**DANIELA DE CASTRO GUEDES**

# ALTERAÇÕES NO INTESTINO ANTERIOR DURANTE A METAMORFOSE DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE): ORIGEM DO PROVENTRÍCULO

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: José Eduardo Serrão

Coorientadoras: Luanda Medeiros Santana
Jamile Fernanda Silva Cossolin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**
**2022**

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

T
G924a
2022

Guedes, Daniela de Castro, 1993-
Alterações no intestino anterior durante a metamorfose da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): origem do proventrículo / Daniela de Castro Guedes. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (34 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: f. 30-34.
DOI: https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.434
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas. 2. Insetos - Metamorfose. 3. Intestino anterior. 4. Proventrículo. 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

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

**DANIELA DE CASTRO GUEDES**

# ALTERAÇÕES NO INTESTINO ANTERIOR DURANTE A METAMORFOSE DA ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE): ORIGEM DO PROVENTRÍCULO

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: 23 de fevereiro de 2022.

Assentimento:

Daniela de Castro Guedes
Autora

José Eduardo Serrão
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, mantendo minha força e me dando sabedoria.

A Universidade Federal de Viçosa e à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Departamento de Biologia Geral, pela estrutura e pelos conhecimentos oferecidos.

Ao meu orientador, Professor José Eduardo Serrão, pela boa vontade de sempre, pelo apoio durante a realização desse trabalho, por ser um grande exemplo de professor e cientista e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

A minha mãe Ilza e ao meu pai Wilson, por serem a razão de toda essa caminhada, estando sempre presentes, sem medir esforços para me ajudar, me ensinando a conduzir a vida com mais leveza.

Ao meu irmão André, por estar sempre presente em minha vida, sendo meu maior exemplo de força e de perseverança.

Ao Jonas por toda paciência e companheirismo ao longo dessa caminhada.

A minha família e aos meus amigos por estarem sempre torcendo por mim.

A minha orientadora e amiga Luanda, por ter me acompanhado durante todo esse tempo, por todos ensinamentos, pelo apoio, paciência e principalmente pela amizade.

A Beth, pela presteza de sempre.

Ao Kenner e a Fran por toda a atenção, ajuda e pelos ensinamentos.

A Jamille, por todo apoio e ensinamentos, pela boa vontade e alegria, estando sempre disposta a ajudar.

A todos do laboratório de Ultraestrutura celular pelos conhecimentos oferecidos.

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

## RESUMO

GUEDES, Daniela de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Alterações no intestino anterior durante a metamorfose da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Origem do proventrículo.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadoras: Luanda Medeiros Santana e Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Abelhas são insetos holometábolos, passando assim por uma complexa mudança corpórea durante a metamorfose. Além disso, são insetos bem-sucedidos evolutivamente, e parte desse sucesso se deve a variedade fisiológica e estrutural de seu trato digestório, que é dividido em três porções anatomicamente distintas: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeu. O intestino posterior tem como função o equilíbrio osmótico e excreção, o intestino médio é simples morfologicamente, porém é complexo funcionalmente, sendo este o principal sitio de digestão e absorção de nutrientes. No intestino anterior ocorre a passagem e o armazenamento do alimento. Este, segundo Cruz-Landin (2009), não sofre uma metamorfose real no sentido de degeneração, o que ocorre de fato é uma diferenciação seguida de uma reorganização celular, ocorrendo assim um alongamento dessa porção do intestino e a formação do papo e do proventrículo. O proventrículo é o segmento final do intestino anterior, situado na transição para o intestino médio. Durante a fase larval o proventrículo está representado apenas pela válvula estomodeal, sendo o bulbo formado durante a metamorfose. O presente estudo buscou investigar os eventos celulares que possibilitam a formação e diferenciação do proventrículo durante a metamorfose de *Apis mellifera*. As regiões precursoras do proventrículo foram submetidos a análises histológicas e de imunofluorescência para detecção de apoptose, autofagia, proliferação e diferenciação celular. Os dados mostraram proliferação celular ocorrendo nas pré- pupas, nas pupas de olho branco e de olho marrom. Nas pupas de olho rosa não ocorre proliferação, e sim uma intensa diferenciação celular. Morte celular por apoptose ocorre em grande quantidade nas pré-pupas, sendo raras nos outros estágios do desenvolvimento. Pupas de olho preto e adultas não apresentaram células positivas para os anticorpos testados.



Palavras-chave: Proventrículo. Intestino anterior. Metamorfose.

## ABSTRACT

GUEDES, Daniela de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Changes in the foregut during the metamorphosis of the bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Origin of the proventriculus**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: Luanda Medeiros Santana and Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Bees are holometabolous insects, thus undergoing a complex body change during metamorphosis. Moreover, they are evolutionarily successful insects, and part of this success is due to the physiological and structural variety of their digestive tract, which is divided into three anatomically distinct portions: foregut or stomodeum, midgut or ventricle, and hindgut or proctodeum. The hindgut has the function of osmotic balance and excretion. The midgut is morphologically simple, although functionally complex, and it is the main site of digestion and absorption of nutrients. In the foregut occurs the passage and storage of food. This, according to Cruz-Landin (2009), does not undergo a real metamorphosis in the sense of degeneration. What actually occurs is a differentiation followed by a cellular reorganization, thus occurring an elongation of this portion of the intestine and the formation of the crop and the proventriculus. The proventriculus is the final segment of the foregut, situated at the transition to the midgut. During the larval stage, the proventriculus is represented only by the heart valve, and the bulb is formed during metamorphosis. This study aimed to investigate the cellular events that enable the formation and differentiation of the proventriculus during the metamorphosis of *Apis mellifera*. The precursor regions of the proventriculus were submitted to histological and immunofluorescence analysis to detect apoptosis, autophagy, proliferation and cell differentiation. The data showed cell proliferation occurring in prepupae, in white-eyed and in brown-eyed pupae. In pink eye pupae there is no proliferation, but an intense cellular differentiation. Cell death by apoptosis occurs in large numbers in prepupae, and it is rare in other stages of development. Black eye and adult pupae did not show positive cells for the antibodies tested.



Keywords: Proventriculus. Foregut. Metamorphosis.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO ..... 7
2. OBJETIVO ..... 14
3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 14
    3.1. ANIMAIS ..... 14
    3.2. HISTOLOGIA ..... 14
    3.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA ..... 14
4. RESULTADOS ..... 15
5. DISCUSSÃO ..... 25
REFERÊNCIAS ..... 30

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos ocupam os mais diversos ambientes. Parte desse sucesso adaptativo se deve à diversidade estrutural e fisiológica de diversos sistemas, em especial o seu trato digestório, o que lhes permite utilizar ampla variedade de alimentos como fonte de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Dow, 1986).

As abelhas são insetos que possuem importância econômica devido ao seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas, produtoras de mel, geleia real, cera e própolis (Kerr *et al*, 1996). O ciclo de vida das abelhas, assim como de outros insetos holometábolos, perpassa em quatro fases: embrião, larva, pupa e adulto. A metamorfose ocorre durante a fase de pupa, e nesta fase, muitas modificações fisiológicas e anatômicas ocorrem diferenciando a larva do adulto. Dentre os órgãos da larva, o canal alimentar é extensamente remodelado durante este processo (Cruz- Landim, 2009).

O canal alimentar dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeu, sendo o anterior e posterior de origem ectodérmica e, portanto, possuem um revestimento de cutícula, enquanto o médio é de origem endodérmica e o lúmen é revestido pela matriz peritrófica (Cruz Landim, 1985; Chapman, 1998; Neves *et al*., 2003). O intestino anterior está envolvido principalmente na ingestão e armazenamento temporário de alimento (Chapman, 1998), sendo que os principais eventos da digestão química e absorção dos nutrientes ocorrem no intestino médio (Terra, 1990), enquanto o intestino posterior é responsável pela excreção, regulação da homeostase de água, íons e solutos orgânicos ( Wigglesworth, 1932; Maddrell, 1981;)

Nas larvas das abelhas o trato digestório é um saco alongado sem diferença anatômica ao longo de sua extensão (Chapman, 1998). Em regiões especificas do tubo digestivo larval são encontrados anéis de células imaginais, correspondentes aos discos imaginais ou histoblastos da epiderme, com possível função de diferenciação das estruturas do adulto (Cruz-Landim, 2009). Essas células proliferam durante a fase larval, mas permanecem indiferenciadas (Judy & Gilbert, 1970).

O intestino anterior larval tem início na cavidade oral, sendo formado por faringe, esôfago e válvula estomodeal, esta última o único componente do proventrículo na larva. As células da epiderme secretam uma cutícula luminal continua com a cutícula tegumentar, a qual é eliminada e renovada a cada muda larval (Snodgrass, 1956; Serrão & Cruz-Landim, 1995; Cruz-Landim, 2009).

A faringe é formada por um estreitamento curto da cavidade oral e é sustentada por músculos, sendo seu diâmetro controlado por musculatura extrínseca (Cruz-Landim, 1985). O esôfago é bastante curto, sendo uma continuação da faringe formada pelos mesmos constituintes desta, exceto a musculatura extrínseca, enquanto a válvula estomodeal larval é uma projeção do epitélio do esôfago para o interior do intestino médio, que se dobra e se liga ao epitélio deste (Cruz-Landim, 1985; Cruz-Landim, 2009).

O intestino médio larval é constituído de células colunares ricas em microvilosidades em seu ápice e desprovidas de cutícula (Chapman, 1998). Células epiteliais ao longo do ventrículo e uma região de células especializadas próximo ao proventrículo são responsáveis pela formação da matriz peritrófica, que é um delicado revestimento do intestino médio que protege as células epiteliais do atrito com o alimento (Marques- Silva *et al*, 2005; Cruz-Landim, 2009). A membrana peritrófica é formada por fibrilas de quitina imersas em uma matriz proteica (Terra, 2001; Liu *et al*, 2019; Erlandson *et al*, 2019). O intestino médio das abelhas não apresenta modificações anatômicas, e o epitélio do ventrículo é formado por células digestivas (colunares), regenerativas e endócrinas (Cruz- Landim e Mello, 1970; Neves, 2002; Neves *et al*, 2003;). No decorrer da fase larval a forma das células pode se modificar em razão da pressão exercida pelo alimento acumulado no lúmen do ventrículo. A passagem entre ventrículo e intestino posterior permanece fechada e se abre na metade do último estágio larval no qual a larva não se alimenta mais (Cruz-Landim, 1985). Nesse caso, todos os resíduos alimentares acumulados no intestino médio passam para o intestino posterior e são defecados. A eliminação desses resíduos provoca um colapso na parede do intestino médio, que perde a forma de um saco alongado e se torna um tubo fino e enrugado ao final do estágio larval (Cruz-Landim, 2009).

O intestino posterior na larva está dividido em intestino fino (íleo) e reto. O íleo é um tubo longo e estreito que tem suas paredes formadas por um epitélio, com células pavimentosas à cúbicas, recoberto por cutícula em sua face luminal (Cruz-Landim, 2009). Sua porção anterior é levemente dilatada, podendo ser denominada piloro. Depois dessa porção, o tubo intestinal adquire um formato sinuoso e em seguida, se dilata em uma bolsa terminal, o reto. No intestino posterior apenas a camada muscular circular está presente, sendo mais desenvolvida, formando um esfíncter (Cruz Landim, 1985).

Como são insetos holometábolos, as larvas de abelhas sofrem metamorfose completa, passando assim por uma complexa mudança na organização corpórea para o estágio adulto (Buszczak & Segraves, 2000; Klapper, 2000). Nesses insetos, durante a metamorfose, o trato digestório é completamente remodelado, o que requer proliferação, morte, diferenciação e migração celular (Buszczak & Seagraves, 2000). As modificações no trato digestório estão, em

geral, relacionadas à alimentação que é diferente na larva e no adulto (Gama et al, 1984; Caetano, 1984). Nas abelhas, mesmo essa dieta sendo basicamente a mesma, o tubo digestório é amplamente reorganizado durante a metamorfose (Cruz-Landim & Silva de Moraes, 2000).

Ao final do estágio larval das abelhas, a cutícula corporal sofre apólise e o inseto permanece imóvel no interior da cutícula sem se alimentar, e devido à transparência desta é possível observar que a larva se transformou em um organismo que tem a conformação corporal e o tamanho muito semelhantes ao adulto, embora seus apêndices externos não estejam completamente distendidos, sendo denominada de pré-pupa (Cruz-Landim, 2009). Após a última muda larval, tem início o estágio pupal com duração variável entre as espécies, sexos e castas. Operárias de *Apis mellifera* tem o estágio pupal com duração entre 10 e 11 dias, porém a contagem cronológica pode variar de acordo com alterações ambientais e disponibilidade de alimento (Kerr & Amaral, 1960; Michelette & Soares, 1993). Por esse motivo, as fases pupais das abelhas também podem ser definidas de acordo com modificações externas ocorridas no corpo, como a pigmentação dos olhos compostos, esclerotização e escurecimento da cutícula corporal (Cruz-Landim & Silva de Moraes, 2000). Sendo assim, as pupas são divididas em pupas de olho branco, olho rosa, olho marrom e olho preto, seguindo assim uma ordem cronológica de desenvolvimento.

Apesar das diversas modificações ocasionadas na metamorfose, a organização histológica do trato digestório é basicamente a mesma na larva e no adulto, sendo a reorganização anatômica a mais evidente (Chapman, 1998; Rolff *et al*, 2019). No início da pupação a maior parte do sistema digestório está na região torácica, à medida que a metamorfose acontece nas abelhas, ele se desloca para a região abdominal (Cruz-Landim, 2009).

A reorganização do intestino médio ocorre principalmente na porção epitelial, embora morte celular das células musculares larvais indique uma pequena reorganização na musculatura. Na pré-pupa o epitélio larval é quase todo eliminado e novas células são produzidas a partir de células regenerativas. Devido a isso, na fase inicial da pupa a reorganização do intestino médio deve- se basicamente a produção de novas células, sendo que na pupa de olhos brancos a transformação do ventrículo está completa, porém, a reorganização celular continua durante todo o período pupal (Cruz-Landim, 1994). Estruturas autofágicas são constantes durante toda essa fase, indicando que durante a metamorfose as células epiteliais continuam a se reorganizar a partir da destruição de parte de seus constituintes (Cruz-Landim, 2009).

Durante a pupação o intestino posterior aumenta de tamanho e o intestino fino se diferencia em piloro e íleo, o que ocorre devido a mudanças na forma e ao descolamento das células

do epitélio, que a partir desse momento se apresentam em uma camada única de células cúbicas (Cruz-Landim, 2009). Em alguns insetos, ocorre um anel imaginal na transição entre intestino médio e posterior, e nas abelhas, os túbulos de Malpighi são formados nessa região, onde também foi observada a ocorrência de proliferação celular que pode contribuir também para o alongamento do intestino posterior (Cruz-Landim, 2009; Gonçalves *et al*, 2017). Na região posterior, o proctodeu dilata-se e forma uma bolsa, o reto, onde a partir de diferenciações celulares do epitélio, formam-se as papilas retais (Santos *et al*, 2009).

A reorganização do intestino anterior ocorre principalmente em função da conformação adquirida pelo corpo do inseto adulto e de peculiaridades no aprovisionamento de alimento para os imaturos (Cruz-Landim, 2009). Ele não sofre uma real metamorfose no sentido de degeneração, somente se diferencia e se reorganiza durante a pupação (Cruz-Landim, 2009). Assim, a partir de um estomodeu larval formado por faringe, esôfago e válvula estomodeal, se origina o intestino anterior do adulto, composto por esôfago, faringe, papo e proventrículo (Cruz-Landim, 2009). Não ocorrem mudanças significativas na faringe da larva para o adulto, enquanto o esôfago se alonga da cabeça ao abdome, onde a partir de uma dilatação é formado o papo (Snodgrass, 1956),. O proventrículo é a região do intestino anterior que apresenta o maior grau de diferenciação, pois a partir apenas da válvula estomodeal na larva, ele se transforma em um órgão complexo no adulto, formado por um bulbo que se projeta no interior do papo, seguido de uma curta região, o pescoço, que se conecta com a válvula estomodeal no interior do intestino médio (Snodgrass, 1956; Serrão & Cruz-Landim, 1995),

O bulbo do proventrículo localizado no interior do papo possui uma abertura em forma de cruz formada por quatro lábios móveis e triangulares. O epitélio que reveste o lúmen do bulbo é continuo com o epitélio do papo e achatado, com a superfície revestida por cutícula, a qual apresenta projeções semelhantes a pelos ou espinhos, que são variáveis de espécie para espécie em relação a tamanho, quantidade e área que ocupam (Serrão, 2001; 2005; 2007).

Projeções da cutícula em forma de espinhos ou pelos avançam para o interior do lúmen, porém, vão diminuindo em tamanho e quantidade à medida que se aproximam do pescoço do proventrículo (Peng & Marston, 1986; Serrão, 2001). O bulbo apresenta uma camada muscular longitudinal interna e outra circular externa que quando contraem abrem os lábios do proventrículo para o interior do papo, e quando a musculatura longitudinal relaxa, os lábios se fecham e seus espinhos cuticulares promovem uma varredura do conteúdo do papo com a separação do pólen do néctar (Peng & Marston, 1986).

O pescoço do proventrículo é a parte que conecta o papo ao intestino médio. Nessa região a musculatura longitudinal que é muito desenvolvida no bulbo, praticamente desaparece.

A circular continua presente, porém com o número e o volume reduzido de fibras, estas irão constituir a camada muscular interna da parede do intestino médio (Snodgrass, 1956; Serrão & Cruz-Landim, 1995).

A válvula estomodeal é a última porção do intestino anterior, estando projetada no interior do intestino médio, sendo formada por uma invaginação do epitélio, na qual a parede do intestino anterior avança para o interior do ventrículo, dobra-se e volta até altura do pescoço do proventrículo, sendo assim, a válvula é constituída por dois folhetos epiteliais separados por suas lâminas basais (Snodgrass, 1956; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Peixoto & Serrão, 2001). A válvula estomodeal tem a função de impedir que o alimento que se encontra no interior do ventrículo retorne ao intestino anterior e na junção entre o pescoço e a válvula estomodeal há um esfíncter, formado pelo acumulo de células musculares que também impede esse refluxo (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim, 2009).

Ainda que o proventrículo seja um órgão fundamental para as abelhas, há poucos estudos sobre os eventos celulares que possibilitam sua formação e diferenciação durante a metamorfose, diferentemente dos detalhes conhecidos para o intestino médio (Neves *et al.*, 2002; Cruz-Landim e Cavalcanti, 2003; Martins *et al*., 2006) e posterior (Santos *et al.*, 2009; Gonçalves *et al*. 2017; 2018) .

Durante a metamorfose, os órgãos internos das larvas são modificados para desempenhar suas funções no indivíduo adulto (Cruz-Landim, 2009; Rolff *et al*, 2019). Portanto, o desenvolvimento das estruturas apropriadas para o adulto requer uma precisa coordenação dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular. Desse modo, é comum que no desenvolvimento pós-embrionário desses órgãos ocorra intensa proliferação celular (Takashima *et al*., 2008; Cruz *et al*., 2013; Fernandes *et al*., 2014; Ganeshina *et al*., 2000). A proliferação celular durante a metamorfose dos insetos promove o crescimento dos tecidos e órgãos, e, juntamente com morte celular programada, garantem a renovação celular e a reestruturação de órgãos em desenvolvimento (Robertson, 1936; Ganeshina *et al*, 2000; Harvey *et al*, 2003; Hakim *et al*, 2010).

A diferenciação celular é composta por diversas etapas programadas geneticamente, sendo assim um processo biológico complexo e vital. Sua principal função é regular a expressão de uma enorme variedade de genes ligados a funções tecido-especificas. Além disso, esse processo controla a proliferação celular. Dentro das etapas programadas destacam-se: a fase de proliferação das células progenitoras ou células-tronco que respondem a estímulo mitogênico; a ativação e/ou repressão de diversos genes; a expressão de proteínas responsáveis por mediar funções biológicas específicas; a diminuição progressiva da capacidade de responder a fatores

mitogênicos; e resultando na diferenciação terminal completa, associada à perda irreversível do potencial proliferativo (Naves, 2000).

A morte celular programada é um processo evolutivamente conservado que possui importante papel no desenvolvimento animal e na homeostase tecidual, removendo células e tecidos de animais multicelulares (Jacobson *et al*, 1997, Fuchs & Steller, 2011). Segundo o comitê de nomenclatura de morte celular (Galluzzi *et al*, 2012) são reconhecidos 13 tipos de mortes celulares classificadas molecularmente de acordo com a via de regulação intracelular e sinalizadores extracelulares, sendo apoptose e autofagia os mais comumente encontrados nos animais (Galluzzi *et al*, 2012).

Na metamorfose dos insetos, é demonstrado um equilíbrio entre proliferação e morte celular durante a remodelação do canal alimentar (Dobrovsky, 1951; Cruz-Landim & Silva-Mello, 1970; Cruz-Landim & Cavalcante, 2003; Cruz *et al*, 2013). Em *Melipona quadrifasciada* (Hymenoptera: Meliponini), há atividades apoptóticas e autofágicas durante a metamorfose do intestino médio (Cruz *et al*, 2013). Durante a metamorfose do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera), a autofagia precede a apoptose no intestino médio (Franzetti *et al*, 2012), enquanto em *Drosophila melanogaster* (Diptera) apenas a autofagia é essencial para a formação desse órgão (Denton *et al*, 2009).

As principais vias de sinalização celular de apoptose são as de caspase e quinase N-terminal c-Jun (JNK) (Ki *et al*., 2012; Ju *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2015). A caspase é uma cisteíno protease que atua como efetor primário durante a apoptose (Kumar, 2007), enquanto JNK é membro das proteínas quinases ativadas por mitogênios (MAPKs), uma família de proteínas que participam da regulação de vários processos biológicos, como apoptose, proliferação e diferenciação celular (Roux e Blenis, 2004; Pinal *et al*., 2019).

A morte celular por autofagia é caracterizada molecularmente pela presença da proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos) que é uma proteína citosólica (LC3 na forma I – LC3-I) que sofre uma clivagem C-terminal quando um sinal pró-autofágico ocorre, sendo convertida, assim, à forma II (LC3-II) que passa a se localizar especificamente na membrana de autofagossomos sendo degradada após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, (Glick *et al.* 2010).

A diferenciação celular tem como principal via de sinalização a Notch, um receptor de superfície celular envolvido na transdução de sinais de curto alcance interagindo com ligantes transmembrana (Kopan, 2012).

A proliferação celular pode ser detectada precocemente pela presença de histona-H3 fosforilada na extremidade amino, no sitio ocupado pela serina 10. A fosforilação da histona-

H3 está correlacionada a condensação cromossômica e ocorre quase exclusivamente durante a mitose (Hendzel *et al* 1997). A fosforilação da serina 10 da histona H3 ocorre inicialmente durante a prófase, atinge o máximo durante a metáfase, diminuindo na anáfase e é completamente perdida durante a telófase (Hendzel *et al* 1997).

Embora existam estudos que forneçam dados sobre as alterações que ocorrem no intestino anterior durante a metamorfose das abelhas, suas análises são histológicas, sendo necessárias informações mais detalhadas sobre os eventos de morte, proliferação e diferenciação celular. Este estudo em questão buscou verificar a ocorrência desses eventos na formação do proventrículo durante a metamorfose de *A. mellifera.*

## 2. OBJETIVO

Descrever os eventos envolvidos na formação do proventrículo durante a metamorfose em operárias da abelha *A. mellifera.*

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. ANIMAIS

Pré-pupas, pupas de olho branco, pupas de olho rosa, pupas de olho marrom e pupas de olho preto de *A. mellifera* foram coletadas diretamente de colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'N; 42°52'E).

### 3.2. HISTOLOGIA

Dez abelhas de cada estágio do desenvolvimento pupal foram crio-anestesiadas a -4°C e dissecadas em solução salina de inseto (0,1M NaCl + 0,1M $KH_2PO_4$ + 0,1M $Na_2HPO_4$) e seus intestinos anteriores juntamente com a primeira porção do intestino médio foram transferidos e mantidos em uma solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 horas a 5°C e depois lavadas com PBS. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70, 80, 90, 99%) e embebidas em historesina JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Secções com 3 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

### 3.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Indivíduos de *A. mellifera* de cada fase do desenvolvimento pupal foram dissecados em solução fisiológica para insetos onde tiveram seus intestinos anteriores e a primeira porção do intestino médio removidos para identificar proliferação e diferenciação celular, apoptose e autofagia. Dez indivíduos de cada fase de desenvolvimento pós- embrionário foram utilizados para cada análise. Após a dissecção, os intestinos foram transferidos para a solução fixadora de Zamboni por 2 horas. As amostras foram então lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 mais Tween-20 a 1% (PBST) por 2 horas. Após isso, as amostras foram incubadas por 12 horas nos seguintes anticorpos primários diluídos em PBS produzidos em coelho: (1) anti-fosfo-histona H3 (1: 100) (Cell Signaling Technology Cat # 9701S, Registro de Anticorpos: AB_331534) para detecção da proliferação celular , (2) caspase anti-clivada-3 (1: 500) (Trevigen Cat # 2305-PC-100, Registro de Anticorpos: AB_2665453) para detecção de apoptose e

(3) anti-LC3A / B (1: 500) (Abcam Cat # ab128025, Registro de Anticorpo: AB_11143008) para identificação de autofagia.(4) anti-Notch1 (1:200)( Cell Signaling Technology D6F11,#4380, Registro de Anticorpo AB_280898) para a identificação de diferenciação celular. Então as amostras foram lavadas em PBS e incubadas por 24 h, a 4 ° C, em outro conjunto de anticorpos primários diluídos em PBS produzidos em camundongos: anti-p-SAPK / JNK (# 9255, 1: 200) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA. Após a incubação dos anticorpos primários, os intestinos foram lavados com PBS 0,1 M e incubados por 24 h, a 4 ° C, com um anticorpo secundário conjugado IgG-FITC anti-coelho (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA; 1 :500), no escuro. Após essa etapa, os intestinos foram lavados em PBS 0,1 M e incubados por 24 h, a 4 ° C, com anticorpo secundário conjugado IgG-TRITC anti-camundongo (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, Mass., EUA; 1: 500 ), no escuro. As amostras foram então coradas com diamidino-2-fenilindol (DAPI; Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA; 1: 500) por 30 min e montadas em lâmina de microscópio em solução de sacarose a 30%. e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Para controles negativos, as incubações com anticorpos primários foram omitidas.

## 4. RESULTADOS

O intestino anterior das larvas de *A. mellifera* possui três estruturas, a faringe, o esôfago e a válvula estomodeal (Figura 1A). Nesta fase do desenvolvimento, a passagem entre o intestino anterior e intestino médio é aberta (Figura 1A). O esôfago e a faringe são formados por células epiteliais cúbicas, enquanto a válvula estomodeal é constituída por uma camada de células colunares que se dobra uma sobre a outra com a lâmina basal comum formando uma projeção em direção ao intestino médio (Figura 1B). Nessa fase do desenvolvimento larval, a musculatura é pouco aparente.

Na última fase larval de pré-pupa, o intestino anterior adquire um formato cilíndrico e uma parede espessa, suas células apresentam núcleos em diferentes alturas, caracterizando um epitélio pseudoestratificado (Figuras 2A e 2B). O lúmen se torna estreito e possui uma fina cutícula (Figura 2B), a passagem entre o intestino anterior e médio, onde antes se encontrava a válvula estomodeal é fechada e esta não é mais visível (Figura 2B). Toda região do intestino anterior apresenta rudimentos dos quatro lábios do proventrículo e é envolta por fibras musculares pouco desenvolvidas e uma grande quantidade de mioblastos (Figura 2C). A região

precursora do proventrículo da pré-pupa apresentou células positivas para os PH3 (Figura 2D), Notch (Figura 2E), Caspase-3 clivada e JNK (Figura 2F).

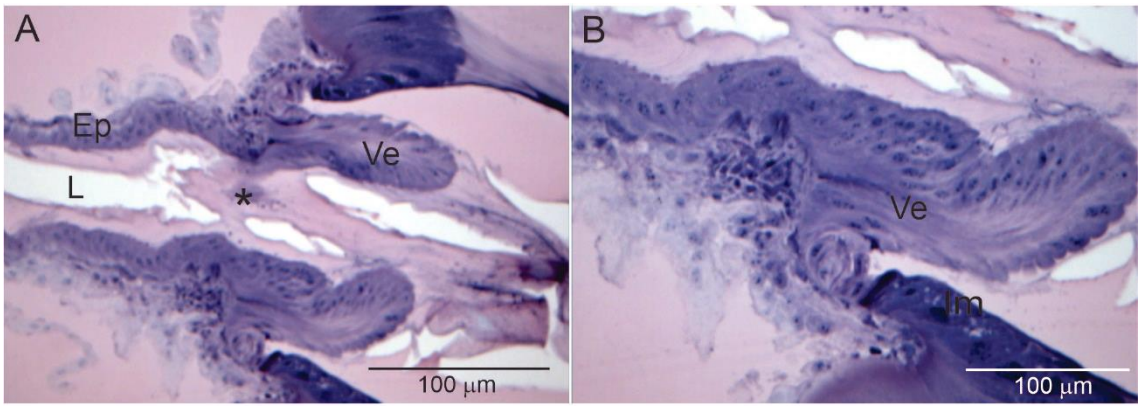


**Figura1:** Micrografia de luz do intestino anterior da larva de *Apis mellifera*. A. Corte longitudinal mostrando camada de epitélio cúbico (Ep) ao redor de um lúmen (L) e a transição entre intestino anterior e médio (*). B. Válvula estomodeal (Ve) e parede do intestino médio (Im).

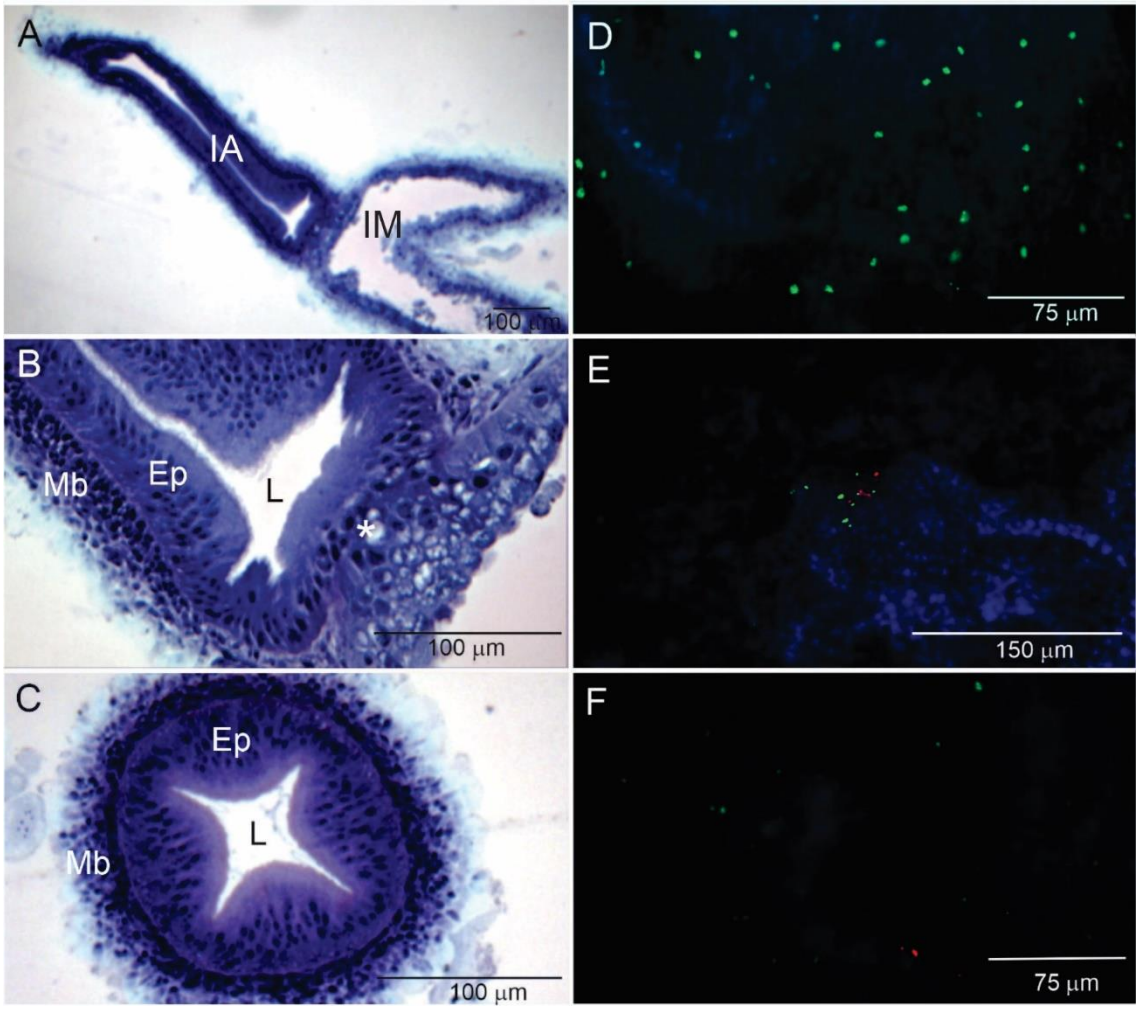


**Figura 2:** Micrografia de luz (A-C) e imunofluorescência (D-F) da região precursora do proventrículo da pré-pupa de *Apis mellifera*. A. Corte longitudinal mostrando a passagem do intestino anterior (IA) fechada para o intestino médio (IM). B). Detalhe da região do intestino anterior mostrando epitélio pseudoestratificado (Ep), lúmen (L) e musculatura pouco diferenciada com muitos mioblastos (Mb). Note células vacuolizadas na transição fechada para o intestino médio (*). C. Corte transversal mostrando os rudimentos dos quatro lábios do proventículo. D. células positivas para PH3 em verde. E células positivas para Notch (verde) F. Células positivas para caspase-3 clivada (verde) e JNK (vermelho). Núcleos em azul corados com DAPI.

No estágio de pupa acontece o processo de diferenciação e remodelação anatômica do intestino anterior que dará origem aos órgãos que farão parte do intestino anterior do adulto. São estes a faringe, o esôfago, o papo e o proventrículo, compreendendo este, a válvula estomodeal.

Na pupa de olho branco a região precursora do proventrículo apresenta um formato cilíndrico possuindo um lúmen estreito em todo seu comprimento (Figuras 3A e 3B) e na porção próxima ao intestino médio se alarga formando uma ampola (Figura 3B). A região precursora do proventrículo possui células colunares revestidas por cutícula, com núcleos ovais contendo grumos de cromatina condensada (Figura 3C e 3D). Nesta fase os rudimentos dos quatro lábios do proventículo estão presentes (Figura 3C) e a musculatura se encontra mais desenvolvida que

na pré-pupa com a presença de mioblastos (Figura 3D). A região precursora do proventrículo da pupa de olho branco apresentou células positivas para os anticorpos PH3 (Figura 4A), Notch (Figura 4B), Caspase-3 clivada e JNK (Figura 4C) e LC3 (Figura 4D).

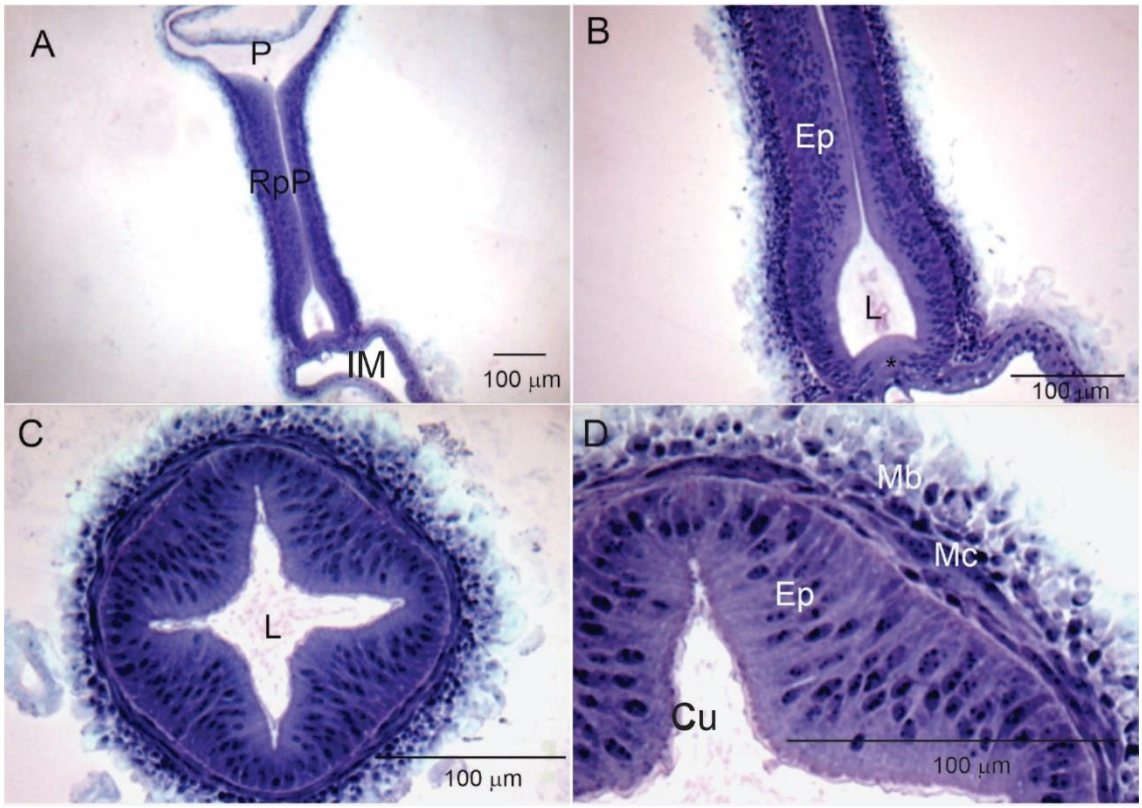


**Figura 3:** Micrografia de luz da região precursora do proventrículo da pupa de olho branco de *Apis mellifera*. A. Corte longitudinal mostrando a região precursora do papo (P) formado por uma camada de células epiteliais cúbicas, região precursora do proventrículo (RpP) e intestino médio (Im). B. O lúmen (L) do proventrículo passa a ter um formato mais amplo na porção posterior, espessamento do epitélio do proventrículo (Ep) e redução das células vacuolizadas na transição para o intestino médio (*). C. Corte transversal do proventrículo na região do bulbo mostrando os quatro rudimentos dos lábios formando o lúmen em cruz (L). D. Detalhe mostrando uma fina cutícula (Cu) que reveste o epitélio (L), presença de musculatura circular (Mc) e mioblastos (Mb).

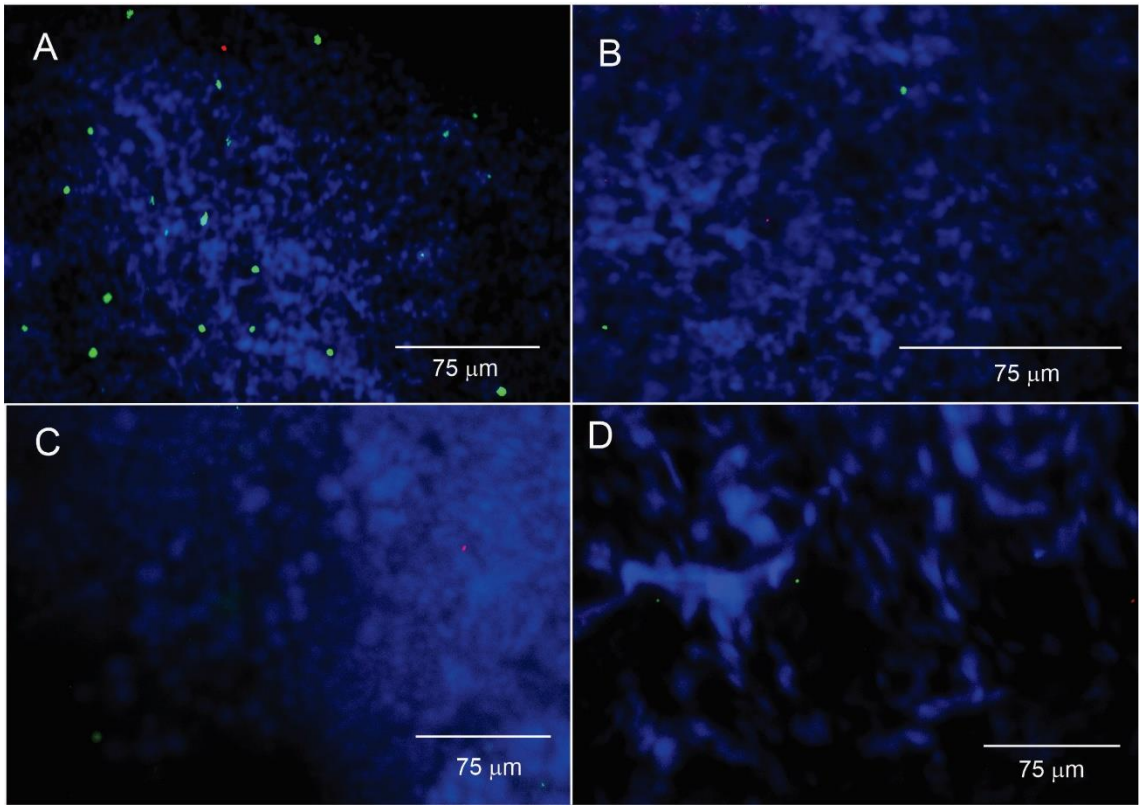


**Figura 4:** Imunofluorescência da região precursora do proventrículo da pupa de olho branco de *Apis mellifera*. A. células positivas para PH3 (verde). B. Células positivas para Notch (verde). C. Células positivas para caspase-3 clivada (verde) e JNK (vermelho). D. Células positivas para LC3 (verde). Núcleos em azul corados com DAPI.

No estágio de pupa de olho rosa ocorre uma mudança drástica no formato anatômico da região precursora do proventrículo sendo encontradas três áreas distintas nessa região que serão denominadas de porções anterior, mediana e posterior (Figuras 5A e 5B). A porção anterior, localizada próximo ao papo, possui células colunares alongadas e polarizadas com região apical mostrando citoplasma corado e núcleo oval, enquanto na região basal o citoplasma não se cora e vai se afinando ao longo de seu comprimento (Figura 5C). A porção mediana possui células cúbicas, com núcleos arredondados e citoplasma com aspecto vacuolizado (Figura 5B). A porção posterior apresenta células colunares e polarizadas, porém menos alongadas que aquelas da porção anterior, com citoplasma corado e núcleo oval em sua região apical, enquanto a região basal não se cora (Figura 5B). No lúmen é possível notar a cutícula mais espessa que na fase pupal anterior (Figura 5B). A musculatura nessa fase é mais desenvolvida, sendo ainda mais evidente a orientação das camadas musculares circular e longitudinal (Figura 5D). A passagem para o intestino médio permanece fechada (Figuras 5A e 5C). A região precursora do proventrículo da pupa de olho rosa não apresentou células positivas para os anticorpos PH3 (Figura 6A),

algumas positivas para Notch (Figura 6B) e poucas para Caspase-3 clivada e JNK (Figura 6C) e LC3 (Figura 6D).

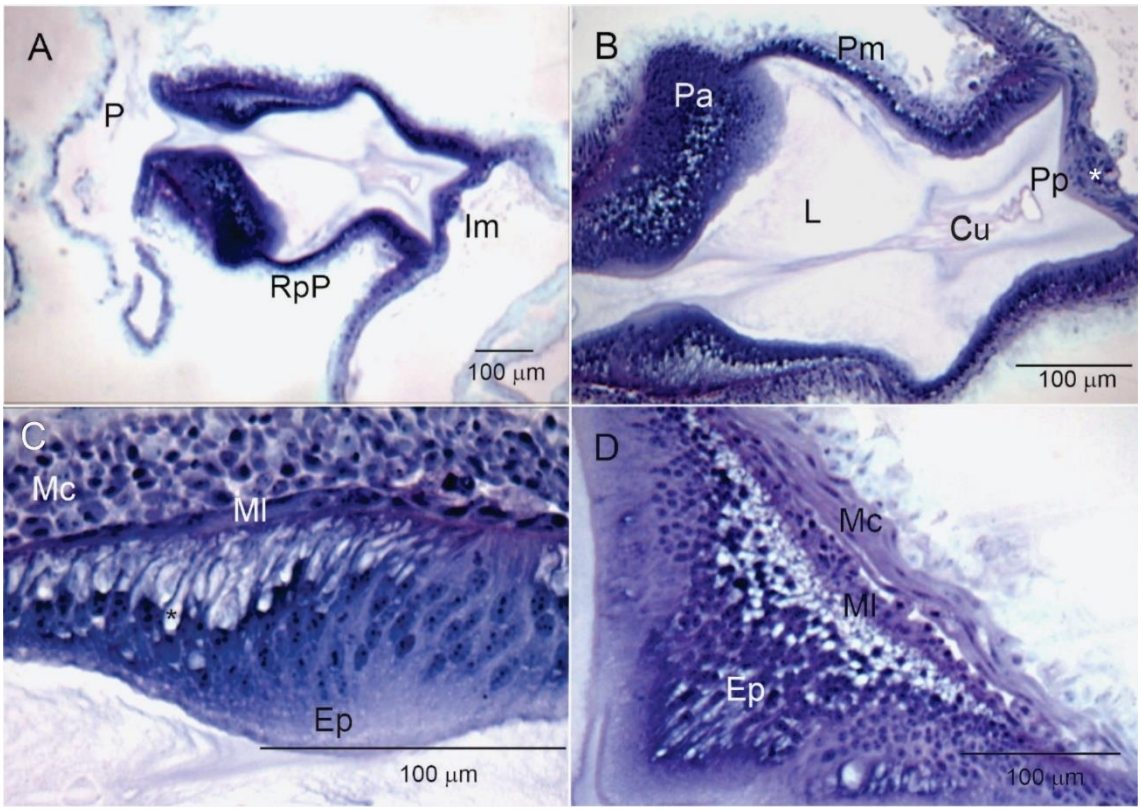


**Figura 5:** Micrografia de luz da região precursora do proventrículo da pupa de olho rosa de *Apis mellifera*. A. Corte histológico longitudinal mostrando a presença da região precursora do papo (P), da região precursora do proventrículo (RpP) e intestino médio (Im). B. Divisão anatômica da região precursora do proventrículo em porção anterior (Pa), mediana (Pm) e posterior (Pp) com lúmen dilatado (L) cutícula espessa (Cu), e transição para o intestino médio fechada (*). C. Epitélio (Ep) da porção anterior com células alongadas e citoplasma com coloração heterogênea D. Detalhe do bulbo do proventrículo mostrando a presença de musculatura longitudinal (Ml) e circular (Mc).

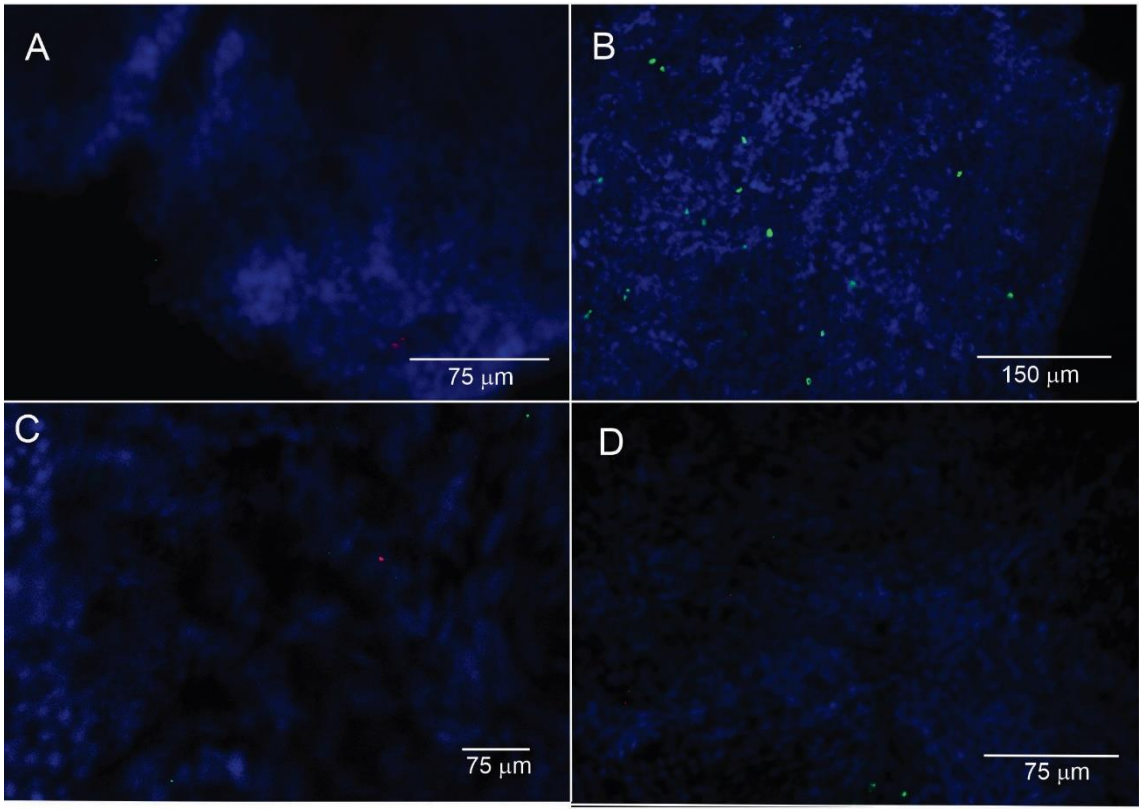


**Figura 6:** Imunofluorescência da região precursora do proventrículo da pupa de olho rosa de *A. melífera*. A. Ausência de células positivas para PH3 (verde). B. células positivas para Notch (verde). C. Células positivas para caspase-3 clivada (verde) e JNK (vermelho). D. Células positivas para LC3 (verde). Núcleos em azul corados com DAPI.

No estágio de pupa de olho marrom o principal evento é a formação da região precursora da válvula estomodeal (Figuras 7A-7C). Para formar esta válvula, o epitélio da porção posterior invagina internamente em direção à porção anterior, formando uma dobra do epitélio (Figuras 7A-C). Além disso, a porção média aumenta em comprimento e o lúmen se torna alargado (Figura 7A). A porção anterior não apresentou alterações significativas em formato de células e tamanho de estrutura em relação à fase pupal anterior (Figura 7B). Nessa fase a cutícula continua sendo secretada em direção ao lúmen e a musculatura é espessa (Figura 7B). A região precursora do proventrículo da pupa de olho marrom apresentou células positivas para os anticorpos PH3 (Figura 7A), Notch (Figura 7B), Caspase-3 clivada (Figura 7C) e LC3 (Figura 7D).

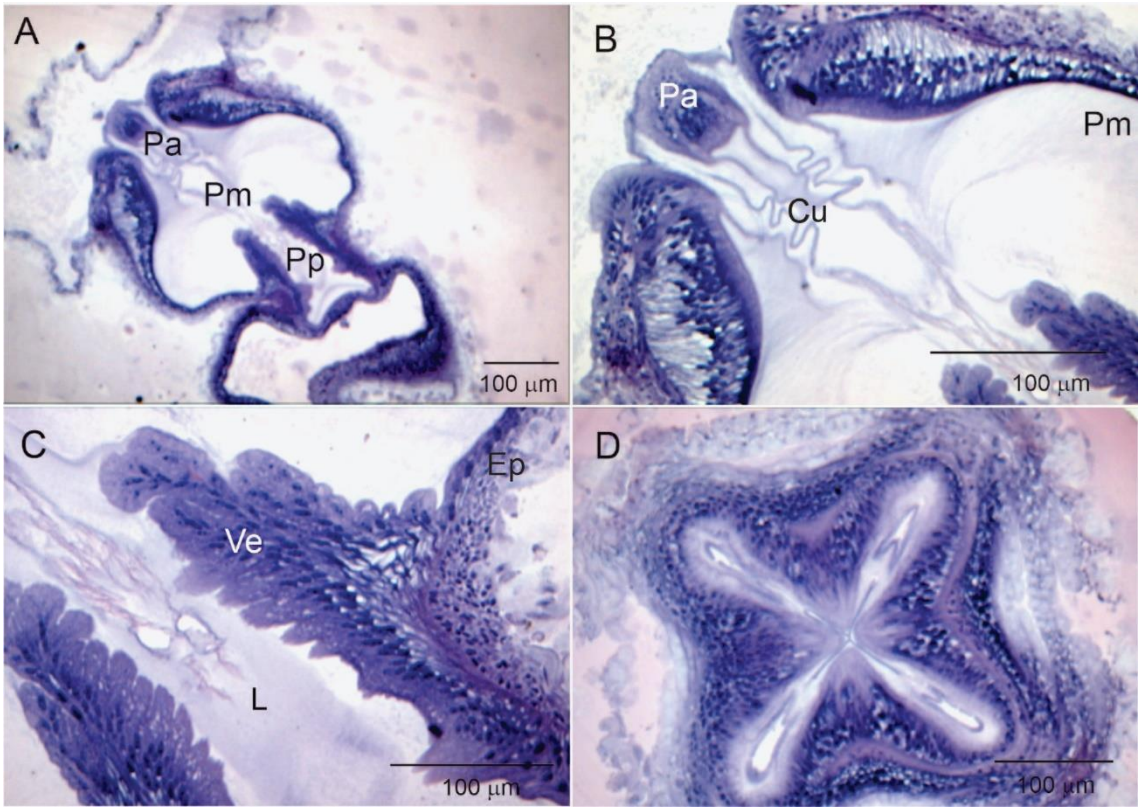


**Figura 7:** Micrografia de luz da região precursora do proventrículo da pupa de olho marrom de *Apis mellifera*. A. Corte histológico longitudinal mostrando a divisão anatômica da região precursora do proventrículo em porção anterior (Pa), mediana (Pm) e posterior (Pp) B. Porção anterior (Pa) e porção mediana (Pm) com lúmen dilatado (L) e cutícula espessa (Cu). C. Porção posterior (Pp) mostrando a válvula estomodeal rudimentar (Ve), em direção ao lúmen (L). D. Corte histológico transversal da região precursora do bulbo.

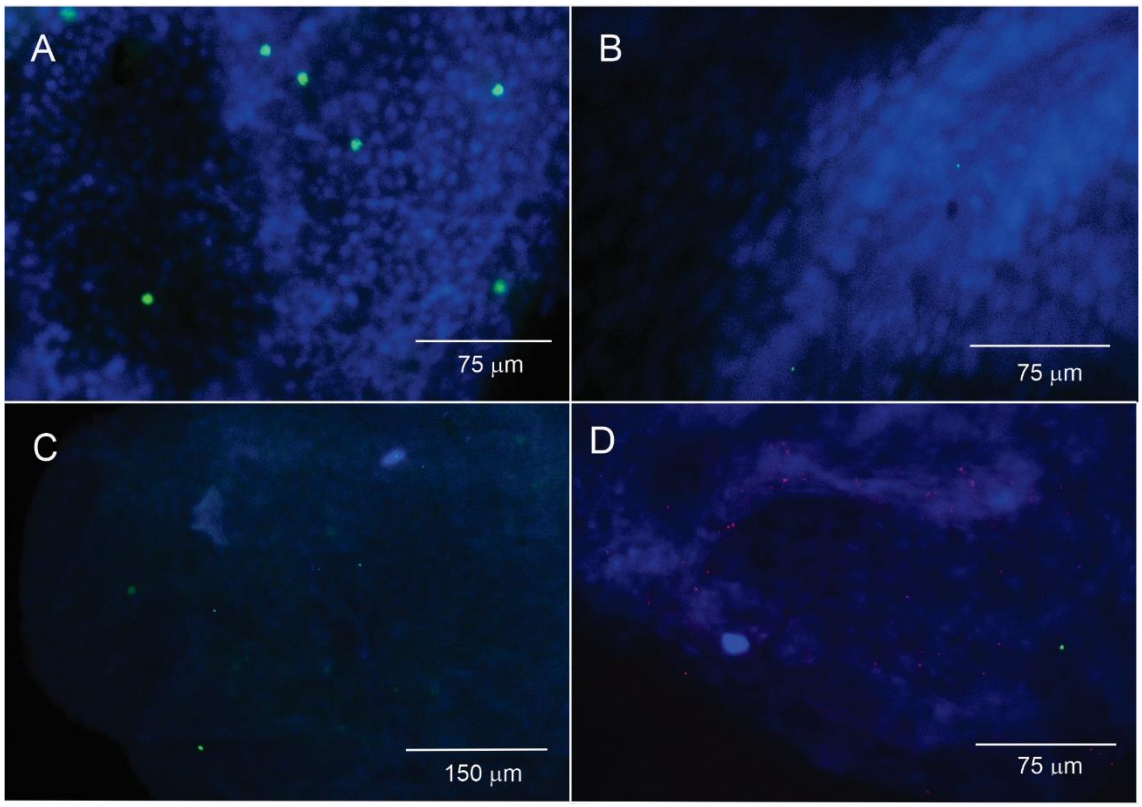


**Figura 8:** Imunofluorescência da região precursora do proventrículo da pupa de olho marrom de *Apis mellifera*. A.Marcações positivas para PH3 (verde). B. Marcações positivas para Notch (verde). C. Marcações positivas para caspase-3 clivada (verde) D. Marcações positivas para LC3 (verde). Núcleos em azul corados com DAPI.

No estágio de pupa de olho preto, todo epitélio da região precursora do proventrículo é cúbico, exceto a região precursora da válvula estomodeal que possui células altas (Figuras 9A e 9B). No lúmen, a cutícula é espessa e a musculatura está desenvolvida, com estrias aparentes (Figuras 9C e 9D). A região precursora do proventrículo da pupa de olho preto não apresentou células positivas para os anticorpos testados.

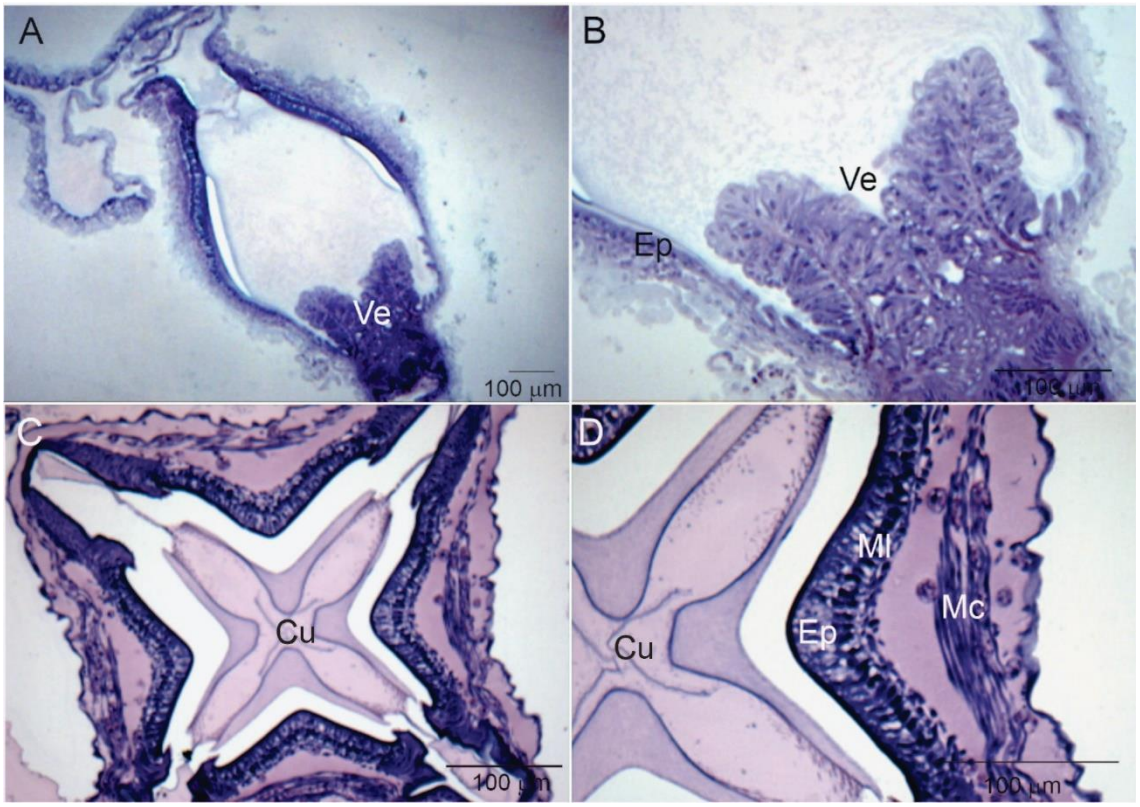


**Figura 9:** Micrografia de luz da região precursora do proventrículo da pupa de olho preto de *Apis mellifera* A. Corte histológico longitudinal o mostrando o formato da região precursora do proventrículo.e a válvula estomodeal (Ve). B. Epitélio (Ep) da porção posterior com células cúbicas e válvula estomodeal (Ve) com células alongadas e citoplasma com coloração homogênea. C.Corte histológico transversal da região do bulbo do proventrículo. D. Detalhe do bulbo do proventrículo mostrando a presença de musculatura longitudinal (Ml) e circular (Mc), o epitélio (Ep) e a cutícula espessa (Cu).

No adulto o proventrículo se encontra completamente formado e funcional semelhante àquele descrito para pupa de olho preto, porém a válvula estomodeal é projetada para o interior do intestino médio e a passagem entre intestino médio e anterior encontra-se aberta (Figuras 10A-10D).

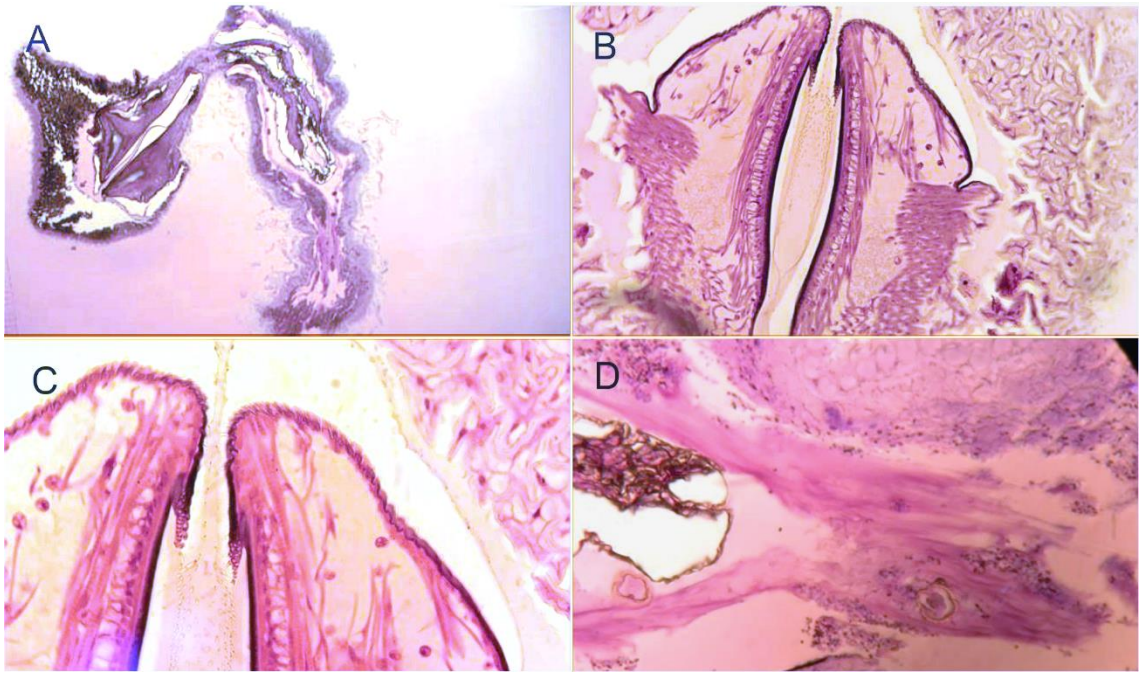


**Figura 10:** Micrografia de luz do proventrículo da operária adulta de *A.mellifera.* A. Corte histológico longitudinal do proventrículo. B. Região do bulbo do proventrículo. C. Cutícula em forma de espinhos na região do bulbo do proventrículo. D. Válvula estomodeal no interior do intestino médio.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve aspectos morfológicos e moleculares do processo de formação do proventrículo durante a metamorfose da abelha *A. mellifera* contribuindo para ampliar o conhecimento sobre o desenvolvimento do trato digestório deste importante polinizador descrito no trabalho pioneiro de Dobrovsky (1951).

Durante a fase larval, o sistema digestivo das abelhas é bastante simples e pouco diferenciado, sendo o intestino anterior formado pelo esôfago, faringe e válvula estomodeal. Essas estruturas sofrem modificações durante a metamorfose, chegando ao fim desse processo, na fase adulta, como faringe, esôfago, papo e proventrículo. No sistema digestório larval, o único componente do proventrículo é a válvula estomodeal. Nessa fase a válvula estomodeal projeta-se para o interior do intestino médio, e a passagem entre este e intestino anterior encontra-se aberta. Essas observações corroboram com o que foi descrito por Cruz-Landin (2009) mas diferem do que foi relatado por Dobrovsky (1951) que descreve a válvula estomodeal como uma estrutura que se projeta para o interior do ventrículo apenas em larvas jovens, sendo que em larvas mais velhas, também denominadas larvas defecantes a válvula aparece voltada para o interior do lúmen do estomodeu. Aqui encontramos a válvula estomodeal projetada para o interior do ventrículo em todas idades larvais.

Na fase pré-pupal, o epitélio da região do proventrículo apresenta um aspecto pseudo-estratificado, com citoplasma uniformemente corado. Apesar de recobrir as células epiteliais, a cutícula não se encontra agregada a elas, e o intestino anterior, como um todo, é envolto externamente por uma grande quantidade de mioblastos em processo de diferenciação celular. A passagem entre o intestino anterior e médio, que antes estava aberta, agora é fechada e a válvula estomodeal não é mais visível. As características anatômicas do trato digestivo estão diretamente relacionadas à alimentação do indivíduo, e a passagem se fechar na fase que precede o estágio de pupa pode estar relacionada com o fato de pupas não se alimentarem. A fase pré-pupal corresponde idade final do estágio larval, representando o início da metamorfose (Pinto *et al.,* 2002) e a transição de larva para adulto, período em que se espera um alto nível de reorganização celular. Neste estudo foram encontradas grandes quantidades de células positivas para PH3, caspase 3, e Notch, indicando intensa proliferação celular, apoptose e diferenciação celular, respectivamente, provavelmente devido à remodelação em curso, semelhante ao encontrado na metamorfose do intestino médio de Hymenoptera, em que tem início nessa fase a degeneração do epitélio larval, restando somente a membrana basal e as células regenerativas, ao mesmo tempo, algumas células regenerativas proliferam, espalham-se pela membrana basal e constroem o novo epitélio (Cruz-Landim & Silva-Mello, 1970; Gama & Cruz-Landim, 1984; Neves *et al*., 2002; Martins *et al*., 2006). A ausência da válvula estomodeal na pré-pupa que anteriormente estava presente e a quantidade de células apoptóticas pode sugerir que ocorreu uma degeneração dessa estrutura como ocorre no intestino médio.

Com o final do estágio pré-pupal, tem início a metamorfose com a pupa de olho branco. Nesse estágio, o epitélio da região formadora do proventrículo deixa de ser pseudoestratificado e passa a ser simples com células colunares com citoplasma uniformemente corado, sendo a cutícula secretada em forma de feixes. O intestino anterior que possuía um formato cilíndrico e uniforme começa a sofrer modificações com a dilatação na região final do esôfago, dando origem ao papo. Adjacente a ele, há quatro dobras na extremidade anterior, estas darão origem posteriormente ao bulbo. Após a formação do papo e reorganização do intestino médio, ocorrida na fase anterior, o ventrículo aumenta de tamanho, ficando assim, entre eles, a região onde ocorrerá a formação do proventrículo. Para Dobrovsky (1951), ainda que não esteja completamente diferenciado esta região já pode ser reconhecida como proventrículo, no entanto, como essa segue em processo de formação, aqui denominaremos esta região como precursora do proventrículo até que este esteja completamente diferenciado e funcional. Análises de imunofluorescência da pupa de olho branco de *A. mellifera* mostram grande quantidade de células positivas para PH3, indicando que durante esta fase segue ocorrendo uma intensa proliferação celular,

diferentemente do que ocorre no intestino médio que cresce por um aumento no volume das células (Cruz-Landim, 2009; Cruz *et al*., 2011). Em pupas de olhos brancos da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*, não há aumento substancial na taxa de proliferação celular porque o aumento do volume celular combinado com a baixa taxa de morte celular parece ser suficiente para promover esse aumento do intestino médio (Cruz *et al*., 2013). Assim, diferentemente do que ocorre no intestino médio, o proventrículo no início do estágio pupal se modifica anatomicamente por um aumento no número de células com pouca ocorrência de morte e diferenciação celular.

O próximo estágio do processo de desenvolvimento pupal corresponde as pupas com pigmentação dos olhos na cor rosa. Durante essa fase a diferenciação anatômica na região precursora do proventrículo é significativa sendo possível identificar regiões anterior, mediana e posterior. A região anterior é aquela próxima ao precursor do papo, a posterior adjacente ao intestino médio e a mediana entre as duas citadas anteriormente. Na região anterior há quatro dobras rudimentares que posteriormente irão formar o bulbo do proventrículo. A porção apical da célula apresenta citoplasma corado e o núcleo. A porção celular basal não se cora pela hematoxilina e eosina, o que pode ser devido a depleção citoplasmática, tendo em vista que ocorre um alongamento ao ponto dessas células parecerem filamentos presos à membrana basal. Na região mediana precursora do proventrículo, as células são cúbicas, enquanto na região posterior são alongadas, mas com menor grau de alongamento quando comparadas com as da região anterior, mesmo assim as células dessas duas regiões também apresentam sinais de esgotamento citoplasmático com porções não coradas. Nessa fase a cutícula segue sendo secretada e os músculos longitudinais e circulares estão evidentes, embora a passagem entre o intestino anterior e o médio permaneça fechada, a camada de células pertencentes ao intestino médio é mais delgada. Na pupa de olho rosa não há células positivas para PH3 e para apoptose e autofagia são raras, havendo predomínio de células positivas para Notch, indicando intensa atividade de diferenciação celular, corroborando com as modificações histológicas encontradas nas células epiteliais. É também nesse estágio que a anatomia da região se modifica significativamente e as células começam a apresentar uma grande mudança em sua forma. Nas abelhas, uma nova transformação do intestino médio começa nas pupas de olho rosa (Cruz-Landim e Mello, 1970; Cruz *et al*. 2011) que coincide com um aumento nas concentrações de ecdisteróides (Pinto *et al*., 2002). Aumento na taxa de proliferação celular em tecidos de insetos foi correlacionado com altos títulos de ecdisteróides (Champlin e Truman, 1998). Em células de insetos cultivadas, os hormônios ecdisteróides estimulam a proliferação, embora altas concentrações do hormônio possam induzir apoptose (Champlin e Truman 1998). Em pupas de olho rosa de *M. quadrifasciata*

*anthidioides*, foram observadas extensas mudanças no intestino médio devido a uma grande quantidade de células mitóticas e apoptóticas (Cruz *et al*., 2013). Nesse mesmo estágio, no intestino posterior de *A. mellifera*, as células epiteliais apresentam invaginações apicais na membrana plasmática e grande número de vesículas (Gonçalves *et al,* 2017). Essas características sugerem que nessa fase ocorre uma endocitose do lúmen intestinal, possivelmente de compostos orgânicos de degradação cuticular, semelhante à do intestino posterior de *Locusta migratoria* (Orthoptera) (Locke e Huie, 1979) e da epiderme de *Calpodes ethlius*. (Lepidoptera) durante a muda de insetos (Peacock, 1986), sendo os compostos reabsorvidos da cutícula degradada reutilizados durante a produção da nova cutícula (Surholt, 1975; Kaznowski et al., 1986; Reynolds e Samuels, 1996). As mudanças ocorridas tanto no intestino médio quanto posterior diferem das ocorridas no intestino anterior. Supõe-se que a ausência de coloração nas regiões basais das células do intestino anterior seja devido ao processo de diferenciação celular que causa um alongamento celular e a perda de organelas citoplasmáticas, estudos devem ser feitos para investigar se ecdistéroides podem influenciar também na diferenciação celular.

Durante a fase pupa de olho marrom, não há mudanças expressivas nas células da região anterior e mediana da região precursora do proventrículo em comparação com aquelas das pupas de olho rosa. A mudança mais significativa se dá na região posterior com as células epiteliais se projetando para o lúmen do intestino anterior, formando assim a válvula estomodeal rudimentar. Nestas pupas há muitas células positivas para PH3 com poucas para Notch, Caspase 3 e LC3, indicando o predomínio de proliferação celular. A proliferação celular durante a metamorfose dos insetos promove o crescimento de órgãos, e em conjunto com morte celular programada, promove a renovação celular e a reestruturação de órgãos em desenvolvimento (Robertson, 1936; Ganeshina *et al*., 2000; Harvey *et al*., 2003; Hakim *et al*., 2010). Durante a metamorfose o intestino médio tem seu epitélio renovado por proliferações celulares e apoptoses na abelha de *M. quadrifasciata* (Cruz *et al*., 2013) e no bicho da seda e *B. mori* , (Franzetti *et al*., 2012), enquanto que as papilas retais de *M. quadrifasciata*, localizadas no final do intestino posterior, surgem por proliferações celulares e são moldadas por mortes celulares programadas (Santos *et al*., 2009). Os dados aqui obtidos indicam que a reorganização da válvula estomodeal ocorre por proliferação celular no intestino anterior. Nesse caso, pode ser sugerido que as novas células se "empurram" provocando uma reestruturação do tecido e causando a invaginação destas para o interior do intestino anterior, formando assim a válvula estomodeal.

A etapa seguinte corresponde às pupas com pigmentação dos olhos na cor preta, com as células epiteliais da região precursora do proventrículo com aspecto uniforme. A região anterior ainda apresenta algumas células alongadas com sinais de depleção citoplasmática, porém,

quanto mais próximo da região posterior da região precursora, mais as células apresentam um formato cúbico com citoplasma uniformemente corado. As células da válvula estomodeal rudimentar não apresentam sinais de esgotamento citoplasmático, demonstrando que a diferenciação total do órgão está cada vez mais próxima. Apesar do proventrículo ser semelhante àquele da abelha adulta, este ainda não se encontra totalmente diferenciado, pois a passagem entre o intestino anterior e médio permanece fechada e a válvula estomodeal rudimentar segue voltada para o lúmen do intestino anterior, o que não interfere no funcionamento do trato digestório, pois as pupas não se alimentam, indicando o trato digestivo não está funcional.

Nas pupas de olho preto, não ocorrem células em morte, proliferação e diferenciação celular, o que pode indicar o fim do processo de remodelação ocorrido durante a metamorfose. As mudanças ocorridas a partir de agora, como a abertura da passagem e a mudança de posição da válvula provavelmente podem acontecer por movimentos do epitélio.

Estudos anteriores, como o de Cruz-Landin (2009), consideram que o intestino anterior não sofre uma real metamorfose no sentido de degeneração ocorrendo apenas diferenciação e reorganização durante a pupação. Porém a ausência da válvula estomodeal na pré-pupa juntamente com um grande número de células em apoptose e a reorganização da válvula estomodeal na pupa de olho marrom podem estar indicando que o intestino anterior não se degenera completamente como acontece no intestino médio, mas uma parte essencialmente importante dele se degenera e é reconstruída durante a metamorfose.

Em geral, nossos resultados mostram que a morfogênese do proventrículo de *A. mellifera* é dinâmica, com remodelação tecidual e eventos celulares ocorrendo para a degeneração e regeneração de constituintes fundamentais desse órgão.

## REFERÊNCIAS

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

Caetano, F.H.; Overal, W.L (1984) Estudos do trato digestivo de vespas (Hymenoptera: Vespidae) e estruturas excretoras associadas. Revista Brasileira de Entomologia, 28(4): 403-408.

Chapman, R.F (1998) The insects - structure and function. 4ª ed. Cambridge Press, Cambridge.

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

Cruz-Landim, C. (1994) Ultrastructure of the ileum epithelium of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (hymenoptera, apidae, meliponinae). Journal of Morphology, 222: 191-201.

Cruz-Landim, C. (2009) Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Ed. UNESP, 408 p.

Cruz, L.C., Araújo, V.A., Dolder, H., Araújo, A.P.A., Serrão, J.E., Neves, C.A. (2011) Morphometry of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. Neotrop. Entomol. 40: 677–681.

Cruz, L.C., Araújo, V.A., Fialho, M.D.C.Q., Serrão, J.E., Neves, C.A. (2013) Proliferation and cell death in the midgut of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) during metamorphosis. Apidologie, 44: 458–466.

Cruz-Landim, C., Cavalcante, V.M. (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). Zoological Science, 20: 1099–1107.

Cruz-Landim, C.; Mello, M.L.S. (1970) Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. IV. Development of the digestive tract. Boletim de Zoologia e Biologia Marinha, 27: 229-263.

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

Denton, D., Shravage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D.L., Baehrecke, E.H., Kumar, S. (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. Current Biology, 19: 1741–1746.

Dobrovsky, T.M. (1951) Postembryonic changes in the digestive tract of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). Cornell Univ. Agr. Exp. Stal. Mem, 301: 3–47.

Dow, J.A.T (1986) Insect midgut function. Advances Insect Physiology, 19: 187-328.

Erlandson, M.A., Toprak, U., Hegedus, D.D. (2019) Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. Journal of Insect Physiology, 117: 103894.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E.; Martins, G. F. (2014) *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. Parasitology International (Print), 506-512.

Franzetti, E., Huang, Z.J., Shi, Y.X., Xie, K., Deng, X.J., Li, J.P., Li, Q.R., Yang, W.Y., Zeng, W.N., Casartelli, M., Deng, H.M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q. (2012) Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. Apoptosis, 17: 305–324.

Fuchs, Y., Steller, H. (2011) Programmed cell death in animal development and disease. Cell, 147:742-758.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., et al. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death and Differentiation, 19: 107-120.

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

Ganeshina, O., Schäfer, S., Malun, D. (2000) Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. Journal of Comparative Neurology, 417: 349-365.

Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of pathology, 221(1): .3–12.

Gonçalves, W.G., Fernandes, K.M., Santana, W.C., Martins, G.F. and Serrão, J.E. (2018) Post-embryonic development of the Malpighian tubules in *Apis mellifera* (Hymenotpera) workers: morphology, remodeling, apoptosis, and cell proliferation. Protoplasma 255: 585-599.

Gonçalves, W.G., Fernandes, K.M., Santana, W.C., Martins, G.F., Zanuncio, J.C. and Serrão, J.E. (2017) Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. Developmental Biology 431: 194-204.

Hakim, R. S., Baldwin, K., Smagghe, G. (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. Annual Review of Entomology, 55: 593-608.

Harvey, K. F., Pfleger, C. M., Hariharan, I. K. (2003) The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. Cell, 114: 457-467.

Hendzel, M., Wei, Y., Mancini, M. et al. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. Chromosoma, 106: 348–360.

Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. Cell, 88: 347-354.

Ju, J., Qi, Z., Cai, X., Cao, P., Liu, N.,Wang, S., Chen, Y. (2013) Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathway in HL-60 cells. Toxicol. in Vitro, 27: 232–238.

Judy, K.J. & Gilbert, L.I. 1970. Histology of the alimentary canal during the metamorphosis of Hyalophora cecropiam (L). J. Morphol. 131: 277-300.

Kaznowski, C.E., Schneiderman, H.A., Bryant, P.J., (1986). The incorporation of precursors into Drosophila larval cuticle. J. Insect Physiol. 32 (2): 133–142.

Kerr, E.W., Amaral, E. (1960) Apicultura científica e prática. São Paulo, Indústrias.

Kerr WE; Carvalho GA; Nascimento VA (1996) Abelha uruçu – biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú. Belo Horizonte.

Ki, Y.W., Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., Koh, H.C. (2012). Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SHSY5Y cells in response to fipronil. Toxicol. Lett, 211: 18–28.

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

Kopan, R. (2012). Notch signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4, a011213.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ. 14. 32–43.

Liu, X., Cooper, A.M.W., Zhang, J., Zhu, K. Y. (2019) Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. Journal of Insect Physiology, 114:109-115.

Locke, M., Huie, P., (1979). Apolysis and the turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. Tissue Cell. 11 (2): 277–291.

Maddrell, S.H.P. (1981). The functional design of the insect excretory system. J Exp Biol 90: 1-15.

Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.O., Serrão, J.E. (2006) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. Micron 37, 161–168.
Marques-Silva, S., Serrão, J.E., Mezêncio, J.M.S. (2005) Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: Imunolocalization of secretory sites. Acta Histochemica, 107: 23 -30.

Michelette, E.R.F., Soares, A.E.E. (1993) Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L). Apidologie, 24: 431–440.
Naves,M.M.V.,Moreno,F.S.(2000)Diferenciação Celular: Importância na Hepatocarcionogênese e papel modulador do β-caroteno. Revista Brasileira de Cancerologia, 46(4): 389-99.

Neves, C.A., Bhering, L.L., Serrao, J.E. and Gitirana, L.B. (2002) FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in Melipona quadrifasciata anthidioides (Hymenoptera, Apidae). Micron 33: 453-460.

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

Peacock, A.J. (1986). Ultrastructure of the ileum of *Locusta migratoria*. J. Morphol. 188 (2): 191–201.

Peixoto, E.B.M.I., Serrão, J.E. (2001) A comparative study of the cardia and cardiac valves in corbiculate bees (Hymenoptera, Apinae). Sociobiology, 37: 707-721.

Peng, Y.S., Marston, J.M. (1986) Filtering mechanism of the honeybee proventriculus. Physiological Entomolgy, 11: 433-439.

Pinal, N., Calleja,M., Morata, G. (2019). Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of Drosophila: roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. Open Biol, 9. 180256.

Pinto, L.Z., Hartfelder, K., Gentile-Bitondi, M.M., Simões, Z.L.P. (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. J. Insect Physiol. 48,:783–790.

Reynolds, S.E., Samuels, R.I., (1996). Physiology and biochemistry of insect moulting fluid.Adv. Insect Physiol, 26:157–232.
Robertson, C.W. (1936) The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. Journal of Morphology, 59: 351–399.

Rolff, J., Johnston, P.R., Reynolds, S. (2019) Complete metamorphosis of insects. Phil. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 374: 20190063.

Roux, P.P., Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev, 68: 320–344.

Santos, C.G., Neves, C.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. (2009) Postembryonic development of rectal pads in bees (Hymenoptera, Apidae). Anatomical Record, 292: 1602–1611.

Serrão, J.E. (2001) A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). Micron, 32: 379-385.

Serrão, J.E. (2005) Proventricular structure in solitary bees (Hymenoptera, Apoidae). Organisms, Diversity & Evolution, 5: 125-133.

Serrão, J.E. (2007) Proventricular structure in the bee tribe Augochlorini (Hymenoptera: Halictidae). Organisms, Diversity & Evolution, 7: 175-180.

Serrão, J.E., Cruz-Landim, C. (1995) Comparative size and histology of the proventriculus and midgut among the female castes and males of the *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). Biociencias, 3: 85-94.

Serrão, J.E., Cruz-Landim, C. (1996) A specialized midgut region in stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). Biocell, 20: 227-234.

Snodgrass, R.E. (1956). Anatomy of the honeybee. Ithaca, Comstock Publishing Associates.

Surholt, B., 1975. Studies in vivo and in vitro on chitin synthesis during the larval-adult moulting cycle of the migratory locust, Locusta migratoria L. J. Comp. Physiol. B102 (2): 135–147.

Takashima, S., Mkrtchyan, M., Younossi-Hartenstein, A., Merriam, J.R., Hartenstein, V. (2008). The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. Nature, 454: 651–655.

Terra, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. Annual Review Entomological, 35: 181-200.

Terra, W.R. (2001). The Origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 47: 47-61.

Wigglesworth, V.B (1932). Memoirs: On the Function of the so-called 'Rectal Glands' of Insects. J Cell Sci s2-75 (297): 131–150.

Zhang, B., Xu, Z., Zhang, Y., Shao, X., Xu, X., Cheng, J., Li, Z., (2015). Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in Drosophila S2 cells. Pestic. Biochem. Physiol. 119: 81–89.