

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



LILIAN COTA CRUZ

**“METAMORFOSE DO INTESTINO MÉDIO DE ABELHAS:
PROLIFERAÇÃO OU MIGRAÇÃO CELULAR?”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lilian Cota Cruz
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Co-Orientador: Prof. Dr. Clóvis Andrade Neves

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C889m	Cruz, Lilian Cota Metamorfose do intestino médio de abelhas: proliferação ou migração celular? / Lilian Cota Cruz. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadores: Mary Anne Heidi Dolder, Clóvis Andrade Neves. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Abelha. 2. Intestino médio. 3. Proliferação celular. 4. Regeneração (Biologia). 5. Metamorfose. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Neves, Clóvis Andrade. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
--------------	---

Título em inglês: Metamorphosis in the midgut of bees: proliferation or cellular migration?

Palavras-chave em inglês: Bee; Midgut; Cell proliferation; Regeneration (Biology); Metamorphosis.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Mary Anne Heidi Dolder, Flávio Henrique Caetano, José Eduardo Serrão.

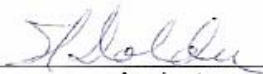
Data da defesa: 26/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

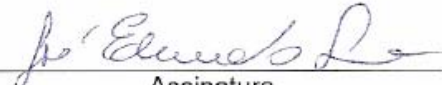
Campinas 26 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. José Eduardo Serrão


Assinatura

Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Assinatura

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Assinatura

*“Não serei o poeta de um mundo caduco.
Também não cantarei o mundo futuro.
Estou preso à vida e olho meus companheiros.
Estão taciturnos, mas nutrem grandes esperanças.
Entre eles, considero a enorme realidade.
O presente é tão grande, não nos afastemos.
Não nos afastemos muito, vamos de mãos dadas.

Não serei o cantor de uma mulher, de uma história,
não direi os suspiros ao anoitecer, a paisagem vista da janela,
não distribuirei entorpecentes ou cartas de suicida,
não fugirei para as ilhas nem serei raptado por serafins.

O tempo é a minha matéria, o tempo presente, os homens presentes,
a vida presente.”*

Mãos Dadas
Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e a UFV pela infra-estrutura disponível e a Capes pelo suporte financeiro.

A minha orientadora Prof^a. Heidi, pela confiança, pela paciência, ajuda, amizade e incentivo em todos os momentos.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Clóvis, da UFV, pelo apoio e incentivo desde a graduação. Serei eternamente grata pela ajuda, idéias e principalmente, pela amizade e exemplo profissional.

Aos demais professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, ao pessoal técnico e administrativo pelo apoio prestado.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV, em especial aos professores Lúcio, Serrão, Lino, Silvia e aos funcionários do Apiário da UFV que contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho. Aos meus queridos pais pelo amor, incentivo, apoio e exemplo. Aos meus irmãos, Joanes e Hamilton, pelo carinho e amizade. Aos meus avós, tios e primos pelas alegrias e união. Ao meu amor Marcelo, pelo companheirismo, amor, paciência e por me fazer tão feliz.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Biologia Estrutural da UFV pelo apoio e principalmente por fazerem do trabalho uma diversão. Agradeço em especial ao Alipio's Group pelo companheirismo, pelas boas risadas e pelo apoio. Ao Alex pela ajuda sempre!!! Ao meu grande amigo Vinícius, a quem nem tenho palavras para agradecer! Muito obrigada pela idéias, incentivo, apoio e principalmente pela amizade. A Paula pela ajuda em vários momentos. Agradeço ainda aos meus grandes amigos de Viçosa em especial a Elaine e também minhas irmãzinhas do JD. Obrigada Re, Van, Kátia, Cyn, Nanda, Pati e Lets pela paciência, carinho e amizade. Aos grandes amigos de Campinas, em especial a Cíntia, Pedro, Ju Monteiro, Fabrícia, Karina, Ju Moya, Taís, Tati, Marcos, João, Júnior pela ajuda, pelo abrigo e pelas farras!!!

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!!!

As abelhas são insetos holometábolos, pois apresentam metamorfose completa. Na metamorfose destes insetos, o trato gastrointestinal é completamente remodelado. Poucos estudos enfatizam os aspectos que envolvem a reconstituição do epitélio do intestino médio de abelhas durante a metamorfose. Os trabalhos que destacam a proliferação das células digestivas durante a metamorfose carecem de documentação das figuras de mitose. O presente trabalho contribui para o conhecimento da biologia dos Hymenoptera, gerando dados que possam esclarecer aspectos da fisiologia digestiva durante a metamorfose dos insetos sociais. Comprovamos a necessidade de aumento do número de células digestivas do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* ao final da metamorfose sem, contudo, observar figuras de mitose que comprovassem a proliferação destas células, como notado em *Nasutitermes rotundatus* (Holmgren) (Isoptera). É possível que as células regenerativas tenham origem externa ao intestino médio e migrem através da membrana basal para se estabelecerem no epitélio. Além disso, nesse trabalho descrevemos a morfologia do epitélio do intestino médio com auxílio da microscopia eletrônica de varredura, demonstrando que somente a membrana peritrófica diferiu entre as castas.

Bees are holometabolus insects, since they present complete metamorphosis. During the metamorphosis of the insects the gut is completely remodeled. Few studies emphasize aspects of the renewal of the epithelium of bee's midgut during metamorphosis. Studies that describe digestive cell proliferation are lacking in images of mitosis. This research is a contribution to the understanding of Hymenoptera biology in relation to some aspects of digestive physiology during metamorphosis of social insects. We have established the necessity of increasing the number of cells in the median intestine of *Melipona quadrifasciata anthidioides* at the end of metamorphosis without having, however, observed mitosis, as was found for *Nasutitermes rotundatus* (Holmgren) (Isoptera). Possibly the regenerative cells arisen outside the midgut migrated through the basal membrane, to establish themselves in the epithelium. Also, in this study we describe the morphology of the median intestine epithelium, using scanning electron microscopy, showing that only the peritrophic membrane presented differences in the casts studied.

ÍNDICE

Resumo.....	06
Abstract.....	07
1. Introdução	09
1.1. Trato Gastrointestinal de Abelha.....	09
1.2. Metamorfose e Aspectos Etológicos em <i>Melipona</i> sp.....	13
1.3. Renovação do epitélio do intestino médio no período pré-embrionário.....	15
2. Objetivos.....	18
3. Referências Bibliográficas.....	19
4. Artigos.....	23
4.1. Migração celular no intestino médio de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose.....	24
4.2. Ultrastructure of queens and foraging workers midgut of the <i>Melipona</i> <i>quadrifasciata anthidioides</i> Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	40
5. Conclusões Gerais.....	53
6. Apêndice.....	54

Os insetos apresentam capacidade adaptativa e reprodutora, o que os confere grande sucesso evolutivo. Dessa forma, ocupam os mais diversos ambientes. Parte desse sucesso adaptativo se deve à variedade estrutural e fisiológica do seu trato gastrointestinal, o que lhes permite utilizar ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Dow, 1986).

As abelhas têm importância econômica devido principalmente ao seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas, na produção de mel, cera e própolis, o que se observa principalmente em *Apis mellifera* e em outras abelhas eussociais. As abelhas sem ferrão – tribo Meliponini – se destacam pela especificidade como agentes polinizadores de diversas espécies vegetais nativas (Kerr *et al.*, 1996). A espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* é comum, possuindo ampla distribuição no território brasileiro, concentrando-se principalmente nos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica das regiões Sul, Sudeste e parte do Nordeste.

1.1. Trato gastrointestinal de Abelha

O trato gastrointestinal dos insetos é dividido em três regiões anatômicas com base em suas origens embriológicas: intestinos anterior (estomodeu) e posterior (proctodeu) de origem ectodérmica e intestino médio (ventrículo) de origem do endodérmica (Cruz-Landim, 1985; Chapman, 1998; Neves, 2002).

Em insetos, a organização do trato digestivo, geralmente, mostra-se constante. Entretanto, variações morfológicas ocorrem nos diferentes grupos de

insetos e essas variações também estão relacionadas aos hábitos, principalmente os alimentares (Caetano, 1984).

Dentre os Hymenoptera, o trato digestivo das abelhas tem sido amplamente estudado (Snodgrass, 1956; Kapil, 1959; Mathewson, 1965; Cruz-Landim *et al.*, 1967; Serrão *et al.*, 1995; Serrão, 2000; Peixoto *et al.*, 2001; Chapman, 2001; Cruz *et al.*, 2007). Esses trabalhos não revelaram diferenças quanto à morfologia do trato gastrointestinal entre espécies de abelhas. Além disso, em outras famílias de Hymenoptera, como em Formicidae, o trato digestivo apresenta-se semelhante ao das abelhas e vespas (Caetano, 1984; 1988; Caetano *et al.*, 1990; Bution *et al.*, 2007a). No entanto, as regiões da válvula cardíaca (Caetano *et al.*, 1988) e do bulbo do proventrículo (Caetano *et al.* 1982; Caetano *et al.*, 1984; Caetano *et al.*, 1987) de formigas, se assemelham mais com vespas.

No intestino anterior ocorre o armazenamento e, algumas vezes, a fragmentação do alimento, já no intestino médio ocorre a digestão química e a absorção do alimento. Este local é o sítio primário de produção das enzimas digestivas nos insetos. O intestino posterior conduz o alimento não digerido para o exterior e participa do equilíbrio hidroeletrolítico do organismo (Chapman, 1998).

O intestino anterior e o posterior, por serem de origem ectodérmica, são revestidos internamente por uma cutícula denominada íntima. Esta cutícula é produzida pelas células epiteliais desta região e é substituída a cada muda. O intestino anterior é subdividido em faringe, esôfago, papo e proventrículo. No intestino médio não existe a camada íntima. No entanto, na maioria dos insetos, está presente uma delicada película, denominada membrana peritrófica, uma camada acelular rica em quitina e proteínas aposta à borda estriada do epitélio

(Chapman, 1998). A válvula pilórica separa o intestino médio do intestino posterior, o qual é subdividido em piloro, íleo e reto, terminando no ânus (Chapman, 1998).

A parede do intestino anterior é formada por um epitélio de células baixas com poucas organelas e possuem contatos reforçados por desmossomos septados, repousando sobre uma tênue membrana basal. Este epitélio é envolto por músculos estriados geralmente dispostos em uma camada circular interna e uma longitudinal externa (Cruz-Landim, 1985). As subdivisões do intestino anterior apresentam funções especializadas. A faringe é geralmente dilatada e está relacionada à ingestão de alimentos, em insetos sugadores sua musculatura é bem desenvolvida. O esôfago é curto e apresenta na sua porção posterior uma dilatação chamada papo cuja função é armazenar o alimento ingerido. No proventrículo ocorre a passagem de alimentos do papo para o intestino médio (Cruz-Landim, 1985). A complexidade estrutural do proventrículo está relacionada diretamente com os hábitos alimentares. Insetos que se alimentam de líquido apresentam um simples esfíncter na entrada do intestino médio, já em abelhas, por se alimentarem de pólen e néctar, ele é bem desenvolvido e sua região anterior (bulbo) tem função importante na produção de mel (Chapman, 1998).

O intestino posterior apresenta um epitélio formado por células mais altas (exceto no reto) e a cutícula mais fina e permeável que o intestino anterior, o que permite a absorção de certos nutrientes e água. No piloro geralmente originam-se os túbulos de Malpighi, sendo que na maioria dos insetos o íleo (intestino fino) apresenta-se como um tubo indiferenciado formado por células cúbicas, revestido internamente pela íntima e externamente por uma camada circular de fibras

musculares (Cruz Landim, 1985; Chapman, 1998). Alguns insetos podem apresentar especializações, como invaginações contendo microrganismos envolvidos na digestão de nutrientes específicos (Chapman, 1998). Em formigas do gênero *Cephalotes*, a região anterior do íleo é responsável por absorver material da hemolinfa e a região posterior absorve o conteúdo do lúmen (Bution *et al.*, 2007b). O reto é geralmente dilatado com uma parede fina e papilas retais envolvidas na reabsorção de água, íons e, algumas vezes, aminoácidos (Chapman, 1998).

O intestino médio nas abelhas possui um formato tubular, seu limite anterior é a válvula cardíaca e posterior, o piloro. É envolto por fibras musculares finas dispostas em duas camadas: uma interna circular, que origina as pregas do intestino médio, e outra, externa longitudinal (Neves, 2002). O epitélio é formado por três tipos celulares: as células digestivas ou principais, as células regenerativas e as células endócrinas (Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003). As células digestivas são cilíndricas e apresentam microvilosidades em sua porção apical. Na região basolateral observa-se inúmeras pregas e invaginações. Possuem retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos além de muitas mitocôndrias nas invaginações basais. Na região média observa-se um núcleo oval com dois ou três nucléolos e, no citoplasma, poucas mitocôndrias. Neste local são formados grânulos de secreção que se concentram na porção apical (Cruz-Landim, 1985; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003). As células digestivas são responsáveis pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos (Terra, 1990).

O “tempo de vida” das células digestivas dos Hymenoptera é mais curto do que o dos indivíduos que as possuem, havendo necessidade de renovação celular ao longo da vida (Cruz-Landim *et al.*, 2000). A renovação destas células está, em parte, sob controle genético, mas depende de uma rede complexa que inclui fatores ambientais e fisiológicos (Cruz-Landim *et al.*, 1996). Entre as células digestivas da maioria dos insetos encontram-se pequenas células regenerativas que podem se apresentar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares, fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Billingsley *et al.*, 1996). Esses conjuntos de células indiferenciadas se apóiam na lâmina basal e não alcançam a luz intestinal. O núcleo relativamente volumoso apresenta cromatina dispersa e nucléolo evidente. O citoplasma é pobre em organelas, com exceção de mitocôndrias que embora numerosas, são pequenas e apresentam poucas cristas, características típicas de células indiferenciadas. Apresentam também ribossomos livres e polirribossomos, além de extensos perfis de retículo endoplasmático rugoso e glicogênio (Neves *et al.*, 2003; Cruz-Landim, 1999). Estas células foram denominadas células-tronco por Baldwin e Hakim (1991) em *Manduca sexta*.

1.2. Metamorfose e aspectos etológicos de *Melipona* sp.

As abelhas são insetos holometábolos apresentando metamorfose completa. Nestes insetos, durante a metamorfose, o trato gastrointestinal é completamente remodelado, muitas células novas são formadas, enquanto outras morrem e algumas apenas se modificam (Buszczak *et al.*, 2000; Klapper, 2000).

As abelhas sociais apresentam castas bem definidas: as rainhas, responsáveis pela deposição de ovos, as operárias, que fazem a maior parte das tarefas da colônia, e os zangões, responsáveis por fertilizar as rainhas (Giannini *et al.*, 1988; Michener, 2000). As operárias possuem polietismo, o qual é determinado por fatores fisiológicos, mas que se adaptam às necessidades da colônia. As diferentes tarefas realizadas pelas operárias são executadas em uma seqüência específica, variando de acordo com a idade ou seu estágio fisiológico. Operárias jovens geralmente alimentam a cria e são chamadas nutridoras, enquanto as mais velhas, que deixam o ninho para coleta de alimentos, são as forrageiras (Hebling *et al.*, 1964).

Sabe-se que embora o tempo de desenvolvimento do ovo até imago não sofra grandes variações entre as castas, a longevidade é bastante desigual. Em operárias de várias espécies de abelhas sem ferrão, o tempo de vida após a emergência está em torno de 51 dias, enquanto em rainhas pode chegar a sete anos (Kerr *et al.*, 1996).

As mudanças ocorridas no tubo digestivo durante a metamorfose estão, em parte, ligadas a alterações na alimentação, a qual, em geral, é diferente na larva e no adulto (Gama *et al.*, 1984).

Na metamorfose o epitélio larval é ejetado e a sua reorganização ocorre pelas células regenerativas. Durante a diferenciação as células alongam-se em direção ao lúmen do intestino e adquirem microvilosidades seguido pelo aumento de volume nuclear e citoplasmático (Werner *et al.*, 1991; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2005). Em Hymenoptera, as mudanças no intestino médio começam na pré-pupa com 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 *et al.*, 1970; Gama & Cruz-Landim, 1984; Neves *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005).

1.3. Renovação do epitélio do intestino médio no período pós-embrionário

Durante a metamorfose nas abelhas, divisões nas células regenerativas raramente foram encontradas (Neves, 2002). Histólise em organismos larvais é um evento chave em insetos holometábolos. Há crescimento e diferenciação de estruturas do adulto juntamente com destruição de células antigas (Tettamanti *et al.*, 2007). Células regenerativas do intestino médio de insetos têm sido estudadas *in vitro* para compreensão dos mecanismos que controlam a proliferação e diferenciação destas, mas análises *in vivo* são raras. Alguns trabalhos descrevem o envolvimento de mecanismos de morte celular programada que engloba tanto autofagia quanto apoptose.

Raes *et al.* (1994) relataram a ocorrência de mitoses no intestino médio de exemplares adultos de *A. mellifera*, embora não tenham demonstrado nenhuma figura que atestassem esta ocorrência. Por outro lado, Cruz-Landim *et al.* (2000) afirmam que, embora seja comum a ocorrência de mitoses em células regenerativas em exemplares adultos de vários grupos de insetos, isto não ocorre em Hymenoptera.

Desta forma, espera-se que a longevidade dos indivíduos da ordem Hymenoptera esteja diretamente relacionada com o número de células regenerativas no momento da emergência, sendo então, definido durante a

pupação (Cruz-Landim *et al.*, 2000). Entretanto, mesmo durante a metamorfose o número de células observadas em mitose não parece ser suficiente para explicar o grande incremento que ocorre no número de ninhos durante a fase final da metamorfose (Neves *et al.*, 2002). É possível ainda que possa haver diferenças no padrão de comportamento das células regenerativas entre as castas, pois figuras inequívocas de mitoses foram observadas recentemente em exemplares adultos de rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* (França *et al.*, 2006). Contudo, sabe-se que através do método clássico de contagem de figuras mitóticas em cortes corados rotineiramente, há uma tendência em se subestimar a verdadeira fração proliferativa dos tecidos em estudo, pois as células em divisão não são identificadas nas fases G1, S e G2 e, conseqüentemente, não podem ser consideradas (Amorim *et al.*, 2001).

Dentre as técnicas utilizadas para se estimar o índice mitótico de determinados tecidos destacam-se o uso da auto-radiografia de células marcadas com isótopos de timidina, o uso de bromodeoxiuridina (BrdU) e a imunohistoquímica (Zudaire *et al.*, 2004). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear que está associada com o ciclo celular e atua como co-fator para a DNA polimerase delta, sendo essencial para a síntese de DNA e, conseqüentemente, é um agente intimamente associado à replicação celular (Amorim *et al.*, 2001). Sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir de G1, tendo pico máximo em S e declina a partir da fase G2, passando a exibir níveis baixos na fase M e em células quiescentes, onde não são mais identificados por métodos imunohistoquímicos (Amorim *et al.*, 2001).

Outra possibilidade é que as células regenerativas se dividam sincronicamente, o que é comum em alguns insetos adultos. Devido ao curto período da divisão celular durante a mitose, elas podem ser subestimadas em todas as espécies analisadas (Rost, 2005). A detecção de proliferação celular é facilmente reconhecida quando há células em determinadas fases da mitose como, por exemplo, na metáfase, onde os cromossomos estão muito condensados.

Vários trabalhos têm focado a remodelação do intestino médio dos insetos (Cruz-Landim *et al.*, 2000; Neves, 2002; Neves *et al.*, 2003; Zudaire *et al.*, 2004; Rost, 2005; Martins *et al.*, 2005). Entretanto, ainda permanecem incerto os aspectos que envolvem reconstituição do epitélio do intestino médio de abelhas durante a metamorfose.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste em esclarecer aspectos da renovação do epitélio do intestino médio durante a metamorfose dos insetos sociais. Com isso, pretendemos detectar a proliferação das células regenerativas do intestino médio durante a metamorfose em *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Os objetivos específicos consistiram em:

1. Investigar a ocorrência de mitose ou a possível sincronização das divisões celulares durante a metamorfose do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides*.
2. Analisar o volume do intestino médio e das células digestivas nas diferentes fases da metamorfose de *M. quadrifasciata anthidioides*, a fim de detectar se há aumento do número de células.
3. Verificar se ocorrem variações na morfologia do intestino médio de rainhas e operárias forrageiras de *M. quadrifasciata anthidioides* decorrentes das diferentes dietas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim RFB; Novellino ATN; Godoy GP (2001) Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) como indicador de lesões potencialmente malignas da mucosa oral. IX Congresso Internacional de Odontologia do DF.
- Baldwin KM; Hakim RS (1991) Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. Tissue & Cell, 23: 411- 422.
- Billingsley PF; Lehane MJ (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, MJ & Billingsley PF (ed) Biology of the insect midgut. Chapman and Hall, London. pp 31-54.
- Buszczak M; Seagraves WA (2000) Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. Current Biology, 10: 830-833.
- Bution ML; Zara FJ; Caetano FH (2007) Comparative morphology of the midgut of three species of *Cephalotes* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology, 50: 725-737.
- Bution ML; Caetano FH; Zara FJ (2007) Comparative morphology of the ileum of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology, 50: 355-369.
- Caetano FH; Lage Filho AL (1982) Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas *Odontomachus* (Hymenoptera-Ponerinae). Naturalia, 7: 125-130.
- Caetano FH; Letizio-Machado VL (1982) Morfologia e histologia do trato digestivo de *Protopolybia exigua exigua* (Hym., Vespidae) e suas estruturas excretoras anexas. Papéis Avulsos de Zoologia, 34(25): 283-296.
- Caetano FH; Overal WL (1984) Estudos do trato digestivo de vespas (Hymenoptera: Vespidae) e estruturas excretoras associadas. Revista Brasileira de Entomologia, 28(4): 403-408.
- Caetano FH; Camargo-Mathias MI; Overal WL (1987) Anatomia e histologia comparada do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Paraponera clavata* (Formicidae:Ponerinae). Naturalia, 11: 125-134.
- Caetano FH (1984) Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae). Papéis Avulso de Zoologia, 35: 257-305.
- Caetano FH (1988) Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). Naturalia, 13: 129-174.

- Chapman RF (1998) The insects - structure and function. 4^a ed. Cambridge Press, Cambridge.
- Chapman GB; Abu-Eid C (2001) The proventriculus of the carpenter bee, *Xylocopa virginica virginica* (L.), with special reference to bacteria-containing luminal tunnels. *Invertebrate Biology*, 120(1): 78-87.
- Cruz LC; Araújo VA; Dolder H; Neves CA (2007) Midgut ultrastructure of queens and foraging workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 50(3): 1117-1125.
- Cruz-Landim C; Rodrigues L (1967) Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. *Journal Apicultural Research*, 6: 17-28.
- Cruz-Landim C; Silva-de-Moraes RLM; Serrão JE (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Computational Biology*, 1(1/2): 209-240.
- Cruz-Landim C; Mello MLS (1970) Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. IV. Development of the digestive tract. (1). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha*, 27: 229-263.
- Cruz-Landim C; Moraes RLSM (2000) Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro. pp 48.
- Cruz-Landim C (1985) Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp*, 44: 28-41.
- Cruz-Landim C (1985) Origin of the peritrophic membrane of the adult *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 45 (3): 207-219.
- Cruz-Landim C (1999) Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology*, 34(3): 597-603.
- Dow JAT (1986) Insect midgut function. *Advances Insect Physiology*, 19: 187-328.
- França AAP; Neves CA; Cruz LC; Vianna PWS; Serrão JE (2006) Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a comparative study of workers and queens. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 23: 129-136.
- 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.

- Giannini KM; Bego LR (1988) Labor division among workers of *Melipona compressipes fasciculata* with comments on task specialization (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia Série Zoológica*, 85: 109-114.
- Hebling NJ; Kerr WE; Kerr FS (1964) Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotricha* Moure. *Papéis Avulso de Zoologia*, 16: 115-127.
- Kapil RP (1959) Anatomy and histology of the alimentary canal of Honey bee, *Apis indica* Fab. (Apidae, Hymenoptera). *Zoologischer Anzeiger*, 163: 306-323.
- Kerr WE; Carvalho GA; Nascimento VA (1996) Abelha urucu – biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú. Belo Horizonte.
- Klapper R (2000) The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mechanism of Development*, 95: 47-54.
- Martins GF; Neves CA; Campos LO; Serrão JE (2005) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2): 161-168.
- Mathewson JA (1965) The internal morphology of the eastern cucurbit bee, *Peponapis pruinosa* (Hymenoptera, Apoidea). *Kansas Entomological Society*, 38: 209-233.
- Michener CD (2000) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press: Baltimore.
- Neves CA (2002) Estudo ontogenético, comparativo e ultraestrutural das células enteroendócrinas FMRFamida-“like” imunorreativas e descrição ultraestrutural do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose. Rio de Janeiro, RJ. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. UFRJ.
- Neves CA; Serrão JE; Gitirana LB (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41: 443-459.
- Peixoto EBMI; Serrão JE (2001) A comparative study of the cardia and cardiac valves in corbiculate bees (Hymenoptera, Apinae). *Sociobiology*, 37: 707-721.
- Raes H; Verbeke M; Meulemans W; Coster WD (1994) Organization and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera* L.) *Tissue & Cell*, 26: 231-238.
- Rost MM (2006) Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Structure & Development*, 35: 69-76.

- Serrão JE (2000) A comparative study of the proventricular structure in corbiculate Apinae (Hymenoptera, Apidae). *Micron*, 32: 379-386.
- Serrão JE; Cruz-Landim C (1995) Scanning electronic microscopy of the proventriculus in stingless bees (Apidae: Meliponinae) with a comparison of necrophagous and feeding pollen workers. *Naturalia*, 20: 207-212.
- Serrão JE (2005) Proventricular structure in solitary bees (Hymenoptera: Apoidea). *Organisms, Diversity & Evolution*, 5: 125-133.
- Snodgrass RE (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Ithaca, New York: Comstock Publishing Association, pp 334.
- Terra WR (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review Entomological*, 35: 181-200.
- Tettamanti G; Crimaldi A; Casartelli M; Ambrosetti E; Ponti B; Congiu T; Ferrrese R; Rivas-Pena ML; Pennacchio F; Eguileor M (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell & Tissue*, 441-449.
- Werner K; Moutairou K; Werner G (1991) Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider *Gerris najas* Deg. (Heteroptera: Gerridae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 20: 69-77.
- Zudaire E; Simpson SJ; Illa I; Montuenga LM (2004) Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 2255-2265.

4.1. Cruz, L.C; Araújo, V.A; Dolder, H & Neves, C.A. 2008. Migração celular no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose.

4.2. Cruz, L.C; Araújo, V.A; Dolder, H & Neves, C.A. 2007. Ultrastructure of queens and foraging workers midgut of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 50(3): 1117-1125.

Migração celular no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose

Cruz, L.C; Araújo, V.A; Dolder, H & Neves, C.A.

Resumo. Em Hymenoptera, as mudanças metamórficas do intestino médio durante a metamorfose começam na larva de último instar com a degeneração do epitélio larval, restando somente a membrana basal e as células regenerativas larvais, que irão compor o epitélio do intestino médio na fase de pupa. Neste trabalho, utilizamos microscopia de luz, para analisar as modificações que ocorrem no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* durante a metamorfose, investigando a ocorrência de proliferação celular, buscando figuras de mitose e células PCNA-positivas. Também foram realizadas análises morfométricas das células digestivas e do intestino médio. Observou-se que ao final da metamorfose, o aumento do volume celular foi proporcionalmente menor do que o aumento do volume do intestino médio, indicando a necessidade de aumento no número de células digestivas. Células PCNA-positivas ocorreram somente nas larvas e apenas uma figura de mitose foi detectada em um exemplar de pupa de olho preto. Em algumas pupas de olhos pretos, foi comum a ocorrência de células com grânulos PAS-positivos na espessa membrana basal. Se estas células forem células indiferenciadas em processo de migração para o epitélio, poderiam explicar o aumento repentino de células digestivas e regenerativas que se observa ao final da metamorfose.

Abstract. In Hymenoptera, the metamorphic changes in the midgut begin in the last larval instar, with the degeneration of the larval epithelium, and finally only the basal membrane and the larval regenerative cells remain. These will make up the epithelium of the median intestine during pupation. In this study, light microscopy was used to analyze the modifications that occur in the median intestine of *Melipona quadrifasciata anthidiodes* during metamorphosis, investigating the occurrence of cell proliferation as shown by mitosis and PCNA-positive cells. Morphometric analysis of the digestive cells and of the median intestine was also carried out. At the end of metamorphosis, the increase in cell volume was, proportionately, smaller than the increase in volume of the median intestine, indicating the necessity of a greater number of new digestive cells. PCNA-positive cells were found only in the larvae and a single cell in mitosis was detected in a black-eyed pupa. In some black-eyed pupae, cells with PAS positive granules, occurring within the thick basal membrane, were a common occurrence. If these are undifferentiated cells that are migrating to the epithelium, this could explain the sudden increase in digestive and regenerative cells observed at the end of metamorphosis.

Introdução

O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, médio e posterior (Cruz-Landim, 1985; Chapman, 1998). O epitélio do intestino médio das abelhas possui três tipos de células: células digestivas que sintetizam enzimas digestivas e absorvem nutrientes, células endócrinas que produzem hormônios e células regenerativas responsáveis pela renovação do epitélio (Serrão *et al.*, 1996; Neves. 2002; Martins *et al.*, 2005; França *et al.*, 2006).

O “tempo de vida” das células digestivas dos Hymenoptera é mais curto do que o dos indivíduos que as possuem, havendo necessidade de renovação celular ao longo da vida (Cruz-Landim *et al.*, 2000; França *et al.*, 2006). Durante a metamorfose o epitélio larval é ejetado e a sua reorganização ocorre pelas células regenerativas. Durante a diferenciação as células alongam-se em direção ao lúmen do intestino médio e adquirem microvilosidades seguido pelo aumento de volume nuclear e citoplasmático (Werner *et al.*, 1991; Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2005).

A renovação destas células está, em parte, sob controle genético, mas depende de uma rede complexa que inclui fatores ambientais e fisiológicos (Cruz-Landim *et al.*, 1996). Entre as células digestivas da maioria dos insetos encontram-se pequenas células regenerativas que podem se apresentar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares, fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Billingsley *et al.*, 1996).

Em Hymenoptera mudanças no intestino médio começam na larva de último instar com a degeneração do epitélio larval, restando somente membrana basal e células regenerativas. Ao mesmo tempo, algumas células proliferam e espalham

pela membrana basal e constroem o novo epitélio (Gama *et al.*, 1984; Neves *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005). Durante a metamorfose nas abelhas, raramente observou-se divisão das células regenerativas no epitélio do intestino médio (Neves *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005).

Rost (2006) sugere que as células regenerativas se dividam sincronicamente, o que é muito comum em alguns insetos adultos. Devido ao curto período da condensação dos cromossomos durante a mitose, elas podem ser subestimadas em todas as espécies analisadas. A detecção de proliferação celular é facilmente reconhecida quando há células em determinadas fases da mitose como, por exemplo, na metáfase, onde os cromossomos estão muito condensados.

Neste trabalho, investigamos a ocorrência de proliferação celular no intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em curtos intervalos de tempo durante a metamorfose.

Material e Métodos

Insetos

Favos de cria foram retirados de colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os favos foram acondicionados em placas de petri e colocados em estufa B.O.D. a 29°C. Foram dissecados, em solução salina para insetos (3,75 g NaCl, 3,6 g KH₂PO₄, 1,2 g NaHPO₄), dois indivíduos de cada fase em intervalos de 1 hora, durante um período de 24 horas. Utilizou-se indivíduos em diferentes fases

da metamorfose, identificados como: pré-pupa, pupa de olho branco ou pupa de olho rosa e pupa de olho marrom ou pupa de olho preto. Também utilizou-se indivíduos adultos (operárias forrageiras) coletados fora do ninho. Para imunocitoquímica foram utilizadas também larvas de último instar como controle positivo, pois é comum a ocorrência de mitoses nessa fase.

Microscopia de Luz

Os intestinos médios foram fixados em Formalina de Carson (Carson *et al.*, 1973) durante 12 horas. Depois foram desidratados em série alcoólica crescente e incluídos em historesina (Historesin, Leica). Secções histológicas de 3 μ m foram coradas com azul de toluidina-borax 1% (AT) e em pupas de olho preto, nas quais foram comprovados aumento no número de células, foi realizado teste histoquímico de PAS (Ácido periódico de Schiff- Hematoxilina). O material foi fotografado em microscópio Olympus BX-60 com câmera fotográfica digital Q color 3 – Olympus.

Imunocitoquímica

Após a fixação os intestinos foram submetidos ao procedimento adaptado a partir de Franklin & Martin (1981) e An *et al.*, (1998) para a marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA): Três lavagens de 1 h em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 contendo 1% de Triton X100 (PBST); pré-incubação em soro normal de cabra a 10% em PBST por 1h em temperatura ambiente; três lavagens (30 minutos cada) em PBST; incubação por 24h, em câmara úmida mantida a 4°C

com anticorpo primário anti-PCNA (PC 10, Sigma) anti-mouse na diluição de 1:100; três lavagens (30 minutos cada) em PBST; incubação do anticorpo secundário (1:100) (cabra anti-mouse) conjugado com biotina (Sigma, Saint Louis, MO, Cat. N° B8895) em geladeira por 24 h; três lavagens (30 minutos cada) em PBST; incubação com o complexo de isotiocianato de fluoresceína-estreptoavidina (SAv-FITC) (1:100) (Pharmingen, San Diego CA. Cat. N° 13024D) em geladeira por 12 h; três lavagens (30 minutos cada) em PBS; desidratação em série crescente de álcool por 1h; inclusão em (2-hidroxietil) metacrilato (Historesin, Leica); obtenção de cortes de 1 a 4 μm ; montagem em geléia de PBS e glicerina ou Vectashied (Vector Lab.).

Análises Estatísticas

As secções histológicas dos indivíduos de todas as fases foram morfometricamente analisadas usando o programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Os valores da célula e do intestino médio foram calculados segundo a fórmula do volume do cilindro: $V = \pi R^2 \times h$. O cálculo do volume celular foi obtido a partir das medidas da altura (h) e do diâmetro/2 (R) da célula. Para cálculo do volume do intestino médio medimos o comprimento (h) e o diâmetro/2 (R) nas diferentes fases da metamorfose. Devido a presença de pregas nas fases de pupas de olho preto e operárias foram calculadas as médias das distâncias entre as membranas basais do ápice e da base das pregas.

Os resultados foram submetidos a análises de variância (ANOVA), com distribuição de erros Normal. As medidas do volume do tubo digestivo foram logaritmizadas a fim de ajustar à distribuição utilizada.

Os modelos foram testados através do software R (R Development Core Team, 2005) e foram seguidos pela análise de resíduos a fim de verificar sua aceitabilidade e sobredispersão.

Resultados

Houve diferença significativa no volume celular entre as diferentes fases de desenvolvimento ($F_{3,120} = 121,41$ e $P < 0,001$) (Fig. 1). No entanto, não houve diferença no tamanho das células nas fases de pupa de olho preto e operária ($F_{1,120} = 0,0838$ e $P = 0,7728$). As pupas de olho branco apresentaram maior volume celular, seguido por pupas de olho preto e operárias, sendo que em pré-pupa foi observado o menor volume.

Todas as fases diferiram quanto ao volume do intestino médio ($F_{3,120} = 517,89$ e $P < 0,001$) (Fig. 2), sendo o maior volume observado em pupas de olho branco, seguido por operárias. Os menores volumes foram observados em pré-pupas e pupas de olho preto. Portanto, durante a passagem de pupa de olho preto para operária, observou-se um aumento no número de células para compensar o aumento do volume do tubo, sem um concomitante aumento do volume celular. Além disso, nas secções histológicas observadas nessa fase notou-se o surgimento dos ninhos de células regenerativas.

Dentre todas as secções histológicas analisadas apenas uma figura de mitose foi observada no epitélio do intestino médio de um exemplar de pupa de olho preto (Fig. 3A).

Muitas células foram observadas na espessa membrana basal de algumas secções histológicas de pupas de olho preto (Fig. 3B e 3C).

Poucos núcleos PCNA-positivos foram observados no intestino médio e ocorreram somente na fase larval (Fig. 3D).

Discussão

As mudanças ocorridas no tubo digestivo durante a metamorfose estão, em parte, ligadas a alterações na alimentação, a qual na larva é, em geral, diferente daquela do adulto (Gama & Cruz-Landim, 1984; Caetano, 1984).

Vários trabalhos têm focado a reorganização do intestino médio de abelhas durante a metamorfose (Neves *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2003; Cruz-Landim & Cavalcante 2003; Martins *et al.*, 2005). A maioria desses estudos não priorizou a reorganização dos ninhos de células regenerativas durante o desenvolvimento pós-embrionário das abelhas. Em outras ordens de inseto a renovação do epitélio intestinal durante a metamorfose tem sido amplamente descrita, sendo relatada divisão celular em indivíduos adultos de Blattodea (Endo 1984), Heteroptera (Werner *et al.*, 1991) e Orthoptera (Zudaire *et al.*, 2004). Entretanto, Cruz-Landim *et al.* (1996) afirmaram que este processo não ocorre nos insetos holometábolos adultos e mais especificamente em Hymenoptera.

O aumento significativo no comprimento do intestino médio de *M. quadrifasciata anthidioides* já havia sido relatado por Neves (2002). Sabe-se que nesta abelha, o aumento no tamanho do intestino médio na fase larval se deve ao crescimento das células digestivas (Cruz-Landim & Mello, 1970) e ao aumento do número dessas células pela proliferação e diferenciação de células regenerativas (Serrão & Cruz-

Landim, 2000; Martins *et al.*, 2005). Larvas de último instar têm seu intestino médio renovado, formando um novo epitélio funcional que é mantido durante o período de pupação. Histólise em organismos larvais é um evento chave em insetos holometábolos, onde ocorrem crescimento e diferenciação de estruturas do adulto juntamente com destruição de células da fase larval. Em larvas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera) quando ocorre a cessação da alimentação, inicia-se a proliferação de células tronco (Tettamanti, 2007). Dessa forma, o estímulo para que as células entrem no processo de divisão pode estar associado à restrição da dieta.

Durante o estágio de pré-pupa há diminuição do volume celular devido a eliminação das células e diminuição da atividade celular para a formação de um novo epitélio durante a fase de pupa. Nessa fase não se observou indícios de proliferação celular, ao contrário do observado por Martins *et al.* (2005). Estes autores, ainda que raramente, detectaram a proliferação de células regenerativas em pré-pupas de *M. quadrifasciata anthidioides* pela incorporação de BrdU e afirmaram que estas originariam os ninhos de células regenerativas nos adultos.

No decorrer da metamorfose, em pupa de olho branco, observou-se aumento do volume celular acompanhado de aumento do volume do intestino. O aumento dimensional dessas células conduz à formação progressiva de uma nova monocamada bem organizada, sem a necessidade de aumento no número celular. Na fase final da metamorfose, há aumento do volume do intestino sem que haja aumento proporcional do volume celular. Além disso, neste período, notou-se o surgimento dos ninhos de células regenerativas. No entanto, apenas uma figura de mitose foi detectada em pupa de olho preto, a despeito do grande número de

exemplares analisados. Esse resultado demonstra que essas células não podem ser originadas pela divisão de células regenerativas pré-existentes, o que está de acordo com os resultados obtidos pela análise imunocitoquímica com PCNA. A proliferação de células regenerativas na fase larval já havia sido relatada (Serrão & Cruz-Landim 2000; Martins *et al.* 2005).

Baldwin & Hahim (1991) sugeriram que células regenerativas da hemolinfa migrariam através da membrana basal e povoariam o epitélio, entretanto não demonstraram nenhuma evidência. Em secções histológicas do intestino médio de pupas de olhos pretos coradas pelo PAS, detectamos a presença de algumas células na membrana basal ou próximas a ela. O fato do PAS não evidenciar a membrana basal de *M. quadrifasciata anthidioides* (Neves, 2002) facilita a visualização das células neste local. É possível que estas sejam células indiferenciadas migrando em direção ao epitélio.

Portanto não foi observada proliferação celular durante a metamorfose. É possível que a migração de células regenerativas em direção ao epitélio seja responsável pelo aumento no número de células digestivas e dos ninhos de células regenerativas observados ao final da metamorfose

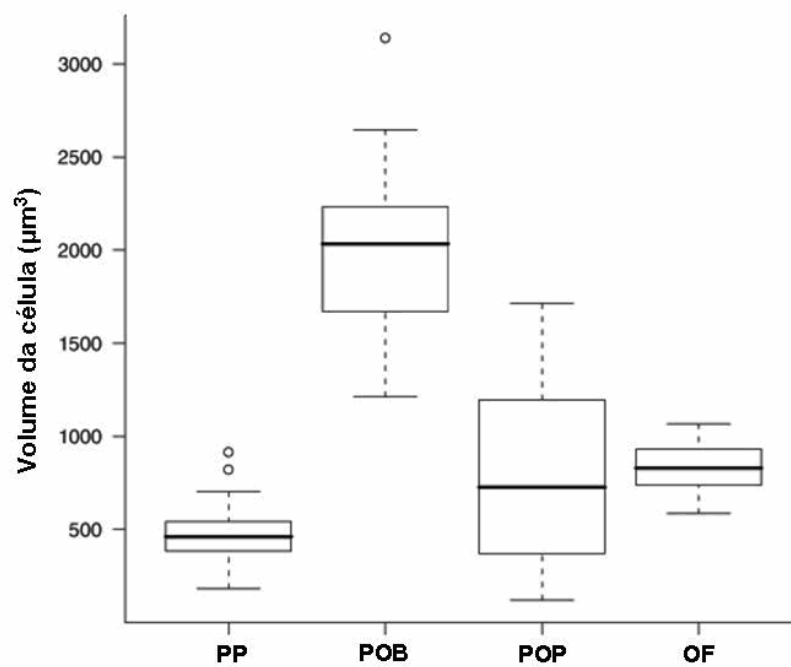


Figura 1. Análise de variância (ANOVA), com distribuição de erros normal, relacionando as fases de desenvolvimento com o volume da célula (μm^3). PP = pré-pupa; POB = pupa de olho branco; POP = pupa de olho preto; OF = operária forrageira.

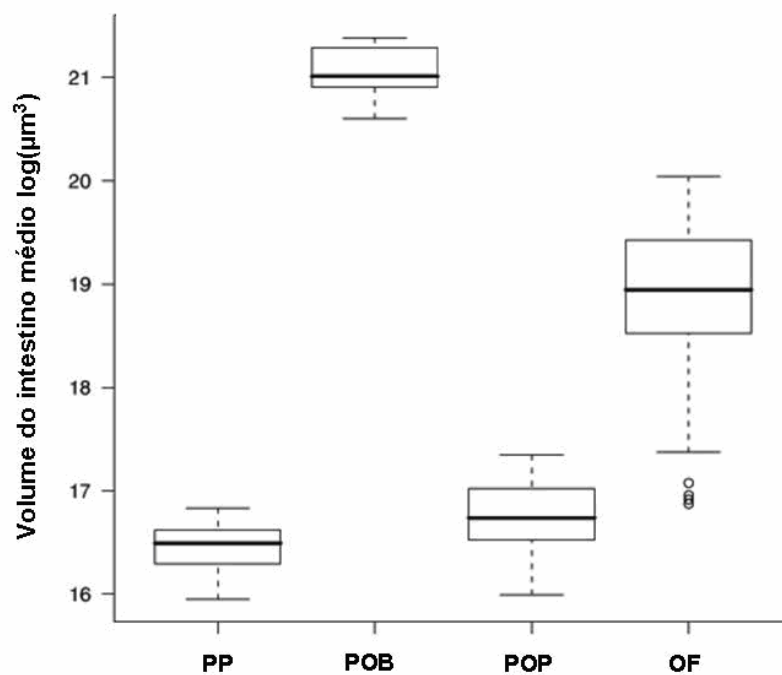


Figura 2. Análise de variância (ANOVA), com distribuição de erros normal, relacionando as fases de desenvolvimento com o volume do intestino médio (μm). As medidas do volume do tubo digestivo foram logaritmizadas a fim de ajustar à distribuição utilizada. PP = pré-pupa; POB = pupa de olho branco; POP = pupa de olho preto; OF = operária forrageira.

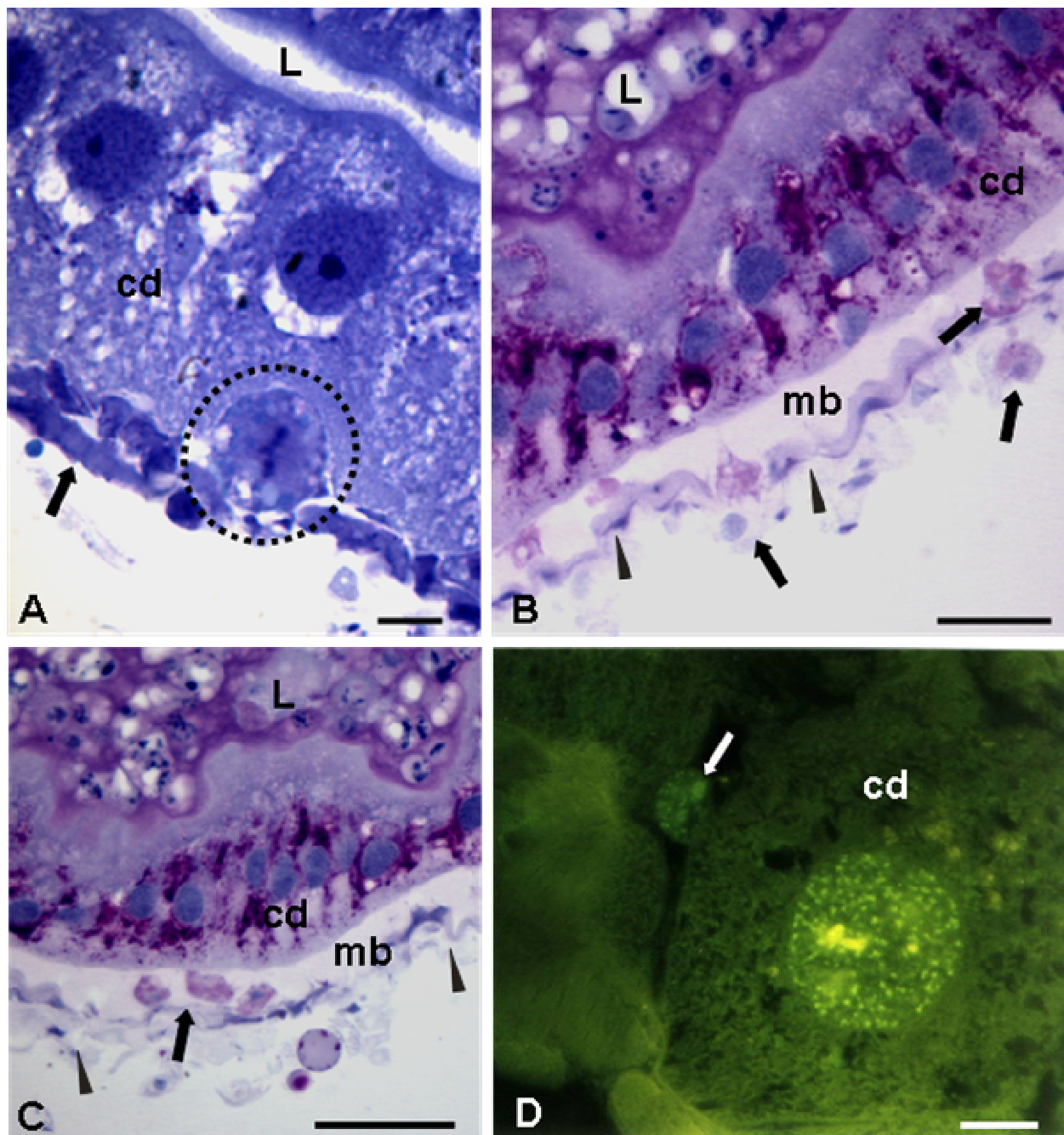


Figura 3. Epitélio do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **A.** Pupa de olho preto evidenciando uma figura mitótica, metáfase (círculo tracejado) e células digestivas (cd). A seta indica a camada muscular. **B-C.** Teste histoquímico PAS em pupas de olho preto. Observa-se possíveis células (setas) que atravessaram a membrana basal (mb). As cabeças de seta indicam a camada muscular. **D.** Larva de último instar mostrando ninho de células regenerativas (seta) e célula digestiva (cd) PCNA-positivas. L= Lúmen; cd = célula digestiva. Barras = 15 µm.

Referências Bibliográficas

- An Y; Nakajima T; Suzuki K (1988) Immunohistochemical demonstration of mammalian – and FMRA amide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera, Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *European Journal of Entomology*, 95: 185-196.
- Baldwin KM; Hakim RS (1991) Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue & Cell*. 23: 411-422.
- Billingsley PF; Lehane MJ (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (ed) *Biology of the insect midgut*, pp 31-54. Chapman and Hall, London.
- Caetano FH (1984) Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 35: 257-305.
- Carson FL; Martin JH; Lynn JA (1973) Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal Clinical Pathology*, 59: 365-373.
- Chapman RF (1998) *The insects - structure and function*. 4^a ed. Cambridge Press, Cambridge.
- Cruz-Landim C; Cavalcante VM (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Sciences*, 20:1099-1107.
- Cruz-Landim C; Silva-de-Moraes RLM; Serrão JE (1996) Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal Computational Biology*, 1(1/2): 209-40.
- Cruz-Landim C; Moraes RLSM (2000) Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro, pp 48.
- Cruz-Landim C (1985) Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp*, 44: 28-41.
- Endo Y (1984) Ontogeny of endocrine cells in the gut of the insect *Periplaneta americana*. *Cell & Tissue*, 238: 421-423.
- França AAP; Neves CA; Cruz LC; Vianna PWS; Serrão JE (2006) Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a comparative study of workers and queens. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 23: 129-136.

- Franklin M; Martin MT (1981) Pre-embedding immunohistochemistry as an approach to high resolution antigen localization at the light microscopic level. *Histochemistry*, 72(2): 173-190.
- 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.
- Martins GF; Neves CA; Campos LO; Serrão JE (2005) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37(2): 161-168.
- Neves CA (2002) Estudo ontogenético, comparativo e ultraestrutural das células enteroendócrinas FMR/Famida-“like” imunorreativas e descrição ultraestrutural do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose. Rio de Janeiro, RJ. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. UFRJ.
- Neves CA; Serrão JE; Gitirana LB (2003) Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41: 443-459.
- Rost MM (2006) Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropodea) during regeneration. *Arthropod Structure & Development*, 35: 69-76.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1996) Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios*, 88: 161-171.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1996) A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*. 17, 1-6.
- Serrão JE; Cruz-Landim C (2000) Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *Journal of Apicultural Research*, 39: 9-17.
- Tettamanti G; Crimaldi A; Casartelli M; Ambrosetti E; Ponti B; Congiu T; Ferrrese R; Rivas-Pena ML; Pennacchio F; Eguileor M (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Research*, 441-449.
- Werner K; Moutairou K; Werner G (1991) Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider *Gerris najas* Deg. (Heteroptera: Gerridae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 20: 69-77.

Zudaire E; Simpson SJ; Illa I; Montuenga LM (2004) Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 2255-2265.

Ultrastructure of Queens and Foraging Workers Midgut of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

by

Lilian Cota Cruz¹, Vinícius Albano Araújo², Heidi Dolder¹ & Clóvis Andrade Neves³

ABSTRACT

Stingless bees are wide spread in the Brazilian territory, being the most important pollinizers of several native plant species. Many studies have described the morphological aspects of the insect's midgut, the main site of chemical digestion and nutrient absorption. In this work, we used the scanning electron microscopy to describe and compare the ultrastructure of the midgut in individuals from different castes of *Melipona quadrifasciata anthidioides*. The midgut of these bees has two layers of muscular fibers, a circular one, involved in the formation of folds, and an external, longitudinal layer. The peritrophic membrane was thicker and homogeneous in the presence of food. The microvilli were evident on the surface of the main cells. We have not found morphological differences in the midgut among individuals from the castes analyzed. Our analyses corroborate previous descriptions made with light microscopy and transmission electron microscopy (TEM).

Key words: Midgut, stingless bees, scanning electron microscopy and digestive cells.

¹Graduate Program in Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Graduate Program in Entomology, Department of Animal Biology and ³Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Brazil.

INTRODUCTION

Insects enjoy a great evolutionary success, which allows them to occupy the most diverse environments. Part of this adaptive success is due to the enormous structural and physiological variety of their intestinal tract, which makes them able to use a wide range of substrata as a food source (Dow, 1986).

Bees are of great economical importance, due to their role pollination, and eusocial bees production of honey, waxes, and propolis. Stingless bees (Meliponini) are outstanding pollinizers of several native plant species (Kerr et al., 1996). The specie *Melipona quadrifasciata anthidioides* presents a wide distribution and abundance in the Brazilian territory (Silveira et al., 2002).

The main site of chemical digestion and absorption of nutrients in bees is the midgut. In this region, a delicate pellicle that surrounds the food, called the peritrophic membrane is present (Terra, 2001). This membrane protects the epithelium avoiding direct contact between cells and food, which could result in mechanical lesions, besides its function as a barrier against pathogens. However, it is permeable to digestive enzymes and to the nutrients that should be absorbed (Lehane, 1997).

The midgut has a tubular shape; its anterior limit is the cardiac valve and its posterior limit is the pylorus. It is surrounded by thin muscular fibers arranged in two incomplete layers, a circular, internal one and a longitudinal, external layer (Neves, 2002). Its epithelium is comprised of three cell types: the digestive cells or main

cells, the regenerative cells, and the endocrinal cells (Cruz-Landim et al., 1996, Neves et al., 2003). The digestive ones have a cylindrical format and present microvilli in their apical portion. At the basolateral portion, numerous folds and invaginations are observed, and at the medium portion, an oval nucleus (Cruz-Landim, 1985; Cruz-Landim et al., 1996; Neves et al., 2003). Among the digestive cells, at the base of the folds, there are groups of regenerative cells, which are fundamental for digestive epithelium renovation (Cruz-Landim, 1999; Neves et al., 2003).

Social bees have well-defined castes, which include the queen that lays the eggs; the workers, which carry out most of the duties of the colony; and the males that fertilize the queen (Michener, 2000). In bees of the Meliponini tribe, the larvae, queens, and feeding workers need a diet comprised of many proteins, and consume a great amount of pollen. However, the foraging workers, and males feed on nectar, since they are involved in activities outside the colony and, therefore, require a rich, energy yielding diet (Serrão and Cruz-Landim, 1995).

In this work, we used scanning electron microscopy to describe and compare the ultrastructure of the midgut in foraging workers and queens of *M. quadrifasciata anthidioides*.

METHODS

Foraging workers, virgin and physogastric queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* were collected in their nests in the *Apiário Central da Universidade*

Federal de Viçosa, Viçosa, State of Minas Gerais, Brazil (20°45'14" S and 42°52'55" W).

Light microscopy

The samples were dissected in sodium cacodylate buffer 0.1M, pH 7.2 and fixed in paraformaldehyde at 4% for 6 hours. Afterwards, they were dehydrated in an increasing alcoholic series and embedded in Histoiresin[®]. Semi-thin (3 µm) sections were stained with toluidine blue/borax at 1% TB and photographed in a CX 31 Olympus microscope.

Scanning Electron Microscopy

The midgut of various bees was fixed in glutaraldehyde at 2.5%, in sodium cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2, for 24 hours. They were then washed in the same buffer and post-fixed in osmium tetroxide 0.1M, for 2 hours. The material was dehydrated in an increasing series of ethanol (50, 70, 90, and 100) for 20 minutes. The fragments were critical point dried and metal sputter-coated with a thin layer of gold (20-30 nm of thickness). The samples were observed and photographed with a scanning electron microscope, JEOL JSM 5200.

RESULTS

No differences were observed in the morphology of the midgut among different castes of *M. quadrifasciata anthidioides*. The internal surface is folded and covered by a simple prismatic epithelium comprised basically of digestive cells with a well-

developed striated border. At the fold base, among the digestive cells, regenerative cell nests are seen. The basal membrane is relatively thick, but is not well stained with TB (Fig. 1A). Above the epithelium, the peritrophic membrane is easily recognized (Figs. 1A and 1B) and is thicker in the absence of food in the lumen (Fig. 1B).

Externally to the basal membrane, there is a thin muscular tunica (mantle), comprised of two layers that are hard to visualize in TB stained slides (Figs. 1A and 1B). The distribution of the muscular fibers around the midgut may best be analysed using scanning electron microscopy (SEM). The external, longitudinal layer is fenestrate and comprised of thin muscular and ramified fibers (Figs. 1C-E). Several tracheas of different calibres are found on the midgut and they penetrate among the muscular fibers (Fig. 1D). The muscular fibers, which comprise the internal layer of the tunica are circular and are found basally inside the folds (Fig. 1E). With higher magnification, it is possible to observe the striation pattern, typical of visceral muscular fibers of insects (Fig. 1E). In the gaps between the muscle fibers, it is possible to observe the basal membrane (Figs. 1D and 1E).

Analyses using SEM to explore the interior of the midgut showed a clear view of the folding pattern of this organ (Fig. 2A). The peritrophic membrane was observed resting upon the striated border of the epithelium (Fig. 2B and 2C). The microvilli, which comprise the striated border are thin and long, sometimes grouping themselves to assume a micro-fold format. Little vesicles close to the microvilli's base were frequently observed (Fig. 2C).

The peritrophic membrane pattern and thickness varied among the castes. In the foraging workers that did not contain food inside their midgut, this membrane

was comprised of a set of plates that seem to be secreted by the digestive cells. Such cells assume a squamous aspect and are not completely covered with microvilli (Figs. 3A e 3B). In the presence of food, basically pollen, the peritrophic membrane is less thick. However, it is more homogeneous and continuous, completely covering the lumen of the midgut, avoiding physical contact of food with the epithelial cells (Fig. 3C).

DISCUSSION

The morphological characteristics of the midgut of *M. quadrifasciata anthidioides* observed in this study corroborate those described by Cruz-Landim (1985, 1986) and Neves et al (2003); however, these authors used light and transmission microscopy. The presence of microvilli in its apical portion and the numerous folds and invaginations at the basolateral region of the cells demonstrate the important role of these cells in the digestive process and nutrient absorption in the midgut (Serrão and Cruz-Landim 1995).

Neves (2002) described the presence of thin muscular fibers in the midgut of *M. quadrifasciata*. The scanning analysis, in this study, shows muscular fibers are arranged in an internal, circular layer, that is important for the formation of folds, and a more external, longitudinal layer. The formation of such muscular layers contributes to the peristaltic movements and, therefore, to food conduction along the gastrointestinal tract (Klapper, 2000). This distribution pattern of the muscular fibers, as well as the presence of numerous of ramified trachea, was observed in ants (Caetano et al. 2002) and in species of Diptera, *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Caetano et al. 2006). According to Caetano et al. (2006), most of the insects present the same arrangement of muscular fibers; nevertheless, in the

midgut of the ant, *Solenopsis salvissima*, there are three muscular layers (Arab and Caetano, 2001) and in *Bactrocera dorsalis* (Diptera), there are only longitudinal fibers (Hung et al. 2000).

The microvilli of digestive cells were clearly seen with SEM, in this study. This structure is typical of absorptive cells and increases the surface contact in relation to digested food as well as increasing the area of enzymatic action, therefore, optimizing digestion and absorption by the midgut (Serrão and Cruz-Landim, 1995).

The peritrophic membranes may be classified in two ways, according to their origin. The type I are produced continuously by the digestive cells along the midgut, while type II are produced by specialized cells of the cardia (Cruz-Landim, 1985; Chapman, 1998). The observation of the midgut of *M. quadrifasciata anthidioides*, in the absence of food, demonstrates that the membrane is multilamellar, with a scale-like aspect. In the presence of food, the peritrophic membrane is homogeneous, less thick and surrounds the food, completely. Ferreira and Cruz-Landim (2004) demonstrated that, in *Apis mellifera*, the presence or absence of food influences the formation and the thickness of the peritrophic membrane. This membrane in forager workers shows the classical multilamellar structure but in queens it appear only as an amorphous material called peritrophic gel, corroborating with the present work. These variations of peritrophic membrane are due to the fact of the queens need proteic food to eggs production, while forager workers feed in nectar or honey (Ferreira and Cruz-Landim, 2004).

Despite the different diets used by foraging workers and queens of *M. quadrifasciata anthidioides*, no morphological differences were found for the midgut with the methodology used in this study. However, variations in the peritrophic membrane pattern may indicate physiological adaptations as a result of the diet.

LITERATURE CITED

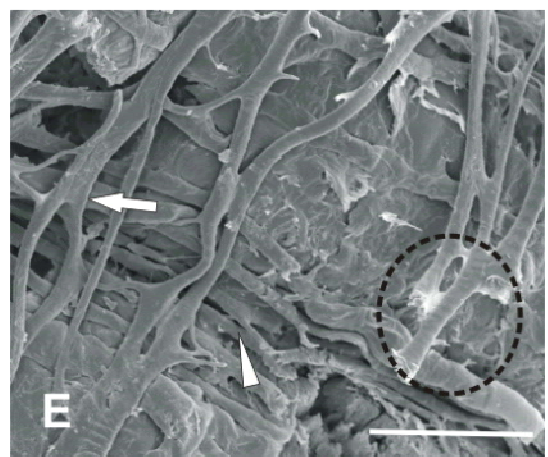
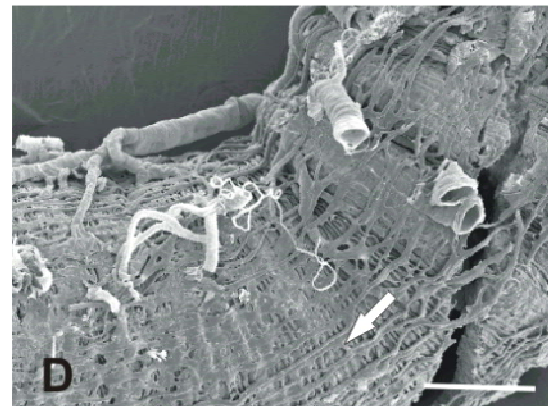
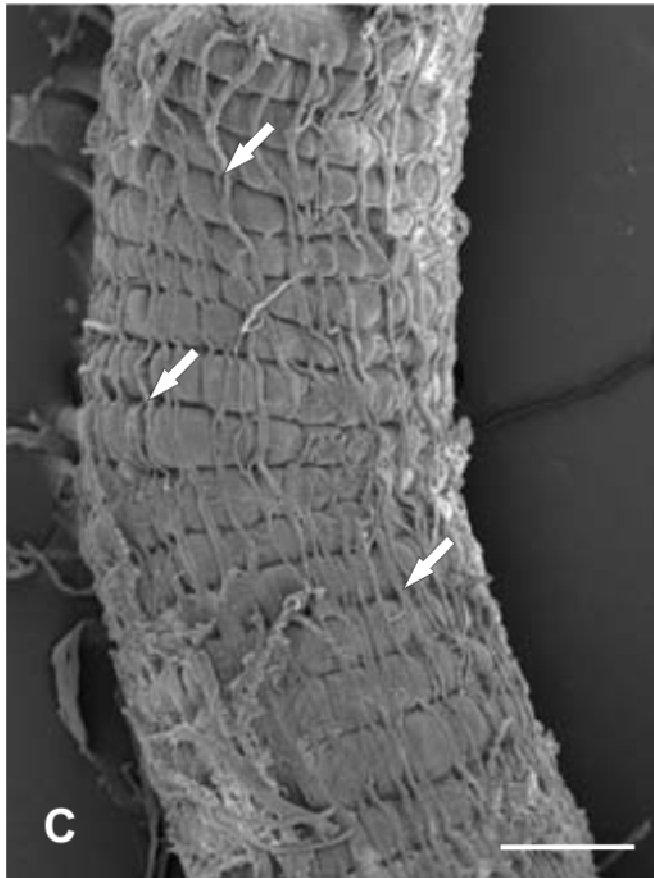
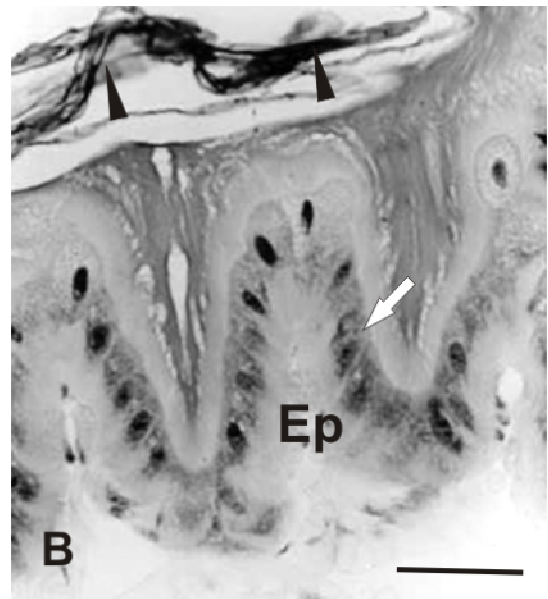
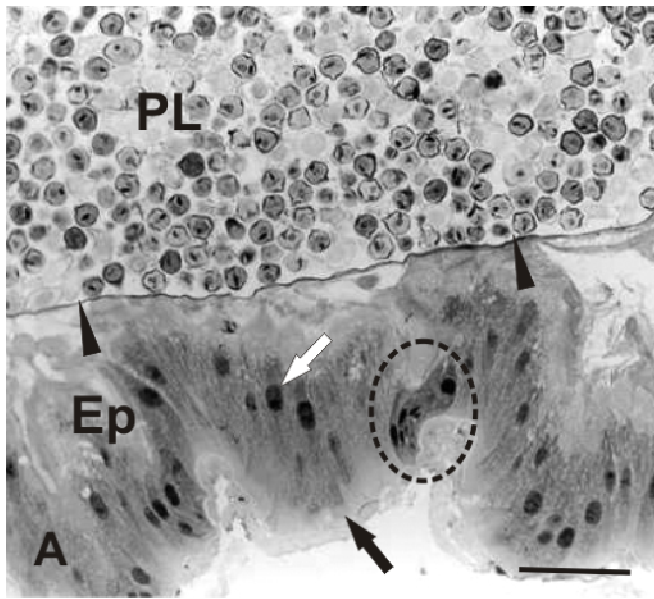
- Arab, A. & F. H. Caetano 2001. Functional ultrastructure of the midgut of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Formicidae: Myrmicinae). *Cytobios* 105: 45-53.
- Caetano, F. H., K. Jaffé & F. J. Zara 2002. Formigas: Biologia e Anatomia, (Eds). Topázio: Araras. 131pp.
- Caetano, F. H., V. N. Solferini, F. B. Britto, D. S. Lins, A. Aluani, V. G. Brito & F. J. Zara 2006. Ultra morphology of the digestive system of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (diptera tephritidae). *Brazilian Journal Morphological Science* 23(3-4): 455-462.
- Chapman, R. F. 1998. The insects - Structure and Function. (4^a Eds.), Cambridge Press, Cambridge. 770pp.
- Cruz-Landim, C., R. L. M. Silva-De-Moraes & J. E. Serrão 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Computational Biology* 1(1/2): 209-40.
- Cruz-Landim, C. 1985. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp* 44: 28-41.
- Cruz-Landim, C. 1985. Origin of the peritrophic membrane of the adult *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE). *Revista Brasileira de Biologia* 45(3): 207-219.
- Cruz-Landim, C. 1999. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology* 34(3): 597-603.
- Dow, J. A. T. 1986. Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology* 19: 187-328.
- Ferreira, F. C. & C. Cruz-Landim 2004. Comparative study of midgut morphology and digestive parameters in workers queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Naturalia* 23: 39-48.

- Hung, C. N., T. L. Lin & W. Y. Lee 2000. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2). The structure of the midgut. *Zoological Studies* 39: 387-394.
- Kerr, W. E., G. A. Carvalho & V. A. Nascimento 1996. Abelha urucu – biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú. Belo Horizonte. 144pp.
- Klapper, R. 2000. The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mechanical Development* 95: 47-54.
- Lehane, M. J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525-50.
- Michener, C. D. 2000. The Bees of the World. The John Hopkins University Press: Baltimore. 913pp.
- Neves, C. A. 2002. Estudo ontogenético, comparativo e ultraestrutural das células enteroendócrinas FMRFamida-“like” imunorreativas e descrição ultraestrutural do intestino médio de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) durante a metamorfose. Rio de Janeiro, RJ. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Neves, C. A., J. E. Serrão & L. B. Gitirana 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology* 41: 443-459.
- Serrão, J. E. & C. Cruz-Landim 1995. The striated border of digestive cells in adult stingless bees (Hymenoptera. Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 83: 229-235.
- Silveira, F. A., G. A. R. Melo & E. A. Almeida 2002. Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte. 253pp.
- Terra, W. R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35: 181-200.
- Terra, W. R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Insect Biochemistry and Physiology* 47:47-61.

Figure 1. Midgut of *M. quadrifasciata anthidioides*.

A and B – Light Microscopy **(A)** Physogastric queen, where a simple layer of high, digestive cells (white arrow) are interposed by nests of regenerative cells (dashed circle) at the basis of the epithelium (Ep). The peritrophic membrane (arrow head) contains grains of pollen (PL) in the lumen. The basal membrane is poorly stained by AT (black arrow). **(B)** Foraging worker showing digestive cells (arrow) in the epithelium (Ep) and the peritrophic membrane (arrow head).

C-E – Scanning electron microscopy (SEM) of foraging workers. Observe the muscular fiber surrounding the midgut, (longitudinal fiber = arrow) and in **(E)**, the circular fibers (arrow head). Muscular striation = dashed circle. Ep = epithelium; PL = pollen. Bars: (A) 100 μm ; (B and C) 200 μm ; (D) 80 μm and (E) 22 μm .



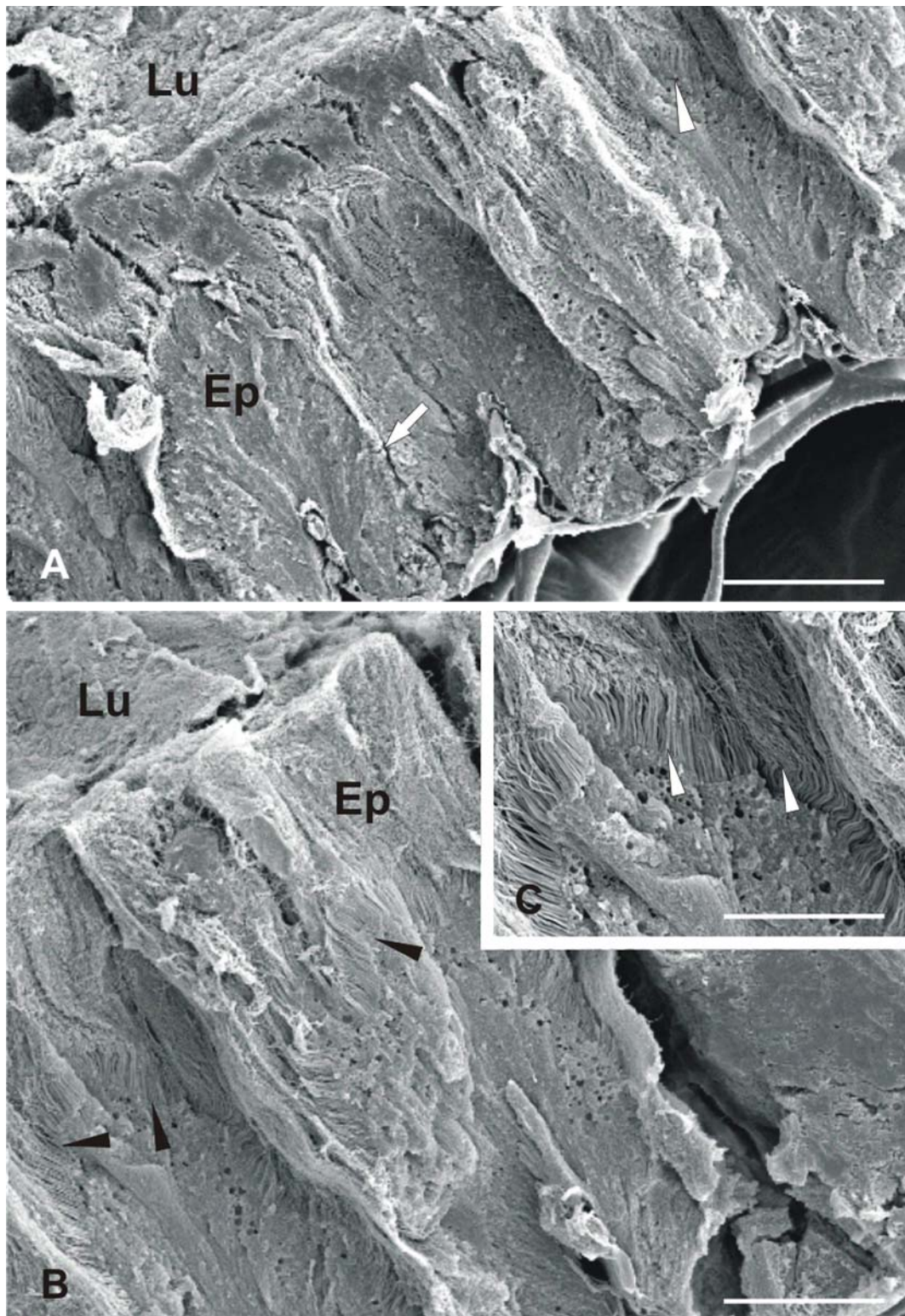


Figure 2. SEM of a longitudinal section of the midgut of a virgin queen.
A-C – The arrowheads point to the microvilli in the apical pole of digestive cells. In **(A)**, the arrows indicate folds of the epithelium (Ep) and in **(C)**, the arrows point out the vesicles. Ep = epithelium; Lu = lumen. Bars: (A) 50 μm ; (B) 25 μm and (C) 10 μm .

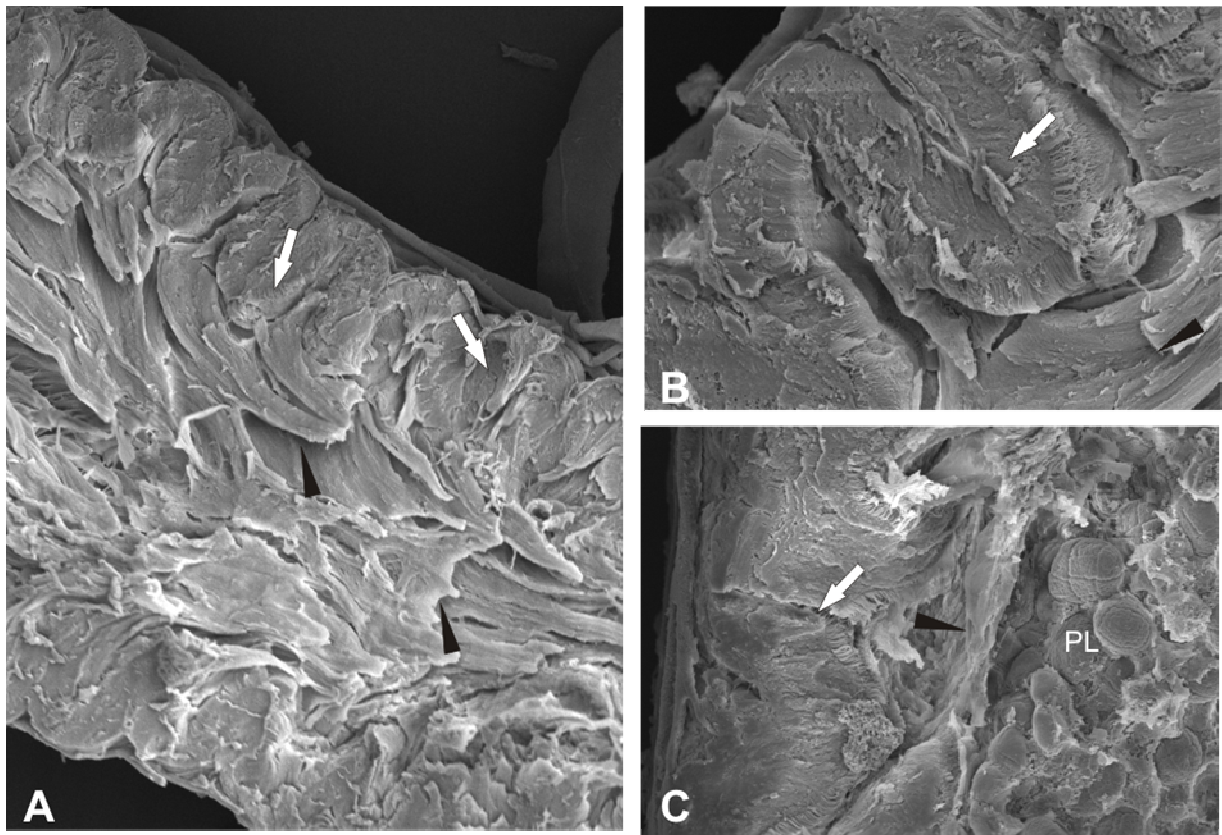


Figure 3. SEM of a longitudinal section of the midgut of *M. quadrifasciata anthidioides*. A and B – Foraging workers showing the peritrophic membrane in squamous form (arrow head). The arrows point to folds of the epithelium (Ep). C- Physogastric queen with pollen grains in the lumen and the peritrophic membranes (arrow heads). PL = pollen. Bars: (A) 50 μm ; (B) 20 μm , and (C) 25 μm .

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O aumento de células digestivas e dos ninhos de células regenerativas durante a metamorfose de *Melipona quadrifasciata anthidioides* ocorre somente na fase final e provavelmente se deve a migração de células que atravessam a membrana basal;
- Células PCNA-positivas ocorrem apenas na fase larval, o que corrobora a hipótese da ausência de divisões celulares durante a metamorfose;
- A análise com auxílio da microscopia eletrônica de varredura não demonstrou diferenças na morfologia da parede do intestino médio, entre operária forrageira e rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides*, onde se observou, com microscopia de luz, mitoses nos ninhos celulares. Este estudo revelou somente alterações no padrão de constituição da membrana peritrófica, o que pode indicar adaptações fisiológicas como resultado da dieta.
- A descrição da morfologia do trato digestivo de *Nasutitermes roduntatus* (Isoptera) (Apêndice), no qual foram observadas inúmeras figuras de mitose, demonstra que a metodologia morfológica, utilizada no presente estudo, seria suficiente para se detectar a proliferação celular nas abelhas.

Digestive system morphology of *Nasutitermes rotundatus*

(Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae)

by

Jane Moreira¹; Clóvis Andrade Neves²; Vinícius Albano Araújo¹; Ana Paula

Araújo¹; Lilian Cota Cruz³; Polyana Amaral Moreira¹ & Silma Leite Rocha¹

ABSTRACT

The digestive system of *Nasutitermes rotundatus* (Termitidae) workers is comprised of foregut, midgut, the mixed segment, and the hindgut. The walls of the oesophagus and crop are composed by the simple cubic epithelium. The wall of the gizzard presents three sets of highly developed longitudinal folds. The oesophageal valve is folded and pervades the midgut. At the midgut, there were identified digestive cells, which presented evident striated border, and the undifferentiated regenerative cells. At the transition from the midgut to the hindgut, there is a mixed segment, which presents three types of epithelia. The first proctodeal segment presents a short cuboidal epithelium without striated borders. The enteric valve connects the first segment of proctodeum to the paunch, which is the most dilated segment of the digestive tract. At the distal region, the paunch becomes narrow and origins the colon; this segment presents the smallest diameter among all others in the digestive tract. At the rectum, the intern circular as well as the extern longitudinal muscular bundle is thick. The epithelium between the rectum papillae is simple squamous with metachromatic intima. At the papillae, the epithelium is stratified, presenting cuboidal cells covering the squamous cells.

Keywords: Isoptera, internal morphology, digestive tract.

¹Graduate Program in Entomology, Dep. Animal Biology; Federal University of Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, MG, Brazil. jane@insecta.ufv.br

²Dep. General Biology Federal University of Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

³Graduate Program in Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

INTRODUCTION

The morphology of the digestive tract may not only indicate the food habits and the type of diet, but also permit an inference about the physiological processes involved in the digestion of a certain species or group of animals. Termites, in general, use as nutrient source highly deteriorated material such humus or even food poor in digestible material such leaves and living wood (Tayassu *et al.* 1997). It is already known that this ability is related to the presence of symbionts living in the intestine of these insects – organisms without which such insects would not survive; although, in more derived families such as Termitidae, there happens the production of cellulase by the digestive cells (Inoue *et al.* 2000; Tokuda *et al.* 2000). The diet based on resources of cellulose origin confers to termites a wide economic and ecological importance (Back & Okwakok 1997, Brusaard 1998).

Morphological aspects of the insects' digestive tract have been used frequently in the systematic and phylogenetic characterization of Isoptera (Godoy 2004). Regarding the Termitidae, the taxonomic descriptions are based on the characteristics of the soldiers and imagos, and the morphological characteristics of the digestive tract may help the identification of workers (Johnson 1979). The termites' digestive system is divided in foregut (comprised by oesophagus, crop, gizzard, and oesophageal valve); the midgut (also called mesenteron or ventriculus); and the hindgut that has the first proctodeal segment, the enteric valve, the paunch, colon, and rectum (Krishna 1970; Johnson, 1979; Cruz-Landim

& Costa-Leonardo 1990; Costa-Leonardo 1995; Godoy & Torales 1993; Godoy 2004).

Termites from the genus *Nasutitermes* are known by their ability to digest wood using their own enzymes (Tokuda *et al.* 1997, 1999). Information regarding the morphology of the digestive system of this genus may help the understanding of process.

Aiming at the knowledge increase concerning this genus, besides the contribution to the understanding of the food habits of termites and the generation of information of taxonomic importance, we described, in this work, anatomical and histological aspects of digestive system of workers of *Nasutitermes rotundatus* Holmgren.

METHODS

Insects

The specimens of *Nasutitermes rotundatus* (Holmgren) were collected at the campus of the Viçosa Federal University (Universidade Federal de Viçosa), Viçosa, State of Minas Gerais, Brazil (20°45'14"S and 42°52'55" W) through manual sampling (using entomological forceps). Soldiers and workers of *N. rotundatus* collected were and identified by Reginaldo Constantino (University of Brasilia – UnB).

Light Microscopy

Concerning the morphological analyses, ten workers were dissected using stereoscopic microscope in saline solution of insects (500ml water, 3.75g NaCl, 1.36g KH₂PO₄, 1.2 g Na₂HPO₄). The digestive system were fragmented and fixed in 2.5%-glutaraldehyde solution in cacodilate buffer (0.1M, pH 7.2) for 12 hours under refrigeration (4-6 °C). The samples were dehydrated in increasing alcoholic series and embedded in Histoiresin® (Leica). Histological sections measuring 2 µm were obtained by glass blade in rotative microtome (RM2155, Leica) and stained with toluidine blue-borax solution at 1% (TB). The histological analyses were accomplished in microscope Olympus CX-31 and the records were photographed by camera Colpix 4500 (Nikon).

RESULTS

The digestive tract of *N. rotundatus* is relatively regular, presenting dilatations correspondent to the crop, paunch, and rectum. The gizzard ornamentation can be seen by transparency before the cardiac valve, which continues with short midgut (Fig. 1A). The oesophagus and crop walls are comprised by simple cuboidal epithelium that rests on a thin layer of muscular tissue. With regard to the epithelium, there is a metachromatic membrane, the cuticle (Fig. 1C-D). The crop wall is irregular due to the presence of folds that allow the organ distension in function of the storage of the food, which is notably less

digested in this region than in other distal segments. The crop is linked to the gizzard, where the muscular layer becomes much more dilated.

The gizzard of *N. rotundatus* has three sets of highly developed longitudinal folds (Fig. 1B-E). The first two, with six folds each are interpolated and are characterised by cuneiform shape and by the presence of visceral muscle fibers in its interior portion (Fig. 1C-D, F-H). More caudally, there is the third set with 12 folds (lower ones) with larger apices than those from the base (Fig. 1E). In some histological section, there are observed little epithelial lumps between the larger folds; there are not, probably, true folds, but epithelial folds in function of the level of contraction of the organ (Fig.1H).

The epithelium that covers internally the gizzard is higher than that in the crop and becomes prismatic at body and apex of the most developed folds. The thick cuticle presents three layers easily delimited through the colour given by toluidine blue (AT). There was not observed any type of structure that could be classified as spine or ornamentations in the epithelial covering the folds (Fig.1H).

A powerful muscular layer is formed by three bundles of muscular fibres. The middle circular is the most developed one and is surrounded by helicoidally orientated fibres. The longitudinal bundle is located inside the folds (Fig.1F).

The cardiac valve (oesophageal valve), also folded, pervades at the anterior region of the midgut. The epithelium that covers the lumen where the food passes is simple cuboidal, while the one that covers the portion towards the lumen of the midgut is prismatic. The cuticle of the first region is thin and orthochromatic, while the second is thick and metachromatic (Fig 2A).

The midgut presents a regular diameter and does not show any fold; its muscular layer is thin – approximately 5% of the total width of the midgut wall – being comprised by a sole bundle of helicoidally orientated muscular fibres. The histological sections stained with TB evidence only two types of cells in the epithelium. The main ones (digestive) are high and thin; their bases are attached to the basal membrane, and their apexes, presenting a striated border, that reach the midgut lumen (Fig. 2B). Among the main cells, there are the regenerative ones, which are located in structures named nests, scarce at the cardiac valve region (Fig. 2B). The cells of the nest are undifferentiated and their apexes do not reach the lumen. Many cells in mitotic processes were observed at these nests (Fig. 2C). The cells close to the nest are less differentiated than those far from it. The nuclei of these last cells become larger and more elongated, changing their position from basal to apical as they get differentiate, and finally becoming main cells (Fig. 2B-C).

It is common to observe, in the main cells, the hyperstained vacuoles, especially close to the nuclei as well as the presence of portions of the cells projecting themselves to ectoperithrophic space (Fig. 2D). The peritrophic membrane is thin and the lumen was always full of food.

The transition from the midgut to the hindgut does not happen abruptly in this species. Approximately, the mixed segment corresponds to 1/3 of the total midgut length, where the tissues with typical characteristics of the midgut are projected towards the hindgut, taking the dorsal half of the digestive tract (Fig. 2E). The ventral portion is taken by the hindgut, and in the anterior limit between them two, there is the insertion of the two pairs of extremely thin Malpighian tubules (Fig

2F). At a transversal section of this segment, three types of epithelium are noticed; dorsally, the typical epithelium of the midgut plus the nests of regenerative cells; ventrally, the hindgut epithelium presenting short cuboidal cell covered by the intima; laterally, both sides among the other two epithelia, there is an epithelium comprised by high cuboidal cells covered by a thick, and extremely metachromatic cuticle (Fig. 3A).

The first proctodeal segment has approximately the same length and diameter of the midgut, but its wall is thinner, allowing, therefore, the easy visualization of the luminal food (Fig. 3B). The covering epithelium is the same one observed at the ventral portion of the mixed segment. At the beginning of this segment, it is still possible to notice the peritrophic membrane and the accumulation of material between it and the intima. In this segment, there is not nest of regenerative cells; and the muscular layer is considerably thin (Fig. 3B).

The enteric valve connects the first segment of the proctodeum to the paunch. The valve region, in this species, can be anatomically recognized as a narrowing of the digestive tract anteriorly to the considerably dilated paunch. The wall of the enteric valve is slightly thicker than the first proctodeal segment at its anterior portion, but it gets thicker as close as it gets to the paunch (Fig. 3C). The longitudinal folds are short at the beginning of the valve, but they become more developed at the entrance of the paunch, where are also present few little epithelial lumps. The paunch, always full of food, is the most dilated segment of the digestive tract of *N. rotundatus*. The paunch is covering by cuboidal simple epithelium with voluminous cells, which are higher than those from the previous segment (Fig. 3D). The intima is thin and orthochromatic. The muscular layer is formed by a

continuous bundle of fibres of circular orientation just below the epithelium and by several bundles of isolate muscular fibres externally along the paunch (Fig. 3D). At high magnification, it is possible to observe transversal striae at the basal and apical regions of the epithelial cells, whose boundaries are easily visualized.

At distal region, the paunch becomes narrow and originates the colon (Fig. 3E), whose diameter is the smallest one in the entire digestive tract, presenting also the thinnest wall; its epithelium is simple squamous, the intima is relatively thick; the muscular layer is comprised by a very thin internal circular bundle, being observed only few longitudinal bundles, mainly formed by a sole fibre. In the transition to the rectum, there is a sphincter, where there are many circular orientated fibres (Fig. 3E).

At rectum, both intern circular and extern longitudinal muscular bundles are thick; its epithelium is simple squamous with a metachromatic intima, which presents surface irregularities (Fig. 3F). This species presents, in the rectum, two well-developed papillae, where the epithelium gets thicker and presents two cellular layers; the basal layer is comprised by squamous cells; the apical layer is comprised by large cuboidal cells with more regular and thinner cuticle than the interpapillar region. The aspect of the cuboidal cells is similar to the paunch cells; however, the cellular boundaries are not visible.

DISCUSSION

In *N. rotundatus* as well as in *N. takasagoensis* (Tokuda *et al.* 2000), the digestive system may be subdivided in six segments: the foregut was short as the

one described for *N. takasagoensis* and several representatives of the family Rhinotermitidae, and different from those described for other families (Krishna 1970; Noirot 1955).

The oesophagus not differ from those described for other families of termites (Krishna 1970; Oliveira *et al.* 1987; Godoy 2004). A similar situation is observed in the crop, whose wall is thinner than the oesophagus, probably, due to its dilatation state (presence of food).

The termite gizzard has an important role as a food grinder. Its morphological aspects allow inferences regarding the hardness of the ingested food. The harder is the food, generally, more folds and ornamentations are present at the folds apexes (Oliveira *et al.* 1987). In *N. rotundatus*, it was observed a gizzard formed by highly developed folds, which were covered by a thick layer of visceral muscle fibres of circular orientation. In fact, these termites seem to ingest considerable hard wood, since the individuals sampled for this study were found feeding themselves on dead trees, with wood in initial stage of degradation. Studies on *Armitermes euamignathus* (Termitidae) and *Rugitermes niger* (Kalotermitidae) have also evidenced a thick cuticular shell in the gizzard, which is in accordance with the non-liquid diet of these species. Furthermore, in *R. niger*, which presents a dry xylophagous diet, there was a great number of sclerotized ornamentation in the gizzard (Oliveira *et al.* 1987). Such ornamentation was not seen in workers of *N. rotundatus*; however, the thickening of the cuticle, which covers the gizzard, was evident. In *N. rotundatus*, the absence of ornamentation, and the increase in the width of the cuticle may be related with the type of food ingested by this species.

Folds or invaginations present in the termites gizzard are anatomically classified according to their height (from the first to fourth rate) (Oliveira *et al.* 1987). Transversal histological sections of this organ have not contributed for a precise classification of these folds, based on their height, due to their superposition in the longitudinal plan. Therefore, folds of higher aspect, in a certain section, may not necessarily be the first rate ones. Thus, we have not used this classification for the present study. Nevertheless, there was noticed that the folds have different heights and that in the biggest ones, there is longitudinal muscle fibres, while the smallest ones are formed only by the epithelial tissue. The absence of third rate and fourth rate folds in *Armitermes euamignathus* and in other tropical termites was correlated with the diet of less hard materials (Oliveira *et al.* 1987).

The thick layer of visceral muscle fibres combined with the thickening of the cuticle, and with the fold arrangements indicates the potential of this organ for grinding and transporting the food from the gizzard to the oesophageal valve and to the mesenteron (Tokuda *et al.* 2001).

The well-developed oesophageal valve as observed in *N. rotundatus* works avoiding the food and enzyme reflow to the foregut (Chapman 1998). The metachromasia observed only at the epithelium facing the midgut lumen points to differences in the constitution and probably functions of such cells.

The midgut of the majority of superior termites – family Termitidae – is source of enzymes, which are necessary for the digestion of cellulose (Tokuda *et al.* 1999; Costa-Leonardo & Kitayama 1991). The morphological characteristics of the middle intestine of *N. rotundatus* are typical in the majority of the insects (Dow

1986). The presence of numerous granules and apical portions of digestive cells projected towards the lumen corroborates with the secretory role of this region. The well-developed striated border is related to absorption, evidencing that most of the digestive process and absorption happens at the mesenteron as generally seen in insects (Terra 1988) and in other termites (Tokuda *et al.* 2001; Inoue *et al.* 2000; Noirot & Noirot-Timotheé 1969). However, the little length and the absence of circular folds in the midgut of the species under study, in despite with happening in Hymenoptera, for instance (Neves *et al.* 2003) cause an expressive decrease on the absorptive surface of this segment, what is probably compensated by the absorption at the proctodeal segments (Noirot & Noirot-Timotheé 1969; Tokuda *et al.* 2000, 2001).

As in other insects, it is common the occurrence of a huge amount of nests of regenerative cells at the midgut of *N. rotundatus*; in this species, the number of mitotic figures was expressive inside the nests. Expressive mitotic activity was also observed in other species of termite (Cruz-Landim & Costa-Leonardo 1996). Mitotic division of regenerative cells in mature insects happens in few groups such Orthoptera (Zudaire *et al.* 2004) and Heteroptera (Endo 1983). In Hymenoptera, the mitosis of regenerative cells was observed in queens (França *et al.* 2006), but not in workers (Neves *et al.*, 2003; Cruz-Landim & Costa-Leonardo 1996). According to Cruz-Landim & Costa-Leonardo (1996), the occurrence of a considerable number mitosis at the midgut termite workers not must be considered an exception, as this caste (in Isoptera) is not comprised by mature individuals – which are the flying forms – but by immature ones. However, this individuals do not mounting again. Are they actually immature forms?

As other Termitidae and Kalotermitidae (Jonhson 1979; Tokuda *et al.* 2001; Godoy 2004), *N. rotundatus* does not present gastric caecum. The Malpighian tubules are inserted at the mesenteron-proctodeum limit at the anterior part of the mixed segment. In *N. rotundatus*, there were observed two superposed pairs of Malpighian tubules that pervade the intestine at its middle-ventral portion as well as observed in *N. takasagoensis* (Tokuda *et al.* 2000); being this, according to Krishna (1970), characteristic of Termitidae.

The mixed segment is a structure exclusive of Termitidae; and in such segment, there has been confirmed the presence of symbionts (Grassè & Noirot 1959). Few studies have characterized morphologically this region (Bignell *et al.* 1983; Tokuda *et al.* 2000). These descriptions corroborates with the ones observed in *N. rotundatus*, that is, at this segment, there is a superposition of mesenteron epithelia and the first proctodeal segment. However, we have noticed that the occurrence of third type of epithelium comprised by high cuboidal cells with intense metachromasia above the nucleus. The material intensively stained by Toluidine Blue that filled the space between the peritrophic membrane and the epithelial surface, in that segment of the intestine is formed, probably, by symbionts.

At the beginning of the first proctodeal segment, there was also found the accumulation of material similar to bacteria. The symbionts associated to the intense digestive activity in the hindgut of termites is widely described (Oliveira *et al.* 1987; Costa-Leonardo & Kitayama 1991; Noirot 1955; Tokuda *et al.* 2000, 2001); however, studies regarding the morphology of this segment are scarce. Godoy (2004) describes this region in two species of the genus *Tauritermes*, as short and not dilated, with the enteric valve composed by six longitudinal folds; and

Tokuda *et al* (2001) who affirm that in *Nasutitermes takasagoensis*, the first proctodeal segment is covered by a thin epithelium that contains flat cells of thick cuticles. In *N. rotundatus*, the wall from the first proctodeal segment is thinner than the middle intestine one, therefore, allowing the observation of the food by transparency. Histologically, we have observed the same aspect described for *N. takasagoensis* (Tokuda *et al.* 2001).

Yoshimura *et al.* (1996) observed that the size of the wood fragments ingested by *Nasutitermes takasagoensis* was visibly reduced after the food passed the middle intestine and reached the first proctodeal segment, suggesting an intense enzymatic activity at these segments.

The enteric valve, located between the first and third segments of the posterior intestine has an important role in the taxonomy of termites; however, its function is not fully understood (Donovan *et al.* 2000; 2001; Donovan 2002). According Donovan *et al.* (2000), this structure is relatively insignificant in wood feeding species, what confirms the observations concerning the *N. rotundatus*, which has not shown denticles or spines in this region notwithstanding the formation of a sphincter with visible boundary that, probably, helps in the control of the food flow from the first proctodeal segment to the paunch.

The paunch is the most enlarged part of the hindgut and numerous microorganisms live in this region (Tokuda *et al.* 2000; Godoy 2004). The wall of this segment is covered by a simple cuboidal epithelium with voluminous cells and two well-defined muscular layers formed by a circular bundle close to the epithelium and other circular bundle externally to it. The epithelial cells of the

paunch are relatively thin for promoting the absorption of nutrients generated by the action of the symbionts as observed in *N. takasagoensis* (Tokuda *et al.* 2001).

In opposition to what was observed in *Tauritermes* (Kalotermitidae) (Godoy 2004), we have not seen spines in the paunch of *N. rotundatus*. However, such ornamentations were easily seen in the colon and at the beginning of the rectum and, probably, help in the adhesion of the food to the walls of these segments, easing its locomotion to rectum. In *N. rotundatus* as well as in *N. takasagoensis*, the colon is a narrowed tube, in opposition to what was observed in *Tauritermes* (Godoy 2004).

In *N. rotundatus*, we have noticed only two large papillae that spread out over each side of rectum. In the majority of insects, there are six structures of these, which are related to the absorption of water, salts, and amino acids, taking part in the formation of the urine (Chapman 1998). Godoy (2004) evidences the occurrence of six rectal papillae in two species of *Tauritermes*.

Studies regarding the morphological aspects of the digestive tract are useful for understanding not only the physiology of this system, but also for generating data which can be used by the complex systematic of isopterous (Johnson 1979). The arrangement of the gizzard ornamentation, the presence of the mixed segment, the place of implantation of the Malpighian tubules as well as the amount and disposition of the rectal papillae seem to be important traits of easy access that might be used for this purpose. On the other hand, the knowledge regarding the physiological aspects of the digestive system is essential for understanding the physiology of these insects.

LITERATURE CITED

- Back, H.I.J. & M.N.J. Okwakol. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of termites. *Applied Soil Ecology* 6: 37-53.
- Bignell, D.E., H. Oskarsson, J.M. Anderson & P. Ineson. 1983. Structure, microbial associations and function of the so-called "mixed segment" of the gut in two soil-feeding termites, *Proculitermes aburiensis* and *Cubitermes severus* (Termitidae, Termitinae). *Journal of Zoology* 201:445–480.
- Brusaard, L. 1998. Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. *Applied Soil Ecology* 9:123-135.
- Chapman, R.F. 1998. The insects: Structure and function. New York, Elsevier. 918p.
- Costa-leonardo, A.M. & K. Kitayama. 1991. Frontal gland dehiscence in the Brazilian termite *Serritermes serrifer* (Isoptera: Serritermitidae). *Sociobiology* 19:333-338.
- Costa-Leonardo, A.M. 1995. Morphology of the digestive tube in the termite *Serritermes serrifer* (Isoptera, Serritermitidae). *Naturalia* 20:31-44.
- Cruz-Landim, C. & A.M. Costa-Leonardo. 1990. Functional adaptations of the epithelium from different gut segments of *Grigiotermes bequaerti* (Isoptera, Termitidae, Apicotermittinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 34:669-678.
- Cruz-Landim, C. & A.M. Costa-Leonardo. 1996. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:129-130.
- Donovan, S.E. 2002. A morphological study of the enteric valves of the Afrotropical Apicotermittinae (Isoptera: Termitidae). *Journal of the Natural History* 36:1823-1840.
- Donovan, S.E.; P. Eggleton & D. Bignell. 2001. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology* 9: 356-366.
- Donovan, S.E, D.T. Jones, W.A. Sands & P. Eggleton. 2000. The morphological phylogenetics of termites (Isoptera). *Biological Journal of the Linnean Society* 70:467-513.
- Dow, J.A.T. 1986. Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology* 19: 188–328.
- Endo, Y, H. Sugihara, S. Fujita & J. Nishiitsutsuji-Uwo. 1983. Kinetics of columnar and endocrine cells in the cockroach midgut. *Biomedical Res.* 4: 51-60.

- França, A.A.P, C.A. Neves, L.C. Cruz, P.W.S. Vianna, J.E. Serrão. 2006. Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a comparative study of workers and queens. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 23: 129-136.
- Grassé, P.P. & C. Noirot. 1954. *Apicotermes arquieri* (Isoptère): ses constructions, sa biologie. Considerations générales sur la sous-famille des Apicotermitinae nov. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 16: 345-388.
- Godoy, M.C. & G.J. Torales. 1993. Morfología del tubo digestivo de obreras del género *Termes* (Isoptera: Termitidae). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 52:123-132.
- Godoy, M.C. 2004. Gut Structure of Two Species of the Neotropical Genus *Tauritermes* Krishna (Isoptera: Kalotermitidae) *Neotropical Entomology* 33:163-167.
- Inoue T., O. Kitade, T. Yoshimura & I. Yamaoka. 2000. Symbiotic associations with protists. Pp 275-288 in Abe, T., D.E. Bignell & M. Higashi (eds.). *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 488pp.
- Johnson, R.A. 1979. Configuration of the digestive tube as an aid to identification of worker Termitidae (Isoptera). *Systematic Entomology* 4: 31-34.
- Krishna, K. 1970. Taxonomy, phylogeny and distribution of termite. in Krishna, K. & F.M. Weesner (eds.). *Biology of termites*. vol.2, Academic Press, New York and London. 643 pp.
- Neves, C. A., J. E. Serrão & L. B. Gitirana 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology* 41: 443-459.
- Noirot, C. 1955. Recherches sur le polymorphisme des termites supérieurs (Termitidae). *Annales des Sciences Naturelles Zoologie* 17: 399-595.
- Noirot C. & C. Noirot-Timotheé. 1969. The digestive system. in Krishna, K. & F.M. Weesner (eds.). *Biology of termites*. vol. 2, Academic Press, New York and London, pp. 49-88.
- Oliveira, G.M.F.; Cruz-Landim, C.; Costa-Leonardo, A.M. 1987. Morfologia da moela em *Rugitermes niger* (Kalotermitidae) e *Armitermes euamignathus* (Termitidae). *Ciência e Cultura* 39:753-756.
- Tayassu, T., T. Abe, P. Eggleton & D. Bignell. 1997. Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. *Ecological Entomology* 22:343-351.

- Terra, R.W. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21: 675–734.
- Tokuda, G., H. Watanabe, T. Matsumoto & H. Noda. 1997. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo- β -1,4-glucanase. *Zoological Science* 14: 83–93.
- Tokuda, G., N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, T. Matsumoto & H. Noda. 1999. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1447: 146–159.
- Tokuda, G., I. Yamaoka & H. Noda. 2000. Localization of symbiot *Clostridia* in the mixed segment of the termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 2199–2207.
- Tokuda G., T. Nakamura, R. Murakami & I. Yamaoka. 2001. Morphology of the digestive system in the wood-feeding termite *Nasutitermes takasagoensis* (shiraki) [Isoptera: Termitidae]. *Zoological Science* 18: 869–877.
- Zudaire E., S. J. Simpson, I. ILLA & M. Montuenga. 2004. Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *The Journal of Experimental Biology* 207: 2255-2265.
- Yoshimura T., K. Tsunoda & M. Takahashi. 1996. Degradation of wood in the digestive tract of a higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki) (Isoptera: Termitidae). *Mokuzai Gakkaishi* 42 (12): 1250-1257.

Figure 1. A-H: Anatomy of the digestive system (A) and histology (B-H) of the *Nasutitermes rotundatus*.

A - General anatomy of the digestive tract, showing the cardiac valve (white arrow) at the transition of the foregut (fg) to the midgut (mg), the mixed segment (ms), the paunch (p), the colon (c) and the rectum (black arrow) in the hindgut (hg).

B - Foregut longitudinal section showing the simple epithelium (ep) and the gizzard ornamentation, with 1^a (arrow) 2^a (star) e 3^a order (arrowhead) ridges. Later, the gizzard meets the cardiac valve (cv) that penetrates in the midgut (mg).

C - D – In a longitudinal cut of 1^a e 2^a order, respectively, the visceral muscular fibers (m), the epithelium (ep) and the cuticle (black arrow) are shown.

E - 3^a order ridges where can be observed one circular muscular layer (m), the lumen (L) and the ridges (arrow).

F - 1^a (star) and 2^a order ridges in a transversal cut. It is noticed that 1^a order ridges have smaller ridges, with the apexes wider than the bases (arrow) and a thick muscular layer (m).

G - Detail of a 1^a order ridge with muscular beam of longitudinal orientation in the interior of the ridges.

H - Detail of a 2^a order ridge, where a prismatic epithelium can be observed in the region of the body and apex of the developed ridges. Fg = foregut; mg = midgut; ms = mixed segment; p = paunch; c = colon; hg = hindgut; ep = epithelium; m = muscular layer; L = lumen. Bars: (A) 5 mm; (B) 200 µm; (C, D, G and H) 60 µm; (E and F) = 100 µm.

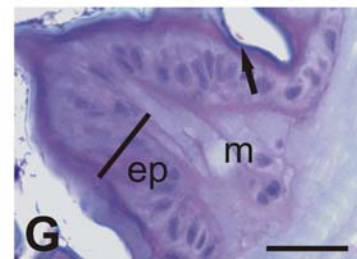
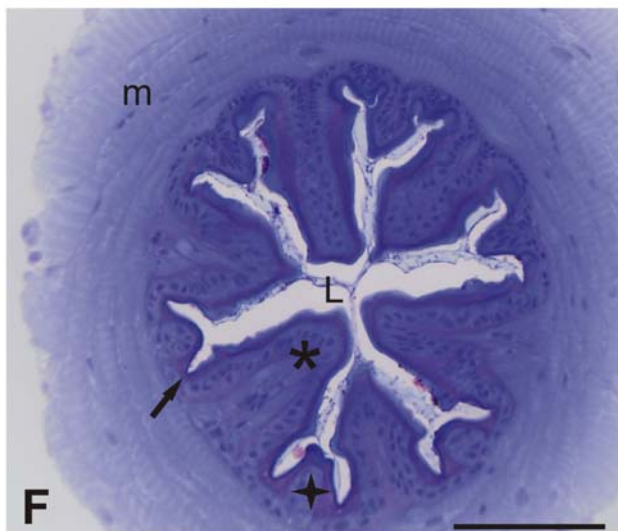
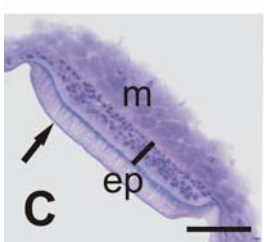
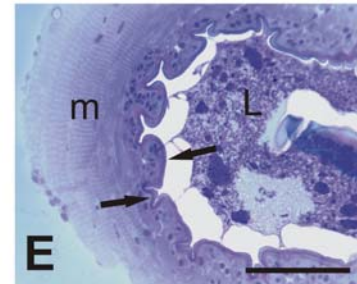
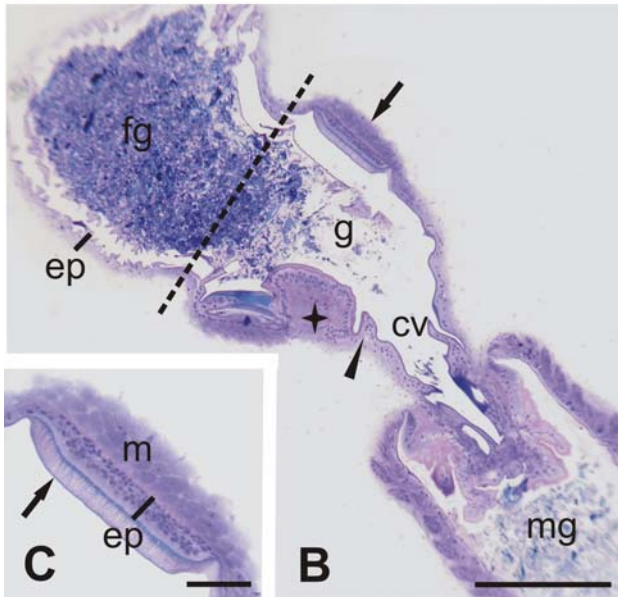
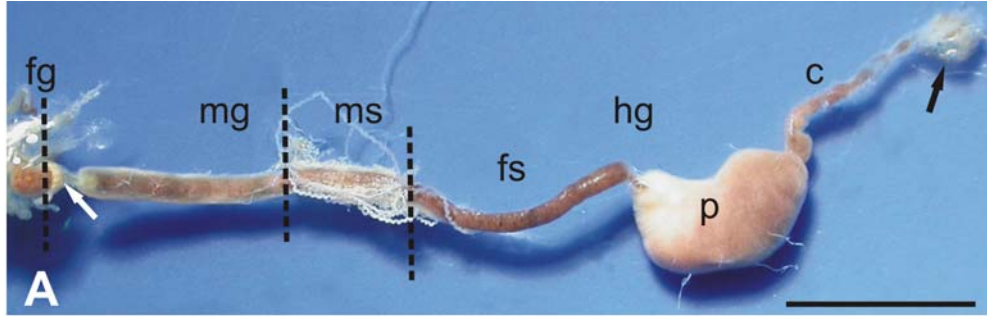


Figure 2. Histology of the digestive system of the *N. rotundatus*.

A - Cardiac valve (cv) getting into the anterior region of the midgut. A simple cubic epithelium can be observed (white arrow) covering the light of the cardiac valve and a prismatic epithelium (black arrow) with metachromatic cuticle (arrowhead) leading to the lumen of the midgut.

B – Midgut epithelium composed by thin, long and with a developed striated wall digestive cells (arrow) and the regenerative cells composing nests (hatched circle). A thin muscular layer can be observed (m).

C – Regenerative cells nest showing the mitosis (arrowhead) and the muscular layer (m).

D - Detail of the main cells apex showing portions of cells that are projecting out of the ectoperitrophic space (arrow), the developed striated wall (arrowhead) and a thin peritrophic membrane (star).

E – F – Midgut transition to the hindgut. **E** - Longitudinal section of the mixed segment, the midgut (arrowhead) and hindgut (arrow) epithelium can be observed. **F** - Light contrast micrography, where the insertion of the two extremely thin pairs of Malpighian tubes can be observed (arrow). cv = cardiac valve; L = lumen. Bars: (A and C) 60 μm ; (B) 100 μm ; (D) 30 μm ; (E) 200 μm ; (F) 500 μm .

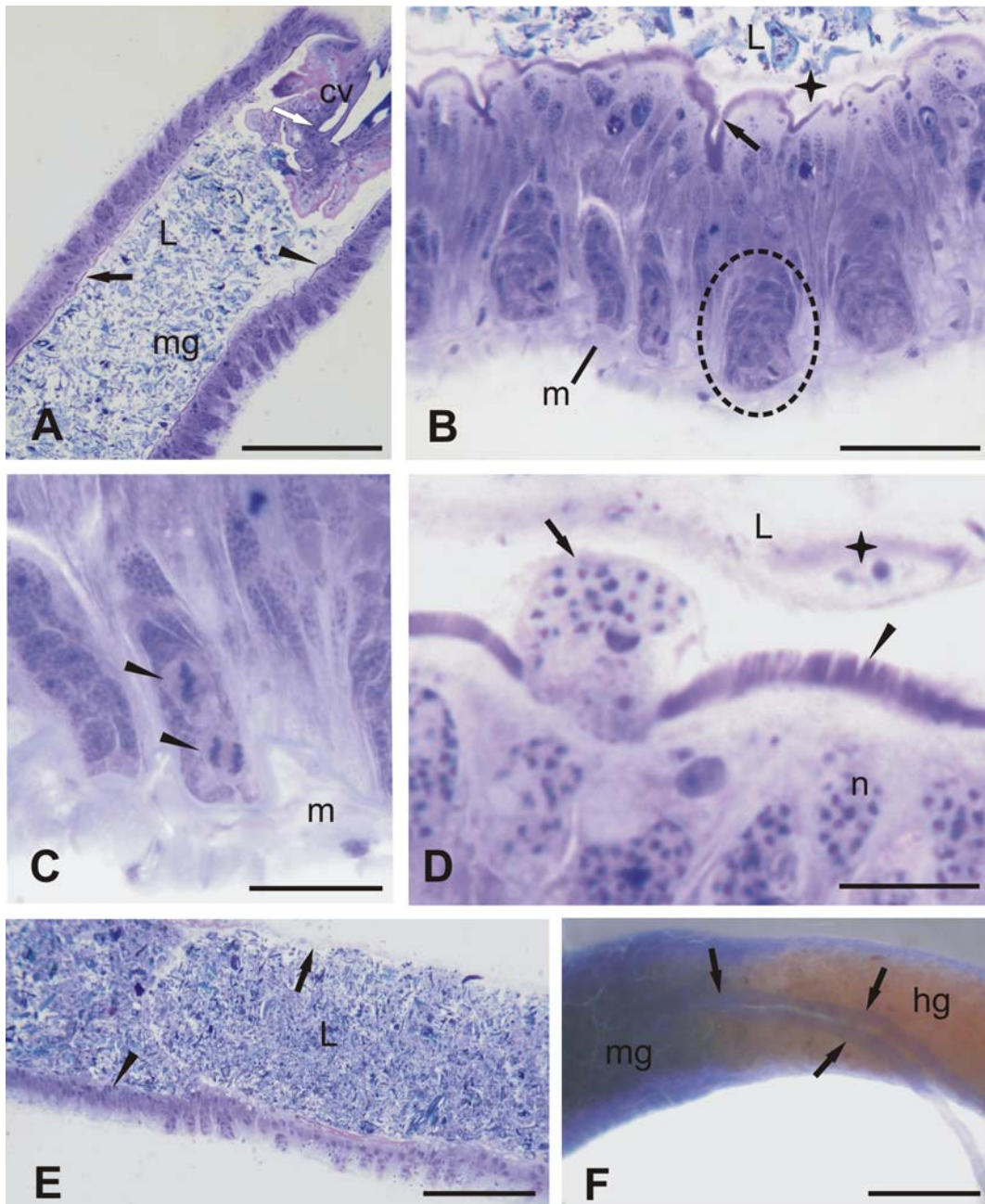


Figure 3. Histology of the digestive system of the *N. rotundatus*.

A - Transversal section of the mixed segment, showing, the tipic wall of the midgut (mg); ventrally to the hindgut (hg), with the epithelium composed by short cubic cells coated by a intima (arrowhead); and laterally, the wall composed by the epithelium with tall cubic cells coated by a metachromatic cuticle (arrow) and a thin muscular layer (m).

B - Transversal section of first proctodeal segment., showing the epithelium with cubic cells (arrowhead). Also, the peritrophic membrane (arrow) and an accumulation of material between the membrane and the intima (hatched circle) and the Malpighi tubes (mt) next to the wall of this segment can be observed.

C - Transversal cut of the enteric valve, evidencing the thick cuticle epithelial cell (arrow), the muscular layer (m) and the bacterial presence (asterisk).

D - Transversal section of the paunch showing the simple cubic epithelium, muscular layer with beams of circular orientation (arrowhead) and isolated muscular fibers (arrow).

E - Longitudinal section of the transition region of the colon to the rectum. The colon epithelium is simple coated by a thick intima (arrow). A sphincter with muscular fibers of a circular orientation can be observed (asterisk).

F - Rectum longitudinal section, with a simple epithelium, metachromatic intima, presenting spicules in the surface (arrowhead). A rectal papilla with stratification epithelium can be observed (asterisk). L = lumen; mg = midgut; hg = hindgut; mt = Malpighi tubes; m = muscular layer. Bars: (A) 200 μ m; (B-F) 100 μ m.

