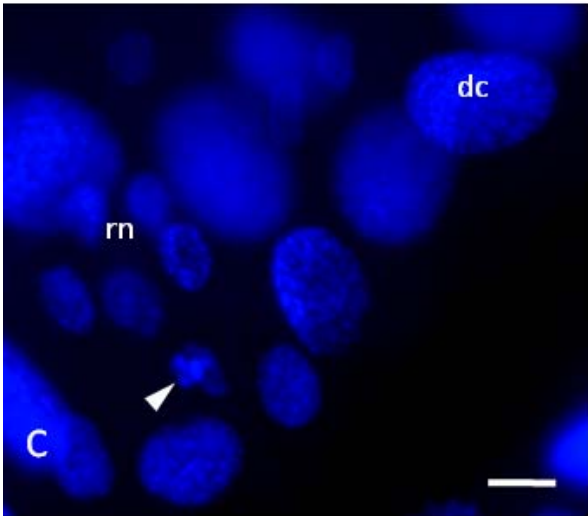
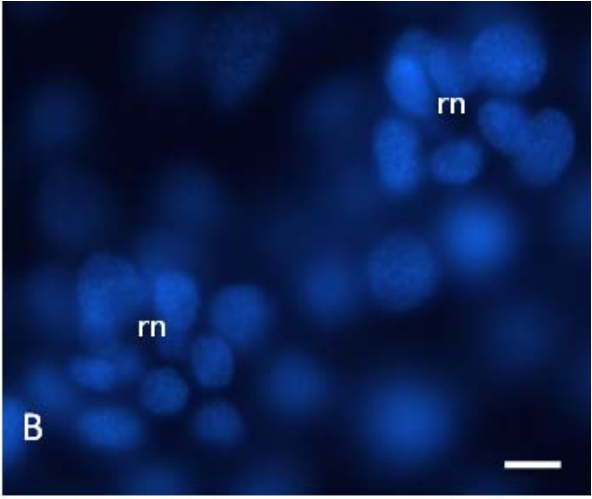
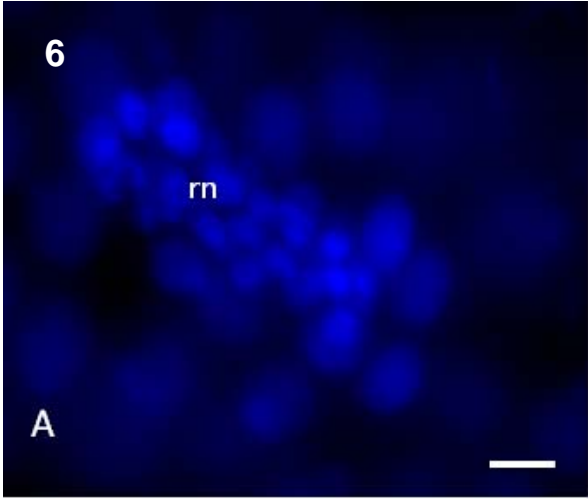
**Fig.3.** Médias das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) dos núcleos de células digestivas entre as castas de *M. quadrifasciata anthidioides*. RV – Rainha virgem; RF – Rainha fisiogástrica; ON – Operária nutridora; OF – Operária forrageira; M – Macho.



**Fig.4.** Médias do número de células regenerativas entre as castas de *M. quadrifasciata anthidioides*. RV – Rainha virgem; RF – Rainha fisiogástrica; ON – Operária nutridora; OF – Operária forrageira; M – Macho.



**Fig.5.** Médias das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) dos núcleos de células digestivas entre as castas de *M. quadrifasciata anthidioides*. RV – Rainha virgem; RF – Rainha fisiogástrica; ON – Operária nutridora; OF – Operária forrageira; M – Macho.



**Fig.6.** Fotomicrografias de fluorescência do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. (A) Região média do macho haplóide evidenciando um ninho com mais de vinte células regenerativas (rn). (B) Ninhos celulares da região anterior de operária nutridora, com núcleos maiores e em menor quantidade (rn). (C) Região posterior do macho haplóide, mostrando núcleo de células digestivas (dc), ninho com poucas células e núcleos desenvolvidos (rn) e ninho constituído de núcleos muito pequenos (ponta de seta). (D) Região média da rainha virgem, evidenciando núcleo de células digestivas (cd), ninhos com núcleos de células regenerativas desenvolvidos (rn) e um grande ninho com pequenos núcleos (ponta de seta). (E) Mitoses (ponta de seta) encontradas na região posterior da operária nutridora. (F) Células regenerativas isoladas (ponta de seta), encontradas na região posterior da rainha fisiogástrica. Escala das barras 10  $\mu$ m.

## 7. Conclusões Gerais

- A análise com montagem total do intestino médio evidenciou diferenças significativas entre as regiões do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em relação às células digestivas e regenerativas.
- Os maiores núcleos das células digestivas são encontrados nas rainhas fisiogástricas, machos e operárias nutridoras, demonstrando que o processo de amplificação do genoma em *Melipona quadrifasciata anthidioides* varia de acordo com as condições fisiológicas ou tipo de dieta do indivíduo.
- Ocorreram poucas diferenças com relação à quantidade de células regenerativas por ninhos entre os indivíduos, indiferente da casta ou idade. Este estudo sugere que exista uma renovação de células regenerativas nos ninhos, pois o número de células não sofreu grandes variações com a idade, mesmo analisando rainhas fisiogástricas com mais de três anos de vida.
- No geral, os maiores núcleos de células regenerativas foram encontrados nas rainhas fisiogástricas, machos e operárias nutridoras. Esse resultado mostra que o processo de diferenciação das células regenerativas pode ter uma correlação com a atividade das células digestivas.
- A visualização de apenas uma imagem de mitose, sugeriu que o mecanismo de manutenção e renovação das células regenerativas no intestino médio deve prescindir desse processo, e que não existe uma relação direta entre o número de células regenerativas e a longevidade das abelhas *M. quadrifasciata anthidioides*.