

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Morfogênese da válvula estomodeal em pupas de *Apis mellifera* Linnaeus,  
1758 (Hymenoptera: Apidae)**

Werônica Célia Starlino Dias  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2026**

**WERÔNICA CÉLIA STARLINO DIAS**

**Morfogênese da válvula estomodeal em pupas de *Apis mellifera* Linnaeus,  
1758 (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*.

Orientador: Jose Eduardo Serrao

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2026**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D541m  
2026  
Dias, Werônica Célia Starlino, 1993-  
Morfogênese da válvula estomodeal em pupas de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Werônica Célia Starlino Dias. – Viçosa, MG, 2026.  
1 dissertação eletrônica (61 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2026.

Referências bibliográficas: f. 48-61.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.236>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelha - Desenvolvimento. 2. Intestinos. 3. Digestão.  
I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799

**WERÔNICA CÉLIA STARLINO DIAS**

**Morfogênese da válvula estomodeal em pupas de *Apis mellifera* Linnaeus,  
1758 (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: 20 de fevereiro de 2026.

Assentimento:

---

Werônica Célia Starlino Dias  
Autora

---

Jose Eduardo Serrao  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 18/05/2026 às 13:41:37 e pelo orientador em 18/05/2026 às 17:01:32. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **JJR4.OB9N.F3MA** e clique no botão 'Validar documento'.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e a todos os seus servidores e colaboradores que contribuem diariamente para manutenção e continuidade do ensino superior público de qualidade.

Agradeço ao Prof. Dr. José Eduardo Serrão pela orientação e exemplo de excelência durante toda a minha jornada acadêmica.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço aos colegas e à minha família, que me apoiou desde o início e esteve presente a cada pequena conquista.

Muito obrigada!

“...enquanto este planeta continua a girar, obedecendo à imutável Lei da Gravidade, as formas mais belas, mais maravilhosas, evoluíram a partir de um início tão simples, e ainda prosseguem hoje em dia neste desenvolvimento.” (A Origem das Espécies - Charles Darwin)

## RESUMO

DIAS, Werônica Célia Starlino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2026. **Morfogênese da válvula estomodeal em pupas de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: Jose Eduardo Serrao.

As abelhas *Apis mellifera* são prestadoras de serviços ecossistêmicos, mas tem apresentado declínio populacional. O conhecimento de diversos aspectos de sua biologia é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mitigadoras desse declínio, incluindo aspectos do desenvolvimento pós-embrionário. O desenvolvimento do proventrículo durante a metamorfose é marcado pela eversão da válvula estomodeal do intestino anterior para o médio na transição entre pupa de olho marrom para abelha recém-emergida, porém os diversos processos celulares envolvidos são pouco conhecidos. O objetivo foi caracterizar a válvula estomodeal durante o processo de eversão em pupas de operárias de *A. mellifera*. Nas análises morfológicas foram realizadas com microscopia de luz, imunofluorescência para detecção de células em apoptose, diferenciação e proliferação celular e microscopia eletrônica de transmissão. Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara a válvula estomodeal está voltada para o lúmen do papo e apresenta epitélio com células de formato irregular, espaço entre os folhetos epiteliais e células livres. Durante a eversão da válvula estomodeal para o intestino médio entre a pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média e escura ocorre diminuição do espaço entre os folhetos epiteliais e desenvolvimento da membrana basal e cutícula. As células musculares do bulbo aumentam em quantidade e diâmetro gradativamente até a abelha adulta. A apoptose, a diferenciação e a proliferação celular ocorrem com maior frequência nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média. As pupas de olho rosa apresentam células com projeções apicais, ausência de cutícula, numerosas mitocôndrias e depósitos citoplasmáticos de material floculado. Nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara, média e escura, ocorre a formação de vesículas e cutícula no domínio apical, depósitos citoplasmáticos de material denso e diminuição da quantidade de mitocôndrias. Portanto, a morfogênese do proventrículo de *A. mellifera* é marcada pela eversão e desenvolvimento da válvula estomodeal e bulbo, com reorganização e diferenciação dos tecidos que os compõem.

Palavras-chave: desenvolvimento; válvula estomodeal; canal alimentar; digestão

## ABSTRACT

DIAS, Werônica Célia Starlino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2026. **Morphogenesis of the stomodeal valve in pupae of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. Adviser: Jose Eduardo Serrao.

Honeybee (*Apis mellifera*) provide ecosystem services, but their populations have been declining. Understanding various aspects of its biology is fundamental for developing strategies to mitigate this decline, including aspects of post-embryonic development. The development of the proventriculus during metamorphosis is marked by the eversion of the stomodeal valve from the foregut to the midgut during the transition from brown-eyed pupa to adult; however, some cellular events involved are poorly understood. The objective was to characterize the stomodeal valve during the eversion process in pupae of *A. mellifera* worker. Morphological analyses were performed using light microscopy, immunofluorescence for the detection of apoptosis, cell differentiation and proliferation, and transmission electron microscopy. In brown-eyed pupae with a light-pigmented thorax, the stomodeal valve faces the crop lumen and presents an epithelium with irregularly shaped cells, spaces between the epithelial layers, and free cells. During the eversion of the stomodeal valve into the midgut between the transition from brown-eyed pupa with medium to dark pigmentation of the thorax, there is a decrease in the space between the epithelial layers and development of the basal membrane and cuticle. The muscle cells of the proventricular bulb gradually increase in number and diameter until the adult bee. Apoptosis, cell differentiation and proliferation occur more frequently in brown-eyed pupae with medium-pigmented thorax. In the early stage of pink-eyed pupae the cells have apical projections, absence of cuticle, numerous mitochondria, and cytoplasmic deposits of flocculated material. In brown-eyed pupae with light, medium, and dark pigmentation of the thorax, cuticle formation occurs in the apical domain, cytoplasmic deposits of dense material, and a decrease in the number of mitochondria. Therefore, the morphogenesis of the proventriculus of *A. mellifera* is marked by the eversion and development of the stomodeal valve and proventricular bulb, with reorganization and differentiation of the tissues that compose them.

Keywords: development; stomodeal valve; alimentary canal; digestion

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
	<b>3.1 Abelhas.....</b>	<b>14</b>
	<b>3.2 Histologia.....</b>	<b>14</b>
	<b>3.3 Imunofluorescência.....</b>	<b>14</b>
	<b>3.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
	<b>4.1 Histologia.....</b>	<b>16</b>
	<b>4.2 Imunofluorescência.....</b>	<b>28</b>
	<b>4.3 Microscopia eletrônica de transmissão .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos possuem importância biológica e a perda de sua biodiversidade gera apreensão no meio científico e na sociedade (Saunders *et al*, 2025). Diversas espécies prestam serviços ecossistêmicos essenciais e estudos sobre sua biologia são essenciais para sua conservação, conhecimento e monitoramento (Millard *et al*, 2025). A polinização é um dos serviços prestados pelos insetos, que através de interações coevolutivas, possibilitam a manutenção e diversificação da vegetação (Peris e Condamine, 2024; Rahimi e Jung, 2024). A abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) possui papel crucial na polinização de vegetação nativa e culturas agrícolas, além de gerar produtos de interesse econômico como mel, própolis, cera e compostos farmacêuticos (Ilyasov *et al*, 2025; Sgroi *et al*, 2025). Além de sua relevância econômica, *A. mellifera* é um organismo modelo amplamente estudado quanto a sua biologia e impactos ecológicos (Cirtwill e Wirta, 2025; Rahimi e Jung, 2025).

As colônias de *A. mellifera* são compostas por castas de indivíduos do sexo feminino, representadas pelas rainhas e operárias, além dos machos. A rainha é o indivíduo reprodutivo, responsável pela produção de quase a totalidade dos ovos e manutenção do número de indivíduos, enquanto os machos são responsáveis pela fertilização da rainha virgem e contribuem pouco com as tarefas da colônia. As operárias realizam todas as demais tarefas da colônia, incluindo cuidado com as crias, alimentação, controle de temperatura, defesa e forrageio por recursos. As abelhas utilizam sentidos refinados como visão, olfato e memória para visitar as plantas floríferas para a coleta de néctar, fonte de carboidratos e grãos de pólen, fonte de proteínas. Estas fontes de alimento são armazenadas na colônia e utilizadas para alimentação dos indivíduos jovens e adultos (Michener, 1974; Gullan e Cranston, 2017).

Sendo insetos holometábolos, as abelhas apresentam desenvolvimento pós-embriônico na forma de larva que posteriormente passam por metamorfose completa, originando os adultos. O período entre a oviposição e a emergência do adulto dura aproximadamente 16 dias para as rainhas, 21 dias para operárias e 24 dias para machos (Gullan e Cranston, 2017). A fase larval compreende cinco instares larvais, sendo marcada principalmente pela alimentação e formação de discos imaginários. Em operárias, o quinto ínstar pode ser subdividido pelas fases de alimentação, tecimento do casulo e pré-pupa, totalizando cerca de oito dias. A fase pupal das operárias é dividida em sete estágios, definidos com base nas alterações na coloração dos olhos e do tórax, e apresenta duração aproximada de 12 dias, correspondendo aos estágios de pupas de olho branco, olho rosa, olho rosa escuro, olho marrom com tórax de pigmentação clara, média e

escura (Michelette e Soares, 1993). É durante o estágio pupal que ocorre a metamorfose completa do inseto, envolvendo diversas transformações nos órgãos internos larvais que constituíram o organismo do inseto adulto.

Nos insetos, o canal alimentar se divide em intestinos anterior ou estomodeu; intestino médio ou ventrículo, e intestino posterior ou proctodeu. O intestino anterior realiza o transporte e armazenamento do alimento ingerido e compreende a boca, faringe, esôfago, papo e proventrículo. No intestino médio ocorre a digestão e absorção dos nutrientes que são transportados para a hemolinfa e posteriormente utilizados na formação e manutenção de todo o organismo. O intestino posterior absorve água e íons e se divide em intestino delgado ou íleo e reto (Serrão e Santos, 2025). As regiões do canal alimentar variam também quanto à sua origem, sendo os intestinos anterior e posterior de origem ectodérmica, caracterizados por uma íntima cuticular revestindo a superfície apical do epitélio e o intestino médio, de origem endodérmica, é recoberto pela membrana peritrófica (Chapman 2013).

Nas abelhas, o canal alimentar das larvas é constituído por um intestino anterior curto sem subdivisões anatômicas evidentes, um intestino médio longo e um intestino posterior rudimentar, uma vez que a passagem entre o médio e o posterior é fechada (Snodgrass, 1956). O canal alimentar do adulto difere daquele observado nas larvas principalmente em relação às subdivisões anatômicas, sendo composto por um intestino anterior diferenciado em faringe, esôfago, papo e proventrículo, além de intestino médio e intestino posterior subdividido em íleo e reto (Snodgrass, 1956). O canal alimentar apresenta ainda duas válvulas responsáveis pelo controle do fluxo e pela compartimentalização do alimento. A válvula estomodeal, também denominada válvula esofageal ou cardíaca, localiza-se na transição entre o intestino anterior e médio, enquanto a válvula pilórica está situada entre o intestino médio e o posterior (Serrão e Santos, 2025). A fase pupal é marcada por transformações morfológicas e fisiológicas, nas quais o canal alimentar passa por processos sucessivos de remodelação, destruição e regeneração de tecidos durante a metamorfose (Cruz-Landim, 2009; Gonçalves *et al.*, 2017; Guedes *et al.*, 2025).

As fontes alimentares constituem basicamente reservas nutritivas ou vitelo do ovo na fase de embrião; mel, pólen e secreções glandulares nas fases larval e adultos, enquanto as pupas mobilizam reservas energéticas armazenadas do corpo gorduroso (Cruz-Landim, 2009). Desde a fase embrionária o canal alimentar passa por mudanças graduais que preparam o órgão para a fase adulta. Na fase de pupa a alimentação cessa e enquanto isso o canal alimentar se remodela intensamente para reorganização e preparação para a alimentação do adulto (Cruz-Landim,

2009). Portanto, o desenvolvimento ontogenético do canal alimentar é marcado por ajustes e transformações que o adaptam para o seu crescimento e sobrevivência (Snodgrass, 1956).

Dentre as transformações metamórficas do canal alimentar, a formação do proventrículo resulta na modificação de uma simples válvula estomodeal na larva para uma estrutura constituída por um bulbo muscular no interior do lúmen do papo, uma válvula estomodeal no lúmen do intestino médio e uma peça mediana (pescoço) conectando as duas estruturas no adulto (Serrão e Santos, 2025). A válvula estomodeal larval se localiza na região de transição entre o intestino anterior e o médio, sendo formada pelo epitélio simples do intestino anterior que se invagina formando uma dobra epitelial separada por uma membrana basal no intestino médio (Metzer, 1910; Dobrovsky, 1951). Como se origina do epitélio do intestino anterior, a válvula também possui revestimento de cutícula (Snodgrass, 1956). A função dessa válvula é regular a passagem do alimento, prevenindo o refluxo daquele em processo de digestão no intestino médio para o intestino anterior (Dobrovsky, 1951; Snodgrass, 1956). A válvula estomodeal, assim como todo o canal alimentar, passa por modificações morfológicas nos estágios do ciclo de vida da abelha (Dobrovsky, 1951). De forma geral, a história da válvula estomodeal pode ser dividida em quatro eventos principais: i) formação durante a fase larval; ii) degeneração na pré-pupa; iii) reconstrução e iv) eversão na fase de pupa (Evenius, 1925; Evenius, 1926; Snodgrass, 1956; Guedes et al., 2025).

O primeiro evento se refere a sua formação inicial e é decorrente da abertura da passagem entre os intestinos anterior e médio na eclosão da larva a partir do ovo, pois anteriormente os rudimentos do intestino médio remanescente da endoderme embrionária formavam uma cavidade fechada (Snodgrass, 1956). A formação da válvula estomodeal tem início com o afinamento da parede epitelial que fecha a passagem entre os intestinos anterior e médio na fase de embrião (Metzer, 1910). A dobra formada pelo epitélio do intestino anterior cresce em direção a essa fina parede até o ponto em que a rompe e se posiciona no interior do intestino médio (Evenius, 1925; Dobrovsky, 1951; Snodgrass, 1956).

O segundo evento se refere a desintegração da válvula estomodeal na fase de pré-pupa, havendo novamente o fechamento entre os intestinos anterior e médio (Metzer, 1910). Os processos que levam ao desaparecimento da válvula começam com o seu encurtamento e retração, sendo que as margens do epitélio que formam a válvula se alongam medianamente até se unirem formando uma parede que fecha a passagem (Evenius, 1926). Ao mesmo tempo, o epitélio do intestino médio também se projeta e se une logo abaixo da parede formada anteriormente, resultando em uma parede dupla que fecha a passagem entre os intestinos (Evenius, 1925; Dobrovsky, 1951).

Então tem-se o início do terceiro evento, com a reconstrução da válvula estomodeal na pupa de olho marrom, com a formação de uma dobra de epitélio do intestino anterior no lúmen do papo, simultaneamente com a vacuolização e desorganização das células da parede dupla que fechavam a passagem desde a pré-pupa (Snodgrass, 1956, Guedes *et al.*, 2025). A seguir, a válvula é evertida para o intestino médio conectando o terceiro e quarto evento, com a abertura da passagem e formação da válvula definitiva e funcional na abelha adulta (Evenius, 1925; Evenius, 1926). Portanto, o canal alimentar é resultado de um elaborado processo de transformação marcado por mudanças que permitem o sucesso evolutivo desses insetos essenciais (Cruz-Landim, 2009; Blaimer *et al.*, 2023).

Curiosamente, na sua primeira formação na fase larval, a válvula estomodeal se alonga em direção ao intestino médio, o que difere do relatado na sua segunda formação no estágio pupal em que ela se projeta para intestino anterior e somente após uma série de mudanças morfológicas everte para o intestino médio (Evenius, 1925; Dobrovsky, 1951; Snodgrass, 1956). Entretanto, há poucos estudos de todo esse processo havendo lacunas sobre essa formação diferenciada em nível celular, com possíveis eventos de morte celular por apoptose, diferenciação e proliferação celular atuando na remodelação da válvula estomodeal.

A apoptose é uma forma de morte celular programada que impacta a homeostase e processos críticos durante o desenvolvimento de um organismo (Park *et al.*, 2023; Griffioen e Nowak-Sliwinska, 2025). A morte celular ao remover células danificadas ou geneticamente programadas para este fim evita danos aos tecidos (Park *et al.*, 2023) e remodela órgãos nos processos morfogenéticos (Monier e Suzanne, 2015). Entre as diferentes implicações teciduais envolvidas na morte celular por apoptose, compreender seu papel no desenvolvimento de insetos apresenta particular relevância.

Em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) a ocorrência de apoptose é aumentada em resposta ao estresse por temperatura (Li *et al.*, 2025). A apoptose também pode ser induzida na infecção viral que compromete o sistema imune de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Pentatomidae), exemplificando a complexidade das interações inseto-microrganismos (Zheng *et al.*, 2025). Em *A. mellifera*, alterações nos níveis de apoptose podem ser desencadeadas por fatores estressores que resultam em danos histopatológicos ao intestino médio de operárias recém-emergidas (De Resende *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2022) e larvas (Nere *et al.*, 2025). O processo de morte em nível celular influencia também no desenvolvimento dos insetos com papel essencial na metamorfose da glândula salivar de *D. melanogaster* (Long *et al.*, 2024) e na remodelação do intestino posterior durante a metamorfose de abelhas *A. mellifera* (Gonçalves *et al.*, 2017).

A apoptose se baseia em uma cascata proteolítica mediada por caspases iniciadoras e executoras. Sinais apoptóticos desencadeiam a dimerização e ativação das caspases iniciadoras (caspases 8, 9) por proteínas adaptadoras. Então, as caspases iniciadoras ativam as caspases executoras (caspases 3, 6, 7), que após mudanças conformacionais desencadeiam a clivagem de múltiplos substratos e proteínas-chave que levam à morte da célula. Após a ação das caspases executoras a célula passa por uma série de mudanças como a fragmentação nuclear, desorganização do citoesqueleto e interrupção da adesão celular, levando a eliminação ordenada da célula. A cascata das caspases é irreversível e auto-amplificada, portanto, a detecção da caspase-3 clivada indica que a célula está apoptose (Alberts, 2017; Park *et al.*, 2023; Griffioen e Nowak-Sliwinska, 2025).

Durante a metamorfose, além da morte celular, a diferenciação celular é um evento fundamental. A via Notch é uma sinalização que determina o caminho que a célula irá tomar durante seu desenvolvimento, como a diferenciação celular (Bray, 2006). Notch é um receptor transmembrana que após ser ativado por uma proteína em uma célula adjacente desencadeia uma série de sinais que controlam processos celulares essenciais (Bray, 2006). A proliferação e diferenciação celular controladas pela via Notch são estudadas em várias espécies e tecidos como o osso (Daria *et al.* 2025) e muscular de mamíferos (Qin, 2025). Em insetos, uma fina regulação da via Notch em *D. melanogaster* tem função no desenvolvimento das asas e sua morfologia (De Celis e García-Bellido, 1994; Zhang *et al.*, 2019). A qualidade da alimentação pode influenciar na diferenciação celular via Notch de diferentes tipos de hemócitos *D. melanogaster* (Katz, 2025). E na formação das asas de *Bombyx mori* (Lepidoptera) a apoptose e a via Notch contribuem no sistema imune e regulação do disco imaginal das asas, respectivamente (Chen *et al.*, 2025).

Além da diferenciação celular que pode ser detectada pela via Notch (Bray, 2006), processos que acontecem no núcleo também são essenciais para o destino das células. No núcleo, a cromatina é composta pelo material genético e proteínas associadas que exercem funções fundamentais como a compactação e organização do DNA (Alberts *et al.*, 2017). Entre estas proteínas estão as histonas, responsáveis pela organização cromossômica do nucleossomo e cujas modificações pós-traducionais regulam a estrutura e função da cromatina, além da expressão gênica (Lai e Wang, 2025). O cerne do nucleossomo é composto por um octâmero de histonas dispostas em pares, chamadas H2A, H2B, H3 e H4 que compactam o DNA (Alberts *et al.*, 2017). As caudas N-terminais das histonas se projetam para fora do nucleossomo, estando sujeitas a modificações químicas como acetilação, metilação e fosforilação para ajuste de novas funções (Li e Lin, 2025). A fosforilação dos resíduos de aminoácidos serina-10 e serina-28 na

cauda da histona H3 (PHH3) é um marcador de proliferação celular específico para células em mitose, pois durante a intérfase a expressão de PHH3 é ausente ou mínima (Paulson e Taylor, 1982; Wei *et al.*, 1998). A fosforilação da histona H3 inicia na fase G2 tardia até o início da prófase, e se encontra altamente fosforilada na metáfase (Juan *et al.*, 1998; Lee, Yang e Bigras, 2014). Já a desfosforilação acontece no final da anáfase até o início da telófase, marcando então a saída da mitose caracterizando PHH3 como um marcador de proliferação celular (Hans e Dimitrov, 2001).

Estudos sobre desenvolvimento das abelhas podem fornecer suporte teórico para a compreensão da formação do canal alimentar e ampliar o conhecimento sobre esse importante inseto polinizador. No entanto, ainda são escassos os estudos que abordam a morfogênese da válvula estomodeal de *A. mellifera*, bem como descrições detalhadas das alterações morfológicas do tecido e dos processos intracelulares envolvidos na sua eversão. Em um estudo prévio, Guedes *et al.* (2025) descreveram a formação do proventrículo na pupa de *A. mellifera*, mostrando que a eversão da válvula estomodeal do lúmen do intestino anterior para o médio ocorre na transição da pupa de olho marrom para abelha recém-emergida. Entretanto, o exato momento deste evento e a influência dos eventos moleculares de apoptose, proliferação e diferenciação celular permanecem desconhecidos. Dessa forma, este estudo visa caracterizar o desenvolvimento da válvula estomodeal durante o processo de eversão em pupas de operárias de *A. mellifera*.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a morfologia tecidual e celular da válvula estomodeal durante o processo de eversão ao longo da metamorfose de *A. mellifera*. Avaliar a ultraestrutura da parede obstrutiva que separa os intestinos anterior e médio na pupa de olho rosa. Adicionalmente, testamos a hipótese de que apoptose, diferenciação e proliferação celular constituem eventos chaves na formação dessa região.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Abelhas**

Pupas nos estágios de desenvolvimento de olho rosa; olho marrom com tórax de pigmentação clara, média e escura e operárias adultas foram coletadas de três colônias mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil (20°45' S 42°52' O).

#### **3.2 Histologia**

Após a coleta, as abelhas (10 indivíduos por estágio do desenvolvimento) foram dissecadas para extração dos intestinos em solução fisiológica para insetos (0.1 M NaCl + 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 7,2. Em seguida, fragmentos da transição ente o intestino anterior e o médio, correspondente a região do proventrículo, foram fixadas em solução de Zamboni por 24 horas a 12 °C. Então, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 10 min em cada etapa. Após infiltração em historesina glicol metacrilato (Leica Byosystems) de acordo com as instruções do fabricante, secções de 3 µm foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM225 e coradas com hematoxilina (15 min) e eosina (5 min). A análise histológica foi realizada em microscópio de luz Olympus BX60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

#### **3.3 Imunofluorescência**

Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média (n = 24) e escura (n = 24) foram coletadas. As pupas foram dissecadas em solução fisiológica para insetos e as amostras correspondentes à região do proventrículo foram fixadas em solução de Zamboni por 90 min. Após séries de lavagens de 10 min cada com tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7,2 (PBS), as amostras foram transferidas para PBS com Tween 20 a 1% por 90 min. Novamente lavadas em PBS, as amostras (n = 6 cada anticorpo) foram incubadas por 48 horas em: (a) anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (1:400) (Trevigen Cat# 2305-PC-100, RRID: AB\_2665453) para detecção de apoptose; (b) anti-Notch1 (1:200) (Cell Signaling Technology D6F11,#4380, Registro de Anticorpo AB\_280898) para a identificação de diferenciação celular e (c) anti-histona H3 fosforilada (1: 100) (Cell Signaling Technology Cat # 9701S, Registro de Anticorpos: AB\_331534) para detecção da proliferação celular. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas em anticorpo secundário IgG anti-coelho FITC conjugado (1:500) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) por 72 horas. Após serem lavadas em PBS as amostras foram incubadas em faloidina conjugada com TRITC (1:400) (Sigma-Aldrich Corp.

P1951, St. Louis, MO, EUA) por 1 hora para detecção de F-actina. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas em 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:500) por 30 min para detecção dos núcleos celulares. Os anticorpos primários foram omitidos nas amostras de intestino (n= 2 por anticorpo) utilizadas para controle negativo. Por fim, as amostras foram montadas em solução de sacarose a 30% e analisadas em microscópio Confocal Zeiss modelo LSM 900 Axio Observer 7 (Zeiss, Alemanha).

### **3.4 Microscopia eletrônica de transmissão**

As regiões do proventrículo de quatro pupas de olho rosa, olho marrom com tórax de pigmentação clara, média e escura e operária adulta recém-emergida foram dissecadas em solução fisiológica para insetos e a região correspondente ao proventrículo transferida para glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15M pH 7,2 por 2h. Após duas lavagens em tampão cacodilato de sódio, as amostras foram transferidas para tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2h. Após nova lavagem no tampão, foi realizada a desidratação em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 99%) e inclusão em resina acrílica LR White (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Seções com 70 a 90 nm de espessura foram obtidas em ultramicrotomo (RMC Boeckeler, Estados Unidos da América), contrastadas com acetato de uranila aquosa a 1% (10 min) e citrato de chumbo (3 min; Reynolds, 1963). As amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss (EM 109) (Zeiss, Alemanha).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Histologia

O bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara possui poucas células musculares nas camadas circulares e longitudinais (Figura 1A-B). O epitélio do bulbo possui células colunares justapostas com núcleos circulares na porção apical próximo a cutícula (Figura 1B). A porção basal da célula apresenta regiões vacuolizadas próximas a camada muscular (Figura 1C).

Na pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média o bulbo apresenta aumento da quantidade e diâmetro de células musculares (Figura 1D). O epitélio revestido por cutícula possui células colunares com núcleos circulares e vacúolos basais em com tórax de pigmentação média (Figura 1E). Células livres globosas e com inúmeros vacúolos em seu citoplasma aparecem entre as fibras musculares de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara (Figura 1C), porém em maior abundância nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média (Figura 1E-F).

No bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura as fibras musculares se tornam mais compactas e numerosas, aproximando as camadas circulares e longitudinais (Figura 2A). O bulbo contém menor abundância de células livres entre as fibras musculares e espinhos cuticulares bem desenvolvidos (Figura 2B). O epitélio pseudoestratificado é revestido por cutícula e possui células com núcleos ovais e diminuição da vacuolização (Figura 2C).

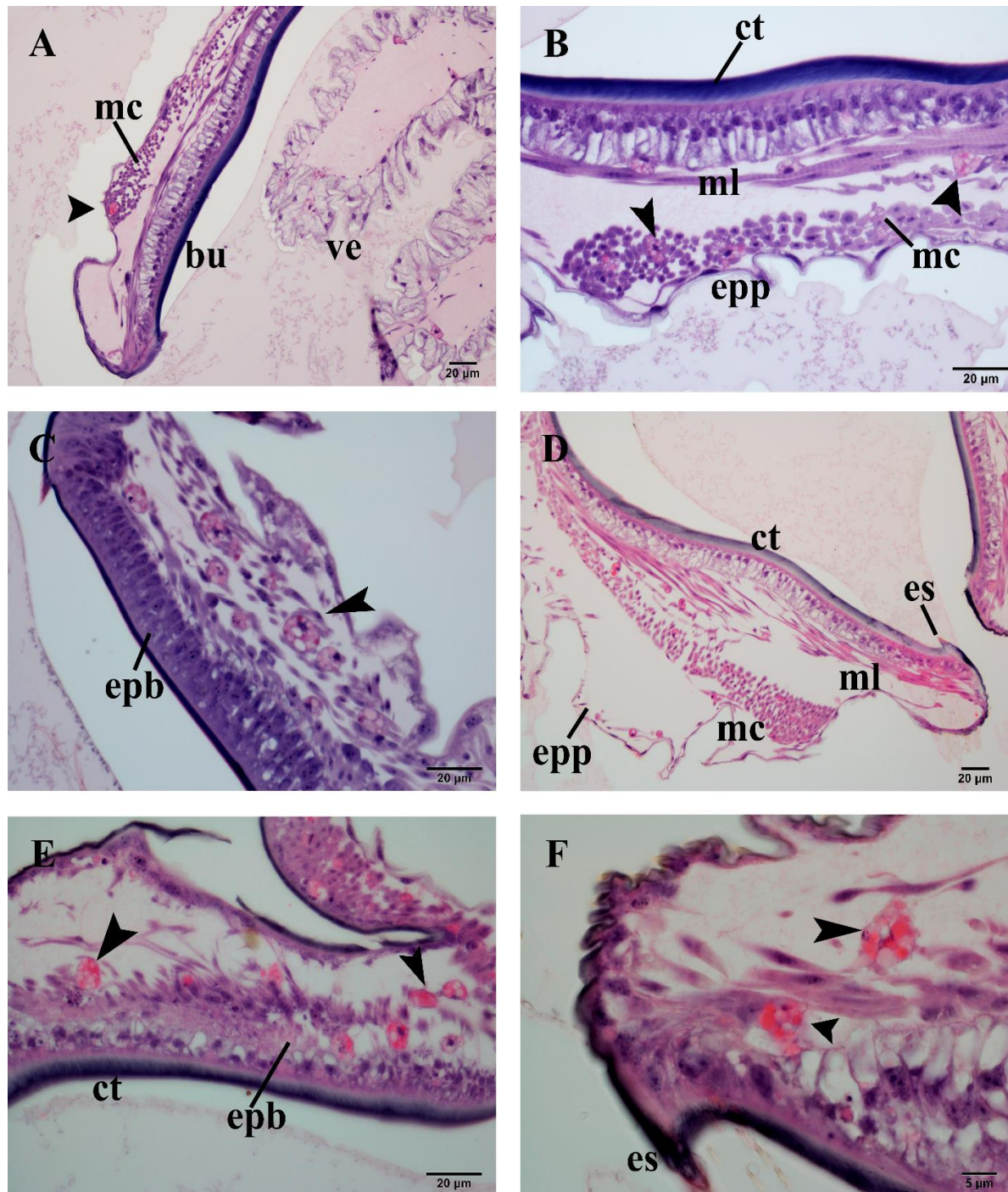


Figura 1. Micrografias de luz do bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-C. Bulbo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara com camada muscular circular externa e longitudinal interna; célula entre as fibras musculares (ponta de seta); epitélio do bulbo com células vacuolizadas; revestimento de cutícula delimitando a superfície externa do bulbo. D-F. Bulbo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média com camadas musculares circular e longitudinal, revestimento de cutícula e células entre as fibras contendo inúmeros vacúolos em seu citoplasma (pontas de seta). mc: músculo circular; bu: bulbo; ve: válvula estomodeal; ct: cutícula; ml: músculo longitudinal; epp: epitélio do papo; epb: epitélio do bulbo; es: espinho cuticular.

No bulbo do proventrículo da abelha adulta as camadas musculares estão mais próximas e compactas com menor espaçamento entre as fibras (Figura 2D). O epitélio pseudoestratificado é revestido por cutícula espessa na região apical e células com núcleos circulares (Figura 2E). As células livres que antes circulavam no interior do bulbo agora estão ausentes (Figura 2F).

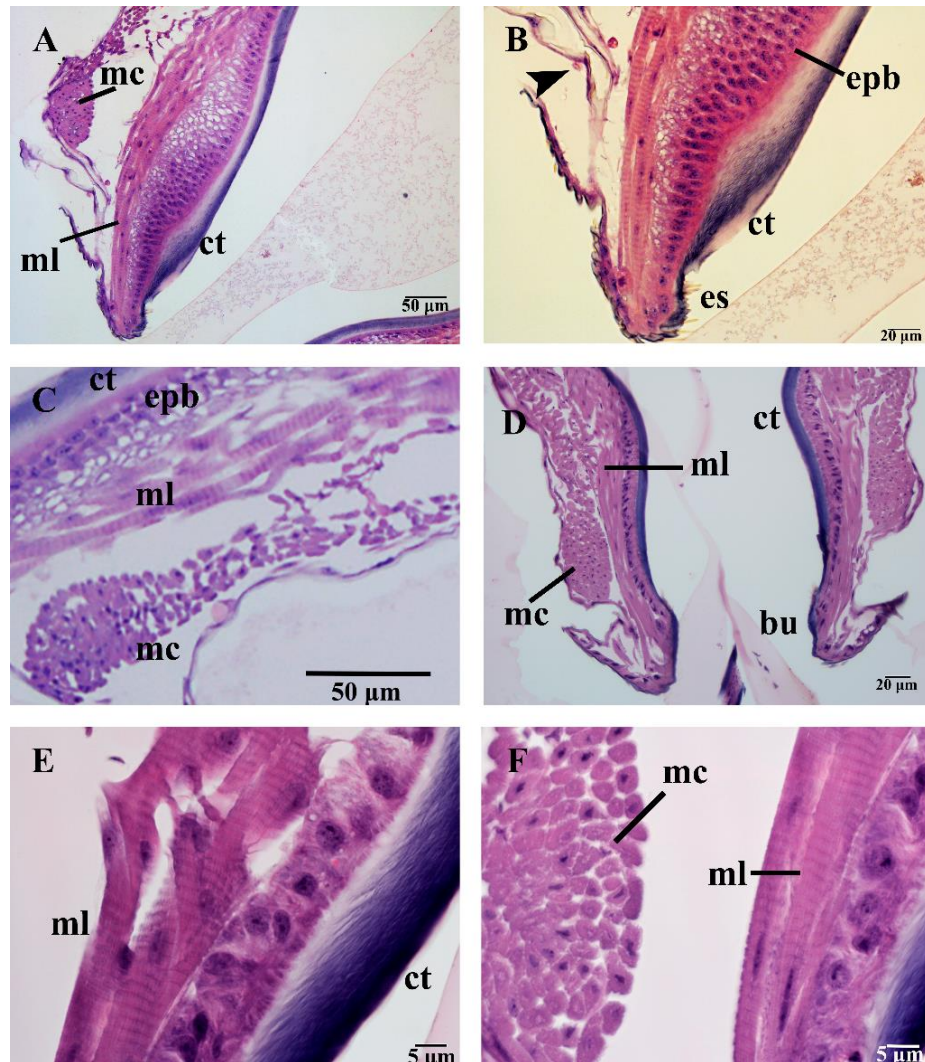


Figura 2. Micrografias de luz do bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom e operárias adultas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-C. Bulbo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura apresentando camadas musculares longitudinal interna e circular externa compactas e células livres entre as fibras. A cutícula reveste e forma o espinho na extremidade do bulbo. Epitélio pseudoestratificado com núcleos circulares sobrepostos. D. Bulbo de abelha adulta com camadas musculares compactas e pouco espaçadas. E. Células musculares longitudinais calibrosas com estriações transversais, epitélio com núcleos circulares e pouco espaço citoplasmático e cutícula densa no bulbo de abelha adulta. F. Células musculares circulares externa em vista transversal e camada muscular longitudinal próxima ao epitélio do bulbo em abelha adulta. mc: músculo circular; ml: músculo longitudinal; ct: cutícula; ep: epitélio; es: espinhos cuticulares; bu: bulbo.

A válvula estomodeal nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara está voltada para o interior do papo (Figura 3A-B). Com a eversão que ocorre na pupa de olho marrom com tórax medianamente pigmentado, a válvula estomodeal se torna voltada para o intestino médio (Figura 3C). A partir da pupa de olho marrom com tórax de pigmentação escura, a válvula, voltada para o intestino médio, continua a passar por modificações em sua morfologia (Figura 3D-E), até a sua posição funcional na abelha adulta (Figura 3F).

A válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara voltada para o interior do papo apresenta dois folhetos epiteliais que convergem para a porção terminal e um aparente ponto de abertura (Figura 4A). A parede dupla que fecha a passagem entre os intestinos, possui epitélio oriundo do intestino anterior pseudoestratificado com núcleos pequenos e em diferentes alturas, enquanto aquele do intestino médio apresenta células colunares e núcleos ovais (Figura 4B). O duplo epitélio da válvula estomodeal apresenta muitas dobras e células com formato irregular e núcleos ovais (Figura 4C-D). Entre os epitélios há uma fina membrana basal e as células são revestidas por fina cutícula (Figura 4E). É possível observar células migrando para a membrana basal (Figura 4F).

Algumas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara, apresentaram os folhetos epiteliais da válvula estomodeal espaçados com desaparecimento da membrana basal (Figura 5A). O epitélio apresenta diminuição na quantidade de dobras e válvula ainda voltada para o papo (Figura 5B). As células da válvula estomodeal apresentam formato irregular com núcleos ovais e revestidas por cutícula (Figura 5C). Células livres entre os dois folhetos epiteliais da válvula estomodeal podem ser fusiformes ou globosas com inúmeros vacúolos citoplasmáticos acidófilos ou células vermiformes basófilas (Figura 5D-F).

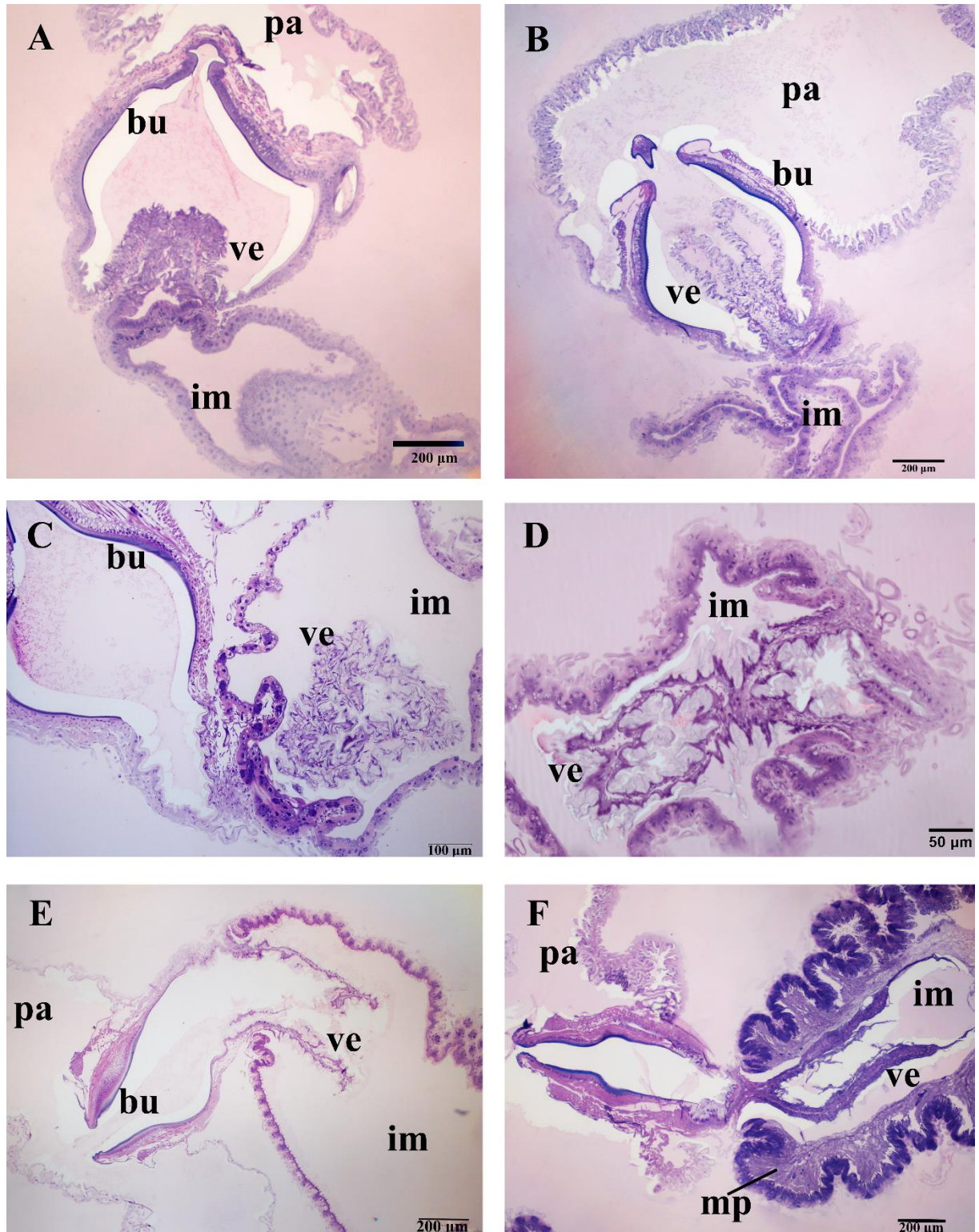


Figura 3. Micrografias de luz da eversão da válvula estomodeal de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara com a válvula estomodeal voltada para o interior do proventrículo. C. Pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média com válvula estomodeal no interior do intestino médio. D-E. Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura com válvula estomodeal no intestino médio. F. Válvula estomodeal em abelha adulta. pa: papo; bu: bulbo do proventrículo; ve: válvula estomodeal; im: intestino médio; mp: membrana peritrófica.

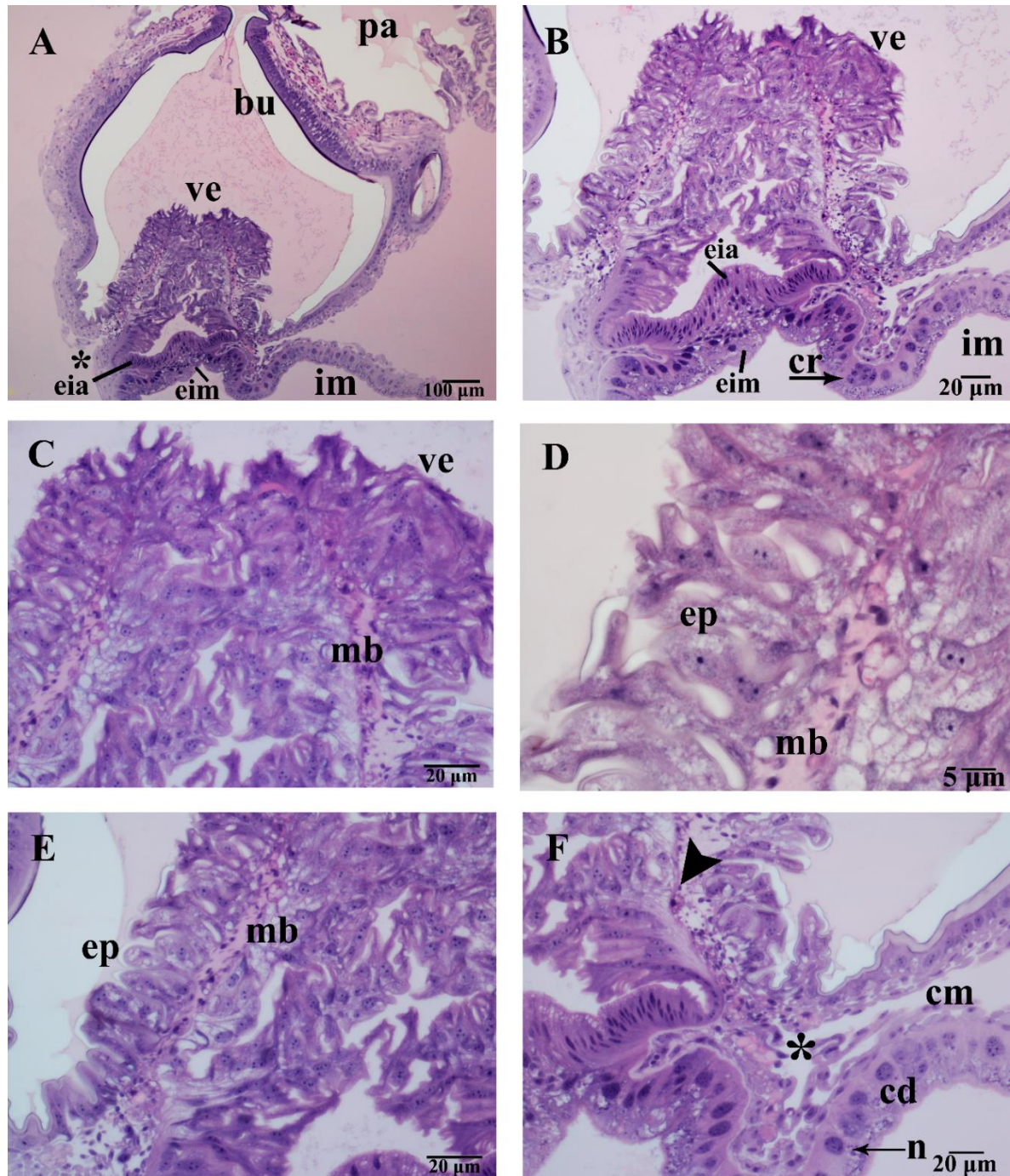


Figura 4. Micrografias de luz da região do proventrículo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Proventrículo em formação mostrando a válvula estomodeal em seu interior. B. Epitélio da válvula estomodeal com limites intercelulares imprecisos e passagem fechada entre os intestinos anterior e médio. C-E. Folhetos epiteliais irregulares da válvula estomodeal. F. Aparente abertura na região do pescoço do proventrículo (asterisco) e célula em migração (ponta de seta). pa: papo; bu: bulbo; ve: válvula estomodeal; im: intestino médio; eia: epitélio do intestino anterior; eim: epitélio do intestino médio; cr: células regenerativas; mb: membrana basal; ep: epitélio; cm: camada muscular; cd: células digestivas; n: núcleo.

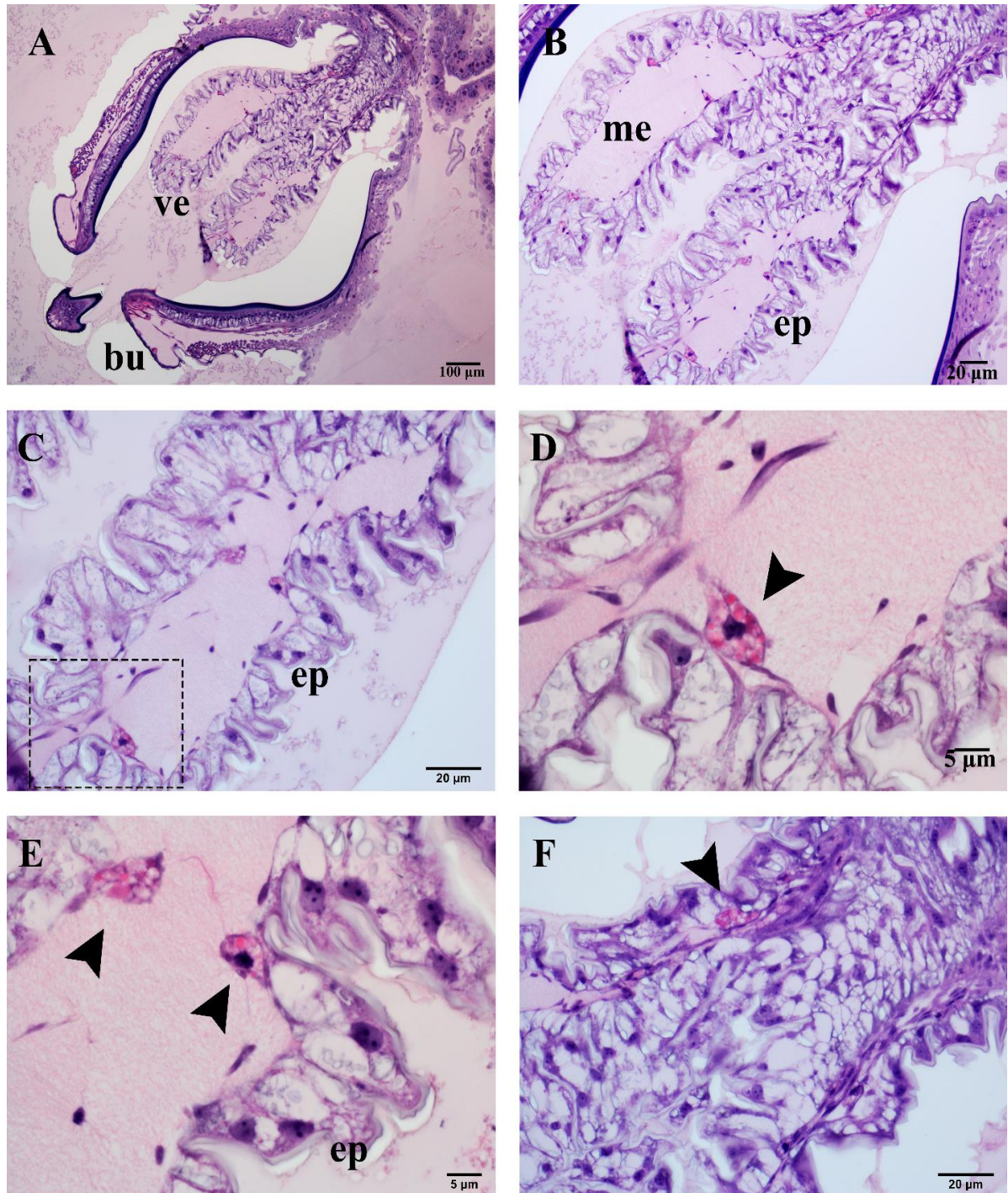


Figura 5. Micrografias de luz da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Válvula estomodeal no interior do proventrículo. C- Matriz extracelular entre os dois epitélios da válvula. D. Detalhe de quadro pontilhado em C mostrando célula livre no interior da válvula. E. Células livres (pontas de seta). F. Célula migrando na base da válvula (ponta de seta). ve: válvula estomodeal; bu: bulbo; me: matriz extracelular; ep: epitélio.

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média a válvula estomodeal ocorre tanto voltada para o papo com a passagem fechada para o intestino médio (Figura 6A) ou em direção ao intestino médio (Figura 6F), caracterizando a ocorrência da eversão. Em ambos os casos, o epitélio, revestido por cutícula, possui dobras e grande espaçamento entre os folhetos epiteliais da válvula estomodeal (Figura 6B) com células de formato irregular e ausência de membrana basal (Figura 6C). Entre os dois epitélios da válvula estomodeal há abundância de células livres vacuolizadas e globosas (Figura 6D-E).

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura a válvula estomodeal possui espaçamento estreito entre os folhetos epiteliais, alongamento do epitélio ainda sem membrana basal definida e passagem aberta para o intestino médio (Figura 7A-C). As células da válvula estomodeal possuem formato irregular, núcleos ovais e nucléolos evidentes (Figura 7D). A cutícula reveste todo epitélio da válvula (Figura 7E-F).

As células livres em migração entre os dois epitélios da válvula estomodeal se tornam raras (Figura 8A), com diminuição do espaço entre os folhetos epiteliais (8B-D).

Após a eversão, a válvula estomodeal continua com modificações até a abelha adulta, onde as células do folheto externo são altas, enquanto o folheto interno possui células baixas (Figuras 9A-B). As células são justapostas e separadas por uma fina membrana basal (Figura 9C). Os núcleos são ovais com nucléolos evidentes (Figura 9D). A cutícula espessa reveste toda a válvula estomodeal e raramente é possível ver células livres entre os epitélios (Figura 9E).

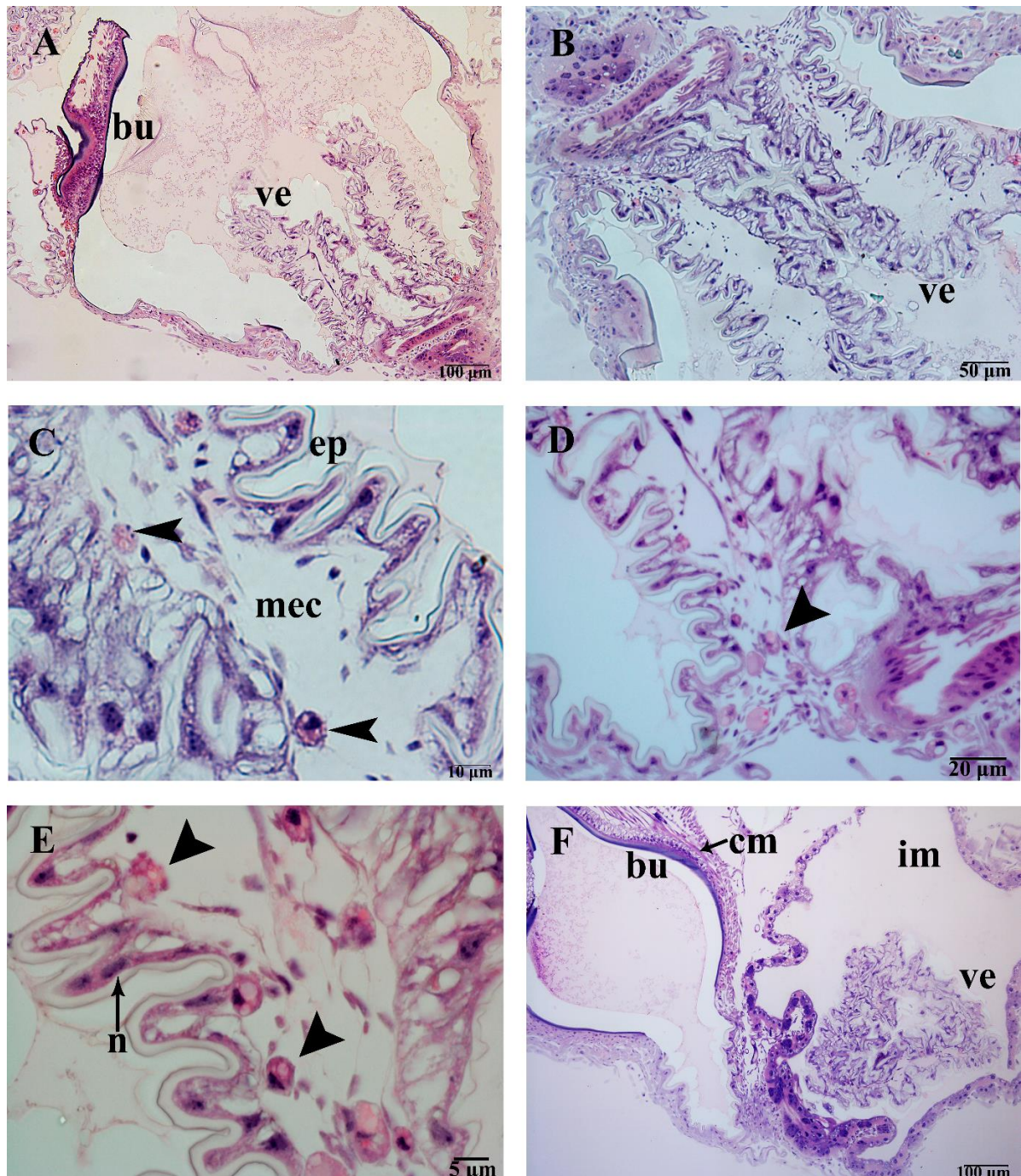


Figura 6. Micrografias de luz da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Válvula estomodeal voltada para o interior do papo. B. Folhetos epiteliais apresentando espaçamento. C. Células da válvula finas e de formato irregular e células livres entre os folhetos epiteliais. D-E. Células livres em migração na base da válvula com vacúolos citoplasmáticos (pontas de seta). F. Válvula evertida em direção ao intestino médio. bu: bulbo; ve: válvula estomodeal; ep: epitélio; mec: matriz extracelular; n: núcleo; cm: camada muscular; im: intestino médio.

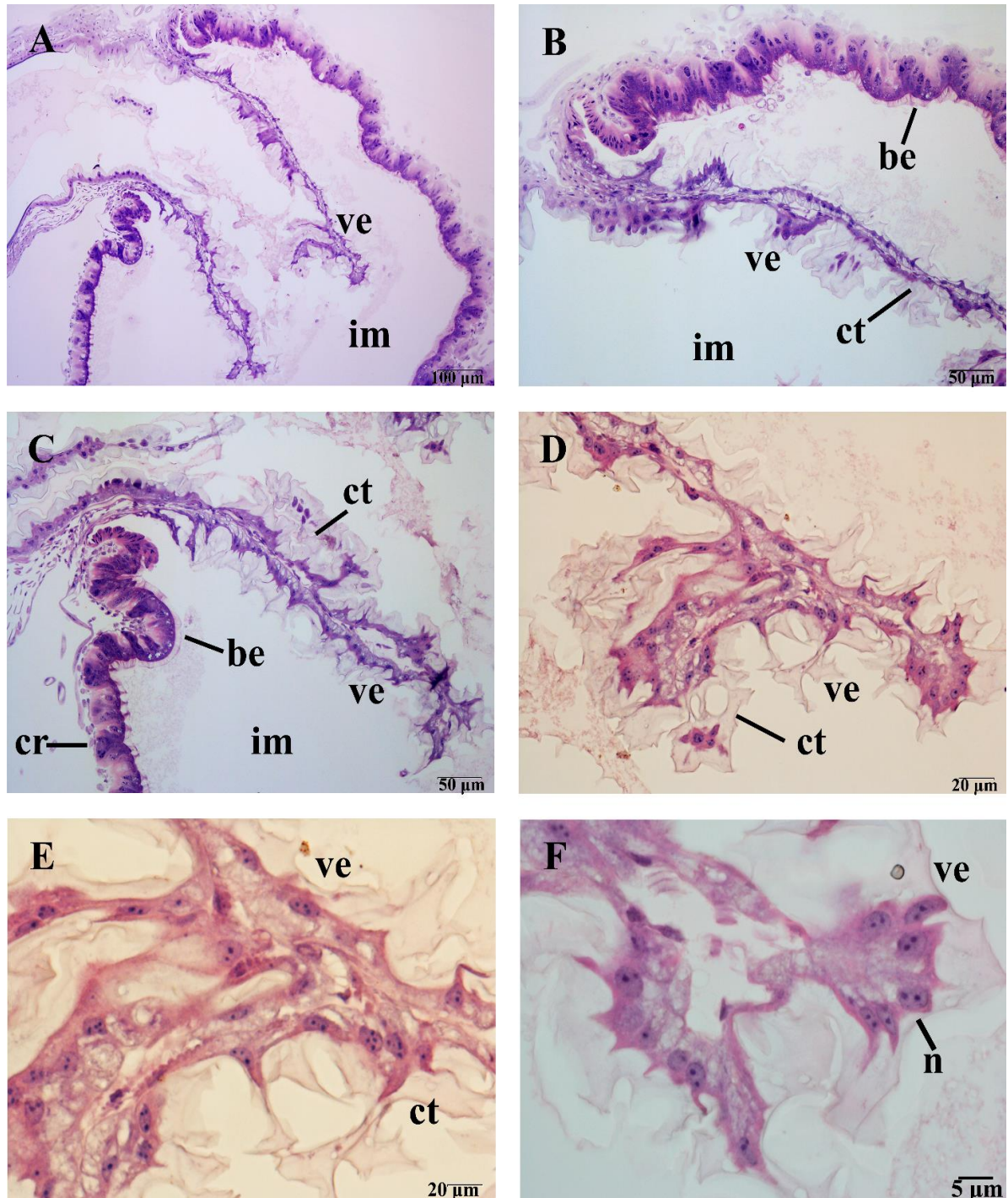


Figura 7. Micrografias de luz da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Válvula estomodeal no interior do intestino médio. B-C. Epitélios da válvula revestidos por cutícula em proximidade ao epitélio simples colunar com borda em escova do intestino médio. D-F. Epitélios da válvula de formato irregular revestido por cutícula e estreitamento do espaço entre os epitélios. ve: válvula estomodeal; im: intestino médio; be: borda estriada; ct: cutícula; cr: células regenerativas; n: núcleo.

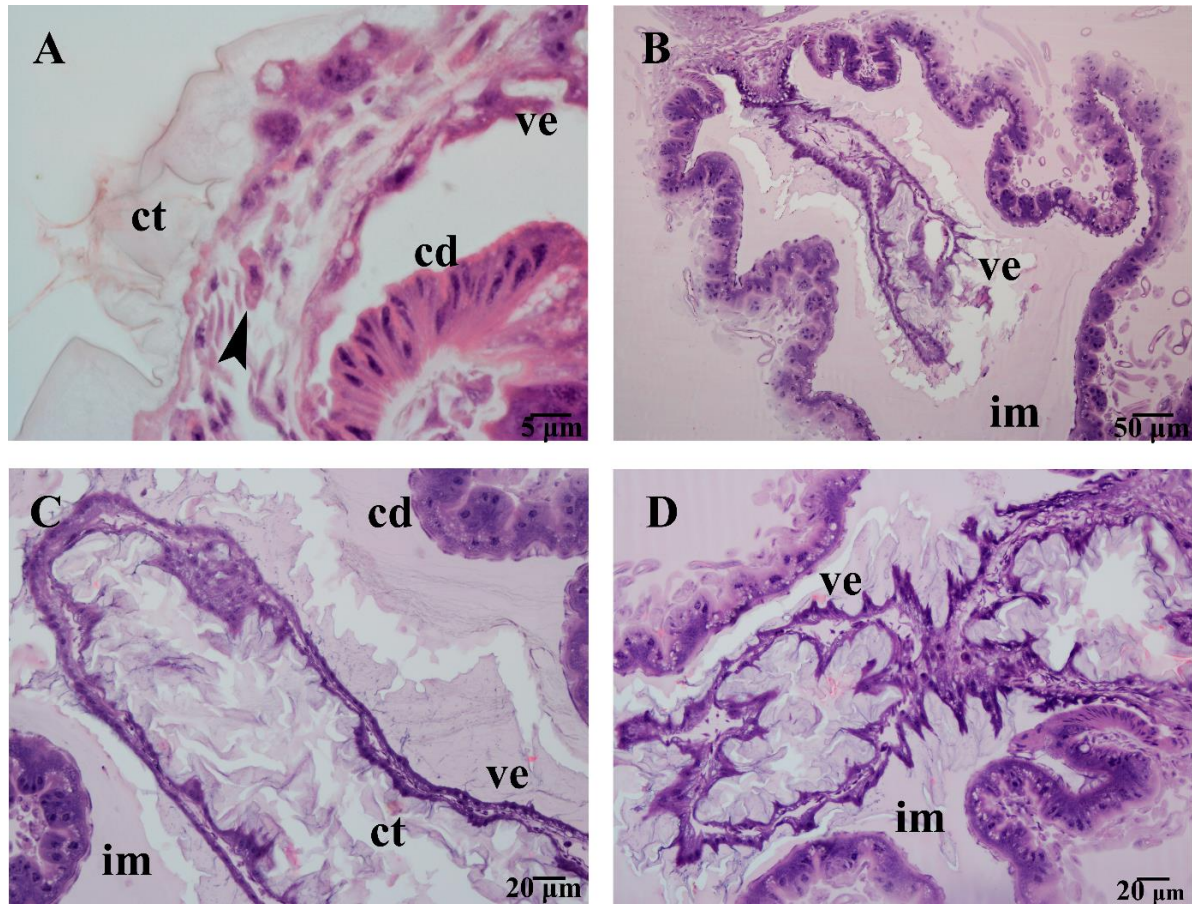


Figura 8. Micrografias de luz da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Célula em migração na base da válvula (seta). B-D. Diminuição do espaço entre os folhetos epiteliais após a eversão da válvula para o intestino médio. ct: cutícula; ve: válvula estomodeal; cd: células digestivas; im: intestino médio.

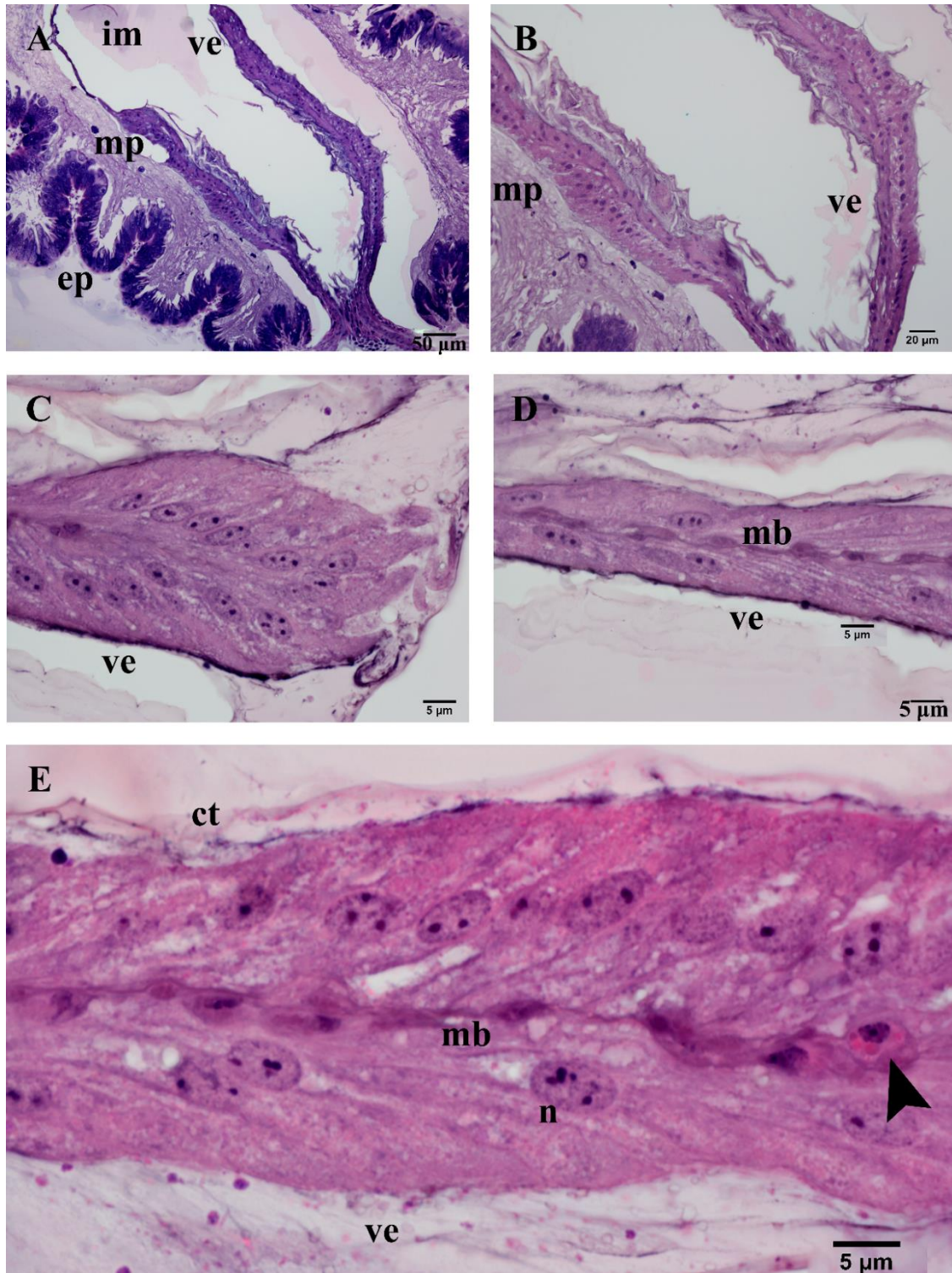


Figura 9. Micrografias de luz da válvula estomodeal de operárias adultas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Válvula estomodeal revestida por cutícula no lúmen do intestino médio em proximidade com a membrana peritrófica. C-D. Folhetos epiteliais da válvula delimitados externamente por cutícula e membrana basal entre eles. E. Células justapostas com núcleos ovais e nucléolos evidentes. Fina camada de membrana basal e célula com vacúolos no citoplasma entre os epitélios da válvula (ponta de seta). im: intestino médio; ve: válvula estomodeal; mp: membrana peritrófica; ep: epitélio; mb: membrana basal; ct: cutícula; n: núcleo.

## 4.2 Imunofluorescência

Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, fase em que ocorre a eversão da válvula estomodeal, apresentaram muitas células positivas para o anticorpo anti-caspase 3 clivada no epitélio da válvula estomodeal e fibras musculares bem desenvolvidas no intestino médio (Figura 10A-D).

As pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura apresentaram poucas células positivas ao anticorpo anti-caspase 3 clivada (Figura 10E). A detecção de F-actina destaca uma trama muscular bem desenvolvida com fibras que se intercalam para formar as camadas musculares do intestino médio (Figura 10F).

Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média apresentaram muitas células positivas para o anticorpo anti-Notch no epitélio da válvula estomodeal e células musculares formando redes (Figura 11A-B).

As pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura não apresentaram marcação significativa para o anticorpo anti-Notch (Figura 11C-D).

As pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média apresentaram muitas células positivas para o anticorpo anti-histona H3 fosforilada na válvula estomodeal (Figura 12A). A detecção de F-actina destaca uma trama muscular bem definida (Figura 12B).

Pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura não apresentaram marcação significativa para o anticorpo anti-histona H3 fosforilada (PHH3) (Figura 12C-D).

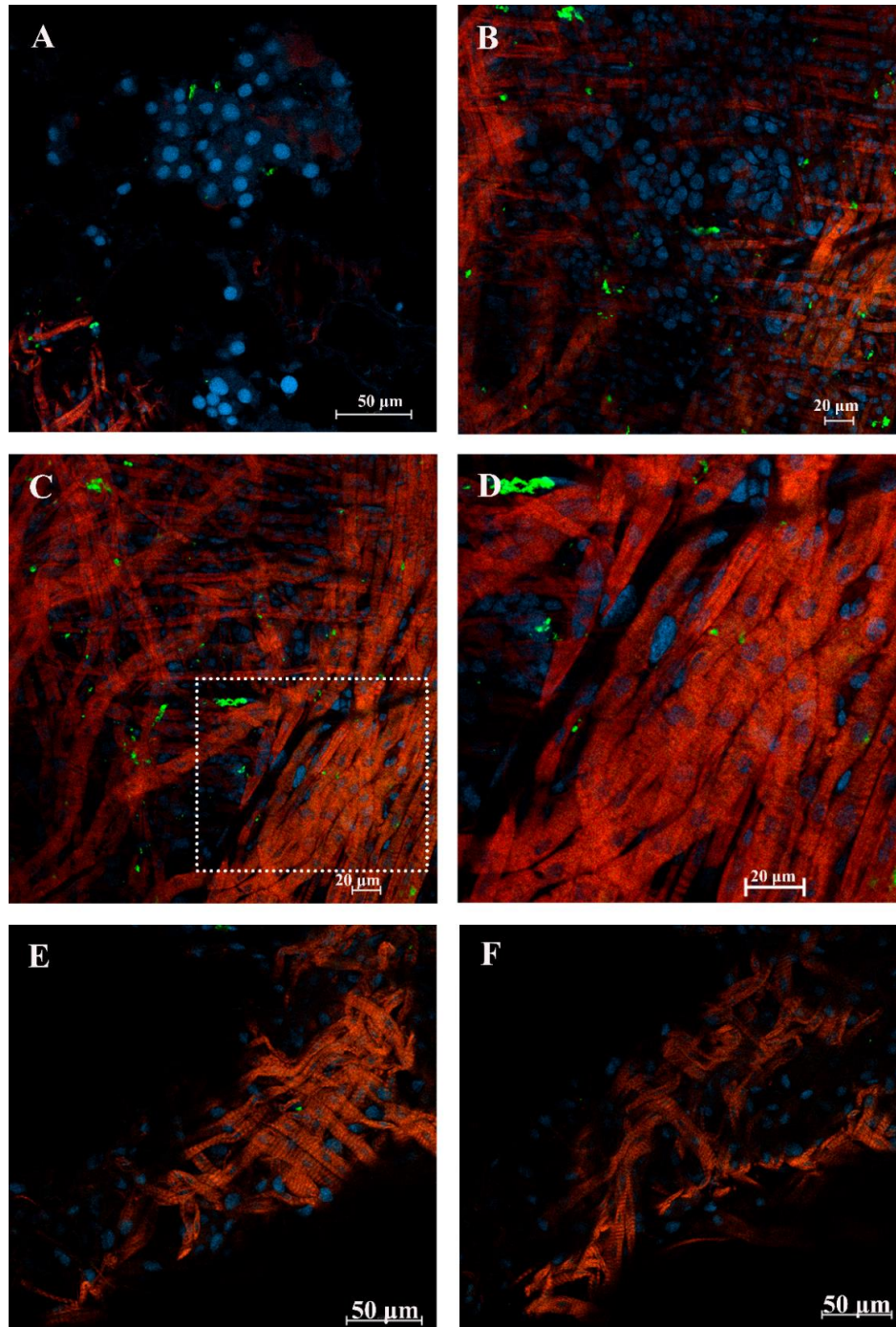


Figura 10. Imunofluorescência para caspase 3 clivada da região da válvula estomodeal de pupas de olho marrom de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Células da válvula positivas para o anticorpo anti-caspase 3 clivada em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, detecção de F-actina nas células musculares e núcleos marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). C-D. Marcação positiva para o anticorpo anti-caspase 3 clivada entre as fibras musculares longitudinais e circulares do intestino médio e detalhe das fibras longitudinais de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média (quadro pontilhado em C). E-F. Uma célula positiva ao anticorpo anti-caspase 3 clivada e detecção de F-actina nas fibras musculares do intestino médio em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura.

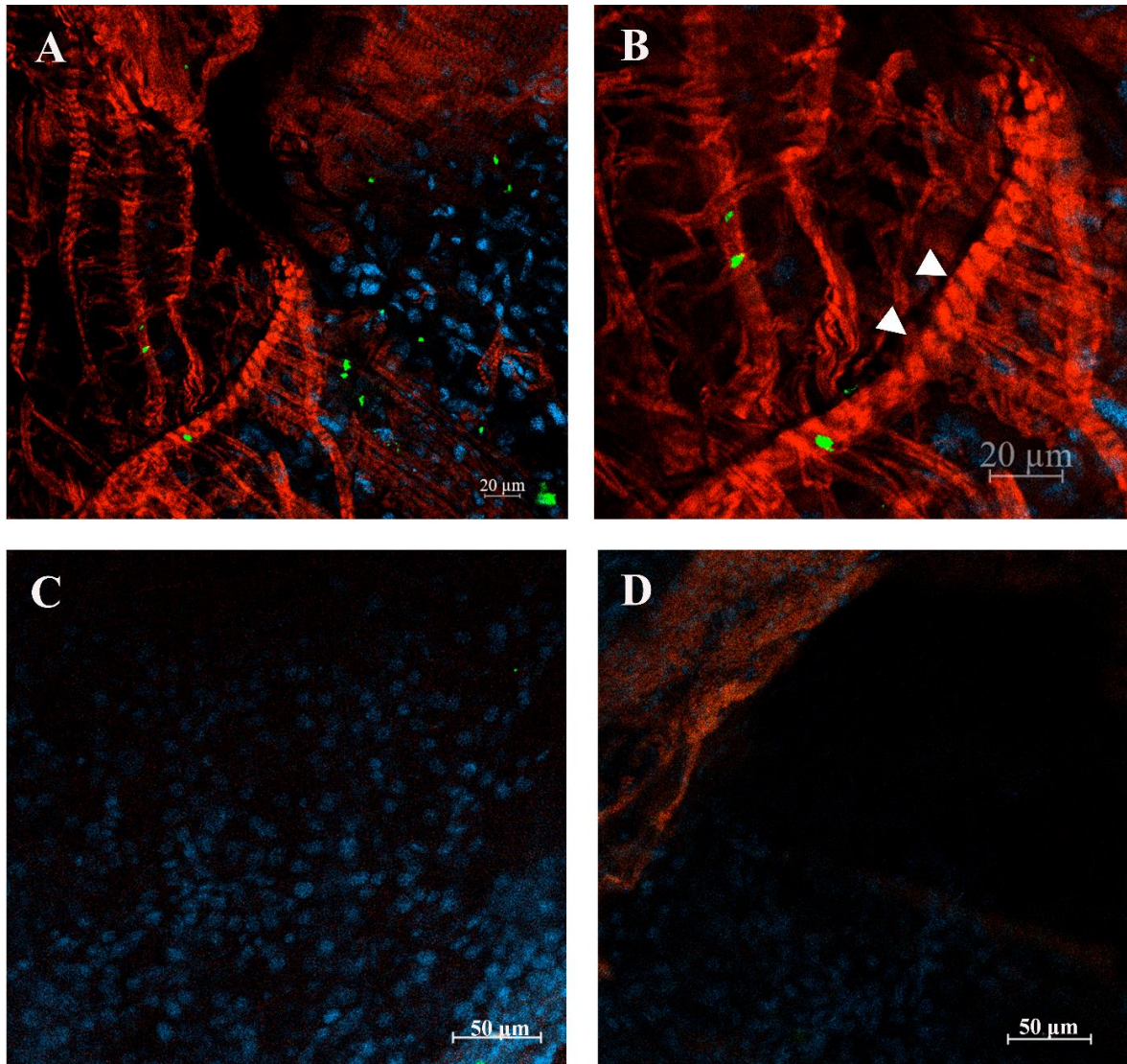


Figura 11. Imunofluorescência para via Notch da região da válvula estomodeal de pupas de olho marrom de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Células positivas para o anticorpo anti-Notch em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média. Detecção de F-actina em células musculares calibrosas que se subdividem em pequenos ramos e estriações aparentes (pontas de seta). C-D. Não houve marcação significativa para o anticorpo anti-Notch em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura. Detecção de F-actina de células musculares em vermelho.

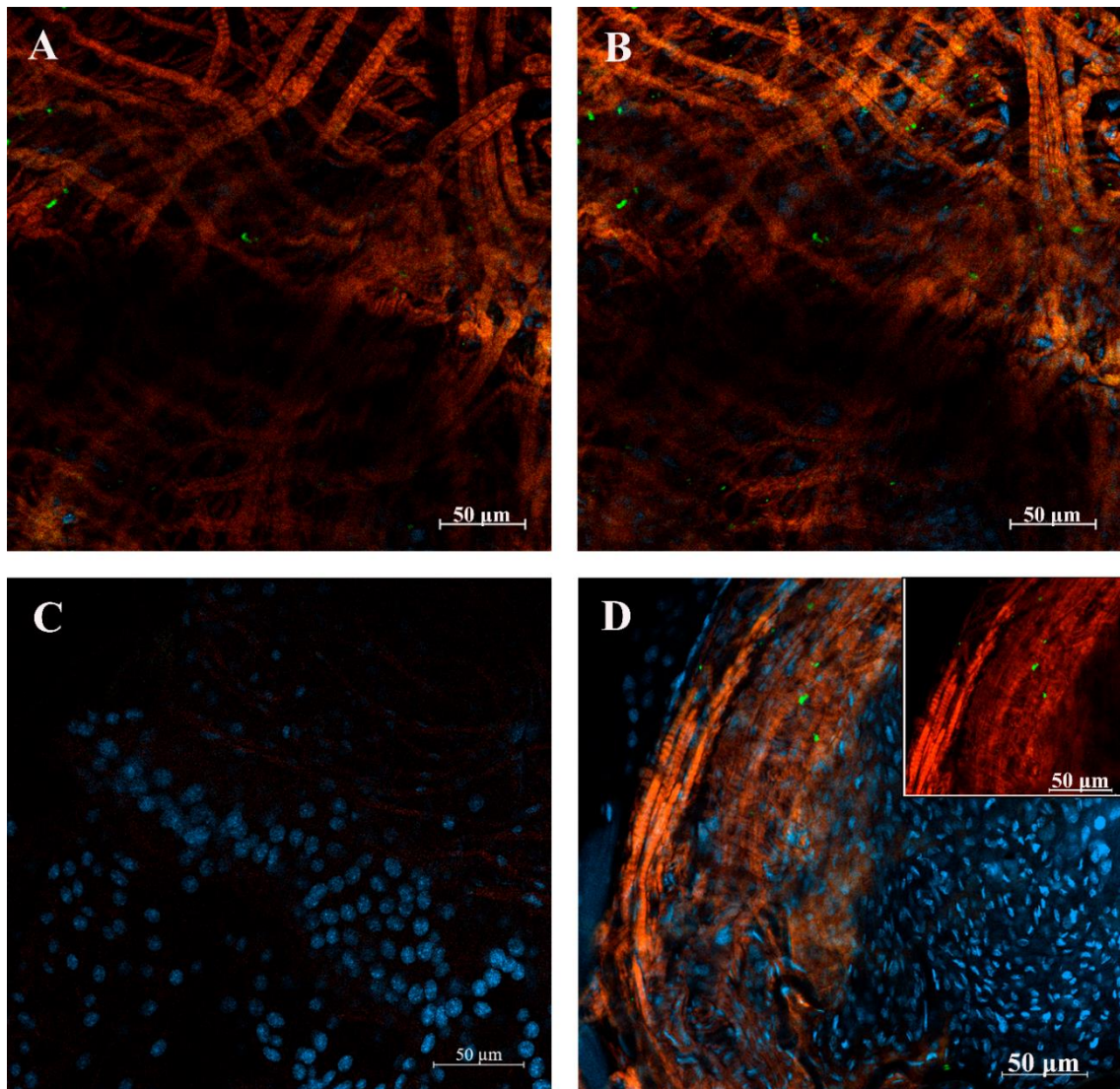


Figura 12. Imunofluorescência para histona H3 fosforilada (PHH3) da região da válvula estomodeal de pupas de olho marrom de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Células positivas para o anticorpo anti-histona H3 fosforilada (PHH3) em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média e detecção de F-actina na trama muscular. C-D. Poucas células positivas para PHH3 em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura e visualização de canal único para actina em células musculares positivas para PHH3 (insert).

As camadas longitudinais e circulares se intercalam, formando uma rede muscular que envolve a região de transição entre os intestinos anterior e médio em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média (Figura 13A-B) e pigmentação escura (Figura 13C). Na região do bulbo do proventrículo, a camada muscular aparece compacta (Figura 13D). Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, as fibras musculares são bem definidas com estriações transversais aparentes e núcleos centrais que podem formar fileiras (Figura 13E-F).

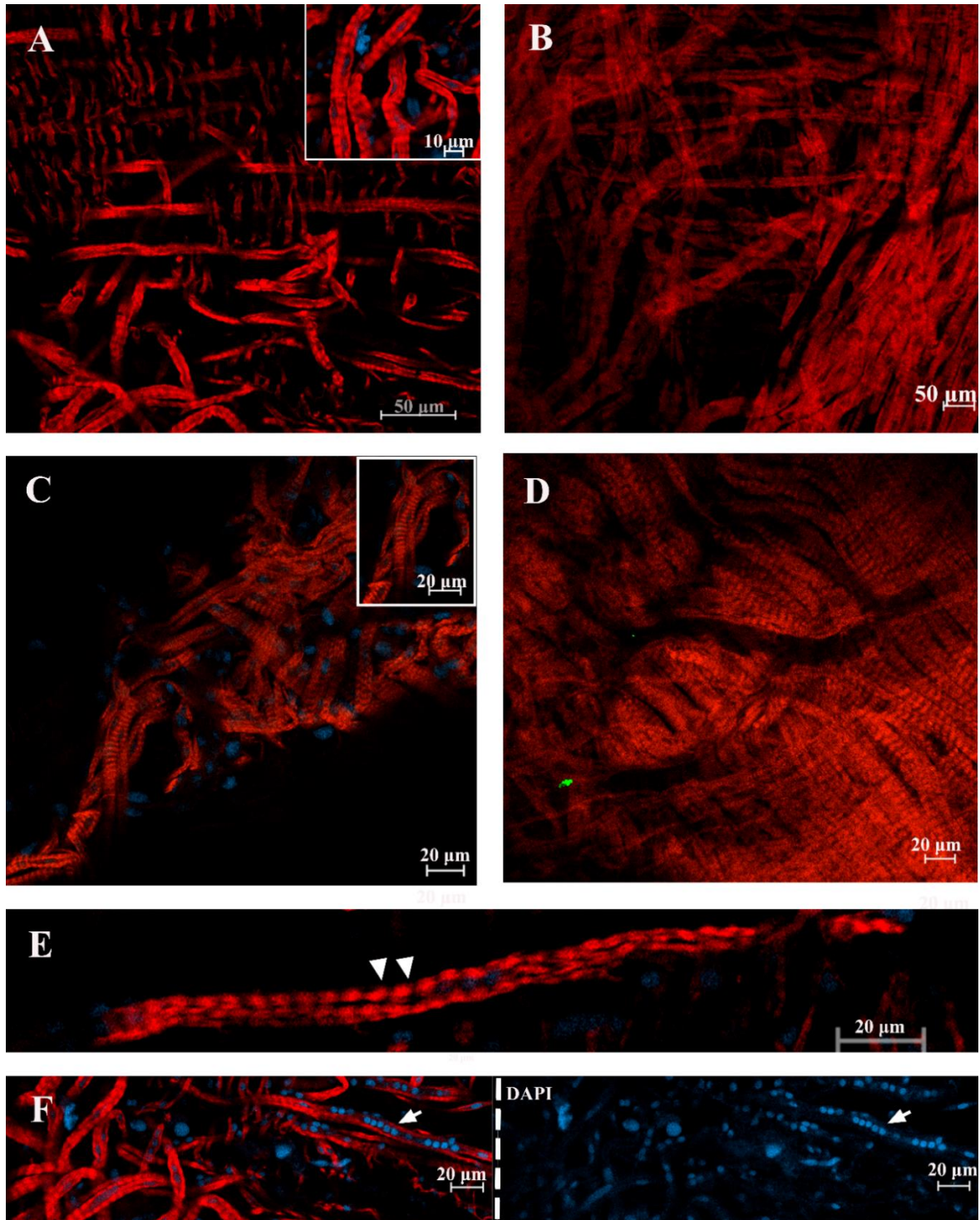


Figura 13. Imunofluorescência da região da válvula estomodeal de pupas de olho marrom de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Detecção de F-actina nas fibras musculares longitudinais e circulares em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média. Destaque dos núcleos centrais das células musculares (insert em A). C. Feixe de células musculares intercaladas em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura e detalhe dos núcleos (insert em C). D. Camada compacta de fibras musculares no bulbo de pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média com uma célula muscular positiva para o anticorpo Notch. E-F. Estriações transversais (pontas de seta) e núcleos em fileiras (setas) em fibra muscular em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média.

### 4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Em pupas de olho rosa, as células da parede epitelial que separa os intestinos anterior e médio apresentam superfície irregular com projeções no domínio apical e ausência de cutícula (Figura 14A). Numerosas mitocôndrias estão presentes no citoplasma, algumas com espaço na matriz e sinais de degeneração (Figura 14B). Os núcleos possuem cromatina descondensada e nucléolos bem desenvolvidos e depósitos com material flocular estão presentes no citoplasma (Figura 14C). As interdigitações sinuosas delimitam os limites entre as células justapostas (Figura 14D), porém o domínio basal apresenta espaços acentuados e fina membrana basal próxima às células epiteliais (Figura 14E-F).

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara, a superfície das células da válvula estomodeal é plana (Figura 15A). Na região apical a cutícula é mais densa na região da epicutícula e fibrilar à medida que se aproxima do ápice celular (Figura 15B). O citoplasma apresenta poucas mitocôndrias e há formação de vesículas no domínio apical (Figura 15C). Retículo endoplasmático rugoso aparece em meio a depósitos de material denso não delimitados por membrana (Figura 15D, F). Os limites celulares são sinuosos entre as células que possuem nessa fase formato fino e irregular (Figura 15E).

Nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, a superfície cuticular se revela irregular com reentrâncias e pouco material fibrilar próximo à superfície das células da válvula estomodeal (Figura 16A). A superfície das células apresenta muitas invaginações e formação de vesículas, além de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma apical (Figura 16B-C). O citoplasma contém poucas mitocôndrias e núcleo com cromatina descondensada (Figura 16D-E). O domínio basal apresenta espaços intercelulares, material fibrilar e presença de células livres na região da matriz extracelular (Figura 16F).

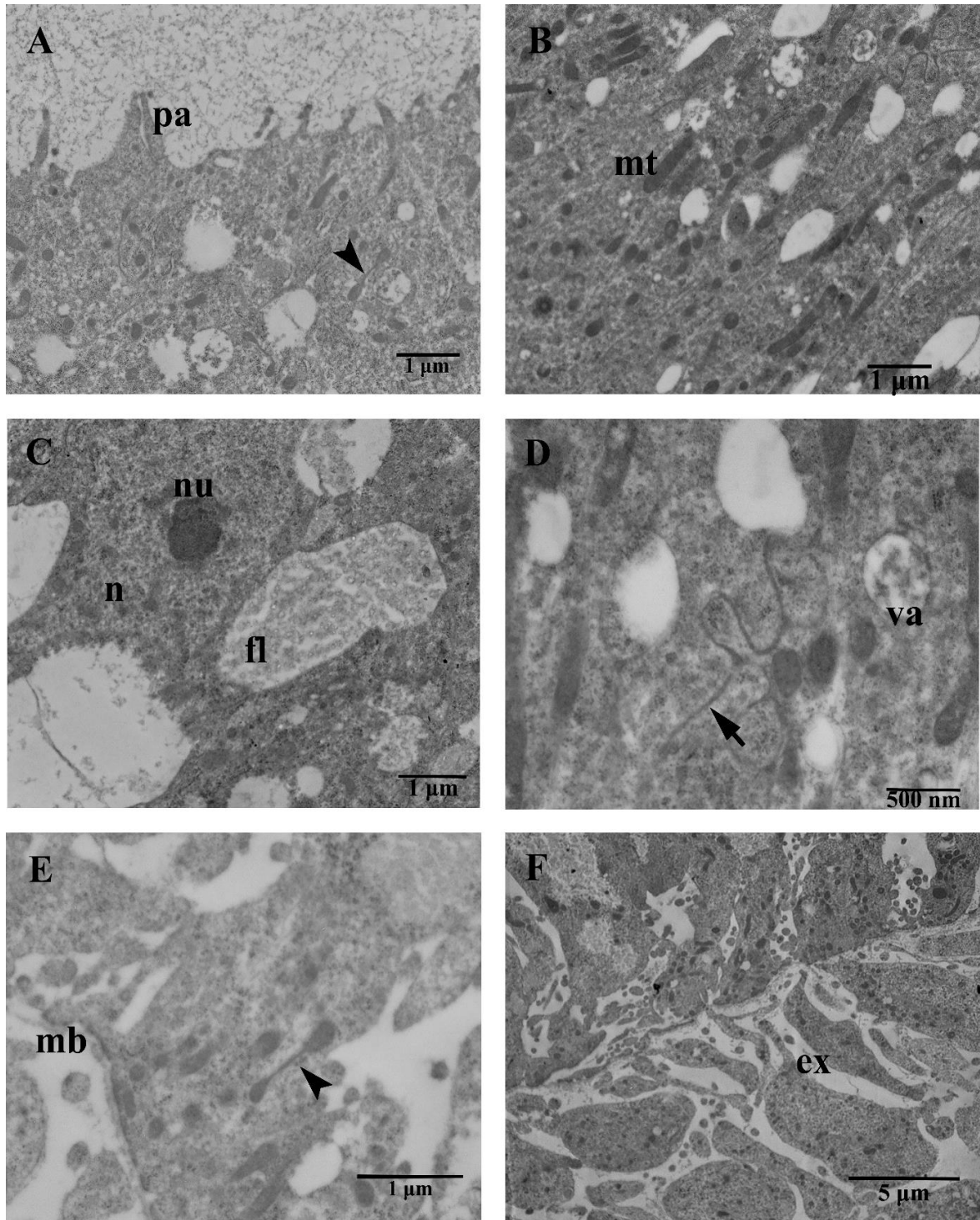


Figura 14. Micrografias eletrônicas de transmissão da parede obstrutiva para o intestino médio de pupas de olho rosa de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Superfície apical das células com mitocôndria com sinal de degeneração (ponta de seta). B. Mitocôndrias. C. Núcleos celulares adjacentes a depósito de material floculado. D. Limites celulares sinuosos (seta). E. Mitocôndrias com sinais de degeneração (ponta de seta). F. Labirinto basal com espaços acentuados. pa: projeções apicais; mt: mitocôndrias; nu: nucléolo; n: núcleo; fl: material floculado; va: vacúolos; mb: membrana basal; ex: espaço extracelular.

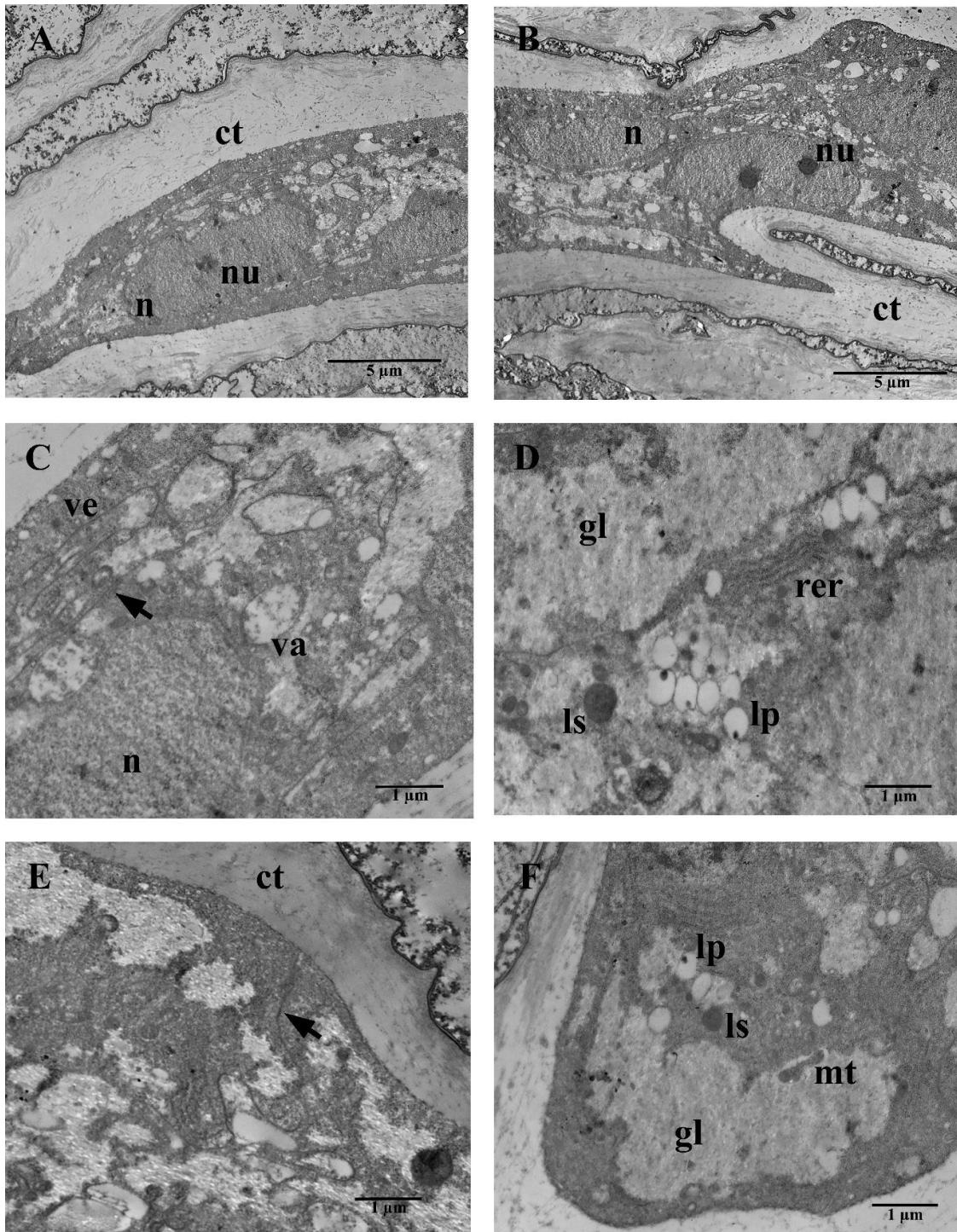


Figura 15. Micrografias eletrônicas de transmissão das células da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A. Célula da válvula com superfície regular. B. Células da válvula de formato irregular e revestidas por cutícula. C. Formação de vesículas na superfície das células com limites intercelulares sinuosos (seta) e vacúolos no citoplasma. D. Citoplasma de célula da válvula com retículo endoplasmático rugoso, gotas lipídicas, lisossomos e depósitos de glicogênio. E. Detalhe de limite celular sinuoso no ápice celular (seta). F. Presença de mitocôndrias no interior dos depósitos de glicogênio. ct: cutícula; n: núcleo; nu: nucléolo; ve: vesículas; va: vacúolo; gl: glicogênio; rer: retículo endoplasmático rugoso; ls: lisossomo; lp: lipídeos; m: mitocôndria.

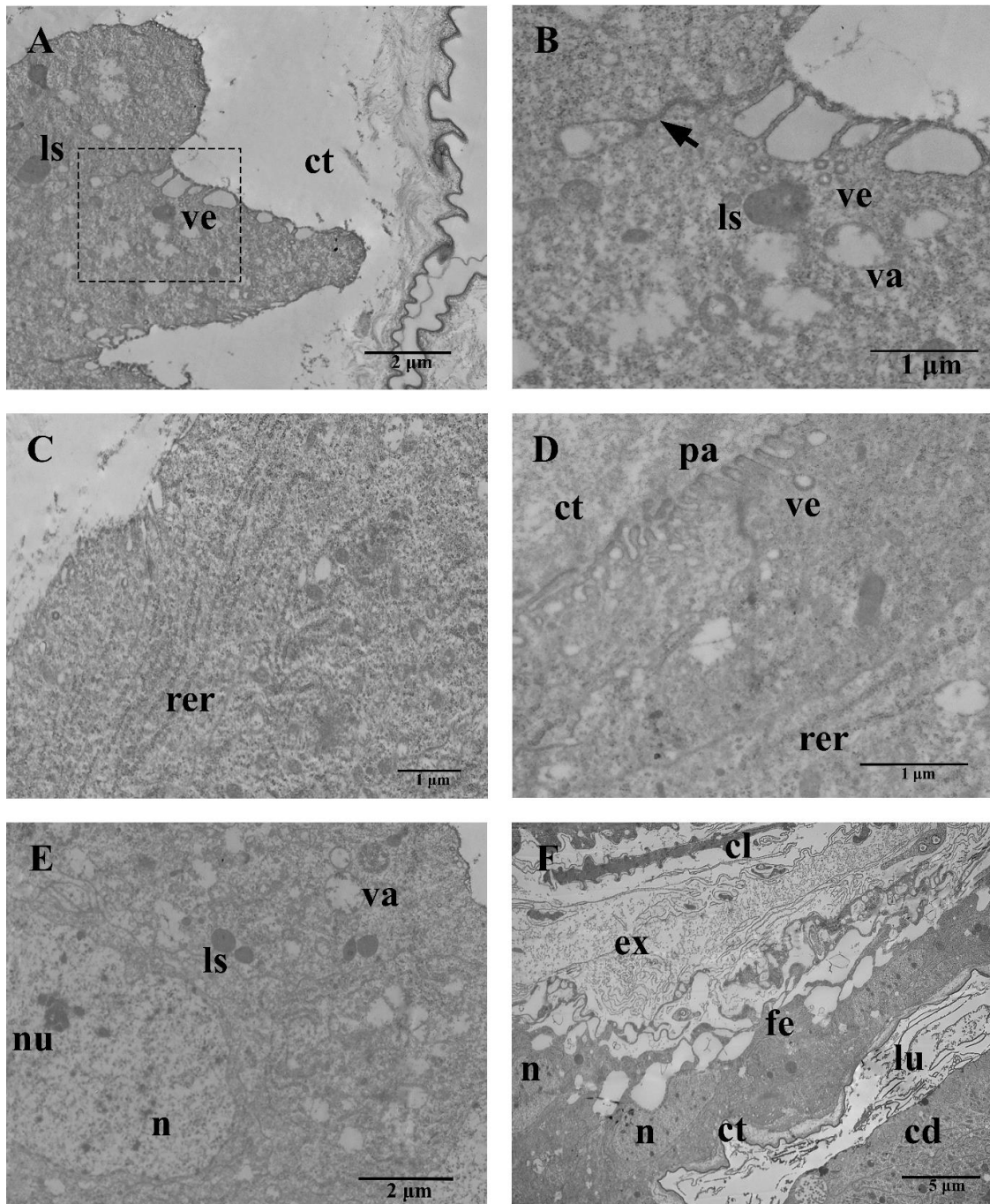


Figura 16. Micrografias eletrônicas de transmissão das células da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Superfície apical revestida por cutícula e com formação de vesículas e limite intercelular (seta). C-D. Abundância de retículo endoplasmático rugoso. E. Núcleo com cromatina descondensada. F. Espaço extracelular entre os folhetos epiteliais com presença de células livres. ls: lisossomos; ve: válvula estomodeal; ct: cutícula; ve: válvula estomodeal; va: vacúolo; rer: retículo endoplasmático rugoso; pa: projeções apicais; nu: nucléolo; n: núcleo; cl: célula livre; ex: espaço extracelular; fe: folheto epitelial externo da válvula; lu: lúmen do intestino médio; cd: células digestivas.

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura, as células da válvula estomodeal apresentam cutícula de superfície irregular, com região apical mais elétron-densa e material fibrilar subjacente (Figura 17A). O domínio celular apical possui projeções irregulares e vesículas (Figura 17B). O citoplasma possui poucas mitocôndrias, porém rico em vacúolos e núcleo possui cromatina descondensada e nucléolos bem definidos (Figura 17C). O domínio celular basal apresenta estreitamento dos espaços do labirinto basal e material fibrilar na matriz extracelular (Figura 17D). Neste espaço da matriz, células livres delgadas e fusiformes estão presentes entre o material fibrilar, assim como traqueíolas (Figura 17E-F).

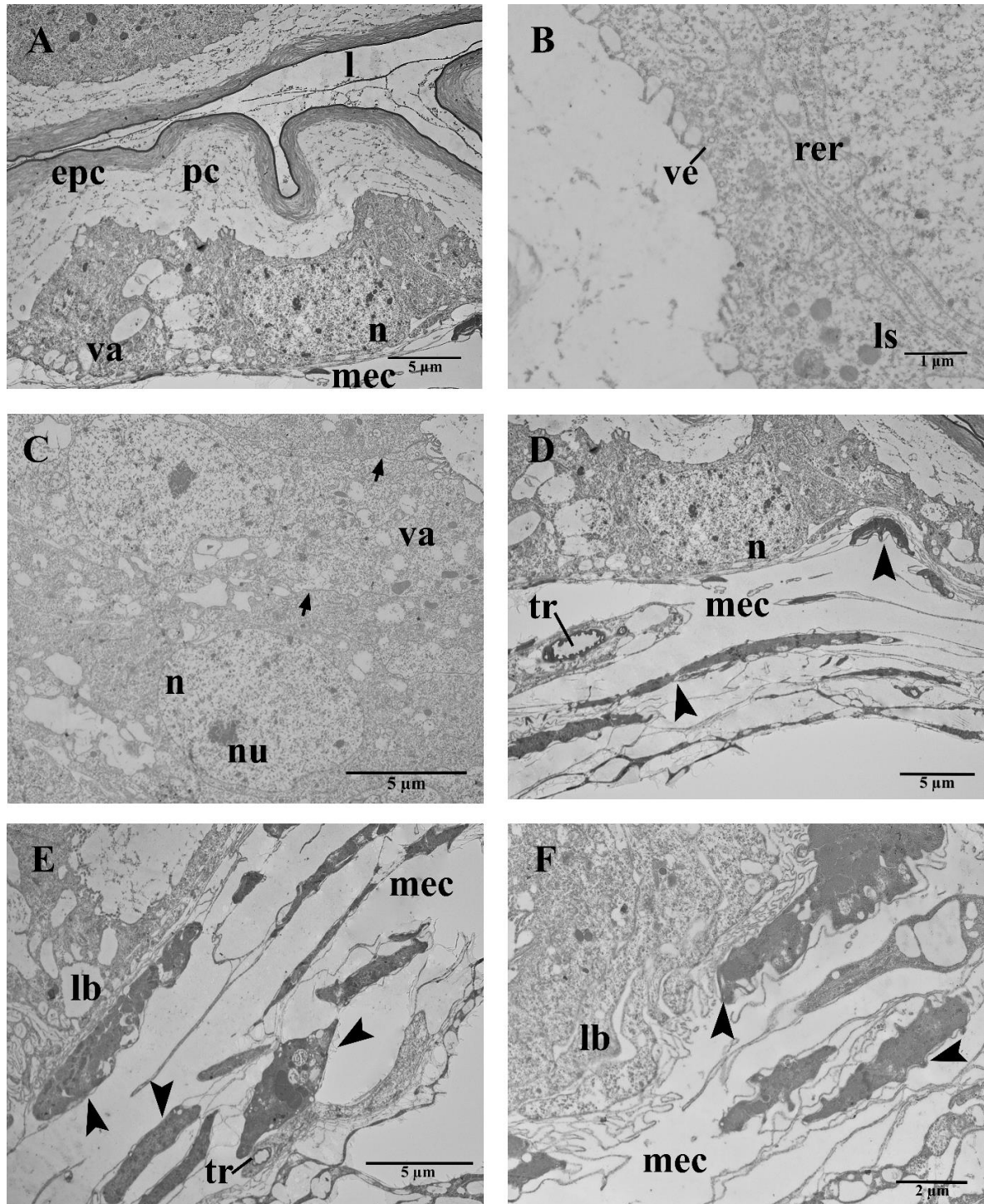


Figura 17. Micrografias eletrônicas de transmissão das células da válvula estomodeal de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). A-B. Superfície apical das células da válvula revestidas por cutícula. C. Região do citoplasma com núcleos, vacúolos e limites intercelulares (setas). D-F. Células livres no espaço entre os folhetos epiteliais da válvula. epc: epicutícula; pc: procutícula; va: vacúolo; n: núcleo; mb: membrana basal; l: lúmen; ve: vesículas; rer: retículo endoplasmático rugoso; ls: lisossomos; nu: nucléolo; tr: traquéolas; mec: matriz extracelular; lb: labirinto basal.

## 5. DISCUSSÃO

A válvula estomodeal constitui uma parte importante do canal alimentar de *A. mellifera* ao controlar o fluxo do alimento, porém são poucos os estudos sobre sua eversão durante a fase de pupa e alterações morfológicas e dos processos intracelulares envolvidos.

As alterações morfológicas do bulbo do proventrículo ocorrem enquanto a morfogênese da válvula estomodeal se desenvolve. O aumento gradual na quantidade e diâmetro nas células musculares do bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara e média se deve à regeneração das camadas musculares após ruptura das miofibrilas e fusão de mioblasto mononucleares, como relatado em *A. mellifera* (Cruz-Landim e Cavalcante, 2003), *D. melanogaster* (Lee e Chen, 2019) e *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (Smit e Velzing, 1986). As células colunares com núcleos de conformação circular do epitélio do bulbo são justapostas devido às junções intercelulares do epitélio presentes nos insetos (Matter e Balda, 2003). A vacuolização nesse epitélio, observada em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara e média e encontrada na região basal das células pode indicar armazenamento de substâncias já que os vacúolos estão associados à essa função, como observado nos vacúolos com produtos de digestão intracelular de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae) (Poiani e Cruz-Landim, 2007). A ocorrência de células livres globosas permeando as fibras musculares que se inicia na pupa de olho marrom com tórax de pigmentação clara e aumenta conforme a pigmentação do tórax acentua, pode ser devido a mecanismos de defesa, visto que essas células se assemelham a hemócitos (Braeckman *et al.*, 2025).

No bulbo do proventrículo de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura, a compactação e aumento no número das células musculares que promovem a aproximação das camadas circulares e longitudinais são características típicas da musculatura em crescimento que estará presente também na fase adulta destas abelhas, como relatado em *D. melanogaster* (Kaya-Çopur *et al.*, 2021). A diminuição da quantidade de células livres entre as fibras musculares mostra que pode haver uma menor necessidade de defesa ou fagocitose de restos celulares após o desenvolvimento desta região, visto que essas são funções de hemócitos (Hystad *et al.*, 2017). Os espinhos bem desenvolvidos se devem à alta esclerotização da cutícula que forma estas projeções características do bulbo, como relatado em abelhas solitárias da subfamília Apinae como *Centris (Centris) aenea* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) (Serrão, 2005). A diminuição da vacuolização nas células do epitélio pseudoestratificado pode ser devido à rearranjo celular que aproxima as células circunvizinhas durante a morfogênese

resultando em compressão entre elas e amadurecimento de junções celulares, como relatado para *D. melanogaster* (Jacinto, Martinez-Arias e Martin, 2001).

Na fase adulta, a compactação e proximidade entre as camadas musculares do bulbo se acentua pois se encerra a fase de metamorfose pupal dando origem a musculatura bem desenvolvida que irá manter a integridade do bulbo, como relatado em formigas do gênero *Cephalotes* (Hymenoptera) (Bution, Caetano e Fowler, 2010). As camadas de epitélio do bulbo com cutícula apical espessa mostram o desenvolvimento dessa região, uma vez que juntamente com a musculatura, os espinhos cuticulares que revestem o epitélio irão exercer a função de filtração do alimento e partículas sólidas em direção ao intestino médio (Bailey, 1952), como observado em *Cephalotrigona capitata* (Hymenoptera: Meliponini) (Serrão, 2001) e abelhas solitárias (Hymenoptera: Apoidea) (Serrão, 2005; Serrão, 2007). A ausência de células livres no interior do bulbo da abelha adulta pode estar associada à idade, pois o sistema de imunidade inata fornecido por hemócitos varia com as castas, visto que estudos relatam que as nutridoras possuem maior competência imune celular que as forrageiras, que são abelhas mais velhas, desta espécie (Hystad *et al.*, 2017).

O posicionamento da válvula estomodeal para o interior do papo em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara marca o início das mudanças sucessivas que resultarão na formação definitiva da válvula (Snodgrass, 1956) como relatado para a espécie (Evenius, 1925; Guedes *et al.*, 2025). A eversão da válvula estomodeal depende da ruptura e dissolução da parede epitelial dupla que fecha a passagem entre os intestinos, que está presente desde a desintegração da válvula estomodeal na fase de pré-pupa e visualizada neste trabalho na pupa de olho rosa até o momento da eversão (Snodgrass, 1956). As características de formato irregular, fina membrana basal e revestimento de cutícula estão relacionados ao recente dobramento do epitélio do papo e a mudança gradual da cutícula do intestino anterior para uma mais espessa do adulto, como observado na metamorfose de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) (Tano *et al.*, 1988). A ocorrência de células em migração para o espaço da membrana basal pode estar associada à entrada de hemócitos trazidos pela hemolinfa, como relatado para os hemócitos perióstiais de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), os quais são levados pela hemolinfa para o interior do coração e geram respostas de defesa (League e Hillyer, 2016). A formação de espaço entre os epitélios da válvula pode estar relacionada à uma abertura transitória na dobra de epitélio do intestino anterior em direção ao papo que permite a entrada transitória de hemolinfa, como observado na passagem de hemolinfa pelos óstios do coração de adultos de *Anopheles gambiae* s.l., Giles (Diptera: Culicidae) (League, Onuh e Hillyer, 2015).

Ainda em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara, a posição no interior do papo da válvula estomodeal verificada marca o início do desenvolvimento dessa estrutura (Snodgrass, 1956). A invaginação epitelial em direção ao bulbo do proventrículo que promove a formação do duplo epitélio, se deve ao dobramento do epitélio do papo que leva ao estabelecimento da válvula e possivelmente, geram uma abertura na válvula (Evenius, 1925; Evenius, 1926; Snodgrass, 1956). A ocorrência de morfologia variável da válvula estomodeal com espaçamento entre os epitélios, embora ainda esteja direcionada ao papo, mostra que a morfogênese envolve a reorganização gradual do tecido, como observado em *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) (Shi *et al.*, 2022) e *Drosophila* (Bauer, Lehmann e Hoch, 2001). O formato celular irregular se mantém, porém, a cutícula começa a ser observada mostrando o início da formação da matriz de quitina e proteínas componentes da cutícula (Asano, 2024). A variação na forma das células livres no interior da válvula estomodeal, de fusiformes, globosas ou vermiformes, se assemelham a hemócitos que podem ser encontrados tanto na fase de larva (Kaur *et al.*, 2023) quanto na fase adulta (Marringa *et al.*, 2014) em *A. mellifera*. Além disso, a coloração por hematoxilina indica a ligação do corante com substâncias ácidas, como no núcleo dos hemócitos de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) (Bancroft e Gamble, 2008; Eskin e Bozdogan, 2022; Eskin, Öztürk e Eskin, 2025).

Nas na pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média, a eversão da válvula estomodeal para o intestino médio está associada à série de processos do desenvolvimento que formam a válvula funcional, como previamente relatado para esta espécie (Evenius, 1925; Evenius, 1926). Estas mudanças anatômicas para a formação do órgão adulto, também são observadas na remodelação do canal alimentar de *Tenebrio molitor* Linnaeus e *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) (Vommaro *et al.*, 2024). O acentuado espaçamento entre os epitélios da válvula estomodeal pode estar associado às mudanças inerentes do epitélio do proventrículo durante seu desenvolvimento, como observado em *D. melanogaster* (Pankratz e Hoch, 1995). A irregularidade da forma das células e seus núcleos e a presença de cutícula mostram a continuidade das mudanças provindas do desenvolvimento que se assemelham ao encontrado na pupa de olho marrom com tórax de pigmentação clara (Evenius, 1925). O deslocamento de células vacuolizadas semelhantes a hemócitos para esse espaço podem aumentar a capacidade de defesa, visto que essas células circulam também na fase adulta de *A. mellifera* (Richardson *et al.*, 2018).

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura, a diminuição de espaço entre os folhetos epiteliais da válvula, voltada para o intestino médio, mostra que a dissolução do material da matriz extracelular pode ter levado a redução das dobras assimétricas e

alongamento do epitélio, como observado em *D. melanogaster* (Díaz-de-la-Loza e Stramer, 2024). As mudanças morfológicas das células da válvula estomodeal também é observada em espécies de dípteros Schizophora (King, 1989). A transição morfológica dos núcleos, que assumem uma conformação oval, precedendo a mudança no formato das células, cujos contornos permanecem irregulares, pode estar associado à forma das células visto que na fase adulta a válvula possui células colunares, nas quais os núcleos são geralmente ovais (Junqueira e Carneiro, 2018; Evenius, 1925; Cruz-Landim, 2009). O revestimento de cutícula da válvula estomodeal deve-se à sua origem ectodérmica, como observado em *Copris felschei* Reitter (Coleoptera: Scarabaeidae) (Snodgrass, 1956; Koçakoglu *et al.*, 2025). A diminuição da quantidade de células livres pode ser devido ao menor espaço de acesso e deslocamento no interior da válvula ou ausência de sinais quimiotáticos que guiam os hemócitos, como observado em *D. melanogaster* (Nakatogawa *et al.*, 2009).

Nas abelhas adultas, o estabelecimento morfológico da válvula estomodeal verificado pela definição da membrana basal, folheto epitelial externo com células altas e folheto interno com células baixas são características próprias da válvula estomodeal em indivíduos adultos (Cruz-Landim, 2009). Sua posição anatômica no interior do intestino médio determina sua funcionalidade, onde agora exerce sua função de prevenir o refluxo de alimento no canal alimentar, como observado para *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (De Sousa, 2013) e *Nasutitermes rotundatus* Holmgren (Isoptera: Termitidae) (Moreira *et al.*, 2008). Após as transições morfológicas que marcaram a fase de pupa, o estabelecimento da válvula como uma dobra de epitélios e uma fina membrana basal indica que se completou a formação do proventrículo, como relatado para *D. melanogaster* (Bauer *et al.*, 2001). A conformação oval e nucléolos evidentes mostram efeitos morfogenéticos devido à mudança da forma celular que agora os núcleos acompanham a forma colunar das células (Junqueira e Carneiro, 2018). O espessamento da cutícula é um dos passos da morfogênese do intestino anterior e em insetos sua regulação é essencial para o correto desenvolvimento, como relatado para *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) (Dong *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2021). A ocorrência de células livres é rara e pode não afetar a manutenção da válvula, visto que o desenvolvimento se encerrou e agora já se torna funcional (Guedes *et al.*, 2025).

As análises de imunofluorescência revelam grande quantidade de células positivas para o anticorpo anti-caspase 3 clivada no epitélio da válvula estomodeal e fibras musculares de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média confirma alta atividade apoptótica. Isto coincide com o momento da eversão da válvula, o que ressalta o papel fundamental da apoptose na remodelação tecidual durante o desenvolvimento, como ocorre em espécies como

*Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae) (Araujo *et al.*, 2019) e *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) (Romanelli *et al.*, 2016).

A baixa detecção de células positivas ao anticorpo anti-caspase 3 clivada em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura mostra que a apoptose diminui à medida que a metamorfose avança, o que ressalta que a apoptose é um processo geneticamente regulado para que se mantenha a homeostase (Zhang *et al.*, 2025). A robustez das camadas musculares do intestino médio com fibras intercalares evidenciadas pela marcação por F-actina se deve à reorganização da musculatura durante a metamorfose que se regenera principalmente na pupa de olho branco (Da Cruz-Landim e Cavalcante, 2003).

A grande ocorrência de células positivas para o anticorpo anti-Notch no epitélio e células musculares de pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média está relacionada à diferenciação celular e o papel fundamental da sinalização da via Notch na regulação da morfogênese do tecido epitelial da válvula estomodeal e camadas musculares, como observado para *D. melanogaster* (Córdoba e Estella, 2020).

A ausência considerável de marcação para o anticorpo Notch em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura mostra que, após a eversão, essa via possivelmente está inativa, dado seu papel essencial nos movimentos celulares epiteliais, observados sobretudo na pupa de olho marrom com tórax de pigmentação média, assim como no desenvolvimento do intestino anterior de *D. melanogaster* (Fuss *et al.*, 2004).

A expressiva quantidade de células positivas para o anticorpo anti-histona H3 fosforilada (PHH3) em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média indica que a proliferação celular é importante para reorganização e eversão da válvula, como ocorre na junção dos intestinos anterior e médio de *D. melanogaster* onde morte celular e proliferação também foram detectadas (Singh *et al.*, 2011). A trama muscular bem delimitada destacada pela marcação por F-actina mostra a morfologia da musculatura após a fusão de mioblastos, como ocorre no desenvolvimento de músculos viscerais de *Drosophila* (Aghajanian *et al.*, 2016).

A ausência do marcador de proliferação fosfohistona H3 (PHH3) em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura pode estar associado à menor proliferação de novas células para alongar o epitélio da válvula após a eversão, e, portanto, próximo do cessar da reorganização e estiramento das dobras epiteliais, como observado no desenvolvimento das pernas em *Drosophila* (Rodríguez *et al.*, 2024) e intestino médio de *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Teixeira *et al.*, 2013).

A definição marcante das fibras musculares com estriações transversais e núcleos centrais nas pupas de olho marrom destacam a morfologia das unidades de contração das células

musculares cujo papel no canal alimentar é o peristaltismo e movimentação do alimento e fluxo de enzimas digestivas dos insetos (Spit *et al.*, 2012). A camada muscular do bulbo do proventrículo juntamente com os espinhos cuticulares filtram o alimento e partículas sólidas em direção ao intestino médio coordenando a digestão e absorção de nutrientes (Bailey, 1952; Serrão, 2007). Além disso, a formação expressiva de uma rede de camadas musculares longitudinais e circulares está relacionada a organização das células musculares que são multinucleadas e formam feixes inervados responsáveis pela digestão e eliminação de resíduos (Copenhaver, 2007), como relatado em *Meligethes (Odonthogethes) chinensis* (Coleoptera: Nitidulidae) (Chen *et al.*, 2023). A camada muscular se mostrou em desenvolvimento simultaneamente com a válvula estomodeal e em *Drosophila*, a ausência de músculo visceral prejudicou a população de células tronco e alongamento dos intestinos médio e posterior no adulto, o que indica sinalização dos músculos para o desenvolvimento do intestino (Aghajanian *et al.*, 2016).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão mostram a organização intracelular. Em pupas de olho rosa, a superfície irregular com projeções apicais e ausência de cutícula nas células da parede de epitélios dupla que fecha a passagem entre os intestinos anterior e médio de pupas de olho rosa estão relacionados às microvilosidades em formação e origem endodérmica do epitélio correspondente ao intestino médio, como observado em *C. felschei* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Koçakoglu *et al.*, 2025). A abundância de mitocôndrias no citoplasma mostra que há intensa atividade e uma maior disponibilidade de energia por ATP (Moura, Oliveira e Urbano, 2025). Enquanto os sinais de degeneração representados pelas constrições observadas em algumas mitocôndrias se assemelham a nanotúneis, que podem ser normais ou indicativos de falhas na fissão e na cadeia respiratória mitocondrial, como observado no intestino médio de *Anticarsia gematalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Vincent *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2019). Além disso, os sinais como o alongamento e formação de constrições que indicam sinais de degeneração das mitocôndrias, como ocorre nas mitocôndrias de *Meconema meridionale* Costa (Orthoptera: Tettigoniidae) em resposta a danos por uma micotoxina (Sekula, Tworzydło e Bilinski, 2024). A cromatina descondensada e nucléolos aparentes está associada a maior atividade de síntese proteica, uma vez que o descondensamento do DNA o torna menos compactado e mais acessível a maquinaria de tradução (Alberts, 2017), e também pode ser observado em outras regiões do canal alimentar como no intestino médio de *Legnotus limbosus* Geoffroy (Heteroptera: Cydnidae) (Koçakoglu *et al.*, 2025). Foi observado material floculado acondicionado em depósitos citoplasmáticos, de modo que vacuolização também ocorre após a retração e dissolução da válvula estomodeal da larva e formação da

parede que fecha a abertura entre intestino anterior e médio (Snodgrass, 1956). As interdigitações que unem as células apicalmente e os espaços basais acentuados são características típicas de células epiteliais regionalizadas, como ocorre no intestino anterior e médio de diferentes estágios de *Cloeon dipterum* Linnaeus (Ephemeroptera: Baetidae) (Harker, 1999).

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara a maior densidade da epicutícula em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação clara assim como seu aspecto fibrilar próximo ao ápice celular mostram o desenvolvimento da cutícula íntima composta de quitina e glicoproteínas cuticulares dos insetos (Lai *et al.*, 2024). A diminuição da ocorrência de mitocôndrias em relação à fase anterior de pupa rosa indica menor necessidade celular da energia carregada pelo ATP (Moura *et al.*, 2025). A regularidade da superfície e formação de vesículas na região apical das células da válvula podem estar relacionadas à atividade absorptiva, uma vez que endocitose em vesículas por clatrina são importantes no desenvolvimento pupal de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) (Xiao *et al.*, 2023). O retículo endoplasmático rugoso é responsável por síntese proteica, resposta celular ao estresse e homeostase de cálcio (Coughlin e Makarewich, 2025) e os depósitos de material denso não delimitados por membrana podem ser armazenamento de energia de glicogênio ou “ilhas de glicogênio” presentes também em células do intestino posterior de *A. mellifera* (Gonçalves *et al.*, 2017) e na válvula cardíaca de *Lucilia cuprina* Wiedeman (Diptera: Calliphoridae) (Binnington, 1988). A sinuosidade dos limites entre as células de formato fino e irregular ressalta o papel importante das junções celulares que mantêm unidas as células e organizam o epitélio (Jacinto *et al.*, 2001).

Nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, a irregularidade superficial da cutícula, as camadas lamelares e pouco material fibrilar próximo ao ápice das células da válvula estão relacionados com o desenvolvimento da cutícula desse órgão de origem ectodérmica, uma vez que deposição de cutícula também é observada no intestino posterior de mesma origem em pupas de olho marrom desta espécie (Gonçalves *et al.*, 2017). As abundantes invaginações e vesículas sendo formadas na superfície das células novamente parecem reforçar atividade de absorção após formação de vesículas revestidas por clatrina que também ocorrem no intestino anterior em desenvolvimento de *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) (Shi *et al.*, 2022). Na região do citoplasma, o reduzido número de mitocôndrias, presença de eucromatina e depósitos de material denso mostram a reorganização intracelular da válvula, que agora everte para o intestino médio após a vacuolização e dissolução do epitélio que fechava a passagem entre intestino anterior e médio (Evenius, 1925; Snodgrass, 1956). Os

espaços intercelulares se devem à formação do labirinto basal que, entretanto, é mais associado a células com atividade de transporte como em mosquitos da ordem Diptera (Franz *et al.*, 2015), enquanto que o material fibrilar próximo ao domínio basal pode estar relacionado aos componentes da membrana basal que está sendo remodelada entre as paredes internas da válvula (Evenius, 1925). Já a ocorrência de células livres no espaço extracelular pode estar relacionada a atividade de defesa e fagocitose de hemócitos como em *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) (Ravaiano *et al.*, 2018).

Em pupas de olho marrom com tórax de pigmentação escura, a irregularidade superficial da cutícula, regiões mais densas e menor quantidade fibrilar mostram a remodelação da válvula e organização da quitina, como observado no intestino anterior de *L. migratoria* (Yu *et al.*, 2024). As projeções e vesículas na superfície apical indicam células com atividade de absorção e reciclagem de componentes através de vesículas que, porém, são mais comuns na região do intestino médio, como em *L. decemlineata* (Capelle *et al.*, 2016). A escassa quantidade de mitocôndrias e muitos vacúolos reafirmam intensa reorganização intracelular da válvula estomodeal em desenvolvimento (Evenius, 1926). A recorrência de núcleos com cromatina descondensada e nucléolos bem aparentes mostra que essa disposição nuclear continua importante mesmo após a eversão da válvula e pode estar ligado à síntese proteica assim como em células de *Drosophila* (Filion *et al.*, 2010). O estreitamento do labirinto basal e o material fibrilar na matriz extracelular são eventos teciduais que resultarão na formação de uma válvula bem desenvolvida e funcional para a fase adulta, como é a válvula de adultos de *Ceraeochrysa cubana* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae) (Vacacela *et al.*, 2017). A ocorrência de células delgadas e fusiformes semelhantes a hemócitos pode estar associada à defesa e construção do tecido, como ocorre em *Polistes dominulus* Christ (Hymenoptera: Vespidae) (Manfredini *et al.*, 2008). Além disso, as traquéolas na matriz extracelular indicam trocas gasosas pois estes vasos especializados realizam transporte de oxigênio para os tecidos dos insetos (Wigglesworth, 1990). Essas estruturas respiratórias também são importantes para o desenvolvimento de todo o organismo de *Batocera rufomaculata* De Geer (Coleoptera: Cerambycidae) (Urca, Ribak e Gefen, 2024).

## 6. CONCLUSÃO

A eversão da válvula estomodeal envolve uma série de mudanças graduais que remodelam sua estrutura ao longo do seu desenvolvimento e a preparam para o exercício de sua função na abelha adulta. Tais mudanças são evidenciadas pelo formato do tecido, composição intracelulares das células que a compõem, aquisição gradual de cutícula, além de mudanças marcantes no bulbo do proventrículo. A apoptose, a diferenciação e a proliferação celular ocorreram com maior frequência nas pupas de olho marrom com tórax de pigmentação média, que corresponde ao momento da eversão da válvula. Dessa forma, estudos sobre o desenvolvimento e características morfológicas internas são importantes para enriquecer o conhecimento sobre essa importante espécie de abelha polinizadora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAJANIAN, P.; TAKASHIMA, S.; PAUL, M.; YOUNOSSI-HARTENSTEIN, A.; HARTENSTEIN, V. Metamorphosis of the *Drosophila* visceral musculature and its role in intestinal morphogenesis and stem cell formation. *Developmental Biology* 420(1): 43–59, 2016.
- AJIRO, K.; YODA, K.; UTSUMI, K.; NISHIKAWA, Y. Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. *Journal of Biological Chemistry* 271(22): 13197–13201, 1996.
- ARAÚJO, R. D.; FERNANDES, K. M.; LOPES, M. P.; MARTINS, G. F.; TAVARES, M. G. Epithelial remodelling of the midgut in the post-embryonic development of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie* 50(1): 80–89, 2019.
- ASANO, T. Multicopper oxidase-2 mediated cuticle formation: Its contribution to evolution and success of insects as terrestrial organisms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 168(104111), 2024.
- BAILEY, L. The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Biology* 29(2): 310–327, 1952.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, London, 2008.
- BAUER, R.; LEHMANN, C.; HOCH, M. Gastrointestinal development in the *Drosophila* embryo requires the activity of innexin gap junction channel proteins. *Cell Communication and Adhesion* 8(4–6): 307–10, 2001.
- BINNINGTON, K. C. Ultrastructure of the peritrophic membrane-secreting cells in the cardia of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Tissue and Cell* 20(2): 269–281, 1988.

- BLAIMER, B.B., SANTOS, B.F., CRUAUD, A. *et al.* Key innovations and the diversification of Hymenoptera. *Nature Communications* 14: 1212, 2023.
- BRAECKMAN, M.; DE SMET, L.; DEVREESE, B.; DE GRAAF, D. C. Exploration of the hemocyte surfaceome of *Apis mellifera* by a proteomic and transcriptomic approach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 184(104398), 2025.
- BRAY, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(9): 678–689, 2006.
- BUTION, M. L.; CAETANO, F. H.; FOWLER, H. G. Proventriculus of *Cephalotes* ants: A structural and comparative analysis. *Micron* 41(1): 79–83, 2010.
- CARNEIRO, L. S.; MARTINEZ, L. C.; DE OLIVEIRA, A. H.; COSSOLIN, J. F. S.; DE RESENDE, M. T. C. S.; GONÇALVES, W. G.; MEDEIROS-SANTANA, L.; SERRÃO, J. E. Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of The Total Environment* 815(152847), 2022.
- CHAPMAN, R. F. *The insects: structure and function*. Edited by Simpson, S. J.; Douglas, A. E. Cambridge University Press, 5th edition, Cambridge, 962p., 2013. ISBN 978-0-521-11389-2 Hardback
- CHEN, H.; LIU, Q.; XIA, Q.; ZHAO, P. Molecular basis and regulatory network of wing development in *Bombyx mori*. *Insect Science* 0: 1–18, 2025.
- CHEN, L. Y.; LIU, M.; DI GIULIO, A.; CHEN, X.; SABATELLI, S.; WANG, W.; AUDISIO, P. Morphological study of the alimentary canal and malpighian tubules in the adult of the pollen beetle *Meligethes (Odonthogethes) chinensis* (Coleoptera: Nitidulidae: Meligethinae). *Insects* 14(3): 298, 2023.
- CIRTWILL, A. R.; WIRTA, H. DNA in honey could describe the changes in flower visits and microbe encounters of honey bees over decades. *Scientific Reports* 15: 8807, 2025

- COPENHAVER, P. F. How to innervate a simple gut: Familiar themes and unique aspects in the formation of the insect enteric nervous system. *Developmental Dynamics* 236(7): 1841–1864, 2007.
- CÓRDOBA, S.; ESTELLA, C. Role of Notch signaling in leg development in *Drosophila melanogaster*. *Notch Signaling in Embryology and Cancer* 1218: 103–127, 2020.
- CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Ed. UNESP, 408 p., 2009.
- COUGHLIN, T. M.; MAKAREWICH, C. A. Emerging roles for microproteins as critical regulators of endoplasmic reticulum function and cellular homeostasis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 170: 103608, 2025.
- CRUZ-LANDIM, C.; CAVALCANTE, V. M. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Science* 20(9): 1099–1107, 2003.
- CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of the ileum epithelium of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Journal of Morphology* 222(2): 191–201, 1994.
- DE SOUSA, G.; SCUDELER, E. L.; ABRAHÃO, J.; CONTE, H. Functional morphology of the crop and proventriculus of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of The Entomological Society of America* 106(6): 846–852, 2013.
- PEREPLETCHIKOVA, D.; KUCHUR, P.; BASOVICH, L.; KHVOROVA, I.; LOBOV, A.; AZARKINA, K.; AKSENOV, N.; BOZHKOVA, S.; KARELKIN, V.; MALASHICHEVA, A. Endothelial-mesenchymal crosstalk drives osteogenic differentiation of human osteoblasts through Notch signaling. *Cell Communication and Signaling* 23(1): 100, 2025.

- DECELIS, J. F.; GARCIABELLIDO, A. Roles of the notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mechanisms of Development* 46(2): 109–122, 1994.
- DE RESENDE, M. T. C. S.; SOUZA, D. S.; CARNEIRO, L. S.; MOTTA, J. V. O.; DA SILVA, L. L.; SERRÃO, J. E. Pathogen-pesticide-host interaction: Apoptosis modulation by *Nosema ceranae* increases honeybee susceptibility to the insecticide cyantraniliprole. *Journal of Hazardous Materials* 495: 139064, 2025.
- DÍAZ-DE-LA-LOZA, M. D.; STRAMER, B. M. The extracellular matrix in tissue morphogenesis: No longer a backseat driver. *Cells and Development* 177: 203883, 2024.
- DOBROVSKY, T. M. Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.): Memoir. Cornell University, Agricultural Experiment Station, 301: 1–64, 1951.
- DONG, W.; SONG, C.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Osiris17 is indispensable for morphogenesis of intestinal tract in *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 201: 105860, 2024.
- ESKIN, A.; BOZDOGAN, H. Effects of the copper oxide nanoparticles (CuO NPs) on *Galleria mellonella* hemocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 45(4): 1870–1880, 2022.
- ESKIN, A. N.; ÖZTÜRK, S.; ESKIN, A. Effects of magnetic iron oxide nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) on *Galleria mellonella* hemocytes. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 22(1): 57–63, 2025.
- EVENIUS, J. Die entwicklung des zwischendarmes der honigbiene. *Zoologischer Anzeiger* 63: 49-64, 1925.
- EVENIUS, C. Der verschluss zwischen vorder- und mitteldarm bei der postembryonalen entwicklung von *Apis mellifica* L. *Zoologischer Anzeiger* 68: 249-262, 1926.
- FILION, G. J.; VAN BEMMEL, J. G.; BRAUNSCHWEIG, U.; TALHOUT, W.; KIND, J.; WARD, L. D.; BRUGMAN, W.; DE CASTRO, I. J.; KERKHOVEN, R. M.;

- BUSSEMAKER, H. J.; VAN STEENSEL, B. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* 143(2): 212–224, 2010.
- FRANZ, A. W. E.; KANTOR, A. M.; PASSARELLI, A. L.; CLEM, R. J. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* 7(7): 3741–3767, 2015.
- FUSS, B.; JOSTEN, F.; FEIX, M.; HOCH, M. Cell movements controlled by the Notch signalling cascade during foregut development in *Drosophila*. *Development* 131(7): 1587–1595, 2004.
- GONÇALVES, W. G.; FERNANDES, K. M.; SANTANA, W. C.; MARTINS, G. F.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. *Developmental Biology* 431(2): 194–204, 2017.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Insetos: fundamentos da entomologia. Rio de Janeiro: Gen/Editora Roca, 5 ed., 912p., 2017.
- GURLEY, L. R.; D'ANNA, J. A.; BARHAM, S. S.; DEAVEN, L. L.; TOBEY, R. A. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in chinese-hamster cells. *European Journal of Biochemistry* 84(1): 1–15, 1978.
- GRIFFIOEN, A. W.; NOWAK-SLIWINSKA, P. A cellular danse macabre: the choreography of programmed cell death. *Apoptosis* 30(3–4): 507–511, 2025.
- GUEDES, D. C.; DIAS, W. C. S.; MEDEIROS-SANTANA, L.; COSSOLIN, J. F. S.; CASTRO, B. M. C.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Formation of the proventriculus in the foregut during metamorphosis of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Protoplasma*, 2025.
- HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20(24): 3021–3027, 2001.

- HARKER, J. E. The structure of the foregut and midgut of nymphs, subimagos and imagos of *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera) and the functions of the gut of adult mayflies. *Journal of Zoology* 248(2): 243–253, 1999.
- HYSTAD, E. M.; SALMELA, H.; AMDAM, G. V.; MÜNCH, D. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *Plos One* 12(9): e0184108, 2017.
- ILYASOV, R. A.; BOGUSLAVSKY, D. V.; ILYASOVA, A. Y.; DAVYDOVA, E. D.; ATNAGULOVA, A. A.; SATTAROV, V. N.; KHRAPOVA, S. N.; MANNAPOV, A. G.; KEKEÇOĞLU, M. Unveiling the truth: honey bees' astonishing adaptation to human management. *Journal of The Hellenic Veterinary Medical Society* 76(2): 8955–8966, 2025.
- JACINTO, A.; MARTINEZ-ARIAS, A.; MARTIN, P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biology* 3(5): E117–E123, 2001.
- JUAN, G.; TRAGANOS, F.; JAMES, W. M.; RAY, J. M.; ROBERGE, M.; SAUVE, D. M.; ANDERSON, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry* 32(2): 71–77, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. *Histologia básica: texto e atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 13 ed., 2018.
- KATZ, M. J.; RODRÍGUEZ, F.; EVANGELISTI, F.; BORRAT, A. G.; PEREZ-PANDOLFO, S.; PETERS, T.; SOMMARIO, N.; BOCCACCIO, G. L.; MELANI, M.; WAPPNER, P. Autophagy controls differentiation of *Drosophila* blood cells by regulating Notch levels in response to nutrient availability. *Nature Communications* 16(1): 5858, 2025.
- KAUR, G.; SINGH, A.; SHARMA, R.; THAKUR, A.; TUTEJA, S.; SHYAMLI; SINGH, R. Effect of fungicidal contamination on survival, morphology, and cellular immunity of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Frontiers in Physiology* 14: 1099806, 2023.

- KAYA-ÇOPUR, A.; MARCHIANO, F.; HEIN, M. Y.; ALPERN, D.; RUSSEIL, J.; LUIS, N. M.; MANN, M.; DEPLANCKE, B.; HABERMANN, B. H.; SCHNORRER, F. The Hippo pathway controls myofibril assembly and muscle fiber growth by regulating sarcomeric gene expression. *Elife* 10: e63726, 2021.
- KING, D. G. Phylogenetic diversity of cellular-organization in the cardia of muscoid flies (Diptera, Schizophora). *Journal of Morphology* 202(3): 435–455, 1989.
- KOÇAKOĞLU, N. Ö.; ERSOY, D. E.; ARSLAN, H.; CANDAN, S. The anatomy and histology of the midgut and malpighian tubules of *Copris felschei* Reitter, 1892 (Coleoptera: Scarabaeidae). *Protoplasma* 262(3): 683–693, 2025.
- KOÇAKOĞLU, N. Ö.; ARSLAN, H.; CANDAN, S. Anatomical and histological descriptions of the alimentary system, salivary gland, and malpighian tubules of *Legnotus limbosus*, the bordered shieldbug (Geoffroy, 1785) (Heteroptera: Cydnidae) - light and electron microscopic studies. *Protoplasma* 262(6): 1439–1450, 2025.
- LAI, Y. L.; WANG, S. B. Epigenetic Regulation in insect-microbe interactions. *Annual Review of Entomology* 70(1): 293–311, 2025.
- LAI, Y.; ZHENG, W.; ZHENG, Y.; LU, H.; QU, S.; WANG, L.; LI, M.; WANG, S. Unveiling a novel entry gate: Insect foregut as an alternative infection route for fungal entomopathogens. *Innovation* 5(4): 100644, 2024.
- LAKE, R. S.; SALZMAN, N. P. Occurrence and properties of a chromatin-associated F1-histone phosphokinase in mitotic chinese-hamster cells. *Biochemistry* 11(25): 4817–4826, 1972.
- LEAGUE, G. P.; ONUH, O. C.; HILLYER, J. F. Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology* 218(3): 370–380, 2015.

- LEAGUE, G. P.; HILLYER, J. F. Functional integration of the circulatory, immune, and respiratory systems in mosquito larvae: pathogen killing in the hemocyte-rich tracheal tufts. *BMC Biology* 14: 78, 2016.
- LEE, D. M.; CHEN, E. H. *Drosophila* myoblast fusion: invasion and resistance for the ultimate union. *Annual Review of Genetics* 53: 67–91, 2019.
- LEE, L. H.; YANG, H.; BIGRAS, G. Current breast cancer proliferative markers correlate variably based on decoupled duration of cell cycle phases. *Scientific Reports* 4: 5122, 2014.
- LI, S.; YANG, H.; DUAN, Y.; WU, L.; HU, C.; YU, B.; ZHAO, Y. Role of heat shock proteins in response to temperature stress and their effect on apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules* 306(Part 1): 141320, 2025.
- LI, R. N.; LIN, X. C. Connected chromatin amplifies acetylation-modulated nucleosome interactions. *Biochemistry* 64(6): 1222–1232, 2025.
- LONG, S.; CAO, W.; QIU, Y.; DENG, R.; LIU, J.; ZHANG, L.; DONG, R.; LIU, F.; LI, S.; ZHAO, H.; LI, N.; LI, K. The appearance of cytoplasmic cytochrome C precedes apoptosis during *Drosophila* salivary gland degradation. *Insect Science* 31(1): 157–172, 2024.
- MANFREDINI, F.; DALLAI, R.; OTTAVIANI, E. Circulating hemocytes from larvae of the paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). *Tissue and Cell* 40(2): 103–112, 2008.
- MARRINGA, W. J.; KRUEGER, M. J.; BURRITT, N. L.; BURRITT, J. B. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *Plos One* 9(10): e108486, 2014.
- MATTER, K.; BALDA, M. S. Signalling to and from tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(3): 225–236, 2003.
- MICHENER, C. D. The social behavior of the bees. Harvard University Press, Cambridge, 404p., 1974.

- MILLARD, J.; SKINNER, G.; BLADON, A. J.; COOKE, R.; OUTHWAITE, C. L.; RODGER, J. G.; BARNES, L. A.; ISIP, J. E.; KEUM, J.; RAW, C.; WENBAN-SMITH, E.; DICKS, L. V.; HUI, C.; JONES, J. I.; WOODCOCK, B.; ISAAC, N. J. B.; PURVIS, A. A multithreat meta-analytic database for understanding insect biodiversity change. *Diversity And Distributions* 31(5): e70025, 2025.
- MONIER, B.; SUZANNE, M. The morphogenetic role of apoptosis. *Apoptosis and Development* 114: 335–362, 2015.
- MOREIRA, J. *et al.* Digestive system morphology of *Nasutitermes rotundatus* (Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae). *Sociobiology* 51(3): 563–578, 2008.
- MOURA, J. P.; OLIVEIRA, P. J.; URBANO, A. M. Mitochondria: An overview of their origin, genome, architecture, and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1871(5): 167803, 2025.
- NAKATOGAWA, S.; ODA, Y.; KAMIYA, M.; KAMIJIMA, T.; AIZAWA, T.; CLARK, K. D.; DEMURA, M.; KAWANO, K.; STRAND, M. R.; HAYAKAWA, Y. A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Current Biology* 19(9): 779–785, 2009.
- NERE, P. H. A.; KERN, R. R.; CARNEIRO, L. S.; LIMA, B. S. A.; SOUZA, D. D. S.; SERRÃO, J. E. Impact of a lambda-cyhalothrin formulation residues on larval *Apis mellifera*: examining midgut and fat body morphological response to insecticide chronic exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 44(5): 1422–1434, 2025.
- PANKRATZ, M. J.; HOCH, M. Control of epithelial morphogenesis by cell signaling and integrin molecules in the *Drosophila* foregut. *Development* 121(6): 1885–1898, 1995.
- PARK, W.; WEI, S.; KIM, B.; KIM, B.; BAE, S.; CHAE, Y. C.; RYU, D.; HA, K. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental and Molecular Medicine* 55(8): 1573–1594, 2023.

- PERIS, D.; CONDAMINE, F. L. The angiosperm radiation played a dual role in the diversification of insects and insect pollinators. *Nature Communications* 15(1): 552, 2024.
- PAULSON, J. R.; TAYLOR, S. S. Phosphorylation of histone-1 and histone-3 and non-histone high mobility group-14 by an endogenous kinase in hela metaphase chromosomes. *Journal of Biological Chemistry* 257(11): 6064–6072, 1982.
- POIANI, S. B.; CRUZ-LANDIM, C. Histology and ultrastructure of pericardial cells of *Scaptotrigona postica latreille* (Hymenoptera, Apidae) in workers and queens of different ages. *Micron* 38(7): 766–770, 2007.
- QIN, G. Y.; LIU, Z.; LU, H.; ZHANG, Y.; DING, S.; ZHOU, G.; LI, C.; GUO, R. Notch signaling modulation enhances porcine muscle stem cell proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 752: 151456, 2025.
- RAHIMI, E.; JUNG, C. L. Spatial modeling of insect pollination services in fragmented landscapes. *Insects* 15(9): 662, 2024.
- RAHIMI, E.; JUNG, C. L. Trends in pollination scientists' research: A comprehensive analysis in citations and research topics. *Ecology and Evolution* 15(5): e71215, 2025.
- RAVAIANO, S. V.; BARBOSA, W. F.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. Variations in circulating hemocytes are affected by age and caste in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Science of Nature* 105: 48, 2018.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 17, 208–213, 1963.
- RICHARDSON, R. T.; BALLINGER, M. N.; QIAN, F.; CHRISTMAN, J. W.; JOHNSON, R. M. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie* 49(3): 397–410, 2018.

- RODRÍGUEZ, A.; FORONDA, D.; CÓRDOBA, S.; FELIPE-CORDERO, D.; BAONZA, A.; MIGUEZ, D. G.; ESTELLA, C. Cell proliferation and Notch signaling coordinate the formation of epithelial folds in the *Drosophila* leg. *Development* 151(8): dev202384, 2024.
- ROMANELLI, D.; CASARTELLI, M.; CAPPELLOZZA, S.; DE EGUILEOR, M.; TETTAMANTI, G. Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Scientific Reports* 6: 32939, 2016.
- SAUNDERS, M. E.; LEES, A. C.; GRAMES, E. M. Understanding and counteracting the denial of insect biodiversity loss. *Current Opinion in Insect Science* 68: 101338, 2025.
- SEKULA, M.; TWORZYDLO, W.; BILINSKI, S. M. Balbiani body of basal insects is potentially involved in multiplication and selective elimination of mitochondria. *Scientific Reports* 14: 8263, 2024.
- SERRÃO, J. E. A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). *Micron* 32(4): 379–385, 2001.
- SERRÃO, J. E. Proventricular structure in solitary bees (Hymenoptera: Apoidea). *Organisms Diversity and Evolution* 5(2): 125–133, 2005.
- SERRÃO, J. E. Proventricular structure in the bee tribe Augochlorini (Hymenoptera: Halictidae). *Organisms Diversity and Evolution* 7(3): 175–180, 2007.
- SERRÃO, J. E.; SANTOS, H. C. P. Intestinal tract. *Insect Anatomy. Structure and Function*. Edited by Bernard Moussian. 1 ed. France: Academic Press, 519p., 2025.
- SGROI, G. *et al.* Bees on the run: *Nosema* spp. (Microsporidia) in *Apis mellifera* and related products, Italy. *Frontiers in Veterinary Science* 11: 1530169, 2025.
- SHI, X.; LIU, X.; SILVER, K.; ZHU, K. Y.; ZHANG, J. Lethal giant larvae gene is required for normal nymphal development and midgut morphogenesis in *Locusta migratoria*. *Insect Science* 29(4): 1017–1029, 2022.

- SHI, X.; LI, S.; YANG, L.; LIU, X.; MERZENDORFER, H.; ZHU, K. Y.; ZHANG, J. Clathrin heavy chain is essential for the development and reproduction of *Locusta migratoria*. *Insect Science* 29(6): 1601–1611, 2022.
- SINGH, S. R.; ZENG, X.; ZHENG, Z.; HOU, S. X. The adult *Drosophila* gastric and stomach organs are maintained by a multipotent stem cell pool at the foregut/midgut junction in the cardia (proventriculus). *Cell Cycle* 10(7): 1109–1120, 2011.
- SNODGRASS, R. E.; (MORSE, R. A). *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press, 352p., 1956.
- SPIT, J.; BADISCO, L.; VERLINDEN, H.; VAN WIELENDAELE, P.; ZELS, S.; DILLEN, S.; VANDEN BROECK, J. Peptidergic control of food intake and digestion in insects. *Canadian Journal of Zoology* 90(4): 489–506, 2012.
- TANO, Y.; FRANCOIS, J.; NOIROT-TIMOTHEE, C. Effects of a juvenile-hormone analog on the metamorphic changes of the foregut and midgut in *Tenebrio molitor* L (Insecta, Coleoptera). *Canadian Journal of Zoology* 66(2): 421–426, 1988.
- TEIXEIRA, A. D.; FIALHO, M. C. Q.; ZANUNCIO, J. C.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E. Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. *Arthropod Structure and Development* 42(3): 237–246, 2013.
- VACACELA, H. E.; ALVAREZ-ZAPATA, A.; GONZALES, A. C.; MARTINS, E. F.; MARTINEZ, L. C.; SERRÃO, J. E. Anatomy and histology of the alimentary canal and ovarioles of *Ceraeochrysa cubana* adults. *Bulletin of Insectology* 70(2): 181–188, 2017.
- VOMMARO, M. L.; DONATO, S.; CAPUTO, S.; AGOSTINO, R. G.; MONTALI, A.; TETTAMANTI, G.; GIGLIO, A. Anatomical changes of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum* during complete metamorphosis. *Cell and Tissue Research* 396(1): 19–40, 2024.

- WEI, Y.; MIZZEN, C. A.; COOK, R. G.; GOROVSKY, M. A.; ALLIS, C. D. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 95(13): 7480–7484, 1998.
- WIGGLESWORTH, V. B. The direct transport of oxygen in insects by large tracheas. *Tissue and Cell* 22(2): 239–243, 1990.
- XIAO, D.; YAO, J.; GAO, X.; ZHU, K. Y. Clathrin-dependent endocytosis plays a critical role in larval and pupal development, and female oocyte production in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Pest Management Science* 79(5): 1731–1742, 2023.
- YU, R.; DUAN, J.; ZHAO, X.; ABBAS, M.; ZHANG, Y.; SHI, X.; CHEN, N.; ZHANG, J. Knickkopf (LmKnk) is required for chitin organization in the foregut of *Locusta migratoria*. *Insect Science* 31(5): 1412–1424, 2024.
- ZHANG, X.; MIAO, C.; NAN, Z.; LYU, J.; XI, Y.; YANG, X.; GE, W. A positive role of Sin3A in regulating Notch signaling during *Drosophila* wing development. *Cellular Signalling* 53: 184–189, 2019.
- ZHANG, M.; MA, P.; ZHANG, T.; GAO, Z.; ZHAO, P.; LIU, X.; ZHANG, X.; LIU, W.; YU, R.; MOUSSIAN, B.; ZHANG, J. Roles of LmCDA1 and LmCDA2 in cuticle formation in the foregut and hindgut of *Locusta migratoria*. *Insect Science* 28(5): 1314–1325, 2021.
- ZHANG, T.; LI, J.; YANG, J.; FAN, X.; MI, S.; GUO, X.; DAI, M.; LUO, X.; ZOU, P.; TAN, Q.; CHEN, D.; QIU, J.; GUO, R. Apoptosis and relevant genes are engaged in the response of *Apis mellifera* larvae to *Ascospaera apis* invasion. *Insects* 16(9): 925, 2025.
- ZHENG, L.; FU, S.; ZENG, M.; LI, L.; WANG, D.; GAO, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; FEI, S.; YE, X.; CHEN, L.; CHEN, Q.; WANG, Y.; ZHOU, X.; XIE, Y.; HU, B.; WU, J. Rice ragged stunt virus Pns10 induces mitochondrial-mediated apoptosis to promote viral

infection in *Nilaparvata lugens* through disrupting the NINDUFS1-NIPHB2 interaction.

Plos Pathogens 21(8): e1013415, 2025.