

GUSTAVO FERREIRA MARTINS

**METAMORFOSE NO VENTRÍCULO DE ABELHA:
RECONSTRUÇÃO POR MITOSE OU DIFERENCIAÇÃO
CELULAR?**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Martins, Gustavo Ferreira, 1980-

M386m
2004

Metamorfose no ventrículo de abelha : reconstrução por mitose ou diferenciação celular? / Gustavo Ferreira Martins. – Viçosa : UFV, 2004.
xi, 41f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-41.

1. Abelha sem ferrão - Morfologia. 2. Abelha sem ferrão - Aparelho digestivo. 3. Abelha sem ferrão - Intestino médio. 4. Regeneração (Biologia). 5. Embriologia - Inseto. 6. *Melipona quadrifasciata*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 595.799044

GUSTAVO FERREIRA MARTINS

**METAMORFOSE NO VENTRÍCULO DE ABELHA:
RECONSTRUÇÃO POR MITOSE OU POR
DIFERENCIAÇÃO CELULAR?**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 13 de Fevereiro de 2004.

Prof. Dr. Adilson Ariza Zacaro

Prof. Dr. Clóvis Andrade Neves
(Conselheiro)

Prof. Dr. Lucio Antonio Oliveira Campos
(Conselheiro)

Profa.. Dr^a. Silvia das Graças Pompolo

Prof. Dr. José Eduardo Serrão
(Orientador)

Aos tão amados avós: Carlos Guerzoni Martins (Vô Neném) (in memoriam) e Francisca Ferraz Martins (Vó Petita), dedico. Esta homenagem é pequena diante do amor, do carinho, do respeito e da admiração que sinto por vocês. Obrigado pelo exemplo de vida. Vocês são meus verdadeiros mestres.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador Professor Dr. José Eduardo Serrão: pela amizade, por ter ensinado-me trilhar os meus primeiros passos na pesquisa com morfologia interna de insetos, por estar sempre preocupado com minha formação e por ter conduzido minha orientação com calma e serenidade durante estes quase seis anos de ótima convivência. A você o meu MUITO OBRIGADO.

Ao meu amigo e conselheiro Prof. Dr. Clóvis Andrade Neves: pela amizade, pelos conselhos e por estar sempre disposto a ajudar e discutir sobre nosso trabalho. Gostei muito de trabalhar contigo e espero criar novas oportunidades.

À Prof. Dr^a. Silvia das Graças Pompolo do Laboratório de Citogenética de Insetos: por ter sido sempre acessível e disposta a ajudar quando precisei utilizar o laboratório de citogenética.

À amiga Lenira: pela amizade e agradável companhia. Por ter me iniciado nos estudos com as vespas, contribuindo tão positivamente para minha formação.

À Adriana: pelo amor, compreensão e carinho. Por tornar meus dias mais afáveis e dar mais sentido à minha vida.

À minha mãe Alzira e meu irmão Henrique (Kiko) que apesar de entenderem pouco do meu trabalho, admiram-me e reconhecem quanto ele é importante para mim. Eu amo muito vocês e sem o apoio de vocês e de outros familiares não conseguiria jamais chegar até aqui.

Enfim, agradeço a todos que realmente contribuíram para realização deste trabalho.

*“Viver e não ter a vergonha de ser feliz/
Cantar e cantar e cantar,
a beleza de ser um eterno aprendiz...”
(Gonzaga Jr.)*

BIOGRAFIA

GUSTAVO FERREIRA MARTINS, filho de Francisco Ferraz Martins e Alzira Ferreira Martins, nasceu no dia sete de fevereiro de 1980. Natural de Ponte Nova (MG), aos quatro anos foi morar no município de Piedade de Ponte Nova (MG), onde terminou o ensino fundamental na Escola Estadual Coronel Antoninho. Chegou em Viçosa em 1995 quando iniciou o ensino médio no COLUNI (Colégio Universitário) da Universidade Federal de Viçosa. Em 1998 iniciou o curso de Ciências Biológicas nesta universidade, obtendo o título de bacharel e licenciado no dia dez de maio de 2002. Durante a graduação foi bolsista do CNPq durante dois anos e meio, desenvolvendo trabalhos com morfologia interna de insetos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Serrão. Iniciou o mestrado em abril de 2003 pelo Programa de Pós-graduação em Entomologia nesta mesma universidade. Durante o mestrado foi bolsista do CNPq, defendendo tese de mestrado no dia 13 de fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- MATERIAL E METODOLOGIA	10
3- RESULTADOS.....	13
4- DISCUSSÃO.....	24
5- CONCLUSÕES.....	34
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

MARTINS, Gustavo Ferreira. M. S. Universidade Federal de Viçosa. Fevereiro de 2004.
Metamorfose no ventrículo de abelha: reconstrução por mitose ou diferenciação celular?
Orientador: José Eduardo Serrão. Conselheiros: Clóvis Andrade Neves e. Lucio Antonio Oliveira Campos.

O tubo digestivo dos insetos pode ser dividido em intestino anterior, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior, sendo o ventrículo de origem endodérmica e os intestinos anterior e posterior de origem ectodérmica. No ventrículo ocorre a secreção de enzimas digestivas e a absorção dos nutrientes. Os principais tipos celulares encontrados no ventrículo são as células digestivas, que secretam enzimas e absorvem nutrientes e as células regenerativas, que se diferenciam e originam os demais tipos celulares do epitélio do ventrículo. Durante a metamorfose das abelhas, o epitélio do ventrículo é substituído, e esta substituição ocorre às custas da diferenciação das células regenerativas larvais. O presente trabalho busca investigar as modificações ocorridas no epitélio do ventrículo da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* durante o desenvolvimento pós-embrionário e se existe proliferação das células regenerativas durante a metamorfose do ventrículo, utilizando-se técnicas anatômicas, de imunofluorescência e imunoperoxidase com anticorpo anti BrdU. Foram analisadas larvas de diferentes idades, pré-pupas, pupas de operárias em diferentes fases de desenvolvimento: pupas de olhos brancos, olhos marrons, olhos pretos e operárias adultas. Os resultados revelaram que na larva ocorre proliferação de células regenerativas, o que pode ser comprovado pela observação de metáfases, culminando com o aumento do número de células regenerativas por ninho. Com o envelhecimento da larva o número e o tamanho dos ninhos de células regenerativas aumentam. A substituição do epitélio larval pelo epitélio do adulto ocorre a partir do segundo dia após o início da defecação. Neste período os ninhos de células regenerativas estão em contato, formando uma espécie de rede, lembrando um sincício pelo fato de não ter sido observado o limite celular. Concomitante à degeneração das células digestivas larvais ocorre a diferenciação das células regenerativas, formando as células digestivas do adulto. Células regenerativas BrdU positivas são observadas somente na fase de pré-pupa, 12 h após a injeção de BrdU, indicando que é durante esta fase que a população de

células regenerativas aumenta. Pode-se entender a proliferação das células regenerativas como um processo compensatório, que repõe as células regenerativas que se diferenciam durante a metamorfose do ventrículo. Parece que a existência de proliferação de células regenerativas culmina no aumento da população de células regenerativas e não na formação de novas células digestivas. A hipótese de que células digestivas dos adultos se originam através da proliferação e posterior diferenciação das células regenerativas durante a metamorfose do ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* pode ser rejeitada porque a proliferação das células regenerativas durante a pupação não seria suficiente para restabelecer os ninhos de células regenerativas e ao mesmo tempo formar novas células digestivas e pelo fato de que a população de células regenerativas existente durante o processo de defecação parece ser suficiente para promover a renovação do epitélio do ventrículo durante a metamorfose.

ABSTRACT

MARTINS, Gustavo Ferreira. M. S. Universidade Federal de Viçosa. February de 2004. **Bee midgut metamorphosis: reconstruction from mitosis or cell differentiation?** Adviser: José Eduardo Serrão. Committee members: Clóvis Andrade Neves and Lucio Antonio Oliveira Campos.

The digestive tract of insects can be divided into foregut, midgut and hindgut. Fore and hindgut have an ectodermic origin, while midgut is endodermic. Midgut is responsible for the enzyme secretion and nutrient absorption. The midgut epithelium is formed basically by the digestive cells, responsible for the enzyme secretion and nutrient absorption and for the small regenerative cells that are placed in nests scattered among the digestive cells. During midgut metamorphosis, the epithelium is substituted to attend adult's nutritional needs, and this substitution occurs due to larval regenerative cells differentiation. The present work focused on the midgut epithelial modifications during the post-embryonic development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. The presence of regenerative cells proliferation during midgut metamorphosis was also investigated, using anatomical and imunofluorescence techniques with antibody against BrdU. Were analyzed specimens at the following developmental stage: larvae of different ages, prepupae, White eyed, brown eyed and black eyed pupae and adult workers. Regenerative cell proliferation is easily detected during larval period by the presence of metaphase, which results in the regenerative cell number increasing. During larval aging the number and the size of the nests of regenerative cells also increases. Larval epithelium degeneration starts in the second day after defecation process had initiated. In this period the nests of regenerative cells are in contact and cell limit were not visualized, resembling a sincicium. The degeneration of the larval digestive cells and the regenerative cells differentiation into adult's digestive cells occurs at the same time. The BrdU positive regenerative cells are only observed in the prepupae period, 12 h after BrdU injection indicating that regenerative cell population increase during this period. Regenerative cell proliferation can be understood as a compensatory process, responsible for the regenerative cell replacing that are consumed during midgut epithelial renewing during metamorphosis. It probably assures the maintenance of the adult midgut epithelium. It seems that the regenerative cell proliferation culminates in the increase of the regenerative cells population and not

in the formation of new digestive cells because the proliferation of regenerative cells would not be enough to reestablish the nests of regenerative cells and at the same time form new adult digestive cells. In this sense the hypothesis that digestive adult cells are originated through the regenerative cell proliferation and posterior differentiation during *M. quadrifasciata anthidioides* midgut metamorphosis can be rejected.

1. INTRODUÇÃO

O tubo digestivo dos insetos está dividido em três regiões: o intestino anterior, ou estomodeu, de origem ectodérmica, o intestino médio, ou ventrículo que é de origem endodérmica, e o intestino posterior, ou proctodeu, de origem ectodérmica (Chapman, 1998).

O intestino anterior ou estomodeu é revestido por epitélio simples recoberto por cutícula e se forma a partir da invaginação da porção anterior do embrião. Nesta região em geral, não ocorre absorção de nutrientes e nem secreção, sendo a cutícula relativamente espessa e podendo apresentar projeções em forma de espinhos ou dentes. O intestino anterior pode ser subdividido em faringe, esôfago, papo e proventrículo. A função da faringe é participar da ingestão do alimento, encaminhando-o através de movimentos da musculatura externa, que é bastante desenvolvida nesta região. O esôfago possui forma tubular e conecta a faringe ao papo, sendo bem definido nos insetos holometábolos e pouco desenvolvido nos hemimetábolos. Nos holometábolos o esôfago se estende da região dos músculos do vôo até o abdome. O papo quando vazio possui uma grande quantidade de dobras internas que permitem sua distensão quando está armazenando o alimento (Dow, 1986; Chapman, 1998). O papo dos insetos sociais possibilita a trofalaxia, pois, é nele que fica armazenado o alimento trocado entre os indivíduos da colônia e nas abelhas serve para o transporte de néctar da flor para a colônia (Cruz-Landim, 1985). O proventrículo varia quanto à forma e funciona como uma válvula no início do intestino médio, e sua cutícula pode apresentar expansões em forma de dentes ou pêlos que muitas vezes auxiliam na trituração e separação do alimento, sendo a túnica muscular bem desenvolvida nesta região (Dow, 1986; Chapman, 1998). O proventrículo projeta-se para o interior do intestino médio formando dobras que constituem a válvula cardíaca, a qual tem por função impedir o retorno do alimento para o intestino anterior.

O intestino posterior é diferenciado em íleo ou intestino fino e reto e se origina a partir da invaginação da porção posterior do embrião. O íleo geralmente é fino e quando possui a parte posterior diferenciada, esta é denominada cólon. O reto é uma expansão do intestino posterior, dotado de dilatações denominadas papilas ou glândulas retais, com células mais altas, cuja cutícula é mais

fina e pouco esclerotizada. Acredita-se que em alguns insetos as papilas retais absorvem água e íons das fezes (Cruz-Landim, 1985; Terra, 1991; Chapman, 1998).

O intestino médio ou ventrículo ou mesêntero, apesar de ser morfológicamente simples é funcionalmente complexo. Entre suas funções podemos citar a digestão e absorção de nutrientes, sendo este órgão o sítio primário de produção e secreção de enzimas digestivas (Cruz-Landim, 1985; Dow, 1986; Chapman, 1998).

Na maioria dos insetos, o epitélio do ventrículo apresenta uma cobertura chamada matriz ou membrana peritrófica, que varia de espessura dependendo da fase do inseto. Esta estrutura é composta de proteínas, glicoproteínas e microfibrilas de quitina, mergulhados numa matriz de proteoglicanas. Ela evita o contato do alimento com o epitélio ventricular, protegendo-o de agentes patogênicos, toxinas e abrasão, ao mesmo tempo possibilitando a absorção dos nutrientes. A matriz peritrófica divide fisicamente o lúmen do ventrículo em espaço endoperitrófico (onde se inicia a digestão) e ectoperitrófico (onde a digestão é finalizada) regulando a passagem de moléculas entre estes diferentes compartimentos (Lehane, 1997).

O epitélio do ventrículo, como no restante do trato digestivo está formado por uma camada única de células. Três tipos principais de células ocorrem no ventrículo: as células endócrinas, digestivas e regenerativas.

As células endócrinas ocorrem isoladamente, espalhadas entre as células digestivas. Apesar de terem sido pouco estudadas, supostamente estão envolvidas na produção de fatores endógenos, refletindo a função do ventrículo também como órgão endócrino dos insetos (Chapman, 1998; Neves *et al.* 2002). Serrão & Cruz-Landim (1996a) estudaram ultraestruturalmente as células endócrinas em espécies de *Trigona* (Apidae) e observaram que o ápice destas células não alcançava o lúmen intestinal e que na porção basal destas células havia uma concentração de grânulos de secreção, sugerindo que a secreção é direcionada para a hemolinfa. Neves *et al.* (2004) observaram algo parecido em *Melipona quadrifasciata anthidioides*, onde na base destas células também se concentravam vesículas secretoras, embora tenham observado também a presença de células em contato com a luz do ventrículo.

As células digestivas atuam na secreção de enzimas digestivas e na absorção de nutrientes. Ocorrem em maior abundância e recebem diferentes denominações além de células digestivas: células principais, colunares e enterócitos. Cada célula desta possui milhares de microvilosidades que aumentam a área de absorção, e que por sua vez estão revestidas por glicocálix. Quando as células digestivas estão sintetizando enzimas, apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Chapman, 1998).

É indiscutível o papel das microvilosidades no aumento da área de absorção das células digestivas. Em adultos de algumas espécies de abelhas a área de absorção pode aumentar 200 vezes e nas larvas ela pode aumentar até 90 vezes, maximizando o processo de absorção de nutrientes (Serrão & Cruz-Landim, 1995; Serrão 1996; Cruz-Landim *et al.*, 1997; Serrão & Cruz-Landim, 2000).

Nos himenópteros a célula digestiva pode ser dividida em três regiões: a região basal, que apresenta inúmeras invaginações da membrana plasmática associadas às mitocôndrias, a região apical que contém grânulos de secreção, retículo endoplasmático granular, lisossomos, vesículas de micropinocitose e acúmulo de microfilamentos em razão das microvilosidades, e a região mediana onde se localiza o núcleo (Davies & King, 1977; Serrão, 1996; Serrão & Cruz-Landim, 1996b).

Além do ventrículo participar da digestão e absorção de nutrientes nos insetos, a função de órgão excretor têm sido sugerida por vários autores como Waku & Sumimoto (1974), Nijhout (1975), Serrão & Cruz-Landim (1996b) e Cruz-Landim & Serrão (1997), que observaram acúmulo e extrusão de concreções minerais e esferocristais na região apical das células digestivas. O ventrículo também é considerado um órgão imunocompetente pelo fato de participar da defesa contra patógenos através da produção de substâncias antimicrobianas (Hoffman, 1997; Vizioli *et al.*, 2001). Portanto, as células digestivas estão em intensa atividade metabólica, seja secretando enzimas, absorvendo nutrientes, secretando a matriz peritrófica, transportando os nutrientes para a hemolinfa e/ou armazenando metabólitos como enzimas e peptídeos antimicrobianos. Isso promove um intenso desgaste destas células que precisam ser substituídas com frequência.

A renovação das células digestivas ocorre durante todo o desenvolvimento pós-embriônico dos insetos através da diferenciação das células regenerativas, que nos lepidópteros são comumente

chamadas células-tronco (*stem cells*) (Hakim et al, 1988; Baldwin & Hakim, 1991a; Baldwin *et al.*, 1993; Loeb *et al.*, 1999). Estas ocorrem em grupos ou ninhos celulares que algumas vezes são encontrados em criptas intestinais como em alguns coleópteros. A diferenciação das células regenerativas foi investigada em alguns himenópteros (Oertel, 1930; Raes *et al.*, 1994; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Cruz-Landim, 1999), térmitas (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996), hemípteros (Werner *et al.*, 1991) e lepidópteros (Hakim et al, 1988; Baldwin & Hakim, 1991a; Baldwin *et al.*, 1993; Loeb *et al.*, 1999).

As células regenerativas do ventrículo dos insetos, geralmente, contêm pouco citoplasma e o núcleo possui cromatina condensada. No citoplasma existem poucos ribossomos, retículo endoplasmático, elementos do complexo de Golgi e mitocôndrias, refletindo uma baixa taxa de síntese protéica nestas células (Hecker *et al.*, 1971; Cruz-Landim, 1985; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Cruz-Landim, 1999). Quando as células regenerativas se diferenciam em células digestivas, elas se alongam em direção à luz intestinal, adquirem microvilosidades, seguido do aumento nos volumes do núcleo e citoplasma (Werner *et al.*, 1991; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003).

As abelhas são insetos holometábolos e como tal passam por uma complexa mudança na organização corpórea durante o desenvolvimento pós-embriônico que é caracterizado pela fase larval e imaginal, separadas por uma fase de pupa. A larva difere do imago, principalmente pela ausência de apêndices externos, de olhos compostos e de sistema reprodutor desenvolvido. Na pupa o corpo apresenta-se dividido em cabeça, tórax e abdome e os apêndices como pernas, asas e antenas tornam-se evidentes. Nos insetos holometábolos, um mesmo indivíduo apresenta diferentes formas e hábitos alimentares, e ocupam habitats distintos em diferentes fases da vida, o que certamente reduz a competição intraespecífica. Por isso, acredita-se que a holometabolia permitiu uma grande irradiação destes insetos (Horn, 1978).

As mudanças morfológicas durante a metamorfose compreendem a histólise, onde os tecidos são destruídos e reutilizados durante a histogênese para o desenvolvimento dos órgãos adultos. Este processo ocorre durante o estágio que compreende a pupa, onde geralmente o inseto não se alimenta e nem se locomove (Borror, 1992).

A remodelagem de tecidos requer proliferação, morte e movimentação celular. Depois de remodelado, a forma final do novo tecido dependerá do número de células deixadas no local e das variações na sua proliferação e morte. A ocorrência da morte celular nas mudanças metamórficas varia largamente em diferentes insetos e em diferentes tecidos. Ela pode envolver um pequeno ajuste na quantidade de células até quase a destruição total do organismo larval para a substituição por células que funcionarão no adulto (Locke, 1985).

Durante a metamorfose o epitélio do intestino médio é histolisado e a sua reorganização ocorre pela diferenciação das células regenerativas, para atender as exigências nutricionais dos insetos holometábolos, que são diferentes entre a larva e o adulto.

Os parágrafos subseqüentes descrevem os principais eventos que ocorrem durante a metamorfose do sistema digestivo de *M. quadrifasciata anthidioides*, que foram descritos por Cruz-Landim & Mello (1970) e mais recentemente por Neves (2002). As observações são muito semelhantes às descritas para *Apis mellifera* por Oertel (1930), Snodgrass (1956) e Cavalcante (1998).

Nas larvas de abelhas o sistema digestivo é alongado e arredondado, ocupando quase toda cavidade abdominal, podendo ser dividido em intestino anterior (subdividido em faringe, esôfago e proventrículo, embora este último esteja representado apenas pela válvula cardíaca), ventrículo e intestino posterior, onde o íleo e o reto estão pouco definidos, pois a passagem do ventrículo para o intestino posterior, geralmente, permanece fechada até o final da fase larval. À medida que a larva se alimenta, o volume do ventrículo aumenta. No final da vida larval, o ventrículo ocupa em torno de dois terços do volume do corpo da larva.

As células regenerativas são muito pequenas e inconspícuas no período larval. Já as células digestivas variam no aspecto. Em larvas recém-eclodidas, elas formam um epitélio cilíndrico ou cúbico. À medida que a larva se alimenta, grânulos e vacúolos aparecem no ápice das células, com a produção de borbulhas na borda apical, sendo este padrão mantido ao longo da vida larval.

Na pré-pupa o ventrículo torna-se fino e alongado devido ao processo de defecação. Na pupa de olhos brancos, o ventrículo adquire um formato de garrafa e o diâmetro aumenta. Na pupa de olhos

rosas, o diâmetro torna-se mais uniforme e o ápice das células são descartados para o lúmen. Na pupa de olhos pretos, o ventrículo apresenta anelações em decorrência do desenvolvimento da túnica muscular e o epitélio adquire características do adulto.

Durante a metamorfose do ventrículo não se observa divisão das células regenerativas, não sendo possível interpretar o papel destas durante a metamorfose, porque apesar de estarem mais numerosas na pré-pupa, não se constatou divisão celular ou estas foram raramente observadas.

O intestino anterior não sofre uma real metamorfose no sentido de degeneração. Ele só se diferencia e se reorganiza durante a pupação. Na pupa o intestino anterior alonga-se e ocorre a formação do papo e o proventrículo. O desenvolvimento do intestino anterior se dá por mitose seguida de diferenciação celular.

No início da pupação, a maior parte do sistema digestivo está na região correspondente ao tórax. À medida que a metamorfose procede nas abelhas, o sistema digestivo desloca-se para a região correspondente ao abdome. No final da pigmentação dos olhos, o ventrículo, proventrículo e o papo já se localizam no abdome.

O tubo digestivo das abelhas adultas apresenta um intestino anterior constituído por vários compartimentos: faringe, esôfago, papo e proventrículo; o ventrículo não apresenta subdivisões nem cecos gástricos, mas é bastante longo; o intestino posterior é subdividido em intestino fino e reto.

Os túbulos de Malpighi larvais ocorrem em número de oito, são longos alcançando a região entre o intestino anterior e médio. Nesta fase eles acumulam excretas e se tornam dilatados. Durante a metamorfose eles se esvaziam, eliminando excretas juntamente com o conteúdo do ventrículo. Na pré-pupa os túbulos de Malpighi larvais e adulto coexistem e a degeneração dos túbulos larvais se completa. Na pupação os túbulos de Malpighi aumentam de tamanho por mitose na região de contato com o intestino posterior (Cruz-Landim & Mello, 1970). O intestino posterior durante a fase larval tem por função apenas a eliminação dos produtos de excreção provenientes dos túbulos de Malpighi (Gama & Cruz-Landim, 1984).

Durante a fase larval, as abelhas apresentam a comunicação entre o ventrículo e o intestino posterior obstruída. Isso mantém o alimento aprisionado, facilitando uma boa absorção de nutrientes e

impedindo a contaminação do alimento presente no ambiente larval com fezes, uma vez que a larva desenvolve-se no interior de um alvéolo. A passagem do ventrículo para o intestino posterior só é aberta ao final do período larval, o ventrículo é esvaziado e seu epitélio reorganizado para funcionar no adulto. Com a eliminação da matriz peritrófica e dos resíduos alimentares, o ventrículo afina-se e as células digestivas tornam-se vacuolizadas, caracterizando processo de histólise. Na pupa a passagem para o intestino posterior é novamente fechada (Oertel, 1930; Snodgrass, 1956; Cruz-Landim & Mello, 1970; Gama & Cruz-Landim, 1984; Cavalcante, 1998).

Parece que nos himenópteros as mudanças no ventrículo iniciam-se no estágio de pré-pupa. As células do epitélio larval degeneram e são eliminadas para o lúmen do ventrículo, permanecendo somente a membrana basal e as células regenerativas. Ao mesmo tempo, as células parecem proliferar ativamente e espalham-se sobre a membrana basal para formar um novo epitélio pupal (Oertel, 1930; Snodgrass, 1956; Cruz-Landim & Mello, 1970; Gama & Cruz-Landim, 1984; Neves, 2002). Porém, durante a metamorfose das abelhas não foram observadas células regenerativas em divisão (Oertel, 1930; Cruz-Landim & Mello, 1970; Cavalcante, 1998; Cruz-Landim & Cavalcante, 2003), ou as divisões celulares foram observadas em pequeno número (Neves, 2002). No entanto, ficou claro que o epitélio do ventrículo larval é substituído na fase inicial de pupação.

A substituição das células digestivas por outras pode ser caracterizada como sendo parte de um processo de morte celular programada, que é essencial para a remodelagem de tecidos para novas funções no organismo adulto e também para a eliminação de órgãos inteiros não necessários à vida no novo ambiente (Bowen & Bowen, 1990; Cavalcante, 1998).

Apesar de alguns trabalhos enfocarem a metamorfose do ventrículo, são escassos os trabalhos que tratam da reorganização e da proliferação das células regenerativas ao longo do desenvolvimento das abelhas.

Nas larvas de lepidópteros, o crescimento do epitélio do ventrículo ocorre pelo aumento das células existentes ou através da reposição das células diferenciadas por uma população de células não diferenciadas (Judy & Gilbert, 1970; Baldwin *et al.*, 1996). Em *Manduca sexta* (Lepidoptera), durante a vida larval, estimou-se que a quantidade de células do intestino médio aumenta em torno de

duzentas vezes, e um terceiro mecanismo foi discutido para esta espécie, onde o crescimento do epitélio do ventrículo ocorreria devido à proliferação e diferenciação das células regenerativas, que se intercalavam entre as células preexistentes. Apesar disso, a fonte de células regenerativas ainda não é sabida. Não há relatos de migração de células da hemolinfa para o ventrículo, mas durante cada ecdise observou-se uma pequena população de células basais que é conservada e aparentemente estas células originavam novas células digestivas durante a ecdise. Além disso, não se observou figuras de mitose no período de intermuda, sugerindo que elas apareceram antes ou durante a ecdise subsequente (Baldwin & Hakin, 1991a).

A detecção de proliferação celular é facilmente reconhecida quando há presença de células em determinadas fases da mitose como, por exemplo, na metáfase, onde os cromossomos estão muito condensados. A replicação do DNA na maioria das células eucariotas ocorre somente durante o período S ou de síntese e esta etapa da intérfase não pode ser detectada por simples observação. As células podem ser reconhecidas, entretanto, através do fornecimento de moléculas que são incorporadas na nova molécula de DNA sintetizada, como por exemplo, a ³H-timidina (timidina tritiada) e a bromodeoxiuridina (Alberts *et al.*, 2002).

Alguns componentes químicos são suficientemente similares às bases nitrogenadas normais e ocasionalmente são incorporadas ao DNA. Estes componentes são chamados análogos. Como exemplo destes temos 5-Bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) ou bromouracila (5-BU) que é um análogo da timina que possui um átomo de bromo no carbono 5, no lugar do grupo metil (-CH₃) pertencente à timina (Figura 1). Esta mudança não afeta os átomos que participam da formação das pontes de hidrogênio, mas a presença do bromo altera a distribuição dos elétrons. A forma normal (ceto) de BrdU parecia com a adenina, porém, BrdU pode frequentemente ocorrer na forma enol ou ionizada, pareando com guanina (Figura 1). Portanto, a natureza do pareamento formado na replicação dependerá da forma da BrdU no momento do pareamento (Griffiths *et al.*, 2000). Ocasionalmente, BrdU é incorporada no lugar da citocinina, o que gera a transição G-C → A-T (Voet *et al.*, 2000).

Anticorpo monoclonal anti-BrdU pode ser usado para identificar células que incorporaram BrdU. Este procedimento foi desenvolvido por Gratzner (1982) e representa uma alternativa à utilização de timidina tritiada, por ser mais rápido e menos perigoso, pois, BrdU não é radioativa.

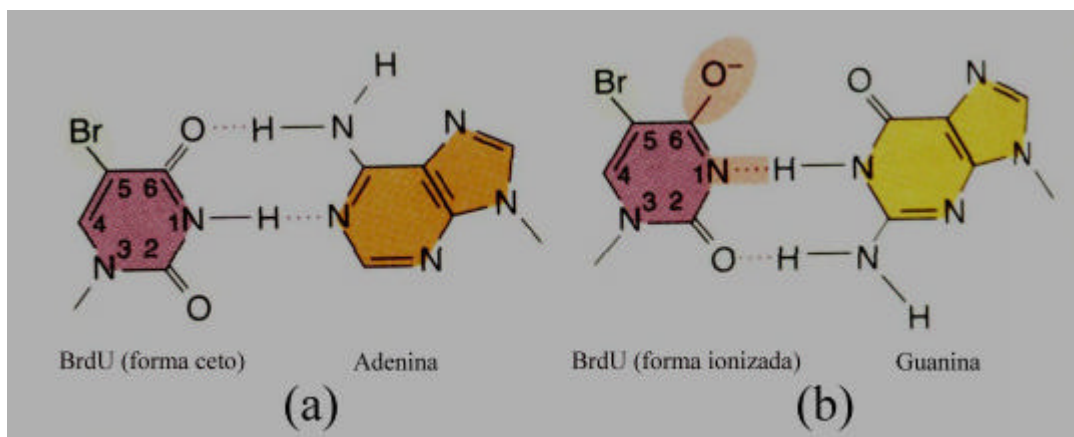


Figura 1: Pareamentos possíveis para BrdU. (a) forma ceto pareada com adenina. (b) forma ionizada de BrdU pareada com guanina (modificado de Griffiths *et al.*, 2000).

No presente trabalho lançamos mão desta técnica com o intuito de investigarmos a presença de proliferação celular no ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* durante a metamorfose, pelo fato de marcações com BrdU terem sido utilizadas com sucesso em outros insetos, especificamente nos estudos de neurogênese. Como exemplo temos os trabalhos de Vitt & Hartfelder (1998) com *A. mellifera* (Apidae), Zacharias *et al.* (1993) com *Schistocerca gregaria* (Acrididae), Stocker *et al.* (1995) com *Drosophila melanogaster* (Diptera) e Cayre *et al.* (2000) que investigaram a proliferação de neuroblastos de *Acheta domesticus* (Orthoptera). Existem também estudos com *corpora cardiaca* em *S. gregaria* (Kirschenbaum & O'Shea, 1993), com ovário em *A. mellifera* (Capella & Hartfelder, 1998) e com células do intestino médio de *M. sexta*, cultivadas *in vitro* (Loeb & Hakim, 1996).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo estudar a reorganização dos ninhos de células regenerativas em *M. quadrifasciata anthidioides* durante o desenvolvimento pós-embrionário, para testar a hipótese de que novas células digestivas são originadas de células regenerativas devido à ocorrência de mitoses. Além disso, pretende-se investigar se há um momento durante a pupação em que ocorreria uma sincronização das mitoses nestas células.

2. MATERIAL E METODOLOGIA

ANIMAIS

Os exemplares de *M. quadrifasciata anthidioides* foram obtidos de colônias mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, transferidos para o laboratório e dissecados em solução salina para insetos para a extração do sistema digestivo. Utilizou-se indivíduos em diferentes fases: 27 larvas de diversos tamanhos, 15 pré-pupas, 18 pupas de operárias, sendo seis pupas de olhos brancos, seis pupas de olhos marrons e seis pupas de olhos pretos e nove adultos (três operárias nutridoras e seis forrageiras). Das 27 larvas, 23 estavam no período alimentar e quatro estavam no período de defecação, duas das quais com dois dias após o início da defecação e duas com cinco dias após terem iniciado a defecação.

HISTOLOGIA

Os intestinos médios foram fixados em solução de ácido pícrico e paraformaldeído em tampão fosfato (Stefanini *et al.*, 1967) por um intervalo que variou de 6 a 24 horas. Para as larvas somente o ventrículo foi preservado, enquanto as demais fases o intestino anterior e o ventrículo foram processados integralmente.

Os intestinos foram desidratados em solução alcoólica crescente, embebidas por 24 horas e incluídas em historesina JB-4[®], polimerizada a vácuo, à temperatura ambiente por 12 h.

Secções (1-2 μ m) foram obtidas com micrótomo, com navalha de vidro, coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%. As lâminas foram montadas com Entellan[®], observadas e fotografadas em microscópio fotônico.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

A síntese de DNA foi estudada utilizando-se kit para detecção de proliferação celular Boehringer Mannheim.

Nas pré-pupas e pupas injetou-se 5 µL de 5-Bromo-2'-deoxi-uridina com o auxílio de um microinjetor ou microseringa na região abdominal. Após a injeção de BrdU, as observações foram feitas de 4 h em 4 h, durante 24 h.

Depois de fixados, os intestinos foram submetidos a três lavagens de 1 h cada, em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100 (PBST), seguindo-se incubação por 24 h a 4 °C em solução de anticorpo primário anti BrdU obtido em rato, diluído em tampão de incubação (1:100). Amostras foram lavadas três vezes em tampão de lavagem (15 min cada), seguidas de incubação com solução de anticorpo secundário de ovelha (anti IgG de rato) conjugado com FITC por mais 24 h a 4 °C. Sucederam-se três lavagens com tampão de lavagem e o material foi desidratado em etanol, embebidos em historesina, seccionados a 15 µm de espessura e montadas com VectaShield® (Vector Lab.). A fluorescência foi observada e fotografada em fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX-60 com filtro WB.

IMUNOPEROXIDASE

Para os testes de imunocitoquímica com peroxidase, 12 indivíduos (seis pupas de olhos brancos e seis pupas de olhos marrons) foram utilizados e as observações foram feitas 24 h após a injeção de solução de BrdU .

Após a fixação, as peças foram lavadas durante 10 min por três vezes com PBST 1%. Utilizou-se solução de fenilhidrazina a 1% por 40 min em temperatura ambiente, a fim de se bloquear a peroxidase endógena. Subseqüentemente as amostras foram lavadas três vezes com PBST 1%, por 5 minutos cada, sendo a primeira lavagem à temperatura ambiente e as demais a 37 °C. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro albumina bovina 1,5% (BSA) em PBST 0,05%, pH 7,4 por

10 min. Após nova lavagem em PBST 1% por 10 min a 37 °C, procedeu-se incubação em soro de camundongo a 2% em PBST 1% por 20 minutos a 37 °C, a lavagem com PBST 1% três vezes (30 min cada) e a incubação com anticorpo primário anti-BrdU (1:100) em PBST 1% por 24 h a 4°C. Após este período foi realizada a lavagem com BSA 1% em temperatura ambiente e com PBST 1% três vezes (30 min cada). Em seguida procedeu-se incubação em anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:300) em PBST 1% por 24 h a 4 °C, seguida da lavagem com PBST 1% três vezes (30 x min cada). Peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB) por 15 min, bloqueando-se a reação com água destilada. Subseqüentemente, as peças foram processadas para microscopia fotônica, como descrito anteriormente, seguido da contracoloração das lâminas com eosina por 2 min.

CONTROLES

Três gânglios cerebrais de pré-pupas e o intestino anterior foram utilizados como controle positivo, já que se sabia da ocorrência de proliferação celular nestes órgãos durante o processo de metamorfose em abelhas. Para os gânglios cerebrais foram dados pulsos de 24 h, enquanto que para os proventrículos foram feitas observações juntamente com o ventrículo, ou seja durante 24 h com intervalos de 4 h. Três pré-pupas e duas pupas de olhos brancos foram utilizadas como controle negativo para os tratamentos com anticorpo secundário conjugado a fluoresceína e uma pupa de olhos brancos foi utilizada como controle negativo, para os tratamentos com anticorpo secundário conjugado a peroxidase, onde os mesmos passaram pelos mesmos tratamentos descritos acima, exceto pela incubação com anticorpo anti BrdU.

3. RESULTADOS

O ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* consiste de um epitélio simples, sendo reconhecidas as células digestivas e as células regenerativas em contato a membrana basal. Todas as fases aqui observadas apresentavam uma túnica muscular externa, que foi facilmente visualizada. Pode-se distinguir a túnica muscular composta por duas camadas: uma circular, mais interna e mais desenvolvida, e uma longitudinal externa (Figuras 2 - 17).

Nas larvas o ventrículo apresenta o epitélio composto por uma população uniforme de células digestivas, que são prismáticas, com uma borda estriada e que aparentemente aumentam de tamanho com o desenvolvimento larval (Figuras 2 e 3). A matriz peritrófica do ventrículo da larva chega ser mais espessa que o próprio epitélio do ventrículo larval, isolando o epitélio do conteúdo do espaço endoperitrófico, onde estão contidos os grãos de pólen e a flora bacteriana (Figuras 2 e 8).

Os ninhos de células regenerativas localizam-se na base do epitélio do ventrículo. Durante todo o desenvolvimento larval elas ocorrem em grande quantidade, porém, o número e o tamanho dos ninhos aumentam (Figuras 3 - 7).

Nas larvas mais novas as células regenerativas são arredondadas ou ovais, sem prolongamentos, formando ninhos isolados com uma ou duas células. A morfologia do ninho varia, sendo na maior parte das vezes oval. Alguns ninhos se encontram envolvidos por uma única célula digestiva ou quase sempre eles são observados entre os limites basais das células digestivas (Figuras 3 e 4).

À medida que a larva se desenvolve, o número e o tamanho das células regenerativas aumenta de seis até oito células por ninho em larvas no início da defecação (Figuras 6 e 7). Além de aumentarem de tamanho, as células regenerativas apresentam um núcleo maior e passam para um formato fusiforme devido à emissão de prolongamentos, que aumentam de tamanho até que prolongamentos de ninhos vizinhos se encontrem (Figuras 6 - 7).

Figura 2: Secção longitudinal do ventrículo de larva menos desenvolvida de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Note a presença de um epitélio com células digestivas prismáticas (cd), com um núcleo (N) mediano e borda estriada (b) de fácil identificação. gp- grãos de pólen; m- túnica muscular; mp- matriz peritrófica. Barra = 10 µm.

Figura 3: Secção longitudinal do epitélio do ventrículo de larva menos desenvolvida de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando em detalhe as células digestivas (cd). Note a presença de um ninho (n) de células regenerativas englobado por uma célula digestiva. Ponta de seta- núcleo da célula regenerativa; b- borda estriada; m- túnica muscular; N- núcleo da célula digestiva. Barra = 10 µm.

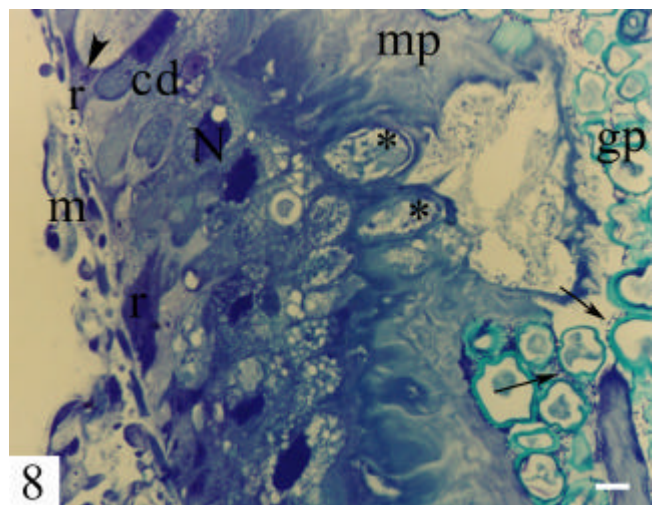
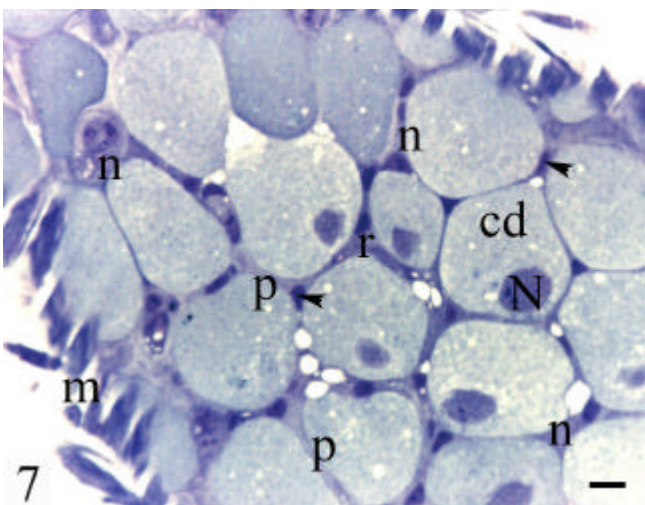
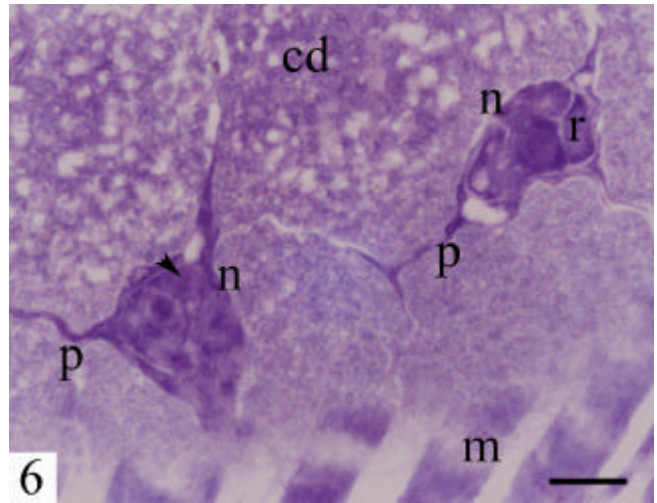
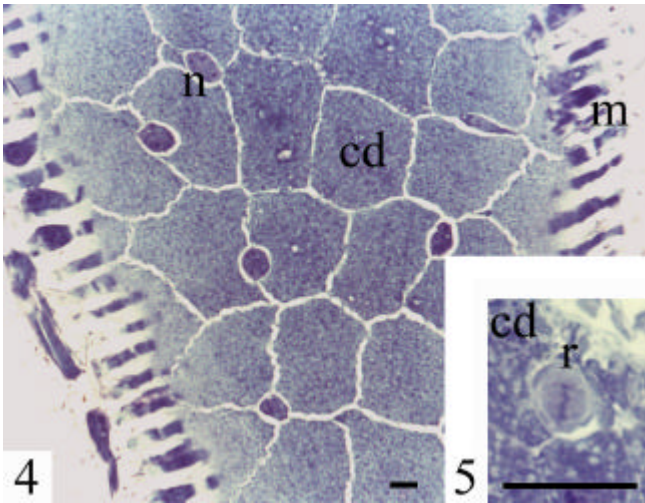
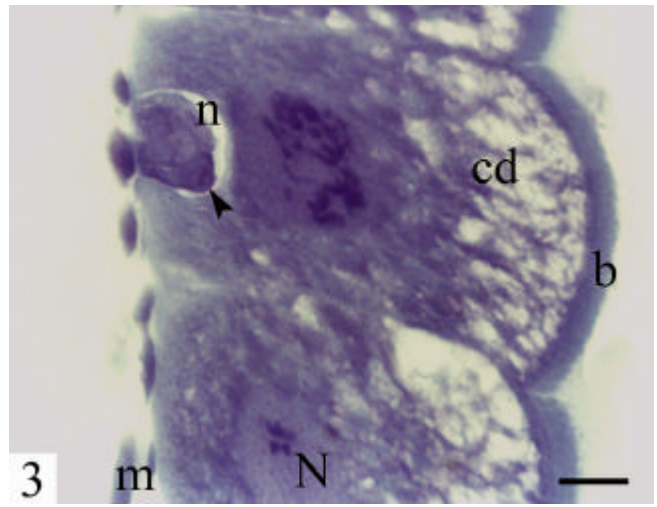
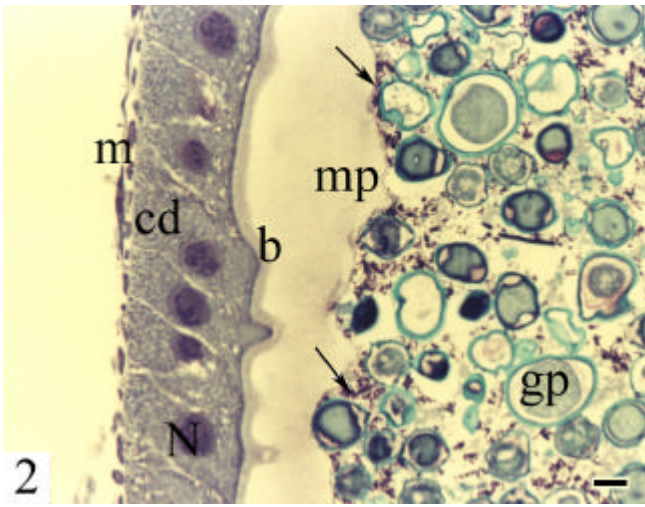
Figura 4: Secção tangencial do ventrículo de larva menos desenvolvida de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando vários ninhos de células regenerativas (n) com diferentes tamanhos e diferentes números de células regenerativas entre as células digestivas (cd). m- túnica muscular. Barra = 10 µm.

Figura 5: Secção tangencial do ventrículo de larva menos desenvolvida de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, onde se observa um ninho com uma célula regenerativa (r) em metáfase. cd- célula digestiva. Barra = 10 µm.

Figura 6: Secção tangencial do ventrículo de larva mais desenvolvida de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mostrando em detalhe dois ninhos de célula regenerativas (n), mostrando a emissão de prolongamentos (p) pelas células regenerativas (r), que partem em direção aos ninhos vizinhos. cd- célula digestiva; ponta de seta- núcleo da célula regenerativa; m- túnica muscular. Barra = 10 µm.

Figura 7: Secção tangencial da porção posterior do ventrículo de larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, dois dias depois de iniciada a defecação, mostrando células digestivas (cd) com núcleos excêntricos (N) e ninhos de células regenerativas (n), formando uma espécie de rede entre as células digestivas. Ponta de seta- núcleo da célula regenerativa; m- túnica muscular; p- prolongamento das células regenerativas. Barra = 10 µm.

Figura 8: Secção longitudinal da região anterior do ventrículo de larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, dois dias depois de iniciada a defecação. Note o desprendimento das células digestivas (cd), que apresentam citoplasma vacuolizado (*), núcleo condensado (N) e borda estriada ausente. Simultaneamente, se observa o desenvolvimento das células regenerativas (r) que se coram intensamente pelo azul de toluidina. Ponta de seta - núcleo da célula regenerativa; gp- grãos de pólen; m- túnica muscular; mp- matriz peritrófica; setas- bactérias. Barra = 10 µm.



Como as células regenerativas são relativamente pequenas, a visualização destas foi facilitada pelo seccionamento tangencial do ventrículo, o que facilitou também visualizar os prolongamentos celulares, que estão em contato com a membrana basal.

No início da defecação, a região anterior do ventrículo afina-se primeiro que a região posterior e concomitante ao processo de defecação inicia-se a degeneração do epitélio larval. É nas intermediações com o intestino anterior, que se observa o início do desprendimento das células digestivas no segundo dia após ter se iniciado a defecação. Nesta região as células digestivas larvais apresentam um núcleo com cromatina condensada e a região apical se torna vacuolizada, não sendo possível reconhecer borda estriada (Figura 8).

Cinco dias depois de iniciada a defecação, a desorganização do epitélio do ventrículo aumenta. Percebe-se na região anterior do ventrículo a coexistência de duas camadas de células: uma mais próxima da luz e outra mais externa. A primeira faz parte do antigo epitélio larval em estágio adiantado de degeneração com células com núcleo picnótico e fragmentado e com o citoplasma vacuolizado. A segunda camada é desorganizada e é formada por células polimórficas, originadas das células regenerativas menores que estão em processo de diferenciação, as quais exibem forte afinidade pelo corante azul de toluidina (Figuras 8 e 9). Quando se analisa a região posterior do ventrículo das larvas defecantes, nota-se ainda a integridade do epitélio. Neste caso as células digestivas estão intactas, com um núcleo excêntrico e as células regenerativas são bem maiores que as encontradas nas larvas que estavam na fase de alimentação. Nesta região as células regenerativas de diferentes ninhos estão em contato, formando uma rede de células regenerativas (Figura 7).

Durante o desenvolvimento larval e durante a defecação o limite entre células regenerativas de diferentes ninhos não é visualizado quando se utiliza a objetiva de 100x, dando a impressão de que estas formam um sincício (Figura 7).

Nas pré-pupas um novo epitélio já está estabelecido, porém está desorganizado, com células de diferentes alturas, sendo este caracterizado como epitélio pseudoestratificado. Nota-se a presença de células basais, que correspondem às células regenerativas, que estão espalhadas, separadas umas das outras. Em algumas pré-pupas, a luz do ventrículo está preenchida com restos celulares,

resultantes do descarte do epitélio larval (Figura 10). Num estágio mais avançado do desenvolvimento os restos celulares do epitélio larval já não mais preenchem a luz do ventrículo e o que se observa no lugar são estruturas semelhantes a vesículas, que são eliminadas pelos ápices das células digestivas (Figura 11).

Nas pré-pupas as novas células digestivas são vacuolizadas e em alguns indivíduos estas já apresentam borda estriada definida e a superfície epitelial começa apresentar reentrâncias que correspondem ao início da formação das pregas (Figura 11).

Nas pupas de olhos brancos o epitélio do ventrículo apresenta uma maior organização, com células ainda altas, porém mais baixas que as encontradas nas pré-pupas. Aqui as células basais (ou regenerativas) estão também espalhadas como nas pré-pupas sendo possível distinguir a presença de borda estriada nas células digestivas e pregas na parede do ventrículo (Figura 12). Nesta fase as células regenerativas formam pequenos ninhos inconspícuos e com poucas células (Figura 13).

Nas pupas de olhos marrons e olhos pretos o epitélio do ventrículo é muito parecido e as células digestivas são mais baixas que as observadas nas pré-pupas e pupas de olhos brancos. Os ninhos de células regenerativas e as pregas ficam mais definidos. Nesta fase, os ninhos de células regenerativas apresentam células com diferentes tamanhos e estas não apresentam prolongamentos (Figuras 14 e 15).

Com o desenvolvimento da pupa, os ninhos de células regenerativas tornam-se cada vez mais definidos e aparentemente o número de células regenerativas por ninho aumenta (Figuras 10, 13 - 15).

Nos adultos o ventrículo é caracterizado pela presença de pregas e é na base destas pregas que se localizam os ninhos de células regenerativas. As células digestivas apresentam um núcleo mediano, bem desenvolvido, são altas e com a borda estriada de fácil identificação (Figuras 16 e 17).

Nos ninhos de células regenerativas do adulto distinguem-se dois tipos de células: as células maiores, que ocupam as bordas do ninho e exibem prolongamentos; e as células menores, imbricadas, que ocupam interior do ninho, formando uma estrutura semelhante ao bulbo da cebola. As células do interior do ninho são côncavas e bem menores que as células da borda do ninho (Figuras 16 e 17). As

células regenerativas que ocupam a porção externa do ninho parecem estar em contato com a luz do ventrículo (Figura 17).

Nas larvas de diferentes tamanhos observa-se com pouca frequência figuras de mitose nos ninhos de células regenerativas (Figura 5), enquanto que não se detectou nenhuma célula digestiva em divisão.

Marcações com BrdU foram observadas durante a metamorfose, 12 horas após a injeção de solução de BrdU nas pré-pupas. Pode-se distinguir dois tipos de marcações: uma que correspondente ao núcleo das células digestivas (Figura 18) e outra que corresponde ao núcleo das células regenerativas (Figura 19). De modo geral uma pequena quantidade de marcações de células regenerativas foi observada nas pré-pupas (Figura 19). Particularmente, em três pré-pupas, com pulso de 24 h, nota-se uma abundância de células basais BrdU positivas, muitas delas aos pares, bem como células digestivas BrdU positivas que apareceram em grande quantidade nestas pré-pupas (Figura 18). No epitélio do ventrículo das pupas de olhos marrons e olhos pretos não se observa células BrdU positivas.

Nas pupas de olhos brancos e olhos marrons há algumas células marcadas, porém estas células aparentemente não fazem parte do epitélio do ventrículo, estando aderidas externamente à parede do ventrículo (Figura 20). Estas células marcadas também são detectadas quando se utiliza anticorpo secundário conjugado à fluoresceína, porém, a origem destas não foi investigada.

Quanto aos controles positivos, observa-se uma quantidade grande de células epiteliais na epiderme e no gânglio cerebral de pré-pupas e no proventrículo de pupas de olhos brancos e marrom (Figura 21). Marcações nos proventrículos foram obtidas 4 h após a injeção de solução de BrdU e nos gânglios cerebrais, após 24 h.

Figura 9: Secção tangencial da região anterior do ventrículo de larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, cinco dias depois de iniciada a defecação. Abaixo do epitélio larval em degeneração (setas), vê-se o epitélio da pupa em formação, constituído pelas células regenerativas (r) em diferenciação. cd- célula digestiva; m- túnica muscular; N- núcleo da célula digestiva. Barra = 10 µm.

Figura 10: Secção longitudinal do ventrículo de pré-pupa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. O epitélio é constituído por células digestivas (cd) recém formadas com diferentes alturas e com células basais (pontas de seta), espalhadas entre as células digestivas. Note-se na luz a presença de restos celulares (setas) resultante do descarte do epitélio larval. *- núcleo da célula regenerativa; L- lâmina basal; m- túnica muscular; N - núcleo da célula digestiva. Barra = 10 µm.

Figura 11: Secção longitudinal do ventrículo de pré-pupa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Com o desenvolvimento da pré-pupa, as células digestivas (cd) eliminam borbulhas (*) pelos ápices. Ainda nesta fase o epitélio torna-se mais organizado e aparecem reentrâncias (seta) que originarão pregas. m- túnica muscular; N- núcleo da célula digestiva. Barra = 10 µm.

Figura 12: Secção longitudinal do ventrículo de pupa de olhos brancos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Nesta fase nota-se o surgimento de borda estriada (b) nas células digestivas (cd), que são altas. m- túnica muscular; N- núcleo da célula digestiva; setas- pregas. Barra = 10 µm.

Figura 13: Secção longitudinal do ventrículo de pupa de olhos brancos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando em detalhe um ninho (n) com duas células regenerativas. cd- célula digestiva; m- túnica muscular. Barra = 10 µm.

Figura 14: Secção longitudinal do ventrículo de pupa de olhos pretos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Nesta fase as células digestivas (cd) são mais baixas, que na pupa de olhos brancos. Os ninhos de células regenerativas (pontas de seta) situam-se isoladamente na base de cada prega (setas). b- borda estriada; L- lâmina basal. Barra = 10 µm.

Figura 15: Secção tangencial do ventrículo de pupa de olhos pretos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando em detalhe ninhos (n) de células regenerativas (r) entre as células digestivas (cd). Nesta fase as células regenerativas não apresentam prolongamentos. pontas de seta- núcleo das células regenerativas; m- túnica muscular. Barra = 10 µm.

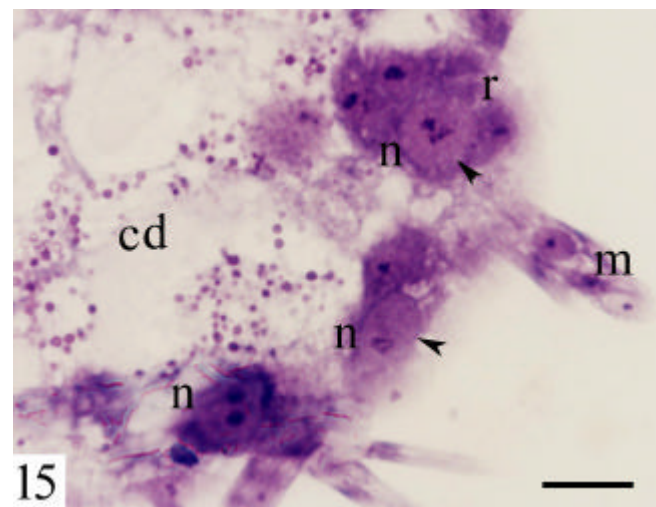
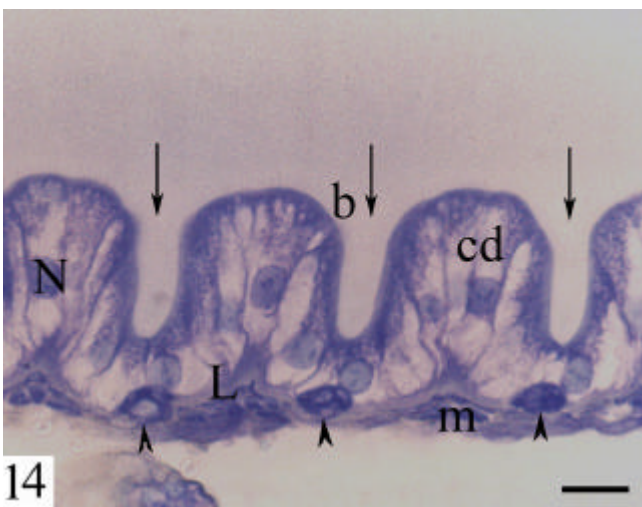
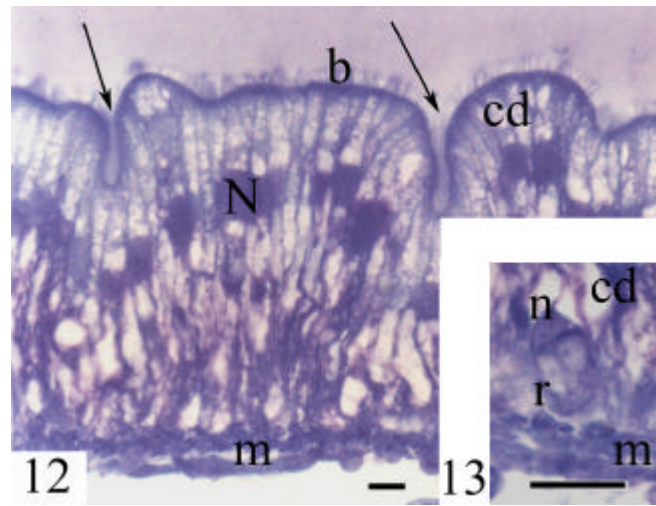
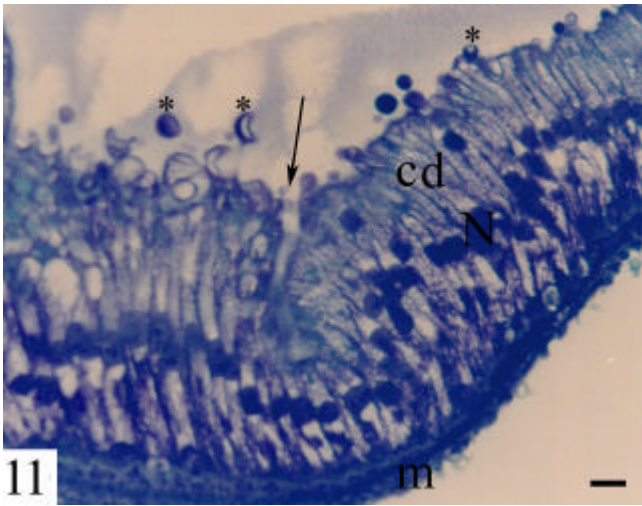
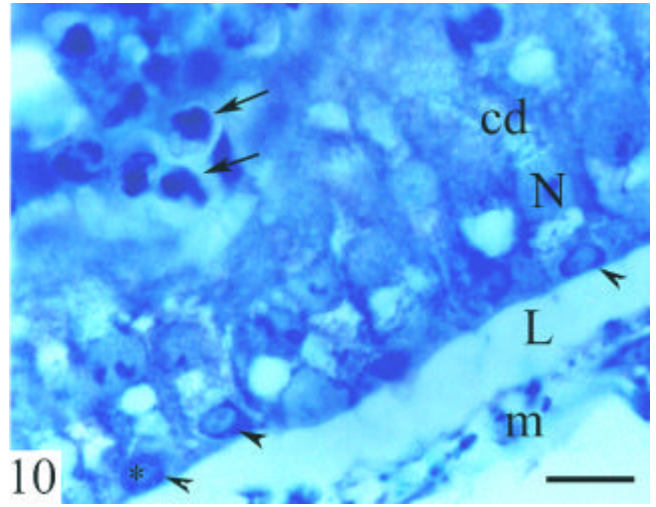
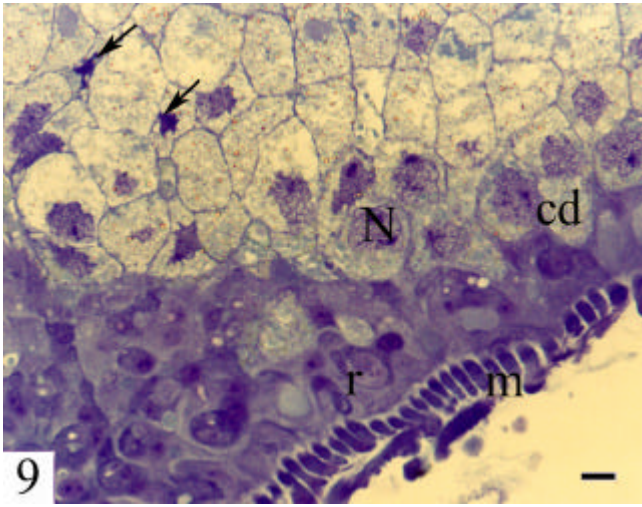


Figura 16: Secção longitudinal do ventrículo de uma operária forrageira de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando em detalhe um ninho (n) de células regenerativas (r). No interior do ninho as células são menores e imbricadas, enquanto que as células mais externas do ninho são maiores e emitem prolongamentos (seta). cd- célula digestiva; pontas de seta- núcleo das células regenerativas; m- túnica muscular. Barra = 10 μ m.

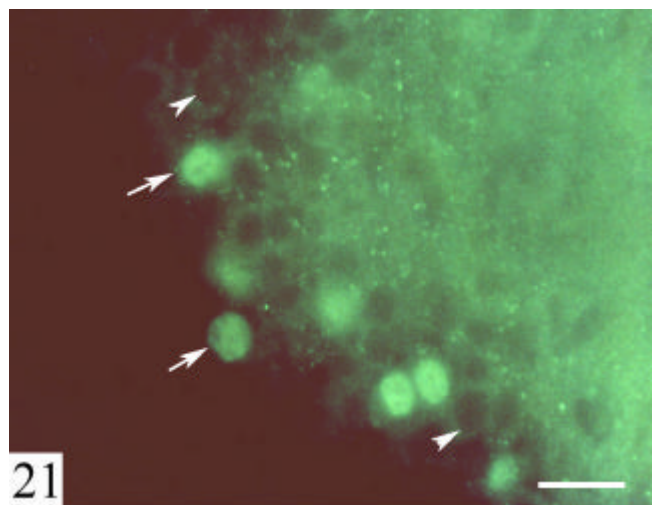
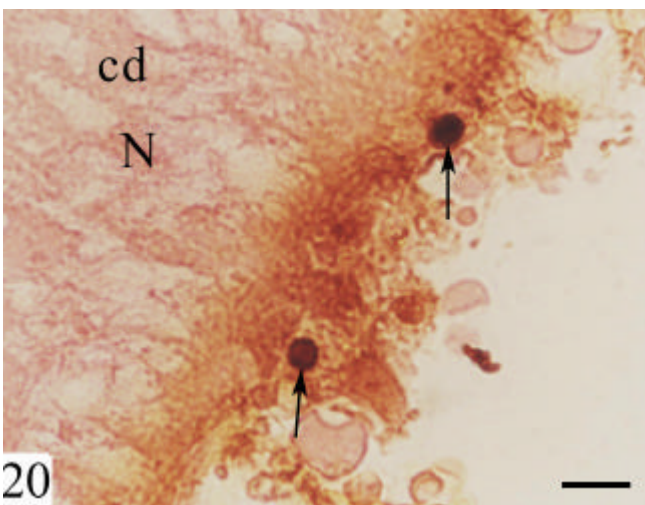
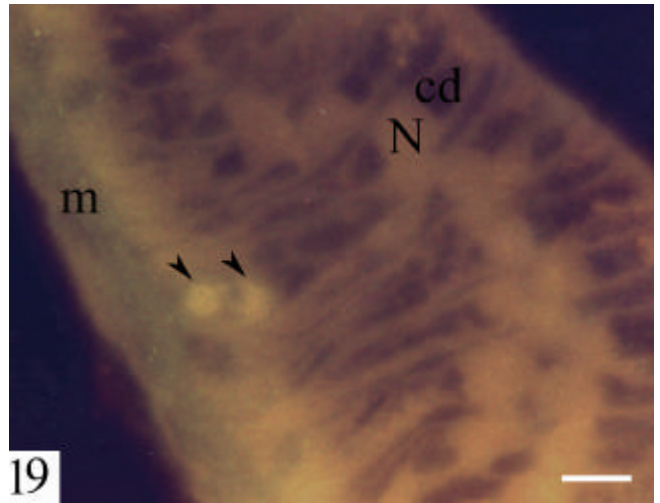
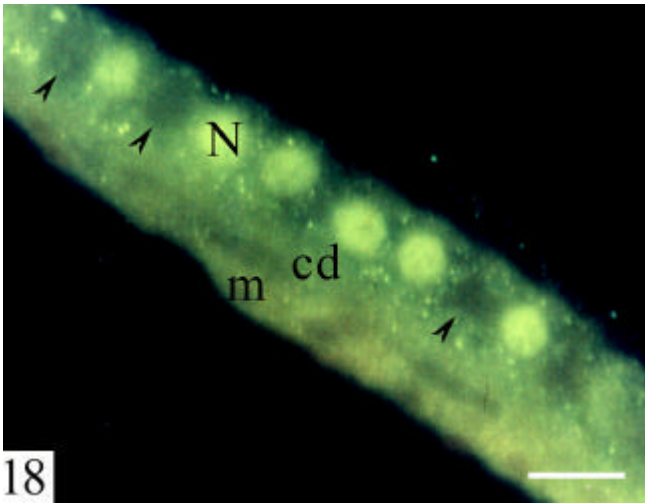
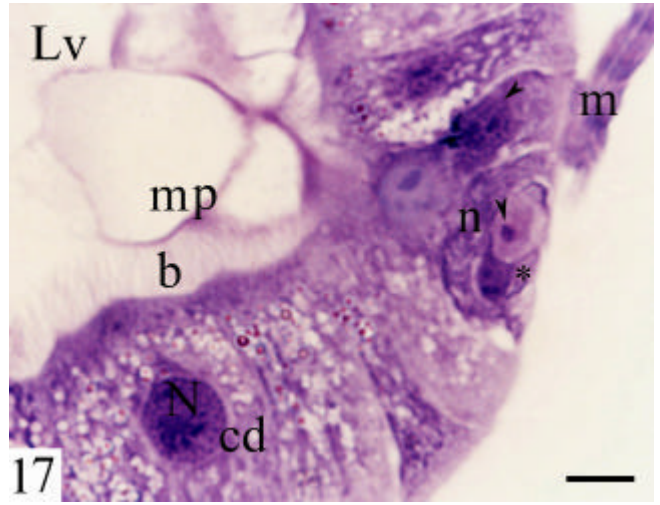
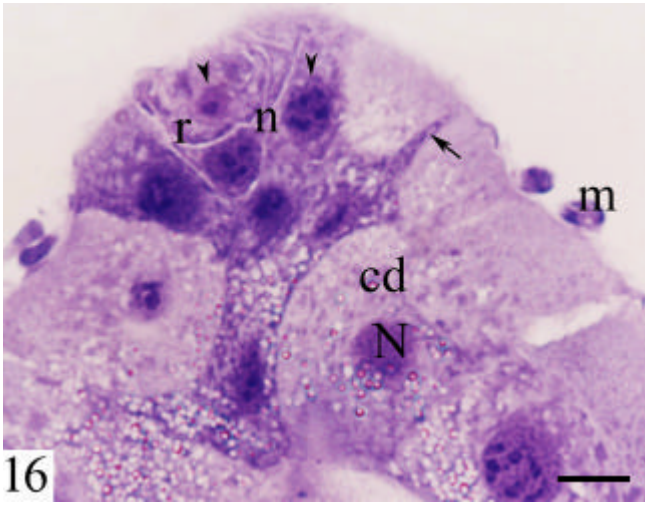
Figura 17: Secção longitudinal do ventrículo de uma operária forrageira de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando em detalhe de um ninho (n) de células regenerativas, cujas células externas estão em contato com a luz do ventrículo. *- célula regenerativa do interior do ninho; b- borda estriada; d- célula digestiva; pontas de seta- núcleo das células regenerativas; Lv- luz do ventrículo; m- túnica muscular; p- matriz peritrófica. Barra = 10 μ m.

Figura 18: Secção longitudinal do ventrículo de pré-pupa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, 12 h após a injeção de BrdU, mostrando células digestivas BrdU positivas (cd), marcadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína, intercaladas com células BrdU negativas (pontas de seta). N- núcleo de célula digestiva; m- túnica muscular. Barra = 10 μ m.

Figura 19: Secção longitudinal do ventrículo de pré-pupa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, 16 h as após a injeção de BrdU, mostrando um par de núcleos de células regenerativas BrdU positivas (pontas de seta) marcados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína. cd- célula digestiva; N- núcleo de célula digestiva não marcado; m- túnica muscular. Barra = 10 μ m.

Figura 20: Secção longitudinal do ventrículo de pupa de olhos brancos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, 24 h após a injeção de BrdU, mostrando núcleos (setas) em células aderidas à parede do ventrículo marcados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. cd- célula digestiva; N- núcleo de célula digestiva. Barra = 10 μ m.

Figura 21: Secção tangencial do ventrículo de pupa de olhos brancos de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando células BrdU positivas (setas) marcadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína e células BrdU negativas (pontas de seta), observadas 4 h após a injeção de BrdU. Barra = 10 μ m.



4. DISCUSSÃO

A reestruturação do ventrículo das abelhas durante a metamorfose já foi estudada por Oertel, (1930), Snodgrass (1956), Cruz-Landim & Mello (1970), Cavalcante (1998), Neves (2002), Neves *et al.* (2002), Neves *et al.* (2003) e Cruz-Landim & Cavalcante (2003). Porém, esses estudos não priorizaram a reorganização dos ninhos de células regenerativas durante o desenvolvimento pós-embriônico das abelhas. No presente trabalho procurou-se rever alguns aspectos das modificações do ventrículo durante a metamorfose e investigar a reorganização dos ninhos de células regenerativas durante o desenvolvimento pós-embriônico de *M. quadrifasciata anthidioides*.

A organização do ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* é bastante semelhante à observada nas abelhas, no sentido de que o ventrículo é formado por um epitélio simples, que repousa sobre uma lâmina basal. Externamente se observa uma camada muscular, que é responsável pelos movimentos peristálticos. Em todas as fases aqui estudadas prevalece no epitélio do ventrículo uma população uniforme de células digestivas, intercaladas com os ninhos de células regenerativas como observado por Cruz-Landim & Mello (1970), Weaver & Scott (1990), Cruz-Landim & Costa-Leonardo (1996), Serrão & Cruz-Landim (1996b; 2000), Cavalcante, (1998) Neves (2002), Cruz-Landim & Cavalcante (2003) e Guedes *et al.* (2003).

As células digestivas mostram uma morfologia semelhante ao longo de todo ventrículo, apresentando um núcleo grande e mediano, o que condiz com a alta taxa de síntese destas células, que secretam as enzimas digestivas e absorvem os nutrientes, sendo estas características bastante comuns para os insetos (Ferreira *et al.*, 1981; Baker *et al.*, 1983; Lehane & Billingsley, 1996; Chapman, 1998; Serrão & Cruz-Landim, 1996b; Andrade-Coelho *et al.*, 2001).

No adulto a borda estriada das células digestivas é mais desenvolvida que na larva, mostrando que o ventrículo apresenta uma adaptação aos diferentes modos de vida entre a larva e o adulto. Na larva o alimento permanece no interior do ventrículo durante todo o desenvolvimento, permitindo seu aproveitamento, mesmo com uma menor taxa de absorção pelas células, como sugerido pelas características das microvilosidades. A diferença no desenvolvimento da borda estriada dos adultos

em relação às larvas poderia ser explicada pelo fato de que nesta o alimento permanece o tempo todo armazenado, enquanto que no adulto ocorre fluxo contínuo de alimento pelo sistema digestivo. Neste sentido, uma borda estriada desenvolvida compensaria a menor permanência do alimento no sistema digestivo do adulto, diferente da larva onde o alimento permanece armazenado até o final desta fase, o que provavelmente facilitaria a absorção de nutrientes (Serrão & Cruz-Landim, 1995).

A matriz peritrófica da larva é muito espessa em relação à encontrada nos adultos. Como a larva não defeca, o bolo alimentar fica armazenado até que a comunicação entre o ventrículo e o intestino posterior seja desobstruída antes do início da metamorfose (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim & Mello, 1970). Neste caso, uma matriz peritrófica espessa provavelmente teria o papel de conferir proteção para o epitélio ventricular contra patógenos que poderiam ficar armazenados junto ao bolo alimentar e contra lesões provocadas pelo alimento armazenado que é constituído principalmente de grãos de pólen. Além disso, a matriz peritrófica larval teria o papel de manter a integridade do epitélio durante a distensão provocada pela ingestão do alimento.

Durante a metamorfose as células digestivas estão em processo de diferenciação e provavelmente, não sintetizam matriz peritrófica e nem secretam enzimas, como é o caso da larva e do adulto (Terra, 1991; Chapman, 1998). Como durante a metamorfose não ocorre ingestão de alimento, o epitélio está menos susceptível ao ataque de microorganismos e não há também a necessidade de secreção de enzimas. Neste sentido o inseto não seria prejudicado pela ausência da matriz peritrófica. Nos adultos ocorre livre passagem do alimento. Neste caso, o epitélio do ventrículo dos adultos seria menos susceptível ao ataque de microorganismos e não distenderia tanto quanto o ventrículo larval, já que no adulto não ocorre o armazenamento do alimento no ventrículo (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim & Mello, 1970).

Os ninhos de células regenerativas dos adultos aqui observados estão equidistantes uns dos outros, como os descritos para *Apis mellifera* por Raes *et al.* (1994). Porém, na larva estes estão espalhados aleatoriamente por entre as células digestivas, não estando equidistantes um dos outros como nos adultos. Além disso, no adulto o ventrículo possui anelações que correspondem às pregas, que se formam em consequência do desenvolvimento da musculatura circular. Os ninhos de células

regenerativas se localizam somente na base destas anulações, diferente do padrão encontrado nas larvas, onde a musculatura do ventrículo é menos desenvolvida que a do adulto (Cruz-Landim & Mello, 1970).

De acordo com Raes *et al.* (1994), as células regenerativas formam criptas no epitélio do ventrículo do adulto de *A. mellifera*. Porém Cruz-Landim *et al.* (1996) descrevem o conjunto de células regenerativas das abelhas como estruturas que formam grupos ou ninhos que estão situados ao mesmo nível basal das células digestivas, o que não caracteriza a formação de criptas, o que também foi observado aqui em *M. quadrifasciata anthidioides*. Criptas regenerativas são comumente encontradas nos coleópteros (Chapman, 1998) e não na base de pregas do ventrículo das abelhas.

Em *M. quadrifasciata anthidioides* o ventrículo aumenta de tamanho durante o desenvolvimento larval, sendo que parte deste desenvolvimento deve-se ao aumento do tamanho das células digestivas enquanto ocorre a alimentação da larva (Cruz-Landim & Mello, 1970; Baldwin & Hakin, 1991a) e pelo aumento do número de células digestivas devido à diferenciação das células regenerativas que se alongam em direção ao lúmen (Serrão & Cruz-Landim, 2000). Em *Manduca sexta* (Lepidoptera) do primeiro ao quinto instar larval, a superfície de contato do intestino médio aumenta aproximadamente 200 vezes, o que ocorre pelo aumento do tamanho das células existentes antes de cada muda e também pelo aumento da população de células digestivas, através da diferenciação das células regenerativas (Baldwin & Hakin, 1991a). Werner *et al.* (1991) descreveram para *Gerris najas* (Heteroptera) células regenerativas em diferentes estágios de desenvolvimento intercaladas com as células digestivas. A detecção de células regenerativas em processo de diferenciação também foi constatada nas abelhas adultas por Cruz-Landim *et al.* (1996) e Raes *et al.* (1994) e, em larvas de lepidópteros, por Baldwin & Hakin (1991a). Um outro mecanismo que poderia ser responsável pelo aumento de área do ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* poderia ser o aumento da quantidade de ninhos de células regenerativas e o aumento do tamanho dos ninhos, que poderia ter o papel de preencher os espaços entre as células digestivas durante o estiramento do ventrículo.

Além de aumentar a área do epitélio do ventrículo, os prolongamentos das células regenerativas larvais serviriam para manter os ninhos em contato, possibilitando a sincronização da diferenciação celular que levaria a formação do epitélio do imago durante a metamorfose. Sabe-se que nos lepidópteros as células regenerativas estão interligadas por junções (*gap junctions*) comunicantes, que possibilitam a comunicação intercelular e poderiam ter um papel fundamental na sincronização da diferenciação das mesmas (Baldwin & Hakin, 1991a). Em *A. mellifera* não se observa a presença de estruturas responsáveis pela conexão intercitoplasmática das células que ocupam o interior dos ninhos de células regenerativas, porém notou-se que nas células regenerativas da porção mais externa dos ninhos, ocorrem estruturas denominadas fusomas, que provavelmente funcionam de forma análoga às junções comunicantes dos lepidópteros, interconectando os citoplasmas das células mais externas sendo responsável pela diferenciação sincrônica das mesmas (Raes *et al.* 1994). A presença de fusomas não se limita às células regenerativas, sendo estas estruturas comumente encontradas nos ovários meroísticos dos insetos, sendo responsáveis pela interconexão dos cistócitos (Büning, 1994). A não observação de limite celular entre células regenerativas de diferentes ninhos do ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides*, sugere a existência de uma estrutura semelhante a um sincício celular, porém estudos ao microscópio eletrônico de transmissão são necessários para que isso seja confirmado.

Nas larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre proliferação das células regenerativas, que foi facilmente detectado pela simples observação de células em metáfase e parece que isto acontece também em *M. sexta* como observado por Baldwin & Hakim (1991a) e Baldwin *et al.* (1993). Durante o desenvolvimento larval e durante a metamorfose, a demanda por células regenerativas provavelmente é grande nos insetos. Considerando que as exigências nutricionais da larva aumentam com o desenvolvimento e que o surgimento de novas células digestivas e o desenvolvimento das mesmas são fatores necessários para atender as necessidades nutricionais da larva, as células regenerativas teriam que se dividir para repor aquelas células que se diferenciam, se não o estoque de células regenerativas acabaria. Além disso, o epitélio do adulto é reconstruído às custas da diferenciação das células regenerativas larvais, para fornecer as células para a reposição

epitelial durante a metamorfose (Judy & Gilbert, 1970; Cruz-Landim & Mello, 1970; Cavalcante, 1998; Neves, 2002; Cruz-Landim & Cavalcante, 2003; Serrão & Cruz-Landim, 2000). De qualquer forma o número de mitoses encontrado nas células regenerativas das larvas, parece ser baixo, o que necessita de estudos mais aprofundados para quantificar estas divisões.

Tanto as células digestivas quanto as regenerativas da pré-pupa, foram marcadas 12 h após a injeção de BrdU, sugerindo que nesta fase ocorre a síntese de DNA por estas células. A incorporação de BrdU pelas células regenerativas sugere que é na fase de pré-pupa que as células regenerativas proliferam para recompor os ninhos de células regenerativas do imago, que se tornam definidos nas pupas de olhos marrons e olhos pretos. Isto pode ser comprovado pelo fato de que células basais marcadas foram comumente encontradas aos pares, o que poderia ser o resultado do processo de mitose. Estes resultados são esperados pelo fato de que boa parte do estoque de células regenerativas larvais se diferencia para originar as células digestivas do adulto (Cavalcante, 1998; Serrão & Cruz-Landim, 1996b; 2000; Neves, 2002). Neste sentido, a proliferação das células regenerativas ocorreria para compensar o consumo de células regenerativas durante a metamorfose, e para garantir a presença destas nos adultos, que também dependem das células regenerativas para manutenção do epitélio do ventrículo (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996; Cruz-Landim *et al.*, 1996; 1997; Werner, 1991).

Nota-se uma abundância de células digestivas BrdU positivas nas pré-pupas. Isto poderia ser um indício de que ocorre síntese de DNA pelas células digestivas durante o processo de formação do epitélio do ventrículo do adulto, já que as células digestivas são células diferenciadas, que no adulto são comprometidas com o processo de secreção de enzimas e absorção de nutrientes (Terra, 1991; Chapman, 1998) e pelo fato de não haver indícios de que as células digestivas larvais se dividem como observado em secções histológicas do ventrículo larval de *M. sexta* por Baldwin & Hakin (1991a).

A presença de células poliplóides nos insetos é comum, como observado nas glândulas salivares dos dípteros (Pavan & Da Cunha, 1969) e nos túbulos de Malpighi de *M. quadrifasciata anthidioides* (Silva de Moraes & Cruz-Landim, 1976). Sabe-se que no ventrículo de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera) (Billigsley, 1989) e de larvas de *M. sexta* (Baldwin & Hakin,

1991b apud Baldwin et al, 1996) ocorre aumento do conteúdo de DNA do núcleo das células digestivas. Em *R. prolixus* o núcleo das células digestivas sofre mudanças no conteúdo do DNA após alimentar-se onde provavelmente, estaria ocorrendo a replicação seletiva de partes do genoma, resultando na amplificação das regiões comprometidas com funções digestivas, como genes que codificam para enzimas digestivas e não necessariamente a duplicação dos cromossomos, caracterizando uma endomitose (Billingsley, 1989), entretanto, em abelhas é desconhecida a influência da alimentação sobre o conteúdo de DNA das células digestivas. Pelo fato de ter ocorrido incorporação de BrdU no núcleo das células digestivas em *M. quadrifasciata anthidioides*, pode-se supor que estaria ocorrendo síntese de DNA pelas novas células digestivas na fase de pré-pupa.

R. prolixus é uma espécie hematófaga, que ingere grande quantidade de alimento de uma única vez, como forma de compensar períodos de jejum ao qual está sujeita (Billingsley, 1990; Chapman, 1998), o que difere das abelhas sociais, que se alimentam constantemente, não passando por períodos prolongados de escassez de alimento. Síntese de DNA possivelmente estaria ocorrendo na fase de pré-pupa, preparando o sistema digestivo do adulto para receber o alimento logo após emergirem. Seria pouco provável que ocorresse síntese de DNA antes da diferenciação das células regenerativas pelo fato das células regenerativas serem indiferenciadas, possuindo, portanto, baixa atividade de síntese proteínica. As células regenerativas possuem poucas organelas comprometidas com a atividade de síntese como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Raes *et al.*, 1994; Chapman, 1998; 1999; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Serrão, 1996). A amplificação de DNA ocorre provavelmente em regiões do genoma que codificam para proteínas úteis durante o processo de digestão, que não é o caso das células regenerativas, que não participam da secreção de enzimas e do processo de absorção de nutrientes e nem da secreção de fatores endógenos como é o caso das células digestivas e endócrinas respectivamente (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 1999; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves et al, 2002; Serrão & Cruz-Landim, 1996a).

Célula-tronco é um termo utilizado para denominar células indiferenciadas que são capazes de originar células mais especializadas. Estas células ocorrem tanto no embrião quanto nos adultos dos vertebrados. As células-tronco do embrião são denominadas células totipotentes, pois além de

originar os folhetos embrionários que darão origem a todas estruturas do adulto, originam também os anexos embrionários. No adulto as células-tronco são denominadas células multipotentes. Estas células compõem diferentes populações de células que possuem relativamente uma baixa taxa de divisão e continuamente produzem novas células-tronco bem como novas células que se desenvolvem e se diferenciam. Durante o processo de diferenciação das células-tronco até células diferenciadas, ocorre uma sucessão de células em diferentes graus de diferenciação. Estas células intermediárias são denominadas células-tronco comprometidas (*committed stem cells*), cuja divisão origina novas células comprometidas, que retêm a capacidade de se dividir, formando células mais diferenciadas, com menor capacidade de divisão, até que estas últimas perdem a capacidade de originar outras células comprometidas e originam células progenitoras, que ao se dividirem originam duas células diferenciadas (Gilbert, 2003). Uma típica célula-tronco possui as seguintes propriedades: a) não é totalmente diferenciada, ou seja, não se encontra no final do processo de diferenciação; b) apresenta uma taxa de divisão relativamente baixa; c) se divide indefinidamente enquanto o organismo viver e d) quando se divide, a progênie tem dois possíveis destinos: permanecer como célula-tronco, ou pode se diferenciar totalmente, perdendo a propriedade de se dividir (Alberts *et al.*, 2002; Gilbert, 2003).

Nos lepidópteros ocorrem três tipos principais de células no ventrículo: as células digestivas, as células regenerativas e as células caliciformes, que atuam no bombeamento de íons para o lúmen do ventrículo (Judy & Gilbert, 1970; Cioffi, 1979; Srivastava *et al.*, 1983; Chapman, 1998). Mais recentemente, o termo célula-tronco foi introduzido para denotar as células regenerativas de *M. sexta* que se diferenciam originando as outras células do epitélio do ventrículo (Hakim *et al.*, 1988; Baldwin & Hakim, 1991a; Baldwin *et al.*, 1993; 1996; Loeb *et al.*, 1999). Para serem consideradas células-tronco, as células regenerativas deveriam seguir o mesmo padrão descrito para as células-tronco de vertebrados: onde as células-tronco retêm a capacidade de se diferenciar, e ao proliferarem originam tanto células mais diferenciadas como outras células-tronco. Não existem provas de que este mecanismo exista nos insetos. Além disso, não está provado que as células regenerativas se dividem nos adultos. Raes *et al.* (1994) também utilizam o termo célula-tronco para denominar as células

regenerativas e afirmaram que as células regenerativas proliferam nos adultos de *A. mellifera*, porém neste trabalho não haviam fotos comprovando tal afirmação, somente havia um esquema com uma célula regenerativa em divisão. Pelo que foi exposto, percebe-se que o termo célula-tronco é restrito a alguns estudos com células digestivas em insetos e deve ser aplicado com cautela pela falta de estudos que investigam a diferenciação das células regenerativas. Células do ventrículo de *M. sexta* em diferentes estágios de diferenciação foram observadas *in vitro* por Loeb & Hakim (1996), porém, não se observou proliferação neste tipo de célula, o que seria esperado se a diferenciação destas fosse semelhante à diferenciação células-tronco dos vertebrados, onde se observa que as células de estágios intermediários de desenvolvimento ainda retém a capacidade de se dividir (Alberts *et al.*, 2002; Gilbert, 2003).

Nos insetos adultos a renovação de células é diferente dos vertebrados, pelo fato de que mitoses são ausentes ou raras. Mesmo assim a renovação dos tecidos é assegurada por uma certa quantidade de células indiferenciadas. O ventrículo dos insetos é um exemplo disto, porque nele ocorrem as células regenerativas que repõe as células digestivas (Cruz-Landim & Costa Leonardo, 1996; Chapman, 1998; Serrão & Cruz-Landim, 2000; Locke, 2003).

As observações feitas nas operárias nutridoras e campeiras de *M. quadrifasciata anthidioides* corroboram os resultados de Neves (2002) e de Cruz-Landim *et al.* (1996), de que não ocorre proliferação de células regenerativas nestas castas. A ausência de proliferação de células regenerativas na fase adulta também foi constatada por Reinhardt (1976) em três espécies de sifonápteros.

As operárias das abelhas sociais vivem em torno de cinquenta dias. As células digestivas têm uma vida útil menor e são substituídas através da diferenciação das células regenerativas. Nos insetos holometábolos adultos não ocorre divisão celular no ventrículo e a substituição é feita pelo reservatório de células que são produzidas durante a metamorfose. Neste sentido, a renovação do epitélio das abelhas consiste de eventos morfogenéticos que ocorrem em células latentes, para compensar a degeneração e eliminação das células digestivas (Cruz-Landim & Mello 1981 apud Cavalcante, 1998). Estes autores sugerem que mitoses não ocorrem nas abelhas adultas pelo fato de

que os ninhos celulares das operárias mais velhas de *M. quadrifasciata anthidioides*, *A. mellifera* e *Scaptotrigona postica* possuem menos células por ninho, o que indica que as células não são repostas. Portanto, o termo célula-tronco é mais adequado para designar as células indiferenciadas dos vertebrados do que para os insetos que possuem um tempo de vida mais curto que os vertebrados. Os vertebrados necessitam de reposição constante de células (Alberts *et al.*, 2002; Gilbert, 2003), enquanto que os insetos vivem bem menos e o estoque de células indiferenciadas é suficiente para reposição celular (Cruz-Landim & Mello, 1981apud Cavalcante, 1998; Locke, 2003).

Durante a defecação da larva, percebe-se que a população de células regenerativas supera a de células digestivas. Neste sentido, a população de células regenerativas larvais parece ser suficiente para que ocorra a formação do epitélio do adulto, pois a maior parte das células regenerativas se diferencia e ainda resta um pequeno estoque de células regenerativas, que prolifera na pré-pupa, restabelecendo os ninhos de células regenerativas do adulto.

As marcações obtidas no proventrículo das pré-pupas foram observadas 4 h após a injeção de BrdU e no ventrículo 12 h após. Provavelmente esta diferença se deva a existência de uma maior taxa de mitose no proventrículo, que apresentou uma maior quantidade de células marcadas. Tanto no proventrículo como no ventrículo parece haver um momento no período que compreende a fase de pré-pupa que ocorre um *pool* de células marcadas, o que pode ser um indício de que as mitoses se concentram nesta fase, e que provavelmente ocorrem em sincronia. Neves (2002) demonstrou a presença de figuras de mitose na pupa de olhos pretos o que não condiz com os resultados apresentados aqui. Apesar desta observação ser pouco conclusiva, pelo fato destas mitoses terem sido raramente observadas, não se pode descartar a ocorrência de mitose no ventrículo em outras fases da metamorfose, apesar de parecer que as mitoses se concentram na fase de pré-pupa.

Três pré-pupas apresentaram uma maior quantidade de células BrdU positivas em relação as outras pré-pupas. Isto poderia ser explicado pelo fato de ter sido utilizado um pulso de maior intervalo (24 h), o que aumentaria as chances de detectar síntese de DNA.

As mudanças morfológicas que acontecem durante a metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides* compreendem os processos de histólise e histogênese descritos por Borror (1992). Porém

não se deve tomar estes dois processos como eventos isolados, porque a histólise do ventrículo larval ocorre concomitante à histogênese, como exemplificado pelos resultados do presente trabalho e pelas observações de Neves *et al.* (2003) que estudaram a renovação do epitélio do ventrículo durante a metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides* e observaram que durante o processo de substituição do epitélio do ventrículo larval pelo do adulto, as células regenerativas originam as células digestivas e durante este processo, as células em diferenciação participam da fagocitose das células digestivas em processo de degeneração.

Provavelmente as células regenerativas da pré-pupa proliferam originando mais células regenerativas e não novas células digestivas, como se supunha. Portanto, a hipótese de que células digestivas dos adultos se originam através da proliferação e posterior diferenciação das células regenerativas durante a metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides* pode ser descartada pelo fato de que a população de células regenerativas existente durante o processo de defecação parece ser suficiente para promover a renovação do epitélio do ventrículo durante a metamorfose, além disso, o número de mitoses detectadas parece não dar conta de restabelecer os ninhos de células regenerativas e ao mesmo tempo formar as novas células regenerativas. Se isto for verdadeiro, durante a metamorfose do ventrículo de *M. quadrifasciata anthidioides* não ocorre formação do epitélio *de novo* e sim o aproveitamento de células regenerativas oriundas da larva que se diferenciam nas novas células digestivas. O restabelecimento dos ninhos de células regenerativas provavelmente é uma consequência das divisões ocorridas na fase de pré-pupa, que teriam o papel de garantir a renovação de células digestivas do ventrículo do adulto.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho pode concluir que em *M. quadrifasciata anthidioides*:

- 1- Durante o período larval de as células regenerativas se dividem contribuindo para o aumento do número de células por ninho.
- 2- As células regenerativas de diferentes ninhos do ventrículo ao final do período larval estão em contato.
- 3- Durante o processo de substituição do epitélio do ventrículo larval pelo epitélio do adulto, as células regenerativas aumentam de tamanho e vão aos poucos se espalhando, ocupando o espaço que antes era ocupado pelas células digestivas larvais.
- 4- Durante a metamorfose a proliferação das células regenerativas ocorre no período de pré-pupa.
- 5- Provavelmente o epitélio do ventrículo do imago se origina a partir de células regenerativas larvais. A quantidade de mitoses observadas nas células regenerativas, durante a metamorfose, aparentemente é pequena, e provavelmente, seriam suficientes somente para restabelecer os ninhos de células regenerativas que irão compor o epitélio de ventrículo do adulto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. 4th ed. Garland Science Taylor & Francis Group. USA. 1463 p.
- Andrade-Coêlho, C. A., Santos-Mallet, J., Souza, N. A., Lins, U., Meirelles, M. N. & Rangel, E. F. 2001. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 96(8): 1141-1151.
- Baker, J. E., Woo, S. M. & Byrd, R. V. 1983. Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. Can. J. Zool. 62: 1251-1259.
- Baldwin, K. M. & Hakim, R. S. 1991a. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molting in the moth, *Manduca sexta*. Tissue Cell. 23(3): 411-422.
- Baldwin, K. M. & Hakim, R. S. 1991b. Cell proliferation and maintenance of pattern during molting in midgut of tobacco hornworm. Anat. Rec. 229: 7A-8A.
- Baldwin, K. M., Hakim, R. S. & Stanton, G. B. 1993. Cell-cell communication correlates with pattern formation in molting *Manduca sexta* midgut epithelium. Dev. Dynamics. 197: 239-243.
- Baldwin, K. M., Hakim, R. S., Loeb, M. J. & Sadrud-Din, S. Y. 1996. Midgut development. In Biology of the insect midgut. Lehane, M. J. & Billingsley, P. F. eds. Chapman & Hall. London. 486 p.
- Billingsley, P. F. 1989. Endopolyploidy and digestion in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). Ann. Trop. Med. Parasitol. 83(1): 93-99.
- Billingsley, P. F. 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annu. Rev. Entomol. 35: 219-248.
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A. & Johnson, N. F. 1992. An introduction to the study of insects. 6th ed. Saunders College Publishing. USA. Philadelphia. 875 p.
- Bowen, I. D. & Bowen, S. M. 1990. Programmed Cell Death in Tumour and Tissues, 1ed., London, Chapman & Hall.

- Büning, J. 1994. The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic, growth and evolution. Chapman & Hall. London. 400 p.
- Capella, I. C. S. & Hartfelder, K. 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. J. Insect Physiol. 44: 385-391.
- Cavalcante, V. M. 1998. Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae) durante a metamorfose: estudos ultra-estruturais e citoquímicos. Rio Claro, SP. Dissertação de mestrado – Unesp.
- Cayre, M., Malaterre, J., Charpin, P., Strambi, C. & Strambi, A. 2000. Fate of neuroblasts progeny during postembryonic development of mushroom bodies in the house cricket, *Acheta domesticus*. J. Insect Physiol. 46: 313-319.
- Chapman, R. F. 1998. The insects. Structure and functions. Cambridge University Press. 4th ed. New York. 770 p.
- Cioffi, M. 1979. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca Sexta*) in relation to active ion transport. Tissue Cell. 11(3): 467-479.
- Cruz-Landim, C. & Mello, R. A. 1981. Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. Aciesp. 31: 118.
- Cruz-Landim, C. C. 1985. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. Aciesp. 44(6): 28-41.
- Cruz-Landim, C. C. 1999. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. Sociobiology. 34(3): 597-603.
- Cruz-Landim, C. 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. C. & Costa-Leonardo, A. M. 1996. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 91(1): 129-130.

- Cruz-Landim, C. C. & Serrão, J. E. 1997. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Neth. J. of Zool.* 47(1): 21-29.
- Cruz-Landim, C. C. & Cavalcante, V. M. 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Science.* 20: 1099-1107.
- Cruz-Landim, C. C., Silva-de-Moraes, R. L. & Serrão, J. E. 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J. Comp. Biol.* 1(1/2): 29-40.
- Cruz-Landim, C. C., Serrão, J. E. & Silva-de-Moraes, R. L. 1997. On the structure of the striated border of midgut digestive cells of *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Iheringia, Sér. Zool.* 82: 127-132.
- Davies, I. & King, P. E. 1977. The ultrastructure of the mid-gut cells of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae). *Cell Tiss. Res.* 177: 227-238.
- Dow, J. A. T. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19: 187-328.
- Ferreira, C., Ribeiro, A. F. & Terra, W. R. 1981. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *J. Insect Physiol.* 27(8): 559-570.
- Gama, V. & Cruz-Landim, C. C. 1984. Morfologia do tubo digestivo de *Camponotus (Myrmotherix) rufipes* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera, Formicidae) durante a metamorfose. *Naturalia.* 9: 43-55.
- Gilbert, S. F. 2003. *Developmental biology.* Sinauer Associates, Inc., Publishers. 4th, Massachusetts. 894 p.
- Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218: 474-475.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. M. 2000. *An introduction to genetic analysis.* W. H. Freeman and Company. New York. 7th ed. 860 p.

- Guedes, B. A. M., Neves, C. A. & Serrão, J. E. 2003. Descrição histológica do intestino médio de *Bombus morio* (Apidae, Bombini). Anais do XIII Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- Hakim, R. S., Baldwin, K. M. & Bayer, P. E. 1988. Cell differentiation in the embryonic midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Tissue Cell. 20: 51-62.
- Hecker, H., Freyvogel, T. A., Briegel, H. & Steiger, R. 1971. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. Acta Tropica. 28(2): 80-104.
- Hoffmann, J. A. 1997. Immune responsiveness in vector insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 11152-11153.
- Horn, D. J. 1978. Biology of insects. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA. 439 p.
- Judy, K. J. & Gilbert, L. I. 1970. Histology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* (L.). J. Morphol. 131: 277-300.
- Kirschenbaum, S. R. & O'Shea, M. 1993. Postembryonic proliferation of neuroendocrine cells expressing adipokinetic hormone peptides in the corpora cardiaca of the locust. Development. 118: 1181-1190.
- Lehane, M. J. & Billingsley, P. F. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Biology of the insect midgut. Lehane, M. J. & Billingsley, P. F. eds. Chapman & Hall. London. 486 p.
- Lehane, M. J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annu. Rev. Entomol. 42: 525-550.
- Locke, M. 1985. A structural analysis of post-embryonic development In: Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 2. Oxford. Pergamon Press.
- Locke, M. 2003. Surface membranes, Golgi complexes, and vacuolar systems. Annu. Rev. Entomol. 48: 1-27.
- Loeb, M. J. & Hakim, R. S. 1996. Insect midgut epithelium *in vitro*: an insect stem cell system. J. Insect Physiol. 42(11-12): 1103-1111.

- Loeb, M. J., Jaffe, H., Gelman, D. B. & Hakim, R. S. 1999. Two polypeptide factors that promote differentiation of insect midgut stem cells *in vitro*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 40: 129-140.
- 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. Tese. 113 p.
- Neves, C. A., Bhering, L. L., Serrão, J. E. & Gitirana, L. B. 2002. FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). Micron. 33: 453-460.
- Neves, C. A., Gitirana, L. B. & Serrão, J. E. 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. Sociobiology. 41(2): 443-459.
- Neves, C. A., Gitirana, L. B. & Serrão, J. E. 2004. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). Braz. J. Biol. 63(4): 683-690.
- Nijhout, H. F. 1975. Excretory role of the midgut in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). J. exp. Biol. 62: 221-230.
- Oertel, E. 1930. Metamorphosis in the honeybee. J. Morphol. Physiol. 50(2): 295-339.
- Pavan, C. & Da Cunha, A. B. 1969. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other Sciaridae. Ann. Rev. Genet. 425-450.
- Pipan, N. & Rakovec, V. 1980. Cell death in the midgut epithelium of the worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) during metamorphosis. Zoomorphologie. 94: 217-224.
- Raes, H., Verbeke, M., Meulemans, W. & Coster, W. D. 1994. Organization and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (L. *Apis mellifera*). Tissue Cell. 26 (2): 231-238.

- Reinhardt, C. A. 1976. Ultrastructural comparison of the midgut epithelia of fleas with different feeding behavior patterns (*Xenopsylla cheopis*, *Echidnophaga gallinacea*, *Tunga penetrans*, Siphonaptera, Pulicidae). *Acta Trop.* 33(2): 105-132.
- Serrão, J. E. 1996. Ultra-estrutura do epitélio do ventrículo de abelhas. Anais do II encontro sobre abelhas. Ribeirão Preto, SP.
- Serrão, J. E. & Cruz-Landim, C. 1995. The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Cytobios.* 83: 229-235.
- Serrão, J. E. & Cruz-Landim, C. 1996a. Ultrastructure of midgut endocrine cells in workers of stingless bee (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia, Sér. Zool.* 81: 151-156.
- Serrão, J. E. & Cruz-Landim, C. 1996b. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios.* 88: 161-171.
- Serrão, J. E. & Cruz-Landim, C. 2000. Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *J. Apic. Res.* 39 (1-2): 9-17.
- Silva de Moraes, R. L. M. & Cruz-Landim, C. 1976. Estudos comparativos dos tubos de Malpighi de larva, pré-pupa e adulto de operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae). *Pap. Avulsos Zool.* 29(25): 249-257.
- Snodgrass, R. E. 1956. *Anatomy of honeybee*. Ithaca, New York, Comstock Publishing Ass. 334 p.
- Srivastava, K. P., Kumar, P. & Awasthi, V. K. 1983. On the anatomy of the larva of the lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. (Lepdoptera). Part IV. Anatomy and metamorphosis of the alimentary canal. *Zool. Anz., Jena.* 210 (3/4): 239-256.
- Stefanini, M., & De Martino, C. & Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature.* 216: 173-174.
- Stocker, R. F., Tissot, M. & Gendre, N. 1995. Morphogenesis and cellular proliferation pattern in the developing antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol.* 205: 62-72.
- Terra, W. R. 1991 A digestão dos insetos. *Ciência Hoje.* 12(70): 28-38.

- Vitt, H. H. & Hartfelder, K. 1998. Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 27(4): 351-354.
- Vizioli, J., Richman, A. M., Uttenweiler-Joseph, S., Blass, C. & Bulet, P. 2001. The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 241-248.
- Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. 2000. *Fundamentos de bioquímica*. Artmed Editora Ltda. Porto Alegre, RS.
- Waku, Y. & Sumimoto, K. I. 1974. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm II. Electron microscopy. *Tissue Cell.* 6(1): 127-136.
- Weaver, S. C. & Scott, T. W. 1990. Ultrastructural changes in the abdominal midgut of the mosquito, *Culiseta melanura*, during the gonotrophic cycle. *Tissue Cell.* 22(6): 895-909.
- Werner, K., Moutairou, K. & Werner, G. 1991. Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider, *Gerris najas* DEG. (Heteroptera: Gerridae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 20(1/2): 69-77.
- Zacharias, D., Williams, J. L. D., Meier, T. & Reichert, H. 1993. Neurogenesis in the insect brain: cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development.* 118: 941-955.