
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE ZOOLOGIA)

**MORFOLOGIA DO TRATO DIGESTIVO
DE FORMIGAS**

MURILLO LINO BUTION

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro,
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração: Zoologia)**

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho de 2006

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE ZOOLOGIA)**

**MORFOLOGIA DO TRATO DIGESTIVO
DE FORMIGAS**

MURILLO LINO BUTION

**Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO HENRIQUE CAETANO
Co-orientador: Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro,
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração: Zoologia)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Junho de 2006**

595.796 Bution, Murillo Lino.

B984s Morfologia do trato digestivo de formigas / Murillo Lino
Bution. – Rio Claro : [s.n.], 2006
96 f. , figs. fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Flávio Henrique Caetano

Co-orientador: Fernando José Zara

1. Formigas. 2. Proventrículo. 3. Ventrículo, 4. Íleo.
Histoquímica. 5. Ultramorfologia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedicado a...

Meus pais, Edson e Célia, pelo amor,
confiança, carinho, exemplo de educação,
honestidade e por serem meu maior motivo
de orgulho.

À vocês devo tudo na vida...

Meu irmão Ronaldo e minha namorada Maria Flora,
amigos de todas as horas, pelo apoio, amor e
confiança...

Ao meu querido amigo Flávio, pelo carinho,
confiança, amparo nos momentos difíceis,
respeito, puxões de orelha, conselhos. Meu
eterno muito obrigado...

Aos Profs. Drs. Flávio Henrique Caetano e Fernando
José Zara pela orientação e co-orientação dedicada,
exemplos de seriedade, competência, ética e que
trabalham muito para minha formação acadêmica e
pessoal...

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Mestrado Proc. 134493/2005-2.

Ao Departamento de Biologia, na pessoa da Profa. Ana Maria Costa Leonardo, pela utilização dos Laboratórios, equipamentos e pessoal.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Rio Claro, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano.

A Antônio Teruyoshi Yabuky, Cristiane Márcia Miléo, Gerson Melo Souza, Lucila de Lurdes Segalla Franco, Monika Iamonti, Neuza Ap. B. Perinotto e Rogilene Aparecida Prado pela presteza, amizade, ensinamentos práticos e serviços técnicos prestados.

A coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Profa. Dra. Sulene Noriko Shima, pelo apoio e as secretárias da seção de Pós-Graduação, Catalina, Sandra, Heloísa e Rute, que prontamente nos atendem.

A Carmen, Cristina, vó Ionne, Octávio, Talissa e Tássia Bution, Cícero (Cicinho), Mário Moreira, Carlos (Chapinha), Afonso Celso, Carolina, Leonardo, Lenita e toda sua família e a todos os meus familiares, meu eterno muito obrigado.

Aos amigos Ivan Martins, Rodolfo Mariano, Rogério Begosso, Luciane, Viviane, Leandro (Lee), Frederico e Leonardo Nojimoto, Skeeter, Eduardo e Frederico Pfaffenback, Alex Mello, Aroldo, Dante e Diego Villa-Clé, Diogo, Murilo e Érika pela amizade e apoio.

Aos companheiros de orientação Fábio Barros Britto, Rodrigo Ferracine Rodrigues, Giovana A. Tomaino Gomes, Runer e Dimitrius, companheiros do dia a dia.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A Deus.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
CAPÍTULO 1: Estudo comparativo da histologia, histoquímica e ultramorfolgia do proventrículo da tribo Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae).....	15
CAPÍTULO 2: Histologia, histoquímica e ultramorfolgia do ventrículo de três espécies de <i>Cephalotes</i> (Formicidae, Myrmicinae).....	31
CAPÍTULO 3: Histologia e Histoquímica do Ventrículo de <i>Dolichoderus</i> (= <i>Monacis</i>) <i>bispinosus</i> (OLIVIER, 1792) (Hymenoptera: Formicidae).....	50
CAPÍTULO 4: Anatomia do íleo de três espécies de <i>Cephalotes</i> (Formicidae, Myrmicinae).....	65
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89.

RESUMO

A presença de microorganismos no trato digestivo de formigas da tribo Cephalotini (Subfamília Myrmicinae) e do gênero *Dolichoderus* (Subfamília Dolichoderinae), tem sido motivo de várias especulações entre os mirmecologistas. Entretanto não existem dados sobre muitas das características da relação destes microorganismos descobertos a menos de 25 anos, principalmente no que concerne os aspectos histoquímicos, enzimológicos e também ultramorfológicos.

Assim sendo, foram realizados estudos comparados do proventrículo, ventrículo e do íleo de três espécies pertencentes ao gênero *Cephalotes*: *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, e do ventrículo de uma espécie do gênero *Dolichoderus*: *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus*, objetivando buscar relações entre as espécies, assim como, diferenças enzimológicas e histoquímicas tanto da parede como do conteúdo de destas porções do trato digestivo, que possam ser utilizadas para a compreensão da função intestinal, bem como esclarecer quais e como os recursos alimentares são aproveitados em cada parte do trato digestivo. Das espécies de *Cephalotes* foram feitas análises ultramorfológicas.

Os resultados tanto de natureza enzimológica quanto de natureza histoquímica de todas as regiões estudadas, apresentaram o mesmo padrão para todas as espécies. De

mesma maneira, a secreção das células digestivas colunares para todas as espécies estudadas, foi considerada como do tipo apócrino.

Na tribo Cephalotini (Myrmicinae) e em *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* (Dolichoderinae) o pH levemente ácido presente tanto no lúmen do ventrículo, quanto no lúmen do íleo, permite a sobrevivência dos microorganismos nestas regiões do trato digestivo.

Assim sendo, a estabilização deste pH está relacionado com a intensa secreção de íons de Ca^{++} pelas células digestivas do ventrículo da tribo Cephalotini.

A presença maciça de microorganismos no íleo de Cephalotini, frente às adaptações morfológicas que garantem um elevado suprimento de oxigênio e de metabólitos, somadas à capacidade absorptiva e digestiva observadas nas células epiteliais, nos leva a acreditar que esta região do trato digestivo seja uma estrutura bastante especializada e adaptada para abrigar microorganismos, estabelecendo com eles uma legítima simbiose, que leva a otimização dos recursos alimentares explorados por estas formigas.

ABSTRACT

The presence of microorganisms in the digestive tract of Cephalotini tribe (subfamily Myrmicinae) and *Dolichoderus* (subfamily Dolichoderinae) ants has been causing several speculations among the myrmecologists. However, the data concerning the relationship of these microorganisms (discovered less than 25 years ago) to the ants are scarce at the histochemical, enzymological and ultramorphological point of view.

Thus, we carried out studies on the proventriculus, midgut and ileum in three species of *Cephalotes* (*C. atratus*, *C. clypeatus* and *C. pusillus*) and the midgut of *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus*. The histochemical and enzymological aspects of the epithelium of these structures and their contents were compared among these species. We tried to understand the function of these organs and establish how each of them takes advantage of the alimentary sources. Some ultramorphological studies were also carried out in Cephalotini.

The enzymological and histochemical techniques showed that each studied organ presented the same pattern when compared among species. In the same way, the secretion

of the digestive cells was also similar. Besides, all of these digestive cells were classified as apocrine.

In *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* and all species of Cephalotini studied the slightly acid pH allows the survival of the microorganisms as in the midgut lumen, as in ileum's lumen. We propose that, in Cephalotini, the stability of the pH is related to the intensive secretion of Ca^{++} by the digestive cells in the midgut.

The morphological adaptations of the ileum in Cephalotini tribe provide high supply of oxygen and metabolites that also explain the strong presence of microorganisms in this region. Besides it, the absorptive and digestive capacity of this epithelium indicates that it could be a very specialized region adapted to maintain microorganisms. These relationships probably establish a true symbiosis, that optimizes the absorption of the alimentary sources explored by these ants.

INTRODUÇÃO

Morfologia geral do trato digestivo

No trato digestivo dos insetos há três regiões principais com esfíncteres (válvulas) controlando o movimento do alimento entre estas regiões. Tais regiões são o intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e o intestino posterior (proctodeu) (GULLAM; CRANSTON, 2000).

O intestino anterior e posterior, de origem ectodérmica, são revestidos por uma fina camada cuticular denominada íntima, entretanto o intestino médio é de origem endodérmica, não sendo revestido pela camada cuticular vista nas demais regiões. Ao invés disso, existe a matriz peritrófica que o reveste e o protege contra injúrias (mecânicas ou químicas) que possam vir a ocorrer pela passagem do bolo alimentar nesta região do trato digestivo (CHAPMAN, 1975).

O intestino anterior dos insetos adultos é, em geral, composto das seguintes partes: cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo; o intestino médio é composto pelo ventrículo e cecos gástricos e o intestino posterior pelo intestino fino (ou íleo) e o reto (SNODGRASS, 1935 apud CAETANO 1984; CHAPMAN, 1975).

As variações no tamanho do trato digestivo estão correlacionadas com a dieta do inseto, assim sendo, os insetos que têm alimentação rica em proteínas têm um trato digestivo curto, por outro lado os que têm dieta rica em carboidratos apresentam trato digestivo mais longo, embora possam ocorrer exceções (CHAPMAN, 1975).

Os estudos realizados com formigas mostram que, de um modo geral, o trato digestivo apresenta-se muito semelhante ao das abelhas, com faringe revestida com delicados espinhos voltados para traz, com função de sugar o alimento líquido em alguns casos, e em outros de apenas ajudar na deglutição e comunicar a cavidade bucal com o esôfago. No final do seu trajeto, o esôfago abre-se em um saco periforme, o papo, com paredes finas nas quais, como no esôfago, encontra-se uma camada de musculatura circular e longitudinal externamente ao epitélio. Não existem glândulas no papo e a camada cuticular impede qualquer absorção de alimento nessa região deixando-lhe a função exclusiva de armazenar alimento. O proventrículo é a parte do intestino anterior que maior grau de diversificação apresenta de uma para outra espécie e segundo Emeri (1888, apud CAETANO, 1984) é possível delimitar subfamílias, e quem sabe até gêneros, através das características do proventrículo. Esta porção do trato digestivo em muitos casos apresenta nitidamente três regiões: o bulbo que fica dentro do papo; o pescoço ligando este ao ventrículo, formado por um tubo delgado que em alguns casos se dilata abruptamente e finalmente, a válvula estomodeal ou cardíaca que se situa no lúmen da extremidade anterior do ventrículo (CAETANO, 1984).

Segundo Wheeler (1926, apud CAETANO, 1984), o proventrículo detém grande importância social ao permitir o represamento de alimento líquido no papo, este, com finalidade de transporte e alimentação de outros indivíduos da colônia.

O bulbo do proventrículo pode ser dividido em lobos, que se fecham pela pressão do líquido contido no papo (processo passivo) ou por ação da musculatura circular aí presente (processo ativo). O lúmen do bulbo apresenta-se em forma de cruz de malta, esclerotizado, e que pode ser obliterado pela contração dos músculos circulares presentes no pescoço do proventrículo (EISNER, 1957). Assim, acredita-se que o desempenho adequado da função social do papo está relacionado com a eficiência do bulbo do proventrículo (EISNER, 1957; WIGGLESWORTH, 1972 e CAETANO, 1984 e 1988). Caetano et al (1998), acredita que o principal responsável pelo mecanismo de trofalaxia nas formigas seja o esôfago, o qual apresenta forte musculatura oblíqua externa.

Nas formigas estudadas até o presente momento, o bulbo do proventrículo mostra-se constituído por quatro lábios móveis, fato este que parece indicar que o aspecto quadripartido é constante para a família Formicidae (TOMOTAKE, 1996). Entretanto

Eisner (1957) observou a presença de seis lábios móveis em *Amblyopone australis*, único dentre os Formicidae.

Os representantes das subfamílias Dolichoderinae, Pseudomyrmicinae e Formicinae apresentam o bulbo do proventrículo altamente elaborado, com a cúpula do bulbo bastante espessa e com projeções cuticulares com forma de espinhos cuja função provável seria a de barrar a passagem de partículas sólidas para o ventrículo (EISNER, 1957; CAETANO, 1984).

O pescoço do proventrículo nas formigas apresenta-se como um tubo delgado, que liga o proventrículo ao ventrículo, geralmente revestido por duas camadas de musculatura, uma longitudinal e outra circular (CAETANO, 1984 e 1988; TOMOTAKE, 1996). Entretanto Eisner (1957) observou várias camadas de músculos longitudinais em representantes de Formicinae.

A válvula cardíaca é a última porção do proventrículo e situa-se no interior do ventrículo. É formada por uma projeção do epitélio do intestino anterior, que dobra sobre si mesmo e tem como função impedir o retorno do alimento contido no ventrículo (EISNER, 1957; WIGGESWORTH, 1972; CAETANO, 1984, 1988 e 1989).

O ventrículo ou estômago apresenta-se como um saco relativamente pequeno, globular cuja parede é glandular e com capacidade de dilatação média (CAETANO, 1984). No ventrículo de algumas espécies da subfamília Dolichoderinae, existem simbioses, cuja função ainda é desconhecida (CAETANO et al, 2002).

Sheffield et al, (1989) e Muyzer et al, (1996) demonstraram que com a técnica DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Denaturante) pode-se determinar a variedade de microorganismos existente no interior do trato digestivo de invertebrados, sem que haja perda da flora intestinal decorrentes de técnicas que se utilizam meios de cultura.

As variações anatômicas do ventrículo parecem ser mais de ordem específica do que relacionada com a alimentação. Assim sendo, as formigas mais primitivas apresentam ventrículos longos e as mais derivadas os possuem arredondados (CAETANO, 1989 e TOMOTAKE, 1997).

Histologicamente o intestino médio é bastante uniforme e as variações que ocorrem são mais relacionadas ao tamanho das células digestivas, as quais podem apresentar-se fisiologicamente como sendo de dois tipos: aquelas com inúmeras microvilosidades longas, com corpos com laminação concêntrica e corpos mielínicos

geralmente múltiplos (absorção e excreção) e um segundo tipo com poucas e curtas microvilosidades, grânulos de secreção e corpos mielínicos simples (CAETANO; CRUZ LANDIM, 1983). Em Formica, (JEANTET, 1971, apud CAETANO; CRUZ LANDIM, 1983) descreve também dois tipos de células dentre as chamadas células digestivas.

As células digestivas são colunares, com núcleo na posição mediana e apresentam citoplasma vacuolizado. As células generativas são pequenas e distribuem-se aos grupos na base das células digestivas sobre a membrana basal. Externamente à membrana basal são encontradas fibras musculares circulares e/ou longitudinais (CAETANO, 1984 e 1988).

Segue-se ao ventrículo, o íleo que apresenta aspecto muito semelhante ao proventrículo quando em corte transversal, e que depende da ação de músculos para se contrair (CAETANO, 1984). Em *N. villosa* o íleo apresenta na sua porção inicial células sem microvilosidades. Essas células possuem invaginações da membrana basal bastante pronunciada e com poucas mitocôndrias. Um segundo tipo de célula surge logo após a primeira região e apresentam-se com muitas e longas microvilosidades. Essa região contém também inúmeras mitocôndrias alongadas. Estas células são mais altas do que aquelas da primeira região. Em ambos os tipos celulares observa-se interdigitações das membranas laterais, extremamente elaboradas, mostrando ser esta uma região com grande mobilidade, talvez por ação da forte musculatura circular aí presente. O primeiro tipo de célula parece estar relacionado com absorção de material da hemolinfa e o segundo tipo com a absorção de material do lúmen (CAETANO, 1989).

Quanto à histologia, Caetano (1988), descreve o intestino fino sendo composto por uma cutícula fina que recobre o epitélio formado por células cúbicas. Este epitélio assenta-se sobre a membrana basal bastante delgada, e abaixo desta encontra-se a musculatura circular e longitudinal mais externa. Em *Dinoponera gigantea* e *Panaponera clavata* (CAETANO et al, 1986/87), descrevem que nesta região ocorrem espinhos cuticulares arranjados em fileiras longitudinais que desaparecem no ponto onde a musculatura circular regride de volume. Tais espinhos parecem ter a função de puxar e perfurar a membrana peritrófica.

Após o íleo segue-se o reto que se apresenta como uma estrutura saculiforme com uma camada fina de musculatura recobrimo-o. O reto abre-se no exterior por meio do

ânus que é dotado de um esfíncter muscular. Encontra-se ainda na parede do reto as papilas retais (WHEELER, 1926 apud CAETANO 1984 e 1988). Estas papilas são responsáveis pela absorção de água, íons de sais e aminoácidos (WIGGLESWORTH, 1972).

O número de papilas retais é constante dentro da subfamília, exceto Pheidole (Myrmicinae) que têm número igual ao das formigas de correição (Ecitoninae e Dorylinae). Podemos encontrar, também, formas aberrantes como no caso dos machos de *Atta sexdens rubropilosa*, os quais apresentam duas papilas longas e duas redondas, estas resultantes da divisão incompleta de uma longa (CAETANO et al, 2002).

A Tribo Cephalotini

A tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae) contém cerca de 110 espécies divididas em quatro gêneros (*Zacryptocerus*, *Cephalotes*, *Procryptocerus* e *Cryptocerus*), compreendendo formigas arbóreas detentoras de peculiaridades biológicas complexas de grande importância na fauna neotropical, que frequentemente tem causado especulações aos mirmecologistas à respeito de sua anatomia única que é associada hábitos alimentares incomuns (HOLLDOBLER; WILSON, 1990).

Observações de quatro espécies (*Zacryptocerus texanus*, *Z. rohweri*, *Cephalotes atratus* e *Z. maculatus*) mostram que suas dietas podem incluir fezes úmidas de pássaros, líquidos extraídos de homópteros, carniça, e mais notadamente, pólen (WEBER, 1957; CREIGHTON, 1963 e 1967, ADAMS, 1990 apud WHEELER; ROCHE, 1997). Pólen é uma alimentação incomum nas formigas, mas em espécies pertencentes a Tribo Cephalotini que apresentam comportamento trofaláxico intenso, este tipo de alimento é frequentemente utilizado (WHEELER; ROCHE, 1997).

No final do século XIX, Emery relatava notáveis plasticidades estruturais observadas em proventrículos de diferentes espécies de formigas. Descrições sobre o proventrículo de formigas da tribo Cephalotini feitas por Caetano (1988), mostram uma estrutura altamente complexa, cuja função parece ser a de separar o alimento líquido do sólido a fim de permitir a passagem daquele para o ventrículo.

Em *Zacryptocerus rohweri*, Wheeler e Roche (1997) descrevem que o proventrículo possui o formato de um cogumelo, sendo uma estrutura rígida, fortemente

esclerotizada e recoberta com densas placas de espinhos. Em um corte transversal da parede anterior do proventrículo de *C. atratus*, a referida autora também descreve a qualidade arborescente da superfície espinhosa e demonstra que partículas $> 12.5 \mu\text{m}$ não passam para o ventrículo onde ocorre a digestão. Tais descrições são idênticas a aquelas feitas por Caetano (1984), para as espécies *Cephalotes atratus* e *Zacryptocerus clypeatus*.

Caetano (1984), remete à frágil musculatura do bulbo do proventrículo de *Cephalotes atratus* e *Zacryptocerus pusillus* a uma função filtradora, e não a de um separador de alimentos como visto em abelhas, cuja a musculatura apresenta-se bem desenvolvida.

O referido autor descreve para o pescoço do proventrículo de *Z. pusillus*, musculatura bem desenvolvida e com a presença de inúmeras projeções cuticulares arborescentes grandes, que podem completar a ação do bulbo, além da possibilidade desta região funcionar como um esfíncter.

Análises sobre as características anatômicas da válvula cardíaca de *C. atratus* e *Z. pusillus* realizadas por Caetano (1984), demonstra ser esta, uma estrutura de tamanho diminuto que projeta-se para o interior do ventrículo.

Geralmente, cada uma das regiões do trato digestivo das formigas apresenta uma porção globosa: no intestino anterior é o papo, no intestino médio é o próprio ventrículo e no intestino posterior é o reto (CAETANO; LAGE FILHO, 1982).

Entretanto nas formigas da tribo Cephalotini há uma quarta porção globosa, o íleo, que apresenta-se dilatado para abrigar microorganismos como bactérias e fungo filamentosos não septado (CAETANO, 1989).

Caetano (1989), descreve o íleo de *C. atratus* como sendo uma estrutura portadora de profundas dobras na íntima em direção ao lúmen. Esta característica, frente à grossas camadas de musculatura circular e longitudinal, somadas a grande quantidade de traqueólas infiltradas nos tecidos, sugere o aumento da superfície de absorção e fixação de bactérias.

Nas formigas desta tribo, há fortes indícios de que a ação da forte musculatura circular sirva também para aumentar o contato dos microorganismos com o material contido no lúmen. As demais porções do trato digestivo são tubulares: faringe, esôfago, proventrículo, íleo e ligação reto-ânus (CAETANO et al 2002).

A função destas bactérias e fungo é desconhecida, mas Caetano & Cruz Landim (1982) sugerem que estes exerçam alguma forma de mutualismo alimentar com suas formigas hospedeiras.

A maneira pela qual estes microorganismos se alojam no trato digestivo destas formigas parece estar relacionada com uma forma de trofalaxia abdominal de ocorrência entre operárias adultas e as recém emergidas, no qual a extrusão de uma gota de líquido retal pela operária é consumido pelo indivíduo recém emergido. Este comportamento é comum em cupins, nos quais, os indivíduos jovens adquirem bactérias e protozoários necessários para a digestão de celulose (CLEVERLAND, 1926 apud WHEELER; ROCHE, 1997).

O fenômeno, observado em *Zacryptocerus varians*, é iniciado após a emergência das novas operárias (WILSON,1976; COLE,1980 apud WILSON,1990). O característico comportamento trofaláxico existente entre indivíduos recém emergidos e operárias dessa tribo, chamou a atenção devido a constatação do desenvolvimento de coloração após a realização desta trofalaxia. Assim sendo as jovens operárias, que num primeiro momento apresentavam-se desprovidas de coloração, iniciam um processo de aquisição da mesma, após a realização da trofalaxia abdominal (WHEELER, 1984; BANDÃO et al 1987). Estes últimos autores verificaram que os indivíduos recém nascidos apresentam o íleo dilatado porém sem a característica mancha escura presente nos adultos (CAETANO, 1984), o que quer dizer que estavam livres de microorganismos.

No ventrículo de Cephalotini também foram descritos microorganismos na porção mediana e posterior (CAETANO, 1988).

Nesta porção do trato digestivo os microorganismos estão distribuídos num gradiente crescente da região proximal para a distal. Poucos microorganismos estão localizados livremente no lúmen, enquanto que a maioria estão localizadas entre as microvilosidades de células digestivas. Em muitos casos há uma pequena depressão no ápice de células digestivas, nas quais encontram-se alojados microorganismos (CAETANO, 1988).

Em Cephalotini, o epitélio do ventrículo é recoberto pela matriz peritrófica que consiste de fibras de quitina, proteínas e carboidratos que são produzidas na região anterior do ventrículo. Esta matriz peritrófica possui poros que permite a passagem de

pequenas partículas alimentares e bactérias que vão de encontro às células desta porção do intestino (GULLAM; CRANSTON, 2000).

A ausência de informações sobre os aspectos mais refinados do trato digestivo de formigas desta tribo levou-nos a várias perguntas, as quais esperamos conseguir responder com este projeto.

Deste modo realizamos estudo comparado do ventrículo e do íleo de três espécies pertencentes a dois gêneros de formigas da tribo *Cephalotini*: *Cephalotes atratus*, *C. pusillus* e *Zacryptocerus clypeatus*. Também foi realizado estudo do ventrículo de *Dolichoderus bispinosus*. Paralelamente estudos da ultramorfolgia do proventrículo serão realizados com intuito de buscar relações entre as três espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANDÃO, C.R.F.; CAETANO, F. H.; ALMEIDA, S.A.B.** *Intestinal symbionts microorganisms, and abdominal trophallaxis in the neotropical myrmicinae tribe Cephalotini* (Hymenoptera: Formicidae). In: Eder, J.; Rembold, H. (Ed.). *Chemistry and Biology of social Insects*. Munich: Verlag J. Peperny , 1987, p. 631.
- CAETANO, F.H.** *Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae* (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool,(São Paulo),v.35, n.23, p.257-305, 1984.
- CAETANO, F.H. et al.** *The Role of Ants Esophagus in the Trophallaxis* (Formicidae), In: *Recent advances in Ecobiological Research, Indian*. v.2, p. 397-403, 1998.
- CAETANO, F.H. et al.** *The digestive tract of the Dinoponera gigantea and Paraponera clavata under anatomical and histological point of view* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, v. 11/12, p. 125-134, 1986/87.
- CAETANO, F.H.** *Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo),v. 13, p. 129-174, 1988.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.H.** *Formigas: biologia e anatomia*. Araras: Topázio, 2002.131p.
- CAETANO, F.H.** *Endosymbiosis of ants with intestinal and salivary gland bacteria*. In: Schwemmler, W. (Ed.) *Insect Endocytobiosis: Morfology, Physiology, Genetics, and Evolution*. CRC Press, Florida, p. 57- 76, 1989.
- CAETANO, F.H.; CRUZ-LANDIM, C.** *Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.8, p. 91-100, 1983.
- CAETANO, F.H.; LAGE FILHO, A.L.** *Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, v.7, p. 125-134, 1982.
- CHAPMAN, R.F.** *The Insects: struture and function*. New York: American Elsevier, 1975. 819p.

- EISNER, T.A.** *A comparative morphological study of the proventriculus of ants* (Hymenoptera: Formicidae). Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ., Cambridge, v. 116, p.441- 490, 1957.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S.** *The Insect. An outline of entomology*. Carlton: Blackwell Science, 2000. 470p.
- HOLLDOBLER, B.; WILSON, E.O.** *The Ants*. London: Springer, p.436- 467, 2000.
- MUYZER, G; HOTTENTRAGER, S.; TESK, A.; WAWER, C.** *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities*. In: Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, p 1-23, 1996.
- ROCHE, R.K.; WHEELER, D.E.; WHEELER, D.E.;** *Morfological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohweri* (Hymenoptera, Formicidae)*. Journal of morphology, Tucson, v.234, p. 253-262, 1997.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MEYERS, R.M.** *Attachment of a 40- base pair G + C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reactions results in improved detection of single-base changes*. Procedures of National Academy of Sciences USA, p. 232-236, 1989.
- TOMOTAKE, M.E.M.** *Morphology of the digestive tract of *Acanthosthicus serrelatus* and *Cylindromyrmex brasiliensis* (Hymenoptera: Formicidae)*. Naturalia, São Paulo, v.22, p.9-15, 1997.
- TOMOTAKE, M.E.M.** *Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília ponerinae (Hymenoptera: Formicidae)*. 1996. 129f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996
- WHEELER, D.E.** *Behavior of ant, *Procryptocerus scabriusculus* (Hymenoptera, Formicidae), with comparisons to other cephalotines*. Psyche, Cambridge, v. 91, p.171-192, 1984.
- WIGGLESWORTH, V.B.** *The Principles of Insect Physiology*. 7th.ed. London: Chapman and Hall, 1972. 827p.

Estudo Comparativo da Histologia, Histoquímica e Ultramorfologia do Proventrículo da tribo Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae).

RESUMO:

A utilização da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura propiciou o exame comparativo da natureza histológica, histoquímica e ultramorfológica do bulbo proventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. Este peculiar órgão do trato digestivo possui projeções cuticulares arborescentes, sendo estas, altamente esclerotizadas e atuam na seleção de alimentos. Sobre a projeção cuticular, foi descoberta uma camada de material amorfo com características de muco. Essa camada parece otimizar a eficiência do proventrículo tanto na seleção de alimentos, quanto nas funções sociais perante a colônia (trofalaxia). Assim sendo, características mais refinadas desta estrutura são descritas neste estudo.

ABSTRACT:

The use of the optic microscopy and scanning electron microscopy, propitiated the comparative exam of the nature histology, histochemistry and ultra morphologic of the proventriculus bulb of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* and *C. pusillus*. This portion of the digestive tract possesses cuticles projections, being these, highly esclerotized and their act in the selection of victuals. Over the cuticle projections exist a layer of amorphous material with mucous characteristics. That layer, seems to optimize the efficiency of the so much proventriculus in the selection of feed, as in the social functions before the colony (trophallaxis). Like this, more details of the characteristics this structure is described in this study.

INTRODUÇÃO

A tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae) contém cerca de 185 espécies divididas em quatro gêneros (*Zacryptocerus*, *Cephalotes*, *Procryptocerus* e *Cryptocerus*). São formigas arbóreas com peculiaridades biológicas de grande importância na fauna neotropical, tendo causado especulações entre os mirmecologistas a respeito de sua anatomia única, que está associada a hábitos alimentares incomuns (HOLLDOBLER; WILSON, 1990).

Os hábitos alimentares das espécies *Zacryptocerus texanus*, *Z. rohweri*, *Z. maculatus* e *Cephalotes atratus*, mostram que suas dietas podem incluir fezes úmidas de pássaros, líquidos extraídos de homópteros, carniça, e mais notadamente, pólen (WEBER, 1957; CREIGHTON, 1963 e 1967, ADAMS, 1990, ROCHE; WHEELER, 1997). Pólen é uma alimentação incomum entre as formigas, mas as espécies pertencentes à Tribo Cephalotini, este tipo de alimento é freqüentemente utilizado (ROCHE; WHEELER, 1997).

Himenópteros adultos são distintos em seus hábitos alimentares, subsistindo em sua maioria de alimentos líquidos (EISNER, 1957). Quando as operárias da tribo cephalotini forrageiam para suprir as demandas nutricionais da colônia, parte dos nutrientes líquidos obtidos não passa diretamente para o ventrículo. Ao invés disso, primeiro é retido temporariamente no papo; de tempos em tempos, o proventrículo permite a passagem de pequenas quantidades de nutrientes. Estes fluem do papo para o ventrículo, conferindo ao proventrículo a importante função no controle do fluxo de alimento no trato digestivo (EISNER 1957, CAETANO, 1988).

De acordo com Caetano (1988), este órgão é a porção do intestino anterior que apresenta maior grau de diversificação dentre os Formicidae. Na maioria dos casos mostra nitidamente três regiões: o bulbo que fica dentro do papo; o pescoço ligando este ao ventrículo, formado por um tubo delgado e finalmente, a válvula estomodeal que se situa no lúmen da porção anterior do ventrículo.

O bulbo do proventrículo, quando presente, é dividido em lábios, que se fecham pela pressão do líquido contido no papo (processo passivo), ou pela ação da musculatura circular aí presente (processo ativo) (EISNER, 1957). Na maioria das espécies de formigas, a junção dos lábios móveis formando o bulbo, apresentam forma de cruz-de-malta. Estes bulbos são esclerotizados, e podem apresentar projeções cuticulares filiformes a guisa de filtro. A contração dos músculos circulares presentes no pescoço do proventrículo fecha a passagem para o ventrículo (EISNER, 1957). Assim, acredita-se que o desempenho adequado da função social do papo está relacionado com a eficiência do bulbo do proventrículo (EISNER, 1957; WIGGLESWORTH, 1972 e CAETANO, 1984 e 1988).

Nas formigas estudadas até o momento, o bulbo do proventrículo mostra-se constituído por quatro lábios móveis, fato este que parece indicar que o aspecto quadripartido é constante para a família Formicidae (TOMOTAKE, 1996). Entretanto EISNER (1957) observou a presença de seis lábios móveis em *Amblyopone australis*, o único dentre os Formicidae. Caetano e Overall (1984), mostraram a ocorrência de cinco lábios móveis em machos de *Vespa Myschocyttarus atramentarius*.

Os representantes das subfamílias Dolichoderinae, Pseudomyrmicinae e Formicinae apresentam o bulbo do proventrículo altamente elaborado, com a cúpula do bulbo bastante

espessa e com projeções cuticulares com formas de espinhos. A função provável destas projeções cuticulares seria a de barrar a passagem de partículas sólidas para o ventrículo (EISNER, 1957; CAETANO, 1984).

O pescoço do proventrículo nas formigas apresenta-se como um tubo delgado, que liga o proventrículo ao ventrículo, geralmente revestido por duas camadas de musculatura, uma longitudinal e outra circular (CAETANO, 1984 e 1988; TOMOTAKE, 1996). Eisner (1957) mostrou a presença de três tipos de musculatura em formigas da subfamília Formicinae. Caetano (1992) mostrou que *Neoponera villosa* da subfamília Ponerinae possui três musculaturas longitudinais e duas circulares. A válvula estomodeal é a última porção do proventrículo e situa-se no interior do ventrículo. Ela é constituída por uma projeção do epitélio do estomodeu, que se dobra sobre si mesmo e tem como função impedir o retorno de alimento contido no ventrículo (EISNER, 1957; WIGGLESWORTH, 1972; CAETANO, 1984, 1988 e 1989).

Notáveis plasticidades estruturais observadas em proventrículos de diferentes gêneros de formigas foram descritas por diversos pesquisadores. Caetano (1984) descreve o complexo proventrículo de formigas da Tribo Cephalotini como sendo uma estrutura que apresenta o formato de um cogumelo. Esta é uma estrutura rígida, fortemente esclerotizada e recoberta por densas camadas de espinhos. Tais descrições também foram confirmadas por Roche e Wheeler (1997), com estudos de ultramorfologia.

A estrutura e forma desta porção do trato digestivo demonstram distinta adaptação para a natureza fluida de suas dietas. A atividade proventricular consiste de contrações e distensões rítmicas da musculatura, que torna este órgão um exímio regulador do trato digestivo, além de funcionar como uma tenaz bomba de sucção (EISNER, 1957).

Apesar da constância da organização do trato digestivo, o proventrículo é o exemplo de uma estrutura que varia de maneira exacerbada dentre os Formicidae. Darwin, em sua teoria sobre a origem das espécies, descreve que ao longo da evolução, estruturas que não atuam como fator decisivo na seleção natural, poderiam variar bastante quanto a sua morfologia. Eisner (1957), acredita que a análise morfológica do proventrículo seja um fator que pode auxiliar na determinação de subfamílias e até gêneros dentre as formigas, assim sendo, tem grande importância para estudos de filogenia.

A utilização da microscopia óptica com a aplicação conjunta de técnicas histológicas e histoquímicas, acrescidas daquelas de Microscopia Eletrônica de Varredura, propiciou a análise do panorama geral do proventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. Assim sendo, pretende-se contribuir para o melhor entendimento desta complexa estrutura, a qual detém papel importante no comportamento social dos Formicidae.

O presente trabalho apresenta um estudo comparado do proventrículo destas três espécies pertencentes à tribo Cephalotini, sob o ponto de vista histoquímico e ultramorfológico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foram utilizadas operárias de três espécies de formigas da tribo Cephalotini, (subfamília Myrmicinae): *Cephalotes atratus* (LINNAEUS, 1758), *Cephalotes clypeatus* (FABRICIUS, 1804) e *Cephalotes pusillus* (KLUG, 1824). Os espécimes foram coletados nos municípios de Rio Claro e Brotas, região central do Estado de São Paulo. O proventrículo foi obtido por meio da dissecação em solução fisiológica para insetos (NaCl, 0,9%), sob estereomicroscópio. Após este procedimento, os proventrículos foram então fixados de acordo com o protocolo dos laboratórios de Histologia e Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico UNESP/ Rio Claro, sendo posteriormente preparados para respectivas análises histológicas e morfológicas deste peculiar órgão.

Microscopia Óptica: Histologia e Histoquímica:

Para análise da histologia e detecção dos compostos químicos, o material dissecado foi fixado em paraformaldeído 4% durante duas horas, sendo então tamponados em fosfato de sódio pH 7,4 por vinte e quatro horas. Após este período, o material foi submetido a uma seqüência de desidratação progressiva de álcoois (70 a 95%) por trinta minutos. Posteriormente o material permaneceu em resina de embebição por vinte e quatro horas na geladeira para ser então incluso em resina de polimerização ou inclusão.

Obtiveram-se cortes de sete micrômetros de espessura, sendo estes, montados em lâminas e coradas com H.E., P.A.S (carboidratos), Azul de Toluidina (compostos ácidos do

citoplasma), Picrossírius red (detecção de colágeno), Azul de Bromofenol e Xilidine Ponceau (para proteínas). Os cortes assim preparados foram examinados e fotografados com o auxílio do microscópio óptico, tendo a ele acoplado um capturador de imagens.

Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E. V):

Os proventrículos foram removidos e fixados em glutaraldeído 4% durante 24h, desidratado em uma série crescente de álcool (70 a 100%), dois banhos de acetona 100% e desidratado no ponto crítico (Balzers CPD 030). Após desidratação, o material foi vaporizado com ouro no sputtering Balzers SD 050. Os proventrículos foram examinados no S.E.M. Jeol P 15.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na descrição dos resultados do presente trabalho, a histologia e a histoquímica do proventrículo são apresentadas separadamente da morfologia.

Embora os proventrículos destas três espécies sejam muito semelhantes ao estereomicroscópio, para o estudo da morfologia do proventrículo, utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura que resultou em diferenças sutis entre as três espécies. A imagen do bulbo do proventrículo mostra uma estrutura de aparência delicada, semelhante a um cogumelo (Fig.1-B). Tal característica concorda com o descrito por Caetano (1984). Entretanto a homogeneidade da superfície do bulbo desaparece quando o material amorfo que recobre esta estrutura não é preservado ou é removido. A ausência deste material revela uma superfície repleta de estriações e projeções com formato de espinhos (Fig. 1-C a F).

As projeções cuticulares são estruturas ocas, e são vistas atravessando a camada de material amorfo que as recobre (figura1-F), fornecendo assim, uma excelente base de sustentação para esta camada. Caetano (1984 e 1988), descreve a provável função destes espinhos como sendo a de impedir a passagem de alimentos sólidos para o ventrículo. O

material amorfo visto recobrando o bulbo do proventrículo, parece atuar otimizando a capacidade de filtração atribuída às projeções cuticulares. Tal função parece ser a de constituir uma barreira que fica entre o alimento contido no lúmen e as projeções cuticulares. O alimento após ultrapassar a camada amorfa e as projeções cuticulares, flui para uma das diversas estriações que são vistas por toda a superfície do bulbo (Fig. 1-E), para então ser conduzido ao lúmen do proventrículo e posteriormente ao ventrículo.

O teste H.E. permitiu a visualização histológica do proventrículo, que apresenta o bulbo do com cutícula de coloração laranja, e é sulcado em toda a superfície. Nestes sulcos, a cutícula apresenta espinhos com aspecto arborescente (Fig. 2-A). Segundo Caetano (1984), as células epiteliais do bulbo apresentam ligeira basofilia, e o mesmo ocorre com as células epiteliais do pescoço do proventrículo. O referido autor descreve que revestindo o lúmen do pescoço do proventrículo há uma cutícula bem desenvolvida, facilmente vista em cortes transversais.

Fibras musculares são vistas aderidas ao epitélio do bulbo do proventrículo, tal musculatura deve estar relacionada à mobilidade da estrutura (Fig. 2-A).

Na detecção de compostos protéicos, as técnicas do Azul de Bromofenol (Pearse, 1996) e Xilidine Ponceau (Mello & Vidal, 1980) resultaram nas colorações azul e vermelho-alaranjado respectivamente (Fig. 2 B,C). Ambas as reações para a detecção de proteínas, evidenciam forte positividade tanto para o tecido epitelial, quanto para o material amorfo que recobre o bulbo do proventrículo.

Os testes para polissacarídeos com a aplicação das técnicas de P.A.S. (Junqueira, 1983) e Azul de Toluidina ácido (Junqueira, 1983) mostraram reações positivas para polissacarídeos e glicoconjugados. Esta técnica baseia-se na capacidade do ácido periódico oxidar as ligações carbono-carbono das seqüências 1-2 glicol dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos. Estes, então são revelados pelo reagente Schiff. A reação P.A.S. evidenciou grânulos positivos no citoplasma das células epiteliais e no espaço subcuticular, demonstrando a presença dos referidos compostos nesta região (Fig. 2-D).

A aplicação do Azul de toluidina ácido, que é um corante básico e apresenta a propriedade de formar e ligações eletrostáticas com radicais ácidos presentes no tecido, evidenciou a presença de polissacarídeos ácidos. Reações de forte positividade para PAS e Azul de

Toluidina ácido foram vistas no material amorfo que recobre o bulbo, assim como no citoplasma do epitélio deste órgão (Fig. 2-E).

A técnica Picrossírius red, detectou a presença de colágeno e de fibras reticulares, delineando toda a região basal das projeções cuticulares do bulbo e pescoço do proventrículo (Fig. 2-F).

O epitélio do bulbo e a musculatura do pescoço do proventrículo reagiram com intensidade mediana a esta técnica, portanto pouco colágeno deve estar associado ao órgão.

O proventrículo demonstra ser algo mais que a simples ligação do papo para o ventrículo. Ele é a estrutura responsável pelo represamento do alimento líquido, que deverá permanecer no estômago social ou papo, o qual tem as funções de transportar controlar a alimentação dos demais membros da colônia, assim sendo, o proventrículo tem função social muito importante (Eisner, 1957 e Wigglesworth, 1974). Outro aspecto atribuído ao proventrículo, diz respeito a ponto de vista filogenético. Segundo Eisner (1957), a presença de um bulbo do proventrículo elaborado, serve como característica adaptativa, ao demonstrar ser uma estrutura refinada que é especializada para o processo de seleção de nutrientes.

A eficiência deste filtro parece ser otimizada pela presença uma cobertura de material amorfo, que reveste toda a superfície do bulbo do proventrículo. A análise histoquímica desta estrutura demonstrou, ser ela composta de polissacarídeos e proteínas, que são constituintes fundamentais de muco.

Devido a suas características químicas e localização, a função provável desta camada que recobre o bulbo, deve ser a de auxiliar o proventrículo na filtração do alimento líquido que se dirige ao ventrículo.

O pescoço do proventrículo apresenta projeções de seu revestimento cuticular que podem completar a ação do bulbo. Além disso, a musculatura mais desenvolvida do que nas demais regiões do estomodeu, podem significar a ação de esfíncter para esta região (Caetano, 1984).

Toda esta região do trato digestivo apresenta-se intensamente esclerotizada. Segundo Chapman (1975), quanto mais esclerotizada for à quitina, mais difícil é a coloração desta, razão pela qual, que a cutícula apresentou sua coloração natural amarela ou castanha.

Não se detectou diferenças entre as três espécies estudadas quanto à natureza histoquímica, porém a ultramorfologia permitiu diferenciar o bulbo das três espécies.

Figura 1

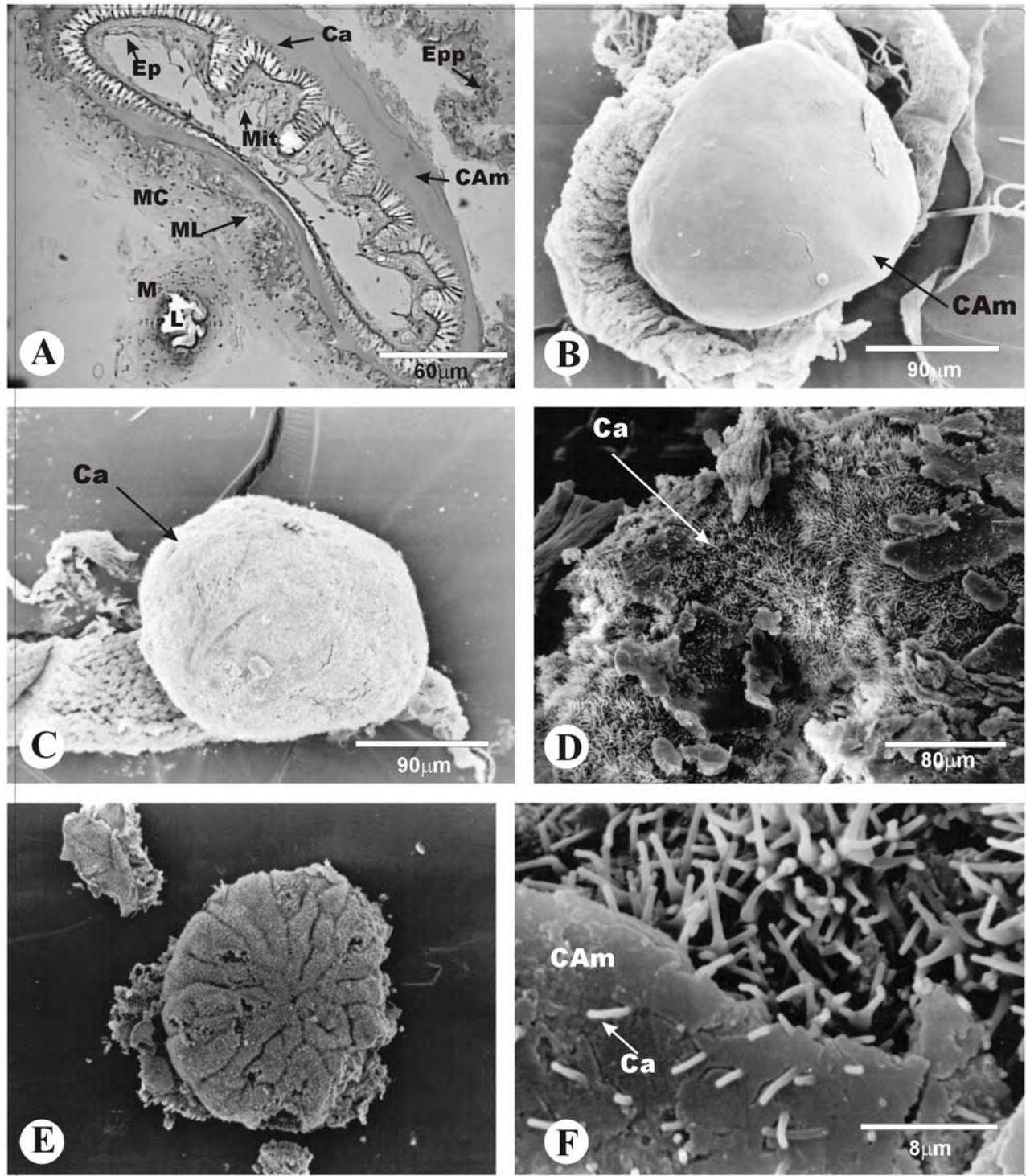


Figura 1. (A) Corte longitudinal do proventrículo de *C. atratus* (cutícula arborescente - **ca**; camada de material amorfo que recobre o bulbo - **Cam**; epitélio do bulbo - **Ep**; epitélio do papo - **Epp**; lúmen - **L** e musculatura - **M** do pescoço, musculatura circular - **MC**; longitudinal - **ML** e interna - **Mit** do bulbo do proventrículo. (B) Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície anterior do proventrículo de *C. pusillus*; note que o aspecto liso do bulbo do proventrículo deve-se a presença de uma camada de material amorfo - **Cam**, que recobre toda esta estrutura. (C,D) MEV da superfície anterior do proventrículo de *C. pusillus*; nessas imagens, a camada que o recobre foi parcialmente removida, evidenciando a superfície coberta por projeções cuticulares arborescentes - **ca**. (E) MEV da superfície anterior do proventrículo de *C. clypeatus*; mostrando estriações que conduzem ao pescoço do proventrículo. (F) MEV de projeções cuticulares atravessando a camada que o recobre; a cutícula parece fornecer sustentação a esta camada.

Figura 2

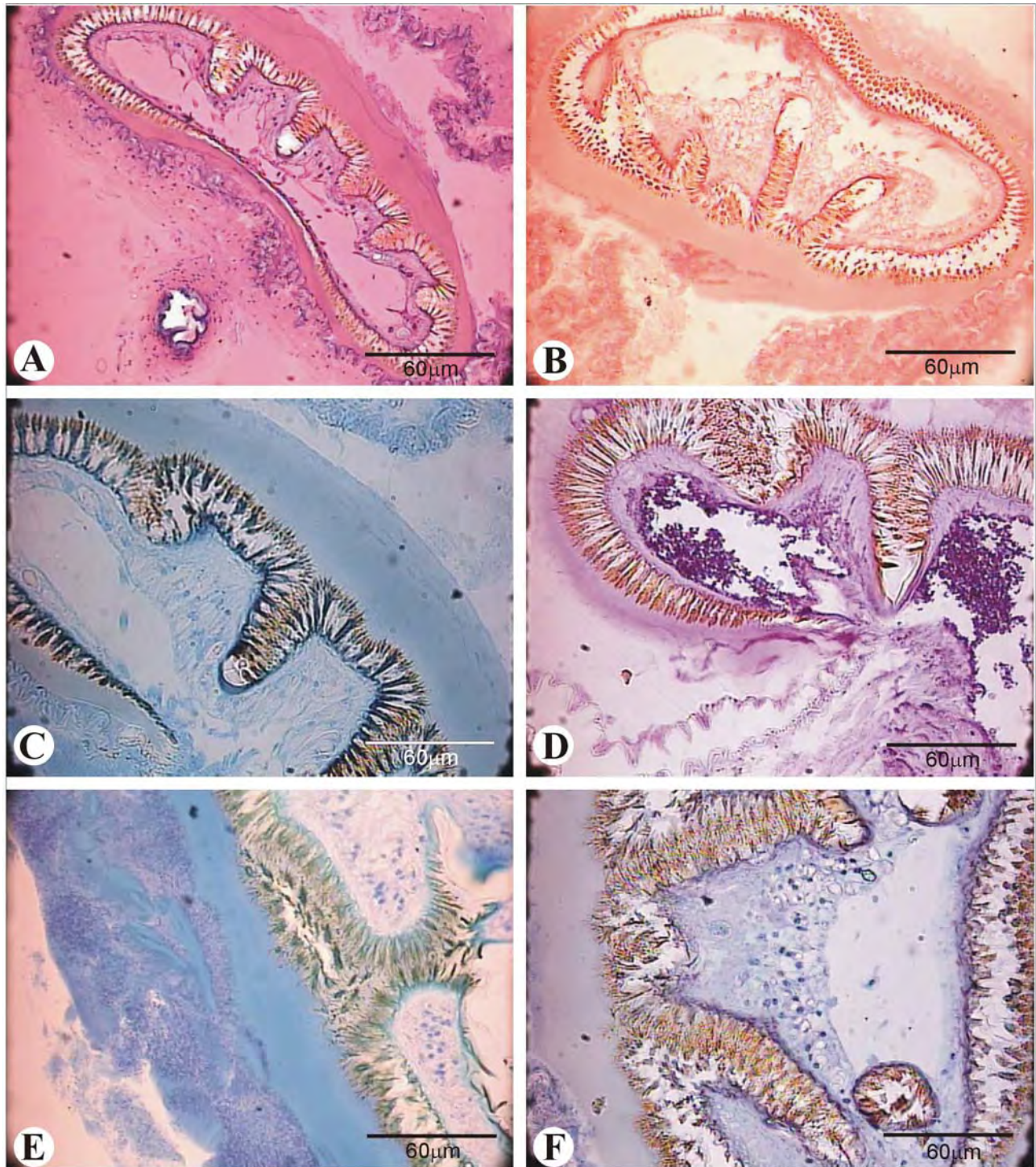


Figura 2. Cortes longitudinais do proventrículo de *C. atratus*, mostrando diversas reações para as técnicas utilizadas. **(A)** H.E; **(B)** Xilidine Ponceau; **(C)** Azul de Bromofenol; **(D)** PAS; **(E)** Azul de Toluidina ácido; **(F)** Picrossírius red.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANDÃO, C.R.F.; CAETANO, F. H.; ALMEIDA, S.A.B.** *Intestinal symbionts microorganisms, and abdominal trophallaxis in the neotropical myrmicinae tribe Cephalotini* (Hymenoptera: Formicidae). In: Eder, J.; Rembold, H. (Ed.). *Chemistry and Biology of social Insects*. Munich: Verlag J. Peperny , 1987, p. 631.
- CAETANO, F.H.** *Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae* (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool,(São Paulo),v.35, n.23, p.257-305, 1984.
- CAETANO, F.H. et al.** *The Role of Ants Esophagus in the Trophallaxis* (Formicidae), In: *Recent advances in Ecobiological Research, Indian*. v.2, p. 397-403, 1998.
- CAETANO, F.H. et al.** *The digestive tract of the Dinoponera gigantea and Paraponera clavata under anatomical and histological point of view* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, v. 11/12, p. 125-134, 1986/87.
- CAETANO, F.H.** *Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo),v. 13, p. 129-174, 1988.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.H.** *Formigas: biologia e anatomia*. Araras: Topázio, 2002.131p.
- CAETANO, F.H.** *Endosymbiosis of ants with intestinal and salivary gland bacteria*. In: Schwemmler, W. (Ed.) *Insect Endocytobiosis: Morfology, Physiology, Genetics, and Evolution*. CRC Press, Florida, p. 57- 76, 1989.
- CAETANO, F.H.; CRUZ-LANDIM, C.** *Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.8, p. 91-100, 1983.

- CAETANO, F.H.; LAGE FILHO, A.L.** *Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, v.7, p. 125-134, 1982.
- CHAPMAN, R.F.** *The Insects: structure and function*. New York: American Elsevier, 1975. 819p.
- EISNER, T.A.** *A comparative morphological study of the proventriculus of ants* (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ.*, Cambridge, v. 116, p.441- 490, 1957.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S.** *The Insect. An outline of entomology*. Carlton: Blackwell Science, 2000. 470p.
- HOLDOBLER, B.; WILSON, E.O.** *The Ants*. London: Springer, p.436- 467, 2000.
- MUYZER, G; HOTTENTRAGER, S.; TESK, A.; WAWER, C.** *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities*. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, p 1-23, 1996.
- ROCHE, R.K., WHEELER, D.E.;** | *Morfological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohweri** (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of morphology*, Tucson, v.234, p. 253-262, 1997.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MEYERS, R.M.** *Attachment of a 40- base pair G + C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reactions results in improved detection of single-base changes*. *Procedures of National Academy of Sciences USA*, p. 232-236, 1989.
- TOMOTAKE, M.E.M.** *Morphology of the digestive tract of *Acanthosthicus serrelatus* and *Cylindromyrmex brasiliensis** (Hymenoptera: Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.22, p.9-15, 1997.
- TOMOTAKE, M.E.M.** *Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília ponerinae* (Hymenoptera: Formicidae). 1996. 129f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996
- WHEELER, D.E.** *Behavior of ant, *Procryptocerus scabriusculus** (Hymenoptera, Formicidae), with comparisons to other cephalotines. *Psyche*, Cambridge, v. 91, p.171-192, 1984.

WIGGLESWORTH, V.B. *The Principles of Insect Physiology*. 7th.ed. London: Chapman and Hall, 1972. 827p.

**Histologia, histoquímica e ultramorfolgia do
ventrículo de três espécies de *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae).**

RESUMO:

Realizaram-se estudos de natureza histológica, histoquímica e ultramorfológica do ventrículo de três espécies de formigas do gênero *Cephalotes* (*atratus*, *clypeatus* e *pusillus*). Para a histologia usou-se H-E e para a histoquímica técnicas para detecção de carboidratos, proteínas em geral e fibras de colágeno e cálcio. As espécies são idênticas quanto aos caracteres estudados, exceto no tamanho e formato. As células digestivas apresentam secreção típica de formigas que é o tipo apócrino. A histoquímica mostrou que o cálcio presente nas células e no lúmen do ventrículo pode atuar na manutenção do pH, o colágeno presente na lâmina basal oferece suporte para o epitélio do ventrículo e o pH do lúmen do ventrículo é mais baixo próximo da região apical das células digestivas do que na região central do lúmen do ventrículo.

ABSTRACT

Studies of histological nature, histochemistry and ultra-morphology of the midgut of three species of ants belonging to the genus *Cephalotes* (*atratus*, *clypeatus* and *pusillus*) were performed. In histology H-E was employed, and in histochemistry techniques for detection of carbohydrates, proteins in general and collagen fibers and calcium were used. The species are identical in the characters under study, except in size (*C. atratus* have a bigger than *C. clypeatus* beside its body having similar size) and shape. The digestive cells exhibited a secretion that is typical of ants, the apocrine type. The histochemistry showed calcium is present in the cell and in the ventriculus lumen and may be act in the pH maintenance, the collagen is present only in the basal lamina given support to the ventriculus epithelium and pH of ventriculus lumen is lower close to the apical region of the digestive cells than in the central lumen.

INTRODUÇÃO

A tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae) contém cerca de 185 espécies, inicialmente divididas em quatro gêneros (*Zacryptocerus*, *Cephalotes*, *Procryptocerus* e *Cryptocerus*) Kempf (1951e1973). Atualmente são reconhecidos apenas dois gêneros, *Cephalotes* e *Procryptocerus* (ANDRADE & BARONI URBANI, 1999) sendo os gêneros *Cryptocerus* e *Zacryptocerus* sinonimizados a *Cephalotes*.

Os hábitos alimentares de espécies de *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*) *texanus*, *C.* (= *Z.*) *rohweri*, *C.* (= *Z.*) *maculatus* e *C.* *atratus* podem incluir fezes úmidas de pássaros, líquidos extraídos de homópteros, carniça, e mais notadamente, pólen (WEBER, 1957; CREIGHTON, 1967; ADAMS, 1990; BARONI-URBANI & ANDRADE, 1997 e ROCHE & WHEELER, 1997). A utilização de pólen é incomum entre as formigas, porém em Cephalotini, este é frequentemente utilizado (ROCHE & WHEELER, 1997).

A menos de 25 anos atrás, Caetano descreve que formigas da tribo Cephalotini são excepcionais em manter microorganismos em seu trato digestivo que são transmitidos através da trofalaxia abdominal realizada entre indivíduos adultos e recém emergidos. De acordo com Jaffé et al. (2001), foram identificados mais de 10 microorganismos no trato digestivo de *C. pusillus* com diferentes padrões de resistência a antibióticos. Os autores formulam a hipótese de que os microorganismos provêm nutrientes às formigas, sintetizando aminoácidos de carboidratos e nitratos.

O intestino médio é de origem endodérmica, não sendo, portanto, revestido por cutícula. Entretanto, existe a matriz peritrófica que reveste o intestino médio e o protege

contra injúrias (mecânicas ou químicas) que possam vir a ocorrer pela passagem do bolo alimentar (CHAPMAN, 1975; CAETANO, 1984 e 1988; ZARA & CAETANO, 1998, CAETANO et al, 2002). Além desta função, a matriz peritrófica compartimentaliza o intestino médio, permitindo a circulação eficiente de enzimas nos compartimentos endo e ectoperitróficos (TERRA, 2001; TERRA & FERREIRA, 1994 e TERRA et al, 1996).

A matriz peritrófica que se constitui de fibras de quitina, proteínas e carboidratos é produzida na região anterior do ventrículo. De acordo com a composição, esta pode ser classificada como gel ou matriz (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA, 2001). A matriz peritrófica possui poros que permitem a passagem de pequenas partículas alimentares e bactérias que vão de encontro às células desta porção do intestino (GULLAM & CRANSTON, 2000).

Para Caetano et al (1994) as vesículas de secreção produzidas no ventrículo de *Pachycondyla striata* atravessam a matriz peritrófica. Assim que atinge o espaço endoperitrófico tais vesículas começam a mostrar sinais de desintegração.

Caetano et al. (2002), mostrou que nas espécies mais primitivas, como as predadoras *Myrmecia regularis* e *Dinoponera gigantea* o ventrículo apresenta-se alongado. Por sua vez, nas formigas mais derivadas e com hábitos onívoros o formato é arredondado. Porém, em Cephalotini, como *Cephalotes atratus* e *C. clypeatus*, a estrutura do ventrículo é alongada, indicando ser uma característica intermediária entre as formigas mais primitivas e as mais derivadas (CAETANO, 198). Esta característica também é descrita por Caetano et al. (1990), para *Dolichoderus attelaboides* e Caetano et al., (2002) para *Dolichoderus (=Monacis) bispinosus*.

O ventrículo nas formigas é composto de uma única camada de epitélio que repousa sobre uma contínua lâmina basal (CAETANO, 1984, 1988; LEHANE & BILLINGSLEY, 1996). Histologicamente as células digestivas são colunares e podem se apresentar como sendo de dois tipos fisiológicos distintos: aquelas com inúmeras microvilosidades longas, com corpos com laminação concêntrica (esfereocristais) e corpos mielínicos geralmente múltiplos (absorção e excreção) e um segundo tipo com poucas e curtas microvilosidades, grânulos de secreção e corpos mielínicos simples (CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983). Um outro tipo celular encontrado junto às células digestivas são as células generativas.

Tais células são pequenas e distribuem-se aos grupos na base das células digestivas sobre a membrana basal (CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983; CAETANO, 1984, 1988; CAETANO et al, 2002). Externamente à membrana basal são encontradas fibras musculares circulares e longitudinais (SNODGRASS, 1935; CAETANO, 1984 e 1988).

Caetano (1990), mostra as bactérias presentes entre as microvilosidades das células digestivas.

O presente trabalho apresenta as características ultramorfológicas, histológicas e histoquímicas do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. (=Zacryptocerus) clypeatus* e *C. pusillus* quanto à presença e distribuição de proteínas básicas, carboidratos ácidos e neutros, RNAs e cálcio, tanto no epitélio quanto no alimento. A produção e composição química da matriz peritrófica também é apresentada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais: As operárias de *Cephalotes pusillus* e *C. clypeatus* foram coletadas em árvores localizadas no campus UNESP/ Rio Claro, enquanto que as operárias maiores de *C. atratus* foram coletadas em árvores localizadas às margens do Rio Jacaré-pepira, no município de Brotas, Estado de São Paulo/Brasil.

2.2 Ultramorfologia: Os ventrículos foram removidos e fixados em glutaraldeído 4% durante 24h, desidratado em uma série crescente de álcool (70 a 100%), dois banhos de acetona 100% e desidratado no ponto crítico (Balzers CPD 030). Após desidratação, o material foi vaporizado com ouro no sputtering Balzers SD 050. Os ventrículos foram examinados no S.E.M. Jeol P 15.

2.3 Histologia: As formigas foram dissecadas em fixador paraformaldeído 4% em tampão Fosfato de Sódio 0,1 M (pH 7,4) durante duas horas, sendo posteriormente lavada pelo mesmo tampão, desidratado em álcool (70, 80, 95%), embebido e incluído em resina Leica.

Os cortes histológicos com 6-8µm de espessura foram recolhidos em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

2.4 Histoquímica: Parte das lâminas obtidas foram submetidas à técnica de PAS (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1993) para carboidratos neutros e polissacarídeos contendo ligações 1-2 glicol; o Azul de Toluidina pH 3,5 (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos ácidos e DNA; Picrossírius red (=Direct red- 80) (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para fibras colágeno; Azul de Bromofenol (PEARSE, 1960) e Xilidine Ponceau (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1993), para proteínas, principalmente as básicas; Tricrômico de Mallory (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), para detecção de estruturas basófilas e acidófilas e a técnica de von Kossa (PEARSE, 1960), para detecção de cálcio. Todas as lâminas foram examinadas no fotomicroscópio Leica. As imagens foram capturadas e digitalizadas usando-se o programa Image Manager 50.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ventrículo é alongado, muito amplo quanto à largura em *C. atratus* (Figs. 1A, 1B, 1C) ao passo que ele possui comprimento similar ao de *C. clypeatus*. As fibras da musculatura circular estão localizadas abaixo da musculatura longitudinal, seguindo o padrão encontrado para outras espécies de formigas (CAETANO, 1984 e 1988). Traquéias penetram o ventrículo, sendo indicativo de alta demanda de oxigênio e intenso metabolismo (LEHANE, 1996).

O epitélio do ventrículo das três espécies é formado por dois tipos celulares: as células digestivas e as generativas (Figs 2 A, 2C) assim como observado por Caetano & Cruz-Landim (1983) e Caetano (1984, 1988 e 1989a) para outras espécies de formigas.

Entretanto em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, um terceiro tipo de célula é observado na região de transição do epitélio do proventrículo para o ventrículo, que forma um epitélio de transição (Fig. 2B). Este tipo celular, junto com a válvula cardíaca, está envolvido na produção da membrana peritrófica, assim como o observado para larvas e adultos das formigas *Ectatoma edentatum* e *P. (=Neoponera) villosa*, respectivamente

(CAETANO, 1988; ZARA & CAETANO, 1998 e CAETANO & ZARA, 2001). A matriz peritrófica em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* pode ser classificada como do tipo I, isto, devido às características como local de produção e tipo de secreção (microapócrina) (TERRA, 2001).

As células digestivas se apresentam com dois tipos histológicos distintos ao microscópio óptico, sendo elas as células colunares e as “goblets cells” (Figs 2 A, 2C, 2D, 2E).

O epitélio do ventrículo mostra-se com grande quantidade de células generativas basófilas e com forma globular, formando pequenos grupos na base das células digestivas (Figs. 2 A, 2C). Esta característica indica que seu citoplasma apresenta grande atividade do retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e RNAs.

As células colunares são altas e apresentam núcleo na porção mediana (Fig. 2 A, 2C), assim como numerosas vesículas que se coram diferentemente pelo H.E., o que caracteriza estas células como secretoras, assim como descrito por Chapman (1975) e Wigglesworth (1974). Estas, diferentemente das células generativas, são estruturas acidófilas, que frequentemente apresentam as extremidades apicais dilatadas e com vesículas de grande tamanho eliminadas de maneira apócrina (Figs 2 A., 2C). Este mecanismo de secreção é igual ao observado em adultos de *Pachycondyla striata* (Caetano et al., 1994) e larvas de *P.(=Neoponera) villosa* (CAETANO & ZARA, 2001). Para estes autores tais vesículas contêm enzimas digestivas, as quais são descarregadas sobre o alimento no espaço endoperitrófico, após fusão com a membrana peritrófica. Assim, *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* (subfamília Myrmicinae) apresentam a mesma característica observadas para larvas e adultos da subfamília Ponerinae (CAETANO, 1988; ZARA & CAETANO, 1998 e CAETANO E ZARA, 2001), sendo esta subfamília considerada como uma das menos derivadas por Holldobler & Wilson (1990). Desta maneira, tal padrão de secreção parece ser o modelo básico para os Formicidae.

Outro grupo de células digestivas, as “goblet cells,” tem a região basal alargada e profunda invaginação do ápice, formando uma cavidade. Esta cavidade mostra-se revestida por muitas microvilosidades longas, as quais são facilmente observadas na maioria das técnicas empregadas (Figs 2 A, 2E, 2F).

O Azul de Toluidina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), possibilitou observar fortes reações nas vesículas das células digestivas de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* (Fig 2D).

Os resultados obtidos com Azul de Bromofenol e Xilidine Ponceau mostraram reações de intensidade mediana no citoplasma de células digestivas. Entretanto, as vesículas presentes no citoplasma das células digestivas mostraram reações muito fracas, quase imperceptíveis (Figs 2E, 2G). O resultado apresentado pelas vesículas indica a existência de pequena concentração de proteínas e que na verdade estão complexadas com polissacarídeos ácidos (Fig 2D). Estudos realizados por Jeantet (1971) com *Formica* e Caetano (1988) com diversas formigas, tais como *Ectatomma quadridens*, *P. (=Neoponera) villosa*, *Camponotus rufipes* e *Azteca bicolor*, observaram o mesmo padrão quanto à intensidade fraca das reações (CAETANO, 1988). Schumaker et al. (1993) descreve o conteúdo destas vesículas em himenópteros, como sendo proteases constituídas apenas por serina (tripsina e chimotripsina). Por outro lado, são inúmeras as carboidrases (α -amilase, celulasas, hemicelulasas, dentre outras).

Com o uso do PAS, foi possível detectar grandes concentrações de glicoproteínas contendo grupamentos 1-2 glicol presentes na periferia das vesículas, demonstrada por reações fortemente positivas (Fig 2F). Reações de baixa intensidade ao PAS foram encontradas no interior das vesículas, opondo-se as descrições feitas por Caetano (1988) em *E. quadridens*, *N. villosa*, *C. rufipes*, *A. bicolor*; por Jeantet (1971) em estágios larvais até imago de operárias, machos e rainhas de *Formica* e também por Cruz-Landim & Mello (1981) em larvas e adultos de *Trigona*. O citoplasma das células digestivas mostraram reações medianas para o PAS, o que pode significar a presença de glicogênio. Segundo Junqueira & Junqueira (1983), esta técnica marca com precisão glicogênio contendo o grupamento 1-2 glicol.

A membrana peritrófica apresenta reações positivas quando submetida à aplicação das técnicas de detecção de proteínas (Xilidine) e polissacarídeos neutros (PAS) e ácidos (Azul de toluidina). Além destes compostos protéicos detectados, colágeno foi positivamente corado diante da aplicação da técnica de Picrossírius Red. A presença do colágeno na composição da matriz peritrófica é perfeitamente compreendida, pois sua

propriedade possibilita flexibilidade e resistência a esta estrutura. Reid & Lehane (1984) descrevem um outro composto constituinte da matriz peritrófica que apresenta propriedades semelhantes às do colágeno, a peritrofina. O emprego desta técnica para detecção de colágeno resultou em fortes reações para a periferia das vesículas digestivas (Fig 2H), o que indica a correspondência entre a periferia das vesículas e a matriz peritrófica, provavelmente a peritrofina.

King & Akai (1982 e 1984), propõe que na lâmina basal dos insetos só foi identificado colágeno IV, sendo que em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* tem-se a presença destes elementos fibrilados do tecido conjuntivo (lâmina basal) (Fig. 2H). Todas as técnicas empregadas demonstraram reações positivas na lâmina basal.

Em geral, as formigas alimentam-se preferencialmente de fluídos compostos principalmente de polissacarídeos, desta maneira a presença de microorganismos no ventrículo seria necessária para a complementação de sua dieta (CAETANO, 1989; ROCHE & WHEELER, 1997). Jones (1983), descreve que nos casos em que a base do recurso alimentar fornece baixa qualidade nutricional, há a possibilidade de organismos que sofrem estas limitações alimentares, adotarem mecanismos que possibilitem otimizar o uso deste recurso. Assim, o mecanismo adotado por estas formigas, a exemplo de outros insetos como cupins, baratas e besouros, é a simbiose estabelecida com microorganismos intestinais.

Esta estratégia descrita por Caetano (1990) para *C. atratus* e van Borm et al. (2002) para formigas do gênero *Tetraponera*, também está presente em cupins (POTRIKUS & BREZNAK, 1981) e em afídeos (DOUGLAS, 1998; SASAKI & ISHIKAWA 1995).

O funcionamento das enzimas digestivas está diretamente relacionado com o pH do conteúdo ventricular (TERRA, 1994). Desta maneira, no ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* assim como nos demais himenópteros, o pH é ácido. Esta característica pôde ser observada por meio da aplicação da técnica de Tricrômico de Mallory (Fig 2 I). Terra (2001), Schumaker et al. (1993) e Wigglesworth (1972) descrevem valores de pH entre 5 e 6 para himenópteros, havendo também um decréscimo do pH em direção a região posterior do ventrículo. Nossos dados sugerem que este pH levemente ácido, o qual se aproxima do pH neutro, é mais ácido perto do ápice das células digestivas

do que na região central do lúmen do ventrículo (Fig 2 I). O pH neutro perto da região apical das células digestivas pode ser oriundo da secreção de cálcio (Figs 2J, 2K) mostrado através do teste de von Kossa. A predominância da secreção de cálcio provêm de esferocristais, os quais podem estar associados a outros compostos, entretanto, alguns íons de cálcio livre são possíveis de se observar no lúmen e no interior de células digestivas, entre as vesículas (Fig 2K). A intensa secreção de Íons Ca^{++} observada por meio da aplicação da técnica de von Kossa, indica que este composto está relacionado com a estabilização do pH levemente ácido.

O conteúdo das vesículas presentes tanto no citoplasma das células digestivas, quanto no lúmen do ventrículo, demonstrou ser de natureza glicoprotéica. Entretanto, os compostos polissacarídicos ácidos apresentaram reações mais intensas do que as reações de compostos protéicos.

FIGURA 1

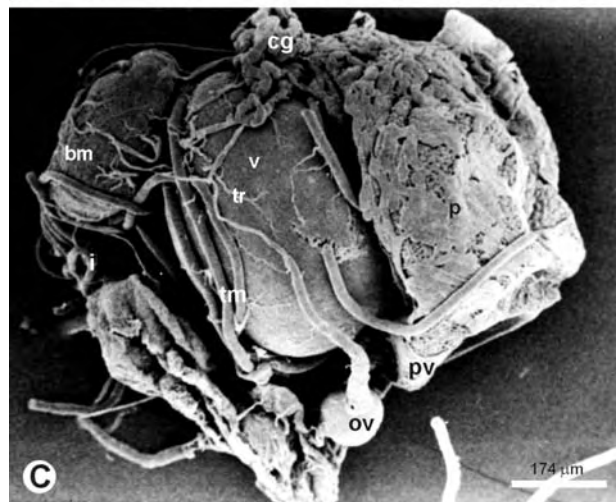
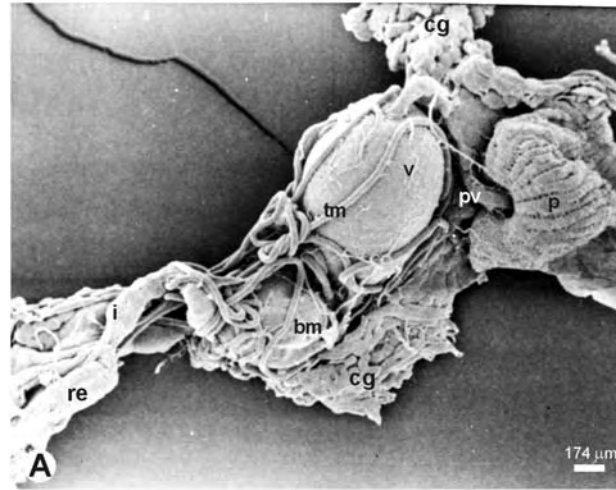


Figura 1 - Comparação do sistema digestivo de três formigas *Cephalotes*.

- A)** Visão geral do trato digestivo de *Cephalotes pusillus*, mostrando a bolsa de microorganismos (bm), o corpo gorduroso (cg), o íleo (i), o papo (p), o proventrículo (pv), o reto (re), os túbulos de Malpighi (tm) e o ventrículo (v).
- B)** Micrografia eletrônica de *C. atratus*, mostrando a bolsa de microorganismos (bm), o íleo (i), o papo (p), o proventrículo (pv), as traquéias (tr) e os túbulos de Malpighi (tm).
- C)** Visão geral do trato digestivo de *C. clypeatus*, mostrando a bolsa de microorganismos (bm), o íleo (i), o ovário (ov), o papo (p), o proventrículo (pv), as traquéias (tr) e os túbulos de Malpighi (tm).

Figura 2

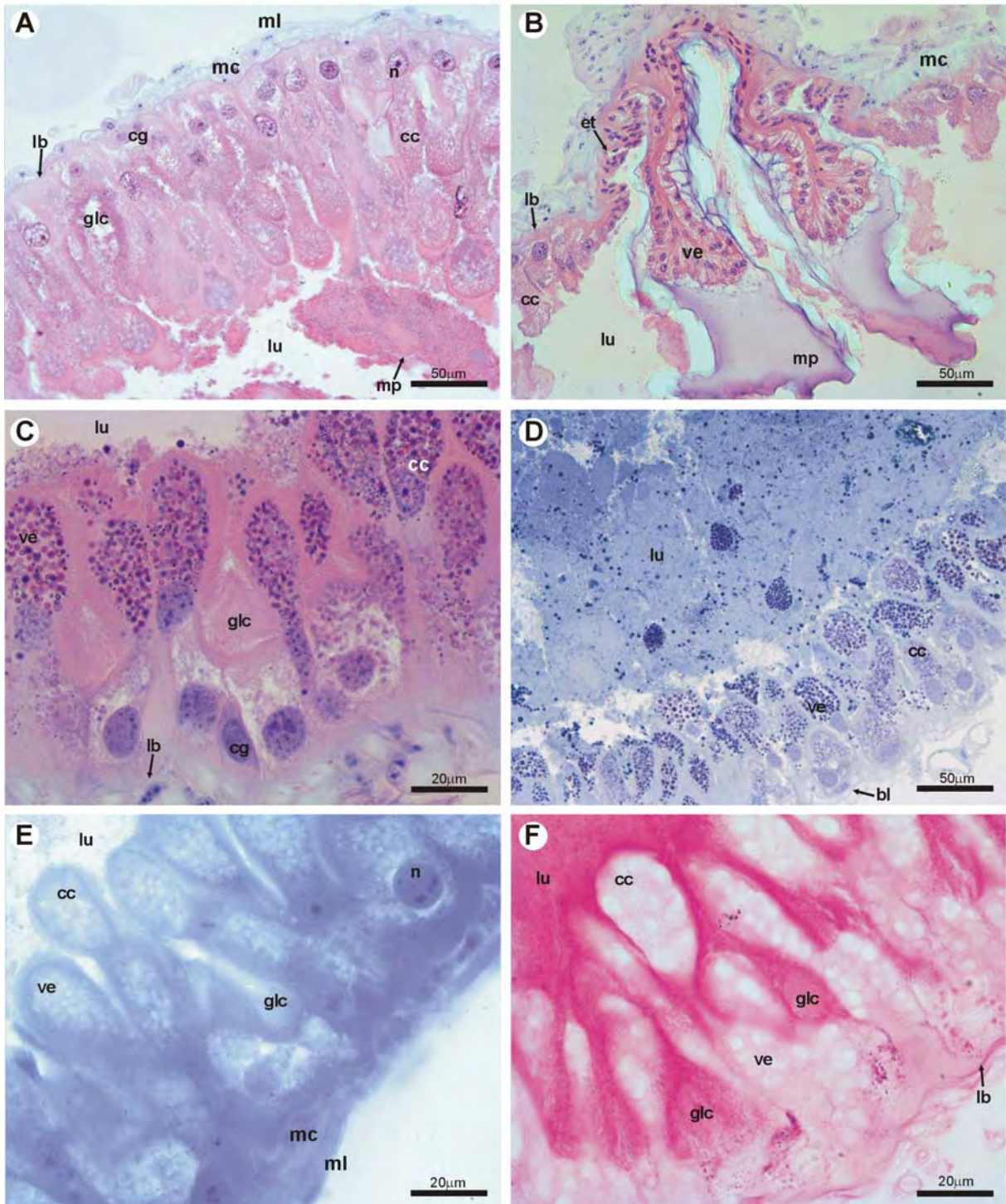


Figura 2

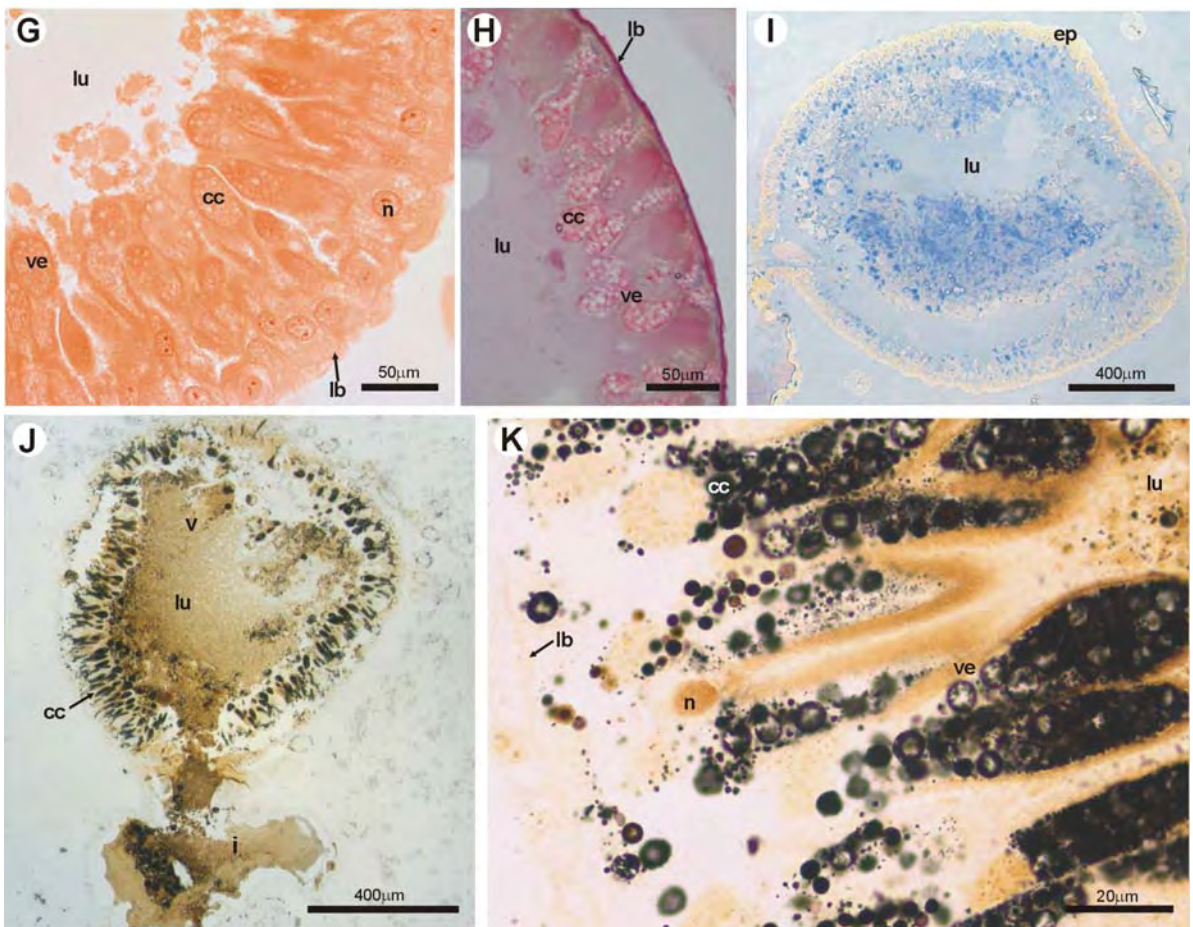


Figura 2- Cortes histológicos do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*.

- A)** H.E. em *C. clypeatus*: O epitélio mostrando as células colunares (cc), as células generativas (cge) e as "goblet cells" (glc), sobre a lâmina basal (lb). A musculatura circular interna (mc), a musculatura longitudinal externa (ml), núcleo (n), a membrana peritrófica (mp) e o lúmen (lu).
- B)** H.E. em *C. clypeatus*: região anterior do ventrículo mostrando o epitélio de transição (et) e a válvula estomodeal (vle), esta última produzindo a membrana peritrófica (mp).
- C)** H.E. em *C. pusillus*: Detalhe do epitélio do ventrículo mostrando as células generativas (cge) com citoplasma fortemente corado com Hematoxilina; as células colunares (cc), com numerosas vesículas (ve) coradas diferentemente pelo H.E. Observe as "goblet cells" (glc).
- D)** Azul de toluidina em *C. atratus*: esta figura mostra as células colunares (cc) com vesículas (ve) e lâmina basal (lb) bastante corada.
- E)** Azul de bromofenol em *C. atratus*: Células colunares (cc) com núcleo (n) na região mediana, e vesículas (ve) pouco coradas.
- F)** PAS em *C. clypeatus*: baixa intensidade na reação de PAS foi observada no interior das vesículas (ve).
- G)** Xilidine Ponceau em *C. pusillus*: As vesículas (ve) foram fracamente coradas.
- H)** Picrossírius red em *C. pusillus*: A forte reação na lâmina basal (lb), indicando a presença de colágeno .
- I)** Tricrômico de Mallory em *C. atratus*: As células epiteliais (ce) estão em amarelo (pH básico) e o lúmen levemente ácido-azul-(lu).
- J)** von Kossa em *C. atratus*: Observe as reações positivas nas vesículas (ve), mostrando a secreção de cálcio pelas células colunares (cc).
- K)** Detalhe da figura anterior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.S. 1990. Interaction between the ants *Zacryptocerus maculatus* and *Azteca trigona*: Interspecific parasitization. *Biotropica* 22: 200-206.

ANDRADE, M. L. de & BARONI-URBANI, C. 1999. Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present (Hymenoptera, Formicidae). *Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde Serie B (Geologie und Palaontologie)* 271:1-889.

BARONI-URBANI, E. & DE ANDRADE M.L., 1997. Pollen eating, storing and spitting by ants, *naturwissense Haften.* 84: 256-258.

CAETANO, F.H. & LAGE FILHO, A.L. 1982. Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia, São Paulo,* 7: 125-134.

CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM, C. 1983. Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia, São Paulo,* 8: 91-100.

CAETANO, F.H. 1984. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília *Myrmicinae* (Hymenoptera, Formicidae), *Pap. Avulsos Zool, (São Paulo),* 35:257-305.

CAETANO, F.H. 1985. Presence of microorganisms in the alimentary canal of ants of the tribe *Cephalotini* (*Myrmicinae*): location and relationship with intestinal structures. *Naturalia (São Paulo),* 10: 37-47.

CAETANO, F.H. 1988. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia, (São Paulo),* 13: 129-174.

CAETANO, F.H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., 1989a. Tipos de microorganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112.

CAETANO, F.H. 1989. Endosymbiosis of ants with intestinal and salivary gland bacteria. *Insect Endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetic, Evolution.* C.R.C. Press, Inc., U.S.A. 57-75.

- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. 1990.** Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants. Applied Myrmecology. A world perspective. Edited by R.K. Vander Meer. U.S.A. 119-129.
- CAETANO, F.H; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I. 1990.** Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS,1775) (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. Naturalia, São Paulo, 15: 57-65.
- CAETANO, F.H; A.H. TORRES Jr; M. I CAMARGO MATIAS; M.E.M. TOMOTAKE. 1994.** Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). Cytobios, Cambridge. 235-242.
- CAETANO, F.H. & RODRIGES, P. 2001.** Ultrastructure of the Ventriculus of the Ant *Odontomachus bauri* (FORMICIDAE: PONERINAE). Naturalia, São Paulo, 26: 43-51.
- CAETANO, F.H. & ZARA J.F. 2001.** Ultramorphology and Hystology of the Foregut and Midgut of *Pachycondyla* (= Neopera) *villosa* (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae). Journal of Hymenoptera Research, 10: 251-260.
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. 2002.** Formigas: biologia e anatomia. Araras: Topázio. 131p.
- CHAPMAN, R.F. 1975.** The Insects: structure and function. New York: American Elsevier. 819p.
- CREIGHTON, W.S. 1967.** Studies of free colonies of *Cryptocerus texanus* Santschi (Hymenoptera: Formicidae). Psyche 74:34-41.
- CRUZ-LANDIM, C. 1981.** Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera; Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. ACIESP. n. 31.
- DOUGLASS, A.E. 1998.** Nutritional interactions in insect microbial symbiosis: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology. 43: 17-38.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. 2000.** The Insect. An outline of entomology. Carlton: Blackwell Science. 470.
- HOLLOBLER, B. & WILSON, E.O . 2000.** The Ants. London: Springer. 436- 467.

- JAFFÉ, K., CAETANO, F.H., SANCHES, P., HERNANDEZ, J.V., CARABALLO, L., FLORES, J.V., MONSALVE, W., DORTAL, B., and VIDAL, R. L. 2001** Can. J. Zool./Rev. Can. Zool. Sensitivity of ant (Cephalotes) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. 79(6): 1120-1124.
- JEANTET, A.Y. 1971.** Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de Formica (Hyménoptère). Z. Zellforsch., 116: 24-405.
- JONES, C. G. 1983.** Microorganisms as mediators of plant resource exploitation by insect herbivores. In: Price, P. W.; Slobodchikoff, C. N. & Gand, W. S. (eds) A New Ecology: Novel Approache to Interactive Systems. 53-99.
- JUNQUEIRA L.C. U & JUNQUEIRA L.M.M.S.1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed.Santos(SãoPaulo),123.
- KEMPF, W. W. 1951.** A taxonomic study on the ant tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). Rev. Entomol.(RioJ.)22:1-244.
- KEMPF, W. W. 1973.** A new Zacryptocerus from Brazil, with remarks on the generic classification of the tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). Stud. Entomol. 16:449-462.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1982.** Insect Untrastructure.. Edited by Plenum Press. 1: 485.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1984.** Insect Untrastructure.. Edited by Plenum Press. 2:624.
- LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY. P.F. 1996.** Biology of the Insect Midigut. Chapman & Hall , p.486.
- LONGINO. J.T. 2003.** Page author: The Evergreen State College, Olympia WA 98505 USA.
- PEARSE, A.G.E. 1960.** Hystochemistry: Theoretical and applied. J. & A . Churchill Ltda. London.
- POTRIKUS, C.J. & BREZNAK, J.ª 1981.** Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: a strategy for nutrient conservation. Pro. Natl Acad. Sci USA 78: 4601-4605.
- REID, G.D. P. & LEHANE, M. J.1984.** Peritrophic membrane formation in three temperature simuliids, Simulium ornatum, S. equinum, S. lineatum, with respect to the migration of onchocercal microfilarial. Ann Trop Med Parasitol, 78: 527-539.

- ROCHE, R.K. & WHEELER, D.E.; 1997.** Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohwer* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of morphology*, Tucson, 234: 253-262.
- SCHUMAKER, T.T.S; CRISTOFOLETTI, P.T; TERRA, W. 1993.** Properties and compartmentalization of digestive carbohydratases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata*(Apidae: Meliponinae) larvae. *Elsevier. Apidologie* 24:3-17.
- SNODGRASS, R.E. 1935.** Principles of Insect Morphology, Mcgraw-hill book Company, first edition, p.667.
- SASAKI, T. & ISHIKAWA, H. 1995.** Production of the essential amino acids from glutamate by micetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 41: 41-46.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*109-b: 1-62 .
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. 1996.** Biology of the Insect Midgut. Ed. Lehane & Billingsley. Chapman & Hall , p. 206-231.
- TERRA, W.R. . 2001.**The origin and functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 47-61.
- WEBER, N.A. 1957.** The nest of an anomalous colony of the arboreal ant *Cephalotes atratus*. *Psyche* 64: 60-69.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1972.** The Principles of Insect Physiology. 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827.
- van BORM, S., BUSCHINGER, A., BOOMSMA, J.J. & BILLEN, J. (2002).** Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 296: 2023-2027
- ZARA, F.J. & CAETANO, F.H.1998.** Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatomma edentatum* (ROGER, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Biologia.* 58: 33-37 .

**Histologia e Histoquímica do Ventrículo de
Dolichoderus (=Monacis) *bispinosus* (OLIVIER, 1792) (Hymenoptera: Formicidae).**

RESUMO:

Estudou-se o ventrículo de *Dolichoderus bispinosus* sob o ponto de vista histológico e histoquímico. O epitélio é constituído por dois tipos celulares básicos, as células generativas com pronunciada basofilia e as células digestivas. Estas últimas apresentam inúmeras vesículas citoplasmáticas, ricas em polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas básicas. O padrão de secreção destas células apresenta-se como sendo apócrino. Na superfície do epitélio observa-se uma massa de material fibroso. Discute-se a função dos resultados obtidos.

ABSTRACT:

In this study we histologically and histochemically describe the ventriculus of *Dolichoderus bispinosus*. The epithelium consists of two basic cell types, highly basophilic generative cells, and digestive cells. The latter present several cytoplasmic vesicles, rich in acidic and neutral polysaccharides, and basic proteins. Also, these cells exhibit an apocrine secretion pattern. A mass of fibrous material is observed on the surface of the epithelium. Finally, we discuss the results obtained.

INTRODUÇÃO

Dolichoderus (= *Monacis*) *bispinosus* (Olivier, 1792), é uma das espécies mais comuns deste gênero cosmopolita, habitando tanto áreas que sofreram grandes distúrbios (plantações de café, cacau, p.ex.) quanto florestas tropicais pouco antropofizadas acima de 2100 metros de altitude (LONGUINO, 2003).

Os hábitos alimentares desta espécie de formiga incluem néctar, exudatos florais de diversas plantas, líquidos extraídos de homópteros, além de serem efetivos predadores de cupins (SWAIM, 1977; FISHER, 1990). Como na maioria dos himenópteros adultos, estas formigas se alimentam preferencialmente de alimentos líquidos (EISNER, 1957), apresentando o trato digestivo especializado para ingestão deste tipo de alimento (CAETANO, 1984).

O trato digestivo em Formicidae, como em outros insetos, está dividido em três regiões com esfíncteres controlando o fluxo do alimento. O intestino anterior e posterior, de origem ectodérmica, são revestidos por uma fina camada cuticular (íntima). O intestino médio é de origem endodérmica, não sendo, portanto, revestido por cutícula. Entretanto, existe a matriz peritrófica que reveste o intestino médio e o protege contra injúrias (mecânicas ou químicas) que possam vir a ocorrer pela passagem do bolo alimentar (CHAPMAN, 1975; CAETANO, 1984 e 1988; ZARA & CAETANO, 1998, CAETANO et al, 2002). Além desta função, a matriz peritrófica compartimentaliza o intestino médio,

permitindo a circulação eficiente de enzimas nos compartimentos endo e ectoperitroficados (TERRA, 2001; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA et al, 1996).

Apesar da constância estrutural do trato digestivo, o ventrículo apresenta uma das mais conspícuas plasticidades estruturais. Segundo Caetano et al. (2002), nas espécies mais primitivas como as predadoras *Myrmecia regularis* e *Dinoponera gigantea* o ventrículo apresenta-se alongado. Por sua vez, nas formigas mais derivadas e com hábitos onívoros o formato é arredondado. Porém, em Dolichoderinae, como *D. bispinosus*, a estrutura do ventrículo é periforme, indicando ser uma característica intermediária entre as formigas mais primitivas e as mais derivadas (CAETANO et al, 1990).

Chapman (1975) correlaciona as variações no tamanho do trato digestivo com a dieta do inseto, onde aqueles com alimentação rica em proteínas tem o trato digestivo mais curto, enquanto que os que têm dieta rica em carboidrato apresentam trato digestivo longo. Entretanto para Caetano (1984, 1988 e 1989) tal fato não é válido para os Formicidae.

O ventrículo nas formigas é composto de uma única camada de epitélio que repousa sobre uma contínua lâmina basal (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996). Histologicamente as células digestivas são colunares e podem se apresentar como sendo de dois tipos fisiológicos distintos: aquelas com inúmeras microvilosidades longas, com corpos com laminação concêntrica (esfereocristais) e corpos mielínicos geralmente múltiplos (absorção e excreção) e um segundo tipo com poucas e curtas microvilosidades, grânulos de secreção e corpos mielínicos simples (CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983). Um outro tipo celular encontrado junto às células digestivas são as células generativas. Tais células são pequenas e distribuem-se aos grupos na base das células digestivas sobre a membrana basal (CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983; CAETANO, 1984, 1988; CAETANO et al, 2002). Externamente à membrana basal são encontradas fibras musculares circulares e longitudinais (SNODGRASS, 1935; CAETANO, 1984 e 1988).

Por entre as microvilosidades das "goblets cells" existentes no ventrículo de formigas do gênero *Atta* ocorre elementos fibrosos e estruturas paracristalinas na forma de bastões (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1975).

A matriz peritrofica que se constitui de fibras de quitina, proteínas e carboidratos é produzida na região anterior do ventrículo. De acordo com a composição, esta pode ser

classificada como gel ou matriz (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA, 2001). A matriz peritrófica possui poros que permitem a passagem de pequenas partículas alimentares e bactérias que vão de encontro às células desta porção do intestino (GULLAM & CRANSTON, 2000). Assim, esta matriz delimita dois espaços internos ao ventrículo, o espaço ectoperitrófico, entre o epitélio e a matriz e o endoperitrófico, no interior da matriz, geralmente caracterizado pelo bolo alimentar (TERRA & FERREIRA, 1990; TERRA, 2001).

Para Caetano et al (1994) as vesículas de secreção produzidas no ventrículo de *Pachycondyla striata* atravessam a membrana peritrófica. Assim que atinge o espaço endoperitrófico tais vesículas começam a mostrar sinais de desintegração.

O presente trabalho apresenta as características histológicas e a histoquímica do ventrículo de *D. bispinosus* quanto à presença e distribuição de proteínas básicas, carboidratos ácidos e neutros, DNA e RNA tanto no epitélio quanto no alimento. A produção e composição química da matriz peritrófica e a presença de material fibroso também é apresentada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos espécimes: As operárias de *D. bispinosus* foram coletadas no tronco de árvores *Caesalpinia peltophoroide* (LEGUMINOSAE), localizadas no campus UNESP/ Rio Claro, (22°24'36"S; 47°33'36"W, 612 metros de altitude).

Histologia: Para análise histológica e detecção dos compostos químicos, o material dissecado foi fixado em paraformaldeído 4% durante duas horas, sendo então tamponado em fosfato de sódio pH 7,4 por vinte e quatro horas.

Após a fixação, o material foi submetido à seqüência de desidratação progressiva de álcoois (70 a 95%) por trinta minutos em cada concentração. Posteriormente o material foi embebido e incluído em resina Leica.

Os cortes histológicos com 6-8 μ m de espessura foram recolhidos em lâminas.

Morfologia: Algumas das lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para as análises morfológicas do ventrículo.

Histoquímicas: Parte das lâminas obtidas foram submetidas à técnica de PAS (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para carboidratos neutros; o Azul de Toluidina pH 3,5 (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos ácidos e DNA; Picrossírius red (JUNQUEIRA, 1983) para colágeno; Azul de Bromofenol (PEARSE, 1960), para detecção de compostos protéicos; Tricrômico de Mallory (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), para detecção de estruturas basófilas e acidófilas e a Resorcina Fucsina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para fibras elásticas e núcleos. Todas as lâminas foram examinadas no fotomicroscópio Leica. As imagens foram capturadas e digitalizadas usando-se o programa Leica Qwin.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O epitélio do ventrículo é formado basicamente por dois tipos de celulares: as células digestivas e as generativas, assim como observado por Caetano & Cruz-Landim (1983, CAETANO, 1984, 1988 e 1989a).

Para Zara & Caetano (1998) e Caetano & Zara (2001), existe um terceiro tipo celular que pode ser encontrado na região de transição do proventrículo para o ventrículo de larvas *Ectatomma edentatum* e *Pachycondyla (=Neoponera) villosa*. Tais células parecem ser especializadas na produção de matriz peritrófica, que, a julgar pela característica, é classificada por Terra (2001) como sendo uma matriz peritrófica do tipo I.

Este tipo de matriz pode ser formada por células epiteliais de todo o ventrículo ou por somente uma parte dele, em *D. bispinosus*, ela é produzida na região de transição do epitélio do proventrículo para o ventrículo. Tal fato também foi mostrado por Caetano (1988) para as formigas da subfamília Ponerinae (*Ectatomma* e *Neoponera*). A matriz peritrófica produzida por estas células envolve o alimento por todo o ventrículo, compartimentalizando-o em diversas camadas que apresentam fases de digestão com diferentes estágios (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1975; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA, 2001; CAETANO & RODRIGES, 2001; CAETANO et al., 2002).

Com base na histologia o epitélio do ventrículo mostra-se com grande quantidade de células generativas basófilas e com forma globular, formando pequenos grupos na base das células digestivas (Figs. 1A, 1B). Esta característica indica que seu citoplasma apresenta grande atividade do retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e RNAs, estando estes preparados para iniciar as sínteses necessárias quando estas células forem recrutadas e por estarem em crescimento.

Tais células foram descritas por Caetano (1984) como sendo mais numerosas nas castas reprodutivas altamente derivadas de *Atta sexdens rubropilosa*, do que para as mesmas castas de outras espécies de formigas estudadas pelo autor. Em *D. bispinosus* considerada como tendo morfologia evolutivamente intermediária (CAETANO et al., 2002) o número de células generativas é grande, entretanto em menor número do que o observado para *A. s. rubropilosa*.

As células digestivas são altas e aparentemente de um só tipo histológico. Estas, assim como as células generativas, são estruturas basófilas, que freqüentemente apresentam as extremidades apicais dilatadas e até mesmo rompidas, portanto, sendo evidências claras de que estas células secretoras são apócrinas (Fig. 1B). Este mecanismo de secreção é bastante semelhante ao observado em *Pachycondyla striata* por Caetano et al (1994). Entretanto, os referidos autores descrevem que as células digestivas de *P. striata* apresentam ligeira acidofilia, diferente do encontrado em *D. bispinosus*, o que pode indicar a presença de compostos distintos entre as duas espécies.

Pela histologia, observa-se que as células digestivas apresentam núcleo na porção mediana (Fig. 1B), assim como numerosas vesículas que se coram diferentemente pelo H.E. Isto caracteriza estas células como sendo secretoras, assim como as descritas por Chapman (1975) e Wigglesworth (1974). Estas vesículas desprendem-se do ápice das células digestivas e atravessam a membrana peritrófica, em seguida, esvaziam-se junto ao alimento contido no lúmen. Essa descrição é semelhante ao relatado para adultos de *P. striata* (CAETANO et al, 1994) e larvas de *P. villosa* (CAETANO & ZARA, 2001). Para estes autores tais vesículas contêm enzimas digestivas, as quais são descarregadas no bolo alimentar (espaço endoperitrófico) após fusão com a membrana peritrófica. Assim, *D. bispinosus* apresenta a mesma característica observadas para larvas e adultos da subfamília Ponerinae, sendo esta subfamília considerada uma das menos derivadas por Holldobler & Wilson (1990). Desta maneira, tal padrão de secreção parece ser o modelo básico para os Formicidae.

Na aplicação do Azul de Toluidina, que é um corante catiônico e forma ligações eletrostáticas com radicais de carga oposta presentes no tecido (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), foi possível observar a presença de fortes reações de polissacarídeos ácidos nas vesículas, assim como na lâmina basal e células generativas. O citoplasma, que apresenta inúmeras vesículas, reagiu com intensidade mediana para esta técnica (Fig. 1B).

Histoquimicamente, a matriz peritrófica apresenta reações positivas quando submetida à aplicação das técnicas de detecção de compostos protéicos e de natureza polissacarídica, sendo estas, o Azul de Bomofenol, PAS e Azul de Toluidina respectivamente (Figs. 1F, 1G, 1B).

Contudo, dentre os compostos protéicos detectados, o colágeno foi positivamente corado diante da aplicação das técnicas de Picrossírius red e Resorcina Fucsina tanto na lâmina basal, quanto na matriz peritrófica (Fig. 1C, 1D, 1E). A presença do colágeno na composição da matriz peritrófica é perfeitamente compreendida, pois sua propriedade possibilita flexibilidade e resistência a esta estrutura. Reid & Lehane (1984) descrevem um outro composto constituinte da matriz peritrófica que apresenta propriedades semelhantes às do colágeno, sendo esta, a peritrofina.

O emprego destas técnicas para detecção de colágeno resultou em reações mais tênues para a periferia das vesículas digestivas, o que indica a correspondência entre a periferia das vesículas e a matriz peritrófica.

De acordo com King & Akai (1982 e 1984), na lâmina basal dos insetos só foi identificado colágeno IV, sendo que em *D. bispinosus* temos fortes indicativos para a presença destes elementos fibrilados do tecido conjuntivo.

Na detecção de compostos protéicos, foi aplicada a técnica Azul de Bromofenol. Os resultados obtidos demonstraram reações fortemente positivas nas células generativas e lâmina basal. Reações de intensidade mediana foram detectadas no citoplasma de células digestivas e matriz peritrófica. Entretanto, as vesículas presentes no citoplasma das células digestivas mostraram reações muito fracas, quase imperceptíveis (Fig. 1F). O resultado apresentado pelas vesículas indica a existência de grande concentração de proteína na constituição das enzimas. Estudos realizados por Jeantet (1971) com *Formica* e Caetano (1988) com diversas formigas, tais como *Ectatomma quadridens*, *Neoponera villosa*, *Camponotus rufipes* e *Azteca bicolor*, observaram o mesmo padrão quanto à intensidade fraca das reações.

Entretanto, na detecção de polissacarídeos com o uso do PAS foi possível visualizar fortes reações na membrana peritrófica, lâmina basal e vesículas. Esta técnica possibilitou a detecção de grandes concentrações de glicoproteínas contendo grupamentos 1-2 glicol presentes no interior das vesículas, as quais mostraram reações fortemente positivas (Fig. 1G). Reações de igual intensidade ao PAS, foram também observadas por Caetano (1988) em *E. quadridens*, *N. villosa*, *C. rufipes*, *A. bicolor*; por Jeantet (1971) em estágios larvais até imago de operárias, machos e rainhas de *Formica* e também por Cruz-Landim & Mello (1981) em larvas e adultos de *Trigona*.

O citoplasma das células digestivas mostraram reações medianas para o PAS, indicando a presença de glicogênio. Segundo Junqueira & Junqueira (1983), esta técnica marca com precisão glicogênio contendo o grupamento 1-2 glicol. Assim, quantidades consideráveis de glicogênio estão presentes no citoplasma destas células, embora em concentrações menores do que as encontradas na lâmina basal (Fig. 1G). Esta é bastante

espessa e reage intensamente tanto para detecção de compostos protéicos (colágeno), quanto para detecção de polissacarídeos.

Os resultados obtidos na aplicação do PAS foram semelhantes aos resultados obtidos na aplicação do Azul de Toluidina, comprovando a precisão de ambas as técnicas.

Observou-se no ventrículo presença de massas de estruturas filamentosas (Figs. 1A, 1D, 1H). Tais massas são semelhantes as descritas por Caetano (1984, 1988 e 1989) para as espécies *Cephalotes atratus*, *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*) *clypeatus* e *Dolichoderus decollatus*. O referido autor constatou que esta estrutura era constituída de aproximadamente 10 tipos diferentes de bactérias e um tipo de fungo, cuja função provável seria a de atuar como simbiontes. Caetano et al (1989) e Caetano et al (1990) refere-se à presença de fungos e bactérias por entre as microvilosidades das células digestivas do ventrículo de *Dolichoderus attelaboides*. Caetano et al (1989), mostrou esta mesma situação, porém somente para bactérias, presentes no ventrículo de *C. atratus*. Em geral, as formigas se alimentam preferencialmente de alimentos fluidos compostos principalmente de polissacarídeos, desta maneira a presença destes microorganismos seria necessária para complementar suas dietas (CAETANO, 1989; ROCHE & WHEELER, 1997). Assim em *D. bispinosus* são fortes evidências de que esta espécie também apresenta microorganismos, uma vez que todos os indivíduos dissecados e processados de diferentes colônias apresentaram tais massas.

O pH do conteúdo ventricular é uma importante propriedade que afeta diretamente o funcionamento das enzimas digestivas (TERRA, 1994). Desta maneira, no ventrículo de *D. bispinosus* assim como nos demais himenópteros, o pH é ácido. Esta característica pôde ser observada por meio da aplicação da técnica de Tricrômico de Mallory (Fig. 1H). Terra (2001), Schumaker et al. (1993) e Wigglesworth (1972) descrevem valores de pH entre 5 e 6 para himenópteros, havendo também um decréscimo do pH em direção a região posterior do ventrículo.

As vesículas presentes no citoplasma das células digestivas aparecem livres no lúmen do ventrículo. Nesta região as vesículas, também, reagiram intensamente na aplicação dos testes de polissacarídeos, demonstrando a predominância deste composto na

constituição das enzimas digestivas. A intensidade das reações para a detecção dos compostos protéicos foram, mais uma vez, fracamente positivas.

Schumaker et al. (1993) descreve o conteúdo protéico destas vesículas em himenópteros, como sendo proteases constituídas apenas por serina (tripsina e chimotripsina). Por outro lado, os compostos polissacarídicos, são as inúmeras carboidrases (α -Amilase, Celulases, Hemicelulases, dentre outras).

Assim este estudo mostrou que o padrão de secreção presente nesta formiga assemelha-se ao padrão apócrino descrito para adultos de *P. striata* (CAETANO et al, 1994) e larvas de *P. villosa* (CAETANO & ZARA, 2001). Todas as formigas estudadas anteriormente por estes autores apresentam este mesmo padrão; desta maneira, este parece ser o modelo básico dentre os Formicidae.

O conteúdo das vesículas presentes tanto no citoplasma das células digestivas, quanto no lúmen do ventrículo, demonstrou ser de natureza glicoprotéica. Entretanto, os compostos polissacarídicos apresentaram reações muito mais intensas do que as reações de compostos protéicos.

A massa de material fibroso, é semelhantes aos dos microorganismos descritos por Caetano (1984, 1988, 1989 e 1990) no interior do trato digestivo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *D. decollatus*.

Os compostos observados na periferia das vesículas digestivas foram os mesmos observados na membrana peritrófica, o que indica uma correspondência entre a periferia das vesículas e a matriz peritrófica, explicando sua permeabilidade a ela.

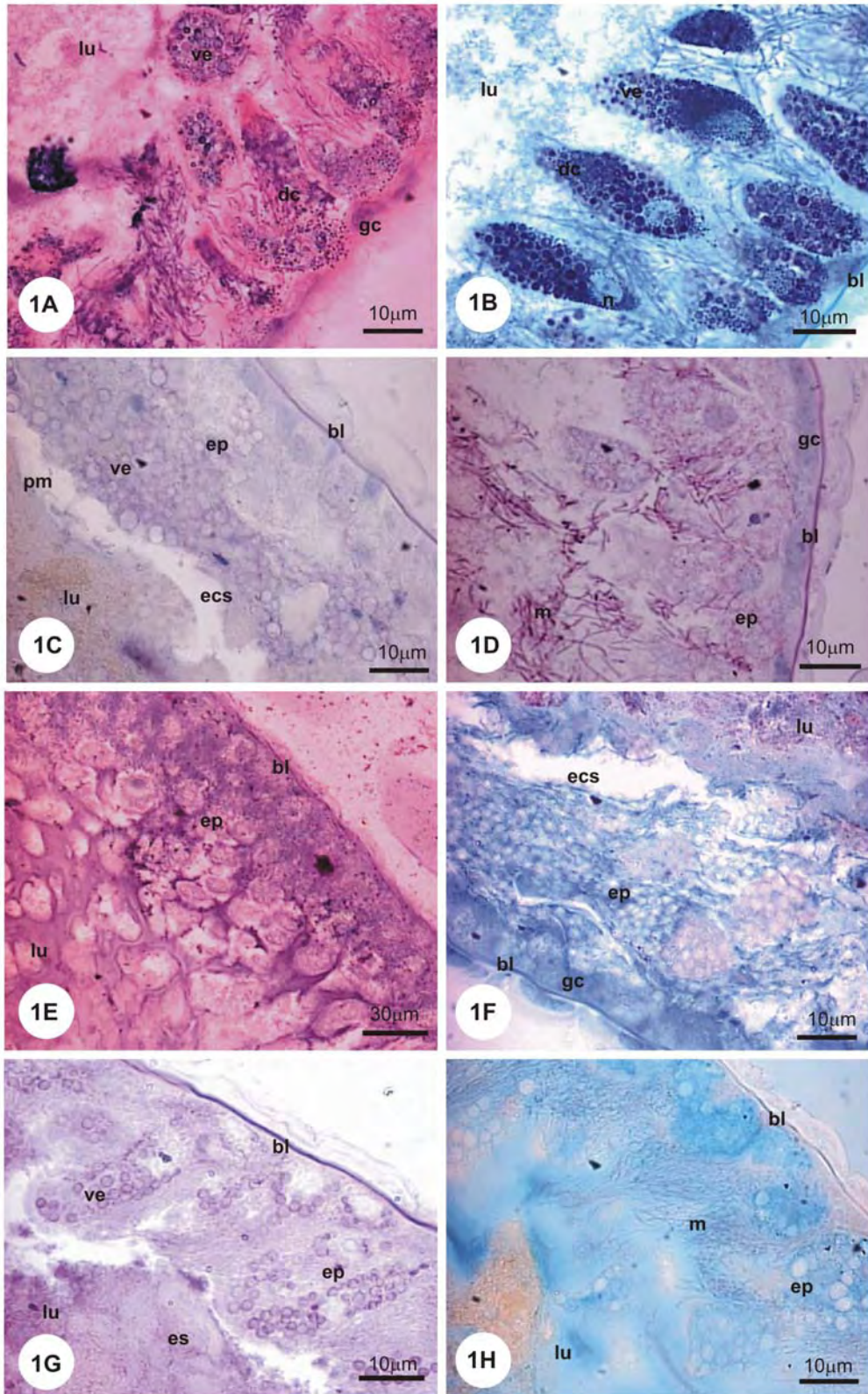


Figura 1 - Secções histológicas do ventrículo de *Dolichoderus bispinosus*.

A) Coloração H-E. Epitélio (ep) apresentando células digestivas (dc) e células generativas (gc). Células digestivas com acúmulo de massa filamentosa e de vesículas (ve) no citoplasma. B) Azul de Toluidina. Células digestivas (dc) com acúmulo de vesículas (ve). O núcleo (n) ocupa a porção mediana da célula. A lâmina basal (bl) apresenta-se fortemente marcada. (C e D) Técnica do Picrossírius. C) Células epiteliais (ep) contendo vesículas (ve) com reação positiva na periferia. Lâmina basal (bl) e membrana peritrófica (pm) apresentam reação positiva á técnica. D) Células generativas (gc) na base do epitélio (ep). Lâmina basal (bl) apresenta-se fortemente marcadas. Massas (m) filamentosas estão presentes nas células epiteliais. E) Resorcina Fucsina. Lâmina basal (bl) com reação positiva. F) Azul de Bromofenol. Lâmina basal (bl), células generativas (gc) e membrana peritrófica (pm) apresentam reação positiva. G) Ácido Periódico de Schiff (PAS). Lâmina basal (bl) e vesículas (ve) contidas nas células epiteliais apresentam-se positivamente marcadas. H) Tricrômico de Mallory. Células epiteliais (ep) contendo massas fibrosas (m). lu= lúmen, ece= espaço ectoperitrófico, ep= epitélio, ee= espaço endoperitrófico, bl= lâmina basal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM. 1975.** XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Belo Horizonte (MG), julho. Histologia do Ventrículo de Formigas Saúvas- *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Documento IV. 98.
- CAETANO, F.H. & LAGE FILHO, A.L. 1982.** Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, v.7, p. 125-134.
- CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM, C. 1983.** Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.8, p. 91-100.
- CAETANO, F.H. 1984.** Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool, (São Paulo), v.35, n.23, p.257-305.
- CAETANO, F.H. 1988.** Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), v. 13, p. 129-174.
- CAETANO, F.H. 1989.** Endosymbiosis of ants with intestinal and salivary gland bacteria. In: Schwemmler, W. (Ed.) *Insect Endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetics, and Evolution*. CRC Press, Florida, p. 57- 76.
- CAETANO, F.H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., 1989.** Tipos de microorganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica vol. 1. P. 111-112.
- CAETANO, F.H; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I. 1990.** Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS,1775) (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. *Naturalia*, São Paulo, vol. 15, p57-65.

- CAETANO, F.H; A.H. TORRES Jr; M. I CAMARGO MATIAS; M.E.M. TOMOTAKE. 1994.** Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios*, Cambridge, p.235-242.
- CAETANO, F.H. & RODRIGES, P. 2001.** Ultraestrutura of the Ventriculus of the Ant *Odontomachus bauri* (FORMICIDAE: PONERINAE). *Naturalia*, São Paulo, vol. 26. p. 43-51.
- CAETANO, F.H. & ZARA J.F. 2001.** Ultramorphology and Hystology of the Foregut and Midgut of *Pachycondyla* (= Neopera) villosa (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae). *Journal of Hymenoptera Research*, vol. 10(02), p. 251-260.
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. 2002.** Formigas: biologia e anatomia. Araras: Topázio. 131p.
- CHAPMAN, R.F. 1975.** The Insects: struture and function. New York: American Elsevier. 819p.
- CRUZ-LANDIM, C. 1981.**Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera; Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. *ACIESP*. n. 31.
- EISNER, T.A. 1957.** A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ.*, Cambridge, v. 116, p.441- 490.
- FISHER, B. L., L. & D. Price. 1990.**Variation in the use of orchid extrafloral nectar by ants. *Oecologia* 83:263-266.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. 2000.** The Insect. An outline of entomology. Carlton: Blackwell Science, 470p.
- HOLLDOBLER, B. & WILSON, E.O . 2000.** The Ants. London: Springer, p. 436- 467.
- JEANTET, A.Y. 1971.** Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). *Z. Zellforsch.* Vol. 116 p. 24-405.
- JUNQUEIRA L.C.U & JUNQUEIRA L.M.M.S.1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed. Santos (São Paulo), 123p.

- KING, R. C. & AKAI, H. 1982 and 1984.** Insect Ultrastructure, vols. 1 and 2. Edited by Plenum Press, pp. 485 and 624.
- LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. 1996.** Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall , p.486.
- LONGINO, J.T. 2003.** Page author: The Evergreen State College, Olympia WA 98505 USA.
- PEARSE, A.G.E. 1960.** Histochemistry: Theoretical and applied. J. & A . Churchill Ltda. London.
- REID, G.D. P. & LEHANE, M. J.1984.** Peritrophic membrane formation in three temperature simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum*, *S. lineatum*, with respect to the migration of onchocercal microfilarial. Ann Trop Med Parasitol. vol. 78, p. 527-539.
- ROCHE, R.K. & WHEELER, D.E.; 1997.** Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohwer* (Hymenoptera, Formicidae). Journal of morphology, Tucson, 234: 253-262.
- SNODGRASS, R.E. 1935.** Principles of Insect Morphology, Mcgraw-hill book Company, first edition, p.667.
- SWAIN, R. B. 1977.** The natural history of Monacis, a genus of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae).Ph.D. diss. Harvard Univ. 258 pp.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol.. Vol.109-b No. 1. 1-62 p.
- TERRA,W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. 1996.** Biology of the Insect Midgut. Ed. Lehane & Billingsley. Chapman & Hall , p. 206-231.
- TERRA, W.R. . 2001.**The origin and functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. Vol. 47, 47-61 p.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1972.** The Principles of Insect Physiology. 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827p.
- ZARA, F.J. & CAETANO, F.H.1998.** Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatomma edentatum* (ROGER, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). Revista Brasileira de Biologia vol. 58, 33-37 p.

**Anatomia do íleo de três espécies de *Cephalotes*
(Formicidae, Myrmicinae).**

RESUMO:

Realizaram-se estudos de natureza histológica (H. E), histoquímica (carboidratos, proteínas, colágeno e cálcio), enzimológica (ATPase e Fosfatase-ácida) e ultramorfológica do íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. O íleo apresenta sua porção proximal com características de região atuante na captura de material da hemolinfa e sua porção distal mostra-se atuante na captura de alimento e seu transporte para a hemolinfa. Morfologicamente não existe diferença entre o íleo das três espécies estudadas.

ABSTRACT:

We conducted a study describing the histological (H.E), histochemical (carbohydrates, proteins, collagen, and calcium), enzymatic (ATPase and Acid phosphatase), and ultra morphological characteristics of the ileum of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* and *C. pusillus*. The proximal region of the ileum showed characteristics of basal absorption and the distal ones presents characteristics of apical absorption. There are no ultramorphological differences between the tree species.

INTRODUÇÃO

Cerca de 185 espécies de formigas pertencem à tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae). Dos quatro gêneros inicialmente constituintes desta tribo (KEMPF, 1951 e 1973), apenas *Cephalotes* e *Procryptocerus* são reconhecidos nos dias de hoje (ANDRADE & BARONI URBANI, 1999), sendo os gêneros *Cryptocerus* e *Zacryptocerus* sinonimizados a *Cephalotes*.

Apesar da grande variabilidade de hábitos alimentares dos formicidae, o trato digestivo destes insetos mostra pouca variação (CAETANO, 1984, 1988 e 1989). Assim, este padrão tem motivado diversos estudos que são utilizados para a compreensão da função intestinal. Por meio destes estudos, torna-se possível esclarecer quais e como os recursos alimentares são aproveitados em cada parte do trato digestivo.

Apesar da relativa constância estrutural do trato digestivo, este pode apresentar variações como descrito para o íleo de *C. atratus*, *C. (=Zacryptocerus) clypeatus*; *C. (=Zacryptocerus) pusillus* e *C. (=Zacryptocerus) rohweri* (CAETANO, 1984, 1988, 1989; CAETANO et al., 2002 e ROCHE & WHEELER, 1997).

Em geral, cada uma das regiões do trato digestivo das formigas apresenta uma porção globosa: no intestino anterior é o papo, no intestino médio é o próprio ventrículo

e no intestino posterior é o reto (CAETANO; LAGE FILHO, 1982). Entretanto nas formigas da tribo Cephalotini há uma quarta porção globosa, o íleo, que se apresenta dilatado para abrigar microorganismos como bactérias e fungo filamentosos (CAETANO, 1989).

O íleo em conjunto com o reto, compõe o intestino posterior nos insetos. A função deste, junto com os túbulos de Malpighi está relacionada com o processo excretor e homeostase de íons e água (CHAPMAN, 1975; WIGGLESWORTH, 1972). Segundo Wheeler (1926), os túbulos de Malpighi nada mais são do que evaginações da parede do íleo.

No processo excretor dos insetos, a urina primária, isosmótica, é formada nos túbulos de Malpighi e liberada no íleo, onde o volume e a composição desta urina vai sendo ajustada ao longo do intestino posterior, de acordo com as necessidades do inseto. Assim ocorre reabsorção de substâncias, tais como água, íons e resíduos metabólicos, do material contido no lúmen (IRVINE et al., 1988; PHILLIPS, 1981; LECHELEITNER & PHILLIPS, 1989; WIGGLESWORTH, 1972).

Bactérias endossimbióticas têm sido descritas em diversas espécies de formigas do gênero *Camponotus* (SCHRODER et al., 1996). Entretanto tais bactérias estão situadas no interior de células denominadas de “bacteriócitos”, presentes no ventrículo. Essas bactérias foram observadas por Blochmann (1882), e são diferentes dos microorganismos presentes no trato digestivo de formigas da tribo Cephalotini estudadas por Caetano (1984), Caetano e Cruz-Landim (1985) e Jaffé et al (2001), as quais consistem de uma complexa população de bactérias e fungo.

Devido a esta particularidade, a presença e a função de simbioses no íleo de formigas da tribo Cephalotini, descritos pela primeira vez por Caetano (1984), e adquiridos por meio da trofaláxis abdominal realizados entre indivíduos adultos e recém emergidos (BRANDÃO et al., 1987) tem sido motivo de especulações entre os mirmecologistas. Porém, pouco se sabe sobre as características desta relação, principalmente no que concerne ao aspecto histoquímico, enzimológico e também ultramorfológicos.

Assim, foram realizados estudos do íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, com objetivo de mostrar relações entre as três espécies, bem como, diferenças histoquímicas, enzimológicas e ultramorfológicas tanto da parede como do conteúdo desta porção do trato digestivo, no intuito de contribuir para o entendimento das relações entre os simbiossomas e seu hospedeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material:

Operárias maiores de *Cephalotes pusillus* e operárias de *C. clypeatus* foram coletadas em árvores localizadas no campus UNESP/ Rio Claro, enquanto que as operárias maiores de *C. atratus* foram coletadas em árvores localizadas às margens do Rio Jacaré-peira, no município de Brotas, Estado de São Paulo/Brasil.

2.2 Métodos

2.2.1 Ultramorfologia (MEV): Os íleos foram removidos e fixados em glutaraldeído 4% durante 24h, desidratado em uma série crescente de álcool (70 a 100%), dois banhos de acetona 100% e desidratado no ponto crítico (Balzers CPD 030). Após desidratação, o material foi vaporizado com ouro no sputtering Balzers SD 050. Os íleos foram examinados no S.E.M. Jeol P 15.

2.2.2 Histologia: As formigas foram dissecadas em fixador paraformaldeído 4% em tampão Fosfato de Sódio 0,1 M (pH 7,4) durante duas horas, sendo posteriormente lavada pelo mesmo tampão, desidratado em álcool (70, 80, 95%), embebido e incluído em resina Leica.

Os cortes histológicos com 6-8µm de espessura foram recolhidos em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

2.2.3 Histoquímica: Parte das lâminas foram coradas com PAS (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1993) para carboidratos neutros e polissacarídeos contendo ligações 1-2 glicol; o Azul de Toluidina pH 3,5 (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos ácidos e DNA; Picrossirius red (=Direct red- 80) (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para fibras colágeno; Azul de Bromofenol (PEARSE, 1960) e Xilidine Ponceau (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1993), para proteínas, principalmente as básicas; Tricrômico de Mallory (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), para detecção de estruturas basófilas e acidófilas, e a técnica de von Kossa (PEARSE, 1960), para detecção de cálcio. Todas as lâminas foram examinadas no fotomicroscópio Leica. As imagens foram capturadas com o capturador de imagens Leica DFC 280 e digitalizadas usando-se o programa Leica Image Manager 50.

2.2.4 Testes Enzimológicos: As formigas foram imobilizadas por resfriamento e imediatamente dissecadas. Os íleos foram removidos e submetidos à solução fixadora (glutaraldeído 0,5% e tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2), a 4°C por 1 hora.

Após fixação, o material foi rapidamente lavado no mesmo tampão cacodilato e incubado por 45min. a 37 °C, no meio descrito por LEWIS & KNIGHT (1977). Após incubação, o material foi lavado em tampão Tris maleato a 4°C, e pós-fixado em solução neutra tamponada de formalina: acetona (9:1), por 20 min. Foi efetuada rápida lavagem em acetona pura, seguida por desidratação em uma série crescente de etanol (70 a 95%), seguida de inclusão em resina acrílica (LEICA). Todas as lâminas foram examinadas no fotomicroscópio Leica. Cortes com 6-8µm de espessura foram recolhidos em lâminas e lavados por 4 min. com uma solução de sulfeto de amônia 1%, secas e montadas em bálsamo do Canadá. As imagens foram capturadas e digitalizadas usando-se o programa Leica Qwin.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na maioria dos insetos o íleo consiste de um tubo indiferenciado, com epitélio coberto por cutícula e se liga ao reto. Esta descrição faz com que não se desperte interesse por esta porção do intestino posterior, porém dados relativamente recentes tem mostrado que o íleo é muito mais do que um simples tubo com a função de terminar a digestão iniciada no ventrículo (CAETANO, 1984,1988, 1989, 1990, 1998). O íleo é constituído das mesmas camadas que o intestino anterior, mas as células epiteliais são usualmente mais largas e freqüentemente apresentam conspícuas estriações da lâmina basal (CHAPMAN, 1975; WIGGLESWORTH, 1972) e microvilosidades da porção apical (CAETANO, 1989).

A imagem do intestino posterior em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* mostra que essa estrutura representa a maior porção do intestino posterior, assim como descrito por Caetano (1984) (Fig. 1A). O referido autor descreve o íleo de *C. atratus* como sendo uma estrutura portadora de profundas dobras na íntima em direção ao lúmen (1B). Esta característica, somada a grossas camadas de musculatura circular e longitudinal, além da grande quantidade de traqueíolas infiltradas nos tecidos, sugere o aumento da superfície de absorção e adesão de bactérias (CAETANO, 1989).

Na região mediana o íleo apresenta musculatura circular muito desenvolvida, diminuindo à medida que se dirige para a região distal. Caetano (1984) acredita que tal musculatura bem desenvolvida sirva para misturar o alimento com os simbiossitos nessa região, facilitando o contato destes com o material a ser digerido.

As mesmas características como a região mediana dilatada, forte musculatura circular e região distal mais estreita e tubular (Figs 1A, 1C, 1E), também foram observadas em *C. (=Z.) rohweri* por Roche and Wheeler (1997), e em *Cataulacus sp* (CAETANO et al, 1994).

O íleo para as três espécies em estudo apresentam aspecto muito semelhante ao proventrículo quando em corte transversal (FIG. 1B). Ambas as estruturas são de origem ectodérmicas e, portanto, são revestidas por de cutícula (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1975). Entretanto, a cutícula vista recobrando a superfície do lúmen do íleo é mais delgada do que a cutícula que reveste o proventrículo. Isto explica a sua permeabilidade, por ser uma das vias de absorção e excreção conhecidas nesta porção do

trato digestivo (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1975; PHILLIPS, 1977 e PHILLIPS et al., 1986 e 1988;).

As células epiteliais são baixas na região proximal e aumentam à medida que se dirigem para a região posterior do íleo. Isto faz supor seu papel na absorção do material digerido na região precedente. Este epitélio assenta-se sobre a lâmina basal bastante delgada, e abaixo desta encontra-se a musculatura circular e longitudinal mais externa, assim como descrito por Caetano (1988), para diferentes espécies de formigas. Esta musculatura é espessa na região mediana e vai regredindo à medida que se dirige para a região posterior.

Dinoponera gigantea e *Panaponera clavata* (CAETANO et al, 1986/87), apresentam, no íleo anterior, espinhos cuticulares arranjados em fileiras longitudinais que desaparecem no ponto onde a musculatura circular regride de volume. Tais espinhos parecem ter a função de puxar e perfurar a membrana peritrófica.

A massa de material fibroso presente no íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, é constituída de microorganismos e foi descrita por Caetano (1984, 1988, 1989 e 1990) e Caetano & Cruz-Landin (1985) para as espécies *C. atratus*, *C. (=Z.) clypeatus*. Os referidos autores constataram que esta estrutura era constituída de aproximadamente 10 tipos diferentes de bactérias e um tipo de fungo filamentosos não septado, cuja função provável seria a de atuar como simbiotes. Jaffe et al., (2001) identificaram para *C. atratus* e *C. pusillus*, bactérias como sendo do tipo *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Sphingobacterium spiritivorum*, *Sphingobacterium multivorum*, *Ochrobaqterium anthropi*, *Myroides* sp., *Brevundimonas diminuta*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenoptrophomonas* sp., *Moraxella* sp. e *Pseudomonas alcaligenes*, dentre os quais pôde ser observado interações metabólicas entre os microorganismos e seus hospedeiros.

Em geral, as formigas alimentam-se de fluídos ricos em polissacarídeos e ou lipídios, desta maneira a presença de microorganismos no íleo seria necessária para a complementação de sua dieta (CAETANO, 1989; ROCHE & WHEELER, 1997). Jones (1983), propõem que nos casos onde o recurso alimentar tem baixa qualidade nutricional, existe a possibilidade dos organismos adotarem mecanismos que

possibilitem otimizar o uso deste recurso. Assim, a exemplo de outros insetos como cupins, baratas e besouros, o mecanismo adotado pelas formigas do gênero *Cephalotes* e *Cataulacus* é a simbiose estabelecida com microorganismos intestinais (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985).

Os hábitos alimentares de espécies de *C. (=Z.) texanus*, *C. (=Z.) rohweri*, *C. (=Z.) maculatus* e *C. atratus* podem incluir fezes úmidas de pássaros, líquidos extraídos de homópteros, carniça, e mais notadamente, pólen (WEBER, 1957; CREIGHTON, 1967; ADAMS, 1990; BARONI-URBANI & ANDRADE, 1997 e ROCHE & WHEELER, 1997). A utilização de pólen é incomum entre as formigas, porém em Cephalotini, este é frequentemente utilizado (ROCHE & WHEELER, 1997).

Para estes autores, fica claro que a procura de fezes de pássaros seja destinada ao suprimento da demanda de compostos nitrogenados, os quais são primordiais aos microorganismos presentes no ventrículo (BUTION et al., *in press*) e íleo. Os compostos nitrogenados ao serem assimilados pelos microorganismos podem fornecer como subproduto de seu metabolismo alguns sais e aminoácidos que carecem nas dietas destas formigas, as quais são onívoras.

Estrutura semelhante, formando uma bolsa que contém bactérias envolvidas na reciclagem oxidativa de compostos nitrogenados não aproveitados pelas formigas, foi descrito entre o ventrículo e o íleo de *Tetraponera binghami*, *T. nítida* e *T. attenuata* (BILLEN & BUSCHINGER, 2000; van BORM et al., 2002).

Em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, a região de passagem do ventrículo para o íleo se apresenta isolada de um lado pela válvula pilórica, e de outro por uma dobra do epitélio (segunda válvula) (Fig 2A, 2B). Nesta região entre as duas válvulas desembocam os túbulos de Malpighi. Após a segunda dobra do epitélio, o íleo se estreita abruptamente e forma uma bolsa na qual, observa-se à presença de microorganismos, como já descrito nos vários trabalhos de Caetano, anteriormente mencionados. Caetano (1984) a denominou de “bexiga”.

O epitélio da segunda válvula apresenta-se com característica secretora (Fig 2B).

Terra (1990), formula a hipótese de que a perda dos cecos gástricos na região anterior do ventrículo nos insetos Holometabolos permitiu adaptações desta região para

a absorção de água e, conseqüentemente, diminuindo o acúmulo de substância nocivas no lúmen, o qual apresenta intenso metabolismo. Segundo o autor, são estas, as características adotadas pelos Hymenoptera em geral. Isso parece indicar que a adaptação estrutural presente no íleo de formigas da tribo Cephalotini, a qual abriga uma rica fauna microbiana, esteja relacionada com a utilização de materiais oriundos do ventrículo e túbulos de Malpighi. Isto é semelhante às características descritas para os ancestrais dos Isoptera, ainda considerando a hipótese sobre a evolução do processo de digestão, proposta por Terra (1990). Assim, *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* apresentam características adaptativas que são válidas tanto para os ancestrais de Hymenoptera, como também apresentam semelhanças aos dos ancestrais dos Isoptera.

O pH do conteúdo do trato digestivo é uma importante propriedade que a princípio poderia afetar os microorganismos aí presentes. O íleo apresenta-se ligeiramente mais ácido que o ventrículo, isto se dá particularmente devido às secreções dos túbulos de Malpighi (CHAPMAN, 1975). De acordo com Erthal et al. (2004), o pH do íleo em *Acromyrmex subterraneus* varia de 5,0 - 4,5, havendo uma gradual acidificação em direção ao reto. Segundo o autor, o reto apresenta pH em torno 5,0 - 3,0.

A técnica de Tricrômico de Mallory mostrou que o íleo possui pH ácido (ao redor do neutro) (Fig 2C). Este pH levemente ácido no lúmen do íleo deve estar relacionado com a liberação de cálcio no ventrículo e que chega até o íleo, o qual foi detectado com a técnica de von Kossa (Fig 2D) para este íon. Assim sendo, este pH levemente ácido (corrigido pelo cálcio aí presente) pode explicar a permanência destes microorganismos no íleo destas formigas, sem que sejam destruídos por um pH extremamente ácido.

A maior parte do cálcio eliminado via células do ventrículo estão complexadas com outros íons formando os esferocristais (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985; CAETANO, 1990) e parte parece estar livre (BUTION et al, *in press*). Assim sendo, a natureza ácida do íleo parece ser lentamente corrigida pela ação deste composto sobre os esferocristais dissolvendo-os. Tal hipótese deve-se ao fato dos esferocristais serem comuns no ventrículo (células digestivas e lúmen), nos túbulos de Malpighi (células e lúmen), mas não serem observados no lúmen do íleo.

Este decréscimo no gradiente do pH ao longo do trato digestivo, também é descrito na maioria dos insetos (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1975; TERRA & FERREIRA, 1994). Desta maneira, acreditamos que *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* apresentam este mesmo padrão de decréscimo no pH, pois a ausência de microorganismos no reto, somada a fortes reações para o caráter ácido observados mediante a técnica de tricrômico de Mallory, evidenciam um provável decréscimo gradiente do pH, quando comparado ao íleo ou a qualquer outra região do trato digestivo, tornando as condições nesta região mais austeras para os microorganismos se abrigarem quando em comparação ao íleo.

Dentre os testes histoquímicos aplicados, picrossírius red (colágeno) teve reações fortemente positivas ao longo de toda a superfície e lâmina basal do epitélio do íleo (Fig 2E), mas em especial, no local onde desembocam os túbulos de Malpighi.

A presença de colágeno nesta região de conexão do íleo com os túbulos de Malpighi é perfeitamente compreendida, pois suas propriedades estruturais conferem certa resistência a esta região, particularmente sujeita a trações (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983; LEHNINGER et al., 1993). A flexibilidade e resistência, permite a livre movimentação da extremidade distal dos túbulos de Malpighi na hemolinfa sem que haja comprometimento, por ruptura na extremidade proximal, junto ao íleo.

Como a maioria das técnicas empregadas, o Picrossírius red também reagiu com a delgada lâmina basal. De acordo com King & Akai (1982 e 1984), na lâmina basal dos insetos ocorre colágeno IV. Desta forma, esta técnica é bastante precisa para a detecção do colágeno, em geral, nos tecidos dos insetos.

Xilidíne ponceau e azul de bromofenol foram utilizadas na detecção de proteínas totais, ambas mostraram reações de intensidade média para o epitélio e o lúmen. Entretanto, tanto a lâmina basal, quanto à massa de microorganismos contida no lúmen, mostraram fortes reações a estas técnicas (Figs 2F, 2G).

Polissacarídeos ácidos e neutros foram detectados mediante a aplicação das técnicas de azul de toluidina e PAS. Reações de intensidade mediana para ambas as técnicas foram vistas no citoplasma das células epiteliais (Figs 2H, 2 I). Entretanto,

vesículas presentes neste epitélio foram fortemente coradas apenas para o PAS, indicando ser estas, compostas basicamente de polissacarídeos neutros (Fig 2 I).

Tais vesículas se apresentam em digestão, pois a técnica para enzimas de fosfatase ácida mostraram-nas presentes nas áreas correlatas do citoplasma das células epiteliais. Assim, este teste detectou a presença deste grupo de enzimas por todo o epitélio do íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, indicando a abundante presença de compostos, os quais, propiciam a quebra entre ligações fosfato-éster no citoplasma deste (Fig 2 J). Estes metabólitos, oriundos tanto do material contido no lúmen do íleo, quanto da hemolinfa, podem ser assimilados se necessário ou simplesmente excretados (PHILLIPS, 1981; PHILLIPS et al. 1988; WIGGLESWORTH, 1972). Entretanto os microorganismos presentes no lúmen podem estar metabolizando estas excretas, onde os subprodutos deste podem ser reabsorvidos no íleo.

Na região proximal do íleo, que apresenta células epiteliais baixas, o teste de ATPase detectou a presença desta enzima próxima à lâmina basal (Fig 2K). Isto parece indicar que esta região está relacionada com a absorção de substâncias da hemolinfa, as quais, são dirigidas para o lúmen, onde são liberadas ou reaproveitadas pelos microorganismos. Esta região poderia estar atuando na excreção. Caetano (1998) mostrou figuras de excreção nas células do íleo de *Dinoponera australis*. Entretanto, na região distal do íleo, as reações ocorreram na parte apical das células epiteliais, denotando a função de absorção desta porção (Fig.2L). Isto mostra que nossa proposição no parágrafo acima esta amparada pela resposta aqui obtida.

Esta afirmação encontra apoio em (CAETANO, 1989) para o íleo de *N. villosa*, o qual apresenta na sua porção inicial células sem microvilosidades. Essas células possuem invaginações da membrana basal bastante pronunciada e com poucas mitocôndrias. Um segundo tipo de célula surge logo após a primeira região e apresentam-se com muitas e longas microvilosidades. Essa região contém também inúmeras mitocôndrias alongadas. Estas células são mais altas do que aquelas da primeira região. Em ambos os tipos celulares observa-se interdigitações das membranas laterais, extremamente elaboradas, mostrando ser esta uma região com grande mobilidade, talvez por ação da forte musculatura circular aí presente. O primeiro tipo de

célula parece estar relacionado com absorção de material da hemolinfa e o segundo tipo com a absorção de material do lúmen.

Estudos ultra-estruturais de *C. (=Z.) rohweri* e *Formica nigricans* realizados por Roche and Wheeler (1997) e Villaro (1999), respectivamente, mostram características semelhantes às descritas por Caetano (1989), indicando ser este um padrão ultra-estrutural comum dentre os Formicidae.

Os simbiossomas presentes nos íleos de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* reagiram intensamente tanto quando submetidos para detecção dos compostos protéicos, como para os polissacarídeos, o que já era esperado devido à composição glicoprotéica da parede bacteriana. Idem para a presença de fosfatase ácida, que indicaria intensa digestão por parte das células do epitélio do íleo.

A presença maciça de microorganismos no íleo, frente às adaptações morfológicas que garantem um elevado suprimento de oxigênio e de metabólitos, somadas à capacidade absorptiva e digestiva observadas nas células epiteliais, nos leva a acreditar que esta região do trato digestivo seja uma estrutura bastante especializada e adaptada para abrigar microorganismos, estabelecendo com eles uma legítima simbiose, onde o processo digestivo é levado a cabo e onde a absorção ocorre intensamente.

Figura 1

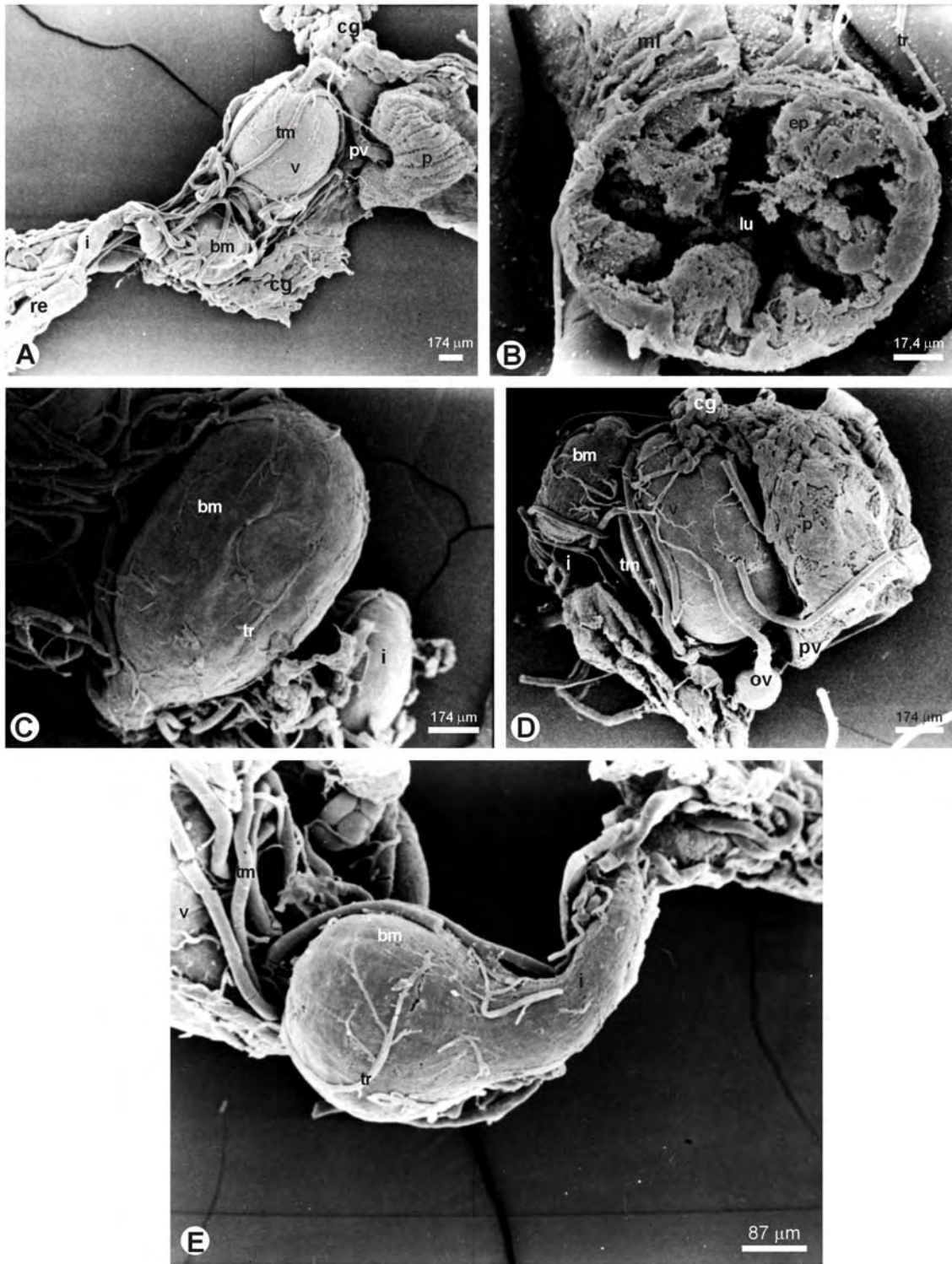


Figura 1- Comparação do trato digestivo de formigas *Cephalotes*.

- A)** Visão geral do trato digestivo de *Cephalotes pusillus*, mostrando: o papo (p), proventrículo (pv), o corpo gorduroso (cg), ventrículo (v), túbulos de Malpighi (tm), íleo (i), bolsa de microorganismos (bm) e o reto(re).
- B)** Corte transversal da região distal do íleo de *C. atratus*. Observe as profundas dobras do epitélio em direção ao lúmen. Esta característica mostra o aumento da área de absorção e adesão de microorganismos.
- C)** Vista da dilatação na região anterior em *C. atratus*. Esta, denominada de bolsa de microorganismos.
- D)** Visão geral do trato digestivo de *C. clypeatus*, mostrando o papo (p), proventrículo (pv), ventrículo (v), túbulos de Malpighi (tm), íleo (i), bolsa de microorganismos (bm) e ovário (ov) e traquéia (tr).
- E)** Imagem do íleo de *C. pusillus* mostrando a região anterior dilatada e região distal mais estreita e tubular, a qual se liga ao reto.

FIGURA 2

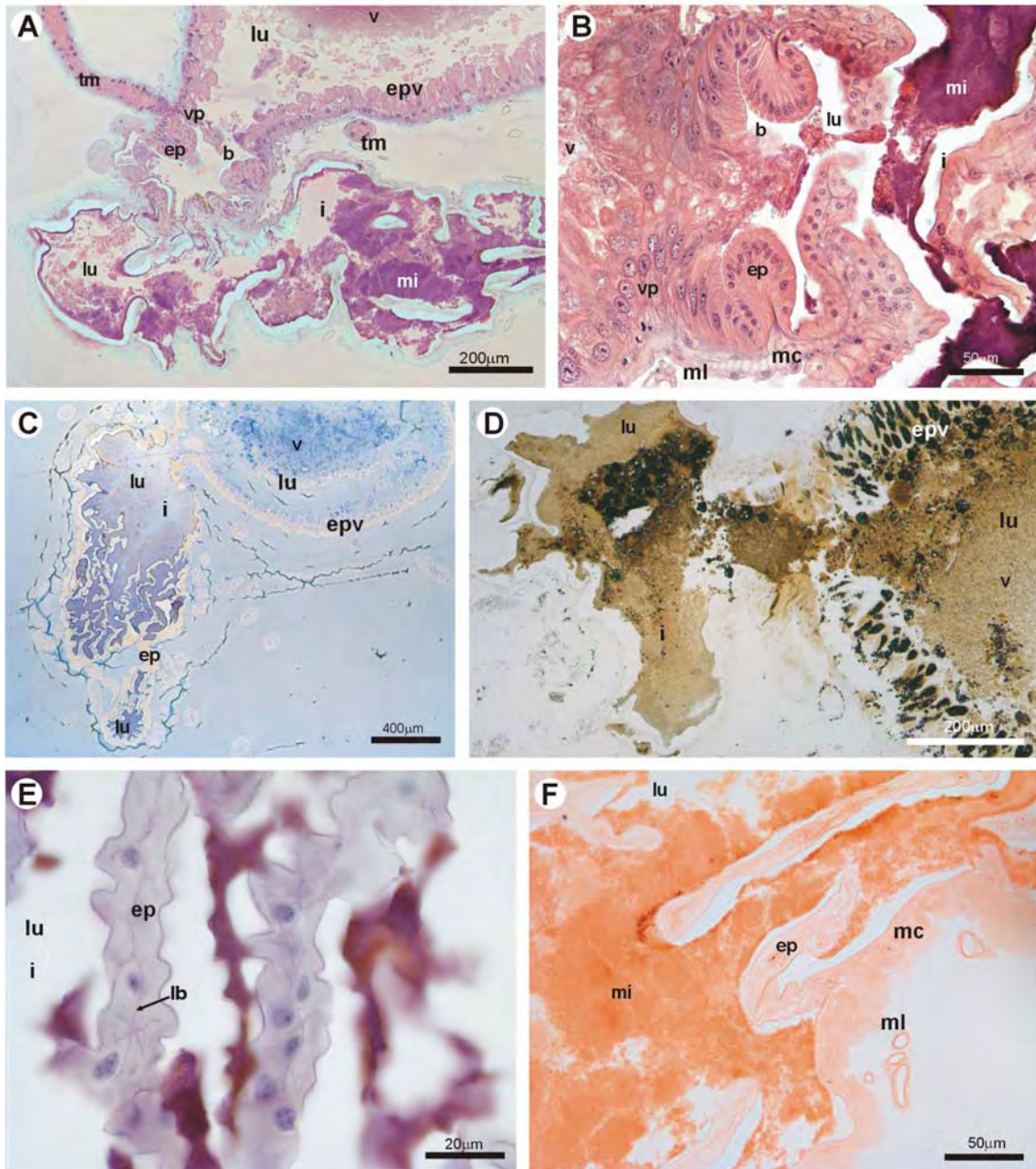


FIGURA 2

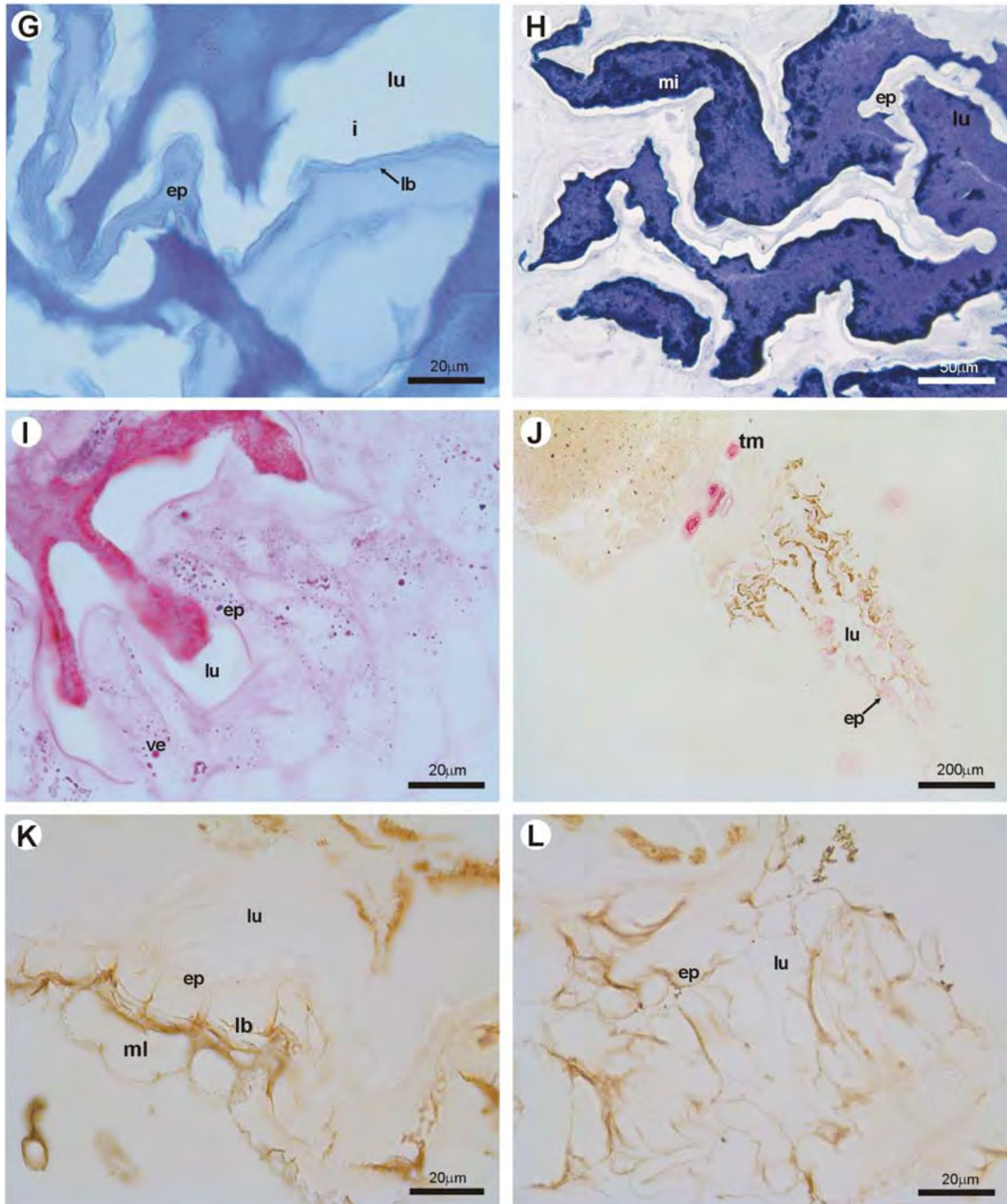


Figura 2- Secções histológicas do íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*.

- A)** H-E em *C. clypeatus*. Visão geral do mostrando parte do epitélio do ventrículo (epv), a bexiga (b), os túbulos de Malpighi (tm) desembocando nesta região, íleo (i) com a presença de microorganismos (mi) em seu lúmen (lu).
- B)** H-E em *C. pusillus*. Detalhe da bexiga (b), mostrando a válvula pilórica (vp), lúmen (lu) com a presença de microorganismos (mi), e a segunda dobra do epitélio (ep), o qual tem característica secretora.
- C)** Tricrômico de Mallory em *C. atratus*. Visão geral do íleo (i), mostrando as células epiteliais (ep) em amarelo e o pH ácido do lúmen -azul (lu).
- D)** von Kossa em *C. clypeatus*. Note as fortes reações no lúmen do íleo (i), mostrando a presença de secreção de cálcio oriundas do ventrículo (v).
- E)** Picrossírius red em *C. atratus*: As fortes reações na lâmina basal (lb), indicam a presença de colágeno.
- F)** Xilidine Ponceau em *C. atratus*: O citoplasma das células epiteliais apresentam reações medianas, enquanto que a lâmina basal e os microorganismos apresentam fortes reações para esta técnica.
- G)** Azul de bromofenol em *C. atratus*: o epitélio apresenta reações medianas, enquanto que o lúmen possui fortes reações.
- H)** Azul de toluidina em *C. atratus*: Reações fortes nos microorganismos (mi) e lúmen (lu), entretanto o epitélio (ep) possui reações medianas.
- I)** PAS em *C. atratus*: Os mesmos resultados da figura anterior também são vistos aqui, entretanto, há a presença de vesículas no citoplasma.
- J)** Fosfatase ácida em *C. pusillus*: Note a presença destas enzimas por todo o epitélio (ep) e túbulos de Malpighi (tm).
- K)** ATPase em *C. pusillus*: A presença destas enzimas na região proximal do íleo são observadas na lâmina basal (lb).
- L)** ATPase em *C. pusillus*: A presença destas enzimas na região distal do íleo são observadas no ápice das células epiteliais. Estas últimas são mais altas que as células da região proximal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E.S. 1990.** Interaction between the ants *Zacryptocerus maculatus* and *Azteca trigona*: Interspecific parasitization. *Biotropica* 22: 200-206.
- ANDRADE, M. L. de & BARONI-URBANI, C. 1999.** Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present (Hymenoptera, Formicidae). *Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde Serie B (Geologie und Palaontologie)* 271:1-889.
- BARONI-URBANI, E. & DE ANDRADE M.L., 1997.** Pollen eating, storing and spitting by ants, *naturwissense Haften*. 84: 256-258.
- BILLEN, J. & BUSCHINGER, A.2000.** Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraoponera* ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). *Arthropod Structure and Development* 29: 259-266.
- BLOCHMANN, F. 1882.** Uber das Vorkommen bakterienahnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, *Zbl. Bakt. II*. 234-240.
- BRANDÃO, C.R.F., CAETANO, F.H. and ALMEIDA, S.A.B. 1987.** Intestinal symbionts microorganisms, and abdominal trophallaxis in the neotropical myrmicinae tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae), in *chemistry and biology of Social insects*, Eder,J. and Rembold. H., Eds., Verlag J. Perperny Verlag, Munich.631.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., FABIO, B. BRITTO, GIOVANA, A. TOMAINO-GOMES and ZARA, F.J. 2006.** Histology and histochemistry of the ventriculus *Dolichoderus* (=Monacis) *bispinosus* (Olivier, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). *Micron. In press*.
- CAETANO, F.H. & LAGE FILHO, A.L. 1982.** Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia, São Paulo*, 7: 125-134.
- CAETANO, F.H. 1984.** Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), *Pap. Avulsos Zool, (São Paulo)*, 35:257-305.

- CAETANO, F.H. . & CRUZ- LANDIM.1985.** Presence of microorganisms in the alimentary canal of ants of the tribe Cephalotini (Myrmicinae): location and relationship with intestinal structures. *Naturalia* (São Paulo), 10: 37-47.
- CAETANO,F.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. and OVERAL, W.L.1986/1987.** Anatomia e histologia do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Pnaponera clavata* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*,11/12:125-134.
- CAETANO, F.H. CAETANO, F.H. 1988.** Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), 13: 129-174.
- CAETANO, F.H; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., 1989.** Tipos de microorganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. 1994.** The digestive tract of the *Cataulacus ants*: presence of the microorganisms in the ileum. 12TH World Congress on Social Insects. Paris (IUSI). 391-392.
- CAETANO, F.H. & ZARA J.F. 2001.** Ultramorphology and Hystology of the Foregut and Midgut of *Pachycondyla* (= *Neopera*) *villosa* (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10: 251-260.
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. 2002.** Formigas: biologia e anatomia. Araras: Topázio. 131p.
- CHAPMAN, R.F. 1975.** The Insects: structure and function. New York: American Elsevier. 819p.
- CREIGHTON, W.S. 1967.** Studies of free colonies of *Cryptocerus texanus* Santschi (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 74:34-41.
- EARTHARAL , M. J.; CARLOS PERES SILVA and RICHARD IAN SAMUELS.2004.** Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Jounal of Insect Physiology*. 50: 881-891.

- IRVINE, B., AUDSLEY, R. LECHELEITNER, J. MEREDITH, B. THOMSON and J. PHILLIPS. 1988.** Transport properties of locust ileum *in vitro*: effects of cyclic AMP. *J. EXP. BIOL.*137:361-385.
- JAFFE K., FLAVIO H. CAETANO, PEDRO SÁNCHEZ, JOSE V. HERNÁNDEZ, LEONARDO CARABALLO, JUANA VITELLI FLORES, WILMER MONSALVE, BLAS DORTAI and VIDAL RODRIGUES LEMOINE. 2001** *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.* Sensitivity of ant (Cephalotes) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. 79(6): 1120-1124.
- JONES, C. G. 1983.** Microorganisms as mediators of plant resource exploitation by insect herbivores. In: Price, P. W.; Slobodchikoff, C. N. & Gand, W. S. (eds) *A New Ecology: Novel Approache to Interactive Systems.* 53-99.
- JUNQUEIRA L.C. U & JUNQUEIRA L.M.M.S.1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed.Santos(SãoPaulo),123.
- KEMPF, W. W. 1951.** A taxonomic study on the ant tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Entomol.(RioJ.)*22:1-244.
- KEMPF, W. W. 1973.** A new Zacryptocerus from Brazil, with remarks on the generic classification of the tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). *Stud. Entomol.* 16:449-462.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1982.** *Insect Untrastructure..* Edited by Plenum Press. 1: 485.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1984.** *Insect Untrastructure..* Edited by Plenum Press. 2:624.
- LECHLEITNER, R.A & PHILLIPS, J.E. 1989.** Effectsof corpus cardiacum, ventral ganglia, and proline on absorbate composition and fluid transportby locust hindgut. *Can. J. Zool* 67:2669-2675.
- LEHNINGER, A. L; NELSON. D. L.; COX, M. M.** *Principles of Biochemistry*, 2nd ed.; Worth: New York, 1993.
- LEWIS, PR, KNIGHT, DP .1977.** Staining methods for sectioned material. In Glauert AM, ed. *Practical Methods in Electron Microscopy.* Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1-311. Vol 5. Part I.
- PEARSE, A.G.E. 1960.** *Hystochemistry: Theoretical and applied.* J. & A . Churchill Ltda. London.

- PHILLIPS, J.E. 1977.** Excretion in insects: function of gut and rectum in concentrating and diluting the urine. *Fred Proc* 36:2480-2486.
- PHILLIPS, J.E. 1981.** Comparative physiology of insect renal function. *Am J. Physiol* 241:241-257.
- PHILLIPS, J.E., HANRAHAN J. and CHAMBERLIN M. THOMSON, B. 1986.** Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut. *Adv Insect Physiol* 19:330-422.
- ROCHE, R.K. & WHEELER, D.E.; 1997.** Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohwer* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of morphology, Tucson*, 234: 253-262.
- SASAKI, T. & ISHIKAWA, H. 1995.** Production of the essential amino acids from glutamate by micetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 41: 41-46.
- SCHRODER, D.; DEPPISCH H.; OBERMAYER, M; KROHNE,G; STACKEBRANDT, E; HOLLDOBLER, B; GOEBEL, W; GROSS, R. 1996.**Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol Microbiol.* 1996 Aug;21(3):479-89.
- SCHUMAKER, T.T.S; CRISTOFOLETTI, P.T; TERRA, W. 1993.** Properties and compartmentalization
- STEVEN van BORM, ALFRED BUSCHINGER, JACOBUS J. BOOMSMA & JOHAN BILLEN. 2002.** Tetraoponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 296: 2023-2027.
- Terra W.R. 1990.** Evolution of digestive systems of insects., *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
- VILLARO, A.C., M. GARAYOA, M.J., LEZAUN and P. SESMA. 1999.** Light and electron microscopic study of the hindgut of the ant (*Formica nigricans*, Hymenoptera): 1. Structure of the ileum. *Journal of morphology.*242:189-204.

WEBER, N.A. 1957. The nest of an anomalous colony of the arboreal ant *Cephalotes atratus*. *Psyche* 64: 60-69.

WHEELER, W.N. 1926. *Ants, their structure, development and behavior.* Columbia University, New York. 663pp.

WIGGLESWORTH, V.B. 1972. *The Principles of Insect Physiology.* 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827.

CONCLUSÕES

A camada de muco envolvendo o bulbo do proventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, tem a propriedade de barrar ou controlar a passagem de microorganismos para o ventrículo.

Não há diferenças de natureza química na composição da camada amorfa nas três espécies de formigas pertencentes à tribo Cephalotini.

A mobilidade dos lábios do bulbo do proventrículo deve-se à presença de fibras musculares que estão aderidas ao epitélio do bulbo do proventrículo.

Os proventrículos de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* mostram diferenças sutis entre si.

A transição do epitélio do proventrículo para o ventrículo, junto com a válvula cardíaca é responsável pela produção da membrana peritrófica em *C. atratus*, e *C. clypeatus* e *C. pusillus*. Em *Dolichoderus bispinosus*, apenas o epitélio de transição do proventrículo para o ventrículo está envolvido na produção da membrana peritrófica.

O padrão de secreção de vesículas digestivas nas quatro espécies estudadas é apócrino.

O conteúdo das vesículas presentes tanto no citoplasma quanto no lúmen do ventrículo das quatro espécies estudadas, demonstrou ser de natureza glicoprotéica.

A intensa secreção de íons de Ca^{++} pelas células digestivas do ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, está relacionado com a estabilização do pH levemente ácido presente no lúmen tanto do ventrículo quanto do íleo.

A presença de elevadas concentrações de colágeno na região de conexão do íleo com os túbulos de Malpighi confere flexibilidade e resistência a esta região.

O íleo em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, apresenta duas regiões histologicamente distintas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E.S. 1990.** Interaction between the ants *Zacryptocerus maculatus* and *Azteca trigona*: Interspecific parasitization. *Biotropica* 22: 200-206.
- ANDRADE, M. L. de & BARONI-URBANI, C. 1999.** Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present (Hymenoptera, Formicidae). *Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde Serie B (Geologie und Palaontologie)* 271:1-889.
- BARONI-URBANI, E. & DE ANDRADE M.L., 1997.** Pollen eating, storing and spitting by ants, *naturwissense Haften*. 84: 256-258.
- BILLEN, J. & BUSCHINGER, A.2000.** Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraponera* ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). *Arthropod Structure and Development* 29: 259-266.
- BLOCHMANN, F. 1882.** Uber das Vorkommen bakterienahnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, *Zbl. Bakt. II*. 234-240.
- BRANDÃO, C.R.F., CAETANO, F.H. and ALMEIDA, S.A.B. 1987.** Intestinal symbionts microorganisms, and abdominal trophallaxis in the neotropical myrmecinae tribe *Cephalotini* (Hymenoptera: Formicidae), in *chemistry and biology of Social insects*, Eder,J. and Rembold. H., Eds., Verlag J. Perperny Verlag, Munich.631.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., FABIO, B. BRITTO, GIOVANA, A. TOMAINO-GOMES and ZARA, F.J. 2006.** Histology and histochemistry of the ventriculus *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* (Olivier, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). *Micron. In press*.

- CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM. 1975.** XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Belo Horizonte (MG), julho. Histologia do Ventrículo de Formigas Saúvas *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Documento IV. 98.
- CAETANO, F.H. & LAGE FILHO, A.L. 1982.** Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, 7: 125-134.
- CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM, C. 1983.** Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.8, p. 91-100.
- CAETANO, F.H. 1984.** Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool, (São Paulo), 35:257-305.
- CAETANO, F.H. & CRUZ-LANDIM. 1985.** Presence of microorganisms in the alimentary canal of ants of the tribe Cephalotini (Myrmicinae): location and relationship with intestinal structures. *Naturalia* (São Paulo), 10: 37-47.
- CAETANO, F.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. and OVERAL, W.L. 1986/1987.** Anatomia e histologia do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Pnaponera clavata* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*, 11/12:125-134.
- CAETANO, F.H. 1988.** Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), 13: 129-174.
- CAETANO, F.H. 1989.** Endosymbiosis of ants with intestinal and salivary gland bacteria. *Insect Endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetic, Evolution*. C.R.C. Press, Inc., U.S.A. 57-75.
- CAETANO, F.H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., 1989.** Tipos de microorganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112.
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. 1990.** Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants. *Applied Myrmecology. A world perspective*. Edited by R.K. Vander Meer. U.S.A. 119-129.
- CAETANO, F.H; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I. 1990.** Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS, 1775)

- (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. *Naturália*, São Paulo, vol. 15, p57-65.
- CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. 1994.** The digestive tract of the *Cataulacus ants*: presence of the microorganisms in the ileum. 12TH World Congress on Social Insects. Paris (IUSSI). 391-392.
- CAETANO, F.H; A.H. TORRES Jr; M. I CAMARGO MATIAS; M.E.M. TOMOTAKE. 1994.** Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios*, Cambridge. 235-242.
- CAETANO, F.H. et al., 1998.** *The Role of Ants Esophagus in the Trophallaxis* (Formicidae), In: Recent advances in Ecobiological Research, Indian. v.2, p. 397-403,.
- CAETANO, F.H. & RODRIGES, P. 2001.** Ultrastructure of the Ventriculus of the Ant *Odontomachus bauri* (FORMICIDAE: PONERINAE). *Naturalia*, São Paulo, 26: 43-51.
- CAETANO, F.H. & ZARA J.F. 2001.** Ultramorphology and Hystology of the Foregut and Midgut of *Pachycondyla* (= Neopera) villosa (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10: 251-260.
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. 2002.** Formigas: biologia e anatomia. Araras: Topázio. 131p.
- CHAPMAN, R.F. 1975.** The Insects: structure and function. New York: American Elsevier. 819p.
- CREIGHTON, W.S. 1967.** Studies of free colonies of *Cryptocerus texanus* Santschi (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 74:34-41.
- CRUZ-LANDIM, C. 1981.** Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera; Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. *ACIESP*. n. 31.
- DOUGLASS, A.E. 1998.** Nutritional interactions in insect microbial symbiosis: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*. 43: 17-38.
- EARTHARAL, M. J.; CARLOS PERES SILVA and RICHARD IAN SAMUELS.2004.** Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*. 50: 881-891.

- EISNER, T.A. 1957.** A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ., Cambridge, v. 116, p.441-490.
- FISHER, B. L., L. & D. Price. 1990.** Variation in the use of orchid extrafloral nectar by ants. Oecologia 83:263-266.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. 2000.** The Insect. An outline of entomology. Carlton: Blackwell Science. 470p.
- HOLLOBLER, B. & WILSON, E.O . 2000.** The Ants. London: Springer, p. 436- 467.
- IRVINE, B., AUDSLEY, R. LECHELEITNER, J. MEREDITH, B. THOMSON and J. PHILLIPS. 1988.** Transport properties of locust ileum *in vitro*: effects of cyclic AMP. J. EXP. BIOL.137:361-385.
- JAFFÉ, K., CAETANO, F.H., SANCHES, P., HERNANDEZ, J.V., CARABALLO, L., FLORES, J.V., MONSALVE, W., DORTAL, B., and VIDAL, R. L. 2001** Can. J. Zool./Rev. Can. Zool. Sensitivity of ant (Cephalotes) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. 79(6): 1120-1124.
- JEANTET, A.Y. 1971.** Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de Formica (Hyménoptère). Z. Zellforsch., 116: 24-405.
- JONES, C. G. 1983.** Microorganisms as mediators of plant resource exploitation by insect herbivores. In: Price, P. W.; Slobodchikoff, C. N. & Gand, W. S. (eds) A New Ecology: Novel Approache to Interactive Systems. 53-99.
- JUNQUEIRA L.C. U & JUNQUEIRA L.M.M.S. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed.Santos(SãoPaulo),123p.
- KEMPF, W. W. 1951.** A taxonomic study on the ant tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). Rev. Entomol.(RioJ.)22:1-244.
- KEMPF, W. W. 1973.** A new Zacryptocerus from Brazil, with remarks on the generic classification of the tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). Stud. Entomol. 16:449-462.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1982.** Insect Untrastructure. Edited by Plenum Press. 1: 485.
- KING, R. C. & AKAI, H. 1984.** Insect Untrastructure., Edited by Plenum Press. 2:624.

LECHLEITNER, R.A & PHILLIPS, J.E. 1989. Effects of corpus cardiacum, ventral ganglia, and proline on absorbate composition and fluid transport by locust hindgut. *Can. J. Zool* 67:2669-2675.

LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, p.486.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. 1993. *Principles of Biochemistry*, 2nd ed.; Worth: New York,.

LEWIS, P.R; KNIGHT, D.P .1977. Staining methods for sectioned material. In Glauert AM, ed. *Practical Methods in Electron Microscopy*. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1-311. Vol 5. Part I.

LONGINO, J.T. 2003. Page author: The Evergreen State College, Olympia WA 98505 USA.

MUYZER, G; HOTTENTRAGER, S.; TESK, A.; WAWER, C. 1996. *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities*. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, p 1-23.

PEARSE, A.G.E. 1960. *Histochemistry: Theoretical and applied*. J. & A . Churchill Ltda. London.

PHILLIPS, J.E. 1977. Excretion in insects: function of gut and rectum in concentrating and diluting the urine. *Fred Proc* 36:2480-2486.

PHILLIPS, J.E. 1981. Comparative physiology of insect renal function. *Am J. Physiol* 241:241-257.

PHILLIPS, J.E., HANRAHAN J. and CHAMBERLIN M. THOMSON, B. 1986. Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut. *Adv Insect Physiol* 19:330-422.

POTRIKUS, C.J. & BREZNAK, J.^a 1981. Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: a strategy for nutrient conservation. *Pro. Natl Acad. Sci USA* 78: 4601-4605.

REID, G.D. P. & LEHANE, M. J.1984. Peritrophic membrane formation in three temperature simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum*, *S. lineatum*, with respect to the migration of onchocercal microfilarial. *Ann Trop Med Parasitol*. vol. 78, p. 527-539.

- ROCHE, R.K. & WHEELER, D.E.; 1997.** Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohwer* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of morphology*, Tucson, 234: 253-262.
- SASAKI, T. & ISHIKAWA, H. 1995.** Production of the essential amino acids from glutamate by micetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 41: 41-46.
- SCHRODER, D.; DEPPISCH H.; OBERMAYER, M; KROHNE,G; STACKEBRANDT, E; HOLLDOBLER, B; GOEBEL, W; GROSS, R. 1996.**Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol Microbiol.* 1996 Aug;21(3):479-89.
- SCHUMAKER, T.T.S; CRISTOFOLETTI, P.T; TERRA, W. 1993.** Properties and compartmentalization of digestive carbohydratases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata*(Apidae: Meliponinae) larvae. Elsevier. *Apidologie* 24:3-17.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MEYERS, R.M. 1989.** *Attachment of a 40- base pair G + C rich sequence (GC clamp) to genomics DNA fragments by the polymerase chain reactions results in improved detection of single-base changes.* *Procedures of National Academy of Sciences USA*, p. 232-236.
- SNODGRASS, R.E. 1935.** *Principles of Insect Morphology*, Mcgraw-hill book Company, first edition, p.667.
- SWAIN, R. B. 1977.** The natural history of *Monacis*, a genus of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae).Ph.D. diss. Harvard Univ. 258 pp.
- TERRA, W.R. 1990.** Evolution of digestive systems of insects., *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*109-b: 1-62 .
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. 1996.** *Biology of the Insect Midgut.* Ed. Lehane & Billingsley. Chapman & Hall , p. 206-231.
- TERRA, W.R. 2001.**The origin and functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 47-61.

- TOMOTAKE, M.E.M. 1996.** *Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília ponerinae* (Hymenoptera: Formicidae). 129f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- TOMOTAKE, M.E.M. 1997.** *Morphology of the digestive tract of Acanthosthicus serrelatus and Cylindromyrmex brasiliensis* (Hymenoptera: Formicidae). *Naturalia*, São Paulo, v.22, p.9-15.
- van BORM, S., BUSCHINGER, A., BOOMSMA, J.J. & BILLEN, J. 2002.** Tetraoponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 296: 2023-2027
- VILLARO, A.C., M. GARAYOA, M.J., LEZAUN and P. SESMA. 1999.** Light and electron microscopic stud of the hindgut of the ant (*Formica nigricans*, Hymenoptera): 1. Structure of the ileum. *Journal of morphology.*242:189-204.
- WEBER, N.A. 1957.** The nest of an anomalous colony of the arboreal ant *Cephalotes atratus*. *Psyche* 64: 60-69.
- WHEELER, D.E. 1984.** *Behavior of ant, Procryptocerus scabriusculus* (Hymenoptera, Formicidae), with comparisons to other cephalotines. *Psyche*, Cambridge, v. 91, p.171-192.
- WHEELER, W.N. 1926.** *Ants, their structure, development and behavior.* Columbia University, New York. 663pp.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1972.** *The Principles of Insect Physiology.* 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827p.
- ZARA, F.J. & CAETANO, F.H.1998.** Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatomma edentatum* (ROGER, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Biologia.* 58: 33-37.