

# Papéis Avulsos de Zoologia

PAPÉIS AVULSOS ZOOL., S. PAULO, 29 (25) : 249-257

20.VIII.1976

## ESTUDOS COMPARATIVOS DOS TUBOS DE MALPIGHI DE LARVA, PRÉ-PUPA E ADULTO DE OPERÁRIAS DE *MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES* LEP. (APIDAE, MELIPONINAE)

REGINA LÚCIA MORELLI SILVA DE MORAES<sup>1</sup>

CARMINDA DA CRUZ-LANDIM<sup>2</sup>

### ABSTRACT

*The Malpighian tubes of Melipona quadrifasciata anthidioides Lep. studied during active phases (4th larval instar and young adult) and inactive phase (pre-pupa), showed differences in morphology, DNA contents of their nuclei, and cytoplasmatic contents of calcium, protein and polysaccharide. In the 4th larval instar the epithelium of these organs showed flattened cells with large ellipsoid nucleus and average values of DNA around 128C. The nuclei of larval Malpighian tubes present in the pre-pupa, in spite of being smaller and irregular, did not show significative differences in the average value of DNA when they are confronted with those of the 4th instar. The cells of the new organs formed during the pre-pupal stage are small with spherical nucleus and average values of DNA around 4C. In the young adult, when the activity of the Malpighian tubes starts, the nucleus reached the value of 8C, increasing in size as well. Histochemical studies showed that the protein reaction was strongly positive in the Malpighian tubes of the 4th instar larva, while calcium was detected in large quantity in the urate cells. Reaction for polysaccharide was strongly positive in the Malpighian tubes of young adults, when they were in the beginning of formation.*

### INTRODUÇÃO

A função excretora dos tubos de Malpighi nos insetos foi sugerida pela presença de ácido úrico nestas estruturas. Em ninfas de Cercopidae, Gouraton (1968) verificou que as células do segmento proximal dos tubos secretam um muco complexo rico em polissacarídeos e proteínas, e nas células e lumen dos tubos de Malpighi de *Melipona quadrifasciata* Mello & Bozzo (1969) detectaram diferentes tipos de glóbulos de natureza lipídica.

1. Departamento de Biologia, Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista, 19.700 Paraguaçu Paulista, SP.

2. Departamento de Morfologia Animal, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 13.500 Rio Claro, SP.

Estas estruturas são encontradas durante toda a vida dos insetos, mas passam por modificações cujo grau varia de acordo com a espécie. Foi verificado que tanto em *Apis mellifera* (Mello & Takahashi, 1971) como em *Melipona quadrifasciata* (Cruz-Landim & Mello, 1969) os tubos de Malpighi larvais são completamente histolisados no final da fase larval e formados aqueles que permanecerão no adulto.

De acordo com Mello & Takahashi (1969) os tubos de Malpighi de *Melipona quadrifasciata* crescem à medida que progride o desenvolvimento larval pelo processo de endopoliploidia.

Neste trabalho pretende-se verificar os graus de ploidia alcançados pelos núcleos das células dos tubos de Malpighi presentes em *Melipona quadrifasciata*, bem como alterações morfológicas e histoquímicas apresentadas pelo órgão durante diferentes fases de sua atividade.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados tubos de Malpighi de larva do 4º estágio, pré-pupa e adulto jovem, dissecados em solução fisiológica.

Morfologia — para o exame ao microscópio o material, fixado em uma mistura de Carnoy 3:1, passou pelo tratamento comum para inclusão em parafina. Os cortes com 7 $\mu$ m de espessura foram corados com hematoxilina e eosina.

Histoquímica — os tubos de Malpighi foram também fixados em Carnoy, desidratados e incluídos em parafina, sendo as secções submetidas à reação do PAS (Mac Manus, 1946), do azul de bromofenol (Durrum, 1950) e ao método de Kossa (Fernandes, 1943).

Citofotometria — para tal estudo foram utilizadas montagens totais dos tubos (fig. 2).

Os tubos de Malpighi dissecados e fixados em Carnoy foram submetidos à reação de Feulgen, após hidrólise em HCl 1 N.

Medidas de extinção foram feitas em 50 núcleos de tubos de Malpighi presentes em cada um dos indivíduos estudados por fase do desenvolvimento, sendo tais medidas realizadas com o auxílio de um citofotômetro Zeiss, com um comprimento de onda de 560 $\mu$ m.

De cada núcleo foram também determinados os diâmetros maior e menor para o cálculo do conteúdo de DNA em unidades arbitrárias que se fez de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{DNA/núcleo} = E \cdot a \cdot b$$

onde, E = medida de extinção  
 a = diâmetro maior  
 b = diâmetro menor

A média do conteúdo de DNA foi determinada para cada indivíduo estudado, bem como o respectivo erro padrão. Como as médias dos 2 indivíduos estudados por fase foram aproximadamente iguais achou-se desnecessário determinar a variância. Portanto, análise de variância foi feita somente entre tratamentos, considerando então as diferentes fases estudadas.

Foram também construídos histogramas de frequência para cada fase cuja escala de valores em progressão geométrica foi elaborada de tal modo que entre os limites de classe foram colocados 7 valores intermediários.

## RESULTADOS

Morfologicamente os tubos de Malpighi diferem bastante de fase para fase estudada. No 4º estágio (fig. 1 a) esses órgãos apresentam um epitélio constituído por células baixas com núcleos grandes, delimitando um lúmen grande. Os tubos de Malpighi nesta fase são longos, em número de 8 e abrem-se no intestino posterior somente neste estágio larval (Cruz-Landim & Mello, 1969). Na pré-pupa tubos de Malpighi larvais e do adulto aparecem juntos (fig 1 b e 1 c). Os tubos de Malpighi larvais estão em franca degeneração com núcleos cuja forma é irregular. Os do adulto estão em início de formação apresentando células e núcleos pequenos, porém bem formados e regulares, colocados na parte apical das células. Nos tubos de Malpighi de adultos jovens as células já são maiores tendo núcleos basais. Este epitélio delimita um lúmen pequeno (fig. 1 d).

Estudos histoquímicos revelaram a presença de proteínas, cálcio e polissacarídeos nas células dos tubos de Malpighi nas diferentes fases do desenvolvimento, excetuando-se a pré-pupa onde não foi detectado cálcio nem nos tubos de Malpighi larvais nem nos do adulto. Os resultados das reações histoquímicas são apresentados na tabela I.

Estudos citofotométricos mostram que os núcleos das células dos tubos de Malpighi em cada uma das fases do desenvolvimento estudadas apresentam graus de ploidia diferentes, tendo sido encontrado em todos os casos um valor máximo de DNA praticamente o dobro do valor mínimo com todos os valores intermediários, o que é mostrado pelos histogramas.

Pela tabela 2 verifica-se que o conteúdo médio de DNA é praticamente igual nos dois indivíduos estudados por fase, enquanto que de fase para fase análises de variância mostraram que ocorrem diferenças significativas ao nível de 1% exceto entre o conteúdo médio de DNA dos núcleos dos tubos de Malpighi do 4º estágio larval e aqueles ainda larvais presentes na pré-pupa.

## DISCUSSÃO

Em larvas de *Melipona quadrifasciata*, os tubos de Malpighi em número de 8 crescem durante toda a fase larval por endopoliploidia (Mello & Takahashi, 1969), sendo destruídos e reabsorvidos na fase de pré-pupa, onde também se formam novos tubos para o adulto onde se apresentam em maior número (44), o que permite um aumento da superfície de absorção, facilitando a troca de material com a hemolinfa.

Tais transformações envolvem modificações na morfologia das células, alterações do conteúdo de DNA e também no conteúdo citoplasmático de substâncias, tais como cálcio, proteínas e polissacarídeos.

Durante o 4º estágio larval estes órgãos ainda devem estar ativos, o que é confirmado pelo estudo morfológico e citofotométrico. Os núcleos são grandes e aproximadamente elipsóides apresentando graus de ploidia desde o valor 72C até 176C, sendo verificado, como mostra o histograma, que grande parte dos núcleos tem conteúdo de DNA ao redor de 128C. Esta variação de núcleo para núcleo pode ser explicada pelo assincronismo na reduplicação genômica e também pela presença de DNA metabólico. Variação semelhante já foi verificada em glândula salivar larval de *Melipona*, embora em maior grau, durante todo o desenvolvimento larval (Silva de Moraes, 1972).

Na fase de pré-pupa os núcleos apresentam um aspecto bem irregular, são menores que aqueles do 4º estágio, mas o conteúdo médio de

DNA não varia, o que corrobora o encontrado por Mello & Takahashi (1969). A diminuição do tamanho dos núcleos é de se esperar desde que na fase de pré-pupa ocorre a autólise dos órgãos em estudo. Nesta fase os núcleos apresentam, como mostram os histogramas, variabilidade do conteúdo de DNA desde 88C até 160C, variabilidade esta menor que a encontrada no 4º estágio, e que pode ser explicada pelo assincronismo de reduplicação sem envolver amplificação gênica, uma vez que os tubos de Malpighi estão em processo de degeneração, apresentando-se inativos.

Os tubos de Malpighi do adulto, estudados ainda na fase de pré-pupa e que estão em início de formação apresentam um valor médio de conteúdo de DNA dado em unidades arbitrárias igual a 5,00, sendo por esta razão tal valor considerado a quantidade 4C. Embora núcleos com quantidades maiores e menores de DNA ocorram nesta fase a maior parte deles apresenta um valor 4C ou aproximadamente igual.

No adulto jovem os núcleos aumentam seu tamanho o que é acompanhado pelo aumento do conteúdo de DNA. Aqui são encontrados núcleos com conteúdo de DNA variando desde 5,5C até 11C, sendo o valor mínimo determinado nesta fase igual ao valor máximo encontrado nos tubos de Malpighi do adulto presentes na pré-pupa. Isto indica que o assincronismo na reduplicação realmente ocorre, apresentando os núcleos mais atrasados quantidades menores de DNA.

Por esses dados pode-se supor que a endopoliploidização continua ocorrendo à medida que a atividade aumenta e que adultos mais velhos apresentam maior conteúdo de DNA do que o encontrado no adulto jovem, desde que nestes indivíduos a atividade dos órgãos está apenas se iniciando.

Reações histoquímicas como PAS, azul de bromofenol e o método de Kossa, mostraram que também os componentes identificados por elas variam nas diferentes fases estudadas.

Assim ficou demonstrado (Tab. 1) que as proteínas dão uma reação intensamente positiva nas células dos tubos de Malpighi do 4º estágio, podendo tal fenômeno ser devido ao fato de que nesta fase talvez estejam sendo elaboradas enzimas que colaborarão na histólise dos órgãos ou muco-complexos como foi verificado por Gouraton (1968). A positividade diminui bastante nos tubos de Malpighi larvais presentes na pré-pupa, os quais já descarregaram seu conteúdo e estão em degeneração. Nos órgãos do adulto jovem a quantidade de proteína determinada é a mesma que aquela encontrada nas larvas do 4º estágio.

Por sua vez o cálcio demonstrado pelo método de Kossa apresenta-se em maior quantidade nas células dos tubos de Malpighi do adulto jovem onde se acumula antes de ocorrer eliminação dos excretos, enquanto que na pré-pupa não foi detectado tal componente nem nos tubos de Malpighi larvais nem nos do adulto. No entanto, sabe-se que quando não ocorrem tubos de Malpighi ou quando estes estão inativos aparecem outras estruturas com função excretora e que são, no caso dos insetos, as chamadas células de urato. Tais células aparecem na fase de pré-pupa e aí a reação para cálcio foi intensamente positiva, mostrando mais uma vez que apesar de existirem tubos de Malpighi larvais e de adulto na pré-pupa estes estão praticamente inativos, já tendo descarregado seu conteúdo no final da fase larval.

A reação do PAS foi mais intensamente positiva no tubo de Malpighi do adulto presente na pré-pupa onde componentes positivos foram detectados tanto no lúmen dos órgãos como distribuídos por toda a célula. Nos tubos de Malpighi do 4º estágio, do adulto jovem e ainda no larval presente na pré-pupa a reação foi mais fracamente positiva e ocorreu somente na parte apical das células.



Sabe-se que tecidos em formação apresentam uma grande quantidade de glicogênio e isto pode explicar o fato de a reação de PAS ser mais intensamente positiva no tubo de Malpighi do adulto presente na pré-pupa, que estão se formando de novo.

## REFERÊNCIAS

CRUZ-LANDIM, C. DA & M. L. S. MELLO

1969. The post embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hym., Apoidea). IV Development of the digestive tract. *Bol. Zool. Biol. Marinha* 1 (27): 229-262.

DURRUM, S. L.

1950. A microelectrophoretic and microionophoretic technic. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 2948-8.

FERNANDES, M. C.

1943. *Métodos escolhidos de técnica microscópica*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 611 pp.

GOURATON, J.

1968. Sécrétion d'un mucus complexe par les tubes de Malpighi des larves de cercopides (Homoptera). Rôle dans la formation de l'abri spumex. *Ann. Sci. Nat., Zoologie*, (12) 10: 117-126.

MAC MANUS, J. F. A.

1946. The histological demonstration of mucus after periodic acid. *Nature* 158: 202.

MELLO, M. L. S. & L. BOZZO

1969. Histochemistry, refractometry and fine structure of excretory globules in larval Malpighian tubes of *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apoidea). *Protoplasma* 68: 241-251.

MELLO, M. L. S. & C. S. TAKAHASHI

1969. The post embryonic changes in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hym., Apoidea). V. Polyplody in the larval Malpighian tubules. *Cytologia* 34: 369-374.
1971. DNA content and nuclear volume in larval organs of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 10 (3): 125-132.

SILVA DE MORAES, R. L. M.

1972. *Conteúdo de DNA e volume nuclear nas glândulas de seda de Melipona quadrifasciata anthidioides Lep. durante o desenvolvimento larval*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, USP.

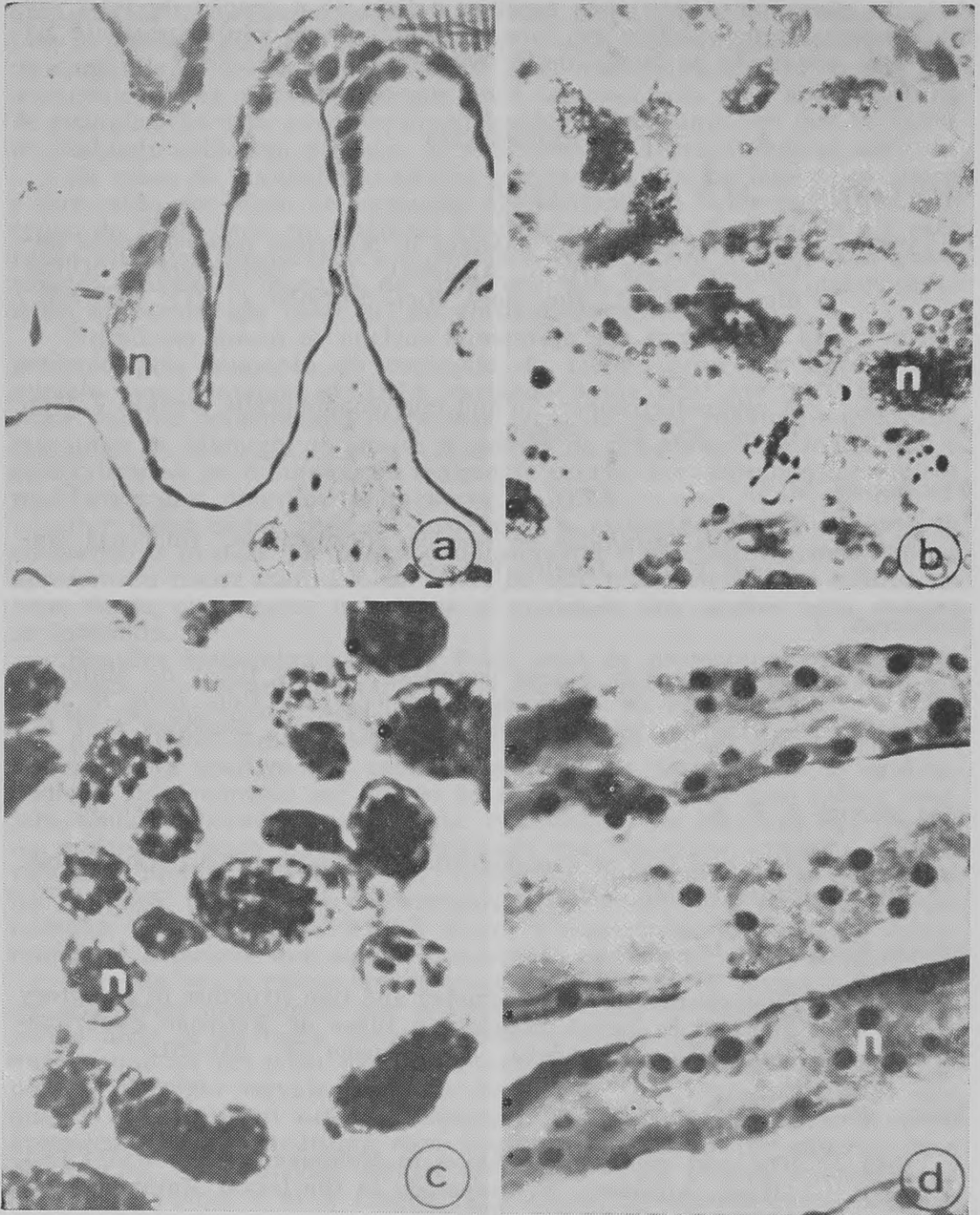


Fig. 1. a, cortes longitudinais de tubos de Malpighi do 4.<sup>o</sup> estágio larval (200x). b, cortes longitudinais de tubos de Malpighi larvais presentes na pré-pupa (100x). c, cortes transversais de tubos de Malpighi do adulto presentes na pré-pupa (200x). d, cortes longitudinais de tubos de Malpighi de adulto jovem (200x).

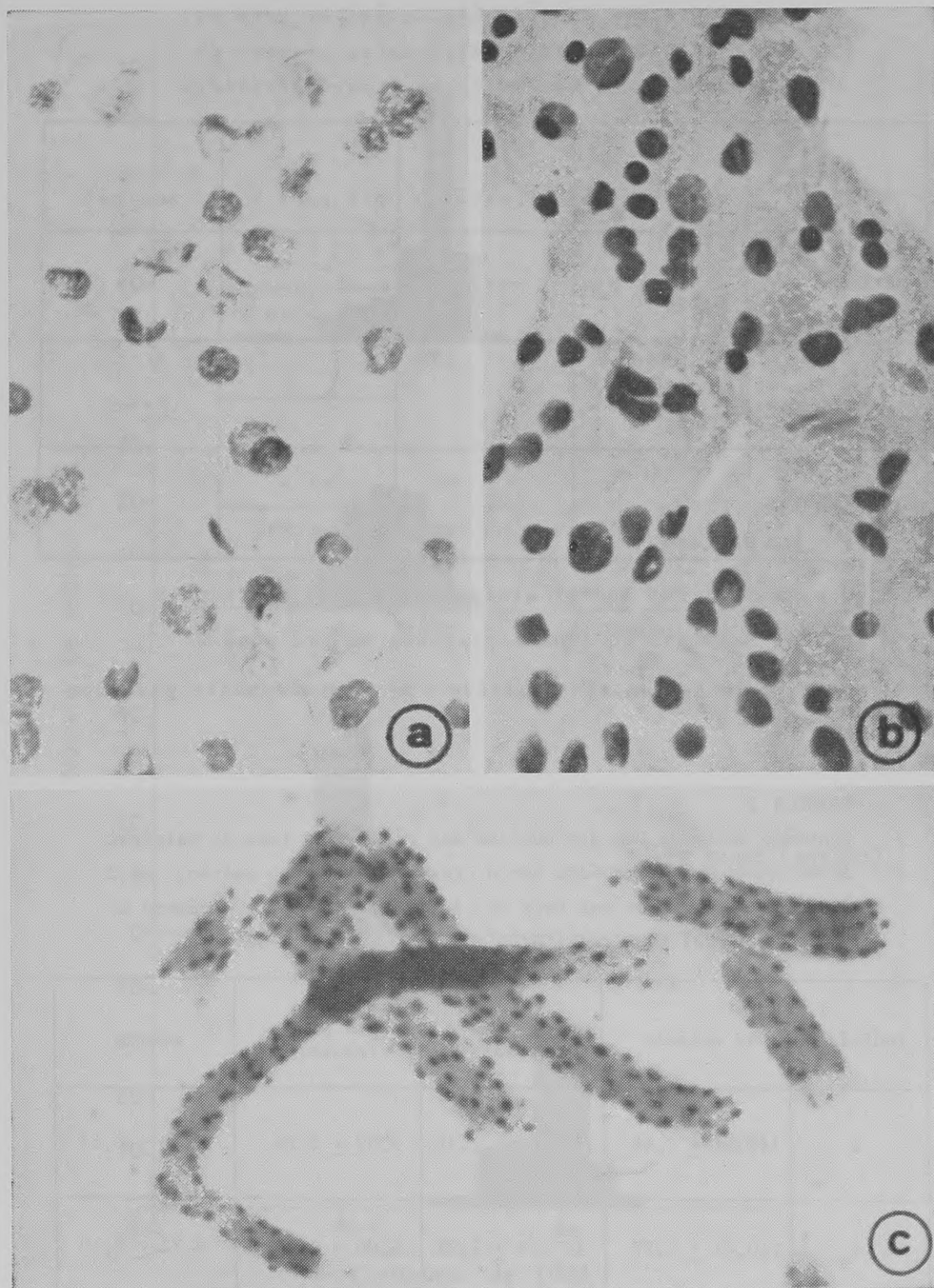


Fig. 2. a, b, c, montagens totais de tubos de Malpighi de larvas de 4.º estágio, pré-pupa e adulto de *Melipona quadrifasciata*, respectivamente (800x). N = núcleo.

TABELA 1.

Resultados das reações histoquímicas para os tubos de Malpighi nas diferentes fases do desenvolvimento de *Melipona quadrifasciata*.

Composição	Método	4º estágio	pré pupa b	adulto
proteína	azul de bro mofenol	+++	+ *	+++
			++ **	
cálcio	método de Kossa	+	-	+++
			-	
polissacarídeo	PAS	++	++ *	++
			+++ **	

\* tubo de Malpighi larval ainda presente na pré pupa b

\*\* tubo de Malpighi do adulto presente na pré pupa b

- negativo + fracamente positivo +++ intensamente positivo

TABELA 2.

Conteúdo médio de DNA dos núcleos das células do tubo de Malpighi de *Melipona quadrifasciata* com o respectivo erro padrão, em 2 indivíduos estudados por fase do desenvolvimento (n = número de medidas para cada indivíduo em cada fase = 50).

Indivíduo	4º estágio	pré pupa (larva)	pré pupa (adulto)	adulto
1	166,21 ± 2,69	145,05 ± 2,31	5,09 ± 0,10	9,90 ± 0,17
2	160,41 ± 2,77	147,14 ± 2,22	5,06 ± 0,10	9,72 ± 0,10
3	163,35	146,10	5,08	9,81



