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

**SIMBIONTES DO TRATO DIGESTIVO DE FORMIGAS
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

MURILLO LINO BUTION

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
2009

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

**SIMBIONTES DO TRATO DIGESTIVO DE FORMIGAS
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

MURILLO LINO BUTION

Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO HENRIQUE CAETANO

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
2009

595.796 Bution, Murillo Lino

B984s Simbiontes do trato digestivo de formigas (Himenoptera:
Formicidae) / Murillo Lino Bution. - Rio Claro: [s.n.], 2009
104 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências
Orientador: Flávio Henrique Caetano

1. Formiga. 2. Microbiota intestinal. 2. DGGE. 3.
Ultra-morfologia. 4. Ultra-estrutura. 5. Enzimologia. 6.
Histoquímica. 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 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...

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano pela orientação dedicada, exemplo de seriedade, competência, ética e que trabalha muito para minha formação acadêmica e pessoal...

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Doutorado Proc. 142211/2006-0.

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

Ao Laboratório de Genética e Evolução pertencente ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa da Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini, que muito colaborou para o desenvolvimento desta tese.

A Professora Dra. Vera Nisaka Solferini, pelos ensinamentos de excelência que me foram transmitidos ao longo de todo o tempo em que desenvolvi parte dos estudos necessários a obtenção desta tese.

Ao Professor Dr. Wanderley Dias da Silveira e sua equipe de técnicos, Izildinha e Sandra, pelos ensinamentos, equipamentos e serviços técnicos prestados.

A Antônio Teruyoshy Yabuky, Cristiane Miléo, Gerson Melo Souza, Célia Bresil e aos Drs. Ricardo e Suzete Destéfano, pela presteza, amizade, ensinamentos práticos e serviços técnicos prestados.

A Octávio, Cristina, Carmen, Talissa e Tássia Bution, Guilherme, Wagner, Cícero (Cicinho), Mário Moreira e família, Manuel, Carlos (Chapinha), Regina, Orlindo “vô Filinho” e a todos os meus familiares, meu eterno muito obrigado.

Aos amigos Dú e sua esposa Adelaide, Bruna e Guilherme, Ivan Martins, Rogério Begosso, Cristina, Cynara de Melo Rodovalho, Matheus, Leandro Xavier Ferreira (Lee), Frederico e Leonardo Nojimoto, Lenita, Afonso Celso, Leonardo, Maria Carolina, Sérgio Clemente, Ernadez, Wagner, Danilo, Skeeter, Mel, Eduardo e Frederico Pfaffenback, Alex Mello, Mariana, Adriano, Roberta, Diogo, Murilo e Érika pela amizade e apoio de todas as horas.

Ao Professor Dr. Harold Gordon Fowler pela oportunidade de trabalhar em conjunto e pelos conhecimentos transmitidos.

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

	<i>Página</i>
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO 1	12
CAPÍTULO 2	40
CAPÍTULO 3	51
CAPÍTULO 4	68
CAPÍTULO 5	86
CONCLUSÕES	97

RESUMO

Foram realizados estudos comparados do proventrículo, ventrículo, íleo e túbulos de Malpighi de três espécies pertencentes ao gênero *Cephalotes*: *C. atratus*, *C. pusillus* e *C. clypeatus*, objetivando buscar relações entre elas, assim como, diferenças histoquímicas e ultra-estruturais tanto da parede como do conteúdo destas porções do trato digestivo, que pudessem ser utilizadas para a melhor compreensão da função intestinal, bem como esclarecer quais e como os recursos alimentares são aproveitados em cada parte do trato digestivo.

As características ultra-estruturais do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, mostram que o epitélio do ventrículo repousa sobre uma lâmina basal contínua e é formado basicamente por três tipos celulares, sendo estas as células digestivas, as células regenerativas e as *goblet cells*. Nestas formigas, o retículo endoplasmático rugoso além de atuar na produção de enzimas digestivas também está envolvido na estocagem de íons em vacúolos especializados presentes no ventrículo. Estas concreções são os esferocristais e podem estar contribuindo com a estabilização do pH e permanência das bactérias simbiotes presentes por entre as microvilosidades.

Secções realizadas ao longo do íleo revelaram diferenças entre três principais regiões: proximal, mediana e distal. As especializações estruturais presentes no íleo destas três espécies de formigas resultam em implicações especialmente relacionadas com as bactérias simbiotes aí hospedadas.

Também foram realizados testes para verificar a diversidade da microbiota intestinal das porções em questão, usando a técnica DGGE. Assim sendo, o perfil molecular dos simbiotes do ventrículo e íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* foi obtido analisando a região variável V3 do gene 16S do rDNA bacteriano. Foram estudadas duas amostras de *C. atratus*, três de *C. clypeatus* e seis de *C. pusillus*. Os resultados mostram que as amostras entre os simbiotes de *C. atratus* e *C. clypeatus* embora coletadas em locais geograficamente distantes, apresentaram índices de similaridade entre 80 e 94%.

A variabilidade de simbiotes encontradas nas amostras de *C. pusillus* oscilou entre 45 e 71%, tanto em amostras próximas como em amostras distantes. Neste estudo, verificamos que as técnicas moleculares de PCR e DGGE mostraram-se eficazes para o propósito da pesquisa e puderam ser consideradas ferramentas versáteis para análises de microbiotas intestinais.

ABSTRACT

This study compared the proventriculus midgut, ileum, and Malpighian tubules of three ants of the genus *Cephalotes*: *C. atratus*, *C. pusillus*, and *C. clypeatus*, by examining histochemical and ultrastructural differences in the wall and the content of these portions that could be used to better understand the intestinal function, as well as clarify which and how food resources are used in each part of the digestive tract.

The ultrastructural analysis of the midgut of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus* revealed that the epithelium of the midgut lays on a basal lamina and is composed basically of three cell types: digestive cells, generative cells, and goblet cells. In these ants, the rough endoplasmic reticulum, in addition to producing digestive enzymes, is involved in ion storage in specialized vacuoles present in the midgut. These concretions are spherocrystals and may contribute to stabilize the pH and to maintain symbiotic bacteria found in between microvilli.

Sections along the ileum revealed differences among the three main regions: proximal, medial, and distal. The structural specializations present in the ileum of these three ants have implications especially to the symbiotic bacteria.

The DGGE method was also performed to assess the diversity of the intestinal microbiota of the portions of the digestive tract. The molecular profile of the symbionts of the midgut and ileum of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus* was obtained using the variable region V3 of the bacterial 16S rDNA gene sequence. Two samples of *C. atratus*, three of *C. clypeatus*, and six of *C. pusillus* were analyzed. The results showed similarity indices from 80% to 94% between the samples of symbionts from *C. atratus* and *C. clypeatus*, despite being collected in sites geographically distant.

The variability of symbionts found in the samples of *C. pusillus* ranged from 45% and 71% in samples geographically close as well as distant. In this study, PCR-DGGE was efficient for the purpose of this study and can be considered a versatile tool to analyze the intestinal microbiota.

INTRODUÇÃO

1.1- Morfologia geral do trato digestivo

No trato digestivo dos insetos existem 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 possui origem endodérmica, não sendo revestido pela camada cuticular observada nas demais regiões, porém, aí existe a membrana peritrófica que 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; CAETANO 1984; 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 armazená-lo.

O proventrículo é a parte do intestino anterior que maior grau de diversificação apresenta de uma para outra espécie. Segundo Emeri (1888) é possível delimitar subfamílias 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), 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 e 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, 1974 e CAETANO, 1984 e 1988). Caetano *et al.*, (1998) acreditam 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*, fato 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 é 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 da subfamília 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; WIGGLESWORTH, 1974; 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 simbiontes, cuja função ainda é desconhecida (CAETANO et al, 2002).

A histologia do intestino médio é bastante uniforme e as variações que ocorrem são mais relacionadas ao tamanho das células digestivas, as quais podem apresentar-se como sendo de dois tipos: aquelas com inúmeras microvilosidades longas, com corpos de 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) 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 regenerativas são pequenas e distribuem-se aos grupos na base das células digestivas sobre a lâmina basal. Externamente à lâmina basal são encontradas fibras musculares circulares e/ou longitudinais (CAETANO, 1984 e 1988) e oblíquas (ARAB & CAETANO, 2001).

Segue-se ao ventrículo, o íleo que apresenta aspecto muito semelhante ao proventrículo quando em corte transversal (CAETANO, 1984). Em *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa*, o íleo apresenta células sem microvilosidades na sua porção inicial. 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 íleo sendo composto por uma cutícula fina que recobre o epitélio formado por células cúbicas. Este epitélio assenta-se sobre a lâmina 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; CAETANO et al., 2002), 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 recobrindo-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). Estas papilas são responsáveis pela absorção de água, íons de sais e aminoácidos (WIGGLESWORTH, 1974).

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 1984 e 1988; CAETANO et al., 2002).

1.2- A Tribo Cephalotini

A tribo Cephalotini (subfamília Myrmicinae) compreende formigas arbóreas detentoras de peculiaridades biológicas complexas de grande importância na fauna neotropical, que freqüentemente tem causado especulações aos mirmecologistas a respeito de sua anatomia única que é associada hábitos alimentares incomuns (HOLLDÖBLER & WILSON, 1990).

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.

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

O referido autor descreve para o proventrículo de *C. pusillus*, musculatura bem desenvolvida e com a presença de inúmeras projeções cuticulares arborescentes grandes, que podem completar a ação do bulbo.

Análises sobre as características anatômicas da válvula cardíaca de *C. atratus* e *C. pusillus* realizadas por Caetano (1984), demonstra que esta é uma estrutura de tamanho diminuto que se projeta 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 se apresenta dilatado para abrigar bactérias (CAETANO, 1984 e 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 às grossas camadas de musculatura circular e longitudinal, somadas a grande quantidade de traqueíolas infiltradas nos tecidos, sugere o aumento da superfície de absorção e fixação de bactérias e elevado metabolismo.

Nas formigas desta tribo, existem indícios de que a ação da forte musculatura circular sirva também para aumentar o contato dos microrganismos com o material contido no lúmen (CAETANO et al., 2002).

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

A maneira pela qual estes microrganismos 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 consumida 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 (ROCHE & WHEELER, 1997)

O fenômeno, observado em *Zacryptocerus varians*, é iniciado após a emergência das novas operárias (HOLLDÖBLER & 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 microrganismos.

A ausência de informações sobre os aspectos mais refinados do trato digestivo de formigas desta tribo levou-nos a várias perguntas as quais esperamos contribuir com os resultados deste estudo.

Deste modo realizamos o estudo comparado do ventrículo e íleo de três espécies pertencentes ao gênero *Cephalotes*: *Cephalotes atratus*, *C. pusillus* e *C. clypeatus*. Paralelamente estudos da ultra-morfologia do proventrículo foram realizados com intuito de buscar relações entre as três espécies.

1.3- Bactérias simbiontes em formigas

As formigas são de interesse particular não só por causa do papel ecológico diante de muitos ecossistemas terrestres, mas também devido ao fato delas possuírem repertórios impressionantes de comportamentos sociais (HOLLOBLER & WILSON, 1990). Uma das características do sucesso evolutivo das formigas é a habilidade de formarem sociedades complexas com divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia. Além destas interações sociais complexas, elas também mostram a capacidade extraordinária para constituir associações com outros organismos tais como outros insetos, plantas, fungos e bactérias (ZIENTZ et al., 2005).

Limitações impostas pelas plantas ao seu uso como recurso alimentar (defesas químicas e mecânicas), impõe às formigas e a outros insetos a necessidade de possuírem mecanismos que lhes permitam contornar essas limitações. Um dos tipos mais interessantes de mecanismos adotados pelos insetos para lidar com essas limitações é o estabelecimento de relações simbióticas com microrganismos (JONES, 1983). Estas relações que envolvem bactérias, fungos e protozoários, podem variar desde mutualismo até comensalismo (DOUGLAS, 1998; AMANN et al., 1995). Assim, acredita-se que a microbiota intestinal evoluiu como um valioso recurso metabólico para alguns insetos com dietas subnutridas. Para muitas espécies de insetos, a relação com suas microbiotas permanecem indefinidas, a exceção ocorre em cupins, baratas e recentemente formigas, que constituem os trabalhos mais elucidativos a respeito desta relação.

Bactérias simbiontes têm sido descritas em diversas espécies de formigas. No gênero *Camponotus* (SCHRODER et al., 1996), tais bactérias estão situadas no interior de células especializadas denominadas de “bacteriócitos”, presentes no ventrículo. Essas bactérias, primeiramente observadas por Blochmann (1882), apresentam características semelhantes aos “endocytobionts” presentes no ventrículo de *Odontomachus bauri* (Ponerinae) descritas por Caetano et al., (2008).

Embora tenha sido descoberta em torno de vinte anos, a flora bacteriana do aparelho digestivo das formigas da tribo Cephalotini ainda é muito pouco conhecida, tanto no que diz respeito a sua composição quanto ao seu papel. Um dos fatores responsáveis por esta deficiência são as metodologias dependentes de cultivo empregadas nos estudos das comunidades bacterianas que, em geral, não são capazes de detectar todas as bactérias presentes na comunidade. Assim sendo o estudo ora proposto, teve a intenção de buscar maiores informações sobre estas formigas com seus simbiontes pela via ultra-estrutural e

histoquímica de três formigas do gênero *Cephalotes* – as espécies *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*.

A fim de contornar este problema utilizamos para o estudo destas comunidades a técnica PCR/DGGE para amplificação e separação do rDNA 16S bacteriano. Por dispensar a etapa de cultivo, esta técnica permitiu elaborar o perfil da microbiota em estudo.

1.4- Referências bibliográficas

ARAB, A & CAETANO, F. H. Functional ultrastructure of the midgut of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Formicidae: Myrmicinae) Cytobios, 45-53. 2001.

AMANN R. I.; LUDWING, W., SCHLEFER, K. H. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev.59:143–69. 1995.

BILLEN, J. & BUSCINGER, A. Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of Tetraponera ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). Arthropod Struct. Dev. 29, 259–266. 2000.

BLOCHMANN, F. Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, Zbl. Bakt. II. 234-240.1882.

BUTION, M. L.; CAETANO, F. H.; ZARA, F.J. Comparative morphology of the ileum of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology 50, 355–369. 2007.

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. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. Micron 39, 897–909. 2008.

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

CAETANO, F. H. & CRUZ-LANDIM, C. 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. 1985.

- CAETANO, F. H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. and OVERAL, W.L. Anatomia e histologia do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Panaponera clavata* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*, 11/12:125-134. 1986/1987.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), 13: 129-174. 1988.
- CAETANO, F. H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., Tipos de microrganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112. 1989.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. 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. 1990.
- CAETANO, F. H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M. I. Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS, 1775) (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. *Naturalia*, São Paulo, vol. 15, p57-65. 1990.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract of the *Cataulacus* ants: presence of the microorganisms in the ileum. 12TH World Congress on Social Insects. Paris (IUSSI). 391-392. 1994
- CAETANO, F.H; JAFFÉ, K. & ZARA, F.J. 2002. Formigas: biologia e anatomia. Araras: Topázio. 131p.
- CHAPMAN, R. F. *The Insects: structure and function*. New York: American Elsevier. 819p. 1975.
- CRUZ-LANDIM, C. Biologia do desenvolvimento de abelhas. Depto. de biologia, Instituto de Biociências/UNESP, Rio Claro. p 1-67. 2004.
- DILLON R. J. and DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49:71–92. 2004.
- EISNER, T. A. A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ., Cambridge* 116, 441–490. 1957.
- GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. *The Insect. An outline of Entomology*. Blackwell Science, Carlton, 470 p. 2000.
- HOLDOBLER, B. & WILSON, E. O. *The Ants*. London: Springer, p. 436- 467. 2000.
- JEANTET, A.Y. Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de *Formica* (Hymenoptere). *Z. Zellforsch* 116, 24–405. 1971.

- JUNQUEIRA L.C. U & JUNQUEIRA L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed. Santos (São Paulo), 123p. 1983.
- ROCHE, R. K. & WHEELER, D. E. Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohweri* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of morphology*, Tucson, 234: 253-262. 1997.
- SAINSBURY, G. M. & BULLARD, B. New proline-rich proteins in isolated Z-discs, *Biochem. J.* 191: 333-339. 1980.
- SCHRODER, D.; DEPPISCH H.; OBERMAYER, M; KROHNE, G; STACKEBRANDT, E; HOLDOBLER, B; GOEBEL, W; GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus species* (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol. Microbiol.* 1996 Aug;21 (3):479-89. 1996.
- SNODGRASS, R.E. Principles of Insect Morphology, first ed. McGraw-hill, pp. 667. 1935.
- TOMOTAKE, M.E.M.. Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, pp. 129. 1996.
- VAN BORM, S., BUSCHINGER, A., BOOMSMA, J.J. & BILLEN, J. Tetraoponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 296: 2023-2027. 2002.
- VILLARO, A. C., M. GARAYOA, M. J., LEZAUN and P. SESMA. 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. 1999.
- WHEELER, W. N. Ants, their structure, development and behavior. Columbia University, New York. 663pp. 1926.
- WIGGLESWORTH, V. B. The Principles of Insect Physiology. 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827p. 1974.
- ZIENTZ E., HEIKE F. STOLL S., GROSS R. Insights into the microbial world associated with ants. *Arch Microbiol.* 184: 199–206. 2005.

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA COMPARADA DO TRATO DIGESTIVO DE FORMIGAS *CEPHALOTES*

MORFOLOGIA COMPARADA DO TRATO DIGESTIVO DE FORMIGAS *CEPHALOTES*

Resumo: Nós conduzimos estudos morfológicos comparativos do trato digestivo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, buscando descrever semelhanças, assim como diferenças histoquímicas, enzimáticas e ultra-morfológicas tanto da parede como do conteúdo do trato digestivo entre as três espécies, objetivando contribuir para o entendimento entre os simbiossiontes e seus hospedeiros.

Palavras-chave: Microrganismos, Histoquímica, Ultra-morfologia, *Cephalotes*.

Abstract: We conducted comparative morphological studies of the digestive tract of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* and *C. pusillus*, aiming at describing the relationships among these three species, as well as the histochemical, enzymatic, and ultra-morphological differences of the wall and the contents of the digestive tract, therefore contributing for the understanding of the relationships between symbionts and their host.

Keywords: Microorganisms; Histochemistry; Ultramorphology; *Cephalotes*.

1. Introdução:

Aproximadamente 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.

1.1 Proventrículo

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.

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.

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 é um fator que pode auxiliar na determinação de subfamílias e até gêneros dentre as formigas, assim sendo, tem grande importância para estudos de filogenia.

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).

A válvula estomodeal ou cardíaca 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, 1974; CAETANO, 1984, 1988 e 1989).

1.2 Ventrículo

O intestino médio é de origem endodérmica, não sendo, portanto, revestido por cutícula. Entretanto, existe a membrana 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 membrana peritrófica compartimentaliza o intestino médio, permitindo a circulação eficiente de enzimas nos compartimentos endo e ectoperitróficos (TERRA & FERREIRA, 1994 e TERRA et al., 1996; TERRA, 2001).

De acordo com a composição, esta pode ser classificada como gel ou matriz (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA, 2001). A membrana 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 membrana peritrófica. Assim que atinge o espaço endoperitrófico tais vesículas começam a mostrar sinais de desintegração.

O ventrículo nas formigas é composto de uma única camada de células que repousa sobre a 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 (esferocristais) 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).

Outro tipo celular encontrado junto às células digestivas são as células regenerativas. Tais células são pequenas e distribuem-se aos grupos na base das células digestivas sobre a

lâmina basal (CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983; CAETANO, 1984, 1988; CAETANO et al., 2002).

Externamente à lâmina basal são encontradas fibras musculares circulares e longitudinais (SNODGRASS, 1935; CAETANO, 1984 e 1988).

1.3 Íleo

Tipicamente, 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 microrganismos 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 (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975). 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 sendo, ocorre reabsorção de substâncias tais como água, íons e resíduos metabólicos do material contido no lúmen (WIGGLESWORTH, 1974; PHILLIPS, 1981; IRVINE et al., 1988; LECHELEITNER & PHILLIPS, 1989).

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 microrganismos 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 simbiontes no íleo de formigas da tribo Cephalotini, descritos pela primeira vez por Caetano (1984), e adquiridos por meio da trofalaxia abdominal realizada 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, enzimológicos e também ultra-morfológicos.

Assim, nós conduzimos estudos comparativos do íleo, assim como outras porções como o proventrículo e ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, com objetivo de mostrar relações entre as três espécies, bem como, diferenças histoquímicas, enzimológicas e ultra-morfológicas tanto da parede como do conteúdo destas porções do trato digestivo, no intuito de contribuir para o entendimento das relações entre os simbioss e seus hospedeiros.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais:

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-pepira, no município de Brotas, Estado de São Paulo/Brasil.

2.2 Métodos

2.2.1 Ultra-morfologia (MEV):

Os proventrículos, ventrículos e 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 proventrículos, ventrículos e 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 corados 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; Picrossírius red (=Direct red- 80) (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para fibras colágeno; Azul de Bromofenol (PEARSE, 1960) e Xilidine Ponceau (MELLO & VIDAL, 1980), 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 proventrículos, ventrículos e 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

3.1. Proventrículo

A imagem do bulbo do proventrículo mostra uma estrutura de aparência delicada, semelhante a um cogumelo (Figura 1B). Tal característica está de acordo 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 (Figuras 1C a 1F).

As projeções cuticulares são estruturas ocas e são observadas atravessando a camada de material amorfo que as recobre (Figura 1F), 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 observado recobrindo 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 observadas por toda a superfície do bulbo (Figura 1E), para então ser conduzido ao lúmen do proventrículo e posteriormente ao ventrículo.

O teste de H.E. permitiu a visualização histológica do proventrículo, o qual apresenta o bulbo com cutícula de coloração laranja, sendo sulcado em toda a superfície. Nestes sulcos, a cutícula apresenta espinhos com aspecto arborescente (Figura 2A). 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.

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 (Figuras 2B e 2C). Ambas as reações para a detecção de proteínas evidenciam intensa coloração 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 & JUNQUEIRA, 1983) e Azul de Toluidina ácido (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) mostraram reações positivas para polissacarídeos e glicoconjugados. A primeira 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 (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983). 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 (Figuras 2D e 2F).

A técnica Picrossírius red (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), detectou a presença de colágeno e de fibras reticulares delineando toda a região basal das projeções cuticulares do bulbo e pescoço do proventrículo (Figura 2F). 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; 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 e especializada para o processo de seleção de nutrientes. A eficiência deste filtro parece ser otimizada pela presença de uma cobertura amorfa, que reveste toda a superfície do bulbo do proventrículo. A análise histoquímica desta estrutura demonstrou que esta é composta de polissacarídeos e proteínas, os quais são constituintes fundamentais de muco.

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

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

2.2. Ventrículo

O ventrículo é alongado, muito amplo quanto à largura em *C. atratus* (Figura 5D) 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 elevada 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 regenerativas (Figuras 3A e 3C) assim como observado por Caetano & Cruz-Landim (1983) e Caetano (1984, 1988 e 1989) 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, constituindo um epitélio de transição (Figura 3B). Este tipo celular, junto com a válvula cardíaca ou estomodeal, está envolvido na produção da membrana peritrófica, assim como o observado para larvas e adultos das formigas *Ectatoma edentatum* e *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa*, respectivamente (CAETANO, 1988; ZARA & CAETANO, 1998; CAETANO & ZARA, 2001). A membrana 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 *goblet cells* (Figuras 3A, 3C, 3E, 3F)

O epitélio do ventrículo mostra-se com grande quantidade de células regenerativas basófilas com forma globular, constituindo pequenos grupos na base das células digestivas (Figuras 3A e 3C). Esta característica indica que seu citoplasma apresenta grande atividade do retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e RNAs.

As células colunares são altas e geralmente apresentam núcleo na porção mediana (Figuras 3A e 3C), assim como numerosas vesículas que se coram diferentemente pelo H.E., fato que caracteriza estas células como secretoras, assim como descrito por Chapman (1975) e Wigglesworth (1974). Estas, diferentemente das células regenerativas, são estruturas acidófilas, que freqüentemente apresentam as extremidades apicais dilatadas e com vesículas de grande tamanho eliminadas de maneira apócrina (Figuras 3A e 3C). 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 & 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 (Figuras 3A, 3C-3F).

O Azul de Toluidina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983), possibilitou-nos observar fortes reações nas vesículas das células digestivas de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* (Figura 3D).

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 (Figuras 3E e 4A). O resultado apresentado pelas vesículas indica a existência de pequena concentração de proteínas complexadas com polissacarídeos ácidos.

Estudos realizados por Jeantet (1971) com *Formica* e por Caetano (1988) com diversas formigas tais como *Ectatomma quadridens*, *Pachycondyla* (= *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 quimotripsina). Por outro lado, são inúmeras as carboidrases presentes (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 (Figura 3F). Reações de baixa intensidade ao PAS foram encontradas no interior das vesículas, opondo-se as descrições feitas por Caetano (1988) em *E. quadridens*, *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa*, *C. rufipes*, *A. bicolor* e por Jeantet (1971) em estágios larvais até imago de operárias, machos e rainhas de *Formica*. O citoplasma das células digestivas mostrou reações medianas para o PAS, o que pode indicar 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 para detecção de proteínas (Xilidine) e polissacarídeos neutros (PAS) e ácidos (Azul de toluidina). Além destes compostos protéicos detectados, o colágeno foi positivamente corado diante da aplicação da técnica picrossírius red. A presença do colágeno na composição da membrana peritrófica é perfeitamente compreendida, pois sua propriedade possibilita

flexibilidade e resistência a esta estrutura. Reid & Lehane (1984) descrevem outro composto constituinte da membrana 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 (Figura 4B), o que indica a correspondência entre a periferia das vesículas e a membrana peritrófica.

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) (Figura 4B). 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 microrganismos 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 microrganismos 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 (SASAKI & ISHIKAWA 1995; DOUGLAS, 1998).

A atividade das enzimas digestivas está diretamente relacionada 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 (Figura 4C).

Terra (2001), Schumaker et al. (1993) e Wigglesworth (1974) 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 menos ácido perto do ápice das células digestivas do que na região central do lúmen do ventrículo (Figura 4C).

O pH próximo ao neutro perto da região apical das células digestivas pode ser oriundo da secreção de cálcio (Figuras 4D, 4E) mostrado através do teste de von Kossa. A predominância da secreção de cálcio provém 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 (Figura 4E). A intensa secreção de Íons Ca^{++} observada por meio da aplicação da técnica de von Kossa, indica que este composto pode estar relacionado com a estabilização do pH levemente ácido, e assim sendo, pode ser um fator que contribui com a permanência dos microrganismos nesta porção do trato digestivo.

3.3. Íleo

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 possui mesma origem embrionária (ectoderma) que o intestino anterior, mas as células epiteliais são usualmente mais largas e freqüentemente apresentam conspícuas estriações da lâmina basal (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975) e microvilosidades da porção apical (CAETANO, 1989).

A imagem do íleo 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) (Figura 5A). O referido autor descreve o íleo de *C. atratus* como sendo uma estrutura portadora de profundas dobras na íntima em direção ao lúmen (Figura 5B). Esta característica, somada a grossas camadas de musculatura circular e longitudinal, além da grande quantidade de traqueólas 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.

O íleo para as três espécies em estudo apresentam aspecto muito semelhante ao proventrículo quando em corte transversal (Figura 5B). Ambas as estruturas são de origem ectodérmicas e, portanto, são revestidas por cutícula (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975). Entretanto, a cutícula presente sobre 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, 1974; CHAPMAN, 1975; PHILLIPS, 1977; 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.

A massa de material fibroso presente no íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* é constituída de microrganismos e foi descrita por Caetano (1984, 1988, 1989 e 1990) e Caetano & Cruz-Landim (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 simbiontes. Jaffé et al., (2001) estudando *C. atratus* e *C. pusillus*, observou interações metabólicas entre os microrganismos e seus hospedeiros.

Em geral, as formigas alimentam-se de fluídos ricos em polissacarídeos e ou lipídios, desta maneira a presença de microrganismos no íleo seria necessária para a complementação de sua dieta (CAETANO, 1989; ROCHE & WHEELER, 1997). Jones (1983) propõe 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.

Para estes autores, fica claro que a procura de fezes de pássaros seja destinada ao suprimento da demanda de compostos nitrogenados, os quais seriam utilizados pelos microrganismos presentes no ventrículo (BUTION et al., 2006) e íleo (BUTION & CAETANO, 2008). Os compostos nitrogenados ao serem assimilados pelos microrganismos podem fornecer como subproduto de seu metabolismo alguns sais e aminoácidos que carecem nas dietas destas formigas, as quais são onívoras.

Em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, a região de passagem do ventrículo para o íleo é delimitada de um lado pela válvula pilórica, e de outro por uma dobra do epitélio (segunda válvula) (Figura 6A e 6B). 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 se observa a presença de microrganismos, como já descrito nos

trabalhos de Caetano anteriormente mencionados. Caetano (1984) a denominou de “bexiga”. O epitélio da segunda válvula apresenta-se com característica secretora (Figura 6B), mas sua real função permanece desconhecida.

O pH do conteúdo do trato digestivo é uma importante propriedade que a princípio poderia afetar os microrganismos aí presentes. O íleo apresenta-se ligeiramente mais ácido que o ventrículo e 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 os autores, 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) (Figura 6C). Este pH levemente ácido no lúmen do íleo deve estar relacionado com a liberação de cálcio no ventrículo que chega até o íleo, o qual foi detectado com a técnica de von Kossa (Figura 6D) para este íon. Assim sendo, este pH levemente ácido (corrigido pelo cálcio aí presente) pode explicar a permanência destes microrganismos 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 & CAETANO, 2008). 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, 1974; 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 microrganismos no reto, somada a fortes reações para o caráter ácido observados mediante a técnica de tricrômico de Mallory, evidenciam um provável decréscimo no gradiente do pH, quando comparado ao íleo ou a qualquer outra região do trato digestivo. Estas condições na região do reto parecem ser mais austeras para os microrganismos 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 (Figura 6E), 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 permitem 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 de colágeno nos tecidos dos insetos.

Xilidine Ponceau e azul de bromofenol foram utilizadas na detecção de proteínas totais, ambas as técnicas mostraram reações de intensidade média para o epitélio e o lúmen. Entretanto, tanto a lâmina basal quanto a massa de microrganismos contida no lúmen, mostraram fortes reações a estas técnicas (Figuras 6F e 7A).

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 (Figuras 7B e 7C). Entretanto, vesículas presentes neste epitélio foram fortemente coradas apenas para o PAS, indicando serem estas, compostas basicamente de polissacarídeos neutros (Figura 7C).

Acreditamos que 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* (Figura 7D).

Na região proximal do íleo, onde as células epiteliais são baixas, o teste de ATPase detectou a presença desta enzima próxima à lâmina basal (Figura 7E). 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 microrganismos. 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 (Figura 7F).

Esta afirmação encontra apoio em (CAETANO, 1989) para o íleo de *Pachycondyla villosa*, o qual apresenta na sua porção inicial células sem microvilosidades. Essas células possuem invaginações da membrana basal bastante pronunciada e com muitas 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 & Wheeler (1997) e Villaro (1999) respectivamente, mostram características semelhantes às descritas por Caetano (1989), indicando ser este o padrão ultra-estrutural comum dentre os Formicidae.

A presença maciça de microrganismos 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 é uma estrutura bastante especializada e adaptada para abrigar microrganismos, estabelecendo com eles uma legítima simbiose.

4. Figuras

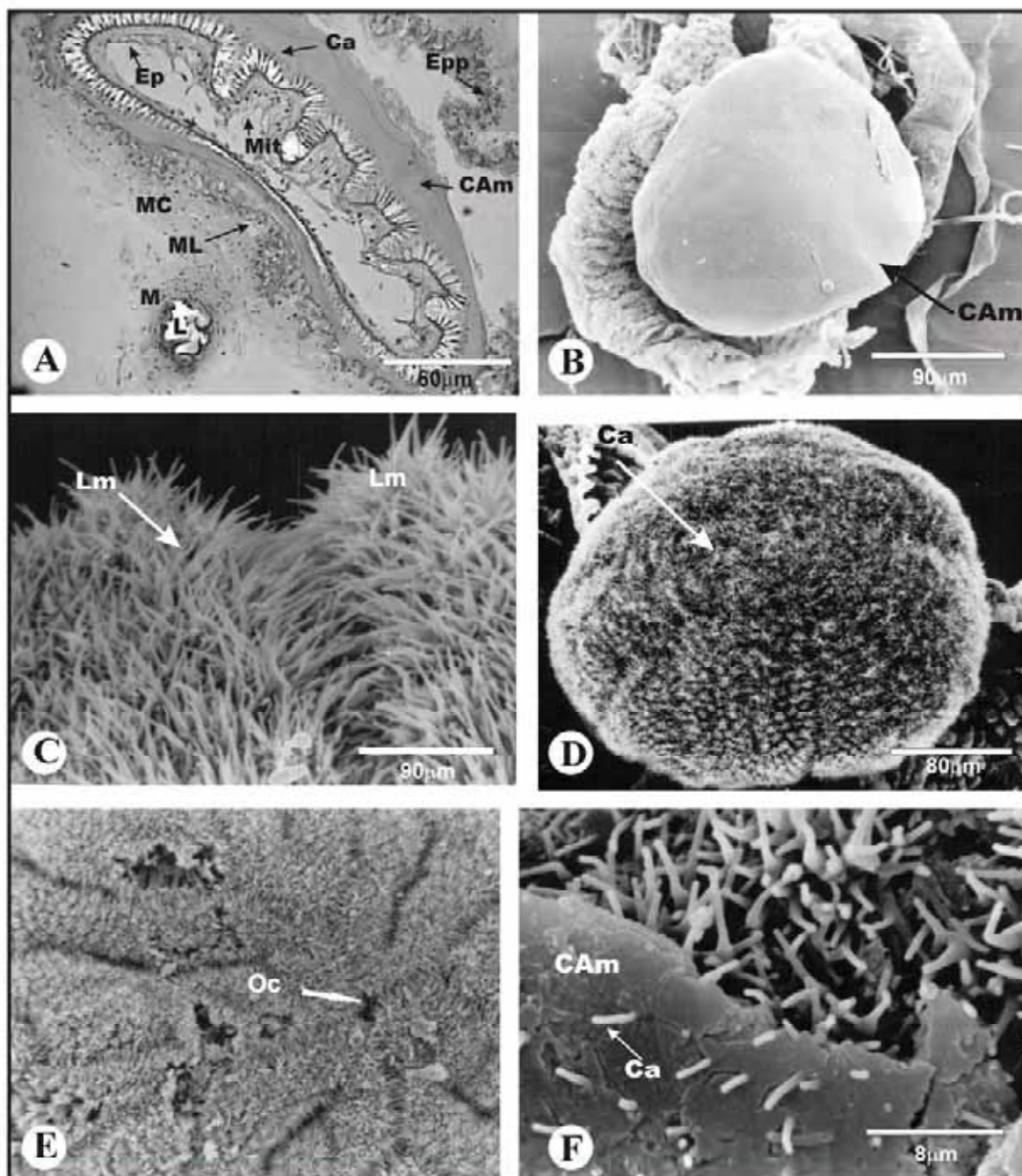


Figura 1. (A) Corte longitudinal do proventrículo de *C. atratus* (cutícula arborescente - **ca**; camada de material amorfo que recobre o bulbo - **Cam**; epitélio do bulbo - **Ep**; epitélio do papo - **Epp**; lúmen - **L** e musculatura - **M** do pescoço, musculatura circular - **MC**; longitudinal - **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 os lábios móveis - **Lm**. (E) MEV da superfície do proventrículo de *C. clypeatus*; mostrando estriações que conduzem ao pescoço do proventrículo; orifício central (**Oc**). (F) MEV de projeções cuticulares atravessando a camada que o recobre; a cutícula arborescente parece fornecer sustentação a esta camada.

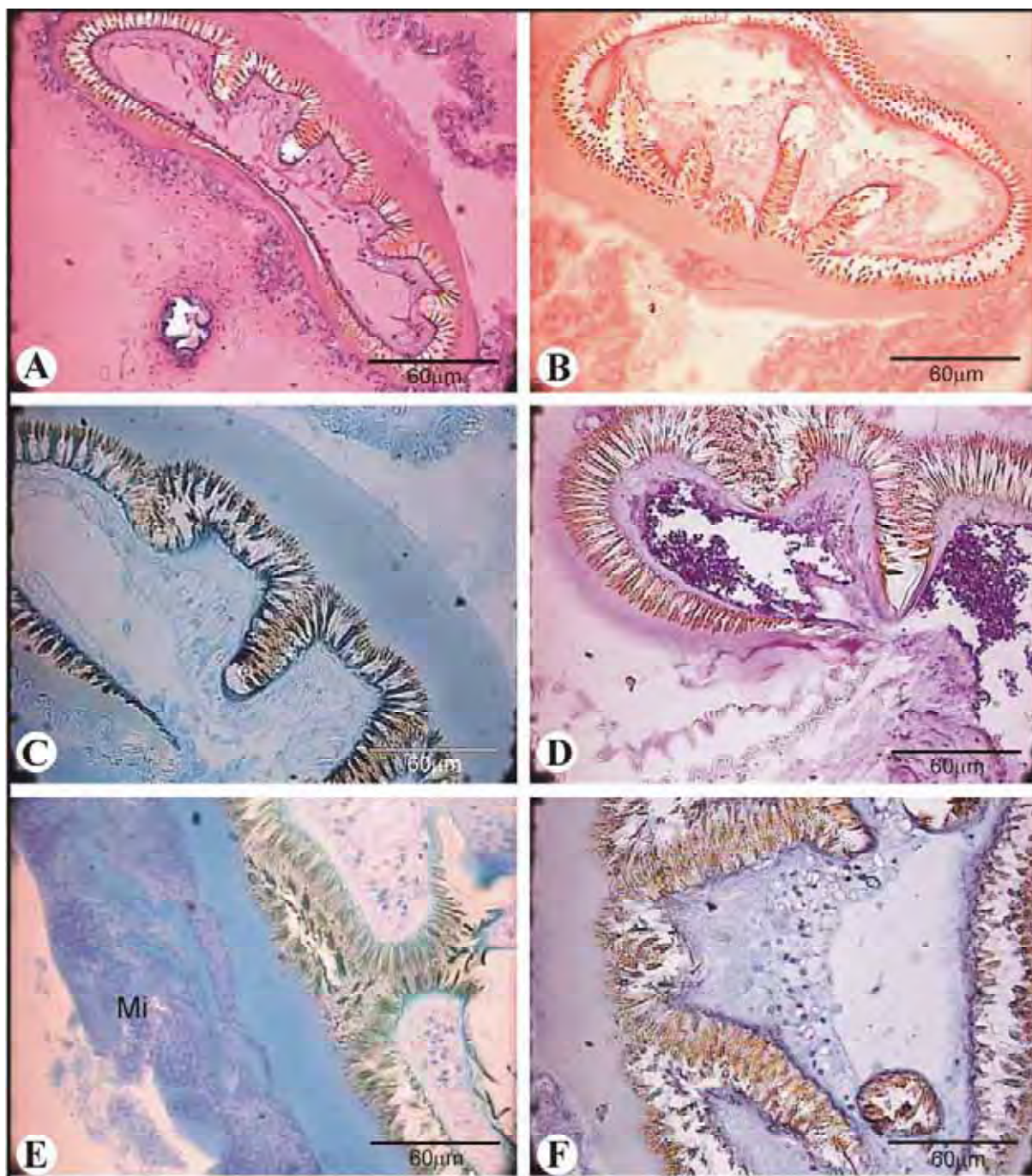


Figura 2. Cortes longitudinais do proventrículo de *C. atratus*, mostrando diversas reações para as técnicas utilizadas. (A) H.E; (B) Xilidine Ponceau (para proteínas totais); (C) Azul de Bromofenol (para proteínas); (D) PAS (para polissacarídeos); (E) Azul de Toluidina ácido (para polissacarídeos);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

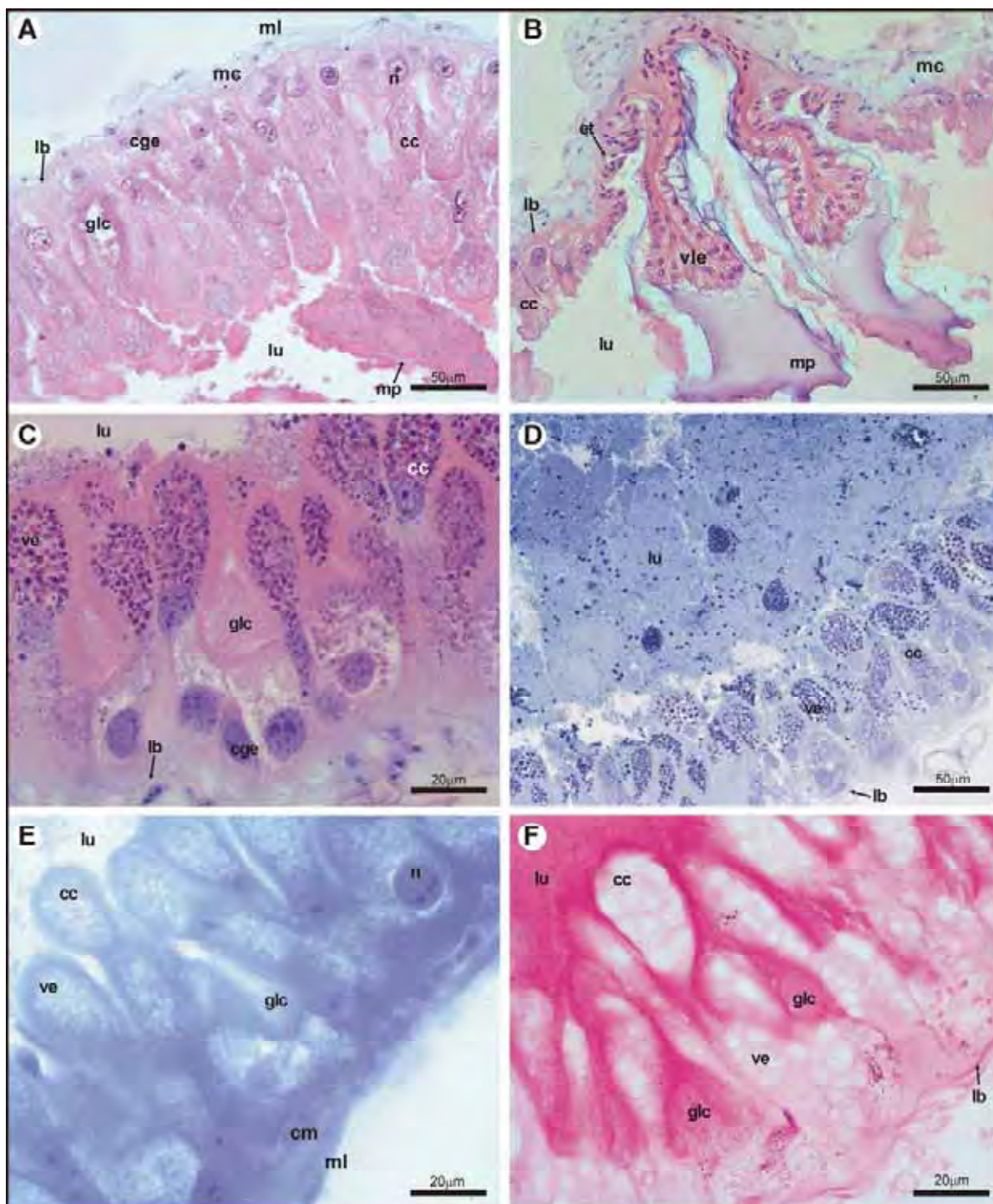


Figura 3- Cortes histológicos do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. **(A)** H.E. em *C. clypeatus*: O epitélio mostrando as células colunares (cc), as células regenerativas (cge) e as "goblet cells" (glc), sobre a lâmina basal (lb). A musculatura circular interna (mc), 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 regenerativas (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).

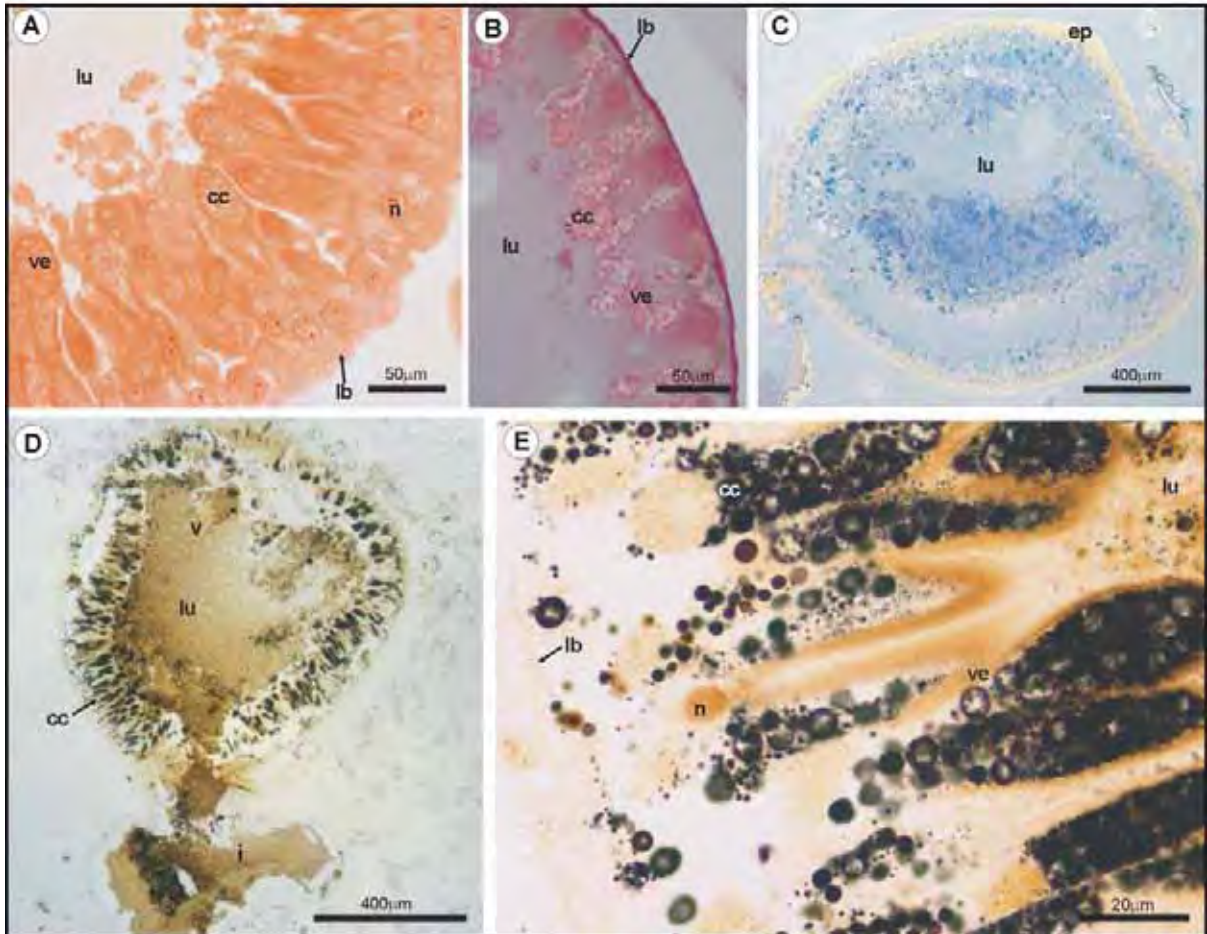


Figura 4. (A) Xilidine Ponceau em *C. pusillus*: As vesículas (ve) foram fracamente coradas. (B) Picrossírius red em *C. pusillus*: A forte reação na lâmina basal (lb), indicando a presença de colágeno. (C) Tricrômico de Mallory em *C. atratus*: As células epiteliais (ce) estão em amarelo (pH básico) e o lúmen levemente ácido-azul-(lu). (D) von Kossa em *C. atratus*: Observe as reações positivas nas vesículas (ve), mostrando a secreção de cálcio pelas células colunares (cc). (E) Detalhe da figura anterior.

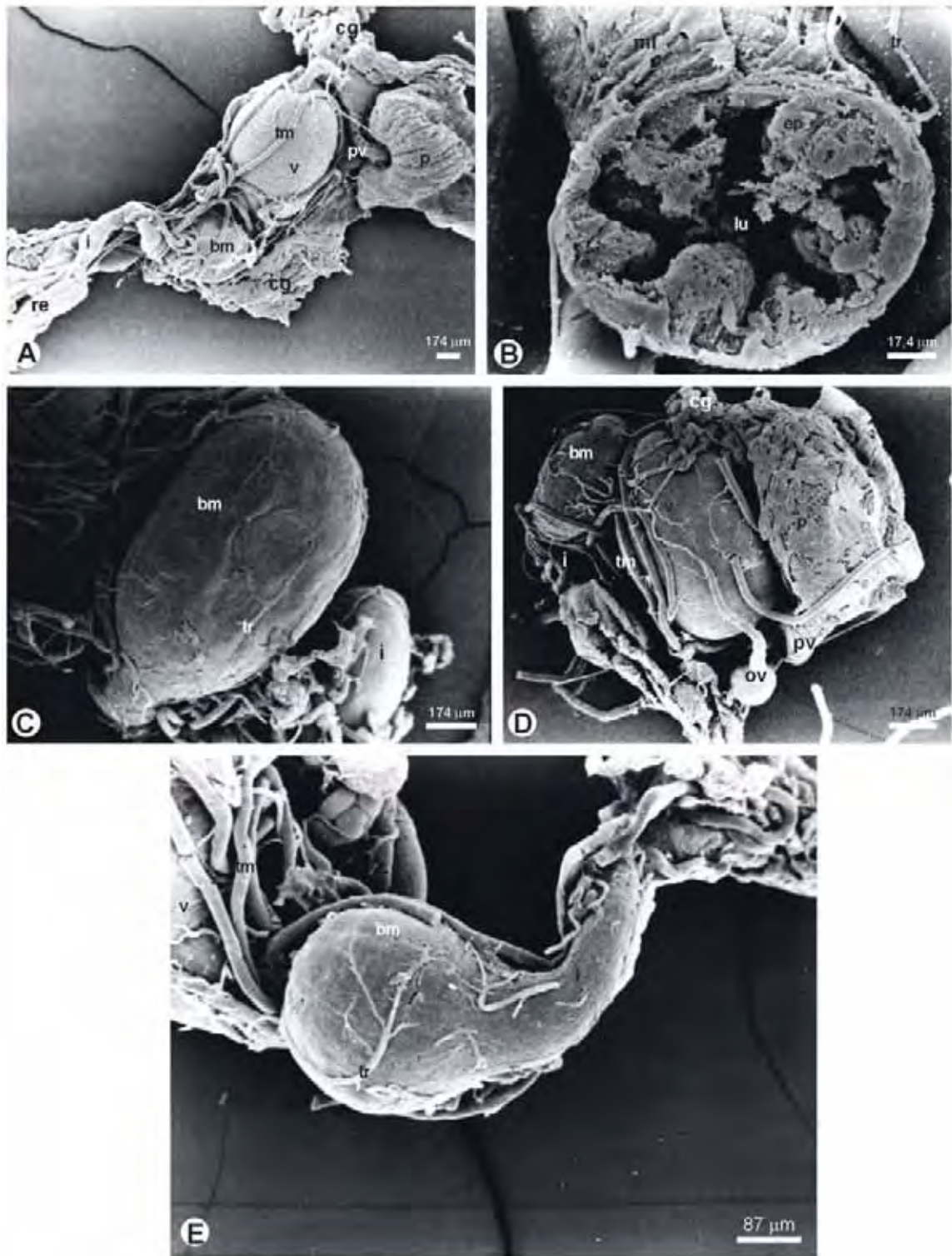


Figura 5- Comparação do trato digestivo de formigas *Cephalotes*. **(A)** Visão geral do trato digestivo de *Cephalotes pusillus*, mostrando: o papo (p), proventrículo (pv), o corpo gorduroso (cg), ventrículo (v), túbulos de Malpighi (tm), íleo (i), bolsa de microrganismos (bm) e o reto(re). **(B)** 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 microrganismos. **(C)** Vista da dilatação na região anterior do íleo em *C. atratus*. Esta, denominada de bolsa de microrganismos. **(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 microrganismos (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.

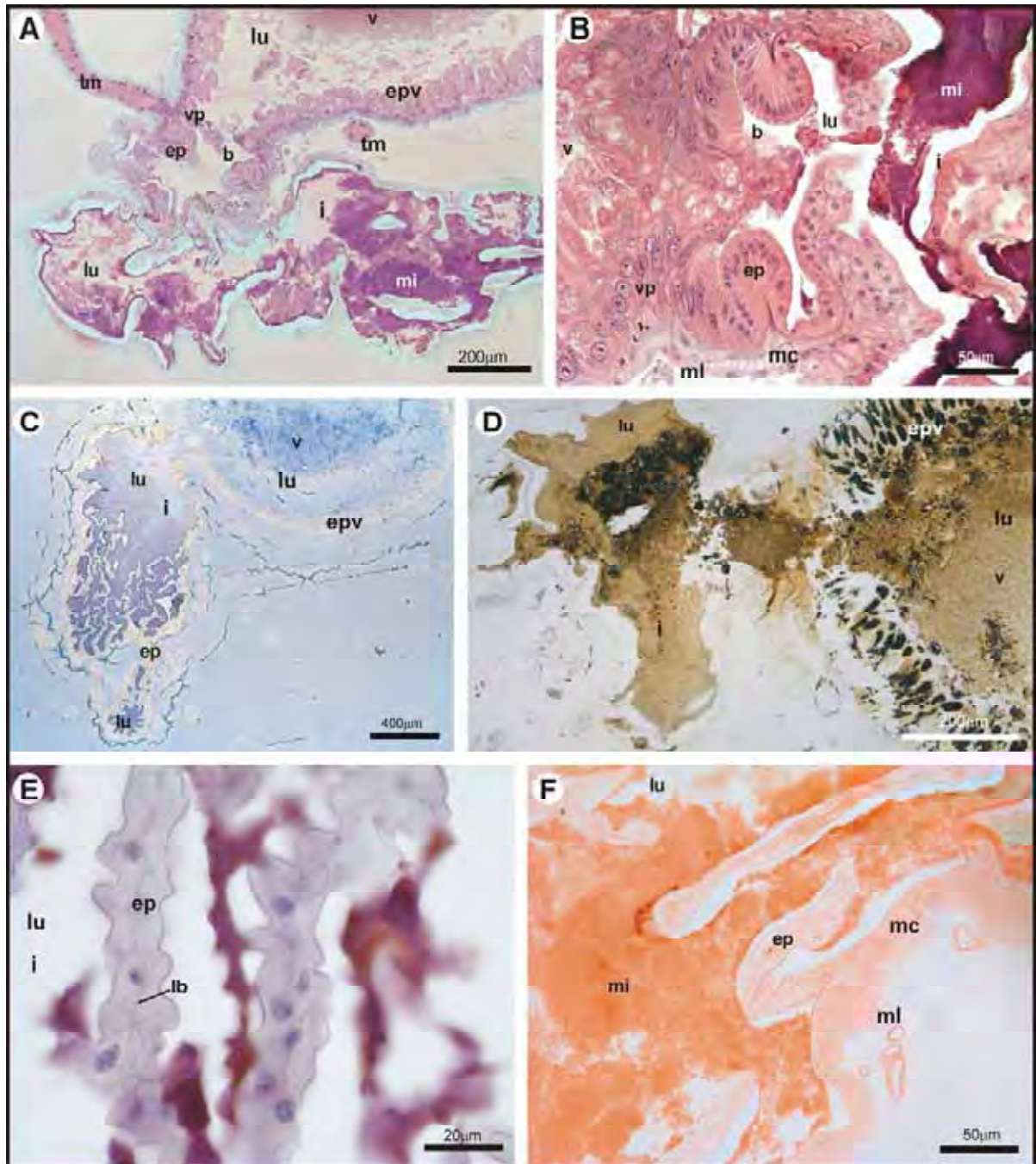


Figura 6- Secções histológicas do íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. **(A)** H-E em *C. clypeatus*. Visão geral mostrando parte do epitélio do ventrículo (epv), a bexiga (b), os túbulos de Malpighi (tm) desembocando nesta região, íleo (i) com a presença de microrganismos (mi) 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 microrganismos (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 microrganismos apresentam fortes reações para esta técnica.

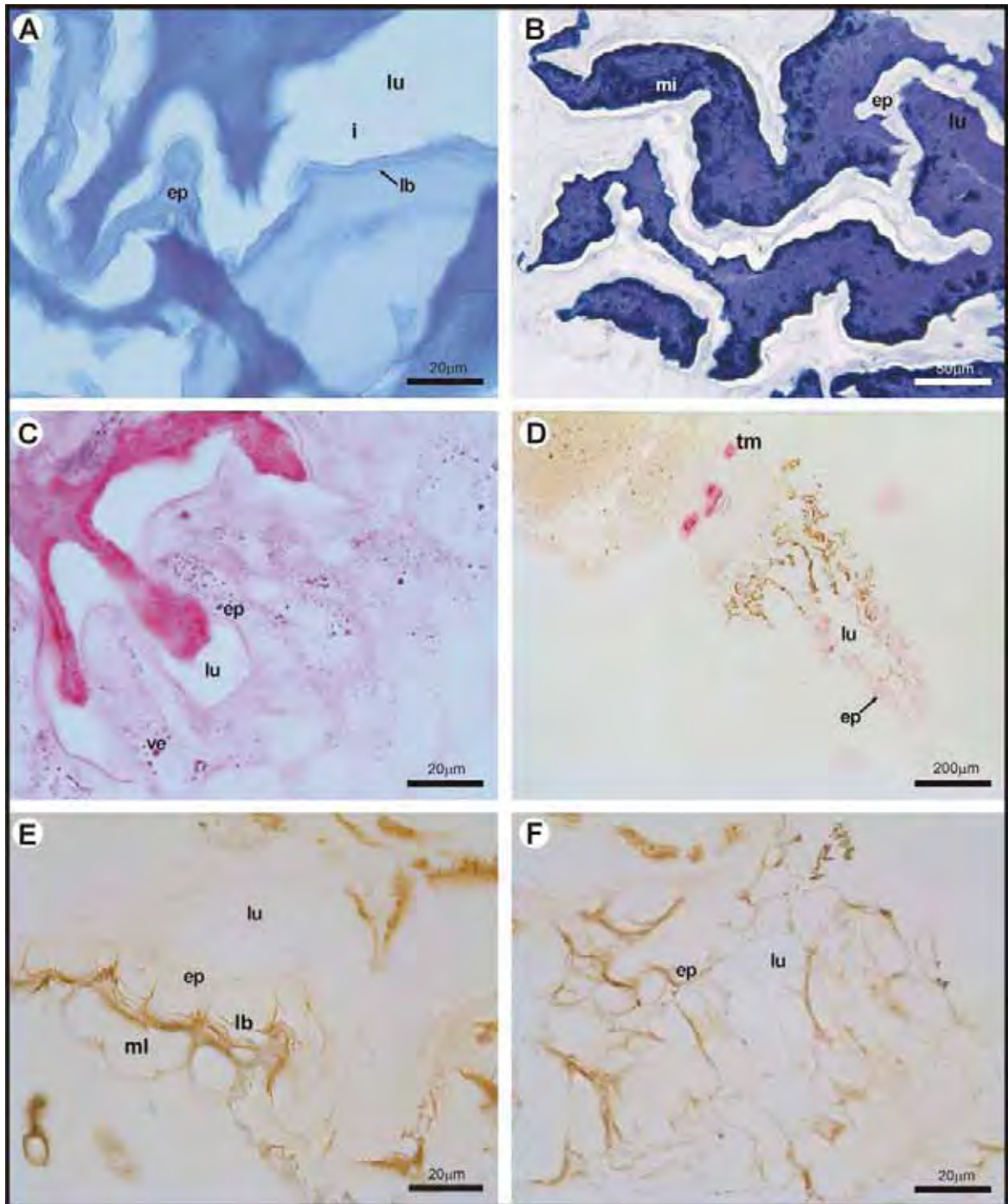


Figura 7. (A) Azul de bromofenol em *C. atratus*: o epitélio apresenta reações medianas, enquanto que o lúmen possui fortes reações. (B) Azul de toluidina em *C. atratus*: Reações fortes nos microrganismos (mi) e lúmen (lu), entretanto o epitélio (ep) possui reações medianas. (C) PAS em *C. atratus*: Os mesmos resultados da figura anterior também são vistos aqui, entretanto, há a presença de vesículas no citoplasma. (D) Fosfatase ácida em *C. pusillus*: Note a presença destas enzimas por todo o epitélio (ep) e túbulos de Malpighi (tm). (E) ATPase em *C. pusillus*: A presença destas enzimas na região proximal do íleo são observadas na lâmina basal (lb). (F) 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.

5. Referências bibliográficas

- BLOCHMANN, F. Ueber das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. Zbl. Bakt. II 234–240. 1882.
- 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. (Eds.), Chemistry and Biology of Social Insects. Verlag J. Perperny Verlag, Munich, p. 631. 1987
- BUTION, M. L., CAETANO, F. H. Comparative study of the histology, histochemistry and ultramorphology of the proventriculus in the Cephalotini tribe (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 46 (1), 185–193. 2005.
- BUTION, M. L., CAETANO, F. H., FABIO, B.B., GIOVANA, A.T.-G., ZARA, F.J. Histology and histochemistry of the ventriculus *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* (Olivier, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). Micron 37, 249 – 254. 2006.
- BUTION, M. L., CAETANO, F.H., ZARA, F. J. Comparative morphology of the ileum of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology 50, 355–369. 2007.
- BUTION, M. L., CAETANO, F. H., ZARA, F. J. Comparative morphology of the midgut of three species of *Cephalotes* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology 50, 725–737. 2007.
- BUTION, M. L. & CAETANO, F. H. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. Micron 39, 897–909. 2008.
- CAETANO, F. H., LAGE-FILHO, A.L. Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). Naturalia (São Paulo) 7, 125–134. 1982.
- CAETANO, F. H., CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae). Naturalia 8, 91–100. 1983
- CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae). Pap. Avulsos Zool. (São Paulo) 35, 257–305. 1984.
- CAETANO F. H., CRUZ-LANDIM. 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, 1985.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). Naturalia (São Paulo) 13, 129–174. 1988.

- CAETANO, F. H., TOMOTAKE, M.E., PIMENTEL, M.A.L., CAMARGO MATHIAS, M. I. Tipos de microrganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. In: XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, vol. 1. pp. 111–112. 1989.
- CAETANO, F. H., TORRES, A. H., CAMARGO, M.M.I., TOMOTAKE, M.E.M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios*, Cambridge, 235–242. 1994
- CAETANO, F. H., ZARA, F. J. Ultramorphology and hystology of the foregut and midgut of *Pachycondyla* (= *Neopera*) *villosa* (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae). *J. Hymenoptera Res.* 10, 251–260. 2001.
- CAETANO, F. H., JAFFÉ, K., ZARA, F. J. Formigas: biologia e anatomia. Topázio, Araras, 131 pp. 2002.
- CHAPMAN, R. F. The Insects: Structure and Function. American Elsevier, New York, 819 pp. 1975.
- CRUZ-LANDIM, C. Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera; Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. *ACIESP.* n. 31. 1981.
- ANDRADE, M.L., BARONI-URBANI, C. Diversity and adaptation in the ant genus *Cephalotes*, past and present (Hymenoptera, Formicidae). *Stuttgarter Beitrage Naturkunde Ser. B (Geol. Palaontol.)* 271, 1–889. 1999.
- EARTHAL, M.J., CARLOS, P.S., RICHARD, I.S. Digestive enzymes of leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *J. Insect Physiol.* 50, 881–891. 2004.
- EISNER, T. A. A comparative morphological study of the proventriculus of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ., Cambridge* 116, 441–490. 1957.
- GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. The Insect. An outline of Entomology. Blackwell Science, Carlton, 470 p. 2000.
- IRVINE, B., AUDSLEY, R.L., MEREDITH, J., THOMSON, B., PHILLIPS, J. Transport properties of locust ileum in vitro: effects of cyclic AMP. *J. Exp. Biol.* 137, 361–385. 1988.
- JAFFÉ, K., CAETANO, F.H., SANCHES, P., HERNADEZ, J.V., CARABALLO, L., FLORES, J.V., MONSALVE, W., DOERTAL, B., VIDAL, R.L.. Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Can. J. Zool.* 79 (6), 1120–1124. 2001.

- JEANTET, A.Y. Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de *Formica* (Hymenoptere). *Z. Zellforsch* 116, 24–405. 1971.
- JONES, C.G.. 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*. pp. 53–99. 1983.
- JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Santos, São Paulo, p. 123. 1983.
- KEMPF, W.W. A taxonomic study on the ant tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Entomol. (RioJ.)* 22, 1–244. 1951.
- KEMPF, W.W. A new *Zacryptocerus* from Brazil, with remarks on the generic classification of the tribe Cephalotini (Hymenoptera: Formicidae). *Stud. Entomol.* 16, 449–462. 1973.
- LECHLEITNER, R.A., PHILLIPS, J. E. Effects of corpus cardiacum, ventral ganglia, and proline on absorbate composition and fluid transport by locust hindgut. *Can. J. Zool.* 67, 2669–2675. 1989.
- LEHANE, M. J., BILLINGSLEY, P. F. *Biology of the Insect Midigut*. Chapman & Hall, 486 p. 1996.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L., COX, M.M. *Principles of Biochemistry*, 2nd ed. Worth, New York, p. 3009. 1993.
- LEWIS, P. R., KNIGHT, D. P. Staining methods for sectioned material. In: Glauert, A.M. (Ed.), *Practical Methods in Electron Microscopy*, vol.5 Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 1–311 (Part I). 1977
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry: Theoretical and applied*. J. & A. Churchill Ltd., London, p. 326. 1960.
- PHILLIPS, J. E. Excretion in insects: function of gut and rectum in concentrating and diluting the urine. *Fred Proc.* 36, 2480–2486. 1977.
- PHILLIPS, J. E. Comparative physiology of insect renal function. *Am. J. Physiol.* 241, 241–257. 1981.
- PHILLIPS, J. E. HANRAHAN, J., CHAMBERLIN, M., THONSOM, B. Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut. *Adv. Insect Physiol.* 19, 330–422. 1986.
- REID, G.D.P., LEHANE, M. J. 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. 1984.

- ROCHE, R.K., WHEELER, D.E. Morphological specializations of the digestive tract of *Zacryptocerus rohweri* (Hymenoptera, Formicidae). J. Morphol. (Tucson) 234, 253–262. 1997.
- SCHRODER, D., DEPPISCH, H., OBERMAYER, M., KROHNE, G., STACKEBRANDT, E., HOLLDÖBLER, B., GOEBEL, W., GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. Mol. Microbiol. 21 (3), 479–489. 1996.
- SCHUMAKER, T.T.S., CRISTOFFOLETTI, P.T., TERRA, W. Properties and compartmentalization of the digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. Apidologie, vol. 24. Elsevier, pp. 3–17. 1993.
- SNODGRASS, R.E. Principles of Insect Morphology, first ed. Mcgraw-hill, pp. 667. 1935.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109-b, 1–62. 1994.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C., BAKER, J. E. In: Lehane, Billingsley, (Eds.), Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, pp. 206–231. 1996.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the Insect Peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 47–61. 2001.
- TOMOTAKE, M.E.M.. Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, pp. 129. 1996.
- WIGGLESWORTH, V. B. The Principles of Insect Physiology, 7th ed. Chapman and Hall, London, pp. 827. 1974.

CAPÍTULO 2

**CONTRIBUIÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI PARA A
MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS SIMBIONTES EM
FORMIGAS *CEPHALOTES*.**

CONTRIBUIÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI PARA A MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS SIMBIONTES EM FORMIGAS *CEPHALOTES*.

Resumo: Baseado na importância fisiológica dos túbulos de Malpighi para a homeostase nas formigas, este estudo objetivou caracterizar a enzimologia, a histologia, a histoquímica e a ultra-morfologia dos túbulos de Malpighi de operárias de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, visando contribuir para o entendimento deste órgão nas formigas acima mencionadas e assim poder esclarecer como os túbulos de Malpighi contribuem para a manutenção de microrganismos simbiotes no íleo destas formigas.

Palavras-chave: Túbulos de Malpighi, formigas, microrganismos simbiotes, íleo.

Abstract: Given the physiological importance of the Malpighian tubules to homeostasis in ants, this study aimed to characterize the enzymology, histology, histochemistry, and ultramorphology of the Malpighian tubules of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus*, as a contribution for the understanding of this organ, as well as to examine its role in the maintenance of symbiotic microorganisms in the ileum of these ants.

Keywords: Malpighian tubules, Ants, Symbiotic microorganisms, Ileum

1. INTRODUÇÃO

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 microrganismos presentes no trato digestivo de formigas da tribo Cephalotini estudadas por Caetano (1984, 1988) e Caetano & Cruz-Landim (1985), as quais consistem de uma complexa população de bactérias e fungo.

A presença e a função de simbiotes no íleo de formigas da tribo Cephalotini, descritos pela primeira vez por Caetano (1984), e adquiridos por meio da trofalaxia 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 ultra-morfológico.

Assim, foram realizados estudos com os túbulos de Malpighi de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, com objetivo de mostrar relações entre as três espécies, bem como, diferenças histoquímicas, enzimológicas e ultra-morfológicas tanto da parede como do conteúdo desta porção do sistema excretor, no intuito de contribuir para o entendimento das relações entre os simbiossiontes e seus hospedeiros.

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-pepira, no município de Brotas, Estado de São Paulo/Brasil.

2.2 Métodos

2.2.1 Ultra-morfologia (MEV):

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

2.2.2 Histologia:

As formigas foram dissecadas e fixadas 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, 1983) 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 (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983) para fibras colágeno; Azul de Bromofenol (PEARSE, 1960) e Xilidine Ponceau (MELLO & VIDAL, 1980), 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 túbulos de Malpighi 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

Nas espécies estudadas, existem seis túbulos de Malpighi com a extremidade distal livre na cavidade do corpo (Figuras 1, 1a e 2). Histologicamente, os túbulos de Malpighi possuem células piramidais ou cúbicas, com núcleos na posição mediana ou basal, no qual se observa a presença de um a três nucléolos (Figuras 4 e 4A). Em corte transversal nota-se que os túbulos de Malpighi possuem até oito células formando seu diâmetro (Fig. 4A).

Em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, a região de passagem do ventrículo para o íleo (piloro), é delimitada de um lado pela válvula pilórica, e de outro por uma dobra do

epitélio (epitélio glandular) (Figura 3). Nesta região, entre a válvula pilórica e o epitélio glandular, desembocam os túbulos de Malpighi. Após a segunda dobra do epitélio, o íleo se estreita abruptamente e em seguida alarga-se, formando uma bolsa na qual, observa-se à presença de microrganismos, como já descrito nos vários trabalhos de Caetano, anteriormente mencionados. A função do epitélio com característica secretora (Figura 3) permanece desconhecida.

O pH ácido do íleo parece ser corrigido pela ação do cálcio excretado pelas células dos túbulos de Malpighi e pelas células do ventrículo (CHAPMAN, 1975; BUTION *et al.*, 2007). Tal hipótese encontra apoio no fato dos esferocristais serem comuns no ventrículo e nos túbulos de Malpighi, mas não serem observados no lúmen do íleo (Figuras 6, 7, 8). O pH levemente ácido pode facilitar a presença dos microrganismos nesta região (Figura 9).

O teste de Picrossírius red (colágeno) obteve fortes reações na região onde desembocam os túbulos de Malpighi (Figura 5). A presença de colágeno na região de conexão do íleo com os túbulos de Malpighi confere resistência a esta região, particularmente por ser sujeita a tração. A flexibilidade e resistência desta região permitem a livre movimentação da extremidade distal dos túbulos de Malpighi na hemolinfa, pela ação da musculatura helicoidal aí presente, sem o comprometimento por ruptura na extremidade proximal.

Xilidine ponceau e azul de bromofenol foram utilizadas na detecção de proteínas totais, ambas mostraram reações de intensidade média para o epitélio e o lúmen, embora o azul de bromofenol tenha apresentado fortes reações para vesículas presentes em seu citoplasma. Tanto a lâmina basal, quanto à massa de microrganismos contida no lúmen, mostraram fortes reações a estas técnicas (Figuras 10 e 15).

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 (Figuras 14 e 16). Entretanto, vesículas presentes neste epitélio foram fortemente coradas apenas para o PAS, indicando serem estas, compostas basicamente de polissacarídeos neutros.

A técnica para enzimas de fosfatase ácida detectou a presença deste grupo de enzimas por todo o epitélio dos Túbulos de Malpighi de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, indicando a abundante presença destes compostos, os quais propiciam a quebra entre ligações fosfato-éster (Figura 13). Estes metabólitos, oriundos do material contido na hemocèle, podem ser estocados e ou simplesmente excretados (WIGGLESWORTH, 1974; PHILLIPS,

1981). Entretanto há indícios que os microrganismos presentes no lúmen do íleo estejam metabolizando estas excretas, onde os subprodutos deste podem ser reabsorvidos no íleo e nas papilas retais (BUTION *et al.*, 2007).

O teste de ATPase detectou a presença desta enzima próxima à lâmina basal (Figuras 11 e 12). Isto indica que esta região está relacionada com a absorção de substâncias da hemolinfa, as quais são dirigidas para o lúmen, onde são liberadas e reaproveitadas pelos microrganismos, como descrito por Bution *et al.*, (2007) para a região anterior do íleo.

Os resultados enzimológicos e histoquímicos apresentaram o mesmo padrão para todas as espécies. A presença maciça de microrganismos no íleo da tribo Cephalotini, frente às adaptações morfológicas que garantem o elevado suprimento de metabólitos oriundos dos túbulos de Malpighi, somada à capacidade absorptiva e digestiva observada nas células epiteliais do íleo (BUTION *et al.*, 2007), nos leva a acreditar que esta região do trato digestivo estabelece com os microrganismos, uma legítima simbiose, o que leva a otimização dos recursos alimentares explorados por estas formigas bem como aqueles oriundos das vias de excreção.

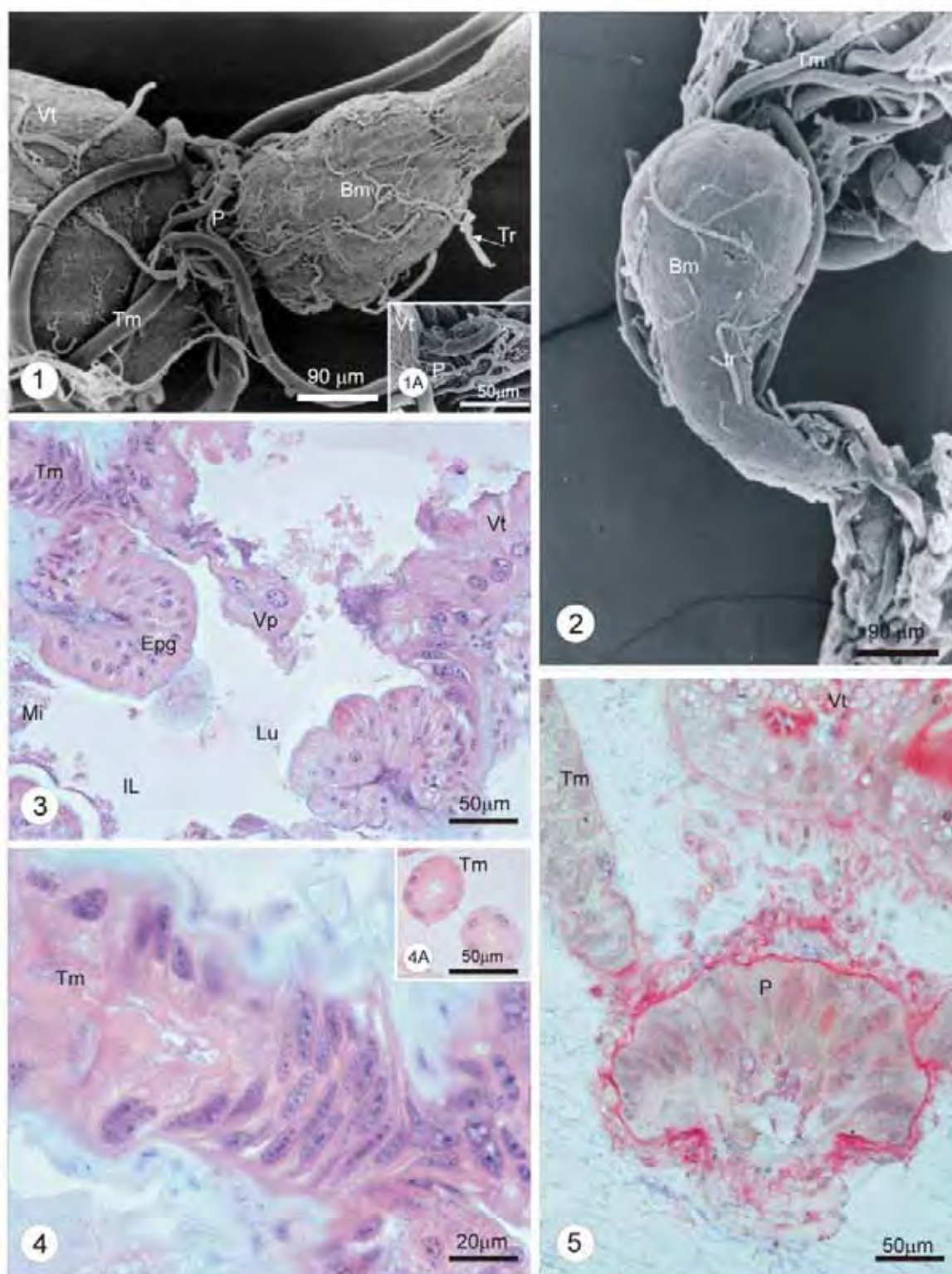
4. Conclusões

É sabido que os hábitos alimentares das espécies da tribo Cephalotini podem incluir fezes úmidas de pássaros, líquidos extraídos de homópteros, carniça e pólen. Os compostos, parcialmente oriundos dos túbulos de Malpighi, ao serem assimilados pelos microrganismos podem fornecer como subproduto, alguns sais e aminoácidos ausentes na dieta destas formigas, como previamente descrito por Jaffé *et al.*, (2001).

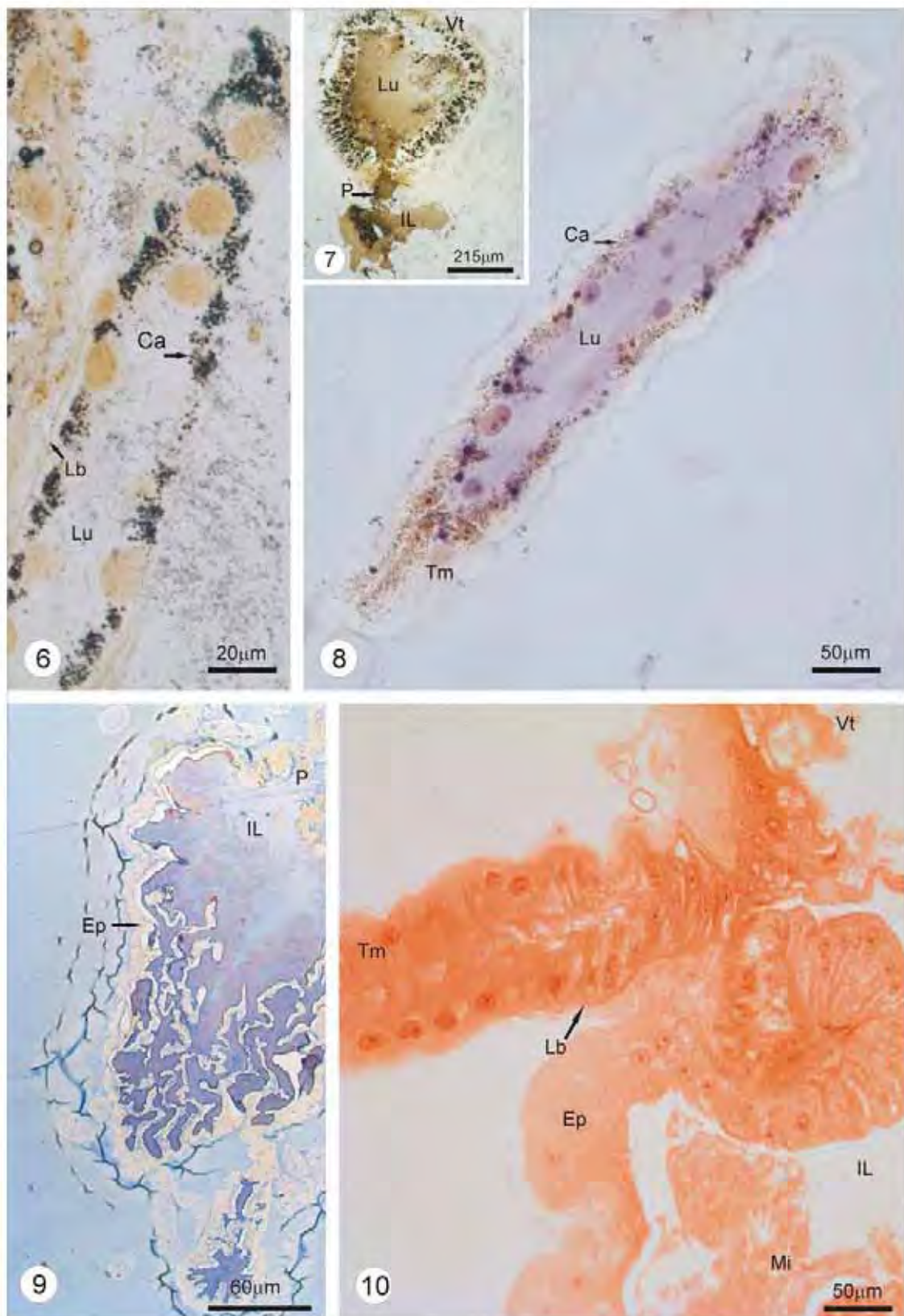
A flexibilidade e resistência desta região de conexão dos túbulos de Malpighi no íleo são provavelmente conferidas pela grande concentração de colágeno, permitindo desta maneira, a livre movimentação da extremidade distal dos túbulos de Malpighi na hemolinfa, através da presença da musculatura helicoidal nesta estrutura, sem que haja comprometimento por ruptura na extremidade proximal.

Os dados apresentados e discutidos indicam que a adaptação estrutural presente no íleo de formigas da tribo Cephalotini, deve estar relacionada com a utilização de materiais oriundos do ventrículo e dos túbulos de Malpighi.

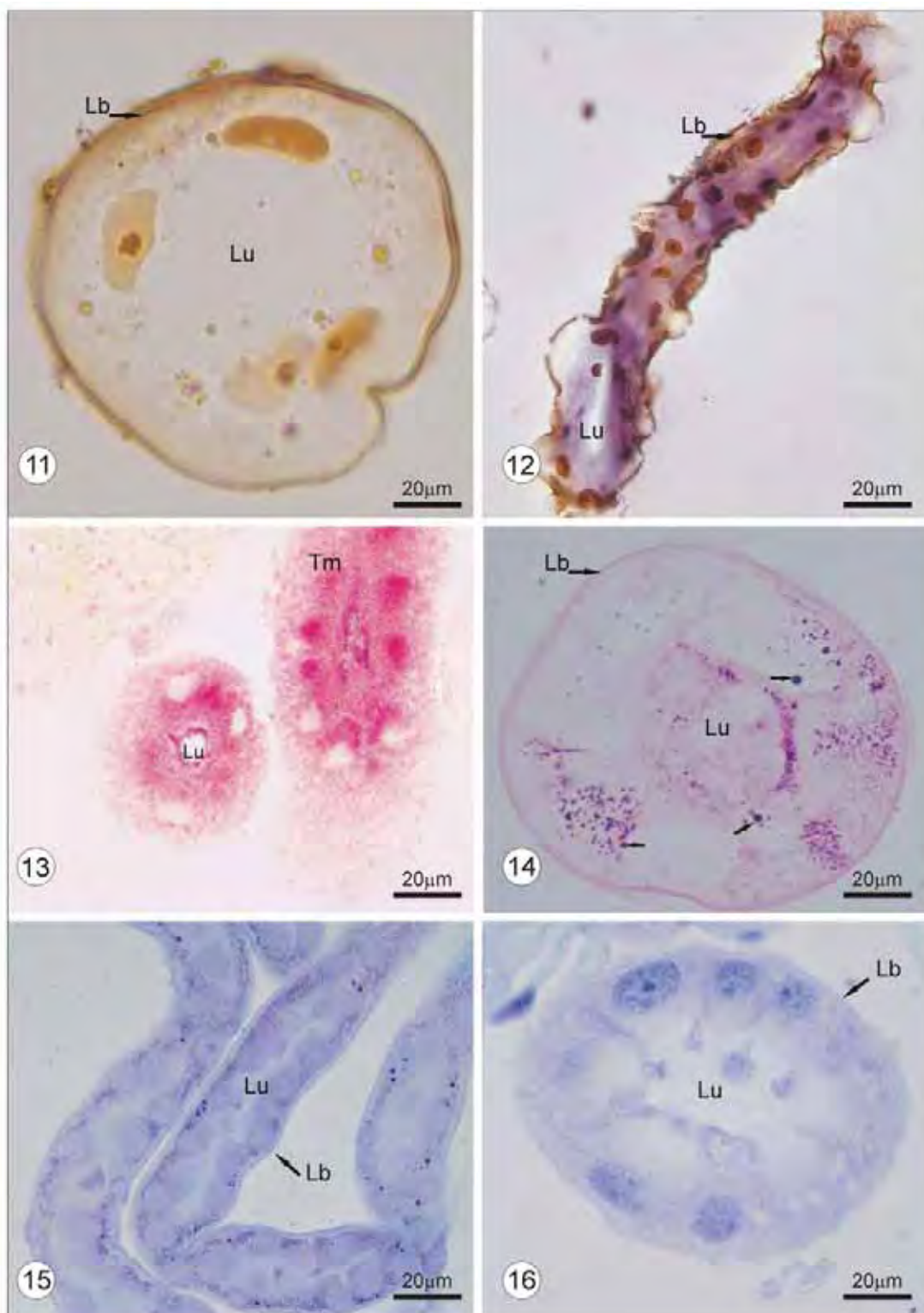
5. Figuras



Figuras 1, 1A e 2. Microscopia Eletrônica de Varredura de *C. pusillus*. Visão da porção terminal do ventrículo (Vt), região onde desembocam os túbulos de Malpighi “piloro” (P) e bolsa de microrganismos (Bm) com traquéias (Tr) em sua superfície. **Figuras 3 e 4,** Técnica de Hematoxilina-Eosina em cortes histológicos de *C. atratus*, mostrando a visão geral de parte do ventrículo, válvula pilórica (Vp), epitélio glandular (Epg) e túbulos de Malpighi (Tm). **Figura 5,** A presença de colágeno na região que conecta o íleo com os túbulos Malpighi pode conferir resistência e força a esta área, especialmente por ser sujeita a tensões *C. clypeatus*, picrossírius red (seta=colágeno). IL= íleo. Mi= microrganismos.



Figuras 6, 7, 8. *C. clypeatus* Técnica de Von Kossa, onde o é mostrado o cálcio (Ca) presente no interior das células e lâmina basal (Lb). **Figura 9.** Tricômico de Mallory em *C. atratus* (azul celeste= substâncias basófilas, amarelo= substâncias acidófilas) mostrando o epitélio (Ep) e o pH levemente ácido no lúmen do íleo . **Figura 10.** Xilidine Ponceau (proteínas) mostrou fortes reações no íleo (IL), Epitélio Glandular (Epg) e lúmen (Lu).



Figuras 11 e 12. *C. atratus*, ATPase. A presença desta enzima é detectada na lamina basal (Lb). **Figuras 13.** *C. atratus* Fosfatase-ácida, note a presença desta enzima por todas as células epiteliais dos túbulos de Malpighi. **Figura 14,** *C. clypeatus* PAS (carboidrato), polissacarídeos neutros puderam ser detectados com esta técnica, principalmente na lâmina basal e em vesículas presentes no epitélio (setas). **Figura 15** *C. clypeatus*, Azul de bromofenol, (proteínas) mostra fortes reações na lâmina basal e **Figura 16,** *C. clypeatus*, Azul de toluidina (polissacarídeos ácidos e DNA), onde esta técnica mostrou o epitélio dos túbulos de malpighi com intensidade mediana.

6. Referências bibliográficas

- BLOCHMANN, F. Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. Zbl. Bakt. II 234–240. 1882.
- 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. (Eds.), Chemistry and Biology of Social Insects. Verlag J. Perperny Verlag, Munich, p. 631. 1987.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., BRITTO, F.B., GOMES, G.A.T., ZARA, F.J., 2006. Histology and histochemistry of the ventriculus *Dolichoderus* (=Monacis) *bispinosus* (Olivier, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). *Micron* 37, 249–254.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., ZARA, F.J.. Comparative morphology of the ileum of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). *Sociobiology* 50.2, 355–369. 2007 A.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., ZARA, F.J.. Comparative morphology of the midgut of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). *Sociobiology* 50.3, 725–737. 2007 B.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. *Micron* 39, 1–16. 2008.
- CAETANO, F.H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae). *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* 35, 257–305. 1984.
- CAETANO, F.H., CRUZ-LANDIM. Presence of microorganisms in the alimentary canal of ants of the tribe Cephalotini (Myrmicinae): location and relationship with intestinal structures. *Naturalia* 10, 37–47. 1985.
- CAETANO, F.H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia* 13, 129–174. 1988.
- CAETANO, F.H., JAFFÉ, K., ZARA, F.J. Formigas: Biologia e Anatomia. Araras, Topázio, p. 131. 2002.
- CHAPMAN, R.F. The Insects: Structure and Function. American Elsevier, New York, 819 pp. 1975.
- EARTHARAL, M.J., CARLOS, P.S., RICHARD, I.S. Digestive enzymes of leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *J. Insect Physiol.* 50, 881–891. 2004.
- JAFFÉ, K., CAETANO, F.H., SANCHES, P., HERNANDEZ, J.V., CARABALLO, L., FLORES, J.V., MONSALVE, W., DORTAL, B., VIDAL, R.L. Sensitivity of ant

(Cephalotes) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Can. J. Zool.* 79 (6), 1120–1124.2001.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S.. Técnicas básicas de citologia e histologia, 1a Ed. Santos, São Paulo, p. 123.1983.

LEWIS, P.R., KNIGHT, D.P. Staining methods for sectioned material. In: Glauert, A.M. (Ed.), *Practical Methods in Electron Microscopy*, vol 5. Elsevier/North- Holland Biomedical Press, Amsterdam, (Part I), pp. 1–311.1977.

PEARSE, A.G.E. *Hystochemistry: Theoretical and applied*. J. & A. Churchill Ltd., London, p. 326.1960.

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

WIGGLESWORTH, V.B. *The Principles of Insect Physiology*, 7th ed. Chapman and Hall, London, p. 827. 1974.

CAPÍTULO 3

VENTRÍCULO DE FORMIGAS CEPHALOTES (FORMICIDAE; MYRMICINAE): ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO E BACTÉRIAS SIMBIONTES

VENTRÍCULO DE FORMIGAS CEPHALOTES (FORMICIDAE; MYRMICINAE): ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO E BACTÉRIAS SIMBIONTES

Resumo: As características ultra-estruturais do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, mostram que o epitélio do ventrículo repousa sobre uma lâmina basal contínua e é formado basicamente por três tipos celulares, sendo estas as células digestivas, as células regenerativas e as *goblet cells*. Nestas formigas, o retículo endoplasmático rugoso além de atuar na produção de enzimas digestivas também está envolvido na concreção e estocagem de íons em vacúolos especializados presentes no ventrículo. Estas concreções são os esferocristais e podem estar contribuindo com a estabilização do pH e permanência das bactérias simbiontes presentes por entre as microvilosidades. Detalhes da relação das bactérias com as microvilosidades são mostradas e discutidas no texto.

Palavras-chave: Ventrículo, bactérias gram-negativas, esferocristais, formigas.

Abstract: The ultrastructural analysis of the midgut of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus* revealed that the epithelium of the midgut lays on a basal lamina and is composed basically of three cell types: digestive cells, generative cells, and goblet cells. In these ants, the rough endoplasmic reticulum, in addition to producing digestive enzymes, is involved in ion storage in specialized vacuoles present in the midgut. These concretions are spherocrystals and may contribute to stabilize the pH and to maintain symbiotic bacteria found in between microvilli. Details of the relationship between bacteria and microvilli are shown and discussed in the text.

Keywords: Midgut, gram-negative bacteria, spherocrystals, ants.

1. Introdução

O ventrículo das formigas assim como nos demais insetos é de origem endodérmica e assim sendo, não é revestido por cutícula. Entretanto, existe a membrana peritrófica que reveste e o protege contra injúrias (mecânicas ou químicas) que possam vir a ocorrer pela

passagem do bolo alimentar (CHAPMAN, 1975; CAETANO, 1984 e 1988; LEHANE & BILLINGSLEY, 1996; ZARA & CAETANO, 1998, CAETANO et al., 2002). Além desta função, a membrana peritrófica compartimentaliza o intestino médio, permitindo a circulação eficiente de enzimas nos compartimentos endo e ectoperitróficos (TERRA & FERREIRA, 1994 e TERRA et al., 1996; TERRA, 2001).

Caetano et al., (1994) mostrou que as vesículas de secreção produzidas no ventrículo de *Pachycondyla striata* atravessam a membrana peritrófica e assim que atinge o espaço endoperitrófico tais vesículas mostram sinais de desintegração.

O ventrículo nos insetos é composto de uma única camada de células que repousa sobre uma lâmina basal contínua (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975, CAETANO, 1984, 1988; LEHANE & BILLINGSLEY, 1996). Este epitélio é composto de células digestivas e células regenerativas, mas em alguns casos, outros tipos celulares como células endócrinas e as *goblet cells* podem estar presentes (SNODGRASS, 1935; WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975; MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Funcionalmente estas células diferenciadas estão envolvidas em um ou mais processos, tais como a secreção, excreção, digestão, absorção e estocagem de substâncias diversas (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975; CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983; MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA et al, 1996; TERRA, 2001).

Externamente à lâmina basal são encontradas fibras musculares circulares e longitudinais (SNODGRASS, 1935; CAETANO, 1984 e 1988 ARAB & CAETANO, 2001). Estas camadas de musculatura conferem movimentos peristálticos a esta região do trato digestivo.

A presença de bactérias simbiontes poderia incomum no ventrículo de insetos, isto, devido às características enzimáticas presentes nesta região do trato digestivo que devem dificultar a sobrevivência destes microrganismos. Entretanto, bactérias simbiontes têm sido descritas no ventrículo de diversas espécies de formigas, dentre as quais, as do gênero *Cephalotes* (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985), *Dolichoderus* (CAETANO et al., 1990) e *Camponotus* (SCHRODER et al., 1996). Neste último caso, tais bactérias estão situadas no interior de células especializadas do ventrículo denominadas de “bacteriócitos”.

Essas bactérias, primeiramente observadas por Blochmann (1882), são filogeneticamente muito próximas das bactérias endossimbiontes de insetos tais como a *Buchnera aphidicola* em afídeos, *Wigglesworthia glossinidia* em moscas “tsé-tsé” *Glossina*

palpalis (BAUMANN, 1995; SCHRODER et al., 1996; CHEN et al., 1999). No ventrículo de *Odontomachus bauri*, Caetano et al., (2009) descrevem a presença de bactérias dentro de células epiteliais denominadas de “endocytobionts”. Os referidos autores sugerem a participação destas bactérias na digestão de alimento, e assim, agindo como organismos simbioses que representam uma nova possibilidade de explorar os recursos alimentares do ambiente.

Descrições de bactérias intestinais também foram feitas para o ventrículo de *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* e para o ventrículo das formigas pertencentes à tribo Cephalotini (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985; CAETANO, 1989 e 1990; ROCHE & WHEELER, 1997; BUTION et al., 2006). Os referidos autores remetem a provável função simbiótica entre as bactérias descritas e suas respectivas formigas hospedeiras.

Assim sendo, as características estruturais do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, foram analisadas com o objetivo de mostrar relações entre as três espécies, bem como, diferenças tanto do epitélio como do conteúdo desta porção do trato digestivo, no intuito de contribuir para o melhor entendimento das relações entre tais bactérias e suas respectivas formigas hospedeiras.

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 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os ventrículos de *C. atratus*, *C. pusillus* e *C. clypeatus* foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante duas horas em geladeira. Transcorrido este tempo, foram processadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio com duração de 15 minutos cada, sendo em seguida feita a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, durante uma hora e, posteriormente, dois banhos no mesmo tampão, com duração de 15 minutos cada. O material foi então incluído em resina Epon pura e levado para estufa por 72 horas a 60°C para polimerização. Os cortes finos e ultra-finos foram feitos em ultra-

micrótomo Porter Blum. Os cortes semi-finos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) e cortes ultra-finos foram colocados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila por 45 minutos e citrato de chumbo durante 15 minutos.

As cortes foram observados e fotografadas em microscópio eletrônico Philips CM100 do laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do Campus de Rio Claro-UNESP.

3. Resultados e discussão

O epitélio do ventrículo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* repousa sobre a lâmina basal contínua e espessa. Este epitélio é formado basicamente por três tipos celulares: as células digestivas ou colunares (entre estas podemos encontrar 2 ou 3 tipos dependendo das características ultra-estruturais, o que de certa forma denuncia sua função), as células regenerativas e as “*goblet cells*” (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Estes dados estão de acordo como o proposto por Caetano & Cruz-Landim (1983), para *Camponotus arboreus*.

As *goblet cells* parecem ser constituídas pelo agrupamento de quatro células (Caetano, IP) que formam a estrutura caliciforme peculiar, possuindo a região basal alargada e profunda invaginação do ápice. Esta evidencia tinha sido sugerida pelas figuras mostradas em Caetano et al., (1994), em *Pachycondyla striata*. A formação desta “célula” ocorre por uma depressão da membrana apical e a cavidade formada mostra-se revestida por muitas microvilosidades longas, as quais foram facilmente observadas com a técnica empregada (Figura 1).

A característica estrutural das *goblet cells* reflete sua função no processo de regulação iônica, promovendo a troca de K^+ , Na^+ e H^+ entre a hemolinfa e o lúmen do ventrículo. Para King & Akay (1984) as *goblet cells* também estão envolvidas no transporte ativo de íons de cálcio provenientes das células colunares adjacentes. Posteriormente estes compostos são direcionados para o lúmen do ventrículo. Assim, o excesso destas substâncias descritas acima pode ser regulado em parte pelas *goblet cells* e em parte pelos túbulos de Malpighi (CHAPMAN, 1975; KLEIN et al., 1996).

As células regenerativas estão situadas junto a lamina basal, onde se apresentam em diferentes estágios de desenvolvimento e mostram o citoplasma com poucas organelas diferenciadas (Figura 2). O núcleo é irregular, grande em relação ao citoplasma e com cromatina dispersa, indicando seu elevado metabolismo de síntese. Características

semelhantes a estas também foram descritas para células regenerativas de *S. saevissima* (ARAB & CAEANO, 2001). Assim sendo, as células regenerativas apresentam desde seu primórdio as características que vão defini-las quando de seu estado maduro – muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e núcleo com forma irregular.

As células digestivas ou colunares constituem o tipo celular mais abundante encontrado no epitélio ventricular e apresentam inúmeras dobras na membrana plasmática basal, as quais constituem o labirinto basal que é interposto por muitas mitocôndrias (Figura 3). Estas são características que mostram a intensa atividade nesta região. De acordo com King & Akai (1984) e Caetano & Cruz-Landim (1983), a ultra-estrutura destas células é bastante variada e depende particularmente das múltiplas funções que esta célula pode exercer durante o ciclo de vida. Tais células podem estar envolvidas na secreção de enzimas, de mucopolissacarídeos, na absorção e armazenamento de produtos orgânicos e inorgânicos. Nas figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16 e 17 os aspectos que definem sua, ou suas atividades, podem ser confirmados.

Em *C. atratus*, *C. clypeatus*, *C. pusillus* assim como em outros insetos descritos por King & Akai (1984), as células colunares também podem atuar excretando e acumulando concreções de minerais em multicamadas conhecidas como esferocristais (Figuras 5, 9, 10 e 11). Estes esferocristais são compostos principalmente de cátions (Ca^{++} e Mg^{2+}), de fosfatos, de carbonatos e clorídeos absorvidos do alimento (WIGGLESWORTH, 1974; CAETANO & CRUZ LANDIM, 1983; KING & AKAI, 1984; ARAB & CAEANO, 2001).

O citoplasma das células colunares nestas formigas apresenta o retículo endoplasmático rugoso (R.E.R.) bem desenvolvido e justaposto a este o complexo de Golgi (Figuras 11, 12, 13). Tais características demonstram a síntese protéica de enzimas digestivas. Em *C. atratus*, *C. clypeatus*, *C. pusillus*, o R.E.R. também está envolvido na estocagem de íons em vacúolos especializados presentes no ventrículo. Estas concreções originam os esferocristais (Figuras 9, 10, 11).

Em *Formica polyctena*, os esferocristais são secretados junto com parte do citoplasma apical (JEANTET, 1971). Características semelhantes a estas são encontradas em *C. atratus*, *C. clypeatus*, *C. pusillus*, onde parte dos esferocristais secretados para o lúmen se origina de células colunares que apresentam a secreção como sendo do tipo apócrino.

A presença de esferocristais no lúmen do ventrículo das formigas estudadas pode estar contribuindo com a estabilização do pH e por conseguinte, com a permanências das bactérias nesta região do trato digestivo (Figura 5). Esta afirmação baseia-se no fato de que os

esferocristais apresentam-se vazios no lúmen mostrando que ocorreu a remoção total ou parcial de seu conteúdo, o que viria a contribuir para a alteração do pH da região envolvida, como temos proposto.

Uma das mais interessantes funções exercidas pelas células colunares foi descrita por Jeantet (1971). Este estudo mostra que quando formigas são contaminadas com metais tóxicos, muitos lisossomos são formados na parte apical das células colunares, e estes, em conjunto com os esferocristais acumulam os metais e asseguram a desintoxicação.

Corpúsculos multi-vesiculares são vistos no citoplasma das células colunares (Figura 14). Estes corpúsculos são vacúolos que contém substâncias de duas origens distintas, sendo elas, substâncias de vesículas pinocitóticas originadas na superfície da membrana plasmática e de lisossomos primários oriundos do complexo de Golgi (KING & AKAI, 1984). As funções prováveis são a reciclagem da membrana plasmática e digestão de proteínas intracelulares. Estes corpúsculos multi-vesiculares por atuarem na reciclagem de membranas estão associados principalmente às células secretoras, isto, devido à necessidade de grandes reposições de membrana utilizadas nas invaginações da superfície, na formação de vesículas e em sistemas reticulares (KING & AKAI, 1984).

No espaço ectoperitrófico, existem inúmeras bactérias por entre as microvilosidades (Figuras 1, 4, 5, 15, 18 e 19). Essa localização é estratégica, pois evita o contato destas bactérias com as enzimas digestivas, visto que as vesículas de secreção circulam com suas membranas íntegras pelo espaço ectoperitrófico até atravessarem a membrana peritrófica. Assim que atinge o espaço endoperitrófico tais vesículas começam a mostrar sinais de desintegração como o descrito por Caetano *et al.*, (1994).

A ultra-estrutura destas bactérias mostra-nos que a presença do duplo envelope corresponde a características de bactérias do tipo gram-negativas, de acordo com Caldwell (1995) (Figuras de 18 a 23). Várias destas bactérias demonstrando sua grande adaptabilidade a esta região do trato digestivo apresentam-se em divisão (Figuras 18, 20, 23). Para Caldwell (1995), esse duplo envelope possui propriedades estruturais e funcionais distintas das encontradas na parede celular das bactérias do tipo gram-positivas descritas para o íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus*, *C. pusillus* (JAFFÉ *et al.*, 2001).

A parede celular das bactérias gram-positivas é quimicamente menos complexa que o envelope celular das bactérias gram-negativas e é composta basicamente de mureína (peptidoglicano) que fica exposta para o meio (CALDWELL, 1995). Como consequência, as enzimas hidrolíticas como a lisozima são mais efetivas contra as bactérias gram-positivas. Isto é um indício de que a presença de enzimas digestivas como a lisozima no ventrículo de *C.*

atratus, *C. clypeatus* e *C. pusillus* possa ser um fator determinante para localização de tipos distintos de bactérias simbiontes ao longo do trato digestivo. Essa hipótese se dá pelo fato de haver a presença de bactérias gram-negativas apenas no ventrículo e de bactérias gram-positivas somente no íleo destas mesmas formigas. Estas últimas bactérias, devido à constituição de sua parede celular, seriam facilmente lisadas pela ação de enzimas presentes no ventrículo. Isto também nos leva a crer que estas enzimas não devem seguir ativas pelo trato digestivo afora, e sim terem seu domínio somente no ventrículo.

A região entre a membrana plasmática externa e a membrana plasmática interna das bactérias gram-negativas contém uma rara e única região fluida, o periplasma (CALDWELL, 1995). O referido autor descreve o periplasma como sendo responsável por grande parte dos eventos fisiológicos que são críticos a sobrevivência destas bactérias, assim como apresentar receptores de membrana e outras proteínas que mediam o transporte de substâncias através do envelope bacteriano. Este periplasma pode ser facilmente visto nas bactérias presentes no ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* (Figuras 20, 21, 22 e 23).

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 microrganismos intestinais.

Em geral, as formigas alimentam-se preferencialmente de fluídos compostos principalmente de polissacarídeos e desta maneira a presença de microrganismos simbiontes no ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* favoreceria a complementação de sua dieta.

Para as três espécies estudadas as semelhanças ultra-estruturais são conspícuas, mostrando ser este, o padrão adotado para o gênero *Cephalotes*.

4. Figuras

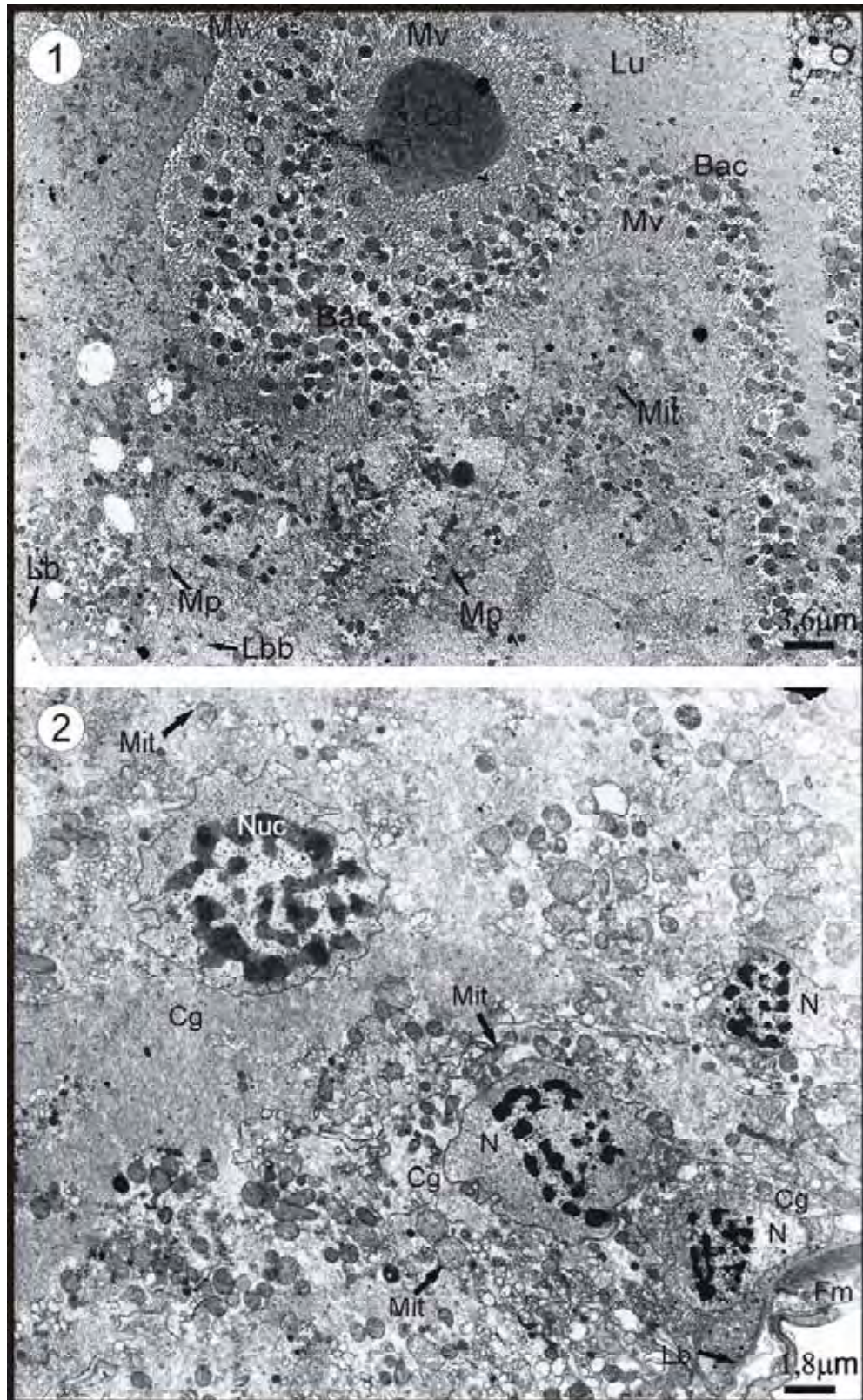


Figura 1: Micrografia eletrônica do epitélio do ventrículo de *C. clypeatus*. Estas células epiteliais se mostram recobertas por muitas microvilosidades longas (Mv), por entre as quais são vistas muitas bactérias (Bac). Célula digestiva (Cd) Lamina basal (Lb), lúmen (Lu), membrana plasmática (Mp), mitocôndrias (Mit). **Figura 2:** Epitélio do ventrículo de *C. pusillus*, mostrando células regenerativas (Cg) em diferentes estágios de desenvolvimento. Note o formato irregular do núcleo (N) e o grande desenvolvimento do nucléolo (Nuc), evidenciando seu elevado metabolismo. Fibra muscular (Fm).

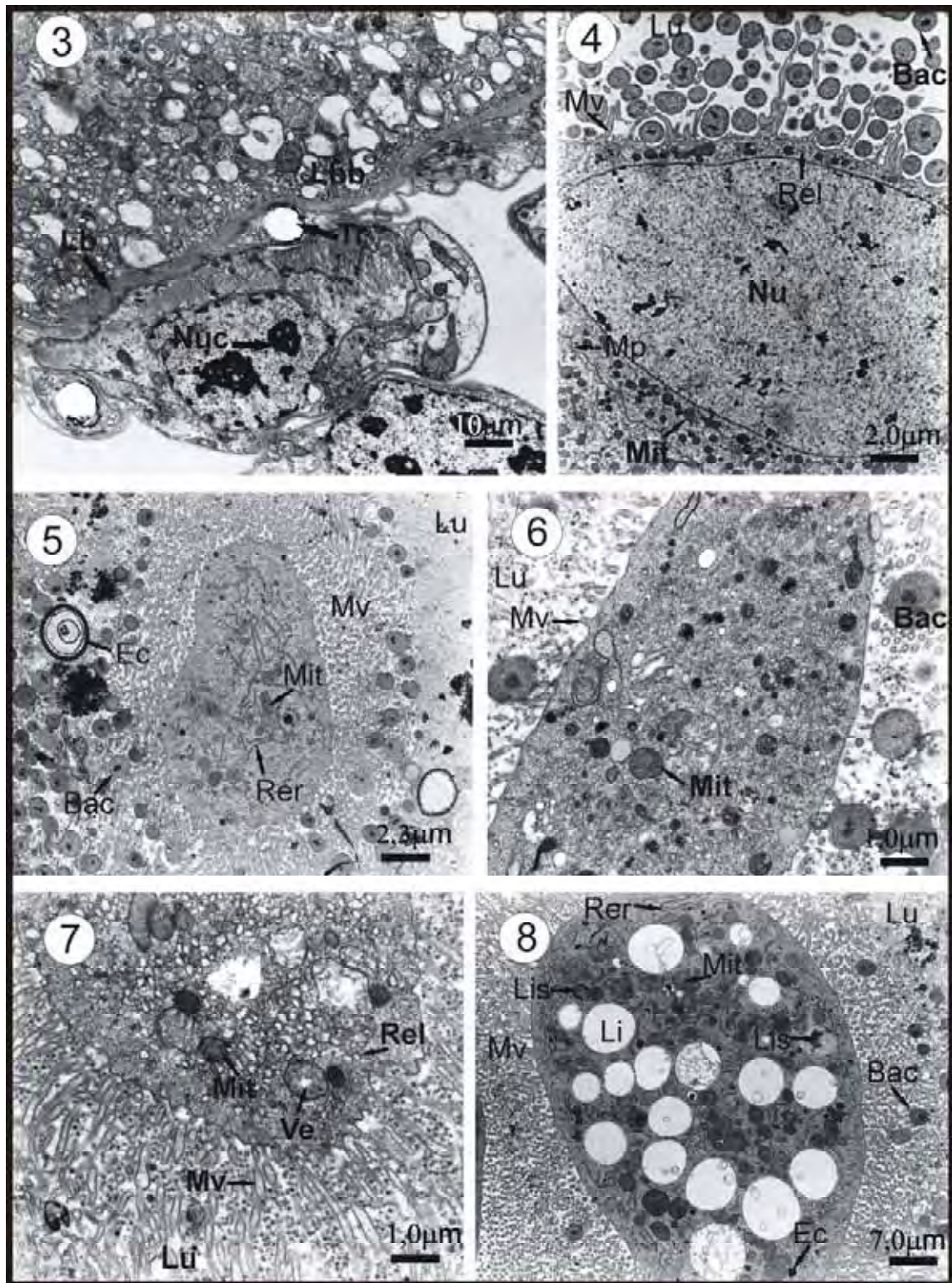
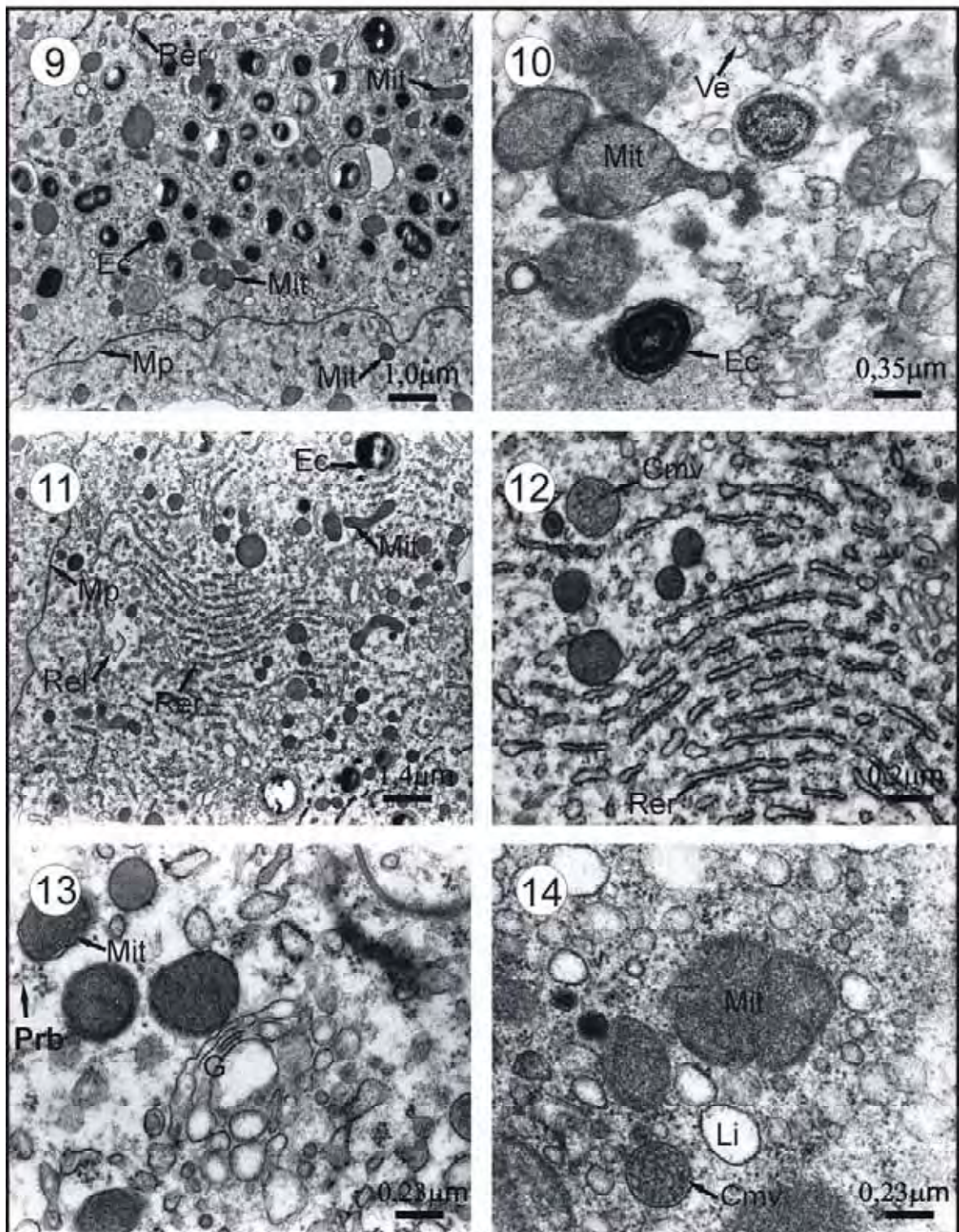
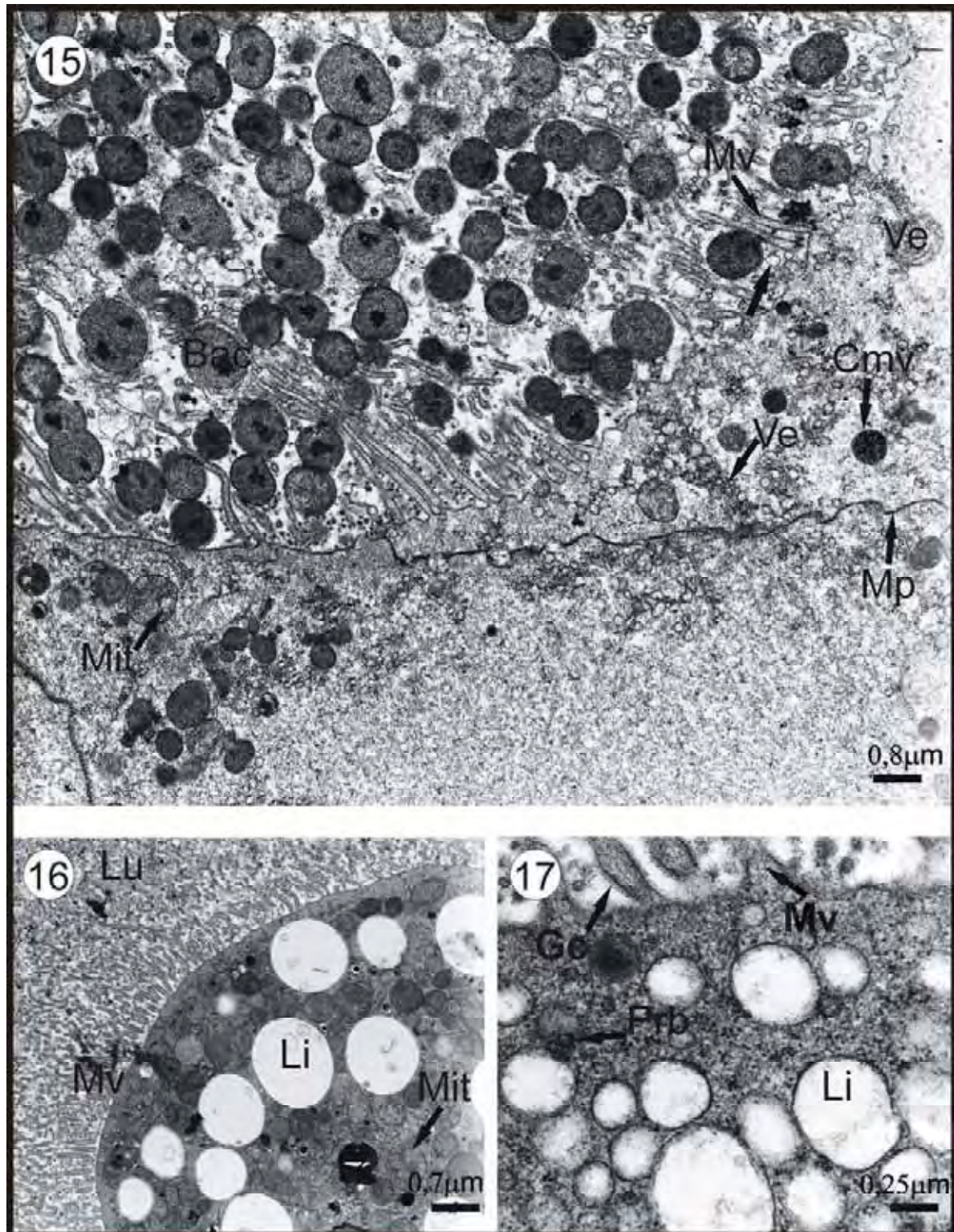


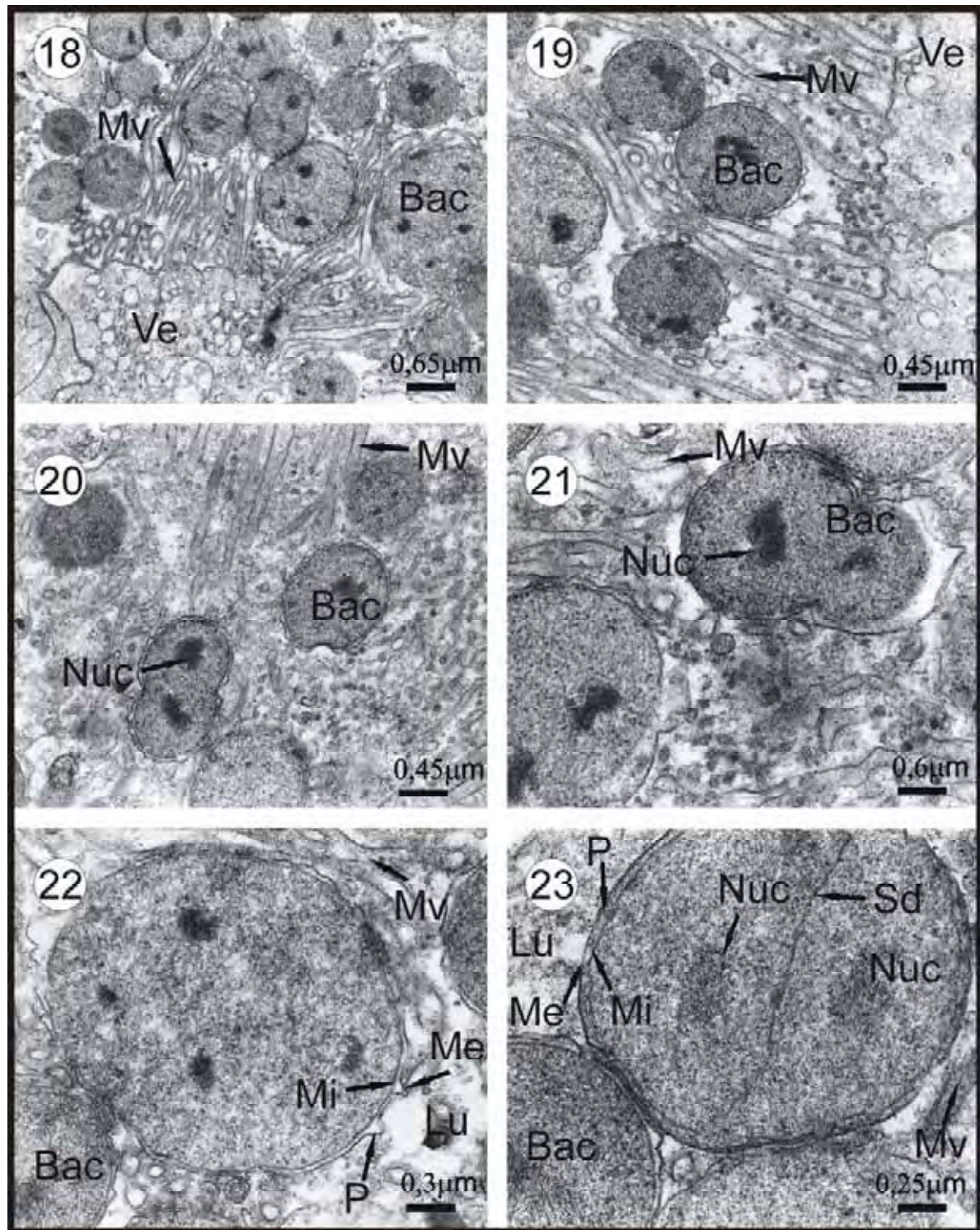
Figura 3: Micrografia eletrônica da região basal do epitélio do ventrículo de *C. pusillus*. Nesta região a membrana plasmática sofre inúmeras dobras que formam o labirinto basal (Lbb). Este labirinto mostra muitas mitocôndrias (Mit) e vesículas elétrón-lúcidas (Ve), indicando absorção de substâncias da hemolinfa. Adjacente a lamina basal (Lb) encontra-se fibras musculares (Fm) e traquéias (Tr). Nucléolo (Nu). **Figuras de 4 a 8:** Micrografias eletrônicas do epitélio do ventrículo de *C. clypeatus* (figura 4) e *C. pusillus* (figuras de 5-8), mostrando que a ultra-estrutura destas células é bastante variada particularmente devido às múltiplas funções que este tipo de célula pode exercer durante o ciclo de vida. Tais funções podem envolver a secreção de enzimas, de mucopolissacarídeos, absorção e armazenamento de produtos orgânicos e inorgânicos. Retículo endoplasmático rugoso (Rer), lipídio (Li) e lisossomos (Lis).



Figuras de 9 a 11: Micrografias eletrônicas do epitélio do ventrículo de *C. clypeatus* (figuras 9 e 11) e *C. pusillus* (figura 10), evidenciando células colunares envolvidas na produção, estocagem e secreção de esferocristais (Ec). Nestas formigas, os esferocristais são originados pelo retículo endoplasmático rugoso (Rer). **Figuras 12 e 13:** Detalhes do citoplasma de células colunares do ventrículo de *C. clypeatus*, mostrando a grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Rer) que está envolvido na formação de esferocristais e na síntese de enzimas digestivas. Complexo de Golgi (G). Polirribossomos (Prb) e gotas lipídicas (Li). **Figura 14:** Detalhe do citoplasma de célula colunar do ventrículo de *C. pusillus*, evidenciando corpúsculo multivesicular (Cmv) próximo a mitocôndria (Mit) em início de estado degenerativo.



Figuras de 15 a 17: Micrografias eletrônicas da região apical do epitélio do ventrículo de *C. pusillus*, mostrando as microvilosidades e as bactérias adjacentes. Note que a figura 17 mostra detalhes do ápice celular, onde sobre as microvilosidades (Mv) pode-se visualizar o glicocálice (Gc).



Figuras de 18 a 23: Micrografia eletrônica do espaço ectoperitrófico do ventrículo de *C. pusillus*, mostrando os detalhes ultra-estruturais das bactérias entre as microvilosidades. A membrana interna (Mi) e membrana externa (Me) são constituintes peculiares do envelope de bactérias gram-negativas. Entre tais membranas do envelope bacteriano observa-se o periplasma (P). Algumas destas bactérias estão em processo de divisão, evidenciando a presença do septo de divisão (Sd) e dois nucleóides (Nuc).

5. Referências bibliográficas

- ARAB, A & CAETANO, F. H. Functional ultrastructure of the midgut of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Formicidae: Myrmicinae) Cytobios, 45-53. 2001.
- BAUMANN, P., L. BAUMANN, C.Y. LAI, D. ROUHBAHSH, N.A. MORAN, M.A. CLARK. Genetics, physiology, and evolutionary relationship of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of the Aphides. Annu. Rev. Microbiol. 49:55-94. 1995.
- BLOCHMANN, F. Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, Zbl. Bakt. II. 234-240. 1882.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H., FABIO, B. BRITTO, GIOVANA, A. TOMAINO-GOMES and ZARA, F.J. Histology and histochemistry of the ventriculus *Dolichoderus* (= *Monacis*) *bispinosus* (Olivier, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). Micron. 37, 249-254. 2006.
- BUTION, M. L., CAETANO, F. H., ZARA, F. J. Comparative morphology of the midgut of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). Sociobiology 50, 3. 725–737. 2007.
- BUTION, M. L. & CAETANO, F. H. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. Micron 39, 897–909. 2008.
- 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. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool, (São Paulo), 35:257-305. 1984.
- CAETANO, F. H. & CRUZ-LANDIM. 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. 1985.
- CAETANO, F. H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. and OVERAL, W.L. Anatomia e histologia do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Panaponera clavata* (Formicidae: Ponerinae). Naturalia, 11/12:125-134. 1986/1987.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). Naturalia, (São Paulo), 13: 129-174. 1988.

- CAETANO, F. H. 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. 1989.
- CAETANO, F. H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I. Tipos de microrganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112. 1989.
- CAETANO, F.H; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I. Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS,1775) (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. *Naturalia*, São Paulo, vol. 15, p57-65. 1990.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract of the *Cataulacus* ants: presence of the microorganisms in the ileum. 12TH World Congress on Social Insects. Paris (IUSSI). 391-392. 1994.
- CAETANO, F. H.; A.H. TORRES Jr; M. I CAMARGO MATIAS; M. E. M. TOMOTAKE. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios*, Cambridge. 235-242. 1994.
- CAETANO, F. H. & RODRIGES, P. Ultrastructure of the Ventriculus of the Ant *Odontomachus bauri* (FORMICIDAE: PONERINAE). *Naturalia*, São Paulo, 26: 43-51. 2001.
- CAETANO, F. H.; BUTION, M. L.; FERNANDO JOSÉ ZARA. First report of endocytobionts in the digestive tract of ponerine ants. *Micron* (Oxford), v. 40, p. 194-197, 2009
- CHAPMAN, R. F. *The Insects: structure and function*. New York: American Elsevier. 819p. 1975.
- CHEN, X.; LI, S; S. AKSOY. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular physiology of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J. Mol. Evol.* 48: 49-58. 1999.
- DANIEL R. CALDWELL. *Microbial Physiology & Metabolism*. Wm. C. Brown Communications, Inc. 353p. 1995.
- LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY. P.F. 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, p.486.
- HOLDOBLER, B. & WILSON, E.O. *The Ants*. London: Springer, p. 436- 467. 2000.
- JEANTET, A.Y. Recherches histophysiologiques sur le developpement postembryonnaire, et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). *Z. Zellforsch.*, 116: 24-405. 1971.

- JONES, C. G. 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 Approaches to Interactive Systems. 53-99. 1983.
- KING, R. C. & AKAI, H. Insect Ultrastructure. Edited by New York Plenum Press. vol. 2: 624p. 1984.
- LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, p.486. 1996.
- LEVY, S. M., FALLEIROS, A. M. F., GREGÓRIO, E. A., ARREBOLA, N. R., TOLEDO, L. A. The larval midgut of the *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. Braz. J. Biol., 64 (3b): 633-638. 2004.
- MARTOJA, R. & C. BALLAN-DUFRAŇAIS. The ultra-structure of the digestive and excretory organs. In R.C. King & H. Akai (eds): Insect Ultrastructure, vol. 2. New York: Plenum Press, pp. 199-268. 1984.
- ROCHE, R. K. & WHEELER, D.E. Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohweri* (Hymenoptera, Formicidae). Journal of morphology, Tucson, 234: 253-262. 1997.
- SCHRODER, D.; DEPPISCH H.; OBERMAYER, M; KROHNE,G; STACKEBRANDT, E; HOLDOBLER, B; GOEBEL, W; GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. Mol Microbiol. 1996 Aug;21(3):479-89. 1996.
- SNODGRASS, R.E. Principles of Insect Morphology, McGraw-hill book Company, first edition, p.667. 1935.
- TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. Annu. Rev. Entomol. 35: 181-200. 1990.
- TERRA, W. R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109-b: 1-62. 1994.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E. Biology of the Insect Midgut. Ed. Lehane & Billingsley. Chapman & Hall, p. 206-231. 1996.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 47: 47-61. 2001.

WIGGLESWORTH, V.B. The Principles of Insect Physiology. 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827p. 1974.

ZARA, F.J. & CAETANO, F. H. Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatomma edentatum* (ROGER, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). Revista Brasileira de Biologia. 58: 33-37. 1998.

CAPÍTULO 4

BACTÉRIAS SIMBIONTES E AS ESPECIALIZAÇÕES ESTRUTURAIS NO ÍLEO DE FORMIGAS *CEPHALOTES* (FORMICIDAE: MYRMICINAE)

BACTÉRIAS SIMBIONTES E AS ESPECIALIZAÇÕES ESTRUTURAIS NO ÍLEO DE FORMIGAS *CEPHALOTES* (FORMICIDAE: MYRMICINAE)

Resumo: O emprego da microscopia óptica em conjunto com a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão possibilitou-nos examinar a ultramorfologia e ultra-estrutura do íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. Secções realizadas ao longo do íleo revelaram diferenças entre três principais regiões: proximal, mediana e distal. As especializações estruturais presentes no íleo destas três espécies de formigas estão relacionadas com as bactérias simbiontes aí hospedadas. As três espécies estudadas são muito semelhantes em seus aspectos histológicos e ultra-estruturais. Detalhes das características desta estrutura são discutidas.

Palavras-chave: Ultra-estrutura, íleo, simbiontes, *Cephalotes*, formigas.

Abstract: Light microscopy combined with scanning and transmission microscopies were used to examine the ultramorphology and ultrastructure of the ileum of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus*. Sections along the ileum revealed differences among the three main regions: proximal, medial, and distal. The structural specializations present in the ileum of these three ants have implications especially to the symbiotic bacteria. Details of the characteristics of this structure are discussed.

Keywords: Ultrastructure, ileum, symbionts, *Cephalotes*, ants.

1. Introdução

O íleo em conjunto com o reto, compõe o intestino posterior nos insetos. Além de sua função primordial na absorção de nutrientes, a outra função deste, junto com os túbulos de Malpighi está relacionada com o processo excretor e homeostase de íons e água (WIGGLESWORTH, 1974; CHAPMAN, 1975).

A diversidade ou plasticidade estrutural do íleo tem mostrado novas implicações fisiológicas, entre as quais fazem parte a absorção de metabólitos oriundos do ventrículo, da

hemolinfa, troca de metabólitos com microrganismos simbioses hospedados em alterações morfológicas no íleo, como o descrito para cupins e algumas formigas (WIGGLESWORTH, 1974; CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985; CAETANO, 1988; ROCHE & WHEELER, 1997; BUTION et al., 2007; BUTION & CAETANO, 2008).

Em *Ectatoma quadridens*, *Neoponera villosa* e *N. obscuricornis* o íleo apresenta hipertrofia muscular na região proximal e o epitélio apresenta dobras pouco evidentes. À medida que se dirige para a região posterior do íleo, as dobras epiteliais vão ficando mais evidentes e a musculatura circular fica mais delgada (CAETANO, 1988). Nesta região em *Dinoponera gigantea* e *Panaponera clavata*, existem espinhos cuticulares dispostos em fileiras longitudinais que desaparecem onde a musculatura circular regride de volume (CAETANO et al., 1986/87). Tais espinhos ocorrem em outras espécies de formigas menos derivadas. Estes parecem ter a função de puxar e perfurar a membrana peritrófica oriunda da região precedente, facilitando assim a troca e a saída de conteúdo envolvido pela membrana (CAETANO et al., 1986/87). Características semelhantes, exceto pela fileira de espinhos, foram também descritas para *Odontomachus affinis*, *O. bauri* e *O. minutus* (CAETANO & LAGE-FILHO, 1982). Assim sendo, este parece ser o padrão geral encontrado em formigas da subfamília Ponerinae.

Em *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* o íleo representa não só a maior porção do intestino posterior, mas também a maior porção de todo o trato digestivo. De acordo com estudos morfológicos realizados por Caetano (1984), o íleo *C. atratus* e *C. (=Zacryptocerus) clypeatus* detém cerca de 30% do tamanho total do trato digestivo.

Descrições morfológicas realizadas para o íleo das formigas da tribo Cephalotini, são semelhantes às realizadas para o íleo de *Cataulacus sp.* Tais semelhanças incluem a região mediana especialmente dilatada para abrigar microrganismos, a forte musculatura circular e a região distal mais estreita e tubular (CAETANO, 1984, 1988, CAETANO et al., 1994; ROCHE & WHEELER, 1997; HOLLDÖBLER & WILSON, 1990).

Em *Dolichoderus attelaboides*, o íleo apresenta-se dilatado na região mediana e afilado na região proximal e distal (CAETANO et al., 1990). Tal configuração estrutural e suas implicações fisiológicas são ainda desconhecidas.

Outra estrutura peculiar foi descrita para intestino posterior de algumas espécies da subfamília Pseudomyrmecinae. Neste caso, um divertículo abriga bactérias simbioses no íleo de *Tetraponera attenuata*, *T. binghami* e *T. nitida* (BILLEN & BUSCHINGER, 2000; VAMBORM et al., 2002).

Os resultados obtidos com o íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, teve por objetivo mostrar relações entre as três espécies, bem como, diferenças histológicas, ultra-morfológicas e ultra-estruturais tanto do epitélio, como do conteúdo desta porção do trato digestivo, no intuito de contribuir para o entendimento das relações entre os organismos envolvidos nesta relação simbiótica.

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-pepira, no município de Brotas, Estado de São Paulo/Brasil.

2.2. Métodos

2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (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. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os íleos de *C. atratus*, *C. pusillus* e *C. clypeatus* foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante duas horas em geladeira. Transcorrido este tempo, as amostras foram processadas: duas lavagens em tampão cacodilato de sódio com duração de 15 minutos cada, sendo em seguida feita a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, durante uma hora e, posteriormente, dois banhos no mesmo tampão, com duração de 15 minutos cada.

Para a contratação em bloco, o material foi submetido ao acetato de uranila 1% dissolvido em álcool 10%, por um período de oito horas, sendo, em seguida, desidratado em uma sequência progressiva de álcoois (70 a 100%) e, posteriormente, embebido em resina Epon mais acetona (1:1), onde permaneceu por 24 horas, sob agitação.

O material foi então incluído em resina Epon pura e levado para estufa por 72 horas a 60°C para polimerização.

Os cortes finos e ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo Porter Blum. Os cortes semi-finos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) e cortes ultrafinos foram colocados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 1% por 45 minutos e citrato de chumbo 1% durante 15 minutos.

As grades foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico Philips CM100 do laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do Campus de Rio Claro-UNESP.

2.2.3. Microscopia óptica

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 corados com Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983). As lâminas foram examinadas com um fotomicroscópio Leica. As imagens foram capturadas e digitalizadas com o software Image Manager 50.

3. Resultados e discussão

O emprego da microscopia ótica em conjunto com a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão foi utilizado para estudos do íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*. Apesar de didaticamente o íleo ter sido, por nós dividido em 3 regiões, algumas características serão descritas em conjunto para duas ou até para as três regiões quando for o caso das similaridades o permitirem.

3.1. Região proximal do íleo

A primeira porção do íleo é contínua com a desembocadura dos túbulos de Malpighi e seu epitélio é composto de células colunares com características de células secretoras como descrito por Bution & Caetano (2008) (Figuras 1, 2, 2a, 3 e 5). Testes histoquímicos realizados neste epitélio glandular mostraram a presença de proteínas, sendo indício que sejam produzidas enzimas nesta região do íleo.

Esta região é delimitada de um lado pela válvula pilórica e de outro por uma dobra do epitélio que se dirige ao lúmen. Tal região, descrita para jardineiras de *Atta*, foi denominada de “bexiga” por Caetano (1984).

Na região basal da célula epitelial observam-se núcleos arredondados, entretanto em alguns casos os núcleos podem ser alongados, acompanhando a forma colunar das células (Figuras 3, 5 e 6). Ao redor do núcleo, o citoplasma perinuclear distingue-se por apresentar maior elétrion-densidade do que o observado para o restante do citoplasma (Figuras 3, 5 e 6).

O epitélio do íleo, nas três espécies, assenta-se sobre a lâmina basal espessa (Figuras 3, 5, 8 e 8a). Este epitélio exibe característica glandular e a membrana plasmática basal origina um conspicuo labirinto basal (Figuras 3, 5 e 6). Essas características somadas à presença grandes quantidades de mitocôndrias em especial na região basal, microtúbulos, lisossomos e muitas vesículas, são indícios de elevada atividade de absorção de substâncias da hemolinfa.

No citoplasma das células epiteliais desta região nota-se a grande quantidade de ribossomos que podem estar envolvidos na síntese de proteínas, as quais são aproveitadas na estrutura celular (Figuras 7, 8, 8a, 9 e 10).

Próxima a região basal, pode observar-se fibras nervosas neuro-secretoras com vesículas elétrion-densas (Figuras 3 e 4). Essas fibras nervosas terminam entre as fibras musculares e as células epiteliais, sendo responsáveis pela condução dos estímulos nervosos que resultam no peristaltismo intestinal.

3.2. Região mediana do íleo.

A região mediana apresenta epitélio com células baixas, as quais aumentam de altura à medida que se dirigem para a porção posterior do íleo. Este epitélio assenta-se sobre a lâmina basal relativamente delgada, quando comparada à lâmina basal da região precedente (Figuras 12, 13, 14 e 15). Externamente a esta lâmina basal encontra-se a forte musculatura circular e externamente a esta a musculatura longitudinal. Esta musculatura é espessa na região mediana

e vai regredindo à medida que se dirige para a região posterior do íleo (Figuras 2b, 13, 14 e 15), assim com descrito previamente por Caetano (1984 e 1988).

Estas descrições apresentam características estruturais semelhantes às descritas para o íleo de *Cataulacus sp.* (CAETANO et al., 1994). Embora esta e outras sinapomorfias estejam presentes, tais formigas encontram-se separadas por um hiato geográfico. As formigas do gênero *Cataulacus* colonizam o continente Africano e Asiático, enquanto as formigas da tribo Cephalotini colonizam as Américas (HOLLOBLER & WILSON, 1990).

Em alguns locais do íleo, entre o epitélio e a musculatura existe uma conspícua especialização da lâmina basal que se projeta em direção à linha Z das fibras musculares adjacentes (Figuras 15 e 16). Essa projeção atua como suporte de ancoragem para as principais proteínas constituintes da linha Z, como a α -actinina e tropomiosina, descritas por Sainsbury e Bullard (1980). Tal especialização funciona como um “apodema não cuticular” para inserção da musculatura visceral adjacente ao íleo. A grande quantidade de colágeno presente na lâmina basal no íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* descritas por Bution e Caetano (2008) é perfeitamente compreendida, pois suas propriedades estruturais conferem resistência a esta estrutura de suporte, particularmente por estar sujeita às trações peristálticas.

As células epiteliais estão recobertas por uma cutícula delgada ou íntima (Figuras 18, 19 e 20). Em certas regiões do íleo, a microbiota intestinal forma uma massa viscosa e densa, a qual parece estar aderida à cutícula por um muco secretado pelo próprio epitélio do íleo ou por biofilme secretado pelas bactérias (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21). Estas imagens também mostram vesículas secretadas pelo epitélio trafegando por entre as bactérias, as quais estão aderidas à íntima (Figuras 18, 20, 25 e 26).

As células epiteliais da região mediana apresentam grande quantidade de mitocôndrias próximas à lâmina basal (Figura 12). A membrana basal forma um intrincado labirinto nesta região. Estas características indicam ser, esta região, uma região de franca absorção de substâncias da hemolinfa (BUTION & CAETANO, 2008).

O epitélio da região mediana exhibe longas e delgadas dobras em direção ao lúmen, as quais foram por nós denominadas de vilosidades. Estas vilosidades conferem maior superfície de contato tanto para adesão das bactérias quanto para absorção e excreção de metabólitos. Estas delgadas vilosidades são constituídas de células que se achatam e que são irrigadas por ramos de traquéia por todo o comprimento. Isto denuncia a elevada atividade metabólica destas especializações. Esse aumento na superfície de contato quando somado às fortes fibras

musculares adjacentes, possibilitam uma eficiente mistura do conteúdo do lúmen com as bactérias aí presentes (Figuras 12, 13, 14 e 15).

Características semelhantes a estas foram descritas para *Ectatoma quadridens*, *Neoponera villosa* e *N. obscuricornis* (CAETANO, 1988), e também foram observadas em *C. (=Zacryptocerus) rohweri* em estudos realizados por Roche & Wheeler (1997).

O epitélio da região mediana assim como o epitélio da região posterior do íleo das três espécies estudadas apresenta grande número de vacúolos digestivos em diferentes fases de maturação espalhados por todo o citoplasma. De acordo com o grau de maturação foram denominados oportunamente como vacúolos autossômicos, corpúsculos multi-vesiculares, lisossomos e inclusões multi-lamelares (Figuras de 23 a 32).

3.3. Região distal do íleo.

Na região distal do íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* as células epiteliais são mais altas e as fibras musculares são poucas e menos desenvolvidas que as da região precedente (Figuras 1, 1a, 2 e 2c). A presença de mitocôndrias na região apical das células epiteliais indica função de absorção de substâncias provenientes do lúmen do íleo (Figuras 21 e 29). Estas características também foram descritas para o íleo de *Pachycondyla (Neoponera) villosa* (CAETANO, 1989).

Em algumas regiões do epitélio do íleo são observadas inúmeras vesículas (Figuras 24, 25 e 26). Estas, em alguns casos parecem se fundir para formar um vacúolo maior com características de um grande reservatório celular (Figuras 24 e 25).

Assim como a região mediana, a região distal do íleo apresenta profundas dobras do epitélio que vão em direção ao lúmen. Essas dobras ou vilosidades possuem traqueíolas em seu interior que as dão suporte para evitar seu dobramento. As traqueíolas se estendem até o ápice da vilosidade e atua tanto no suprimento da demanda de oxigênio exigido pelo metabolismo celular do íleo quanto para grande parte das bactérias aí aderidas. (Figuras 13, 14, 21, 22 e 24). Sabemos que grande parte das bactérias cultiváveis em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* são aeróbicas, fato que explica a farta rede de traquéias presentes no epitélio do íleo (Figuras 1, 21, 22 e 24).

O intestino de alguns insetos digere bactérias como fonte de nutrientes. Esta é uma característica conhecida para os ancestrais dos dípteros Cyclorrhapha (LEMON & TERRA, 1991). Esses autores descrevem que bactérias presentes nos ventrículos de larvas de *Musca domestica* são lisadas por uma combinação que envolve pH baixo, lisozima e proteases e

servem de alimento para seu hospedeiro. Nestes estudos, a lisozima é descrita como sendo extremamente letal para bactérias gram positivas (LEMOS & TERRA, 1991).

Talvez a presença de enzimas como a lisozima no ventrículo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* possa esclarecer o fato de haver a presença de bactérias gram-negativas no ventrículo destas formigas em detrimento do íleo, onde prevalecem bactérias gram-positivas. Portanto, lisozima não deve ocorrer nesta porção do trato digestivo destas formigas. O primeiro tipo de bactérias, as gram-negativas, são menos suscetíveis ao ataque enzimas digestivas como a lisozima, isto, devido à constituição de seu envelope possuir menos receptores de ligação para esta enzima (SCHAECHTER et al., 1997).

Devido a essas peculiaridades, acreditamos que a diversidade da microbiota em *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* deve relacionar-se em parte ao efeito do pH, a ação das enzimas digestivas encontradas em diferentes regiões do trato digestivo e ao tipo de alimento ingerido por estas formigas, assim como descrito por Dillon & Dillon (2004), para insetos no geral. Somam-se a estas características, as adaptações estruturais como as descritas neste estudo, que possibilitam estas formigas abrigarem esta densa microbiota de bactérias simbioses.

4. Conclusões

O íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* possui três regiões distintas: a região proximal, mediana e distal.

As vilosidades possuem traqueíolas que atuam tanto no suprimento da demanda de oxigênio quanto como suportes que evitam o dobramento das vilosidades.

Estruturas como as vilosidades que apresentam peculiaridades como a lâmina basal que se projeta para ancorar a linha Z da musculatura adjacente e a dilatação no íleo destas formigas são adaptações estruturais que contribuem para a permanência destas bactérias simbioses.

As três espécies estudadas são muito semelhantes em seus aspectos histológicos e ultra-estruturais.

5. Figuras

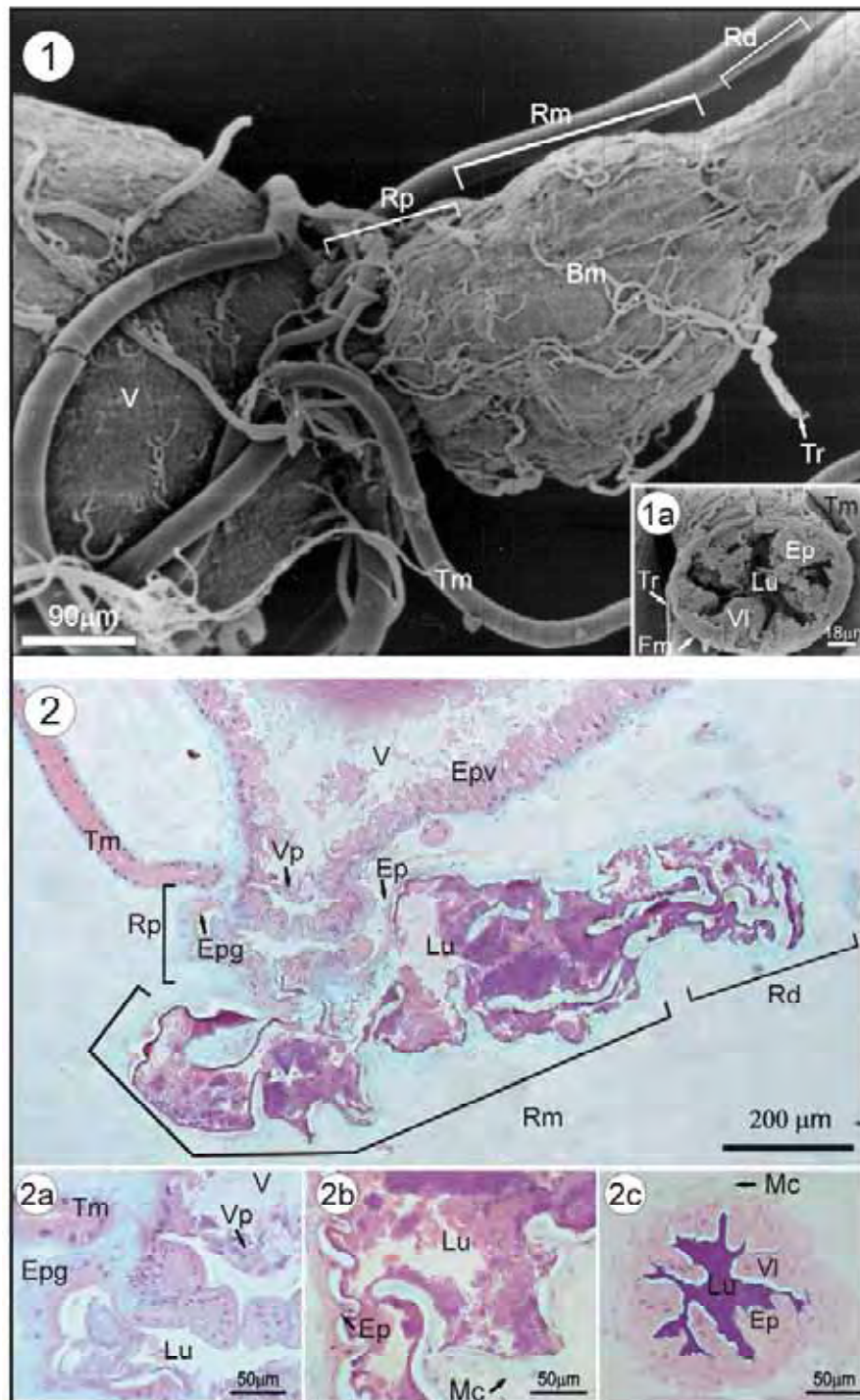


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrando a ultramorfologia do íleo de rainha de *C. pusillus*. Podemos observar a região distal do ventrículo (V), a inserção dos túbulos de Malpighi (Tm) e as três regiões do íleo, sendo elas: a região proximal (Rp), a região mediana (Rm) e a região distal do íleo (Rd). Na **Figura 1a**, podemos observar detalhes da região distal do íleo, onde são mostradas as dobras do epitélio (Ep) ou vilosidade (VI) indo em direção ao lúmen (Lu), assim como as traquéias (Tr) e fibras musculares adjacentes (Fm). **Figura 2.** Secção histológica longitudinal do íleo de *C. clypeatus* (H.E.). A imagem mostra o aspecto geral do íleo onde podemos observar parte do ventrículo (V) seguido pela válvula pilórica (Vp) que precede a região proximal do íleo (Rp), a qual é constituída de epitélio glandular (Epg) contínuo com a desembocadura dos túbulos de Malpighi (Tm). A **Figura 2a**, mostra detalhes desta região. A região mediana (Rm) compreende a região onde se localiza a bolsa de microrganismos. Detalhe desta região é mostrado na **Figura 2b**. A região posterior do íleo (Rp) é visto em detalhes na **Figura 2c**.

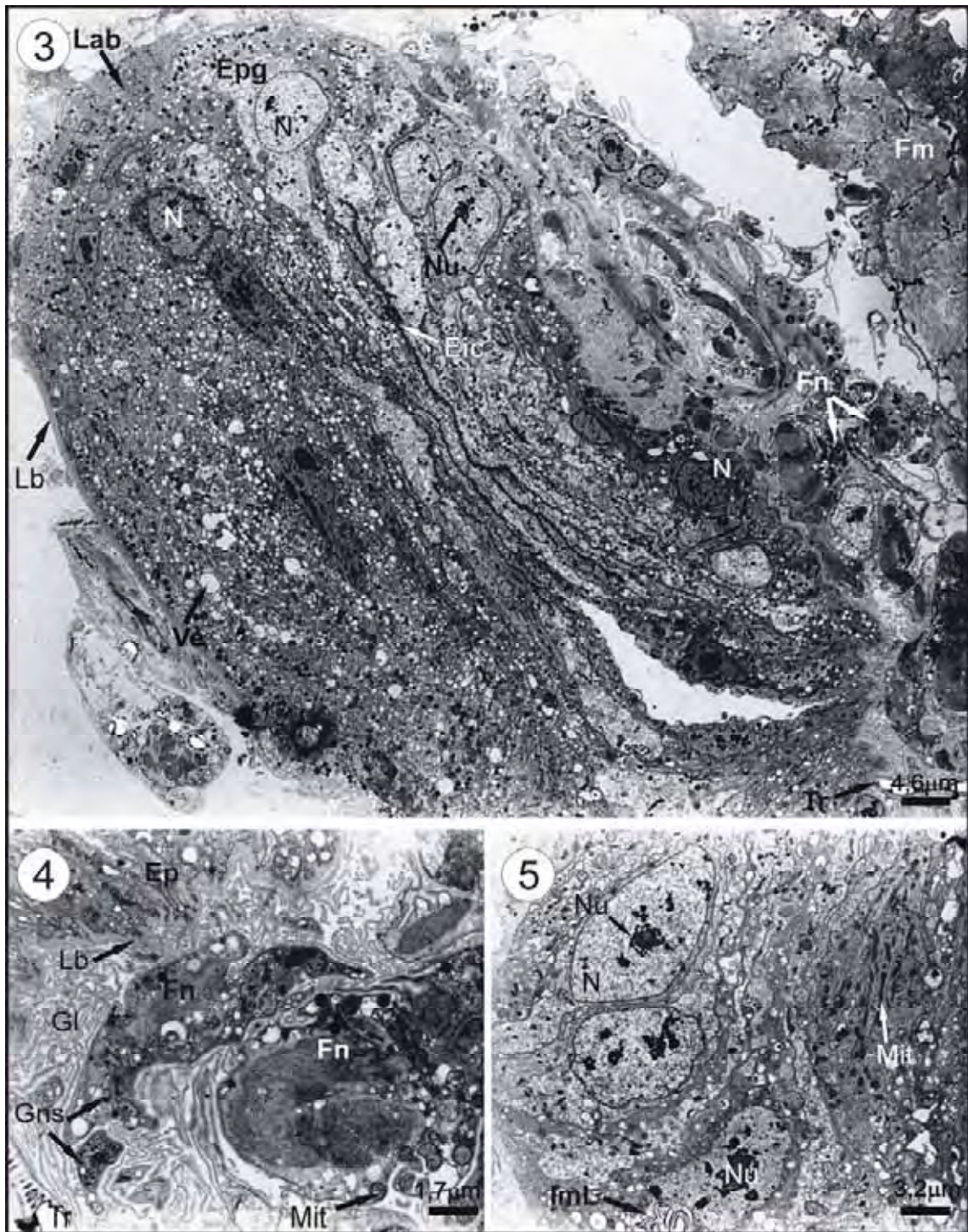


Figura 3. Micrografia eletrônica mostrando secção longitudinal da região proximal do íleo em *C. clypeatus*. Note o aspecto ultra-estrutural do epitélio glandular (Epg), N = núcleos; Nu = nucléolos; Lbb = labirinto basal; Lb = lâmina basal; Eic = espaços intercelulares; Fn = fibras nervosas. **Figura 4.** Detalhe da ultra-estrutura das fibras nervosas (Fn). Estas fibras são envoltas pelas células gliais (Gl) de aspecto frouxo e no interior das fibras nervosas podem ser visualizados grânulos de neuro-secreção (Gns) com elevada elétron-densidade. Tr = Traquéias; Mit = mitocôndrias. **Figura 5.** Micrografia eletrônica mostrando a ultra-estrutura da região basal pertencente ao epitélio glandular (região proximal do íleo). Mit = Mitocôndrias; ImL = inclusões multi-lamelares.

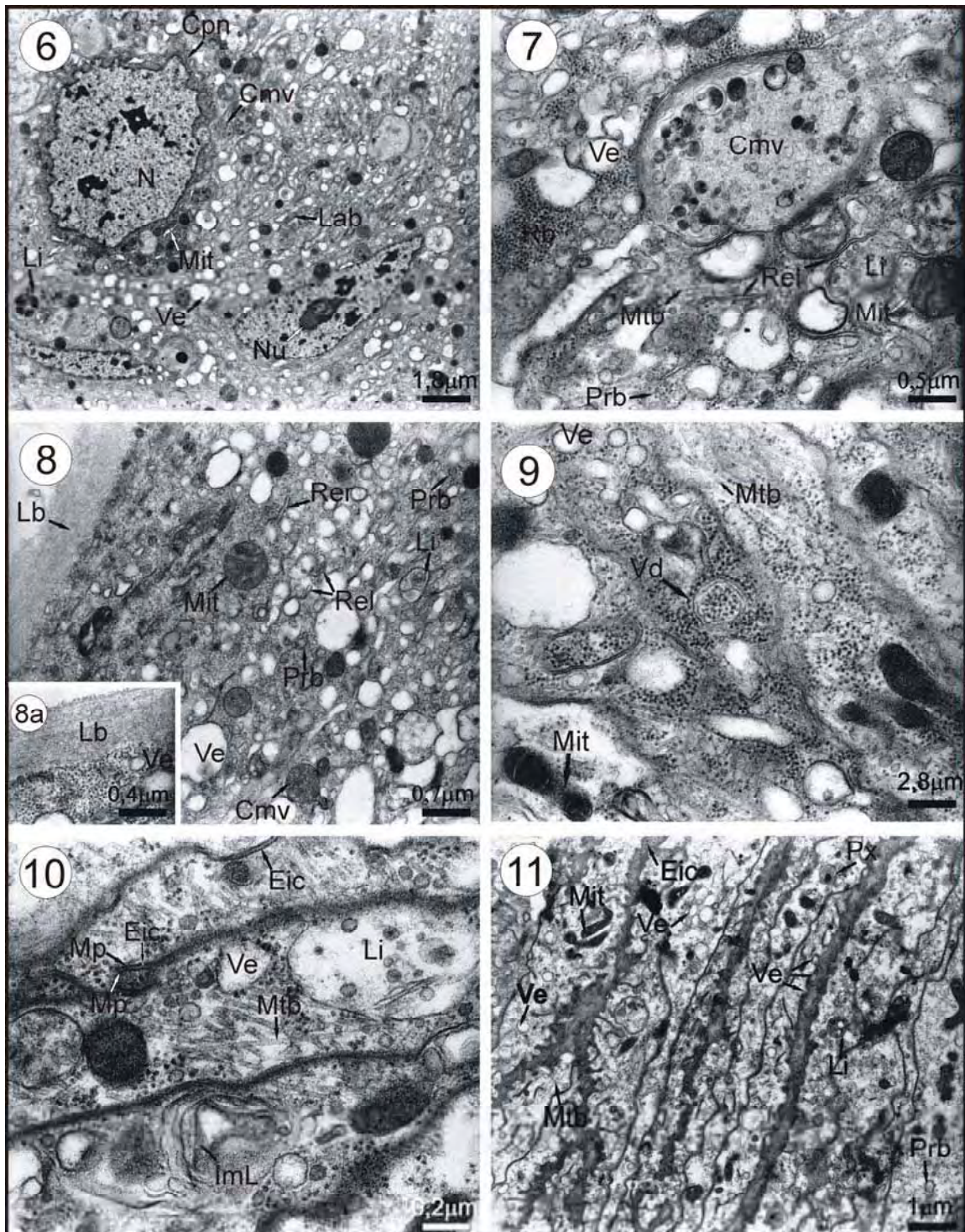


Figura 6. Detalhe da ultra-estrutura da região basal pertencente ao epitélio glandular. Neste detalhe fica evidente o citoplasma perinuclear (Cpn) com maior elétrôn-densidade do que o restante do citoplasma. Inúmeras vesículas (Ve), grande quantidade de lisossomos (Li) e um complexo labirinto basal (Lab) são características desta região epitelial do íleo de *C. clypeatus*. **Figuras 7, 8, 9.** Micrografias mostrando o citoplasma das células epiteliais da região proximal do íleo de *C. clypeatus*, onde podem ser observadas vesículas digestivas (Vd), lisossomos (Li) e os corpúsculos multi-vesiculares (Cmv). Também podem ser observados polirribossomos (Prb), retículo endoplasmático liso (Rel) e rugoso (Rer), microtúbulos (Mtb), mitocôndrias (Mit), inúmeras vesículas (Ve) e ribossomos (Rb). **Figuras 10 e 11.** Detalhes ultra-estruturais de células epiteliais da região proximal do íleo de *C. clypeatus*. Dobras no epitélio e espaços intercelulares (Eic) podem ser observadas, assim como peroxissomos (Px).

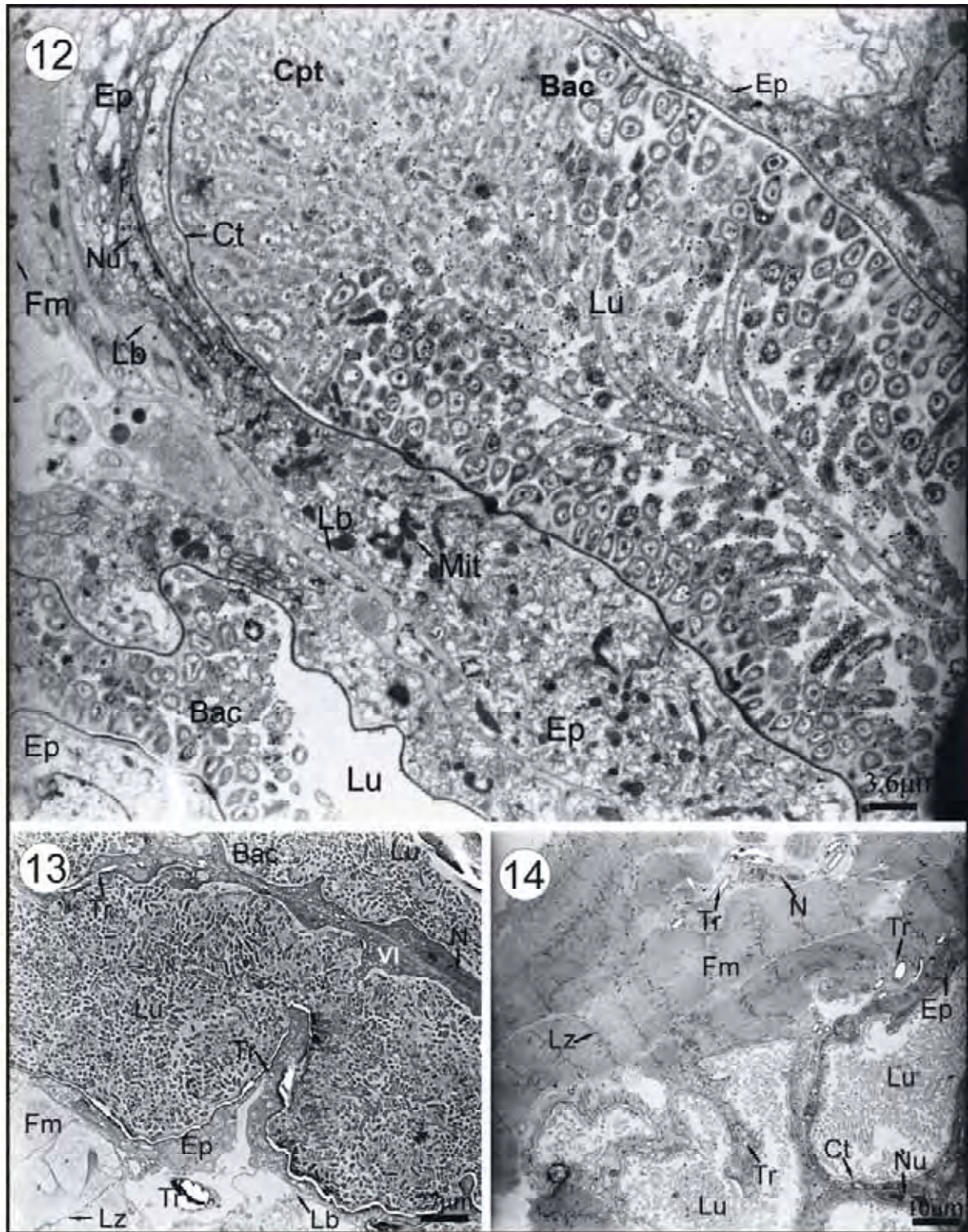
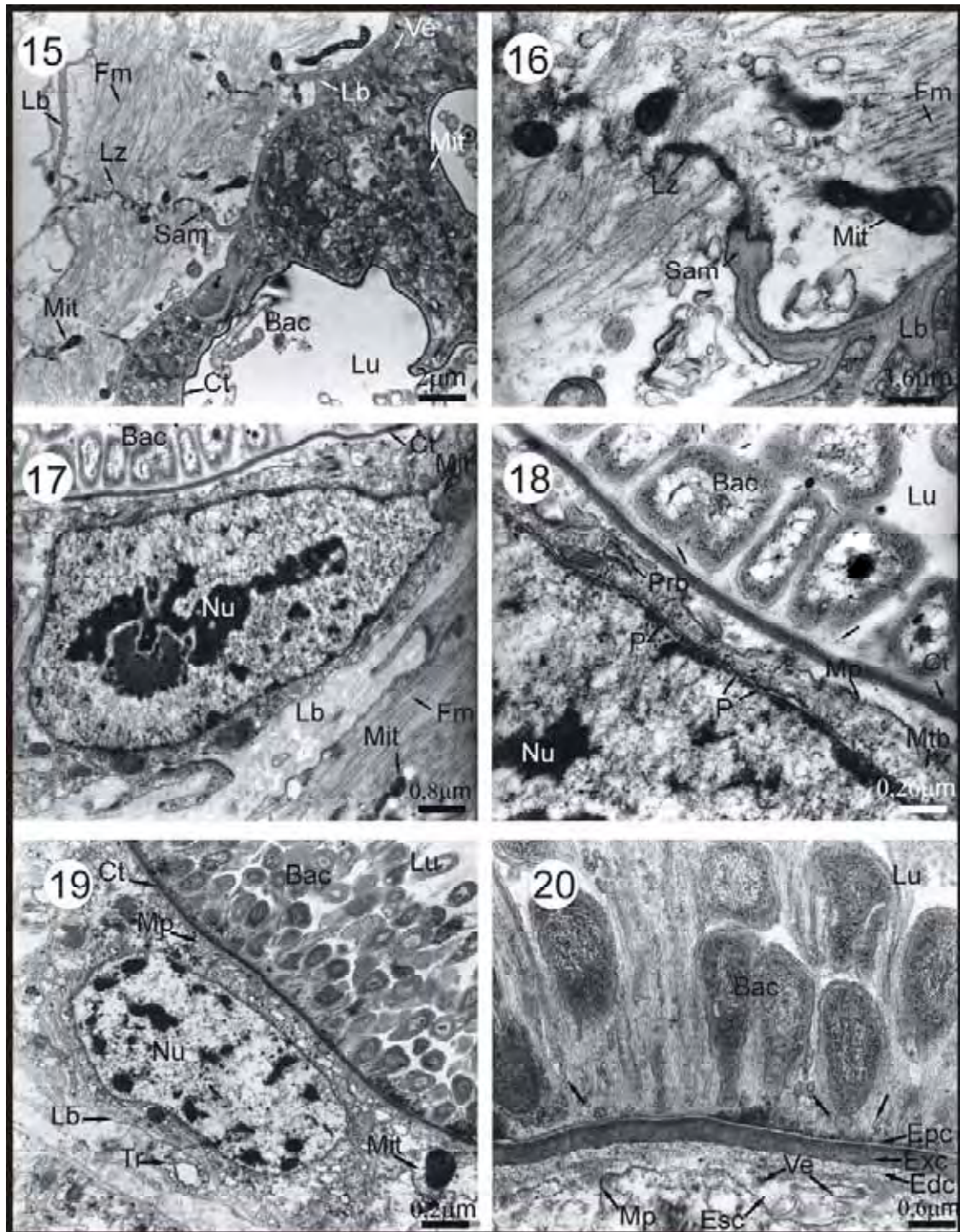
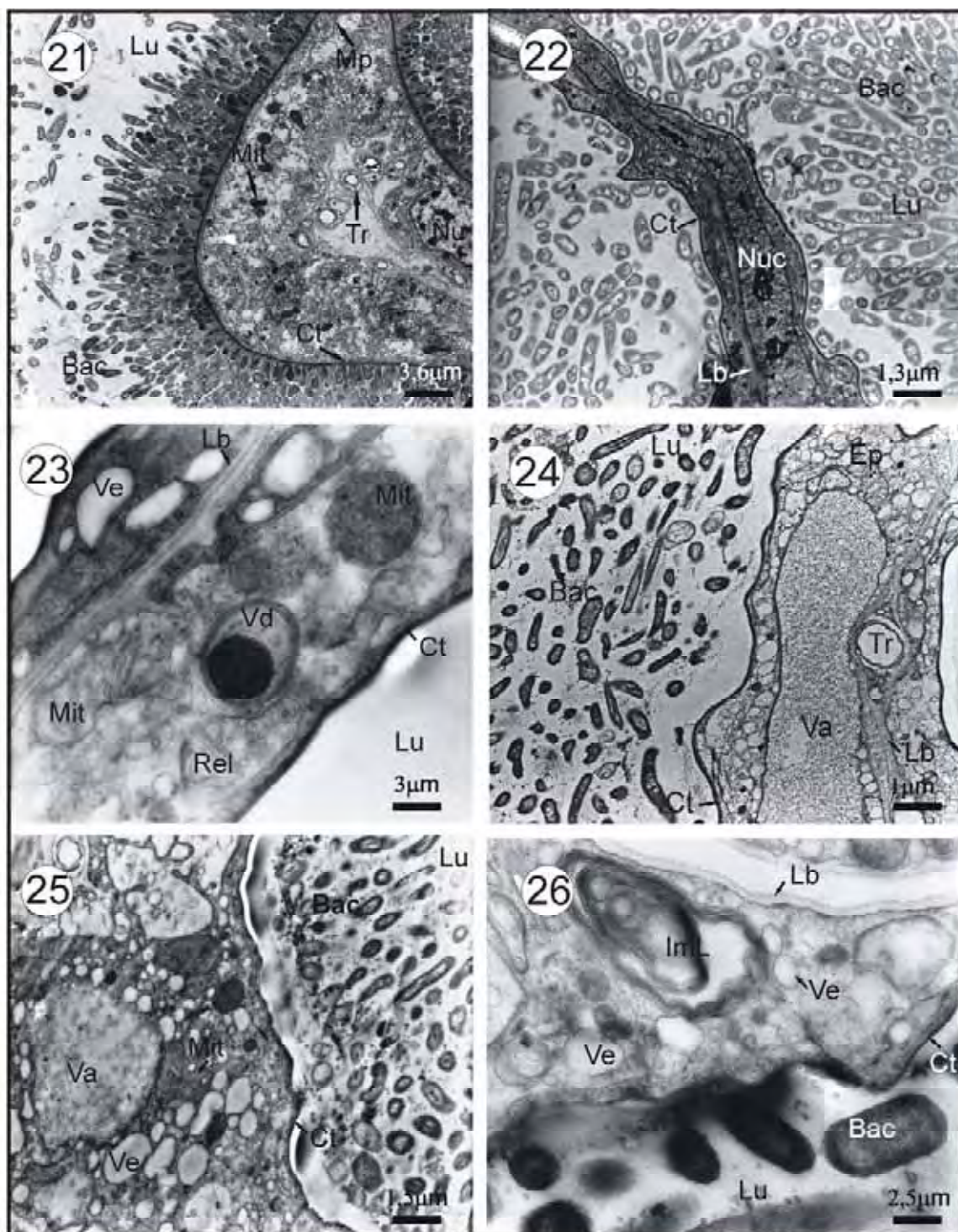


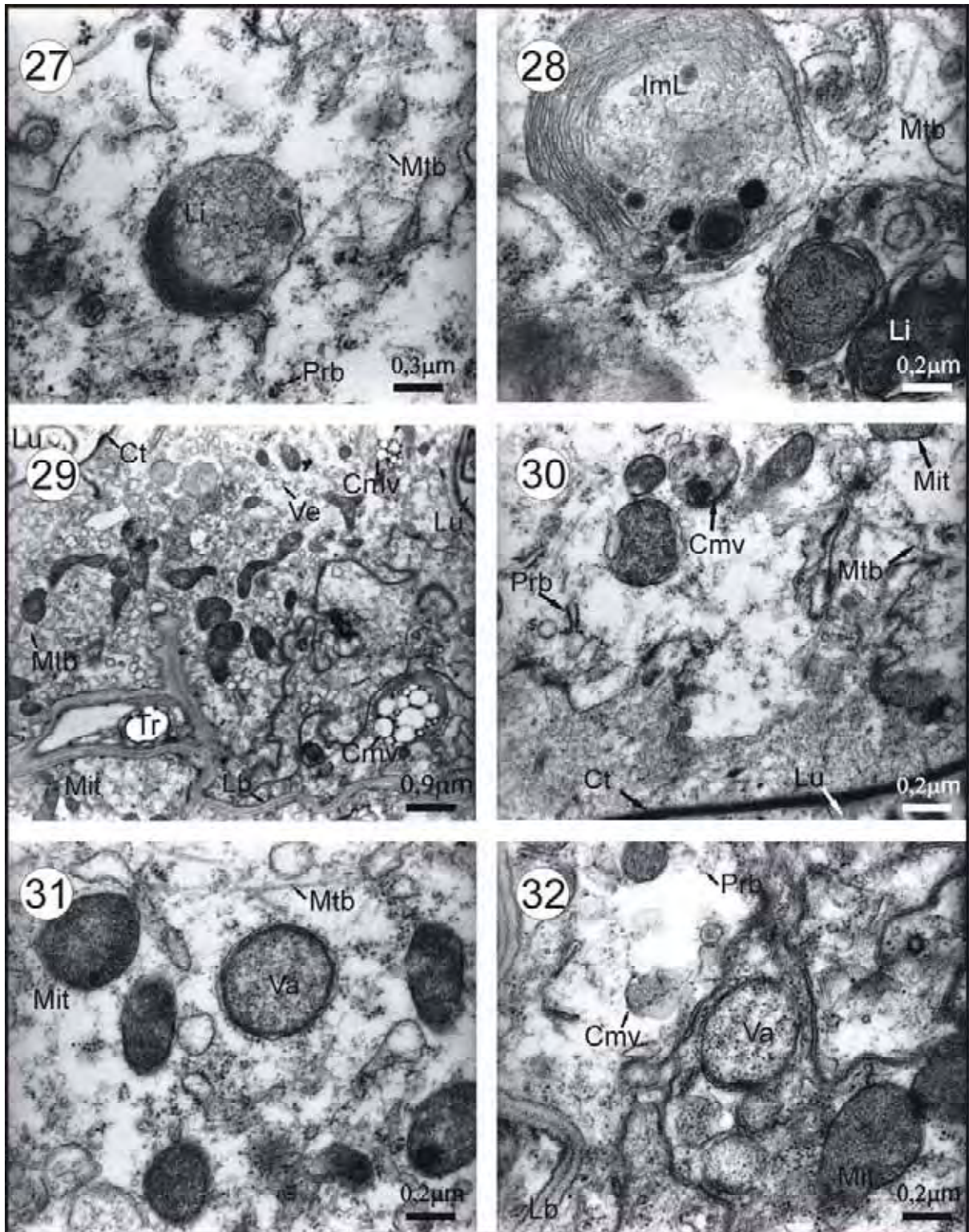
Figura 12. Micrografia eletrônica mostrando a ultra-estrutura da região mediana do íleo de *C. clypeatus*. Observe que o epitélio (Ep) está envolto por fibras musculares (Fm) e frequentemente as dobras do epitélio formam criptas (Cpt) que ficam repletas de bactérias simbiotes (Bac). **Figuras 13 e 14.** Micrografia eletrônica mostrando a ultra-estrutura da região mediana do íleo de *C. pusillus* e *C. clypeatus* respectivamente. A imagem mostra que as dobras do epitélio ou vilosidades (VI) trazem consigo traqueíolas (Tr) que se estendem até o ápice da dobra epitelial. Note que a linha Z (Lz) da fibra muscular (Fm) com intensa elétron-densidade.



Figuras 15 e 16. Micrografia eletrônica mostrando detalhes ultra-estruturais do íleo de *C. clypeatus*. Note a lâmina basal (Lb) se projetar em direção à linha Z (Lz) das fibras musculares (Fm) adjacentes. Esta especialização da lâmina basal assume a conformação estrutural semelhante às garras de um caranguejo. Tal estrutura atua como um suporte de apoio muscular (Sam), onde a linha Z da musculatura circular é vista se aderindo. **Figuras 17 e 18.** Detalhe da região mediana do íleo de *C. clypeatus*. Note como nesta região as células epiteliais são baixas e as fibras musculares se inserem diretamente na base do epitélio. As bactérias estão aderidas sobre a cutícula (Ct) por um tipo de biofilme. Estas bactérias parecem estar absorvendo pequenas vesículas liberadas pelo epitélio (setas). No núcleo pode ser observado o nucléolo e vários poros nucleares (P), indicando seu intenso metabolismo. **Figuras 19 e 20.** Detalhe da região mediana do íleo de *C. atratus*. As vesículas (Ve) lançadas no lúmen do íleo são vistas primeiramente no espaço subcuticular (Esc) após brotarem da membrana plasmática (Mp) das células epiteliais. As imagens mostram em detalhes a estrutura da cutícula (Ct) que é composta pela epicutícula (Epc), exocutícula (Exc) e endocutícula (Edc).



Figuras 21 e 22. Micrografia eletrônica da região distal dos íleos de *C. atratus* e *C. pusillus* respectivamente, mostrando a ultra-estrutura das dobras do epitélio. Estas dobras são ricamente irrigadas pelo sistema respiratório e seu citoplasma apresenta inúmeras vesículas que em certas ocasiões parecem se unir para constituir um vacúolo (Va) que atua como um grande reservatório. Nessas dobras também é comum observar a presença de vacúolos digestivos (Vd) e inclusões multi-lamelares (ImL). **Figuras 23 a 26.** Micrografias eletrônicas mostrando detalhes de vesículas digestivas e inclusões multi-lamelares (ImL) encontradas no epitélio mediano e posterior de *C. pusillus*. Em seu citoplasma nota-se a presença de inúmeras vesículas que em certas ocasiões parecem se unir para constituir um vacúolo (Va) que atua como um grande reservatório.



Figuras 27 a 32. Micrografias eletrônicas da região distal do íleo de *C. clypeatus*, mostrando detalhes do citoplasma. As vesículas digestivas, de acordo com seu estágio de maturação, hora são denominadas de corpúsculos multi-vesiculares (Cmv), hora são denominadas de lisossomos (Li) e hora são denominadas de vacúolo autofágico (Va).

6. Referências bibliográficas

- AMANN R. I.; LUDWING, W., SCHLEFER, K. H. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*59:143–69. 1995.
- BILLEN, J. & BUSCINGER, A. Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraponera* ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). *Arthropod Struct. Dev.* 29, 259–266. 2000.
- BUTION, M. L.; CAETANO, F. H.; ZARA, F.J. Comparative morphology of the ileum of three species of *Cephalotes* (Formicidae, Myrmicinae). *Sociobiology* 50, 355–369. 2007.
- BUTION, M. L. & CAETANO, F. H. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. *Micron* 39, 897–909. 2008.
- CAETANO, F.H. & LAGE FILHO, A.L. Anatomia e histologia do trato digestivo de formigas do gênero *Odontomachus* (Hymenoptera, Ponerinae). *Naturalia*, São Paulo, 7: 125-134.1982.
- CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool, (São Paulo), 35:257-305. 1984.
- CAETANO, F. H. & CRUZ-LANDIM, C. 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. 1985.
- CAETANO, F. H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. & OVERAL, W.L. Anatomia e histologia do trato digestivo de *Dinoponera gigantea* e *Pnaponera clavata* (Formicidae: Ponerinae). *Naturalia*,11/12:125-134. 1986/1987.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), 13: 129-174. 1988.
- CAETANO, F. H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M.I., Tipos de microrganismos presentes no ventrículo de *Dolichoderus decollatus*. XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1: 111-112. 1989.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. 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. 1990.
- CAETANO, F. H.; TOMOTAKE, M. E.; PIMENTEL, M.A.L; CAMARGO MATIAS, M. I. Morfologia interna de operárias de *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS,1775) (FORMICIDAE: DOLICHODERINAE). Trato digestivo e sistema excretor anexo. *Naturália*, São Paulo, vol. 15, p57-65. 1990.

- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract of the *Cataulacus* ants: presence of the microorganisms in the ileum. 12TH World Congress on Social Insects. Paris (IUSSI). 391-392. 1994
- CHAPMAN, R. F. The Insects: structure and function. New York: American Elsevier. 819p. 1975.
- CRUZ-LANDIM, C. Biologia do desenvolvimento de abelhas. Depto. de biologia, Instituto de Biociências/UNESP, Rio Claro. p 1-67. 2004.
- DILLON R. J. and DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. Annu. Rev. Entomol. 49:71–92. 2004.
- HOLLOBLER, B. & WILSON, E. O. The Ants. London: Springer, p. 436- 467. 2000.
- JUNQUEIRA L.C. U & JUNQUEIRA L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia, 1ª Edição. Ed. Santos (São Paulo), 123p. 1983.
- ROCHE, R. K. & WHEELER, D. E. Morphological Specializations of the Digestive Tract of *Zacryptocerus rohweri* (Hymenoptera, Formicidae). Journal of morphology, Tucson, 234: 253-262. 1997.
- SAINSBURY, G. M. & BULLARD, B. New proline-rich proteins in isolated Z-discs, Biochem. J. 191: 333-339. 1980.
- SCHAECHTER, M.; NEIDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J. L. An Electronic companion to benning microbiology. New York: Cogito Learning Media, Inc. 324p. 1997.
- VAN BORM, S., BUSCHINGER, A., BOOMSMA, J.J. & BILLEN, J. Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 296: 2023-2027. 2002.
- VILLARO, A. C., M. GARAYOA, M. J., LEZAUN and P. SESMA. 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. 1999.
- WHEELER, W. N. Ants, their structure, development and behavior. Columbia University, New York. 663pp. 1926.
- WIGGLESWORTH, V. B. The Principles of Insect Physiology. 7th.ed. London: Chapman and Hall. 827p. 1974.

CAPÍTULO 5

PERFIL MOLECULAR DOS SIMBIONTES DO VENTRÍCULO E ÍEO DE FORMIGAS DO GÊNERO *CEPHALOTES* POR MEIO DE PCR-DGGE

PERFIL MOLECULAR DOS SIMBIONTES DO VENTRÍCULO E ÍLEO DE FORMIGAS DO GÊNERO *CEPHALOTES* POR MEIO DE PCR-DGGE

Resumo: O perfil molecular dos simbiossantes do ventrículo e íleo de *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* foi obtido analisando a região V3 do gene 16S do rDNA bacteriano. Foram estudadas duas amostras de *C. atratus*, três de *C. clypeatus* e seis de *C. pusillus*. Os resultados mostram que as amostras entre os simbiossantes de *C. atratus* e *C. clypeatus* embora coletadas em locais geograficamente distantes, apresentaram índices de similaridade entre 80 e 94%. A variabilidade de simbiossantes encontradas nas amostras de *C. pusillus* oscilou entre 45 e 71%, tanto em amostras próximas, como em amostras distantes vários quilômetros. Neste estudo, verificamos que as técnicas moleculares de PCR e DGGE mostraram-se eficazes para o propósito da pesquisa e puderam ser consideradas ferramentas versáteis para análises de microbiotas intestinais.

Palavras-chave: Simbiossantes, DGGE, PCR, 16S rDNA, *Cephalotes*.

Abstract: The molecular profile of the symbionts of the midgut and ileum of *Cephalotes atratus*, *C. clypeatus*, and *C. pusillus* was obtained using the region V3 of the bacterial 16S rDNA gene sequence. Two samples of *C. atratus*, three of *C. clypeatus*, and six of *C. pusillus* were analyzed. The results showed similarity indices from 80% to 94% between the samples of symbionts from *C. atratus* and *C. clypeatus*, despite being collected in sites geographically distant. The variability of symbionts found in the samples of *C. pusillus* ranged from 45% and 71%, in samples geographically close as well as distant. In this study, PCR- DGGE was efficient for the purpose of this study and can be considered a versatile tool to analyze the intestinal microbiota.

Keywords: Symbionts, DGGE, PCR, 16S rDNA, *Cephalotes*.

1. Introdução

Entre os insetos, as formigas são de interesse particular não só por causa da sua função ecológica em muitos ecossistemas terrestres, mas também porque elas possuem um grande repertório de comportamentos sociais (HOLLOBLER & WILSON, 1990). Para diversos

autores, uma característica fundamental das formigas é sua habilidade em formar sociedades complexas com divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia. As formigas também mostram a capacidade de constituir associações com outros organismos tais como outros insetos, plantas, fungos e bactérias (ZIENTZ *et al.*, 2005).

As plantas possuem defesas químicas e mecânicas que impõe às formigas e a outros insetos restrições ao seu uso como alimento. Um dos mecanismos usados pelos insetos para lidar com essas limitações é o estabelecimento de relações simbióticas com microrganismos (JONES, 1983). Estas relações que envolvem bactérias, fungos e protozoários, podem variar desde mutualismo até comensalismo (DOUGLAS, 1998; AMANN *et al.*, 1995).

Os estudos da microbiota intestinal de insetos que utilizaram métodos microbiológicos tradicionais abordaram esta microbiota intestinal por meio da caracterização fenotípica de culturas isoladas (BUCHNER, 1965; DASCH *et al.*, 1984; JAFFÉ *et al.*, 2001; DILLON & DILLON, 2004). Estas metodologias frequentemente apresentam uma descrição parcial da microbiota intestinal do inseto, pois apenas microrganismos capazes de crescer em meio de cultura são detectados.

A utilização de marcadores moleculares para a caracterização de bactérias têm resultado em uma drástica mudança na compreensão da diversidade microbiana nos últimos 20 anos, mostrando que aproximadamente 99% das bactérias em um ambiente não podem ser cultivadas (AMANN *et al.*, 1995; DILLON & DILLON, 2004).

Objetivando analisar e caracterizar o perfil molecular dos simbiontes intestinais de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus*, o estudo da variabilidade dos simbiontes do trato digestivo destas três espécies de formigas foi realizado com a amplificação da região variável V3, compreendido entre as posições 338 e 803 do gene 16S rDNA, a partir do DNA total extraído de um “pool” de operárias de cada colônia. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Cada banda foi interpretada como uma linhagem bacteriana e as similaridades entre as amostras foram calculadas com base no índice binário de Jaccard, tendo como característica os dados de presença das bandas no gel.

Mensurações de distâncias Euclidianas também foram feitas entre os pontos de coletas e serviram para orientar na correlação entre distância geográfica e a similaridade entre as 11 amostras.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material:

Operárias maiores de *Cephalotes atratus* e *C. pusillus* e operárias de *C. clypeatus* foram coletadas em diferentes municípios do interior do Estado de São Paulo, Brasil (Tabela 1).

Amostra	Espécie	Local	Coordenadas	nº de indivíduos
* Colônia I	<i>Cephalotes atratus</i>	Santa Rita do Passa Quatro	21°36'54.97"S, 47°37'26.49"O	13
# Colônia II	<i>Cephalotes atratus</i>	Brotas	22°17'29.00"S, 48° 7'50.80"O	13
# Colônia III	<i>Cephalotes clypeatus</i>	Campinas Unicamp	22°49'13.05"S, 47° 4'9.01"O	30
# Colônia IV	<i>Cephalotes clypeatus</i>	Campinas Unicamp	22°49'16.92"S, 47° 4'10.63"O	30
# Colônia V	<i>Cephalotes clypeatus</i>	Rio Claro Unesp	22°23'44.38"S, 47°32'40.18"O	30
# Colônia VI	<i>Cephalotes pusillus</i>	Rio Claro Unesp	22°23'45.90"S, 47°32'38.43"O	40
# Colônia VII	<i>Cephalotes pusillus</i>	Rio Claro Unesp	22°23'42.15"S, 47°32'40.43"O	40
# Colônia VIII	<i>Cephalotes pusillus</i>	Campinas Unicamp	22°49'12.97"S, 47° 4'9.52"O	40
# Colônia IX	<i>Cephalotes pusillus</i>	Campinas Unicamp	22°49'6.68"S, 47° 4'19.81"O	40
* Colônia X	<i>Cephalotes pusillus</i>	Santa Rita do Passa Quatro	21°36'41.77"S, 47°37'32.00"O	40
* Colônia XI	<i>Cephalotes pusillus</i>	Rio Claro Horto Florestal	22°24'45.46"S, 47°31'15.03"O	40

Tabela 1. Coletas de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* amostradas neste trabalho. O símbolo * indica amostras coletadas em reservas ecológicas e o símbolo # indica amostras coletadas em áreas urbanas.

As formigas foram anestesiadas sob resfriamento e dissecadas em fluxo-laminar. Os ventrículos e íleos foram removidos e colocados em um tubo tipo eppendorf contendo 200 ml de solução salina estéril.

2.2. Extração do DNA:

Para a extração do DNA bacteriano das amostras foi utilizado o protocolo baseado em CTAB (Brometo de hexadecil-trimetil Amônio, Sigma no H-6269).

2.3 - Reações de Polimerização em Cadeia (PCR):

A amplificação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Muyzer et al., (1996). As condições da PCR foram conduzidas nas seguintes condições: 1 ciclo de 98 °C por 1:30min; 10 ciclos de 96 °C por 30s, 60 °C por 40s (-1 °C/ciclo), 72 °C por 1:20min e 30 ciclos de 96 °C por 30s, 50 °C por 40s, 72 °C por 1:20min. Os iniciadores ou “primers” utilizados neste estudo foram: primer direto: (355) 3'-CGA CGG AGG GCA TCC TCA-5' (338) e primer reverso: (803) 3'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-5' (785).

A região amplificada engloba a região variável V3. A princípio poderiam ser utilizados outros primers capazes de amplificar fragmentos maiores, mas estes não seriam adequados para o uso com DGGE, que separa apenas fragmentos com até 500 bp (MUYZER et al., 1996). Na extremidade 5' do primer direto (338) foi acrescentada a sequência 3'-GGG GGG CAC GGG GGC GGG GCG GGC GGC GCG CGC GCG C- 5' (MUYZER et al., 1996).

Esta sequência rica em C+G, acrescenta ao produto de PCR um sítio com temperatura de dissociação mais alta que qualquer outro sítio presente na região amplificada, o que melhora em muito a sensibilidade do DGGE (SHEFFIELD et al., 1989).

2.4. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE):

A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi conduzida em um aparato para eletroforese vertical HOFER SE 600. As corridas foram realizadas por 16 h a 60°C e 100 V. Foi empregado o método de coloração de DNA com prata (PlusOne™ DNA Silver Staining Kit, nº cat. 70-5006-88). A figura 1 mostra um dos géis de poliacrilamida deste trabalho.

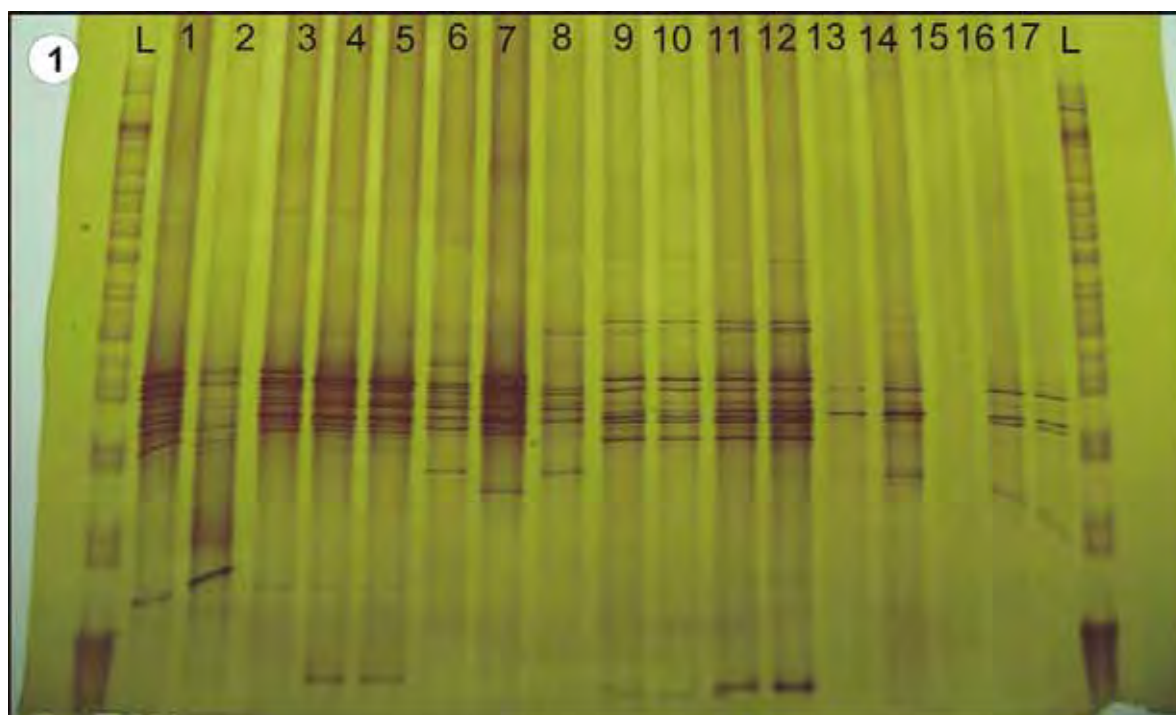


Figura 1. Gel DGGE mostrando o perfil das bandas dos simbiontes intestinais de formigas do gênero *Cephalotes*. Os poços ou slots de 1 a 8 correspondem a *C. pusillus*, representadas pelas colônias VI, VIII, VI, IX, IX, VII, X, XI respectivamente. Os slots de 9 a 12 correspondem a *C. atratus*, representadas pelas colônias II, II, I, I respectivamente. Os slots 13, 14, 16 e 17 correspondem a *C. clypeatus*, representadas pelas colônias III, IV, V, V respectivamente. O slot 15 corresponde ao controle (branco), onde não foi adicionado amostras de DNA. A letra L representa os marcadores moleculares (Ladder 50bp) aplicados nas extremidades do gel.

3- Resultados e Discussão

3.1.- Análise do padrão das bandas.

A figura 2 apresenta os resultados das 11 amostras analisadas. Uma única banda (banda 17) está presente em todas as amostras, indicando que tal bactéria pode ser obrigatória e exercer um papel importante na relação simbiótica com suas formigas hospedeiras (Figuras 2 e 3).

Bandas/ Amostras	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Total de bandas
1												1
2												1
3												4
4												2
5												2
6												5
7												5
8												1
9												3
10												8
11												2
12												3
13												5
14												3
15												3
16												5
17												11
18												6
19												10
20												6
21												7
22												10
23												9
24												5
25												6
26												7
27												5
28												6
29												1
30												1
31												8
32												1
33												3
Total	16	17	9	10	8	16	15	17	15	14	18	155

Figura 2. Padrão das bandas obtidas para as 11 amostras analisadas. O total de bandas de cada amostra é mostrada no fim da respectiva coluna. As frequências de ocorrência de cada banda são mostradas no fim de cada linha. Veja as cores correspondentes para cada espécie estudada na legenda a seguir:

- *Cephalotes atratus* (I= Santa Rita do Passa Quatro; II= Brotas)
- *Cephalotes clypeatus* (III= Campinas 1; IV= Campinas 2; V= Rio Claro/UNESP)
- *Cephalotes pusillus* (VI= Rio Claro UNESP1; VII= Rio Claro UNESP2; VIII Campinas1; IX= Campinas2; X= Santa Rita do Passa Quatro; XI= Rio Claro Horto Florestal).

Outras cinco bandas foram detectadas em quase todas as amostras (Figura 3): nas onze amostras, as bandas 10 e 31 apareceram em oito, a banda 23 apareceu em nove e as bandas 19 e 22 em dez amostras. Tais bactérias também podem ser importantes na relação simbiótica com suas formigas hospedeiras.

Cinco bandas estiveram presentes apenas em uma das amostras, podendo representar aquisições fortuitas ou, ainda, uma associação especializada para as peculiaridades do ambiente da colônia.

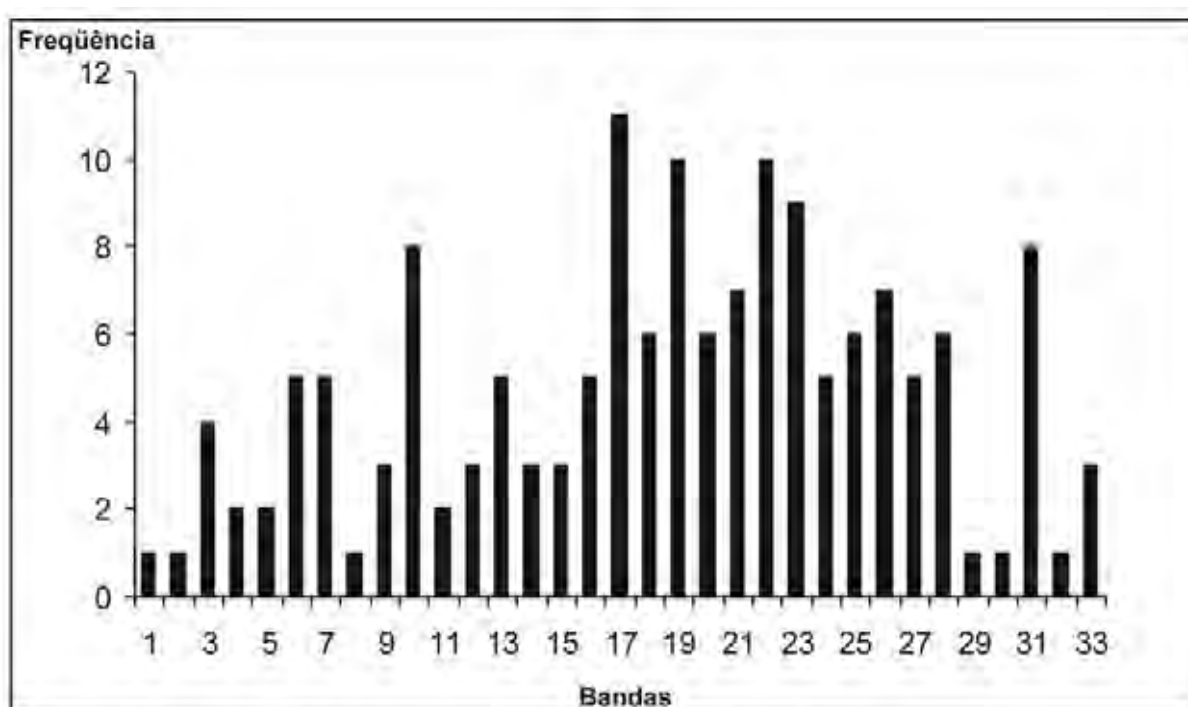


Figura 3. Frequência de aparecimento de cada uma das bandas.

3.2- Variabilidade de linhagens entre amostras.

O estudo da variabilidade dos simbiontes do trato digestivo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* foi realizado por meio do cálculo de matrizes de similaridade entre amostras coletadas em diferentes municípios do interior do Estado de São Paulo (Tabela 2).

As similaridades entre as amostras foram calculadas com base no índice binário de Jaccard, tendo como característica os dados de presença das bandas no gel.

As distâncias entre os pontos de coletas foram utilizadas para testar a correlação entre distância geográfica e similaridade da flora bacteriana entre as amostras.

Cada banda foi considerada como um ribotipo e, portanto, pertencente a uma linhagem de bactérias.

Considerando que as bactérias são relacionadas com a exploração de recursos alimentares, podemos supor que podem variar de acordo com as condições ambientais de cada ponto de coleta.

As amostras das colônias de *C. atratus* coletadas nos municípios de Brotas e de Santa Rita do Passa Quatro encontram-se separadas geograficamente por aproximadamente de 90 Km. No entanto, nossos dados mostram um alto índice de similaridade entre as microbiotas destas duas amostras.

Colônia / município	Col. I Sta Rita	Col. II Brotas	Col. III Camp.	Col. IV camp.	Col. V RC.	Col. VI RC.	Col. VII RC.	Col. VIII Camp.	Col. IX Camp.	Col. X Sta Rita	Col. XI RC.
Col. I Sta Rita	100%										
Col. II Brotas	94%	100%									
Col. III Camp.	39%	37%	100%								
Col. IV Camp.	37%	35%	90%	100%							
Col. V RC.	28%	31%	89%	80%	100%						
Col. VI RC.	45%	40%	31%	30%	33%	100%					
Col. VII RC.	24%	28%	20%	19%	15%	55%	100%				
Col. VIII Camp.	37%	36%	24%	23%	23%	50%	45%	100%			
Col. IX Camp.	41%	39%	33%	31%	28%	55%	43%	39%	100%		
Col. X Sta Rita	25%	24%	28%	26%	22%	50%	33%	29%	52%	100%	
Col. XI RC. HF.	36%	40%	50%	40%	37%	36%	43%	41%	50%	33%	100%

Tabela 2. Similaridade entre as 11 amostras utilizadas. Colônia amostrada / município: Brotas; Camp. (=Campinas); Sta Rita (=Santa Rita do Passa Quatro); RC. (=Rio Claro) e RC.HF. (=Rio Claro-Horto Florestal).

Interspecific similarities *Cephalotes atratus* *Cephalotes clypeatus* *Cephalotes pusillus*

A influência da localização geográfica, estação do ano, idade e região do trato digestivo foram avaliados por Mrázek et al., (2008) em um estudo sobre a diversidade bacteriana no trato digestivo de abelhas (*Apis mellifera*), vespas (*Vespula vulgaris* e *Vespa crabro*) e baratas (*Nauphoeta cinerea*), utilizando-se a técnica de DGGE. Os referidos autores sugerem que os hábitos alimentares são os fatores primordiais que afetam a flora bacteriana presente nestes insetos, ocorrendo grandes variações entre as espécies onívoras. Entretanto nenhuma destas espécies possui uma estrutura especializada em abrigar a microbiota intestinal

como descrito para o íleo de formigas do gênero *Cephalotes* (CAETANO & CRUZ-LANDIM, 1985; CAETANO 1984, 1989 e 1990; BUTION & CAETANO, 2008).

Os exemplares de *C. clypeatus* foram amostrados em dois pontos de coletas localizados nos municípios de Campinas e um ponto de coleta no município de Rio Claro. Todas as amostras foram coletadas em ninhos construídos em galhos de árvores popularmente conhecidas como sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), em perímetro urbano, sendo que a distância geográfica entre as colônias de Campinas foi de aproximadamente 50 metros e entre as colônias de Campinas a Rio Claro foi de aproximadamente 100 km.

A similaridade entre os simbiossomas de *C. clypeatus* amostrados em dois pontos de coletas localizados em Campinas (colônias III e IV) foi de 88% (Tabela 2).

Comparações entre os simbiossomas da colônia III coletada em Campinas e simbiossomas da colônia V coletada em Rio Claro mostraram 77% de similaridade e entre a colônia IV coletada em Campinas e a colônia V coletada em Rio Claro foi de 87,5%, muito próximo do índice de similaridade entre as colônias III e IV coletadas em Campinas. Novamente, as similaridades entre as amostras não dependem da sua distância geográfica, podendo ser indício de que as condições de forrageamento são fatores que atuam sobre os simbiossomas de *C. clypeatus*.

Em *C. atratus* e *C. clypeatus* a similaridade entre as amostras variou de 19 a 50%, representando valores inferiores aos encontrados entre as amostras de uma espécie (intra-específico).

Os resultados obtidos em *C. pusillus* mostram 29-55% de similaridade, os quais são mais próximos dos valores obtidos em comparações interespecíficas do que valores intra-específicos das demais espécies aqui estudadas.

Talvez o fato de *C. pusillus* ser dominante em vegetações de cerrado e explorar uma gama maior de recursos do que *C. atratus* e *C. clypeatus*, possa ser relacionado à maior diversidade da sua microbiota intestinal em relação às duas outras espécies.

A técnica PCR-DGGE mostrou ser uma ferramenta eficiente na caracterização da flora intestinal de *Cephalotes*. Com isso, o perfil da microbiota foi apresentado e junto a este, novas perspectivas quanto a futuros estudos nos foram reveladas.

Referências bibliográficas

- AMANN RI, LUDWING W, SCHLEIFER, KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–69. 1995.
- BUTION, M.L., CAETANO, F.H.. Ileum of the *Cephalotes* ants: a specialized structure to harbor symbionts microorganisms. *Micron* 39, 897-909. 2008.
- BUCHNER, P. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. New York: Wiley. 909 pp. 1965.
- CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera, Formicidae), Pap. Avulsos Zool, (São Paulo), 35:257-305. 1984.
- CAETANO, F. H. & CRUZ-LANDIM, C. 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. 1985.
- CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia*, (São Paulo), 13: 129-174. 1988.
- CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. 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. 1990.
- DASCH G. A., WEISS E, CHANG K-P. Endosymbionts of insects. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. NR Krieg, JG Holt, pp. Baltimore: Williams & Wilkins, 811–13. 1984.
- DILLON R. J. and DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49:71–92. 2004.
- DILLON RJ, CHARNLEY AK. The fate of fungal spores in the insect gut. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. GT Cole, HC Hoch, New York: Plenum, pp. 56- 129. 1991.
- DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect-microbe symbiosis: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43: 17-38. 1998.
- HOLLOBLER, B. & WILSON, E. O. *The Ants*. Springer, London, pp. 436–467. 1990.
- JAFFÉ, K., CAETANO, F.H., SANCHES, P., HERNANDEZ, J.V., CARABALLO, L., FLORES, J.V., MONSALVE, W., DORTAL, B., & VIDAL, R. L. Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.* 79(6): 1120-1124. 2001.
- JONES, C.G. 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 Approaches to Interactive Systems*. pp. 53–99. 1983.

MRÁZEK, J., L. STROSOVÁ, K. FLIEGEROVÁ, T. KOTT, J. KOPECNY. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol.* 53 (3),229-233, 2008.

MUYZER, G.; HOTTENTRANGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular Microbial Ecology Mannual* 3.4.4.:1-23.1996.

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 genomics DNA fragments by the polymerase chain reactions results in improved detection of single-base changes. *Procedures of National Academy of Sciences USA*, p. 232-236.1989.

ZIENTZ, E., HEIKE F. STOLL, S. Gross R. Insights into the microbial world associated with ants. *Arch Microbiol.* V1. 2005.

Conclusões

A presença maciça de microrganismos 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, demonstram que esta região do trato digestivo é uma estrutura bastante especializada e adaptada em abrigar microrganismos, estabelecendo com eles uma legítima simbiose.

A flexibilidade e resistência da região de conexão dos túbulos de Malpighi no íleo são provavelmente conferidas pela grande concentração de colágeno, permitindo desta maneira, a livre movimentação da extremidade distal dos túbulos de Malpighi na hemolinfa, através da presença da musculatura helicoidal nesta estrutura, sem que haja comprometimento por ruptura na extremidade proximal.

A técnica PCR-DGGE mostrou ser uma ferramenta eficiente na caracterização da flora intestinal das formigas *Cephalotes*.

O íleo de *C. atratus*, *C. clypeatus* e *C. pusillus* possui três regiões distintas.

As vilosidades ileais possuem traqueíolas que atuam tanto no suprimento da demanda de oxigênio quanto como suportes que evitam o dobramento das vilosidades.

Para as três espécies estudadas as semelhanças estruturais são conspícuas, mostrando ser este, o padrão adotado para o gênero *Cephalotes*.