

**CAROLINA GONÇALVES SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DAS PAPILAS RETAIS EM  
ABELHAS (HYMENOPTERA, APIDAE)**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

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

T

S237d  
2008

Santos, Carolina Gonçalves, 1985-

Desenvolvimento pós-embriônico das papilas retais em  
abelhas (*Hymenoptera, Apidae*) / Carolina Gonçalves  
Santos. – Viçosa, MG, 2008.  
vii, 33f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 30-33.

1. *Melipona quadrifasciata* - Aparelho digestivo.
  2. *Melipona scutellaris* - Aparelho digestivo.
  3. Órgãos excretórios.
  4. Microscopia eletrônica - Técnica.
  5. Fotomicrografia. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22.ed. 573.37

**CAROLINA GONÇALVES SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DAS PAPILAS RETAIS EM  
ABELHAS (HYMENOPTERA, APIDAE)**

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

**APROVADA: 30 de junho de 2008**

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-Orientador)

---

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Luciane C. de Oliveira Lisboa

---

Prof. Dejair Message

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Orientador)

## PARTIDA

Sem hora, sem traço  
Seguir é preciso  
Pra onde não sei

Caminhando, parando  
Refletindo no tempo  
Temperando a vida  
Com pensar e desejar  
Seguindo a trilha  
Sei que é preciso chegar  
Aonde não sei

(Naka)

Ao tio Mário (*in memoriam*) e tia Naka, dedico. Vocês são os pilares da minha vida. Obrigada pelo exemplo de vida!

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar e dar forças para vencer obstáculos e seguir em frente.

Ao Departamento de Biologia Geral e à Universidade Federal de Viçosa pelas oportunidades oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À minha família, tia Naka, tio Mário (*in memoriam*), Marco, Flávio por me aceitarem na família e me tornarem parte dela, apresentando um mundo novo cheio de oportunidades e alegrias. Tia, obrigado por ser uma mãe para mim, pelos cuidados, amor, atenção. Sempre serei grata a tudo que você fez e continua fazendo por mim. Nunca chegaria até aqui sem vocês. Amo muito todos vocês.

A meu orientador Professor José Eduardo Serrão: pela amizade, compreensão, paciência, confiança, pelo exemplo. “Um abraço especial ao querido mestre, que com tanto carinho transmitiu-me o seu saber, tornando-me seu amigo e colega de profissão”.

Ao Professor Clóvis Andrade Neves pelo auxílio e dedicação na realização de parte deste trabalho.

Ao Professor Lucio Antonio de Oliveira Campos pelo auxílio na criação das abelhas, pelos conselhos em momentos de dúvida.

À Professora Silvia das Graças Pompolo por sempre me receber bem no laboratório de Citogenética de Insetos, sendo sempre acessível.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (CCB/UFV), e a coordenadora técnica Dra. Cláudia Alencar Vanetti, pela disposição dos equipamentos e auxílio na realização de parte desse trabalho.

A todos do laboratório de Histologia pela amizade, disponibilidade e ensinamentos.

Aos professores e amigos da Biologia Celular e Estrutural.

Aos funcionários do Apiário, Íris e Geraldo por sempre estarem dispostos a ajudar no manuseio das abelhas.

Aos amigos e colegas de laboratório, sempre presentes em todos os momentos, alegres ou tristes, pela palavra de carinho, suporte, incentivo: Juliana, Fabíola, Luiza, Katiane, Mariana, Cirlei, Solange, Paula, Gustavo, Edmilson, Luiza Carla, Wagner, Stéphanie, Débora, Douglas.

À Margarete pelas ótimas horas compartilhadas, no laboratório, em casa, e nos momentos de folga. Amiga obrigada por tudo, você me ajudou muito!

A Riviane por tudo! Amiga, você é MARA!

A Mércia pelo carinho.

A Dihego e Marina, pela amizade e pelas noites de jogos de baralho que ajudaram a descontrair. Valeu!

A Madu, pela amizade, carinho e importante apoio na correção deste trabalho.

Às amigas de república Rutênia, Yukari, Jaqueline, Miti. Ru, obrigada pela companhia durante todo esse tempo.

À família viçosense: Miriam, Gilberto, Elizabeth, Carlos.

Às secretárias do DBG, Beth, Diane e Salvadora e a Monteiro, pelo apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	6
RESULTADOS.....	10
DISCUSSÃO .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## RESUMO

SANTOS, Carolina Gonçalves. M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Desenvolvimento pós-embrionário das papilas retais em abelhas (Hymenoptera, Apidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Lucio Antonio de Oliveira Campos

Embora existam muitos trabalhos sobre a morfologia e desenvolvimento do sistema digestivo dos insetos, pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento das papilas retais, estruturas presentes no reto responsáveis pela absorção de água e sais que contribuem para a homeostase do inseto. Comumente são encontradas seis papilas distribuídas radialmente na região proximal do reto, sendo estas compostas de três tipos celulares: as células principais, voltadas para o lúmen, as células basais, e as células juncionais. Entre as células principais e basais há um lúmen intrapapilar. Este trabalho teve por objetivo descrever o processo de formação das papilas retais durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona scutellaris*. Foram analisadas operárias adultas e pupas em diferentes fases do desenvolvimento. Nessas abelhas a papila retal começa a ser formada na pupa de olho branco com 54 horas de idade, apresentando-se como um espessamento do epitélio. Na pupa de olho rosa ocorre a formação da camada de células basais, que está completamente formada ao final do desenvolvimento da pupa de olho marrom. Nesta fase inicia-se o processo de formação do lúmen intrapapilar e o posicionamento das células juncionais, que ficam em contato com o epitélio do reto e as células principais. Durante as fases de desenvolvimento são observadas inúmeras figuras mitóticas em todo o reto, sugerindo que a formação da papila se dê por proliferação, morte e diferenciação celular a partir da parede do reto portanto, sendo de origem completamente ectodérmica.

## ABSTRACT

SANTOS, Carolina Gonçalves. M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, June 2008. **Post-embryonic development of rectal pads in bees (Hymenoptera, Apidae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves and Lucio Antonio de Oliveira Campos

The morphology and development of the digestive tract of the insects has been extensively studied, but little attention was given to the development of the rectal pads. These are rectal organs responsible for the water and salts absorption. There are usually six ovoid rectal pads located in the median-anterior portion of the rectum of insects. Rectal pad has three cell types: principal, basal and junctional cells. The arrangements of these three cell types delimit an intrapapillar lumen. The aim of this work is to describe the development of the rectal pads during the post-embryonic development of *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Melipona scutellaris*. Specimens were analyzed at the following developmental stage: white eyed, pink eyed, brown eyed and black eyed pupae and adult workers. The development of the rectal pad begins as a thickening of the epithelium in white eyed pupa with 54 hours old. In this stage, there is neither basal cells layer nor the intrapapillar lumen. In the pink eyed pupa the basal layers begin to form and are completely formed at the end of the brown eyed pupa development. In brown eyed pupa stage, the intrapapillar lumen is formed and the junctional cells, which connect the rectal epithelium to the principal cells, are positioned and completely differentiated. Cell death, cell proliferation and a large number of mitotic cells were detected in the whole rectum during pupa development, suggesting that the development of the rectal pads involves cell proliferation, death and differentiation. The origin of the rectal pads is only ectodermic.

## INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os Hymenoptera representam a terceira maior ordem de insetos em relação ao número de espécies descritas (Borror *et al.*, 1992) e compreendem as vespas, formigas e abelhas. Estes insetos são importantes na manutenção de diversos ecossistemas atuando como pragas, inimigos naturais, parasitóides, predadores que podem ser utilizadas para controle biológico e polinizadores.

Um terço da produção mundial de alimentos depende da polinização feita por animais, sendo que as abelhas são responsáveis por 38% da polinização das plantas floríferas, sendo portanto um dos importantes agentes polinizadores, sendo que tal atividade é mais importante do que a produção de mel, cera, própolis e outros produtos da colméia utilizados no consumo humano (Michener, 2000). A FAO (Food and Agricultural Organization) estima que a perda anual de produção agrícola por falta de polinização é de 65 bilhões de dólares (citado por Kerr *et al.*, 2001).

A redução do número de espécies de Hymenoptera está relacionada com a fragmentação ou destruição ambiental. Dada a importância destes insetos para a manutenção de ecossistemas, é necessário o estudo detalhado desses visando sua preservação. O conhecimento de características fisiológicas e morfológicas do sistema digestivo dos Hymenoptera é importante para a compreensão de aspectos comportamentais e evolutivos desses insetos, a despeito disso, estudos a esse respeito são escassos.

O sistema digestivo das abelhas é dividido em três regiões principais: estomodeu, ventrículo e proctodeu. O estomodeu é representado pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo. O ventrículo possui uma região anterior diferenciada, a cárdia, enquanto o proctodeu está representado pelo

intestino fino e pelo reto (Snodgrass, 1956; Caetano, 1984, 1988; Cruz-Landim, 1994; Serrão & Cruz-Landim, 1995). O estomodeu possui origem ectodérmica e geralmente apresenta epitélio simples pavimentoso, que não está envolvido com absorção ou secreção de enzimas digestivas e é coberto por uma cutícula voltada para o lúmen. (Snodgrass, 1935; Chapman, 1998; Nation, 2002).

O ventrículo possui origem endodérmica e apresenta epitélio envolvido na produção e secreção de enzimas digestivas, assim como absorção de nutrientes, funções realizadas pelas células principais. Além dessas células, essa região do canal alimentar possui células endócrinas, envolvidas na regulação da produção enzimática e ninhos de células regenerativas, que repõem as células que se desgastam. Não há presença de cutícula, mas de um envelope protéico denominado membrana peritrófica (M.P.). A membrana peritrófica é formada por uma malha de microfibrilas de quitina embebidas numa matriz de proteínas e glicoproteínas, produzida pelas células epiteliais ao longo do ventrículo ou por células especializadas próximas ao proventrículo. A M.P. possui várias funções, dentre as quais compartimentalização da digestão e da absorção, e proteção do epitélio digestivo contra danos químicos e físicos (Chapman, 1998; Marques-Silva *et al.*, 2005).

O proctodeu é de origem ectodérmica e é diferenciado em intestino fino e reto, cujas células epiteliais com morfologia variada estão arranjadas em uma só camada e apresentam o lúmen revestido por cutícula (Nation, 2002).

A principal função do proctodeu é absorção de água e sais da urina e das fezes contribuindo para o controle osmótico do inseto. Estruturas especializadas na absorção de água e sais da urina e das fezes podem ser encontradas no intestino fino de algumas poucas espécies de insetos, embora na maioria das espécies sua

ocorrência seja relatada no reto, onde são denominadas papilas ou glândulas retais (Wigglesworth, 1932; Chapman, 1998). O principal sítio de absorção de água e eletrólitos é o reto, que apresenta epitélio com células achatadas, exceto nas regiões das glândulas retais, nas quais as células epiteliais são cilíndricas e apresentam modificações estruturais relacionadas com a absorção, destacando-se, a presença de microvilosidades e invaginações da membrana plasmática basal associadas à mitocôndrias. Também já foram localizadas enzimas relacionadas com essas funções como a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, envolvida na excreção e osmoregulação, e presente na membrana basolateral das papilas retais de *Ischnura elegans* (Odonata, Coenagrionidae) (Chapman, 1998; Khodabandeh, 2006).

Dentre os órgãos retais as glândulas retais possuem duas formas principais: oval ou alongada que podem ser compactas ou ocas. As ovais são semelhantes a um simples espessamento do epitélio do reto, sendo conhecidas como “almofadas retais” (rectal pads). As alongadas apresentam-se como projeções cônicas do epitélio do reto sendo denominadas “papilas retais” (rectal papillae). O termo papila retal é utilizado no lugar de glândula retal, uma vez que este último pode levar a interpretações errôneas a respeito da função da estrutura em questão (Snodgrass, 1935; Garayoa *et al.*, 1999; Serrão *et al.*, 2004).

Em abelhas, variações no modelo básico dessas estruturas também podem ser encontradas, sendo descritas papilas fusiformes, ovais ou esféricas, variando entre as espécies (Ferreira & Cruz-Landim, 1969; Serrão *et al.*, 2004). Algumas espécies de formigas da subfamília Myrmicinae apresentam três papilas retais de igual tamanho, enquanto em *Myrmica rubra* (Myrmicinae) há um par de papilas iguais e uma outra é localizada numa região mais anterior do reto. Machos da formiga *Atta capiguara* (Myrmicinae) possuem variações na quantidade dessas

estruturas podendo apresentar três ou quatro papilas que também apresentam diferenças de tamanho entre si (Caetano, 1984).

Nos Apoidea, normalmente são encontradas seis papilas retais arranjadas radialmente. A cutícula que recobre as papilas retais é fina se comparada com o restante do reto, exceto na região de comunicação entre a papila e o epitélio do reto (Chapman, 1998).

Em espécies que apresentam papilas retais, a parede do reto não possui grande participação na absorção de íons e fluidos (Snodgrass, 1935; Berridge & Gupta, 1967; Chapman, 1998; Garayoa *et al.*, 1999). Contudo, em espécies que não apresentam tais estruturas, é possível notar no epitélio do reto, características relativas à absorção de substâncias semelhantes às encontradas nas células das papilas retais. Dentre essas, podem ser destacadas a presença de invaginações da membrana plasmática basal associadas a mitocôndrias e microvilosidades. Essas características indicam uma maior participação desse epitélio na absorção, na ausência das papilas retais (Noirot & Noirot-Timothee, 1971). Cada papila retal é formada por uma camada de células exceto em Neuroptera, Lepidoptera e Hymenoptera onde são observadas duas camadas celulares (Chapman, 1998). Nestes insetos, as papilas são formadas pelas células principais, por um conjunto de células altas e estreitas que formam uma bainha ao redor das principais e uma camada de células basais que isolam as principais da hemocele (Noirot *et al.*, 1979).

Em *Apis mellifera* há uma camada de células principais, e duas camadas de células basais (Snodgrass, 1956). Variações desse padrão foram descritas para outras abelhas (Ferreira & Cruz-Landim, 1969; Serrão *et al.*, 2004).

Embora existam estudos sobre a morfologia e fisiologia do reto (Berridge & Gupta, 1967; Ferreira & Cruz-Landim, 1969; Noirot & Noirot-Timothee, 1971; Nicolson & Louw, 1982; Bradley, 1985; Garayoa *et al.*, 1999), poucos trabalhos descrevem o desenvolvimento das papilas retais.

A origem dessas camadas foi estudada por Evenius (1933) em *Vespa vulgaris* e por Dobrovsky (1951) em *Apis mellifera*. Contudo não há consenso sobre essa origem. Segundo Evenius (1933), as camadas basais teriam origem nas células presentes na cavidade corporal, que num dado momento do desenvolvimento se agrupariam sob as células principais formando a papila retal. As papilas retais teriam então uma origem mesodérmica e ectodérmica. Por outro lado, Dobrovsky (1951) sugere a origem completamente ectodérmica dessa estrutura, uma vez que a camada de células basais seria formada a partir do próprio epitélio do reto, juntamente com as células principais, durante o desenvolvimento da pupa, num período de aproximadamente onze dias. Embora esse autor tenha descrito estruturas denominadas corpos cromáticos como sendo precursores das células da camada basal, a completa estrutura e formação desses ainda não foi esclarecida (Dobrovsky, 1951).

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho é descrever o processo de formação das papilas retais durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Melipona scutellaris* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, na tentativa de esclarecer as dúvidas existentes a respeito da formação dessas estruturas nestes insetos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

Neste trabalho foram utilizadas operárias de *Melipona scutellaris* Latreille e *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, fornecidas pelo Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, em diferentes estágios do desenvolvimento (larva, pupa e adulto). As pupas por sua vez foram divididas em quatro estágios: olho branco, rosa, marrom e preto.

Com base em resultados preliminares obtidos, favos contendo larvas de quarto instar pós defecante foram coletados diretamente das colônias, mantidos em placas de Petri a 28°C e observados constantemente para determinação da hora da muda das pupas de olho branco. Após a muda, as pupas de olho branco foram dissecadas em intervalos de seis horas durante um período total de 96 horas. Pupas de olho rosa também foram mantidas em estufa e dissecadas em intervalos de 24 horas durante aproximadamente 72 horas. As pupas de olho rosa, marrom e preto foram obtidas diretamente das colônias para facilitar a análise.

### **MÉTODOS**

#### **Histologia**

Para análises histológicas os animais foram imobilizados em placas de dissecação, e embebidos em solução fisiológica para insetos para a dissecação do reto. As peças foram fixadas por 24 horas em solução Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967), desidratadas em gradiente de etanol, embebidas em historesina e seccionadas a 4 µm de espessura. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina ou azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan<sup>®</sup>, observadas e fotografadas com fotomicroscópio Olympus BX60.

## **Histoquímica**

Retos de pupas de olho branco, rosa, marrom e preto foram submetidos à reação de Feulgen para evidenciar o DNA. As peças foram fixadas em Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) e lavadas em água destilada por cinco minutos. Após lavagem foram submetidas a hidrólise ácida em ácido clorídrico 5M por 25 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água e coradas com reagente de Schiff por uma hora. Posteriormente os retos foram lavados em água sulfurosa (ácido clorídrico 1M, água destilada, metabissulfito de sódio a 10%). Seguiu-se desidratação em gradiente de etanol e inclusão em historesina Leica. Os cortes com 5 µm de espessura foram contrastados com Light Green a 10% (Pearse, 1953), as lâminas foram montadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX60.

## **Deteccão de proliferação celular**

A deteção de proliferação celular foi investigada utilizando-se kit anti-bromodeoxiuridina (BrdU) (Boehringer-Mannheim).

Os retos de pupas de olhos brancos foram dissecados em tampão fosfato de sódio (PBS) e incubados com 0,2 mg/ml de 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) em PBS com Twenn-20 a 1% (PBST) por 50 minutos (Baker & Yu, 2001). As amostras foram então fixadas em solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) por 15 minutos.

Depois de fixados os retos foram submetidos a três lavagens de uma hora cada em PBS, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C em solução de anticorpo primário anti-BrdU (Boehringer-Mannheim) obtido em rato e diluído em tampão de incubação (66 mM de tampão Tris; 0,66 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1mM de 2-

mercaptoetanol) (1:100). As amostras foram lavadas três vezes em PBS, com duração de 15 minutos cada, e incubadas com solução de anticorpo secundário anti IgG (Boehringer-Mannheim) de rato obtido em ovelha e conjugado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 24 horas a 4°C. O material foi novamente lavado em PBS, desidratado em gradiente de etanol, embebido em historesina, seccionado a 10 µm de espessura, montado com sacarose a 50% e analisado em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 com filtro WB. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário anti-BrdU.

### **Detecção de morte celular programada**

A detecção de morte celular programada foi investigada utilizando-se o kit para detecção de morte celular *in situ* (TUNEL<sup>®</sup>, Roche).

Retos de pupas de olho branco e rosa de *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris* foram dissecados em solução fisiológica para insetos, fixados em paraformaldeído a 4% e levadas ao criomicrotomo (LEICA CM1850). As secções de 10 µm foram submetidas ao protocolo de TUNEL de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram lavadas em PBS por 30 minutos, incubadas com solução bloqueadora (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol) por 10 minutos. Em seguida foram incubadas em solução de permeabilização (Triton X-100 a 0,1%, citrato de sódio a 0,1%) em gelo por dois minutos, novamente lavadas em PBS e incubadas com a solução TUNEL (solução marcadora mais enzima terminal transferase) por 30 minutos em ambiente escuro e úmido a 37°C. Após essa etapa as amostras foram lavadas em PBS e submetidas ao protocolo de detecção da peroxidase por diaminobenzidina como substrato. Para o controle negativo as lâminas foram incubadas em solução sem a enzima terminal transferase. As lâminas foram

contracoradas com Light Green a 10%, montadas com Entellan<sup>®</sup>, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX60.

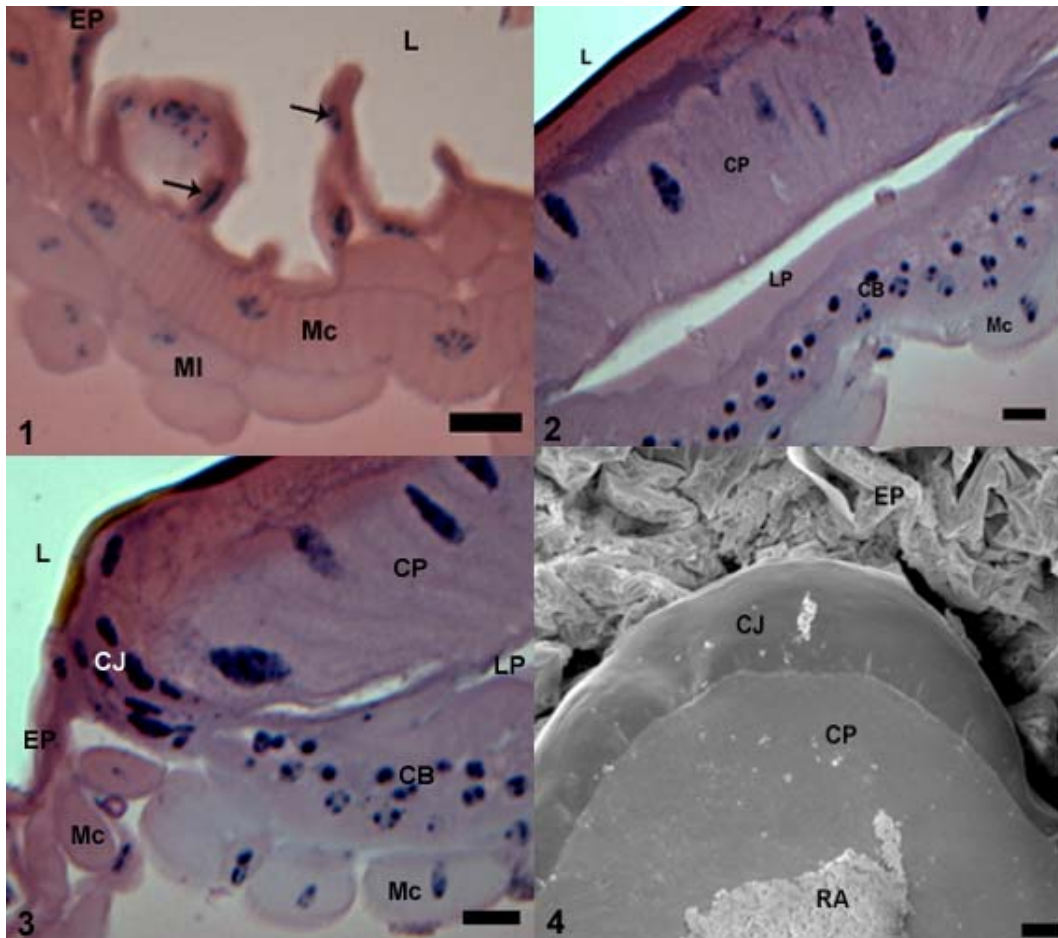
### **Microscopia eletrônica de varredura**

Os retos de pupas de olho branco, rosa, marrom, preto e de operárias adultas foram dissecados em solução salina para insetos, abertos, fragmentados para exposição do interior dos tecidos e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,0. Após a fixação o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato sódio com duração de 15 minutos cada e pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por duas horas. Seguiram-se novas lavagens em água destilada e desidratação em gradiente alcoólico. Após essa etapa as amostras foram submetidas a secagem em ponto crítico (CPD Baltec 30), metalizadas com ouro a 20 nm de espessura e analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO VP 1430.

## RESULTADOS

Não foram observadas diferenças entre as espécies estudadas, portanto, as descrições feitas abordam tanto *M. quadrifasciata anthidioies* quanto *M. scutellaris*.

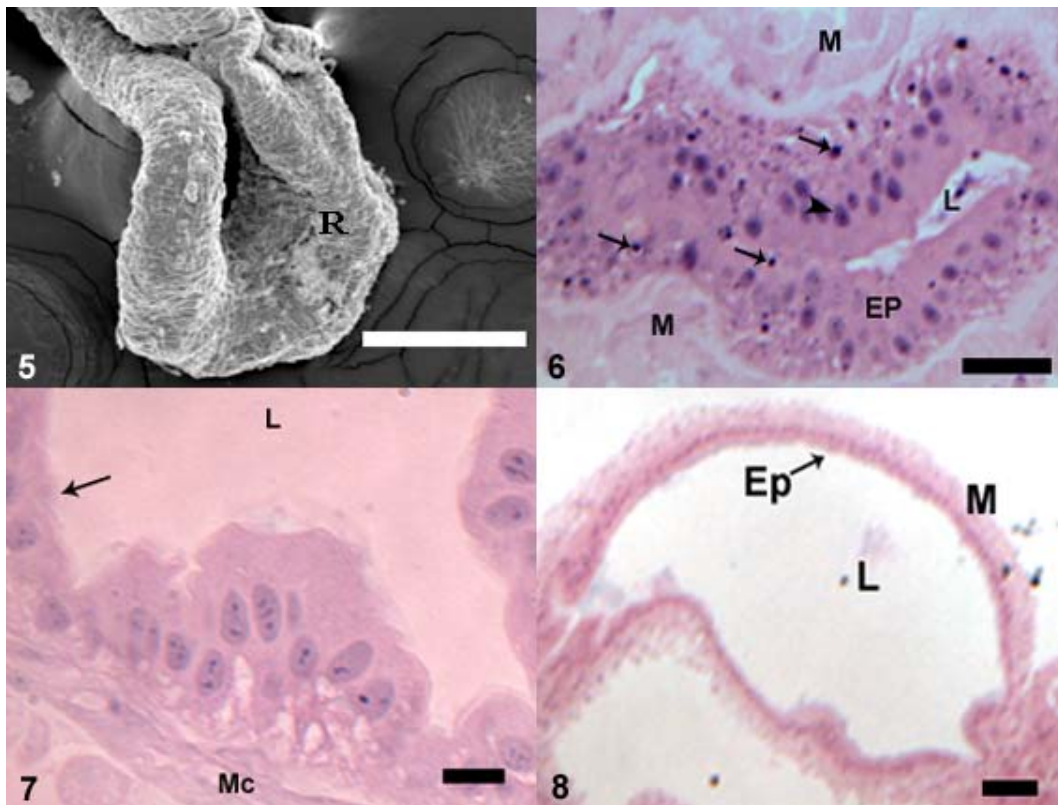
O reto de operárias adultas possui um epitélio simples que apresenta várias dobras, sendo recoberto por uma espessa cutícula quitinosa e envolvido por uma túnica muscular composta de uma camada de fibras circulares internas e de fibras longitudinais externas (Fig. 1). As dobras do epitélio são distendidas quando o reto está cheio, aumentando o tamanho deste. As células epiteliais do reto são pavimentosas com núcleo arredondado que em *M. scutellaris* apresenta regiões de cromatina condensada (Fig. 2 e 3). Há ainda a presença de seis papilas retais arredondadas dispostas radialmente na região mediano-anterior do reto. Cada papila retal é composta de três tipos celulares distintos: as células principais, basais e as juncionais (Fig. 2). A camada de células principais está voltada para o lúmen do reto sendo recoberta por uma cutícula mais fina em comparação àquela que recobre o restante do reto. Essas são células cilíndricas com núcleo alongado disposto na porção mediano-basal. As duas camadas de células basais, separadas das principais pelo lúmen intrapapilar, são cúbicas com núcleo arredondado e estão localizadas na região basal da papila retal em contato com a túnica muscular que recobre todo o reto (Fig. 2 e 3). As células juncionais estão na região de transição entre o epitélio do reto e as células principais, formando uma borda que separa esses tipos celulares. Essas são células estreitas com núcleos alongados, apresentando cutícula mais espessa se comparada com a que recobre as células principais (Fig. 3 e 4).



**Figuras 1-3:** Secção longitudinal do reto de operárias adultas de *Melipona scutellaris*. **1:** As células do epitélio do reto (EP) são pavimentosas com núcleo arredondado (setas). Esse epitélio é envolvido por duas camadas musculares, uma circular interna (Mc) e outra longitudinal externa (MI). L, lúmen. Barra: 10 µm. **2:** Na papila retal, as células principais (CP) são cilíndricas e com núcleo alongado. CB, células basais; LP, lúmen intrapapilar; Mc, camada muscular circular. Barra: 10 µm. **3:** As células juncionais (CJ) separam as principais (CP) do epitélio do reto (EP). L, lúmen; LP, lúmen intrapapilar; Mc, camada muscular circular. Barra: 10 µm. **Figura 4:** Micrografia eletrônica de varredura da papila retal de adulto de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Notar a diferença entre a cutícula que recobre as células juncionais (CJ) e aquela que recobre as células principais (CP). O epitélio do reto encontra-se dobrado (EP). RA, restos de alimento. Barra: 10 µm.

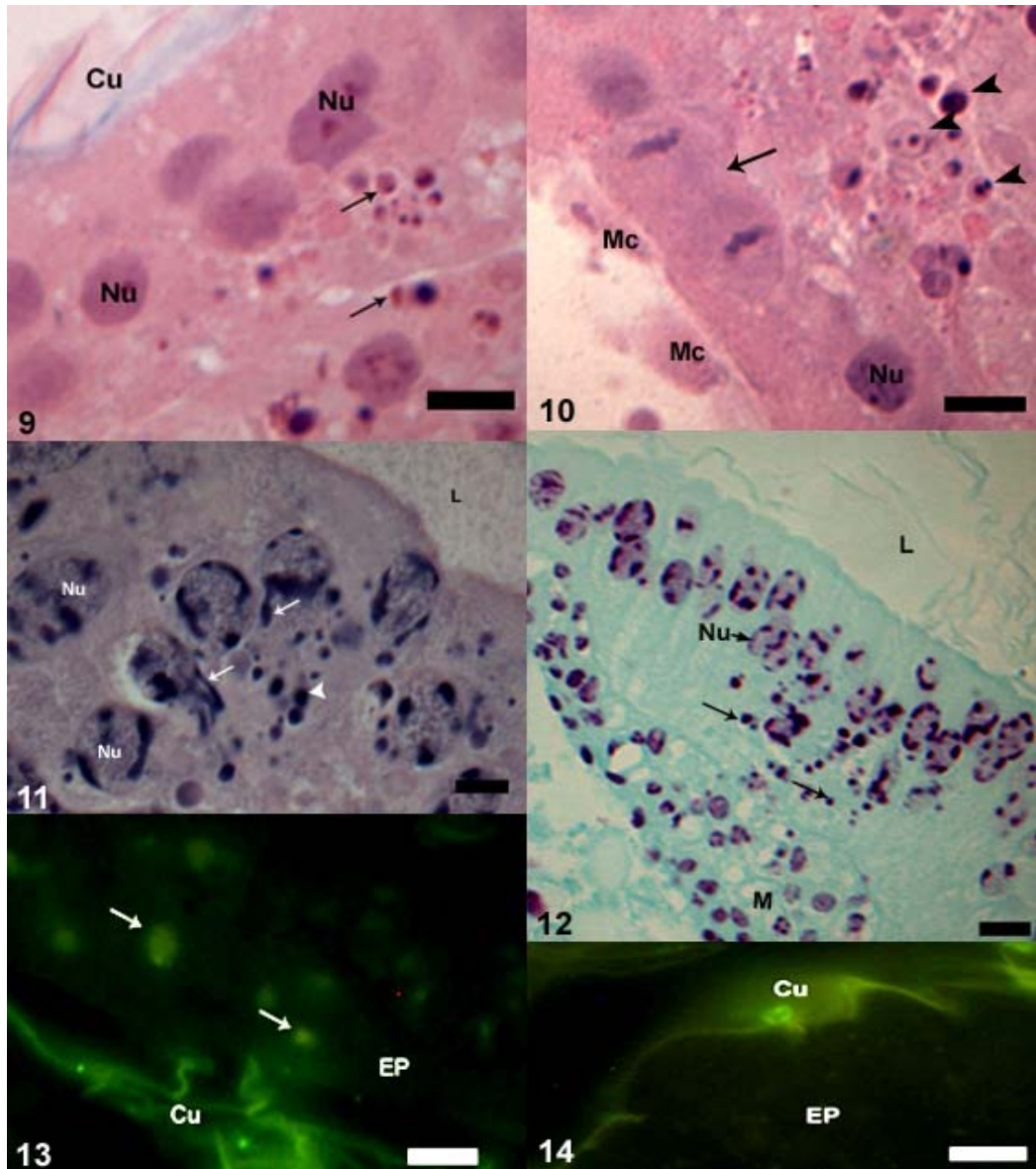
Na larva o reto se mostra como um órgão pouco diferenciado possuindo a forma de um tubo alongado (Fig. 5) com epitélio espesso de aparência estratificada. A cutícula é pouco desenvolvida e de difícil visualização. Estruturas semelhantes a corpos cromáticos descritos por Dobrovsky (1951) que possuem tamanho pequeno e se coram intensamente pela hematoxilina, foram observadas distribuídas por todo o epitélio tanto na região basal quanto na apical (Fig. 6).

Na pupa de olho branco logo após o início da pupação o epitélio do reto também se apresenta espesso, contudo não possui mais a aparência estratificada da fase anterior, sendo a cutícula fina, mas não recobrimo inteiramente o epitélio (Fig. 7). Os corpos cromáticos são mais escassos e até aproximadamente 30 horas de desenvolvimento poucas alterações desse padrão são observadas. Em pupas de olho branco com mais de 30 horas o reto apresenta um aumento de tamanho e volume, sendo facilmente distinguido do intestino fino (Fig. 8). Os corpos cromáticos voltam a aparecer ao longo do epitélio (Fig. 9 e 10), sendo liberados dos núcleos de células epiteliais em fragmentação (Fig. 11). Estes se mostram Feulgen-positivos evidenciando a presença de DNA no seu interior (Fig. 12). Nesse estágio as células epiteliais se tornam cúbicas (Fig. 9) e são observadas muitas divisões celulares (Fig. 10). A ocorrência de divisão celular nessa fase foi comprovada pela incorporação de BrdU pelas células epiteliais (Fig. 13 e 14). É possível observar com maior clareza a cutícula, contudo esta se desprende muito fácil do epitélio, sendo às vezes removida durante a dissecação.



**Figura 5:** Micrografia eletrônica de varredura de reto de larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando reto (R) como um tubo alongado. Barra: 200  $\mu\text{m}$ .

**Figura 6-8:** Secção longitudinal do reto de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **6:** Na larva o epitélio (EP) é estratificado e são encontrados numerosos corpos cromáticos (setas). L, lúmen; M, camada muscular; ponta de seta, núcleo. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . **7:** Na pupa de olho branco logo após a muda o epitélio do reto apresenta células altas, sendo a cutícula secretada fina (seta). L, lúmen; Mc, camada muscular circular. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . **8:** Na pupa de olho branco com 36 h o reto possui forma de bolsa distendida. Ep, epitélio; L, lúmen; M, camada muscular. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

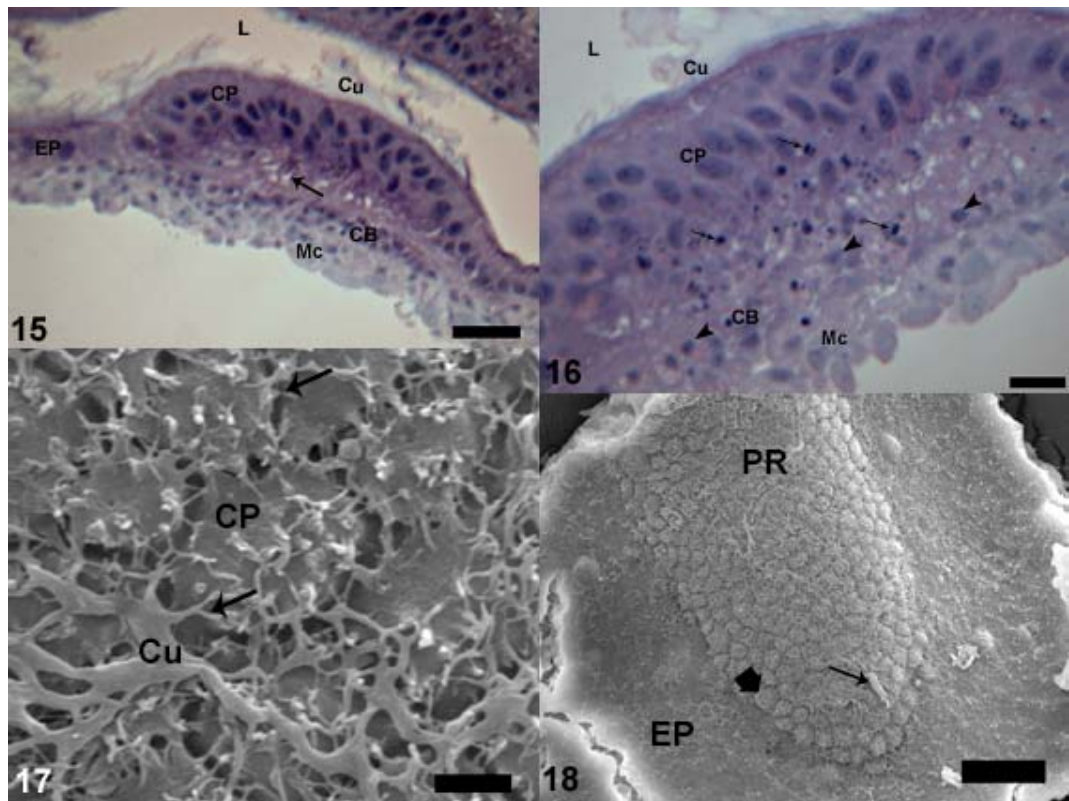


**Figuras 9-10:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho branco de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **9:** Na pupa com 36 h a cutícula é delgada(Cu) recobrando o epitélio e a presença de corpos cromáticos (setas). L, lúmen; Nu, núcleo. Barra: 10 µm. **10:** A pupa com 48 h apresenta o epitélio do reto contendo os corpos cromáticos (pontas de seta) e células em divisão (seta). Mc, camada muscular circular; Nu, núcleo. Barra: 10 µm. **Figuras 11-14:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho branco de *Melipona scutellaris*. **11:** Os núcleos (Nu) das células epiteliais fragmentam-se (seta) e liberam os corpos cromáticos (ponta de seta). L, lúmen. Barra: 10 µm. **12:** Núcleos (Nu) das células epiteliais e corpos cromáticos (setas) Feulgen positivos. L, lúmen; M, camada muscular. Barra: 10 µm. **13:** Células BrdU positivas (setas) no epitélio e cutícula autofluorescente (Cu). Barra: 10 µm. **14:** Controle negativo do teste de BrdU sem marcação no epitélio (EP). Barra: 10 µm.

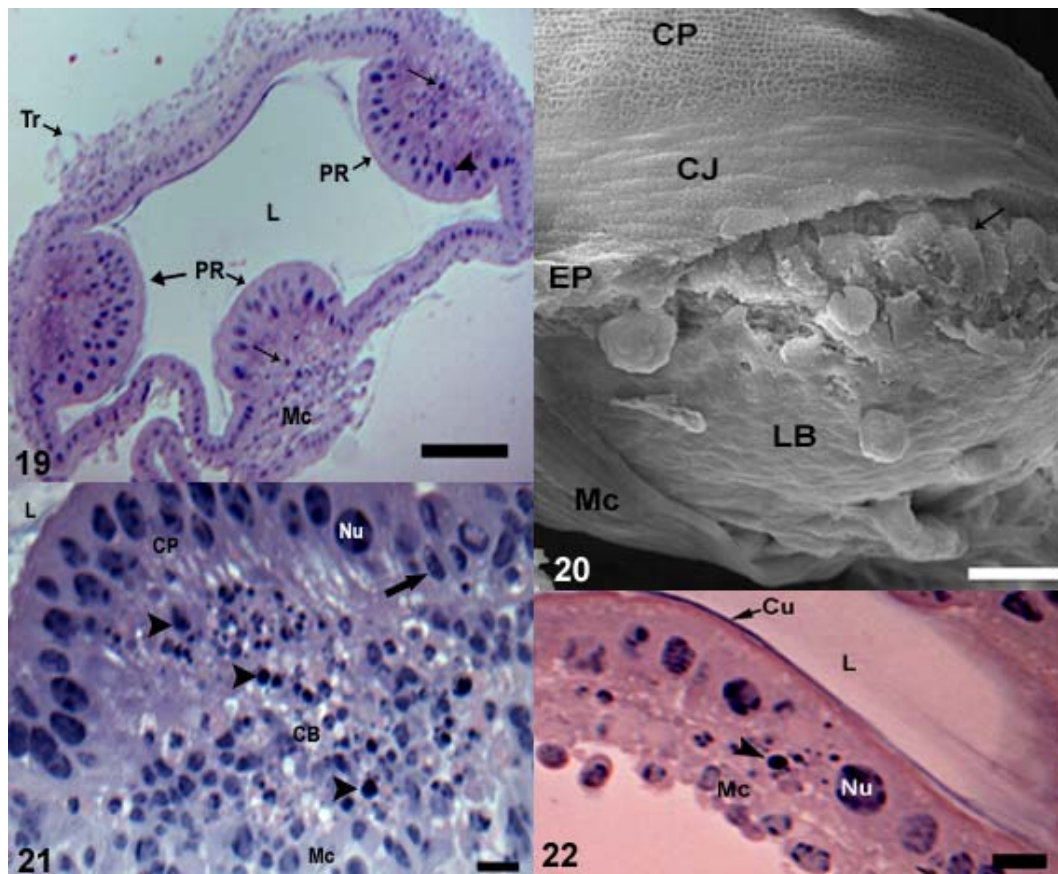
Em pupas de olho branco com 42 horas após o início da pupação são observados corpos cromáticos e metáfases por todo o epitélio. Ainda não são observadas papilas retais nessa fase. O mesmo ocorre na pupa de olho branco com 48 horas. Contudo, na pupa de olho branco com 54 horas após o início da pupação a papila surge como um espessamento do epitélio do reto, com a camada de células principais constituindo um epitélio estratificado e apresentando núcleos esféricos (Fig. 15). Nessa fase é possível observar as células basais as quais ainda não estão dispostas em camadas distintas, encontrando-se agrupadas na porção basal da papila e apresentando tamanho reduzido, quando comparadas com as principais (Fig. 16). Os corpos cromáticos continuam a ser observados nessa fase, tanto no epitélio quanto na papila em formação.

As células juncionais ainda não são observadas na pupa de olho branco com 54 horas após a pupação, não havendo separação clara da papila para o epitélio que compõe a parede do reto. A cutícula que recobrirá todo o reto está em processo de formação, sendo secretada por todas as células (Fig. 17). De 54 até 96 horas de desenvolvimento é observada uma redução do tamanho da papila que se apresenta inicialmente mais alongada adquirindo posteriormente a forma discóide (Fig. 18).

Na pupa de olho rosa as seis papilas já se distinguem claramente do epitélio, embora ainda se encontrem em processo de formação (Fig. 19 e 20). As células juncionais começam a se diferenciar e ocupar seu lugar na região de transição da papila para o epitélio após 48 horas de desenvolvimento. A diferenciação destas células é caracterizada pela presença de núcleo alongado e estreito, estando relacionado à forma que estas células possuirão no adulto (Fig. 21).



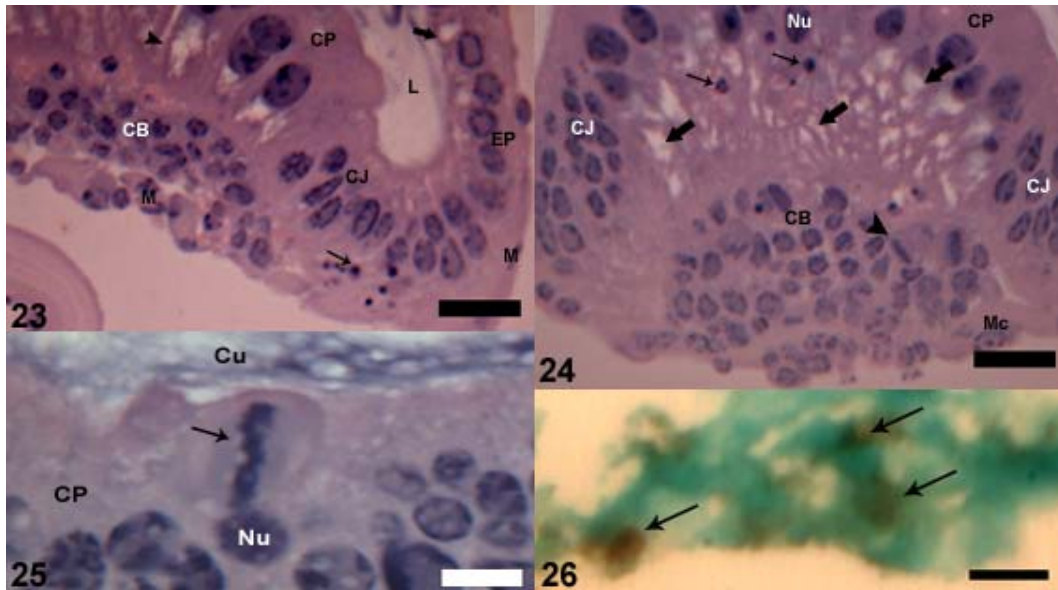
**Figuras 15-16:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho branco com 54 h de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **15:** Início da formação da papila que apresenta a camada de células principais (CP) estratificada, as células basais (CB) ainda não organizadas em camadas. Cu, cutícula; EP, epitélio; L, lúmen; Mc, camada muscular circular; seta, vacúolos. Barra: 20  $\mu$ m. **16:** Células principais (CP) estratificadas, as células basais (CB) dispostas ao longo de toda a papila (pontas de seta). Os corpos cromáticos (setas) encontram-se em maior quantidade na região que formará o lúmen da papila. Cu, cutícula; L, lúmen; Mc, camada muscular circular. Barra: 10  $\mu$ m. **Figuras 17-18:** Micrografia eletrônica de varredura do reto da pupa de olho branco com 66 h de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **17:** Cutícula (Cu) com aspecto ramificado (seta). CP, células principais. Barra: 2  $\mu$ m. **18:** Face luminal da papila (PR) em formação, apresentando forma alongada. As células principais (seta larga) não estão totalmente recobertas pela cutícula (seta). EP, epitélio do reto. Barra: 20  $\mu$ m.



**Figura 19:** Secção transversal do reto da pupa de olho rosa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Visão geral do reto evidenciando três papilas retais (PR). L, lúmen; Mc, camada muscular circular; seta, corpos cromáticos; ponta de seta, núcleo de célula principal; Tr, traquéia. Barra: 50  $\mu$ m. **Figura 20:** Micrografia eletrônica de varredura do reto da pupa de olho rosa de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Na região basal da papila há células basais (seta), que nesta fase ainda não constituem as duas camadas. CP, células principais; EP, epitélio; LB, lâmina basal; Mc, camada muscular circular. Barra: 10  $\mu$ m. **Figuras 21-22:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho rosa com 24 h de *Melipona scutellaris*. **21:** Detalhe de uma papila que apresenta início de formação das células juncionais (seta larga), as células basais (CB) não formam camadas. Notar vários corpos cromáticos (pontas de seta) tanto perto das células principais (CP) como em meio às basais. L, lúmen; Mc, camada muscular circular. Barra: 10  $\mu$ m. **22:** Detalhe do epitélio evidenciando a presença de corpos cromáticos (ponta de seta) no epitélio do reto. Cu, cutícula; L, lúmen; Mc, camada muscular circular; Nu, núcleo. Barra: 10  $\mu$ m.

O epitélio do reto apresenta-se uniformemente constituído por células cúbicas, sendo percebida claramente a diferença entre ele e as células principais das papilas retais que se mostram colunares. Há um grupo de células ocupando a região basal da papila, mas estas ainda não estão estruturadas em duas camadas (Fig. 21). Em pupas de olho rosa com 24 horas há presença de corpos cromáticos no epitélio do reto e nas papilas (Fig. 21 e 22), sendo que essas estruturas também são observadas na região central da papila, que mais tarde se tornará o lúmen intrapapilar (Fig. 21). O número de corpos cromáticos é reduzido nos estágios seguintes, sendo observado aumento do número de vacúolos no interior das células principais (Fig. 24). O epitélio do reto começa a diminuir a espessura, sendo observados inúmeros vacúolos na região apical das células (Fig. 23). Morte e proliferação celular foram observadas tanto nas células do epitélio do reto quanto naquelas da papila retal (Fig. 25 e 26).

Na pupa de olho marrom ocorre a formação das duas camadas basais da papila retal, sendo que a papila apresenta a mesma forma discóide do adulto (Fig. 27 e 28). Inicialmente as células que irão compor essa parte da papila encontram-se distribuídas abaixo das células principais ocupando a mesma extensão destas. As células principais estão dispostas em uma só camada ao final dessa fase do desenvolvimento (Fig. 28). A região central da papila apresenta vacúolos e o lúmen intrapapilar ainda está em processo de formação, mas nos locais onde já está formado apresenta em seu interior pequenas células com citoplasma vacuolizado e núcleo picnótico descentralizado (Fig. 29). Estas células estão em contato com as células basais da papila, parecendo originarem-se destas. Os corpos cromáticos ainda são observados nessa fase.

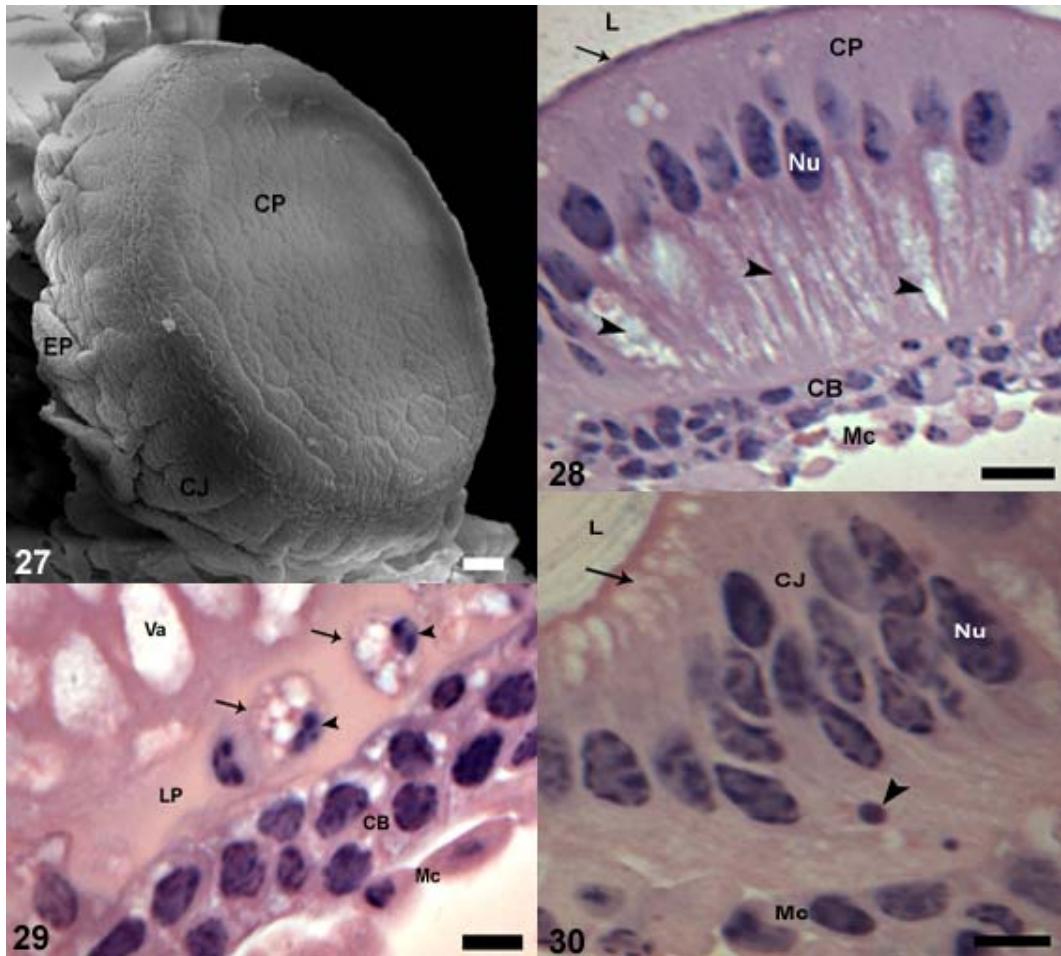


**Figuras 23-25:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho rosa de *Melipona scutellaris*. **23:** Na pupa com 72 h as células epiteliais (EP) exibem vacúolos (seta larga) no citoplasma apical, os quais são maiores (pontas de seta) na região central da papila. CB, células basais; CP, célula principais; CJ, células juncionais; L, lúmen; Mc, músculo circular; seta, corpos cromáticos. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . **24:** Pupa com 72 h apresentando células basais (CB) em divisão (ponta de seta). Os corpos cromáticos (seta) são escassos, enquanto os vacúolos (seta larga) aumentam de tamanho ocupando uma área maior da papila. CP, células principais; CJ, células juncionais; M, músculo; Nu, núcleo. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . **25:** Na pupa com 24 h são encontradas células principais (CP) em divisão (seta). Cu, cutícula; L, lúmen; Nu, núcleo. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . **Figura 26:** Criosecção do reto da pupa de olho rosa de *Melipona scutellaris*, mostrando marcação positiva para o teste TUNEL (seta), indicando a ocorrência de morte celular nesse epitélio. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

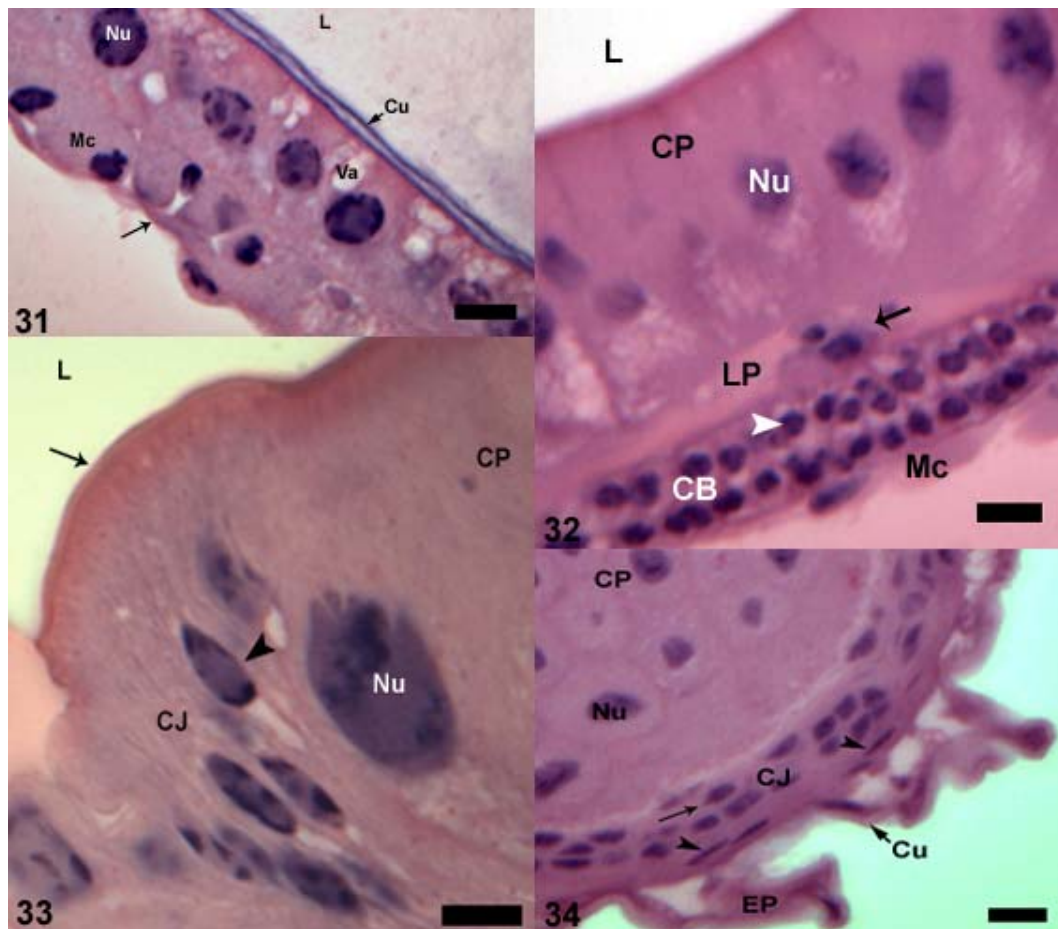
As células juncionais estão mais desenvolvidas e separam o epitélio do reto das células principais da papila (Fig. 30). As células epiteliais que recobrem o resto do reto apresentam redução de tamanho e possuem vacúolos no ápice (Fig. 31).

Na pupa de olho preto a papila já apresenta características semelhantes às do adulto com as células principais cilíndricas, duas camadas definidas de células basais e células juncionais formando um colar em volta das principais (Fig. 32 e 33). Essas apresentam vacúolos localizados na porção basal e núcleos alongados (Fig. 33). O lúmen intrapapilar está formado, sendo encontradas as mesmas células observadas na pupa de olho marrom nessa região (Fig. 32). O epitélio do reto apresenta as mesmas dobras observadas no adulto com células pavimentosas (Fig. 34).

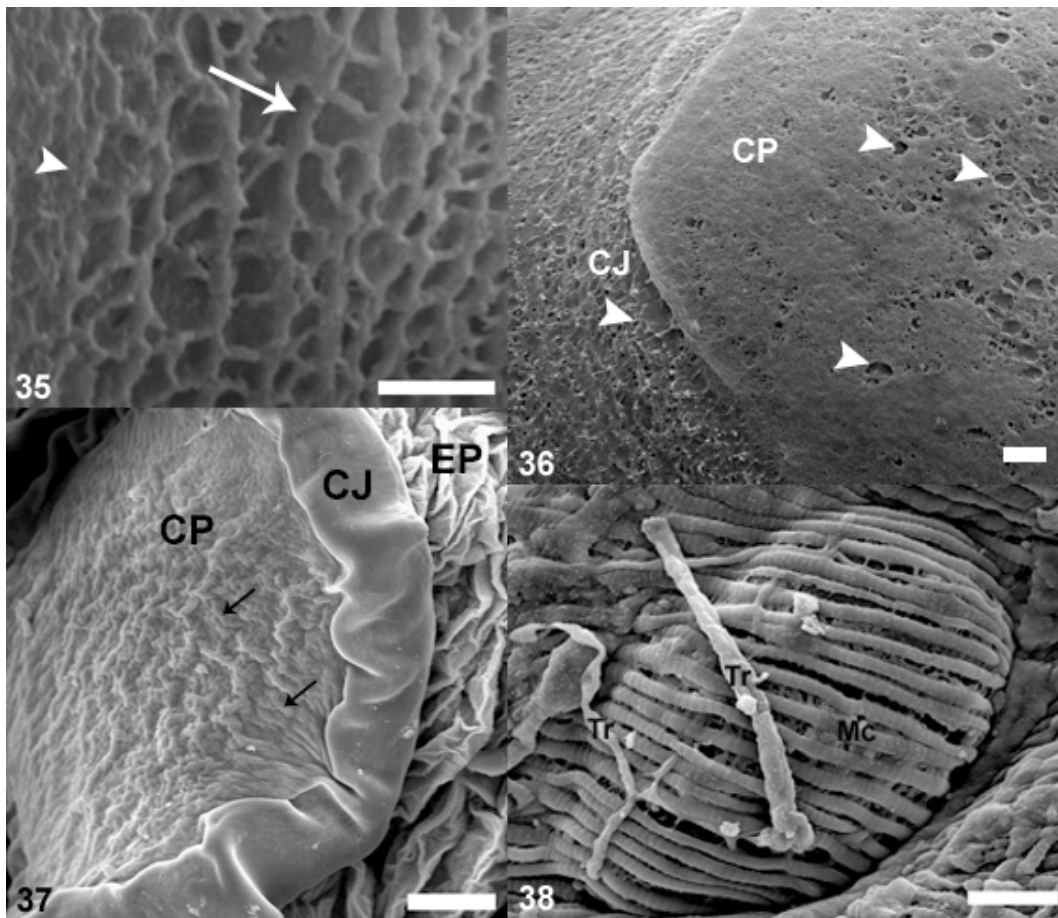
Durante toda a formação da papila é possível notar a formação da cutícula que recobre internamente todo o órgão. Na pupa de olho branco ela está desorganizada e não recobre totalmente as células epiteliais (Fig. 17), na pupa de olho rosa é possível observar uma maior organização dessas estruturas que se apresentam como uma rede na região lateral da papila (Fig. 35). Na pupa de olho marrom há uma condensação dessa estrutura que formará uma camada uniforme recobrendo todo o reto (Fig. 36, 37). A túnica muscular também se organiza durante o desenvolvimento da pupa. Na pupa de olho preto nota-se que na base da papila há apenas a camada circular de músculos, sendo observadas também traquéias (Fig. 38).



**Figura 27:** Micrografia eletrônica de varredura do reto da pupa de olho marrom de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mostrando a papila com forma discóide, com a impressão das células principais (CP) na cutícula. O epitélio do reto (EP) apresenta-se mais dobrado. CJ, células juncionais. Barra: 10  $\mu$ m. **Figuras 28-30:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho marrom de *Melipona scutellaris*. **28:** Nesta fase as células principais (CP) formam uma só camada, sendo possível observar a cutícula (seta) aderida a estas. Notar a ocorrência de vacúolos (pontas de seta) grandes e as células basais (CB) começando a se organizarem em camadas. L, lúmen; Mc, camada muscular circular, Nu, núcleo. Barra: 10  $\mu$ m. **29:** O lúmen intrapapilar (LP) apresenta células em seu interior (seta), contendo citoplasma bastante vacuolizado e núcleo picnótico (ponta de seta). CB, células basais; Mc, camada muscular circular; Va, vacúolos. Barra: 10  $\mu$ m. **30:** As células juncionais (CJ) apresentam estreitamento do citoplasma exceto na região do núcleo (Nu), contendo acúmulo de vacúolos (seta) em seu ápice. L, lúmen; Mc, camada muscular circular; Nu, núcleo; ponta de seta, corpos cromáticos. Barra: 10  $\mu$ m.



**Figura 31:** Secção longitudinal do reto de pupa de olho marrom de *Melipona scutellaris*, mostrando o epitélio com células cúbicas contendo núcleos esféricos (Nu) e vacúolos (Va) na porção apical. L, lúmen; Cu, cutícula; Mc, camada muscular circular; seta, fibra da camada muscular longitudinal. Barra: 10 µm. **Figuras 32-33:** Secção longitudinal do reto da pupa de olho preto de *Melipona scutellaris*. **32:** Notar a presença de células (seta) no lúmen intrapapilar (LP). As células basais (CB) são cúbicas com núcleos esféricos (ponta de seta). CP, células principais, Mc; camada muscular circular; Nu, núcleo. Barra: 10 µm. **33:** As células juncionais (CJ) possuem citoplasma estreito com núcleos alongados (ponta de seta) que diferem dos núcleos esféricos (Nu) das células principais (CP). L, lúmen; seta, cutícula. Barra: 10 µm. **Figura 34:** Secção transversal do reto da pupa de olho preto de *Melipona scutellaris*. As células juncionais (CJ) separam as células principais (CP) daquelas que compõem o epitélio do reto (EP). Cu, cutícula; Nu, núcleo de células principais; seta, núcleo de células juncionais; ponta de seta, núcleo de células epiteliais. Barra: 10 µm.



**Figuras 35-38:** Micrografia eletrônica de varredura do reto de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, **35:** Na pupa de olho rosa notar a cutícula que recobre a região que será ocupada pelas células juncionais (seta) e aquela que recobre as células epiteliais (ponta de seta). Barra: 2  $\mu$ m. **36:** Na pupa de olho marrom a cutícula que recobre as células principais (CP) e as células juncionais (CJ) não está completamente formada apresentando orifícios (ponta de seta). Barra: 3  $\mu$ m. **37:** Na pupa de olho preto a papila já apresenta as mesmas características do adulto sendo possível observar a diferença entre a cutícula (setas) que recobre as células principais (CP) e as células juncionais (CJ). Notar que o epitélio do reto apresenta dobras (EP) Barra: 20  $\mu$ m. **38:** Na pupa de olho preto observa-se que a região basal da papila é recoberta apenas pela camada circular de músculos (Mc) com traquéias (Tr) penetrando essa camada. Barra: 20  $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

A morfologia, ultra-estrutura e fisiologia das papilas retais já foram estudadas em várias espécies de insetos (Berridge & Gupta, 1967; Ferreira & Cruz-Landim, 1969; Noirot & Noirot-Timothee, 1971; Nicolson, 1976; Nicolson & Louw, 1982; Bradley, 1985; Jarial, 1992; Garayoa *et al.*, 1999). Contudo poucos trabalhos relatam detalhadamente o desenvolvimento dessas estruturas, dentre esses Dobrovsky (1951) em *Apis mellifera* e Evenius (1933) em *Vespa vulgaris*. O trabalho foi realizado com a finalidade de esclarecer os processos envolvidos na formação das papilas retais e determinar a real origem dessa estrutura.

O ciclo vital das abelhas como em outros insetos holometábolos processa-se em quatro fases: embrião, larva, pupa e adulto. Dadas as diferenças entre as larvas e os adultos, a pupação é a fase de transformações morfológicas e fisiológicas desta para o adulto. A duração do estágio pupal é variável em diferentes espécies de abelhas eussociais, entre os sexos e as castas. Nas operárias de *A. mellifera* dura 11 dias, em *Scaptotrigona postica* e *M. quadrifasciata anthidioides* 22 dias. A duração desses estágios não é fixa podendo variar com fatores como alimentação e temperatura (Cruz-Landim, 2004). Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas entre exemplares analisados num mesmo estágio. Contudo, pode-se perceber que numa mesma pupa a formação das papilas não ocorre em sincronia, sendo observadas papilas com pequenas diferenças nos estágios de desenvolvimento.

O canal alimentar é remodelado durante a metamorfose, quando as dietas dos imaturos e do adulto são diferentes. Em abelhas a dieta das larvas e dos adultos é basicamente a mesma: secreções glandulares, mel e pólen (Cruz-

Landim, 2004). Contudo, o tubo digestivo é extensivamente reorganizado durante a pupação (Dobrovsky, 1951; Neves *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006).

No presente trabalho, foram observadas as modificações pelas quais o reto da pupa passa para a formação do órgão do adulto. Durante a vida larval, o epitélio do intestino posterior como um todo (intestino fino e reto) apresenta-se formado por células altas que no reto estão em mais de uma camada assim como descrito anteriormente por Cruz-Landim (2004). Contudo, essa autora considera a formação das papilas retais apenas na pupa de olho rosa, sendo observado aqui que essa formação tem início na pupa de olho branco com 54 horas de desenvolvimento.

Dobrovsky (1951) descreveu as mudanças no tubo digestivo no desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*. Esse autor utilizou um parâmetro cronológico para identificação dos estágios, sendo marcado o tempo decorrido desde o início da pupação da pupa de olho branco. Aqui foi utilizada a cor do olho como parâmetro para identificação dessas fases, sendo marcado o tempo do início da pupação apenas na pupa de olho branco. O uso da pigmentação do olho na determinação das fases do desenvolvimento das pupas é um indicador mais eficiente que a idade cronológica, pois evidencia os avanços fisiológicos que estão se processando no indivíduo (Cruz-Landim, 2004).

Em *A. mellifera* foram observadas estruturas no epitélio do reto que se coram intensamente com hematoxilina e estão distribuídas em seis faixas somente na porção anterior do órgão, nas regiões onde mais tarde seriam formadas as papilas retais. Devido a isso, Dobrovsky (1951) considerou essas estruturas, denominadas corpos cromáticos, como precursoras das papilas retais.

Os corpos cromáticos, observados em todas as pupas analisadas, são estruturas de tamanho variável encontradas em todas as regiões do reto, seja no epitélio ou na papila em formação. Possuem DNA em seu interior e em alguns é possível observar restos de citoplasma. Essa descrição está de acordo com a realizada por Dobrovsky (1951). Contudo como a distribuição e a ocorrência dos corpos cromáticos diferem da apresentada por aquele autor, a função dessas estruturas pode não estar relacionada diretamente com a formação das papilas, no sentido de serem precursores das células que compõem a camada basal da papila. Afinal esses corpos cromáticos estão presentes mesmo nas pupas que já apresentam papilas, além de ocorrerem no epitélio do reto.

A marcação positiva para os testes de detecção de proliferação e morte celular sugere que a formação do reto no adulto decorre de remodelação do epitélio durante a fase pupal. A presença de células no lúmen da papila com citoplasma vacuolizado e núcleo picnótico são mais um indicativo da ocorrência de morte celular nesse epitélio (Souza *et al.*, 2007). Neste cenário, os corpos cromáticos seriam, em vez de estruturas precursoras do epitélio, fragmentos de células que sofreram morte celular, sendo corpos apoptóticos. De certa forma estariam relacionados com a formação da papila fazendo parte do processo de remodelação do epitélio, mas não originando seus componentes.

Além dos eventos de proliferação e morte, na formação dos constituintes da papila retal há ocorrência de diferenciação celular. O desenvolvimento contínuo das células da região periférica da papila que originarão as células juncionais ocorre por esse processo. Essas são formadas por diferenciação das células presentes na região de transição entre o epitélio do reto e a papila retal. Assim há um contínuo estreitamento dessas até atingirem a forma final. Da

mesma forma ocorre a formação das duas camadas basais da papila retal. Considerando a ocorrência desses três eventos, a papila retal mesmo durante sua formação é constantemente modelada passando de uma forma alongada presente na pupa de olho branco para a forma discóide presente na pupa de olho preto.

Evenius (1933) propôs uma origem mesodérmica para as camadas basais. Células da mesoderme migrariam da hemocele e atravessariam a camada muscular em formação alojando-se na região basal da papila, formando então as camadas basais. Entretanto Dobrovsky (1951) descarta essa hipótese, o que foi corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho. O epitélio do reto é estratificado na larva e tem a forma das células alterada com o desenvolvimento da pupa. Da mesma forma que as camadas principais da papila se diferenciam das células epiteliais do reto, as camadas basais teriam origem a partir de uma população de células presentes nessa mesma região. São células que sob certos estímulos se diferenciam naquelas que irão compor o epitélio basal da papila. Na pupa de olho marrom há proliferação e migração destas células de origem ectodérmica, que inicialmente estão agrupadas, para formar as duas camadas basais presentes nas papilas das espécies estudadas.

A formação das papilas retais compreende toda a fase de pupa pela qual o inseto passa durante seu desenvolvimento. Embora na pupa de olho preto já possam ser observadas as mesmas características presentes no adulto, a presença de fragmentos celulares no lúmen da papila indica uma continuação do processo de formação desta estrutura.

O desenvolvimento das papilas não ocorre de maneira sincronizada sendo observados estágios de desenvolvimento levemente diferenciados num mesmo

indivíduo analisado, como por exemplo, a redução da estratificação da camada de células principais.

A papila retal é recoberta por uma cutícula quitinosa assim como todo o epitélio do reto. Esta é produzida pelas próprias células epiteliais e secretada em forma de feixes. Há uma diferença morfológica entre as cutículas que recobrem as células principais da papila, as juncionais e as epiteliais do reto. As células principais constituem o principal sítio de absorção de água e íons, possuindo extensas características ultra-estruturais que são relacionadas com essa função, como complexo sistema de espaços intercelulares e invaginações da membrana plasmática apical associadas a mitocôndrias (Berrige & Gupta, 1967; Jarial, 1992; Garayoa *et al.*, 1999). A cutícula que recobre essas células possui um aspecto menos homogêneo do que aquela que recobre o anel de células juncionais e as células epiteliais constituintes da parede do reto. Durante a formação da papila há um maior espessamento da cutícula que recobrirá as células juncionais, havendo uma disposição da matriz cuticular em forma de rede, que mais tarde assumirá um aspecto homogêneo. Embora possuam características diferentes, há continuidade entre esses diferentes tipos de cutícula como observado por Garayoa *et al.* (1999).

Durante a maturação da pupa, o reto muda sua forma deixando a aparência de tubo presente na larva e passando a apresentar-se como uma bolsa dilatada que aumenta de volume quando cheio. Esse aumento de volume observado inicia-se na pupa de olho branco e ocorre devido à proliferação celular e alteração na morfologia das células epiteliais do reto. Simultaneamente ao desenvolvimento das papilas retais, o epitélio do reto perde a característica estratificada com células cilíndricas, sendo observada redução do tamanho destas até se tornarem pavimentosas no adulto (Cruz-Landim, 2004).

A única característica morfológica que diferiu entre as espécies analisadas foi o grau de condensação da cromatina. Em *M. scutellaris* são observados grumos de cromatina condensada no núcleo das células, enquanto em *M. quadrifasciata anthidioides* isso não ocorre. Isso se deve ao fato de *M. scutellaris* apresentar uma maior quantidade de heterocromatina (Rocha & Pompolo, 1998).

Dessa forma é possível concluir que a papila retal começa a ser formada na pupa de olho branco com 54 horas após o início da pupação e envolve processos de proliferação, morte e diferenciação celular. O processo de formação da papila é contínuo durante todo o desenvolvimento da pupa, originando-se a partir do próprio epitélio do reto sendo de origem totalmente ectodérmica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER N, YU S. (2001). The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 104: 699-708.
- BERRIDGE MJ, GUPTA BL. (1967). Fine-structure changes in relation to ion and water transport in the rectal papillae of the blowfly, *Calliphora*. *J Cell Sci.* 2: 89-112.
- BORROR DJ, TRIPLEHORN CA, JOHNSON NF. (1992). An introduction to the study of insects. Harcourt Brace. New York.
- BRADLEY TJ. (1985) The excretory system: structure and physiology. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* (Kerkut GA, Gilbert LI, eds). pp 421-465 Vol. 4. Pergamon Press: New York.
- CAETANO FH. (1984). Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hym.: Formicidae). *Pap. Avul. Zool.* 35: 257-305.
- CAETANO FH. (1988). Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo de operárias de formigas (Hym. Formicidae). *Naturalia* 13: 129-174.
- CHAPMAN RF. (1998). The Insects. Structure and Function. Cambridge University Press, Cambridge.
- CRUZ-LANDIM C. (2004). Biologia do desenvolvimento em abelhas. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina.html> > Acesso em: 08 de junho de 2008

- CRUZ-LANDIM C. (1994). Ultrastructure of the ileum epithelium of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *J. Morphol.* 222: 191-201.
- DOBROVSKY TM. (1951). Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). New York State College of Agriculture: Cornell University. 13: 3-63.
- EVENIUS C. (1933). Über die Entwicklung der Rektaldrüsen von *Vespa vulgaris*. *Zool. Jahrb.* 56: 349-372.
- FERREIRA A, CRUZ-LANDIM C. (1969). A comparative study of the rectal glands of Apoidea (Hymenoptera). *An. Acad. Bras. Cienc* 41: 591-600.
- GARAYOA M, VILLARO AC, LEZAUM MJ, SESMA P. (1999). Light and electron microscopic estudy of the hindgut of the ant (*Formica nigricans*, Hymenoptera): II. Structure of the rectum. *J. Morphol.* 242: 205-228.
- KERR WE, CARVALHO GA, SILVA AC, ASSIS MGP. (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estrateg.* 12: 20-41.
- JARIAL MS. (1992). Fine structure of the rectal pads in the desert locust *Schistocerca gregaria* with reference to the mechanism of water uptake. *Tiss. Cell* 24: 139-155.
- KHODABANDEH S. (2006). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the gut of larvae of the zygopteran, *Ischnura elegans*, and the Anisoptera, *Libellula lydia*, (Odonata): Activity and immunocytochemical localization. *Zool. Stud.* 45: 510-516
- MARQUES-SILVA S, SERRÃO JE, MEZÊNCIO JMS. (2005). Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: Immunolocalization of secretory sites. *Acta Histochem.* 107: 23-30.

- MARTINS GF, NEVES CA, CAMPOS LAO, SERRÃO JE. (2006). The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37: 161-168
- MICHENER CD. (2000). *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, London.
- NATION J. (2002). *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. Florida.
- NEVES CA, GITIRANA LB, SERRÃO JE. (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata athidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology* 41: 443–459.
- NICOLSON SW, LOUW GN. (1982) Simultaneous measurement of evaporative water loss, oxygen consumption, and thoracic temperature during flight in a carpenter bee. *J. Exp. Zool.* 222: 287-296.
- NICOLSON SW (1976). Diuresis in the cabbage white butterfly, *Pieris brassicae*: Water and ion regulation and the role of the hindgut. *J. Insect Physiol.* 22: 1623-1630
- NOIROT C, NOIROT-TIMOTHÉE C. (1971). Ultrastructure du proctodeum chez le thysanore *Lepismodes inquilinus* Newman (= *Thermobia domestica* Packard). *J. Ultrastruct. Res.* 37: 119-137.
- NOIROT C, SMITH DS, CAYER ML, NOIROT-TIMOTHÉE C. (1979). The organization and isolating function of insect rectal sheath cells: a freeze-fracture study. *Tiss. Cell* 11: 325-326.
- PEARSE AGE. (1953). *Histochemistry: Theoretical and Applied*. J. & A. Churchill Ltd. London.

- ROCHA MP, POMPOLO SG. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.* 21:41-45
- SERRÃO JE, CRUZ-LANDIM C. (1995). Gut structures in adult workers of necrophorous Neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Ent. Gener.* 19: 261-165.
- SERRÃO JE, MARQUES-SILVA S, MARTINS GF. (2004). The rectum of *Oxaea flavescens* (Andrenidae) has a specialized structure among bees. *Micron* 35: 245-253
- SNODGRASS RE. (1935). Principles of insect morphology. Cornell University Press, Ithaca and London. Eds. Ellen Burden and Ruth Roach.
- SNODGRASS RE. (1956). Anatomy of honeybee. Comstock Publishing Ass, Ithaca.
- SOUZA EA, NEVES CA, CAMPOS LAO, ZANUNCIO JC, SERRÃO JE. (2007). Effect of mating delay on the ovary of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) queens. *Micron* 37: 471-477
- STEFANINI M, DEMARTINO C, ZAMBONI L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174.
- WIGGLESWORTH, VB. (1932). On the function of the so-called 'rectal glands' of insects. *Quart. J. Micr. Sci.* 75:131-150.