

SOLANGE MARQUES ARAUJO

**ULTRAMORFOLOGIA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL SOBRE A
ORIGEM DA MEMBRANA PERITRÓFICA EM ABELHAS (HYMENOPTERA)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

T

A663u
2008

Araujo, Solange Marques, 1974-
Ultra-morfologia e análise ultra-estrutural sobre a origem
da membrana peritrófica em abelhas (Hymenoptera) /
Solange Marques Araujo. – Viçosa, MG, 2008.
ix, 63f.: il. ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelha - Aparelho digestivo. 2. Ultra-estrutura
(Biologia). 3. Microscopia eletrônica - Técnica.
4. Hymenoptera . I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

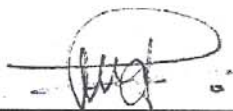
CDD 22.ed. 595.79

SOLANGE MARQUES ARAUJO

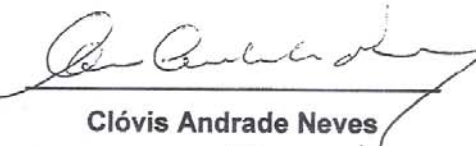
**ULTRAMORFOLOGIA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL SOBRE A
ORIGEM DA MEMBRANA PERITRÓFICA EM ABELHAS (HYMENOPTERA)**

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

APROVADA: 28 de abril de 2008



Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Co-orientador)



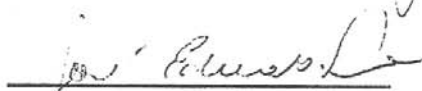
Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)



Luciane Cristina Oliveira Lisboa



Adilson Ariza Zacaro



Prof. José Eduardo Serrão
(Orientador)

Dedico ao meu esposo Charles, às
minhas filhinhas Maria Luiza e
Ana Beatriz e aos meus pais
Arlindo e Dilce e irmãos Zanze e
Nei

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir viver e aprender em todas as circunstâncias da vida, sejam elas boas ou não...

Ao meu Mestre e Orientador Serrão por todos os ensinamentos e pela paciência nos momentos difíceis.

À minha família, principalmente ao Charles pelo amor, força, compreensão, paciência, pelas orações e pensamentos positivos.

Aos meus pais Arlindo e Dilce sempre torcendo e rezando para que eu fosse em frente... sempre.

À minha irmã Zanze e irmão Nei pelos pensamentos positivos e confiança em mim.

Aos meus sogros Adil e Maria, principalmente por cuidar das minhas filhinhas quando não pude.

A todos os amigos que fiz ao longo de minha jornada nesta universidade, alguns sei que nunca mais verei, mas valeu pela caminhada juntos, pelo carinho, tempo, pelos abraços, conversas, risadas e trocas de experiências... Pois, é isso que vale nesta vida.

A todos os funcionários que me auxiliaram durante meus trabalhos, principalmente ao Márcio Mendes que me ajudou muito com a produção dos anticorpos.

Aos meus Conselheiros Prof. Clóvis e Prof. Zanúncio.

Ao Prof. Lúcio que muitas vezes foi como um pai para mim.

E ao CNPq pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Solange Marques Araujo, filha de Arlindo Antunes Silva e Dilce Marques das Neves Silva, nasceu em Dourados - MS, em 13 de abril de 1974. Em março de 1998, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS.

Durante os anos de 1995 a 1997 na graduação foi estagiária no laboratório de Biologia da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados, trabalhando com biologia de abelhas.

De março a dezembro de 1998, trabalhou como professora de Ciências e Biologia no ensino fundamental e médio. De 1999 a 2000 foi secretária do Curso de Pós-Graduação em Agronomia no Campus da UFMS - Dourados.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 30 de julho de 2003. Em agosto do mesmo ano ingressou no curso de Doutorado também na mesma universidade.

Em maio de 2005 deixou Viçosa indo residir no Estado de Mato Grosso, onde realizou parte do experimento de tese. Neste mesmo período trabalhou como professora de entomologia no CEFET Cuiabá até 2007.

Em março de 2008 defendeu a tese de Doutorado pela Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa – Minas Gerais.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
Introdução Geral	1
Objetivo Geral.....	2
Objetivos Específicos.....	2
Capítulo 1 - Ultra-morfologia da membrana peritrófica em abelhas (Hymenoptera).....	3
Resumo.....	3
Abstract.....	4
1. Revisão de Literatura.....	5
2. Material e Métodos.....	8
3. Resultados e Discussão.....	9
4. Conclusão.....	21
5. Referências Bibliográficas.....	22
Capítulo 2 - Origem da membrana peritrófica em abelhas (Hymenoptera): Análise ultra-estrutural.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
1. Revisão de Literatura.....	27
2. Material e Métodos.....	30
3. Resultados.....	36
4. Discussão.....	55
5. Conclusão.....	58
6. Referências Bibliográficas.....	59
Conclusões Gerais.....	63

RESUMO

ARAUJO, Solange Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008. **Ultra-Morfologia e Análise Ultraestrutural sobre a Origem da Membrana Peritrófica em Abelhas (Hymenoptera)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Clóvis Andrade Neves, Lucio Antonio de Oliveira Campos e José Cola Zanúncio

Foram conduzidos dois experimentos sobre a membrana peritrófica (MP) de abelhas. Esta estrutura acelular, composta por fibrilas de quitina, glicosaminoglicanas e proteínas, reveste internamente o intestino médio. O primeiro experimento foi realizado através de microscopia de varredura e teve como por objetivo descrever as características das faces ecto e endoperitrófica da MP em abelhas solitárias e eussociais. Foram utilizados intestinos médios de abelhas adultas, os quais em seguida foram preparados, desidratados em série etanólica crescente (70, 80, 90, 95 e 99,9%) e incubados em hexametildisilazane (HMDS). Após secagem as amostras foram montadas em suporte metálico e em seguida, metalizadas. Posteriormente, as amostras foram analisadas em fotografadas em microscópio de varredura LEO VP 1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados demonstraram que a MP em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) é composta por duas camadas, sendo que a face ectoperitrófica, voltada para o epitélio intestinal, apresentou desenhos hexagonais em sua superfície e a face endoperitrófica, voltada para o lúmen, apresentou-se enrugada. Na MP de *Nannotrigona* sp. (Meliponini) a face endoperitrófica apresentou aspectos de fragmentos irregulares sobrepostos. Em *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini) e *Epicharis flava* (Centridini) a MP apresentou aspecto lamelar. Em *Megachile* sp. (Megachilidae) e *Oxaea flavescens* (Andrenidae) a MP apresentou aspecto de uma massa densa formando projeções irregulares na face endoperitrófica. O segundo experimento foi realizado com intestinos médios de abelhas adultas solitárias e eussociais. O objetivo do presente trabalho foi identificar a origem da MP, pois esta estrutura em muitas espécies de insetos pode ser sintetizada pelas células do intestino médio ou pelas células da região mais anterior deste órgão, a cárdia. A localização dos sítios de produção da MP foi realizada utilizando-se anticorpos produzidos contra peritrofinas, proteínas exclusivas da MP. Os resultados demonstraram sítios de produção das peritrofinas em todas as

células do intestino médio, incluindo as células da cárdia nas abelhas da tribo Meliponini. Sendo assim, nas espécies analisadas *Auglochloa* sp (Halictidae), *Megachile* sp. (Megachilidae), *Oxaea flavescens* (Andrenidae), *Apis mellifera* (Apidae: Apini), *Bombus morio* (Apidae: Bombini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Apidae: Centridini) e *Epicharis flava* (Apidae: Centridini) a MP é produzida somente pelas células digestivas do intestino médio, sendo classificada como tipo I. Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae: Meliponini), *Frieseomelita varia* (Apidae: Meliponini) a MP possui duas origens, tanto pelas células digestivas do intestino médio, MP tipo I, quanto pelas células da região da cárdia, MP tipo II.

ABSTRACT

ARAUJO, Solange Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2008. **Peritrophic Membrane Origin Ultramorfology and Ultra Structural Analysis in Bees (Hymenoptera)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves, Lucio Antonio de Oliveira Campos and José Cola Zanúncio

Two experiments were carried out about bees peritrophic membrane (PM). This not cellule structure, quitine fibril composed, glicosaminoglicanes and protein, to cover midgut inner. The first experiment was carried out through scanning microscopy and had to objective describe ecto and endoperitrophic spaces characteristics in solitary and eusocial bees. Adults bees midguts were utilized, it were prepared, dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90, 95 e 99,9%) and transferred to hexamethyldisilazane, air dried and analyzed in LEO VP1430 SEM. Results showed in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) the PM has two layers, whereas ectoperitrophic space, turned midgut, showed hexagonal ornamentation and the surface associated with the endoperitrophic space is folded. *Nannotrigona* sp. (Meliponini) PM the endoperitrophic space showed overload irregular fragment. In *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini) and *Epicharis flava* (Centridini) the PM showed lamellar aspect. In *Megachile* sp. (Megachilidae) and *Oxaea flavescens* (Andrenidae) the PM showed irregular layers with dense material covering their surface. The second experiment was carried out with solitary and eusocial adults bees midgut. The objective this work was to identified the PM origin, well this structure in many insects species can midgut or cardia cellules synthesized. The localization of the PM production sites was realized using antibody produced against peritrophin, PM exclusive protein. The results showed peritrophin production sites in every midgut cellule, including cardian cellule of the Meliponini tribe bees. Therefore, analyzed species *Auglochloa* sp (Halictidae), *Megachile* sp. (Megachilidae), *Oxaea flavescens* (Andrenidae), *Apis mellifera* (Apidae: Apini), *Bombus morio* (Apidae: Bombini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Apidae: Centridini) and *Epicharis flava* (Apidae: Centridini) the PM is produced only to midgut digestive cellules, type I classified. In *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae: Meliponini), *Frieseomelita varia* (Apidae: Meliponini) the PM two origin presented, as many midgut digestive cellules, type I PM, as cardian region cellule, type II PM.

INTRODUÇÃO GERAL

O canal alimentar dos insetos consiste em três partes: estomodeu ou intestino anterior; mesêntero, intestino médio ou ventrículo; e proctodeu ou intestino posterior. O estomodeu e o proctodeu são de origem ectodérmica e revestidos por uma camada de cutícula, a qual é rica em quitina. O intestino médio é de origem endodérmica não sendo revestido internamente por cutícula. O revestimento interno deste órgão é formado por uma estrutura acelular denominada membrana peritrófica (MP). Em alguns insetos, a MP apresenta-se composta por uma única camada, em outros por várias camadas concêntricas que se sobrepõem.

O epitélio do intestino médio é composto por células colunares denominadas como células digestivas ou principais, células endócrinas e células regenerativas. As células digestivas concentram-se principalmente na secreção de enzimas digestivas que o lúmen intestinal na digestão e na absorção dos alimentos.

A MP atua como barreira mecânica, impedindo que as células intestinais sofram algum tipo de injúria devido ao atrito das partículas alimentares sólidas; como barreira física que impede a invasão de microrganismos; como barreira permeável a enzimas digestivas e produtos da digestão; e como dispositivo para conservação de enzimas digestivas.

A classificação da MP é feita de acordo com o local de síntese, sendo a MP tipo-I produzida por todo o epitélio ventricular e presente na grande maioria dos insetos. Acredita-se que a através da ingestão de alimento ocorra uma dilatação do intestino médio e isto promove síntese da MP tipo-I. Já a MP tipo-II é sintetizada por células especializadas da cárdia, região localizada na porção anterior do ventrículo e está presente na maioria dos adultos de Diptera e em alguns Lepidoptera.

A MP é uma película composta por quitina, glicosaminoglicanas e proteínas que reveste a parede do epitélio intestinal somente na região do ventrículo. Em alguns insetos, esta estrutura apresenta-se composta por uma única camada, em outros por várias camadas concêntricas que se sobrepõem.

Os estudos realizados em abelhas não convergem para um consenso em relação ao tipo de MP existente na ordem Hymenoptera. Isto é, muitos

autores divergem quanto ao local de síntese e secreção dos seus precursores (células digestivas, MP tipo I ou células da cárdia, MP tipo II).

OBJETIVO GERAL

Descrever as características da membrana peritrófica e identificar os locais de síntese de peritrofinas (proteínas específicas da membrana peritrófica) no intestino médio de abelhas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para se atingir o objetivo geral da tese foram executados trabalhos experimentais que estão descritos em dois capítulos.

- Capítulo 1: “Ultra-Morfologia da Membrana Peritrófica em Abelhas (Hymenoptera) está detalhado nas páginas 3-26. Teve por objetivo específico descrever as características ultra-morfológicas da MP, através de microscopia eletrônica de varredura, em várias espécies de abelhas solitárias e eussociais;

- Capítulo 2: “Origem da Membrana Peritrófica em Abelhas Adultas (Hymenoptera): Imunomarcção” está detalhado nas páginas 27-66. Teve como objetivo específico demonstrar a origem da MP utilizando-se anticorpos anti-peritrofina para localizar sítios de síntese de peritrofinas (proteínas exclusivas da MP) no intestino médio de diferentes espécies de abelhas.

ULTRA-MORFOLOGIA DA MEMBRANA PERITRÓFICA EM ABELHAS (HYMENOPTERA)

RESUMO

A membrana peritrófica (MP) em abelhas adultas tem sido descrita somente através de análises histológicas. O objetivo deste trabalho foi descrever a MP em abelhas solitárias e eussociais através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Abelhas utilizadas foram coletadas e dissecadas e intestinos médios isolados. Os intestinos foram particionados, desidratados em série etanólica crescente e incubados em hexametildisilazane (HMDS). Após a secagem das amostras em temperatura ambiente, as mesmas foram montadas em suporte metálico apropriado para posterior processo de metalização. Após a última etapa descrita, as amostras foram analisadas em microscópio de varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados evidenciaram características distintas entre as MP analisadas. Em *M. quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) a MP demonstrou ser composta por duas camadas onde a face ectoperitrófica da MP, voltada para o epitélio, apresentou aspectos hexagonais e a face endoperitrófica, voltada para o lúmen, apresentou-se enrugada. Em *Nannotrigona* sp. (Meliponini) a face endoperitrófica da MP demonstrou aspecto de um revestimento composto por fragmentos irregulares sobrepostos. Em *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini), *Epicharis flava* (Centridini) a MP demonstrou aparência lamelar com camadas muito finas e irregulares.

Palavras-chave: Membrana Peritrófica; Morfologia; Abelhas.

PERITROPHIC MEMBRANE ULTRAMORFOLOGY IN BEES (HYMENOPTERA)

ABSTRACT

The peritrophic membrane (PM) in adult bees has been described only under histological aspects. The objective of this work was to describe the PM solitary and eusocial bees with a scanning electronic microscope (SEM). Adult bees were collected and dissected and the midgut isolated. The midguts were opened, dehydrated in a graded ethanol series transferred to hexamethyldisilazane, air dried and analyzed in LEO VP1430 SEM. Results showed different PM characteristics among the species analyzed. In *M. quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) the PM has two layers and the surface associated with the ectoperitrophic space showed hexagonal ornamentation, whereas the surface associated with the endoperitrophic space is folded. In *Nannotrigona* sp. (Meliponini) the PM was seen as overload irregular fragments. In *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini), *Epicharis flava* (Centridini) the PM has lamellar aspect with thin and irregular layers with dense material covering their surface.

Key-words: Peritrophic Membrane; Morphology; Bees.

1. REVISÃO DE LITERATURA

Como o ventrículo é de origem endodérmica, sua face luminal não é revestida por cutícula e sim por uma estrutura denominada membrana peritrófica (MP). A membrana peritrófica (MP) está presente no ventrículo da maioria dos insetos, exceto em algumas ordens como Hemiptera, Phthiraptera, Psocoptera, Zoraptera, Thysanoptera, Strepsitera, Raphidioptera e Megaloptera (PETERS, 1992). Os insetos das ordens Hemiptera e Thysanoptera possuem membrana perimicrovilar, a qual é diferente morfológica e bioquimicamente da MP (BILLINGSLEY e DOWNE, 1983).

O intestino nas abelhas é composto por três partes: intestino anterior (estomodeu), intestino médio (ventrículo) e intestino posterior (proctodeu). O intestino médio ou ventrículo começa na base da válvula proventricular e termina na válvula pilórica, onde se encontram inseridos os túbulos de Malpighi (JIMENEZ e GILLIAM, 1990). Os intestinos anterior e posterior são de origem ectodérmica, apresentando a face luminal do epitélio recoberta por cutícula, enquanto que o intestino médio, única porção do trato digestivo das abelhas que é de origem endodérmica, é também o órgão responsável pela digestão e absorção dos nutrientes (SNODGRASS, 1935).

Em geral, nas abelhas o epitélio do intestino médio, ou ventrículo, é composto por células regenerativas, células endócrinas e células colunares (JIMENEZ e GILLIAM, 1990). Além disso, algumas espécies de abelhas pertencentes à tribo Meliponini, como *Scaptotrigona postica* (CRUZ-LANDIM, 1985) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (NEVES *et al.*, 2002) apresentam células que compõem a região mais anterior do ventrículo, porção esta denominada cárdia. Esta região denominada cárdia é ausente nas tribos Bombini e Apini e presente em Meliponini (PEIXOTO e SERRÃO, 2001). A caracterização da função da cárdia ainda não está esclarecida, mas SERRÃO e CRUZ-LANDIM (1996) sugerem seu envolvimento na produção da membrana peritrófica. As células digestivas ou células colunares apresentam longas microvilosidades na face luminal, as quais aumentam grandemente a área superficial do ventrículo, estando relacionadas com a absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1997).

Há dois tipos de MP nos insetos, a diferença está em suas propriedades e locais de síntese (WIGGLESWORTH, 1930, 1972; PETERS, 1992). A MP

tipo I é produzida por todo ou por parte do epitélio ventricular. A MP tipo II é produzida constitutivamente pelas células especializadas situadas na região mais anterior do ventrículo, ou seja, a cárdia (CHAPMAN, 1998).

A MP tipo I é considerada menos diferenciada estruturalmente em relação a MP tipo II, sendo formada por delaminações da superfície do epitélio intestinal, onde diferentes regiões do epitélio podem contribuir variavelmente para a síntese. Essas camadas de MP tipo I podem ser formadas por secreção seqüencial de diferentes componentes, por agregação diferencial de componentes secretados no lúmen ventricular ou por diferenças na forma física tomada pelos constituintes básicos da MP (LEHANE, 1997). REID e LEHANE (1984) sugeriram que a formação da MP tipo I passa por processo de maturação que ocorre em três passos: 1) secreção dos precursores das fibrilas de quitina; 2) maturação deste material formando uma rede; e 3) ligação à matriz protéica que se localiza entre as fibrilas de quitina.

A MP tipo II é secretada constitutivamente pelas células da cárdia, formando assim um tubo devido à pressão do material secretado contra as paredes do epitélio. A MP tipo II pode ser constituída por uma ou até três camadas concêntricas, onde as fibrilas de quitina estão dispostas aleatoriamente ou organizadas ortogonalmente (LEHANE, 1997).

Além das descrições citadas até o momento com relação aos dois tipos de MP, TERRA (2001) adiciona algumas diferenças com relação à consistência da MP e considera a existência de dois tipos desta estrutura acelular envolvendo o bolo alimentar: a membrana peritrófica, consistindo em filme completo envolvendo o alimento; e, o gel peritrófico como estrutura com consistência gelatinosa, que ao contrário da membrana não pode ser pinçado durante a dissecação e é susceptível à solubilização durante lavagens e processos de fixação.

À membrana peritrófica são atribuídas funções como proteção ao epitélio delicado do intestino médio com relação à abrasão provocada pelas partículas alimentares, invasões ou infecções microbianas e auxiliar na retenção do alimento no intestino médio para a digestão e absorção. Além disso, promove a compartimentalização dos processos digestivos criando espaços com funções enzimáticas diferentes (RICHARDS e RICHARDS, 1977; CHAPMAN, 1998). As funções da MP foram estabelecidas através de estudos do efeito desta estrutura nos eventos digestivos, em conjunto com o estabelecimento das suas

propriedades estruturais. Assim, foram propostas ainda outras funções à MP como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão, pois atua retendo partículas alimentares não digeridas no espaço endoperitrófico e ao mesmo tempo torna-se permeável às enzimas e produtos iniciais da digestão (DAY e WATERHOUSE, 1953; MELLO *et al.*, 1971); e funciona também como dispositivo para a conservação das enzimas digestivas, isto é, através da compartimentalização da digestão devido à presença da MP criando espaços onde ocorrem fases distintas da digestão. Esta compartimentalização no intestino médio por meio da MP promove a formação de um fluxo de fluidos da região posterior para a anterior deste órgão e assim reciclando enzimas da digestão (TERRA *et al.*, 1979; FERREIRA *et al.*, 1981).

Em indivíduos adultos de *Apis mellifera* a MP foi classificada como sendo tipo I, apresentando diversas camadas concêntricas finas sobrepostas que envolvem o alimento (SNODGRASS, 1956). A composição da MP em abelhas também corresponde à glicosaminoglicanas e proteínas embebidas numa rede formada por fibrilas de quitina (MERCER e DAY, 1952; RICHARDS e RICHARDS, 1977). Além disso, PETERS (1992) enfatiza que a maioria dos intestinos médios dos insetos existe certo número de camadas que compõem a membrana peritrófica e, sugere que essas camadas coletivamente devem ser chamadas de envelope peritrófico.

Em dissecações à fresco de intestinos médios de operárias de *Apis mellifera*, observaram-se que na porção mais anterior deste órgão a MP apresenta uma densa massa de aspecto gelatinoso, possivelmente preenchendo totalmente esta região, a qual corresponde ao espaço ectoperitrófico. De acordo com JIMENEZ e GILLIAM (1990), na porção mediana do intestino médio o espaço ectoperitrófico, ou seja, o espaço entre o epitélio e a MP é mais evidente e definido do que nas porções anterior e posterior deste órgão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de abelhas utilizadas para a análise foram coletadas em Viçosa, Minas Gerais e Cuiabá, Mato Grosso. São elas: *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) *Nannotrigona* sp. (Meliponini), *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini), *Epicharis (Epicharana) flava* (Centridini), *Megachile* sp (Megachilidae) e *Oxaea flavescens* (Andrenidae).

Foram dissecados indivíduos adultos, sendo operárias forrageiras para as abelhas eussociais e as demais solitárias, em solução salina, pH 7,2, para retirada dos intestinos médios. Em seguida, esses intestinos foram particionados, fixados em Zamboni's (STEFANINI, 1967), desidratados em série etanólica crescente (70, 80, 90, 95 e 99,9%) e incubados em hexametildisilazane (HMDS). Posteriormente, foram dispostos para secagem em temperatura ambiente, sendo cada pedaço de amostra biológica montado em suporte metálico apropriado para posterior processo de metalização. Após a última etapa, as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio de varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MP de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, apresentou espessura aproximada de 5 μm (Figura1*). Pode-se observar a presença de duas lâminas, separadas por um espaço preenchido por substância granular. Dados obtidos por meio da imunohistoquímica e imunocitoquímica sugerem que a MP em larvas e adultos de abelhas desta espécie possuem uma única origem, isto é, são sintetizadas pelas células do intestino médio, sendo então MP do tipo I (MARQUES-SILVA *et al.*, 2005). Além disso, o número de membranas que compõem as paredes da MP pode variar entre as espécies de insetos, independentemente se esta for tipo I ou tipo II, sendo que a presença de múltiplas camadas é mais freqüente em insetos com MP do tipo I (CHAPMAN, 1998).

A face superficial externa da MP em *M. quadrifasciata anthidioides*, ou seja, a face voltada para o espaço ectoperitrófico e o epitélio, em baixa resolução, apresentou textura em relevo hexagonal, aspecto possivelmente resultante, primeiramente em função da proximidade e da aderência da MP junto ao epitélio, e pelo acúmulo de materiais que a compõem, os quais possivelmente se depositam nos sulcos formados pelos limites entre uma célula e outra (Figuras 1, 3 e 4). Além disso, foram observadas algumas protuberâncias ao longo do comprimento da MP em várias amostras. Estas protuberâncias foram encontradas tanto nas faces externa e interna da MP (Figuras 3 e 5). O aspecto e a forma dessas protuberâncias nas faces da MP foram diferentes das estruturas semelhantes às projeções de aspecto arredondado da face endoperitrófica, observadas na Figura 2. Pode-se, então, sugerir que as protuberâncias poderiam atuar como tampões em regiões dilaceradas por partículas alimentares ou, então, por microrganismos, pois uma das funções básicas da MP é proteger o epitélio ventricular de possíveis danos mecânicos e físicos. Com relação às projeções arredondadas, sugere-se que sejam componentes precursores da MP que entram no processo de formação da MP. Observou-se na região mais anterior, próxima à cárdia, uma massa espessa de aspecto denso que parece recobrir a MP juntamente com algumas projeções arredondadas (Figura 2) e no restante do comprimento da MP, no

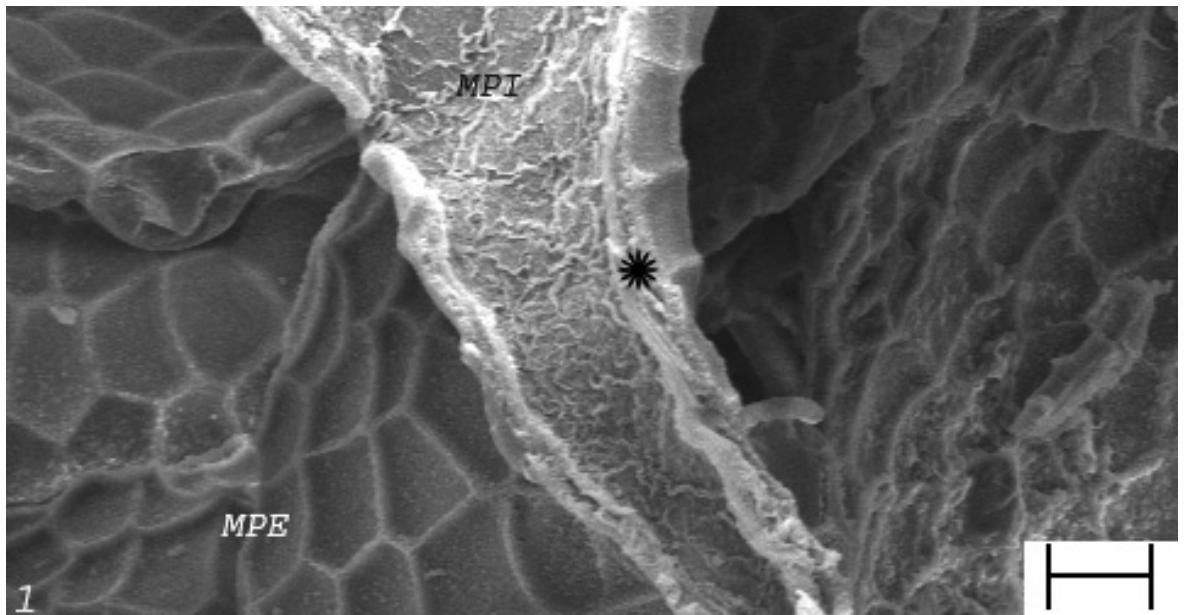


Figura 1. Membrana peritrófica (MP) de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini), demonstrando as duas faces ou lâminas que compõem esta estrutura. Barra: 20µm. MPE = superfície externa da MP; MPI = superfície interna da MP; asterisco = entremeio das duas lâminas da MP.

restante do comprimento a MP demonstrou aspecto rugoso ou pregueado (Figura 5).

Em *M. quadrifasciata anthidioides* as características morfológicas nas duas faces da MP foram bem distintas, sendo a face ectoperitrófica apresentando esculturações hexagonais e a face endoperitrófica pregueada. Isso, possivelmente, poderia sugerir uma origem diferente para cada face.

Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) adultas a MP em dissecação à fresco apresentou-se como um tubo único delicado e translúcido, que reveste todo o intestino médio desde a base da válvula cárdica até a válvula pilórica na junção com o intestino posterior e está bem aderida ao epitélio digestivo, sugerindo um espaço ectoperitrófico reduzido (dados não demonstrados), o mesmo pode ser observado nas demais espécies analisadas neste trabalho.

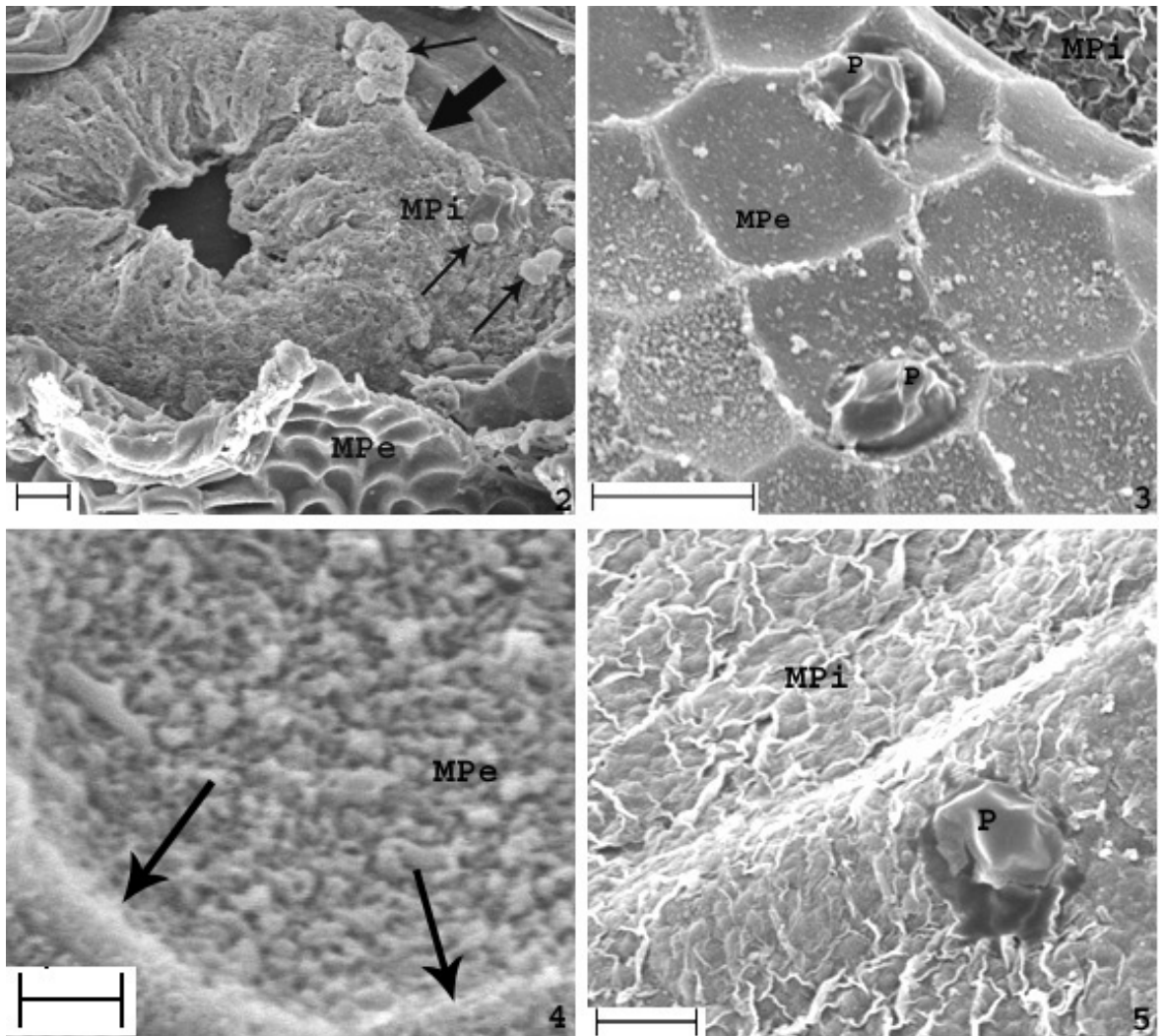
Estudos descrevendo a superfície da MP foram realizados com a espécie *Heliothis virescens*, lagarta do tabaco, estas observações foram feitas em apenas uma das faces da MP e em várias peças e não foram detectadas diferenças na superfície das mesmas. Sendo assim, os autores deste estudo, RYERSE *et al.* (1992), acreditam que tenham descrito a morfologia da face ectoperitrófica, isto é, a superfície voltada para o epitélio intestinal. A superfície da MP analisada na lagarta do tabaco apresentou-se cheia de dobras como se fossem pregas ou rugas, quando analisadas sob microscopia de varredura de

baixa magnitude, mas em alta resolução sua superfície demonstrou-se contínua e lisa como se fosse uma camurça e com ausência de poros ou fendas superficiais entre suas ondulações (RYERSE *et al.*, 1992). E então, sugeriram que o lado não visualizado, isto é, a face endoperitrófica, seja semelhante ao descrito, pois ADANG e SPENCE (1983) em outra espécie de lepidóptero *Orgyria pseudotsugata* descreveram que a morfologia das faces endoperitrófica e ectoperitrófica da MP apresentam características semelhantes.

A MP de *M. quadrifasciata anthidioides* apresentou três camadas sendo as duas externas de aspecto lamelar e a interna de aspecto granular. Além disso, as diferenças anatômicas observadas entre as faces endo e ectoperitrófica da membrana possivelmente podem estar relacionadas às diferenças qualitativas ou quantitativas dos componentes da MP ao longo de sua espessura.

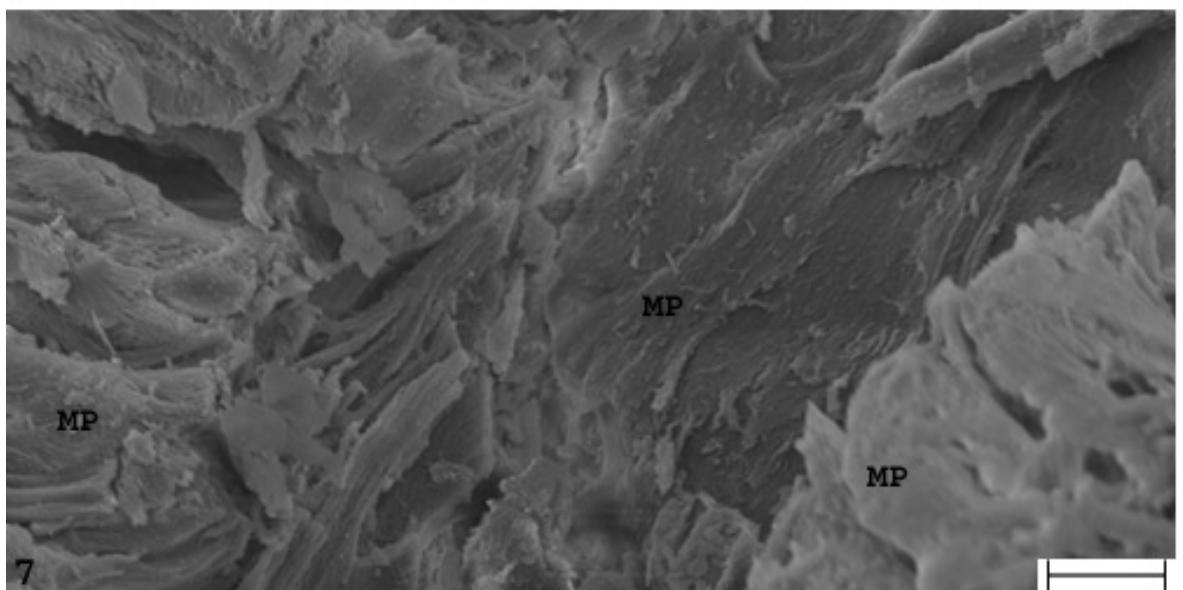
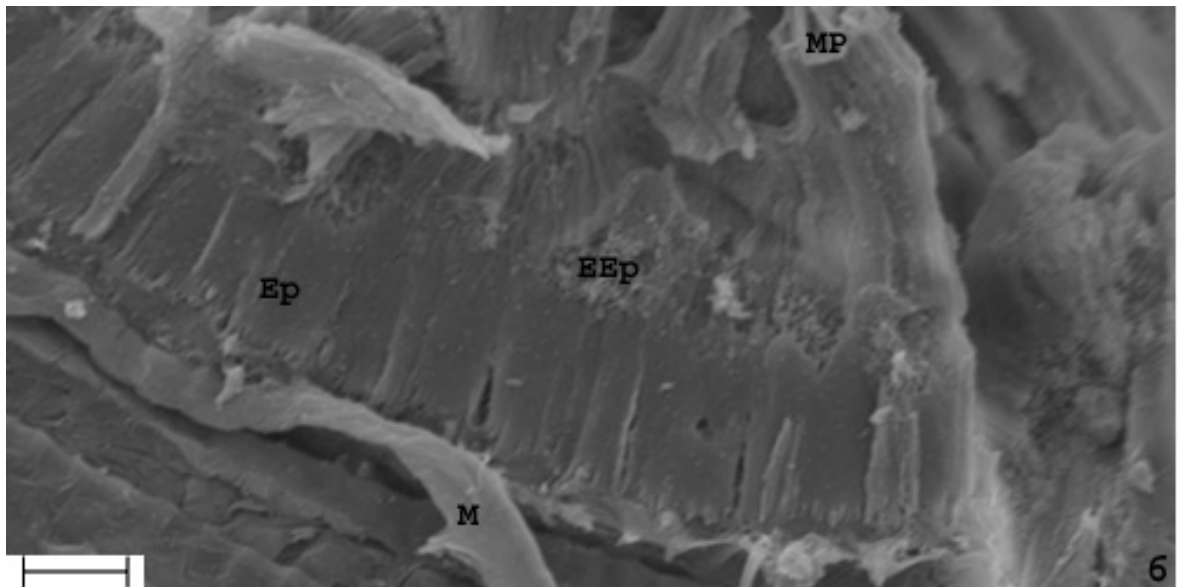
Em abelhas *Nannotrigona* sp (Meliponini) a MP apresentou-se espessa em relação ao epitélio intestinal. Notou-se através da face interna da MP que esta estrutura apresentou aspectos fragmentados e irregulares sobrepostos ao longo de todo comprimento como se fosse uma película quebradiça. Nesta espécie o epitélio apresentou-se alto e o espaço ectoperitrófico foi reduzido e preenchido por material granular (Figura 6), característica que dificultou a extração da MP que permitisse a análise da face externa da MP nesta espécie.

Possivelmente as características da MP observadas nas abelhas da tribo Meliponini possam variar em função de sua dieta nutricional, pois como as abelhas utilizadas neste trabalho eram forrageiras não foram encontrados vestígios de polens. Assim, a ausência de alimento sólido no intestino poderia estar influenciando a espessura e o aspecto morfológico da MP. Segundo CRUZ *et al.* (2007), a MP em *M. quadrifasciata anthidioides* demonstrou-se multi-lamelar e com aspecto de escamas quando em ausência de alimento, e quando em presença de alimento a MP demonstrou aspecto homogêneo, sendo menos espessa e envolvendo completamente o alimento. Além disso,



Figuras 2-5. Membrana peritrófica (MP) de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini). 2. Porção mais anterior da MP demonstrando a face interna coberta por uma massa densa (seta larga), onde se encontram algumas projeções arredondadas (setas finas). Barra: 20 μm . 3. Detalhamento da superfície externa da MP (MPE) demonstrando duas protuberâncias (P). Barra: 20 μm . 4. Superfície externa da MP, em alta resolução, demonstrando demarcações como linhas formadas pelo acúmulo de materiais que compõem a MP (setas). Barra: 3 μm . 5. Superfície interna da MP (MPi) demonstrando esculturas como pregas e uma protuberância (P) semelhante àquela da face externa. Barra: 10 μm .

estes autores também sugeriram que em abelhas rainhas da mesma espécie a MP demonstrou aspecto de um gel peritrófico e não propriamente como um filme ou película. De acordo com TERRA (2001) a MP pode ser também classificada segundo sua consistência em dissecação à fresco, ou seja, MP com consistência firme como uma película corresponde ao filme peritrófico e a MP com consistência gelatinosa que não pode ser pinçada e pode se dissolver durante a dissecação, corresponde ao gel peritrófico.



Figuras 6-7. Membrana peritrófica de *Nannotrigona* sp. 6. Porção em vista lateral demonstrando parte do epitélio (Ep) com células ventriculares altas, o espaço ectoperitrófico preenchido com substâncias granulares e, logo acima a membrana peritrófica. Barra: 10 μ m. 7. Superfície interna da MP, isto é, a face voltada para o lúmen, apresentando aspecto irregular e quebradiço. Barra: 20 μ m. M = fibra muscular.

A MP de *Apis mellifera* (Apidae, Apini), em dissecação à fresco, apresenta-se como uma massa gelatinosa que pode se dissolver durante processamento de dissecação, lavagens e fixação (dados não mostrados). Logo podemos sugerir que a MP de *Apis mellifera* encaixa-se nas descrições do gel peritrófico, pois quando analisamos as Figuras 8 a 11 pode-se perceber que realmente a MP não tem as características de filme.

Em *Apis mellifera* a MP apresentou duas características marcantes nas observações de microscopia de varredura. Uma delas foi supostamente a presença de várias camadas concêntricas de películas extremamente finas e

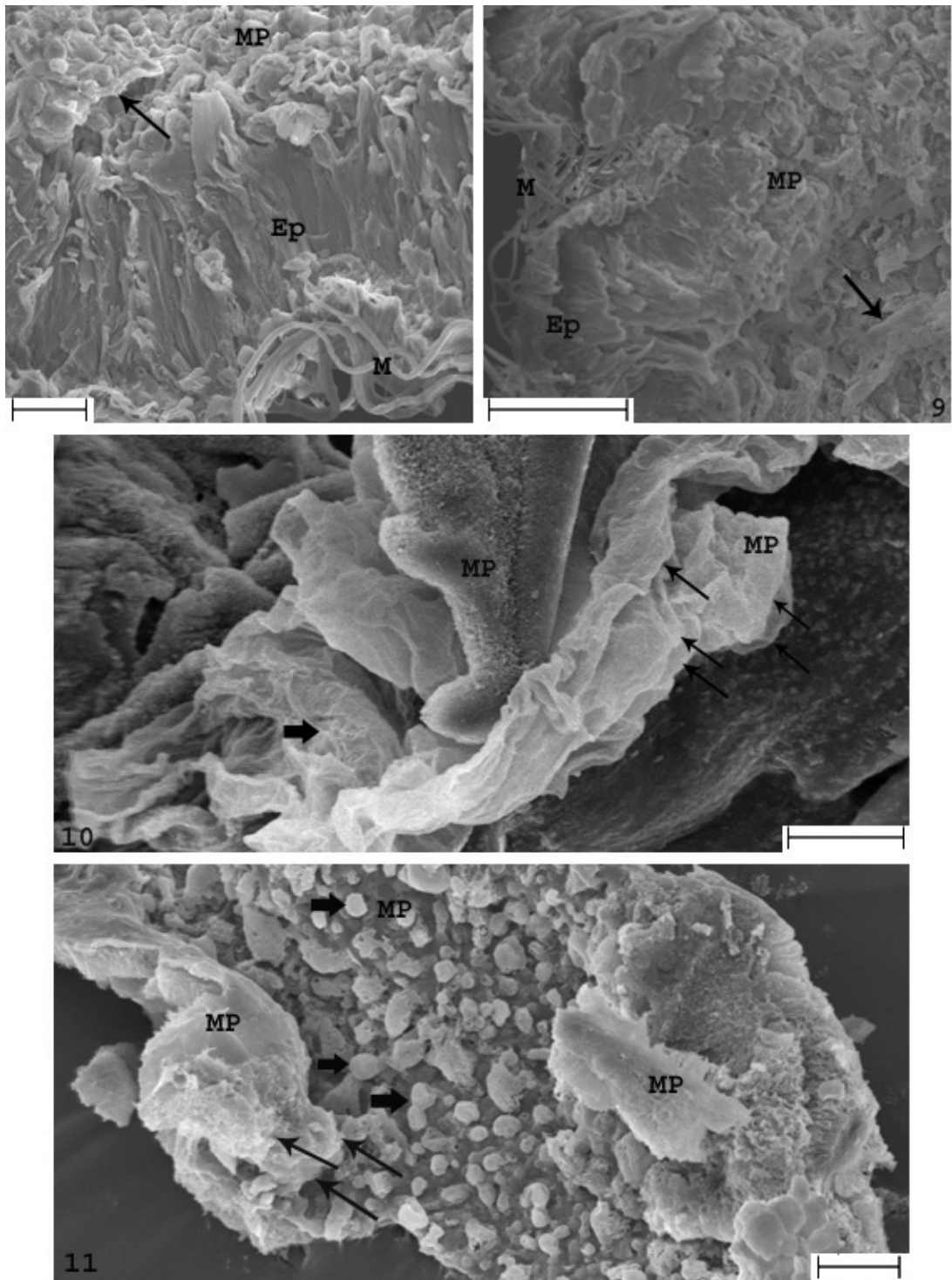
delicadas (Figura 10). Estas películas concêntricas de MP situavam-se na face ectoperitrófica, enquanto a face endoperitrófica demonstrou aspecto de uma massa densa e espessa (Figuras 10, 11). Na face interna da MP observou-se também a presença de projeções de aspecto arredondado.

A MP de *Epicharis flava* (Apidae, Centridini), demonstrou-se espessa, sugerindo inúmeras camadas finas e irregulares sobrepostas e, notou-se que essas camadas seguem as ondulações do epitélio (Figuras 12 e 13). Porém, a MP em *Epicharis flava* não apresentou-se semelhante à MP de *Apis mellifera*, quanto ao aspecto de papel celofane, isto é, com camadas muito finas e delicadas como sugerido por CRUZ-LANDIM (1985) para a MP desta espécie.

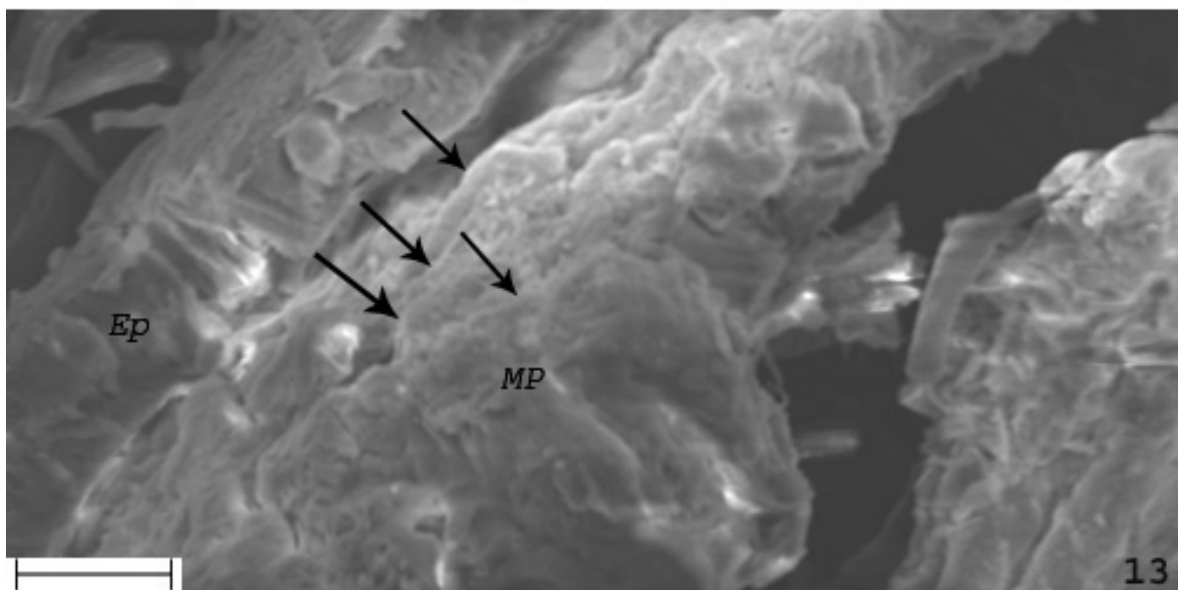
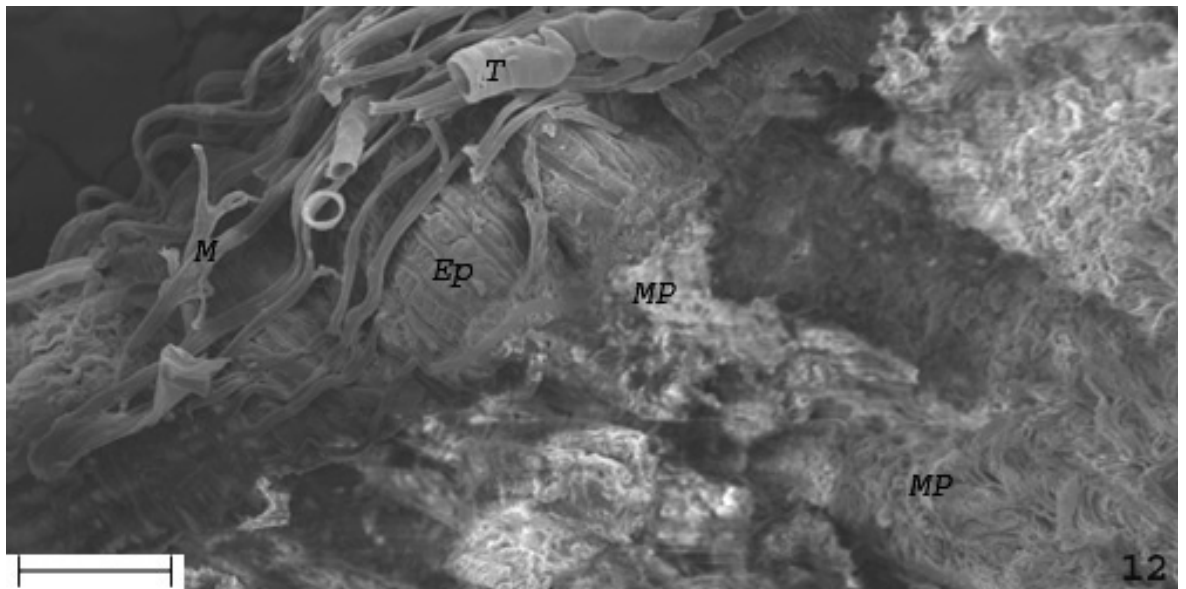
Em *Centris (Melanocentris) sp* (Apidae, Centridini), a face endoperitrófica da MP apresentou-se como uma massa irregular e com grumos. Enquanto, a face ectoperitrófica apresenta aspecto lamelar, vista em secção longitudinal, sugerindo possivelmente uma camada (Figura 14).

Em *Megachile sp* (Megachilidae) observou-se que o epitélio e a MP encontravam-se muito aderidos. Resultando num espaço ectoperitrófico muito reduzido (Figura 15). A face endoperitrófica, em alta magnitude, apresenta aspecto irregular e não lamelar, demonstrando uma massa espessa, densa, formando projeções e depressões distintas (Figura 16).

O aspecto da MP em *Oxaea flavescens* (Andrenidae, Oxaeinae) assemelhou-se ao de *Centris (Melanocentris) sp* e *Megachile sp*, isto é, apresentou a face endoperitrófica irregular e com projeções como grumos. Nesta espécie, assim como nas demais analisadas, pode-se notar que o espaço ectoperitrófico foi bastante reduzido e de difícil delimitação em relação ao epitélio e MP.



Figuras 8-11. Membrana peritrófica de *Apis mellifera*. 8. Porção do epitélio (Ep) e acima a membrana peritrófica com superfície interna toda irregular. Nota-se no canto superior esquerdo um fragmento de MP destacado, como se fosse uma camada separada (seta). Barra: 30 μ m. 9. Porção do epitélio coberto por membrana peritrófica demonstrando superfície irregular. Barra: 100 μ m. M = fibras musculares. 10. Fragmento da membrana peritrófica demonstrando duas características distintas: na parte mediana da figura nota-se uma estrutura com aspecto denso e esponjoso e à direita com aspecto transparente semelhante a papel celofane (setas finas). A seta longa indica um emaranhado de finas camadas. Barra: 20 μ m. 11. Fragmento da parte mediana da MP, demonstrando algumas camadas da MP (setas finas) e a face interna com inúmeras projeções da MP (setas largas). Barra: 10 μ m.



Figuras 12-13. Membrana peritrófica (MP) de *Epicharis (Epicharana) flava*. 12. Parte do epitélio (Ep) demonstrando células ventriculares altas, membrana peritrófica, em vista lateral, de aspecto denso e cheio de camadas irregulares que parecem seguir as ondulações do epitélio. Barra: 100 μ m. 13. Fragmento do epitélio (Ep) juntamente com membrana peritrófica, novamente, demonstrando camadas sobrepostas (setas). Barra: 30 μ m. T = traquéias; M = fibras musculares.

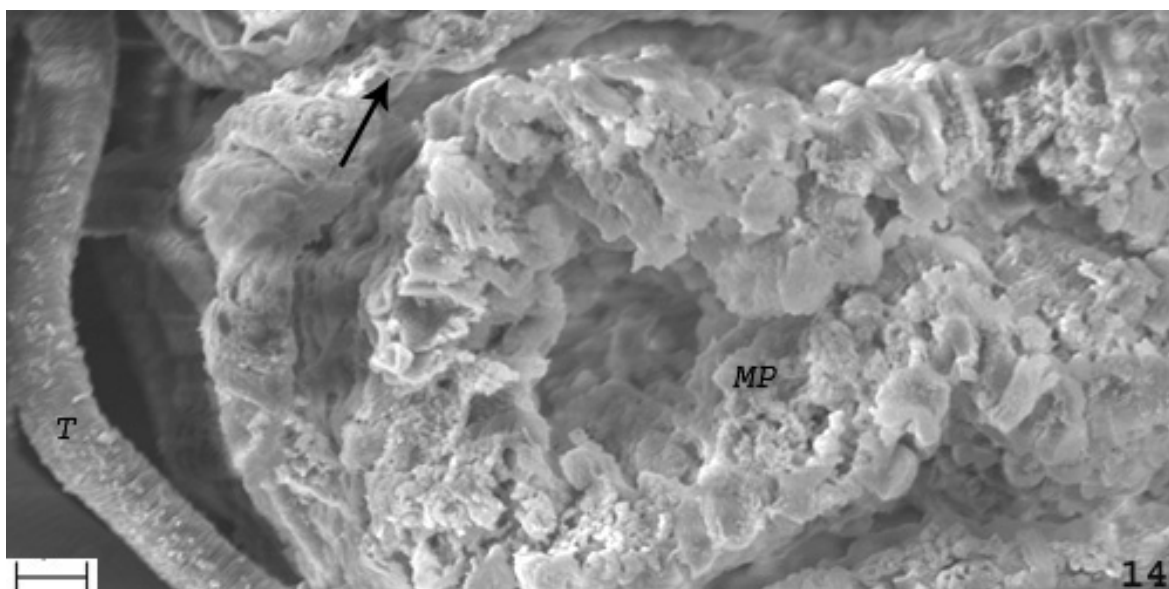
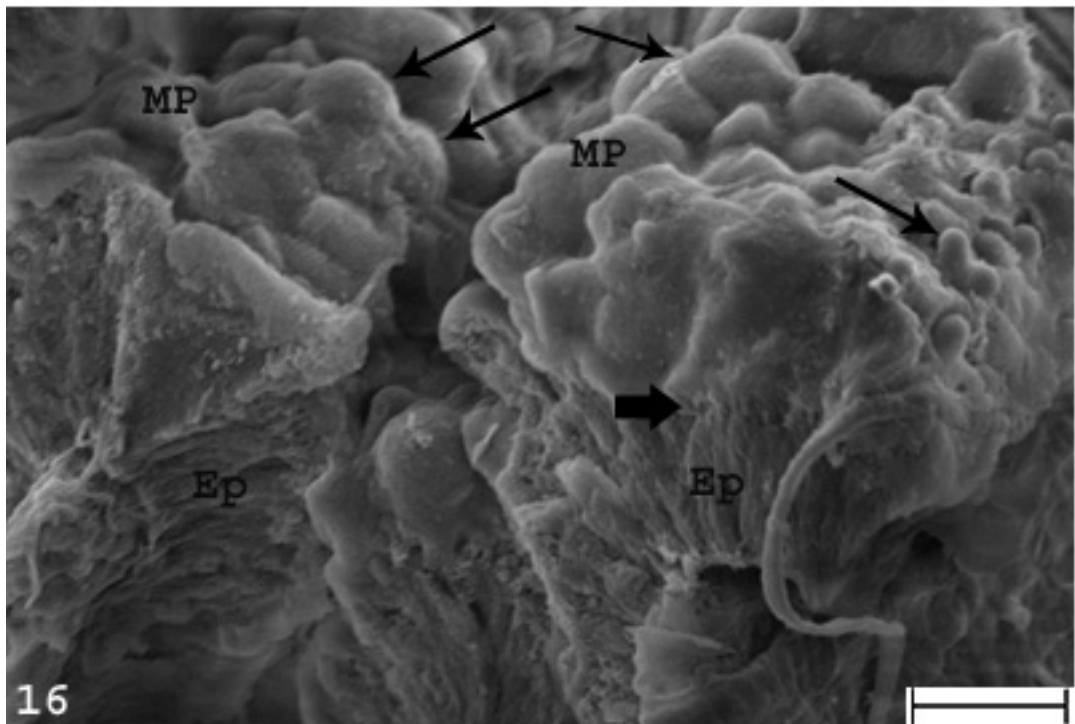
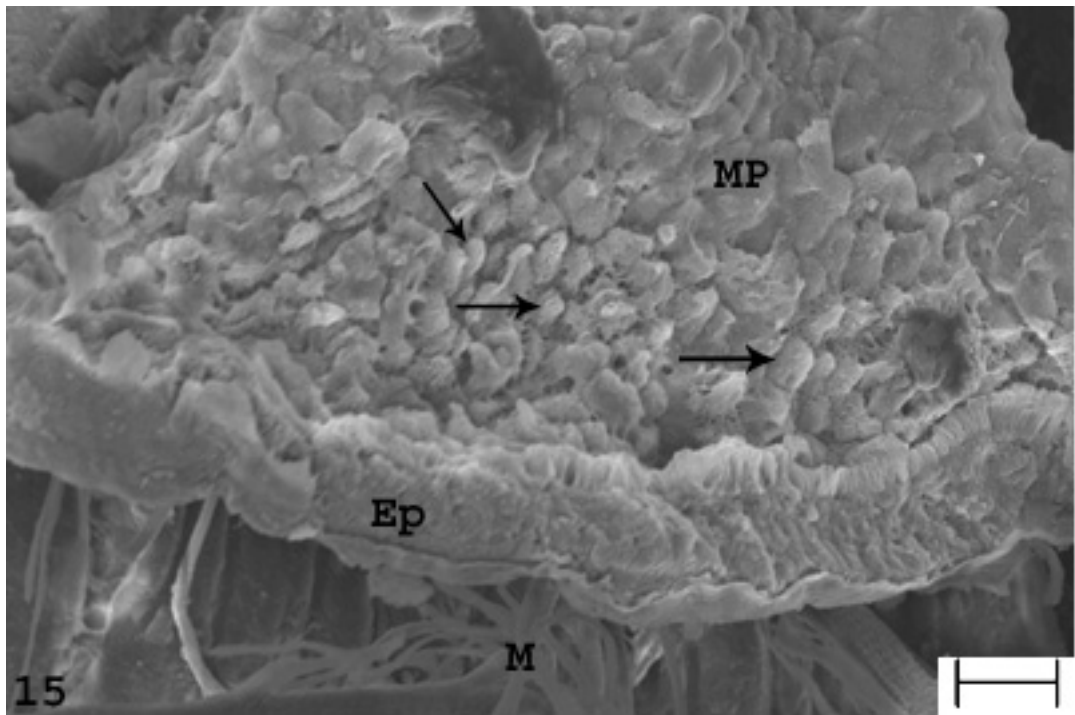


Figura 14. Membrana peritrófica de *Centris (Melanocentris)* sp, em vista frontal, demonstrando seu aspecto irregular e com grumos fragmentados. No canto superior esquerdo nota-se algumas camadas justapostas (seta) de MP. Barra: 10 μ m. T = traquéia.

A estrutura da MP para *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi distinta em relação às demais espécies de Apidae aqui estudadas, pois além de apresentar a MP como um filme/película demonstrou também esculpturações marcantes em ambas as suas faces. Entretanto, a MP de *Nannotrigona* sp. não demonstrou-se semelhante à encontrada em *Melipona* quanto a presença de esculpturações. Possivelmente, a MP de *Nannotrigona* sp. também pode ser considerada como uma membrana peritrófica verdadeira (com aspecto de filme ou película) de acordo com TERRA (2001). Exceto por esta última característica citada poder-se-ia esperar mais similaridades, pois ambas as espécies pertencem à mesma tribo Meliponini.

Como *Apis mellifera* e as abelhas da tribo Meliponini não apresentaram muitas semelhanças, pois como estas são filogeneticamente mais próximas, esperava-se que a MP entre estas apresentassem características mais em comum. Entretanto, a MP das espécies *A. mellifera*, *Epicharis (Epicharana)* sp e *Centris (Melanocentris)* sp. demonstram mais semelhanças entre si. Das características da MP observadas as mais conspícuas foram em *Apis*, pois pôde-se visualizar melhor as suas camadas translúcidas como “papel celofane”, como descrito por CRUZ-LANDIM (1985).



Figuras 15-16. Membrana peritrófica de *Megachile* sp. 15. Parte do epitélio (Ep), em baixa resolução e em vista lateral, demonstrando as células ventriculares e sobre este a camada de MP como inúmeras projeções irregulares (setas). Barra: 20 μ m. 16. Epitélio ventricular, de alta resolução e em vista lateral, demonstrando suas ondulações, nota-se a MP com aspecto de uma massa espessa e de contornos irregulares (setas finas). Seta larga demonstra o limite entre o epitélio e a MP. Barra: 20 μ m.

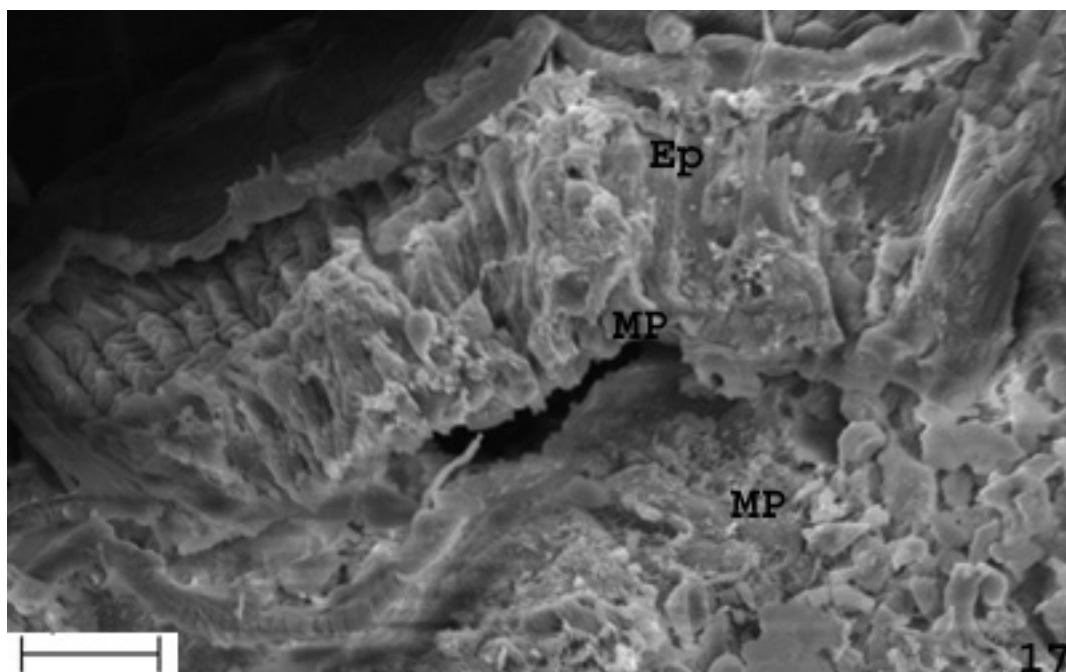


Figura 17. Parte do epitélio ventricular (Ep) de *Oxaea flavescens*, demonstrando células altas e abaixo a membrana peritrófica de aspecto irregular e com grumos. T = traquéia. Barra: 20 μ m.

Em todas as espécies estudadas, pode ser observada a presença de projeções sugerindo possivelmente componentes precursores da MP, pois RICHARDS e RICHARDS (1977), sugerindo a necessidade contínua ou repetida de renovação da MP, pois esta estrutura sobrevive somente por algumas horas às enzimas digestivas.

Apesar da MP tipo I ser geralmente menos diferenciada estruturalmente do que a MP tipo II, elas podem ainda ter zonas estruturalmente diferentes dentro delas. Além disso, existem poucas evidências indicando que zonas diferentes do intestino produzem diferentes componentes da MP tipo I, como foi sugerido por REID e LEHANE (1984). O propósito fisiológico para tais divisões estruturais dentro da MP é desconhecido. Sendo assim, LEHANE (1997), sugere que as camadas da MP são formadas por secreção diferencial de diferentes componentes da MP (quitina, proteínas, peritrofinas e glicosaminoglicanas), seja por agregação diferencial de componentes secretados dentro do lúmen intestinal ou por diferenças na forma física tomada pelo material base da MP.

Possivelmente, todas as diferenças observadas na MP das abelhas descritas neste trabalho envolvem também características fisiológicas não demonstradas até o momento. Pois, sabe-se que em algumas espécies de insetos a produção da MP tipo I pode ser contínua como em gafanhotos ou em

resposta à alimentação como nos mosquitos fêmeas. Nos insetos herbívoros vorazes como *Locusta migratoria*, considerados menos derivados, a MP é secretada de 15 em 15 minutos. Esta MP é passada gradualmente em direção à parte posterior do intestino, antes da próxima ser adicionada, resultando em muitas camadas de MP arranjadas coletivamente, mais precisamente como um telescópio, denominado de envelope peritrófico (EP) (BAINES, 1978). Em estudos realizados com baratas (*Periplaneta americana*), considerados insetos oligófagos, o EP parece ser composto por pelo menos 10 MP (LEE, 1968). Em mosquitos fêmeas hematófagas, uma única MP tipo I é produzida em torno do alimento em resposta ao repasto sanguíneo, cuja espessura desta vai aumentando gradualmente em direção à parte posterior do ventrículo (REID e LEHANE, 1984; RICHARDSON e ROMOSER, 1972).

4. CONCLUSÃO

As características da MP nas abelhas da família Apidae estudadas neste trabalho apresentaram-se distintas, pois em espécies como *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Nannotrigona* sp, pertencentes à tribo Meliponini, a MP demonstrou-se semelhante a uma película sólida, porém com faces ecto e endoperitróficas distintas. A morfologia da MP das espécies *Apis mellifera*, *Epicharis flava* e *Centris (Melanocentris)* sp. demonstraram aspecto lamelar com muitas camadas finas e irregulares, sendo que em *A. mellifera* foi também evidenciada uma massa de aspecto denso recobrimdo a superfície interna da MP. Em relação à *Megachile* sp. (Megachilidae) e *Oxaea flavescens* (Andrenidae) a MP destas espécies apresentaram aspecto de uma massa densa formando projeções voltadas para o lúmen intestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANG, M.J.; SPENCE, K.D. Surface morphology of peritrophic membrane formation 1997.
- DAY, M.F.; WATERHOUSE, D.F. Functions of alimentary systems. In: Roeder, K.D. (Editor). **Insect Physiol.**, p. 299-310, 1953.
- FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. **J. Insect Physiol.**, v. 27, n. 8, p. 559-570, 1981.
- JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Cell Tissue Res.**, v. 218, p. 141-147, 1983.
- BAINES, DM. Observations on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria* (R. and F.) nymphs. **Acrida**, v. 7, p. 11-21, 1978.
- BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodinus prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Can. J. Zool.**, v. 61, p. 2574-2586, 1983.
- CHAPMAN, R.F. 1998. **The Insects. Structure and function.** 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- CRUZ, L.C.; ARAÚJO, V.A.; DOLDER, H.; NEVES, C.A. Midgut ultrastructure of queens and foraging workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepelletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Sociobiology**, 2007.
- CRUZ-LANDIM, C. Origin of the peritrophic membrane of adult *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 207-219, 1985.
- CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J.E.; MORAES, R.L.M.S. On the ultrastructure of the striated border of midgut digestive cells of *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Iheringia**, v. 82, p. 127-132, and nonspecific esterase. **Cell Tiss. Res.**, v. 261, p. 431-443, 1990.
- LEE, R.F. The histology and histochemistry of the anterior midgut of *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae) with reference to the formation of the peritrophic membrane. **Proc. R. Entomol. Soc. Lond. Ser. A**, v. 43, p. 122-134, 1968.

- LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Ann. Rev. Ent.**, v. 42, p. 525-550, 1997.
- MARQUES-SILVA, S.M.; SERRÃO, J.E.; MEZÊNCIO, J.M.S. Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 23-30, 2005.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; VALDRIGHT, L. The larval peritrophic membrane of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera Apoidea). **Protoplasma**, v. 73, p. 349-365, 1971.
- MERCER, E.H.; DAY, M.F. The fine structure of peritrophic membrane of certain insects. **Biological Bull**, v. 103, p. 383-394, 1952.
- NEVES, C.A.; BHERING, L.L.; SERRÃO, J.E.; GIRITANA, L.B. FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v. 33, n. 5, p. 453-460, 2002.
- PEIXOTO, E.B.M.I.; SERRÃO, J.E. A comparative study of the cardia and cardiac valves in corbiculate bees (Hymenoptera, Apinae). **Sociobiology**, v. 37, n. 3B, p. 707-721, 2001.
- PETERS, W. Peritrophic membranes. **Zoophysiol. Series**, v. 30. 238 p, 1992.
- REID, G.D.F.; LEHANE, M.J. Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum* and *S. lineatum* with respect to the migration of onchocercal microfilariae. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 78, p. 527-539, 1984.
- RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. **Ann. Rev. Ent.**, v. 22, p. 219-240, 1977.
- RICHARDSON, M.; ROMOSER, W.S. The formation of the peritrophic membrane in adult *Aedes triseriatus* (Say) (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 9, p. 495-500, 1972.
- RYERSE, J.S.; PURCELL, J.P.; SAMMONS, R.D.; LAVRIK, P.B. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth *Heliothis*. **Tissue and Cell**, v. 24, p. 751-771, 1992.
- SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C. A specialized midgut region in stingless bees midgut (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Biocell**, v. 20, p. 227-234, 1996.

- SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey Bee**. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, 1956. 334 p.
- SNODGRASS, R.E. **Principles of Insect Morphology**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1935. 667 p.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C. ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.
- TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: **Biology of the insect midgut**. Ed. Lehane M.J. & Billingsley, P.F. London: Chapman & Hall, p. 86-114, 1996.
- TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 47, p. 47-61, 2001.
- WIGGLESWORTH, V.B. The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. **Q.J. Microsc. Sci.** v. 73, p. 593-616, 1930.
- WINGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. 7. ed. London: Methuen, 1972.

ORIGEM DA MEMBRANA PERITRÓFICA EM ABELHAS ADULTAS (HYMENOPTERA): IMUNOLOCALIZAÇÃO

RESUMO

O intestino médio é uma porção do trato digestivo das abelhas de origem endodérmica que não é revestido por cutícula e sim por uma estrutura denominada membrana peritrófica. Esta estrutura é composta por proteínas, glicosaminoglicanas e quitina. Dentre as proteínas destacam-se as peritrofinas, proteínas integrais da membrana peritrófica. Anticorpos anti-peritrofina foram produzidos com o objetivo de localizar sítios de síntese destas proteínas e então, estabelecer sua origem. Os resultados demonstraram que as peritrofinas da membrana peritrófica em abelhas são sintetizadas por todas as células do intestino médio, sendo que as células da região posterior têm participação menor nesta síntese. De acordo com os dados obtidos a membrana peritrófica em abelhas é produzida pelas células digestivas do intestino médio, correspondendo a MP tipo I. Nas abelhas da tribo Meliponini há participação também das células da região da cárdia na produção da MP, sendo assim, nas abelhas desta tribo encontram-se MP tipo I e tipo II.

Palavras-chave: intestino médio, imunocitoquímica, peritrofina.

PERITROPHIC MEMBRANE ORIGIN IN ADULTS BEES (HYMENOPTERA): IMUNOLOCATION

ABSTRACT

The midgut is a portion of the bees digestive tract of the endodermic origin lined by a peritrophic membrane composed by chitin and proteins (peritrophin). Anti-peritrophin antibody was produced to localize its sites synthesis in order to contribute to the comprehension of the peritrophic membrane origin in adults of different species of bees. Results showed that the bee peritrophic membrane peritrophin-55k is synthesized along the entire midgut by the digestive cells in all studied species indicating that it is of type I. In the stingless bees (Meliponini) the peritrophin-55k is synthesized in the cardia region in addition to the midgut, suggesting that PM production in that tribe is of both types I and II.

Key words: midgut, immunocytochemistry, peritrophin.

1. REVISÃO DE LITERATURA

O intestino médio ou ventrículo de insetos começa na base da válvula proventricular e termina na válvula pilórica, onde se encontram inseridos os túbulos de Malpighi (JIMENEZ e GILLIAM, 1990). Os intestinos anterior (estomodeu) e posterior (proctodeu) são de origem ectodérmica e revestidos por cutícula. O intestino médio, porção do trato digestivo das abelhas de origem endodérmica, é um dos órgãos responsáveis pela digestão e absorção dos nutrientes e é recoberto pela membrana peritrófica (MP) (SNODGRASS, 1935).

Em abelhas o epitélio do intestino médio é composto por células colunares, que sintetizam e secretam enzimas digestivas e absorvem os nutrientes, células endócrinas produtoras de hormônios e células regenerativas, responsáveis pela substituição das células deste órgão (JIMENEZ e GILLIAM, 1990; MARTINS *et al.*, 2006). A extremidade anterior do intestino médio de certos insetos possui uma região especializada denominada cárdia, a qual é ausente nas tribos Bombini e Apini e presente em Meliponini (PEIXOTO e SERRÃO, 2001).

Há dois tipos de MP nos insetos, onde a diferença está em suas propriedades e locais de síntese. A MP tipo I é produzida por todo epitélio do intestino médio, enquanto a MP tipo II é produzida constitutivamente pelas células especializadas da cárdia, região situada na extremidade anterior do ventrículo (WIGGLESWORTH, 1930, 1972; RICHARDS e RICHARDS, 1977; PETERS, 1992). A MP tem sido considerada uma estrutura análoga, em funcionalidade, à secreção de muco que cobre o lúmen do intestino nos vertebrados, onde a principal função é proteger as células epiteliais contra danos causados por partículas abrasivas de alimento (SNODGRASS, 1956; RICHARDS e RICHARDS, 1977; PETERS, 1992). Mas, há outras funções como proteger o epitélio contra microrganismos, auxiliar na retenção do alimento no intestino médio para a digestão e absorção, além de promover a compartimentalização dos processos digestivos criando espaços com atividades enzimáticas diferentes (RICHARDS e RICHARDS, 1977; CHAPMAN, 1988; TERRA, 1996).

A MP é uma estrutura extracelular e semipermeável, composta quimicamente por microfibrilas de quitina, proteínas e glicosaminoglicanas (MERCER e DAY, 1952; RICHARDS e RICHARDS, 1977; PETERS, 1992). As

proteínas da MP são divididas em quatro classes, com base em técnicas de extração diferencial e utilizando-se condições solubilizantes que aumentam a severidade extratora. As proteínas da classe 1 são facilmente removidas usando-se tampões fisiológicos ou tampões com alta força iônica. O extrato de proteínas correspondente a esta classe contém as proteínas em trânsito no ventrículo e aquelas que se encontram fracamente ligadas à MP. As proteínas da classe 2 são removidas através do uso de detergentes relativamente fracos. As proteínas da classe 3, denominadas peritrofinas, são consideradas proteínas integrantes da membrana peritrófica, pois somente são extraídas utilizando-se fortes agentes desnaturantes, como uréia. As proteínas ou peritrofinas da classe 4 são consideradas de difícil extração e, por isso, pouco conhecidas (TELLAM *et al.*, 1999).

A MP é estrutura estudada há mais de um século. Existem alguns relatos muito antigos como de ANGLAS (1901) sugerindo que a MP é secretada por células do intestino médio que recobrem a válvula esofageal em larvas de vespas e abelhas. Entretanto, este autor não descreveu o mecanismo que poderia promover a secreção da mesma. NELSON (1924) e EVENIUS (1926) sugerem que a MP seria secretada por células especializadas situadas na base da válvula estomodeal, ou seja, na extremidade anterior do intestino médio, onde a partir destas células surge um fino fluxo de secreção que se junta à massa principal da MP no intestino médio. Estudos realizados com adultos de *Bombus* sp. sugerem que a MP é secretada por um colar de células em voltas da base da válvula esofageal (SWINGLE, 1927).

Com relação à espécie *Apis mellifera* sugere-se que a MP seja produzida por delaminações repetidas causadas pela secreção das células do intestino médio. Pois, nesta espécie a MP é composta por diversas camadas concêntricas e, entre estas camadas podem-se encontrar fragmentos do citoplasma das células do epitélio (PAVLOVSKY e ZARIN, 1922; SNODGRASS, 1956). Entretanto, WIGGLEWORTH (1930) acredita na existência de duas origens para a MP em *Apis mellifera*: uma base quitinosa, secretada pela extremidade anterior do intestino médio, isto é, na base da válvula esofageal; e uma série de membranas indefinidas que se condensam, secretadas por todo epitélio do intestino médio. Para SNODGRASS (1956) tanto a MP tipo-I quanto a MP tipo-II são sintetizadas em larvas da espécie *Apis mellifera* e somente a tipo-II em abelhas adultas da mesma espécie.

Existem outros trabalhos sobre a MP de himenópteros que sugerem que a MP nesta ordem pertence ao tipo I, isto é, secretada por todas as células epiteliais do intestino médio (GREEN, 1931; MERCER e DAY 1952; HASSANEIN 1953; MELLO *et al.*, 1971; CRUZ-LANDIM e MELLO, 1981; JIMENEZ e GILLIAM 1990).

SERRÃO e CRUZ-LANDIM (1996) observaram que a MP nas abelhas sem ferrão apresenta uma única camada, sugerindo que sua origem ocorre na região anterior do ventrículo ou cárdia. Porém, estudos imunohistoquímicos e imunocitoquímicos em ventrículos de larvas de abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides*, demonstraram através de anticorpos anti-peritrofinas a presença de peritrofina na membrana peritrófica e em todo o epitélio do intestino médio. Portanto, em larvas desta espécie a MP foi classificada como tipo I (MARQUES-SILVA *et al.*, 2005).

Além disso, características de ultra-morfologia da MP em diversas espécies de abelhas sugerem que esta estrutura pode apresentar em sua morfologia diferenças distintas. Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) a MP apresentou duas camadas distintas com esculpturações geométricas em sua superfície ectoperitrófica e na face endoperitrófica demonstrou aspecto enrugado. Porém, em outras espécies como *Apis mellifera*, *Centris (Melanocentris) sp.*, *Epicharis flava* (Centridini), apresentaram diversas camadas justapostas umas sobre as outras e nas espécies *Megachile sp* (Megachilidae) e *Oxaea flavescens* (Andrenidae) a MP apresentou-se como uma massa densa com inúmeras projeções arredondadas na face endoperitrófica. Estas projeções na face endoperitrófica também foram encontradas nas espécies da família Apidae, exceto em *Melipona quadrifasciata* e *Nannotrigona sp.* (Meliponini) (Capítulo I deste volume).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da Membrana Peritrófica para Produção do Antissoro Policlonal

Foram utilizadas 300 larvas pré-defecantes de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, coletadas em ninhos no apiário da Universidade Federal de Viçosa. Estas larvas foram dissecadas em solução de NaCl 125 mM para a retirada das MP, sendo cada uma rompida e lavada sucessivamente em solução salina para retirar o conteúdo alimentar. Essas MPs foram mantidas na mesma solução e armazenadas a temperatura de -20°C. Posteriormente, essas MP foram processadas para a obtenção de extratos protéicos, para verificação do perfil eletroforético nos extratos e posterior isolamento das proteínas utilizadas como imunógenos.

2.2. Extração das Proteínas

O processo de extração das proteínas da MP com aproximadamente 100 MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, para obtenção do extrato de proteínas da classe 3, isto é, as peritrofinas, transcorreu da seguinte forma: primeiramente, as MP em tubos apropriados e em solução salina (NaCl 125 mM), foram centrifugados a 10.000 g durante 5 minutos, para sedimentação das membranas. Em seguida, foram homogeneizadas por 5 minutos em um 'Potter'. O homogeneizado obtido foi centrifugado em centrífuga refrigerada Beckmann a 20.000 g a 4°C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, armazenado a -20°C e designado 1ª fase da extração da MP; o segundo passo da extração foi realizado com o precipitado da primeira extração, o qual foi ressuscitado e homogeneizado em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, Detergente Chaps a 65 mM em NaCl 125 mM. Seguindo-se por centrifugação (como descrito no item 1), novamente o sobrenadante obtido foi coletado, armazenado a -20°C e denominado 2ª fase da extração da MP.

Ao precipitado da segunda fase de extração adicionou-se 100 µL de uréia a 12 M em tampão Tris-HCl 40 mM, seguindo-se por nova

homogeneização e centrifugação, ao último sobrenadante coletado, armazenado a -20°C e designado 3ª fase da extração da MP.

Para efeitos gerais de comparação dos perfis eletroforéticos das proteínas extraídas das MP também foram realizadas extrações de proteínas utilizando-se os epitélios ventriculares de larvas pré-defecantes e de abelhas adultas *M. quadrifasciata anthidioides*, seguindo-se o mesmo protocolo da extração de proteínas da MP. As respectivas frações obtidas foram designadas 1ª, 2ª e 3ª extrações dos intestinos médios de larvas e 1ª, 2ª e 3ª extrações dos intestino médios de abelhas adultas, as quais foram armazenadas em tubos apropriados a -20°C.

Todos os extratos foram dialisados por 24 horas a 4 °C, utilizando-se membrana de diálise para proteínas com peso molecular acima de 12 kDa (Sigma, USA), contra 1.000 volumes de água destilada e deionizada. Em seguida, as amostras dialisadas foram colocadas em tubos apropriados e armazenadas a -20°C.

2.3. Dosagem de Proteína e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os teores de proteínas dos extratos da MP, dos epitélios do intestino médio de larvas e epitélios do intestino médio de abelhas adultas foram determinados em espectrofotômetro Hitachi ($\lambda = 595 \text{ nm}$), utilizando a técnica de BRADFORD (1976) e, como padrão de peso molecular foi utilizada albumina de soro bovino.

As amostras de 1ª, 2ª e 3ª extrações de proteínas da MP e dos epitélios larvais e adultos foram submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), em um sistema de pH descontínuo (LAEMMLI, 1970), utilizando-se o equipamento Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, USA). As amostras protéicas foram misturadas em tampão de amostra (tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS a 10%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,5% - m/v e 0,71 M de β -mercaptoetanol) na proporção 1:2, seguindo-se por aquecimento em banho-maria a 95 °C, por 4 minutos, imediatamente antes de serem aplicadas no gel.

A eletroforese foi conduzida a 150 V até a frente de corrida (azul de bromofenol) chegar a base do gel. Logo após a corrida, o gel foi corado com solução de prata conforme descrito por BLUM *et al.* (1987).

O peso molecular dos polipeptídeos foi estimado pela regressão linear dos logaritmos da mobilidade relativa ($M_r = \text{distância migrada pela proteína} / \text{distância migrada pelo corante}$), tendo como padrões: fosforilase b, soro albumina bovina, ovo albumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina da soja e lisozima (Bio-Rad, cat. n. 161-0304).

2.4. Produção do Antissoro Policlonal

Foram utilizados cinco camundongos albinos suíços, obtidos do biotério da Universidade Federal de Viçosa, sendo três para tratamento e dois para controle. O imunógeno obtido de MP correspondeu ao sobrenadante contendo as proteínas obtidas na 3ª fase de extração (50 µg), isto é, as peritrofinas. Essas peritrofinas foram emulsificadas com saponina (20 µg/170 µL de água ultrapura). As inoculações nos três camundongos foram por via subcutânea, na base do pescoço entre as escápulas. O volume total do emulsificado aplicado em cada animal correspondeu a 0,2 mL, em cada dose. Foram aplicadas três doses do imunógeno, em cada animal, com intervalos de 10 dias entre elas. Após a terceira inoculação houve um intervalo de 10 dias e em seguida foram realizadas sangrias nos três camundongos-tratamento para verificação dos níveis de anticorpos.

Após obtenção de resultados positivos para a titulação dos antissoros, os camundongos, anestesiados em câmara de éter, foram submetidos à coleta total do sangue com auxílio de pipetas Pasteur esterilizadas, puncionando-se a região do plexo retro-orbital, sem uso de anticoagulantes.

As amostras de sangue foram deixadas em repouso por 12 horas a 4°C, para separação do soro contendo anticorpos anti-peritrofinas da MP e, então, os frascos contendo os coágulos foram centrifugados a 5000 g a 4°C, por 5 minutos. Posteriormente, os soros foram coletados e aliquotados em tubos Eppendorf, armazenados a -20°C e designados como AS₁, AS₂ e AS₃ de acordo com o camundongo que o produziu. Os soros obtidos nos camundongos controle também foram coletados, aliquotados e armazenados a -20°C.

2.5. “Western Blotting”

Antes de iniciar o processo de transferência, todos os materiais utilizados nesta técnica foram equilibrados em tampão de transferência Tris/Glicina/Metanol. Após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% os polipeptídios obtidos nas três fases de extração das amostras de MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, epitélios do intestino médio de larvas e de abelhas adultas da mesma espécie e, epitélios intestinais de larvas e de abelhas adultas *A. mellifera* foram transferidos eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose com diâmetro do poro de 0,45 μm (Bio-Rad). A seguir montou-se um ‘sanduíche’ composto, primeiramente, por 3 folhas de papel-filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel e em seguida mais 3 folhas de papel-filtro. A posição de transferência das proteínas em relação aos pólos negativo e positivo determinava que o gel ficasse voltado para o pólo negativo, e atrás deste a membrana de nitrocelulose que ficou voltada para o pólo positivo. O ‘sanduíche’ foi colocado numa cuba vertical de transferência úmida (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA), preenchida com tampão de transferência, sendo a eletroforese executada a 30 V, a 4°C por 12 horas.

A eficiência da transferência foi avaliada observando-se a transferência do padrão de peso molecular pré-corado colorido (Bio-Rad) sobre a membrana de nitrocelulose. Logo após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras, lavadas e bloqueadas em PBST 0,5% + BSA 1,5%, em temperatura ambiente por 15 minutos e sob agitação lenta. Depois as tiras de membrana de nitrocelulose foram incubadas em uma solução contendo anticorpo primário, anti-peritrofinas policlonal, e PBS (diluição 1:200), por uma hora em temperatura ambiente e sob agitação lenta. Em seguida, as tiras foram lavadas em PBST 0,5% e incubadas em solução com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase, e PBS (diluição de 1:6000), por uma hora em temperatura ambiente e sob agitação lenta. O processo foi finalizado lavando-se as tiras com PBST 0,5%, em seguida, foram submetidas à revelação da reação utilizando-se uma solução com 5 mg de diaminobenzidina (DAB), 5 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, 5 μL de H_2O_2 30% e 250 μL cloreto de níquel a 0,3%. Posteriormente, realizou-se o processo de

bloqueio da reação substrato com DAB aplicando-se sobre os discos água destilada.

O controle negativo foi realizado em tiras de membrana de nitrocelulose que seguiram quase todos os mesmos passos descritos anteriormente, exceto pela omissão da incubação em anticorpo primário

2.6. Imunocitoquímica

As abelhas utilizadas para esta análise foram adultos de *Auglochloa* sp (Halictidae), *Megachile* sp.(Megachilidae), *Oxaea flavescens* (Andrenidae), *Apis mellifera* (Apidae: Apini), *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae: Meliponini), *Frieseomelita varia* (Apidae: Meliponini), *Bombus morio* (Apidae: Bombini), *Centris (Melanocentris) sp.* (Apidae: Centridini) e *Epicharis flava* (Apidae: Centridini).

As abelhas adultas foram dissecadas em solução salina, pH 7,2, e retirados os intestino médios. Em seguida, foram fixados em solução de Zamboni's (STEFANINI, 1967). Após a fixação os intestino médios foram lavados em PBS (Tampão Salino-Fosfato), pH 7,6, por 12 horas à 4°C; seguindo-se por fixação em solução de glutaraldeído a 1% em tampão Sorensen's 0,1M, pH 7,3, durante 3-4 horas à 4°C, e lavagem em tampão Sorensen's, por 12 horas à 4°C. Os processos de desidratação, infiltração e polimerização foram seguidos conforme as instruções sugeridas pelo fabricante da resina LR White para microscopia eletrônica de transmissão. As Secções ultrafinas (60-80 nm) foram coletadas em grades de níquel com 300 mesh.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao tratamento imunocitoquímico, consistindo em duas lavagens com tampão TBS (Tampão Tris-Salino, pH 7,2); incubação em soro normal de camundongo por 30 minutos em temperatura ambiente; incubação em soro normal de cabra por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras controle não foram incubadas em anticorpo primário, anti-peritrofinas produzido em camundongo, e ficaram imersas em TBS por uma hora. As demais amostras foram incubadas em anticorpo primário diluído em TBSB (Tampão Tris-Salino, pH 7,2 com albumina de soro bovino a 0,5%), por uma hora e em temperatura ambiente. Em seguida, todas amostras passaram por quatro banhos em TBSB, de 10 minutos cada uma e em temperatura ambiente.

Após as lavagens, todas as amostras foram incubadas em anticorpo secundário anti-camundongo e produzido em cabra conjugado com ouro coloidal (10 nm), diluído em TBSB, por uma hora e em temperatura ambiente. Novamente, as amostras foram lavadas quatro vezes em TBS por três minutos e em temperatura ambiente. Em seguida, mais quatro lavagens em água ultrapura por cinco minutos, cada banho. Depois as amostras foram contrastadas em acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 do Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa¹.

3. RESULTADOS

As extrações das proteínas obtidas da MP de larvas, proteínas do epitélio do intestino médio de larvas e do epitélio do intestino médio de abelhas adultas de *M. quadrifasciata anthidioides* foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE. Os resultados demonstraram a presença de duas proteínas, observadas principalmente nas extrações da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, onde o peso molecular estimado para uma delas foi de 55 kDa e para a outra 27 kDa (Figura 1).

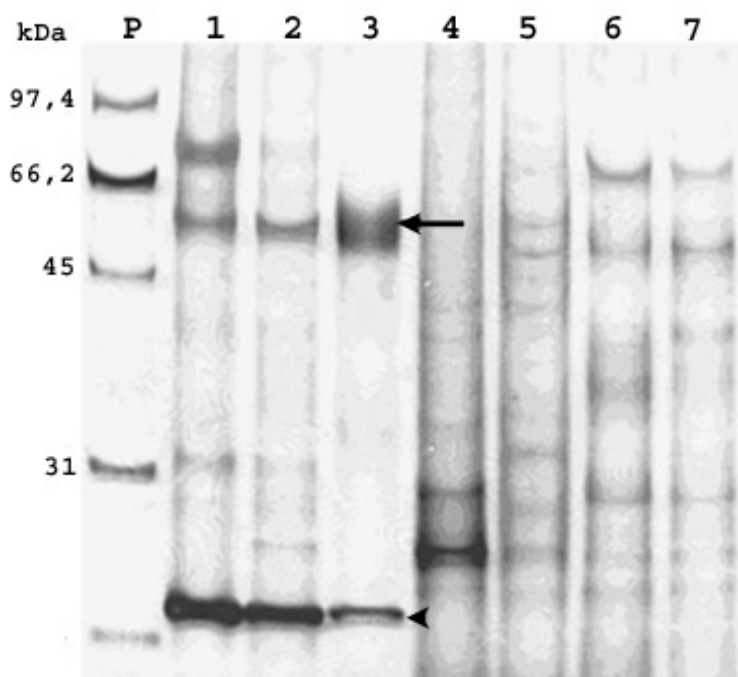


Figura 1. SDS-PAGE a 12% corado com prata das proteínas da membrana peritrófica (MP) e do epitélio do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Linhas 1, 2 e 3: Proteínas da 1ª, 2ª e 3ª extrações da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, respectivamente; Linhas 4, 5 e 6: Proteínas da 1ª, 2ª e 3ª extrações do epitélio do intestino médio de larvas *M. quadrifasciata anthidioides*, respectivamente; Linha 7: Proteínas da 3ª extração do epitélio do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*. P = Padrão de Peso Molecular. Seta = Peritrofina-55k; Ponta de seta = Peritrofina-27k.

Os resultados do Western blotting demonstraram que anticorpos reconheceram uma peritrofina de 55 k nos extratos de proteínas da MP e nos extratos do epitélio do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* e em *A. mellifera* notou-se fracamente o reconhecimento desta peritrofina. Entretanto, em outra banda com aproximadamente 27 k foi observada nos extratos obtidos de *A. mellifera* (Figura 2).

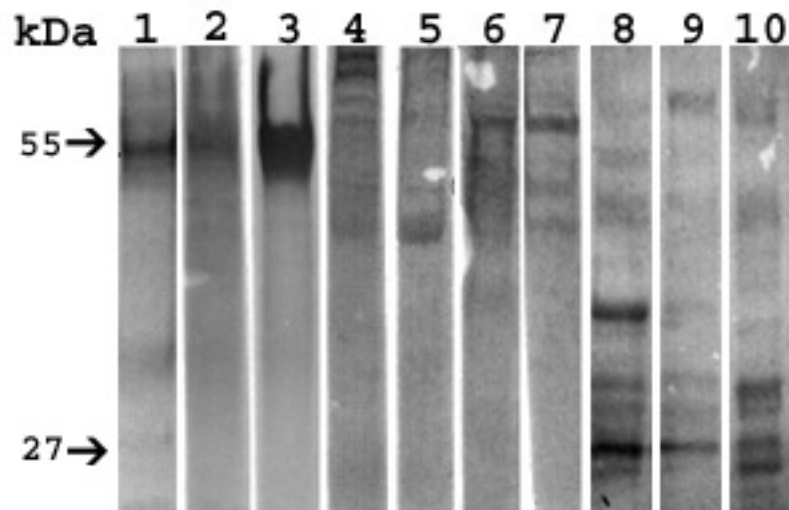


Figura 2. Western blotting das proteínas da membrana peritrófica (MP) e do epitélio do intestino médio de larvas e de abelhas adultas das espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Apis mellifera*. Linha 1, 2 e 3: Proteínas da 1^a, 2^a e 3^a extrações da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, respectivamente; Linhas 4 e 5: Proteínas da 2^a e 3^a extrações do epitélio do intestino médio de larvas *M. quadrifasciata anthidioides*, respectivamente; Linhas 6 e 7: Proteínas da 2^a e 3^a extrações do epitélio do intestino médio de abelhas adultas *M. quadrifasciata anthidioides*, respectivamente; Linhas 8 e 9: Proteínas da 2^a e 3^a extrações do epitélio do intestino médio de larvas *A. mellifera*, respectivamente; Linha 10: Proteínas da 3^a extração do epitélio do intestino médio de abelhas adultas *A. mellifera*.

Os anticorpos obtidos contra as peritrofinas da MP permitiram a localização destas ao longo de todo epitélio do intestino médio de todas as espécies de abelhas analisadas.

Os anticorpos anti-peritrofinas, produzidos a partir da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, foram suficientes para localizar peritrofinas em células da cárdia de abelhas forrageiras *M. quadrifasciata anthidioides*. Essas células apresentaram microvilosidades longas, vesículas grandes e pequenas, e na porção basal notou-se uma superfície irregular com muitas invaginações (Figura 3 A, B, C e D). As marcações foram encontradas nas microvilosidades, algumas dispersas nos espaços entre as microvilosidades, ou seja, no espaço ectoperitrófico, e dispersas na região apical da célula logo abaixo da membrana plasmática (Figura 3 B-C). No citoplasma próximo ao ápice celular foram observadas marcações que possivelmente dirigiam-se para a membrana plasmática e para as microvilosidades. Peritrofinas foram localizadas no interior de grandes vesículas (Figura 3A e D). Além disso, muitas vesículas estavam sempre próximas à áreas de retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi.

Os resultados nas amostras utilizadas como controle, omitindo-se o anticorpo anti-peritrofinas durante o tratamento, demonstraram reação negativa tanto da MP como nas células da cárdia e do intestino médio (Figura 4).

A células digestivas do intestino médio de *M. quadrfaciata anthidioides* apresentaram marcações de forma regular para peritrofinas em vesículas no citoplasma, nas microvilosidades, e na MP (Figura 5). Observou-se algumas vesículas contendo marcações e outras não. Além disso, percebeu-se que as mesmas apresentavam conteúdo bem diversificado, pois algumas demonstravam internamente zonas claras e outras eletro-densas (Figura 5 A-B). Foram observadas também marcações nas microvilosidades desde sua base até sua extremidade (Figura 5 C-D).

Na MP de forrageiras de *Frieseomelita varia* observou-se a presença de peritrofinas bem como nas células da cárdia e nas células digestivas do intestino médio. Na região basal das células digestivas observou-se a membrana basal com invaginações e nessa porção da célula foram observadas marcações esparsas (Figura 6 A). Na Figura 6 B notam-se marcações associadas ao retículo endoplasmático rugoso e em sua periferia. Inúmeras marcações foram encontradas nas microvilosidades e no espaço entre as mesmas (Figura 6 C). Nas células digestivas da região posterior do intestino médio foram observadas poucas marcações em vesículas (Figura 6 D). Sendo que estas marcações foram mais abundantes em células da região anterior e média do intestino médio (Figura 6 E).

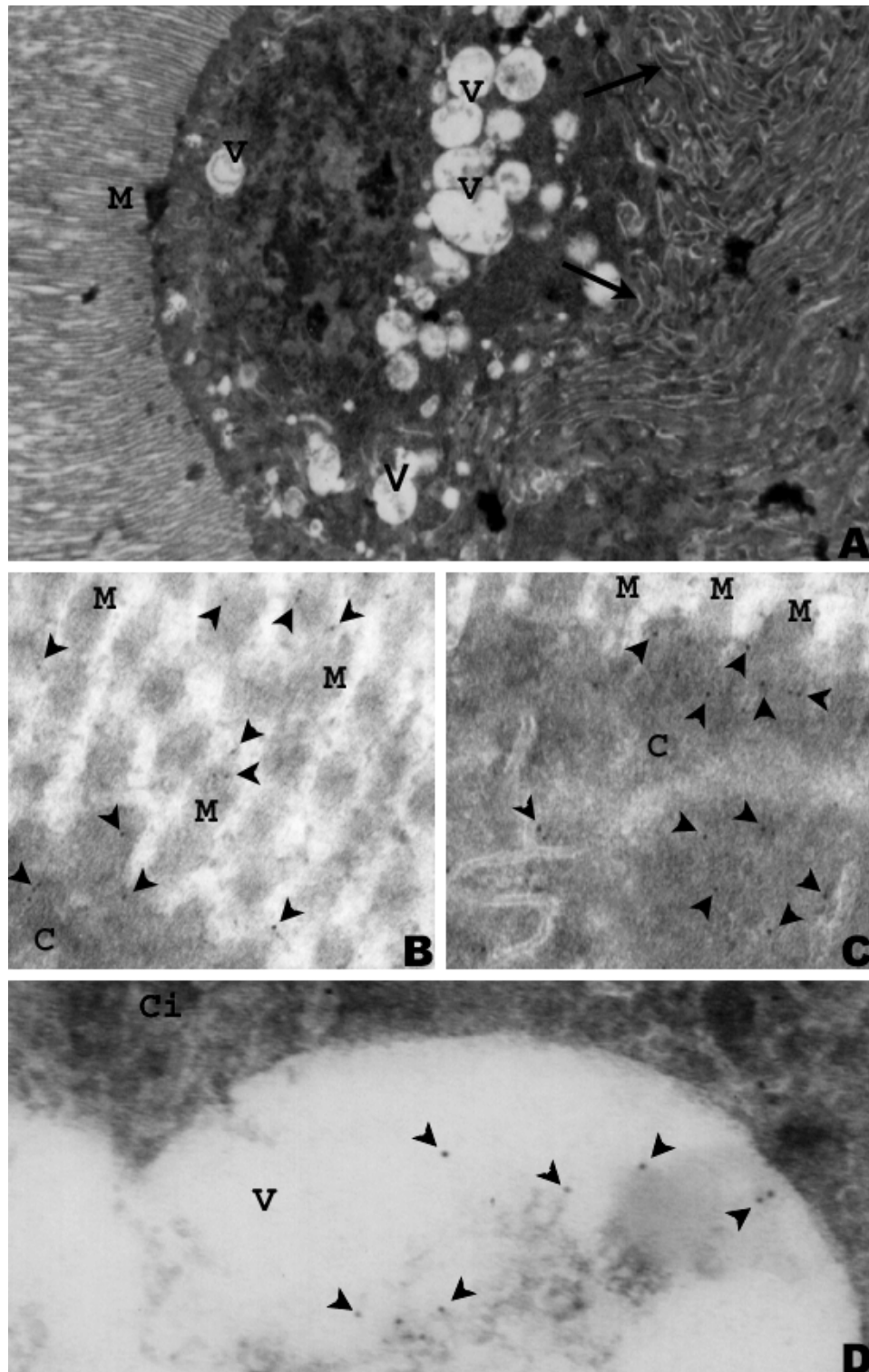


Figura 3. Imunolocalização de peritrofinas em células do epitélio da cardia em abelhas forrageiras *Melipona quadrifasciata anthidioides*. A. Secção tangencial do epitélio da cardia demonstrando aspecto geral. 4526x B. Detalhe da região das microvilosidades demonstrando marcações para a peritrofinina. 33000x. C. Porção subjacente à membrana plasmática demonstrando inúmeras marcações dirigindo-se à membrana plasmática e as microvilosidades. 33000x. D. Grande vacúolo de célula da cardia demonstrando marcações. 75400x. Seta = invaginações da membrana basal da célula; Cabeça de seta = marcações peritrofinina-55; V = vesículas; M = microvilosidades; C = célula; Ci = citoplasma.

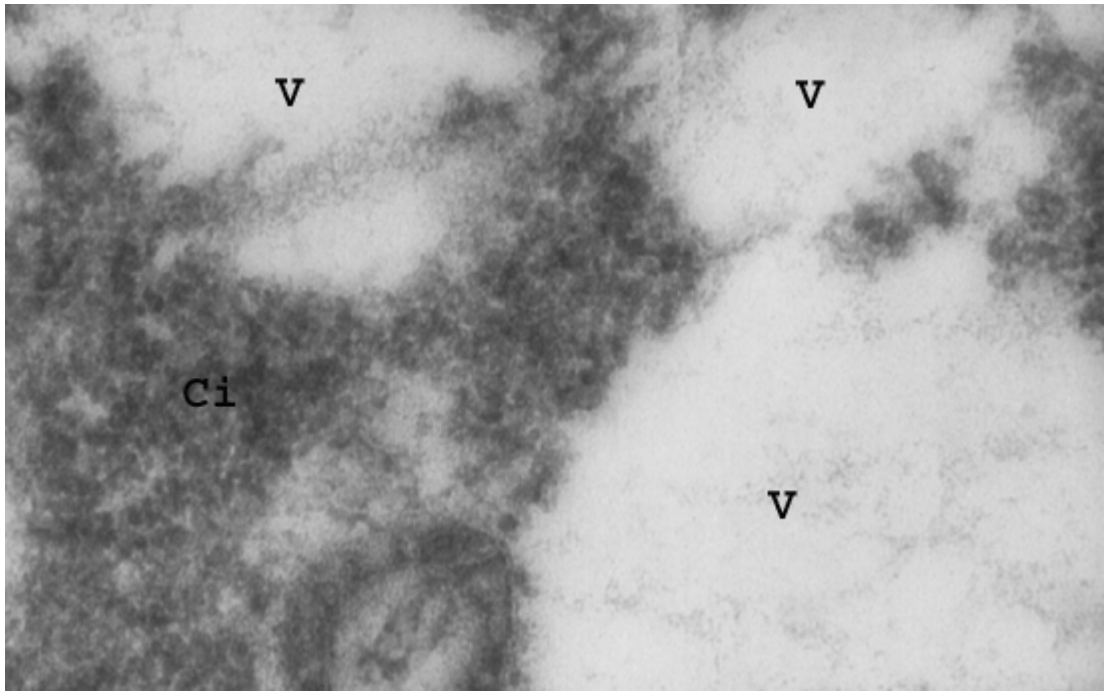


Figura 4. Controle negativo de célula digestiva do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) demonstrando vesículas não-reativas. 48500x. V = vesículas; Ci = citoplasma.

Em *A. mellifera* as marcações foram observadas ao longo do epitélio intestinal médio, sendo mais abundantes na região anterior do que na posterior. Pode-se notar a presença de peritrofinas no ápice da célula, abaixo da membrana plasmática, nas microvilosidades e entre as mesmas (Figura 7 A-B). Foram observadas marcações associadas ao aparelho de Golgi e também em sua periferia, além de marcações em vesículas (Figura 7 C-D).

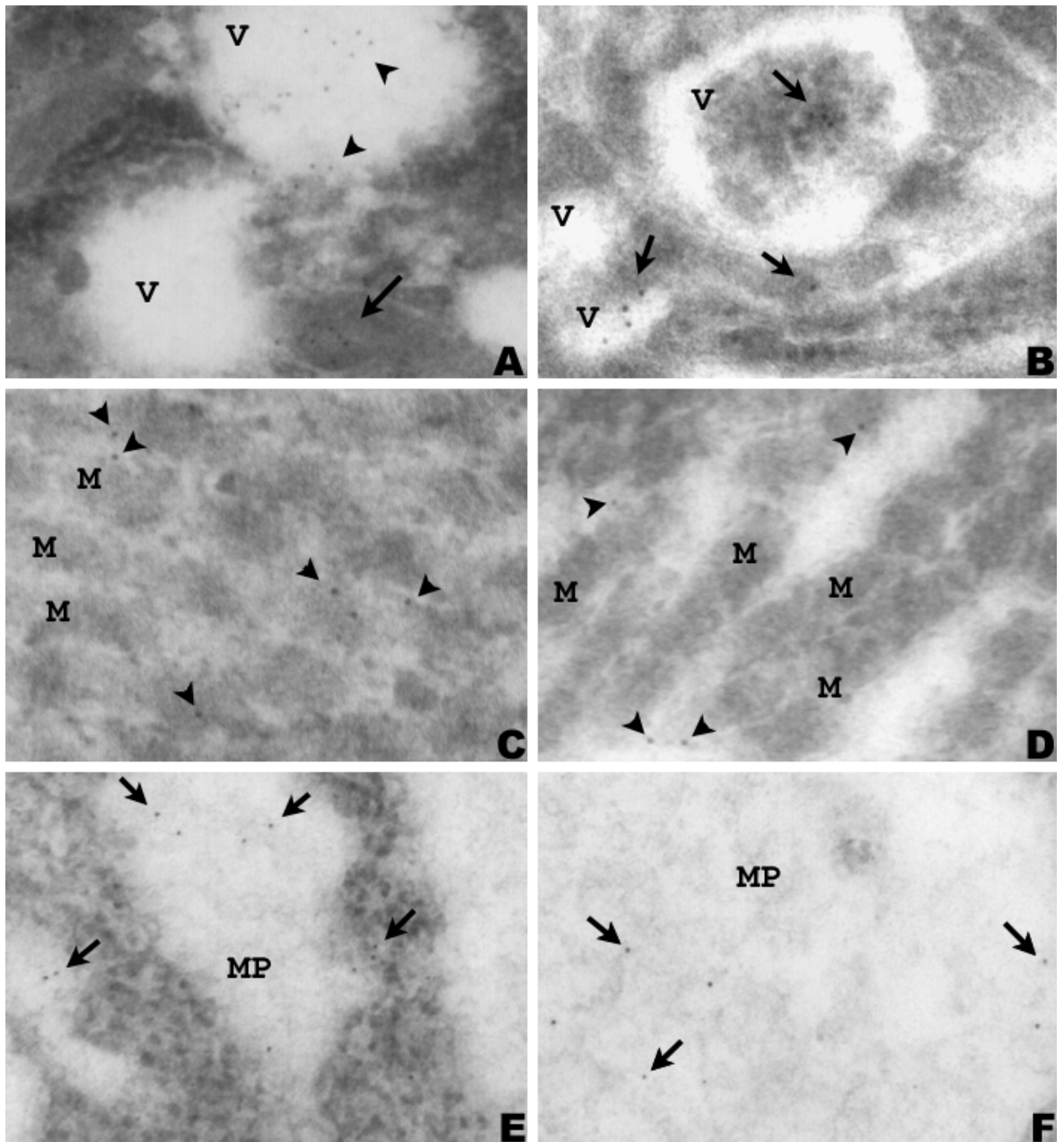


Figura 5. Secções de células digestivas do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* demonstrando imunolocalizações de peritrofinas. A. Detalhe de algumas vesículas de conteúdo translúcido marcadas (cabeça de seta) e outras mais eletro-densas também marcadas (seta), de célula da região anterior do intestino médio, após a cárdia. B. Vesículas da porção mediana da célula demonstrando reação positiva para peritrofinas. 75400x. C-D. Detalhes das microvilosidades, em secções longitudinais, demonstrando marcações 75400x. E-F. MP apresentando marcações tanto nas regiões claras como nas regiões mais eletro-densas (seta). P = membrana peritrófica; M = microvilosidade; V = vesícula.

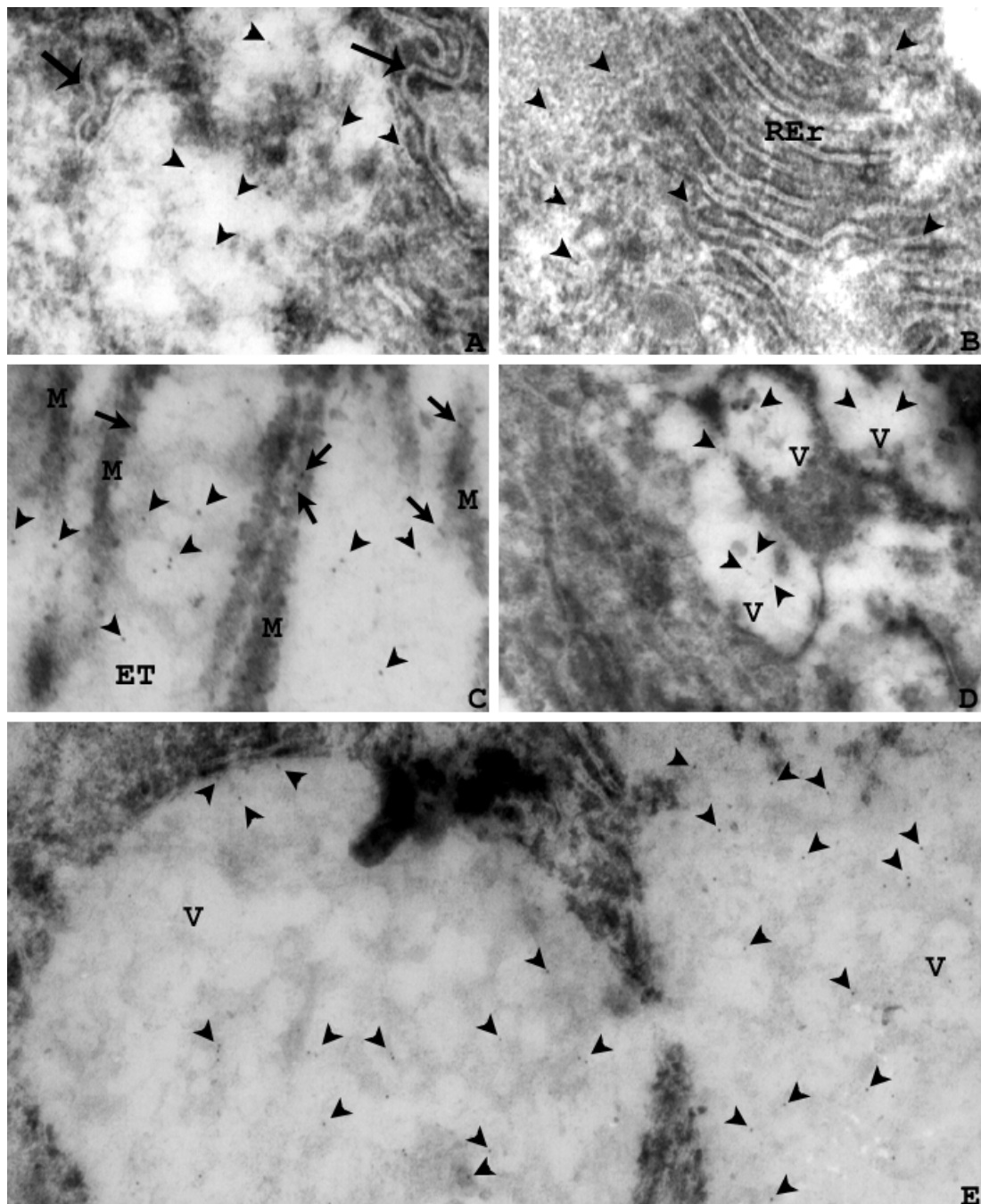


Figura 6. Imunolocalização de peritrofinas em células do intestino de abelhas forrageiras *Frieseomelita varia*. A. Secção tangencial de célula da cardia demonstrando marcações em vesículas (cabeça de seta). Setas indicam invaginações da membrana plasmática. 22000x. B. Secção tangencial de célula da região mediana do intestino médio demonstrando marcações (cabeça de seta) na periferia de um retículo endoplasmático rugoso. 22000x. C. Marcações localizadas nas microvilosidades (seta) e também nos espaços entre microvilosidades (cabeça de seta). 33000x. D. Citoplasma de uma célula da região posterior demonstrando vesículas pouco marcadas (cabeça de seta). 13000x. E. Grandes vesículas de célula situada na região mediana do intestino médio, com diversas marcações dispersas em seu interior (cabeça de seta). 32300x. Rer = retículo endoplasmático rugoso; ET = espaço ectoperitrofico; V = vesícula; M = microvilosidade;

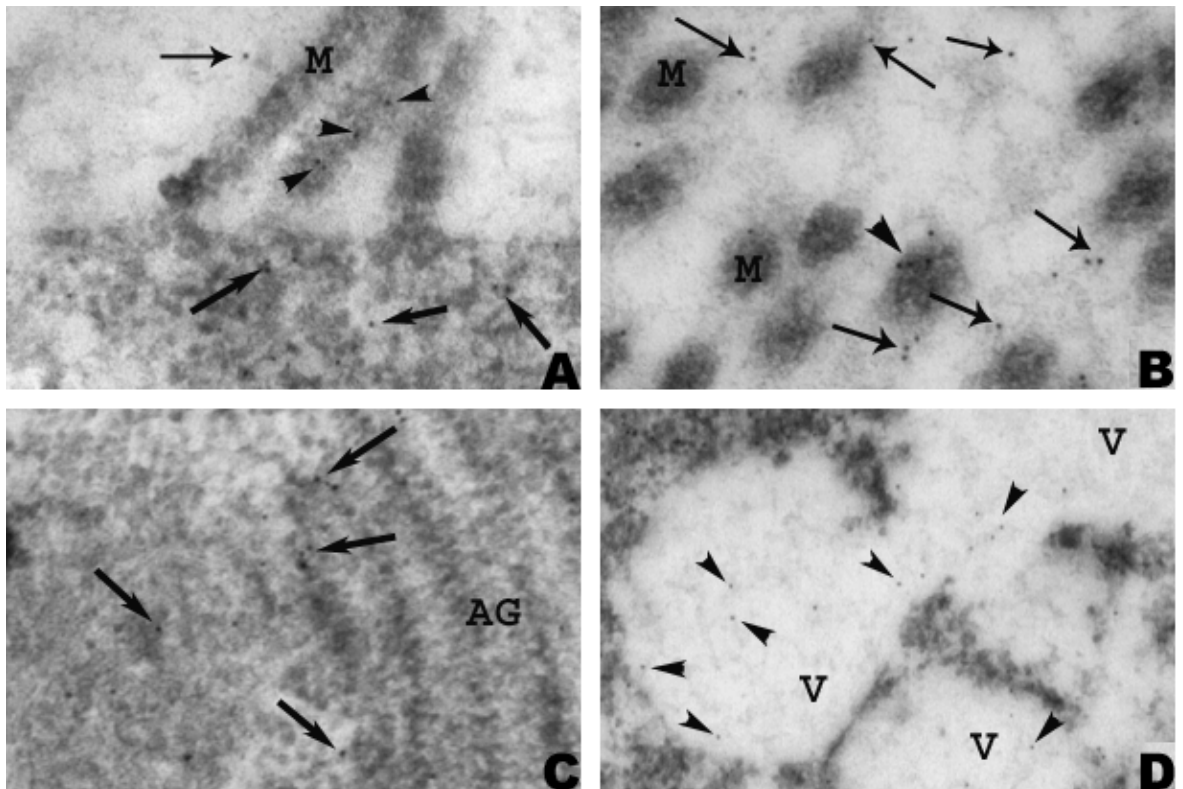


Figura 7. Imunolocalização de peritrofinas em células digestivas da região anterior do intestino médio de *Apis mellifera* (Apini). A. Secção longitudinal do ápice de uma célula demonstrando marcações abaixo da membrana plasmática (seta), nas microvilosidades (cabeça de seta) e nos espaços entre microvilosidades (seta). 33000x. B. Secção transversal das microvilosidades demonstrando marcações dentro das microvilosidades (cabeça de seta) e fora no espaço ectoperitrotrófico (seta). 33000x. C. Detalhe do citoplasma demonstrando marcações próximas ao aparelho de Golgi. 33000x. D. Detalhe de algumas vesículas da região mediana da célula demonstrando marcações. 22000x. AG = aparelho de Golgi; V = vesícula; M = microvilosidade.

A Figura 8 A demonstra o aspecto geral do epitélio do intestino médio de *Bombus morio*. Nota-se logo acima das microvilosidades uma MP espessa em relação ao lúmen estreito. As marcações para peritrofinas foram observadas nas células ao longo do epitélio intestinal, estando localizadas nas microvilosidades, em vesículas de secreção de vários tamanhos (Figura 8 B, C e D), junto às áreas de retículo endoplasmático e em vesículas (Figura 9 A e B). Na MP as marcações também foram observadas ao longo de seu comprimento, porém as marcações foram mais abundantes nas porções anterior e média da MP (Figura 10 A e B).

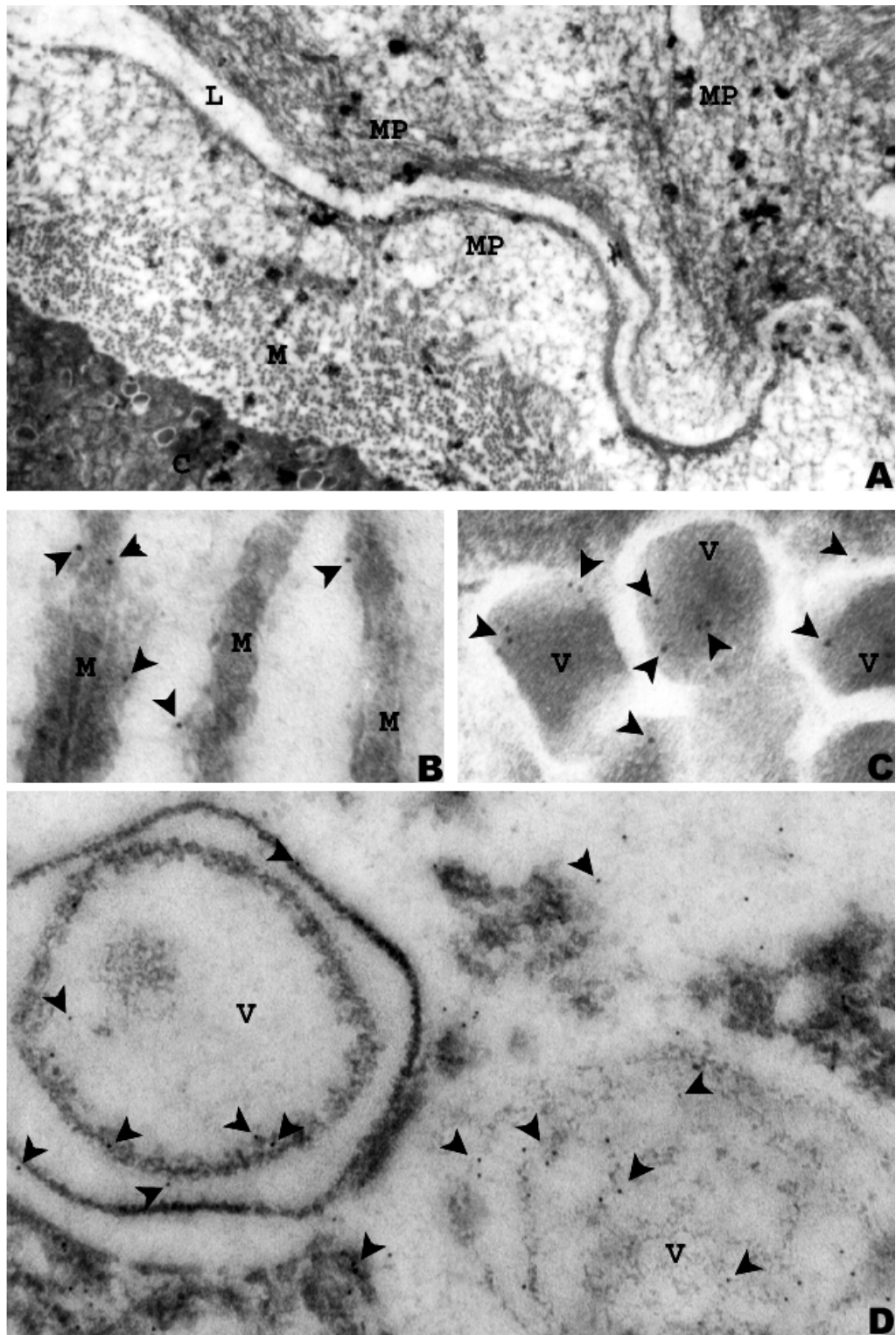


Figura 8. Secções de células digestivas do intestino médio de *Bombus* sp (Bombini). A. Corte tangencial demonstrando aspectos gerais do epitélio do intestino médio, como microvilosidades e MP espessa. 6500x. B. secção longitudinal das microvilosidades demonstrando marcações ao longo de seu comprimento (cabeça de seta). 51300x. C. Marcações em vesículas eletro-densas situadas na região apical da célula. (cabeça de seta). 51300x. D. Vesículas com inúmeras marcações dispersas (cabeça de seta). 48500x. MP = membrana peritrófica; L = lúmen; C = Célula do epitélio; M = microvilosidade; V = vesícula.

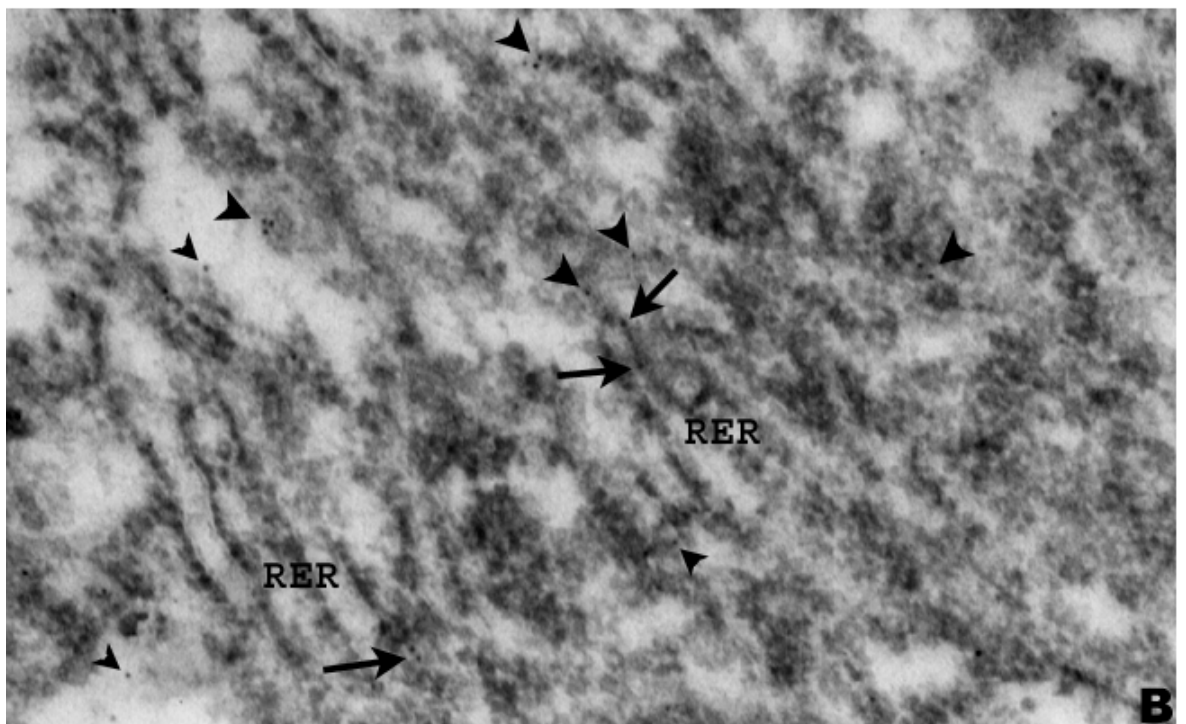
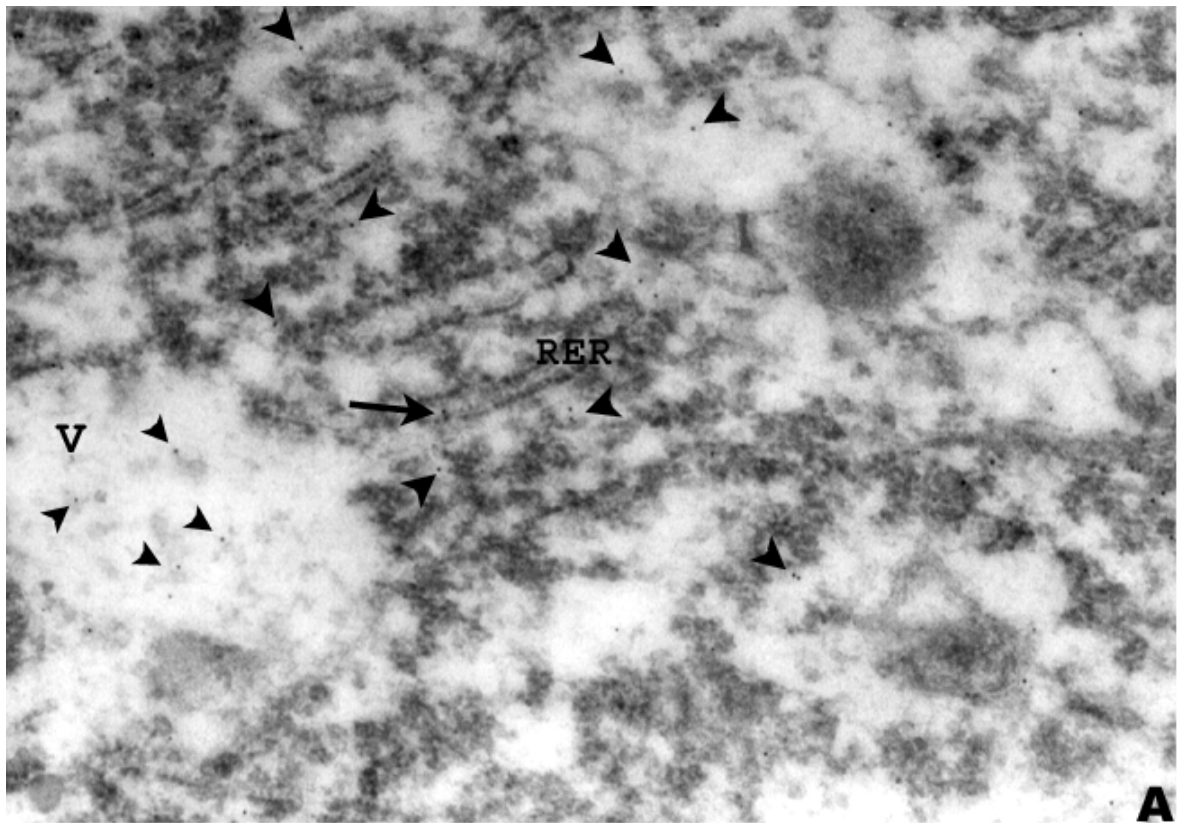


Figura 9. Citoplasma de célula digestiva do intestino médio de *Bombus morio* (Bombini). A. Detalhe de uma área contendo retículo endoplasmático rugoso com marcações associadas (seta) e também em vesículas (cabeça de seta). 41200x. B. Área de retículo endoplasmático em maior resolução demonstrando marcações muito próximas a esta organela (seta) e na sua periferia. (cabeça de seta). 62000x.

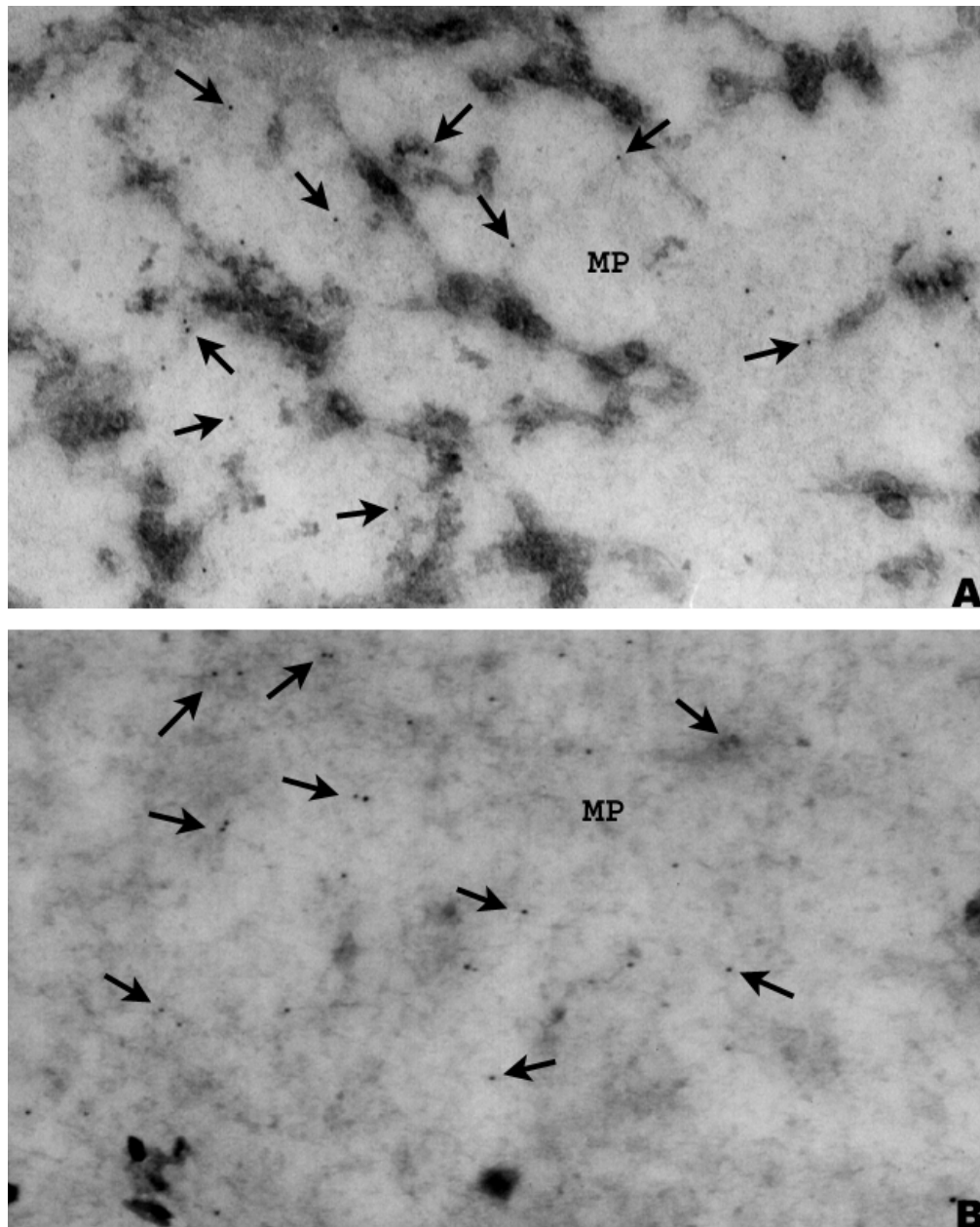


Figura 10. Mp de *Bombus morio* (Bombini). A. Porção anterior da MP demonstrando aspecto granular denso em algumas regiões e diversas marcações. 48500x. Porção média da MP demonstrando diversas marcações dispersas. 48500x. Seta = marcações para peritrofinas. MP = membrana peritrófica.

Em *Centris (Melanocentris)* sp. as marcações foram observadas ao longo do epitélio do intestino médio. Nas células digestivas da região média do intestino foram observadas marcações abundantes no citoplasma próximo ao ápice (Figura 11 B e D) e nas microvilosidades. Entretanto, nas células da região posterior, poucas marcações foram encontradas nas microvilosidades e no espaço ectoperitrófico (Figura 11 C). As células digestivas do intestino médio de *Epicharis flava*, espécie pertencente à mesma tribo de *Centris (Melanocentris)* sp., demonstraram marcações semelhantes, isto é, foram observadas em maior abundância de marcações nas células da região anterior

e média do intestino médio do que na região posterior. As marcações foram encontradas na porção apical das células digestivas em vesículas e também nas microvilosidades, no espaço ectoperitrófico, bem como na MP (Figura 12 A, B e C). Também foram observadas marcações associadas ao retículo endoplasmático e em pequenas vesículas em sua periferia.

O epitélio do intestino médio de *Augochlora* sp apresentou células baixas e longas microvilosidades e uma MP de aspecto granular (Figura 13 A). Os resultados sobre a imunolocalização de peritrofinas nas células digestivas demonstraram-se regulares ao longo de epitélio. Pode-se observar na Figura 13 B marcações na porção basal em vesículas e também nas microvilosidades na Figura 13 C. As marcações na MP foram observadas de forma regular ao longo de seu comprimento e espalhadas em meio a regiões de aspecto granular elétron-denso e em regiões menos elétron-densas (Figura 13 D).

Em *Megachile* sp. o epitélio demonstrou a presença de grandes vesículas de secreção apicais, longas microvilosidades (Figura 14 A). Na região basal foram observadas poucas marcações, sendo que algumas células na porção basal da região posterior do intestino, não apresentaram marcações (Figura 14 B). Em células da região anterior e média do intestino foram observadas marcações no citoplasma apical, abaixo da membrana plasmática. Também foram encontradas marcações associadas ao retículo endoplasmático rugoso, nas microvilosidades e em vesículas (Figura 14 C, D, E e F). A Figura 15 demonstra a presença de peritrofinas na MP.

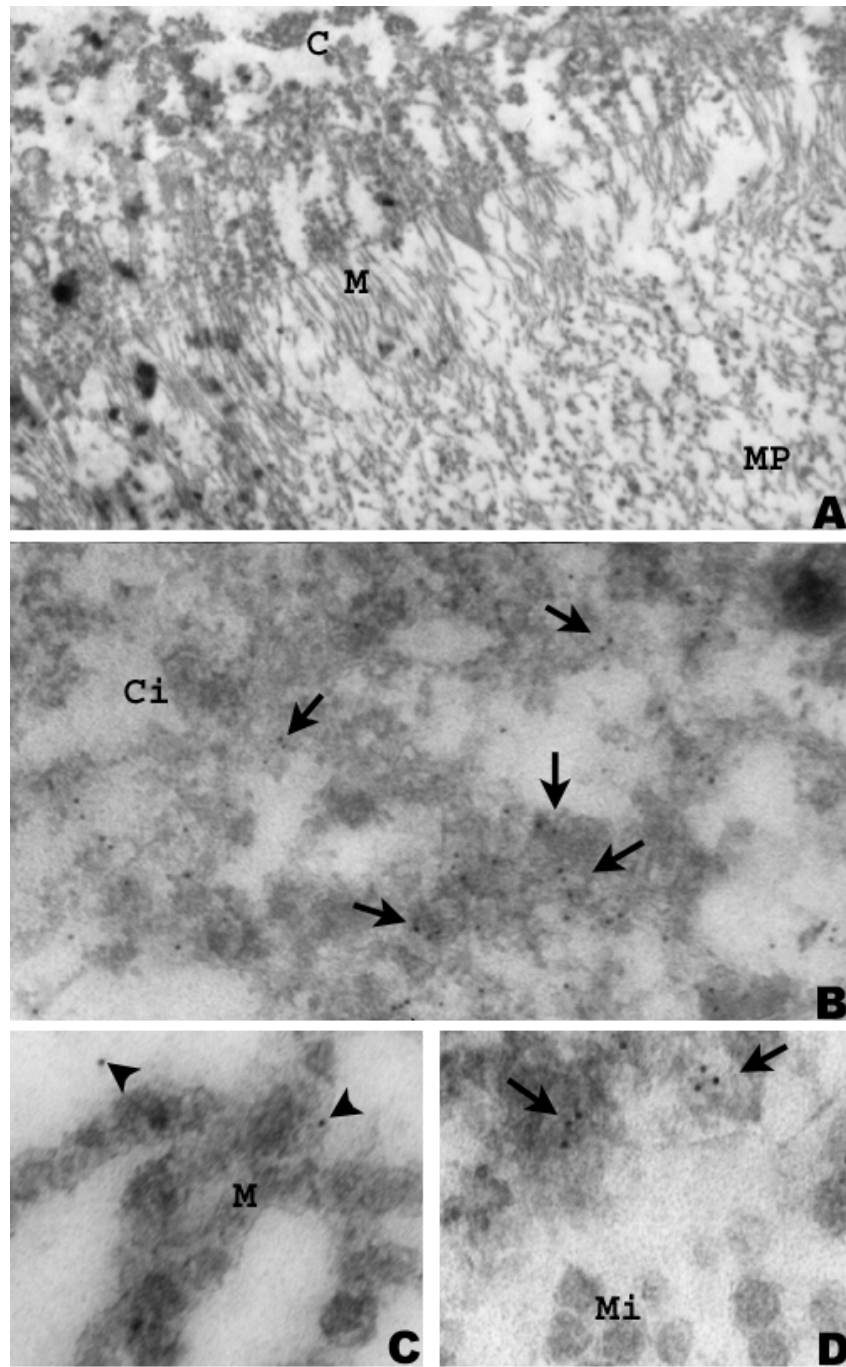


Figura 11. Imunolocalização de peritrofinas em células do intestino médio de *Centris* (*Melanocentris*) sp (Centridini). A. Secção tangencial do epitélio intestinal. 4500x. B. Secção tangencial de uma célula da região média do intestino demonstrando o citoplasma apical com marcações em abundância. 48500x. C. Secção longitudinal demonstrando poucas marcações em microvilosidades e no espaço ectoperitrófico de célula da região posterior do intestino. 51300x. D. Secção tangencial de célula digestiva da região média demonstrando o citoplasma apical com marcações. 51300x. C = célula; Ci = citoplasma; MP = membrana peritrófica; Mi = agregado de mitocôndrias.

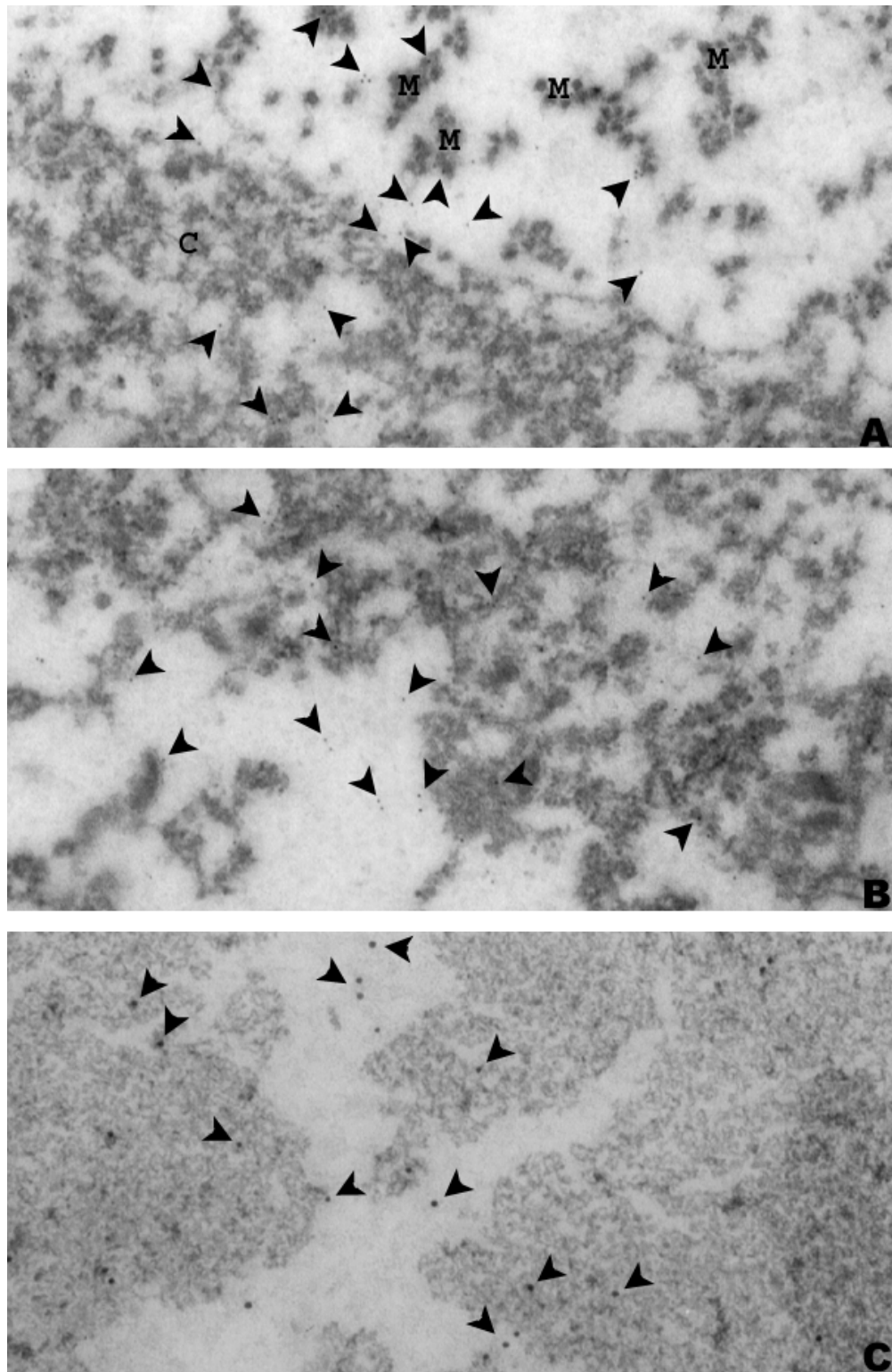


Figura 12. Imunolocalização de peritrofinas no intestino médio de *Epicharis flava* (Centridini). A. Secção tangencial da porção apical de uma célula da região anterior do intestino demonstrando marcações em vesículas situadas abaixo da membrana plasmática, nas microvilosidades e no espaço ectoperitrofrico. 32200x. B. Secção tangencial da porção mediana de uma célula região média do intestino, demonstrando marcações. 32000x C. MP da região média do intestino demonstrando marcações. 75400x. Cabeça de seta = marcações. M = microvilosidades; C = célula.

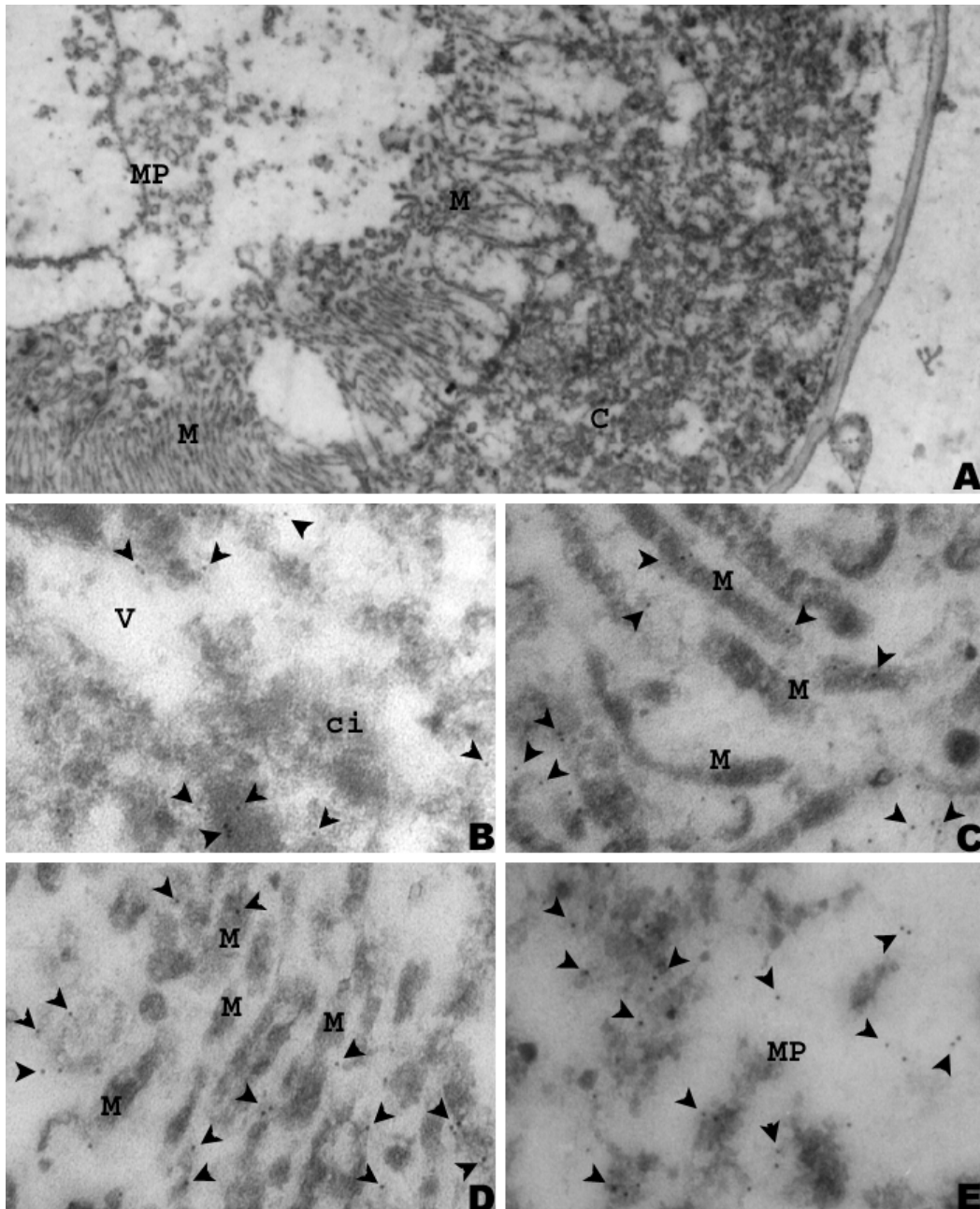


Figura 13. Imunolocalização de peritrofinas em células digestivas do intestino médio de *Augochlora* sp (Halictidae). A. Secção transversal demonstrando o epitélio do intestino médio com células baixas e longas microvilosidades. 6500x. B. Secção tangencial da porção basal de uma célula da região média do intestino demonstrando poucas marcações. 33000x. C-D. Secções longitudinais da porção apical de uma célula da região média do intestino demonstrando marcações dispersas nas microvilosidades e no espaço ectoperitrófico. 33000x. E. MP demonstrando marcações. 33000x. Cabeça de seta = marcações; MP = membrana peritrófica; M = microvilosidade; C = célula; Ci = citoplasma, V = vesícula.

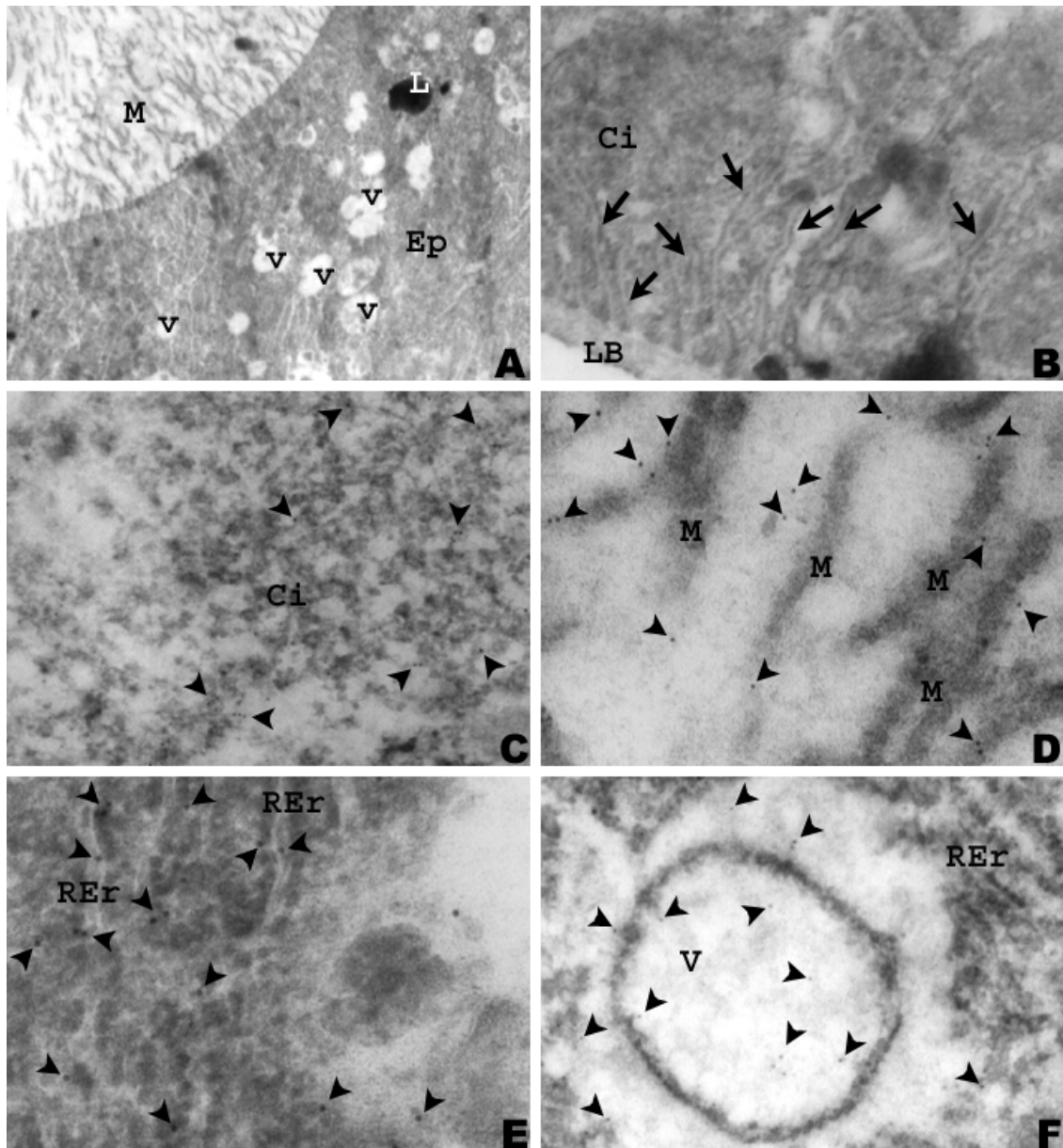


Figura 14. Imunolocalização de peritrofinas em células digestivas da região média do intestino médio de *Megachile* sp. (Megachilidae). A. Secção tangencial do epitélio intestinal demonstrando diversas vesículas e longas microvilosidades. 3000x. B. Porção basal de uma célula da região posterior do intestino, em secção tangencial, demonstrando invaginações da membrana plasmática (setas) e praticamente ausência de marcação nesta região. 22000x. C. Secção tangencial de uma célula da região média do intestino demonstrando o citoplasma apical, próximo à membrana plasmática, com marcações. 22000x. D. Secção longitudinal demonstrando marcações nas microvilosidades e no espaço ectoperitrotrófico entre estas. 33000x. E. Secção tangencial de uma célula da região média do intestino demonstrando marcações na região do retículo endoplasmático e em vesículas. 51300x. F. Vesícula com seu interior demonstrando uma anelação granular e diversas marcações dispersas. 22000x. Cabeça de seta = marcações; MP = membrana peritrotrófica; M = microvilosidade; Ep = epitélio; Ci = citoplasma; RER = retículo endoplasmático rugoso; V = vesícula.

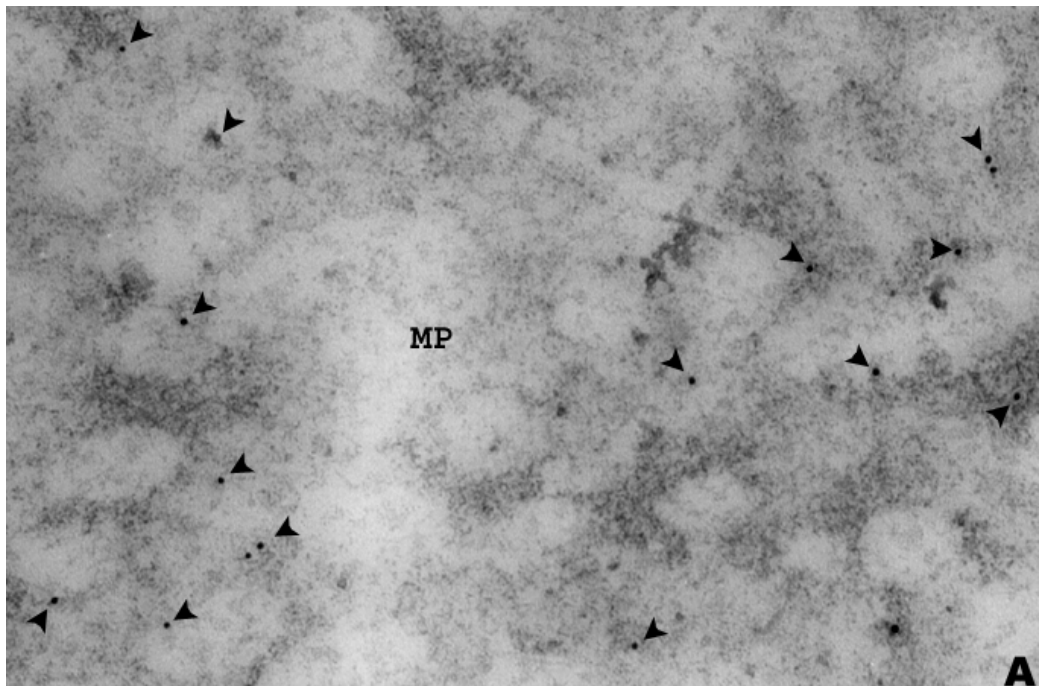


Figura 15. Secção tangencial da membrana peritrófica (MP) de *Megachile* sp. (Megachilidae) demonstrando marcações positivas (cabeça de seta). 75400x.

Em *Oxaea flavescens* os resultados também foram positivos para imunolocalização de peritrofinas ao longo do epitélio do intestino médio. As marcações foram observadas regularmente no citoplasma da célula e próximas ao retículo endoplasmático rugoso e em vesículas na sua periferia (Figura 16 A). Também foram encontradas marcações nas microvilosidades e no espaço ectoperitrófico e na MP (Figuras 16 B e 17).

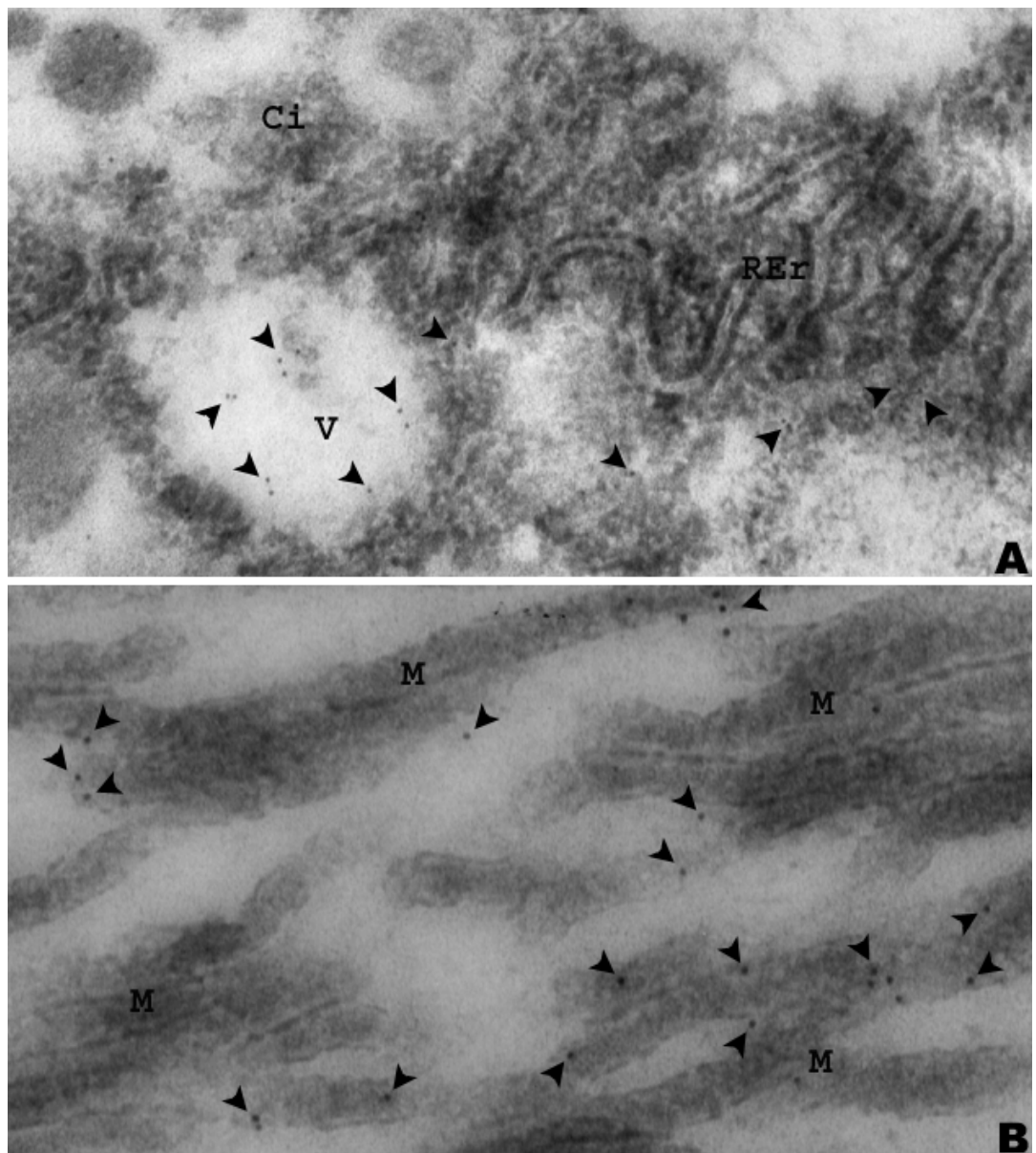


Figura 16. Imunolocalização de peritrofinas em células do intestino médio de *Oxaea flavescens* (Andrenidae). A. Secção tangencial de uma célula da região média demonstrando marcações em uma grande vesícula e também em vesículas menores próximas ao retículo endoplasmático rugoso. 48500x. B. Secção longitudinal das microvilosidades demonstrando marcações. 75400x. Cabeça de seta = marcação; Ep = epitélio; M = microvilosidades; Ci = citoplasma; REr = retículo endoplasmático rugoso; V = vesícula.

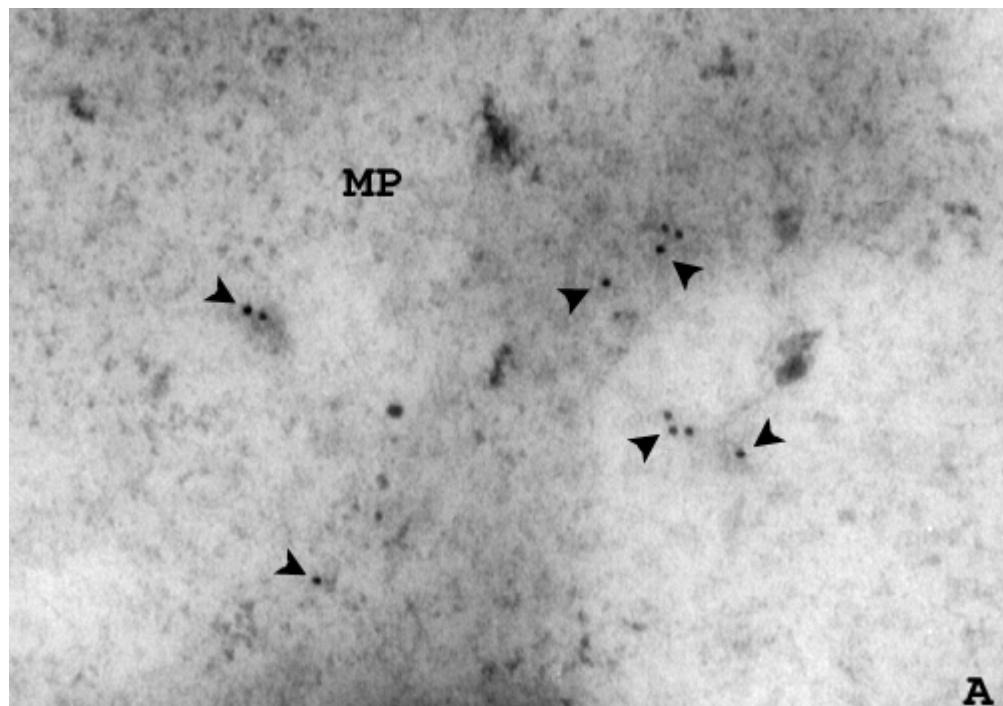


Figura 17. Imunolocalização de peritrofinas (cabeças de seta) na membrana peritrófica (MP) de *Oxaea flavescens* (Andrenidae). 75400x.

4. DISCUSSÃO

A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou o perfil das proteínas da MP e do epitélio de larvas e abelhas adultas *M. quadrifasciata anthidioides*. Pode-se notar nas amostras de proteínas da MP de larvas extraídas com uréia a presença de duas bandas, sendo uma com aproximadamente 55 k e outra com 27 k. Possivelmente, a peritrofina estimada com 55 k é formada por dois dímeros de aproximadamente 27 k que se dissociaram e expressaram-se de forma marcante em *A. mellifera*.

Os resultados do Western Blotting indicam que em *M. quadrifasciata anthidioides* e *A. mellifera* a quantidade das duas peritrofinas encontradas são diferentes, havendo predomínio da peritrofina 55 k em Meliponini e da peritrofina 27 k em Apini. Entretanto, o significado funcional desta diferença é desconhecido.

Amostras de proteínas contendo peritrofina, extraídas da MP de larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* com auxílio de uréia foram utilizadas para a produção dos anticorpos anti-peritrofina. Estes foram utilizados em imunocitoquímica e foram eficientes em demonstrar a presença da peritrofina de forma regular ao longo de todo o comprimento do epitélio do intestino médio de todas as espécies estudadas neste trabalho. Estudos realizados nos dípteros *Lucilia cuprina* (ELVIN *et al.*, 1996; SCHORDERET *et al.*, 1998), *Anopheles gambiae* (SHEN e JACOBS-LORENA, 1998) e no lepidóptero *Trichoplusia ni* (WANG e GRANADOS, 1997) já foram conduzidos similarmente com intuito de isolar e produzir anticorpos anti-peritrofinas da MP. Entretanto, entre abelhas este é um estudo inédito e que pode trazer um desfecho ao impasse sobre a origem da MP na ordem Hymenoptera.

Nas abelhas a presença e a estrutura da MP já foram descritas por diversos autores (SNODGRASS, 1956; KÜMMEL, 1956; VECHI e BRAGAGLIA, 1965; DAVIDSON, 1970; MELLO *et al.*, 1971; CRUZ-LANDIM e MELLO, 1981). De acordo com estes autores a MP em *A. mellifera* é formada constitutivamente por todas as células do ventrículo ou intestino médio e pode consistir em uma ou até 20 camadas concêntricas e finas, dispostas em estratos irregulares. Entretanto, CRUZ-LANDIM (1985) em *A. mellifera* e SERRÃO e CRUZ-LANDIM (1996) em *M. quadrifasciata anthidioides*, sugeriram que MP é formada por uma banda de células que envolvem a

válvula estomodeal e por células da cárdia, respectivamente. Observações ultra-estruturais de JIMENEZ e GILLIAM (1990) suportam a idéia original de que a MP em *A. mellifera* surge a partir das células do intestino médio e que a secreção dos constituintes desta estrutura é maior na região anterior do que na região posterior.

Estudos recentes utilizando-se anticorpos anti-peritrofinas, produzidos a partir de peritrofinas da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, sugeriram através de técnicas imunohistoquímicas que em larvas desta espécie a MP tem origem a partir das células do intestino médio (MARQUES-SILVA *et al.*, 2005). Sendo assim, o presente trabalho vem complementar o trabalho anterior sugerindo que em abelhas adultas da mesma espécie a MP é produzida pelas células digestivas do intestino médio. Além disso, pode-se sugerir o mesmo para as demais espécies de abelhas analisadas.

As marcações foram encontradas dispersas no citoplasma em vesículas de vários tamanhos e em maior abundância naquelas próximas ao ápice celular, a partir de onde possivelmente dirigem-se para a membrana plasmática e/ou para as microvilosidades, onde seriam descarregadas via secreção microapócrina. As peritrofinas em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), cuja MP pertence ao tipo I, são liberadas via secreção microapócrina através de pequenas vesículas na borda estriada (BOLOGNESI *et al.*, 2001).

As marcações em vesículas foram mais abundantes no ápice das células e ao longo do comprimento das microvilosidades, e ainda no espaço entre as microvilosidades, ou seja, no espaço ectoperitrófico junto ao glicocálix. Em *Lucilia cuprina* (Diptera) estudos semelhantes com relação à produção de anticorpos anti-peritrofinas identificaram uma peritrofina-15k que é sintetizada somente pelas células da cárdia. Os autores sugerem que as vesículas que transportam esta peritrofina se fundem com a membrana plasmática situada entre duas microvilosidades e liberam seu conteúdo, via exocitose. Sendo assim, os autores não encontraram nenhuma evidência de que as vesículas são conduzidas dentro das microvilosidades (EISEMANN *et al.*, 2001). Entretanto, foram observadas pequenas vesículas contendo peritrofinas nas microvilosidades tanto nas células da cárdia como nas células digestivas do intestino médio de todas as espécies de abelhas analisadas. Além disso, as proteínas secretórias seguem a rota clássica de síntese, ou seja, síntese no retículo endoplasmático rugoso, processadas no aparelho de Golgi, contidas

em vesículas intermediárias e depois liberadas através de vesículas de secreção (LEHANE, 1976, 1989; JORDÃO *et al.*, 1996).

As marcações para as peritrofinas encontradas associadas ao retículo endoplasmático rugoso e em sua periferia são possivelmente derivadas desta organela. Em *L. cuprina* (Diptera) a peritrofina-15 foi localizada em pequenas vesículas intimamente associadas às organelas como retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi, sugerindo que estas foram responsáveis pela síntese da peritrofina-15 (EISEMANN *et al.*, 2001). Sendo assim, nas amostras do intestino médio das abelhas que demonstraram vesículas contendo peritrofinas nas proximidades de organelas responsáveis pela síntese de proteínas podem sugerir que após serem sintetizadas, essas peritrofinas são transportadas via vesículas de secreção para serem liberadas no espaço ectoperitrófico e, então, tomarem parte na formação da MP, juntamente com os demais componentes desta estrutura. SNODGRASS (1956) observou em células digestivas do ventrículo de *Apis mellifera* que durante a atividade de secreção celular, uma camada gelatinosa preenchida com corpos descarregados pelas mesmas contém enzimas digestivas. Além disso, podemos sugerir que corpos remanescentes das células digestivas como vesículas, também podem estar transportando componentes da MP de acordo com as descrições observadas neste trabalho tanto em *M. q. anthidioides* como nas demais espécies.

5. CONCLUSÃO

As evidências apresentadas através da imunolocalização de peritrofinas da membrana peritrófica (MP) no epitélio do intestino médio, na MP de abelhas adultas e nas células da região da cárdia nas abelhas da tribo Meliponini demonstraram que esta estrutura é sintetizada por todas as células do intestino médio, incluindo as células da cárdia, órgão este presente em abelhas da tribo Meliponini. De acordo com as marcações os sítios de produção das peritrofinas nas células intestinais podem indicar que estas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, processadas nas membranas do aparelho de Golgi e posteriormente seguem por meio de vesículas de secreção para serem liberadas através da membrana plasmática e microvilosidades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGLAS, M.J. Observations sur les métamorphoses internes de la guêpe et de l'abeille. **Bull. Sci. Fr. Et Belg.**, v. xxxiv, 1901.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOLOGNESI, R.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 47, p. 62-75, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 24-254, 1976.
- CHAPMAN, R.F. 1998. **The Insects. Structure and function.** 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- CRUZ-LANDIM, C. Origin of the peritrophic membrane of adult *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 207-219, 1985.
- CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, R.A. Desenvolvimento e envelhecimento de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Aspectos histológicos e histoquímicos. In: Anais do Simpósio Anual, 4, São Paulo. **Aciesp.** São Paulo, v. 31, p.p. 1-118, 1981
- DAVIDSON, E.W. Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). **J. Invert. Pathol.**, v. 15, p. 451-454, 1970.
- EISEMANN, C.H.; WIJFFELS, G.; TELLAM, R.L. Secretion of type 2 peritrophic matrix protein, peritrophin-15 of from the cárdia. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 47, p. 76-85, 2001.
- ELVIN, C. *et al.* Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*: cDNA and deduced amino acid sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 8925-8935, 1996.
- GREEN, T.L. The anatomy and histology of the alimentary canal in the common wasp (*Vespa vulgaris*). **Proc. Zool. Soc.**, p. 1041-66, 1931.
- HASSANEIN, M.H. Studies on the normal and pathological histology of the alimentary canal of the honey-bee *Apis mellifera* L. **Bull. Soc. Fouad. 1^{er} Entom.**, v. 8, p. 345-357, 1953.

- JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and nonspecific esterase. **Cell Tiss. Res.**, v. 261, p. 431-443, 1990.
- JORDÃO, B.P.; LEHANE, M.J.; TERRA, W.R. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEHANE, M.J. Digestive enzyme secretion in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Cell Tissue Res.**, v. 170, 275-287, 1976.
- MARQUES-SILVA, S.; SERRÃO, J.E.; MEZÊNCIO, J.M.S. Peritrophic protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: immunolocalization of secretory sites. **Acta Histochem.**, v. 107, p. 23-30, 2005.
- MARTINS, G.F.; NEVES, C.A.; CAMPOS, L.A.O.; SERRÃO, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, p. 161-168, 2006.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; VALDRIGHI, L. The larval peritrophic membrane of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera Apoidea). **Protoplasma**, v. 73, p. 349-365, 1971.
- MERCER, E.H.; DAY, M.F. The fine structure of peritrophic membrane of certain insects. **Biological Bull**, v. 103, p. 383-394, 1952.
- NELSON, J.A. Morphology of the honeybee larva. **J. Agric. Res.**, v. 28, p. 1167-1272, 1924.
- PAVLOVSKY, E.N.; ZARIN, E.J. On the structure of the alimentary canal and its ferments in the Bee (*Apis mellifera*, L.). **Quart. Journ. Micr. Sci.**, v. lxvi, 1922.
- PEIXOTO, E.B.M.I.; SERRÃO, J.E. A comparative study of the cardia and cardiac valves in corbiculate bees (Hymenoptera, Apinae). **Sociobiology**, v. 37, n. 3B, p. 707-721, 2001.
- PETERS, W. Peritrophic membranes. **Zoophysiol. Series**, v. 30. 238 p, 1992.
- RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. **Ann. Rev. Ent.**, v. 22, p. 219-240, 1977.

- SCHORDERET, S. *et al.* cDNA and deduced amino acid sequences of a peritrophic membrane glycoprotein, 'peritrophin-48', from the larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, p. 99-111, 1998.
- SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C. A specialized midgut region in stingless bees midgut (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Biocell**, v. 20, p. 227-234, 1996.
- SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. A type I peritrophic matrix protein from the vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17665-17670, 1998.
- SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey Bee**. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, 1956. 334 p.
- SNODGRASS, R.E. **Principles of Insect Morphology**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1935. 667 p.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C. ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.
- SWINGLE, M.C. The alimentary tract of the common bumble-bee. **Ohio Journ. Sci.**, v. xxxvii, 1927.
- TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G. & WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p. 87-101, 1999.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: **Biology of the Insect Midgut**. Ed. Lehane M.J. & Billingsley, P.F. London: Chapman & Hall, 1996. p. 206-235.
- VECCHI, M.A.; BRAGAGLIA, M.M. Osservazioni preliminary sull'ultrastruttura del mesointestino dell'ape mellifica (*Apis m. linguistica* Spin.). **Zrch. Aool. Italiano**, v. 50, p. 19-24, 1965.
- WANG, P.; GRANADOS, R.R. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 16663-16669, 1997.
- WIGGLESWORTH, V.B. The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. **Q.J. Microsc. Sci.** v. 73, p. 593-616, 1930.
- WINGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. 7. ed. London: Methuen, 1972.
- ZIMMERMANN, U.; MEHLAN, D.; PETERS, W. Investigations on the transport function and structure of peritrophic membranes; V – Amino acid analysis

and electron microscopic investigations of the peritrophic membranes of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 51, p. 181-186, 1975.

CONCLUSÕES GERAIS

A ultra-morfologia da MP em abelhas demonstrou características distintas entre as espécies analisadas. Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponini) a MP é composta por duas camadas, sendo que a face ectoperitrófica, voltada para o epitélio intestinal, apresentou desenhos hexagonais em sua superfície e a face endoperitrófica, voltada para o lúmen, apresentou-se enrugada. Em *Nannotrigona* sp. (Meliponini) a MP apresentou a face endoperitrófica aspectos de fragmentos irregulares sobrepostos. Em *Apis mellifera* (Apini), *Centris (Melanocentris)* sp. (Centridini), *Epicharis flava* (Centridini) a MP apresentou aspecto lamelar. Em *Megachile* sp. (Megachilidae) e *Oxaea flavescens* (Andrenidae). A MP apresentou aspecto de uma massa densa formando projeções irregulares na face endoperitrófica. A análise ultra-estrutural sobre a origem da MP demonstrou sítios de produção das peritrofinas em todas as células do intestino médio, incluindo as células da cárdia nas abelhas da tribo Meliponini. Sendo assim, em todas as espécies analisadas da família Apidae a MP é produzida somente pelas células digestivas do intestino médio, sendo classificada como tipo I. Exceto a MP em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae: Meliponini), *Frieseomelita varia* (Apidae: Meliponini) a MP possui duas origens, tanto pelas células digestivas do intestino médio, MP tipo I, quanto pelas células da região da cárdia, MP tipo II.