Alexandre Hiroshi Utiyama

**Estudo morfofuncional do sistema digestivo da
cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis*
(Hemiptera: Cicadellidae).**

**Morphofunctional study of the digestive system of the
sharpshooter *Bucephalogonia xanthophis*
(Hemiptera: Cicadellidae).**

São Paulo

2011

Alexandre Hiroshi Utiyama

**Estudo morfofuncional do sistema digestivo da
cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis*
(Hemiptera: Cicadellidae).**

**Morphofunctional study of the digestive system of the
sharpshooter *Bucephalogonia xanthophis*
(Hemiptera: Cicadellidae).**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências Biológicas, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Freitas

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Utiyama, Alexandre.

Estudo morfofuncional do sistema digestivo da cigarrinha
Bucephalogonia xanthophis (Hemiptera: Cicadellidae).

118f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Sistema digestivo de insetos 2. Membrana perimicrovilar
3. Morfologia

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento
de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro
(Orientador)

Dedicatória

*Aos meus pais, Reika e Akimitsu, a quem devo toda minha vida e minha irmã,
Karen, que sempre oferece seu apoio em todos os momentos.*

*À minha namorada e eterna companheira, Priscila, por ser meu porto seguro e
que faz toda e qualquer jornada valer a pena.*

Agradecimentos

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, não somente pela orientação, mas também pelos sábios conselhos e por sempre acreditar no meu potencial, apesar de todas as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, por disponibilizar o Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP) para a realização da parte bioquímica deste trabalho e pelos seus ótimos conselhos.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, por fornecer as cigarrinhas da espécie *Bucephalogonia xanthophis*, objeto de estudo deste trabalho, e por disponibilizar o Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (Entomologia – ESALQ/USP).

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, pela colaboração e permitir nossa interação com a ESALQ-USP.

Aos técnicos e amigos, Márcio Valentim Cruz e Waldir Caldeira, pelo treinamento metodológico, pela disposição, pelas ótimas sugestões e, acima de tudo, pela companhia ao longo de todos estes anos.

Ao doutorando e amigo Fábio Kendi Tamaki, do Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP), por ensinar os métodos bioquímicos, sempre paciente, disposto e bem humorado.

Aos companheiros de laboratório, Emiliano, Fernanda, Felipe e Camila, que compartilharam conhecimentos e pela agradável convivência nestes anos de pós-graduação.

Ao doutorando Felipe, companheiro de diversas atividades, por todo seu apoio e disposição.

À secretária do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva (IB-USP), Deisy Santos de Moraes, por mediar a comunicação com o departamento.

À Nelsita Ferraz de Campos Trimer, diretora técnica do Serviço de Biblioteca do IB-USP, por fornecer material bibliográfico de difícil acesso.

Aos pais da minha namorada, Yoshio e Satiko, por me acolherem como um filho e por todo suporte ao longo dos anos, e às minhas cunhadas, Tatiana e Michelle, pelas conversas e momentos de descontração.

A todos os meus amigos, tanto os de velha data, quanto os recém chegados, que tornam minha jornada sempre mais agradável.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Sumário

INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. MATERIAL	18
2. MÉTODOS	18
2.1 MICROSCOPIA DE LUZ	18
2.1.1. ANATOMIA	18
2.1.2. HISTOLOGIA	18
2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA	19
2.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	19
2.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	20
2.3. MÉTODOS BIOQUÍMICOS	21
2.3.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESATURANTES (SDS-PAGE)	21
2.3.2. WESTERN BLOT E IMUNOENSAIO	21
RESULTADOS	23
1. ANATOMIA	24
2. HISTOLOGIA	25
2.1. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA	25
2.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SISTEMA DIGESTIVO	26
3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	28
3.1. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA	28
3.2. ULTRAESTRUTURA DA CÂMARA DE FILTRAÇÃO	28
3.3. ULTRAESTRUTURA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI	30
3.4. ULTRAESTRUTURA DO VENTRÍCULO	30
4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	33
5. MÉTODOS BIOQUÍMICOS	34
DISCUSSÃO	35
RESUMO	59
ABSTRACT	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
FIGURAS	78

INTRODUÇÃO

Os insetos são, indiscutivelmente, os animais dominantes, em número, em nosso planeta (Terra, 1988). É o grupo mais rico em diversidade de espécies dentre os Arthropoda, sendo encontrado nos mais diversos habitats, com a exceção do ambiente marinho (Triplehorn & Johnson, 2005). Eles vêm evoluindo há cerca de 400 milhões de anos, desde o período Devoniano, no qual, segundo os registros fósseis, surgiram os primeiros insetos (Grimaldi & Engels, 2005).

A adaptação de tantas espécies aos mais diversos habitats permitiu que quase todo material orgânico disponível na natureza possa ser utilizado como alimento (Wigglesworth, 1972). Tal diversidade alimentar dos insetos associada a um íntimo contato com a flora e fauna possibilitou que algumas espécies se tornassem pragas de lavouras, de modo a serem os maiores competidores do homem por alimento (Medeiros, 2000). Além disso, existem os prejuízos causados à saúde pública, já que cerca de 80% de todas as doenças contagiosas têm, como vetores, insetos e outros artrópodes (Medeiros, 2000).

Devido ao extenso uso dos tradicionais defensores químicos contra as pragas agrícolas, que trazem graves consequências ambientais, têm ocorrido avanços significativos nas pesquisas que buscam alternativas mais ecologicamente corretas para o controle dessas pragas (Ribeiro et al., 1990). Uma das linhas de pesquisa de grande potencial envolve o estudo de compostos químicos encontrados nas próprias plantas, capazes de inibir as enzimas digestivas dos insetos predadores e cujas concentrações podem variar nas diferentes partes da planta (Medeiros, 2000).

Estudos sobre os processos digestivos em insetos também têm se mostrado promissores, enfatizando aspectos da biologia celular das células intestinais destes animais e na caracterização de suas enzimas digestivas, assim como sua distribuição celular e os processos de secreção (Ribeiro et al., 1990).

O sistema digestivo dos insetos representa a principal interface de interação entre estes animais e o meio ambiente e apresenta grande diversidade morfológica e funcional, com digestão e assimilação de nutrientes apropriadas aos diferentes tipos de alimentos (Terra, 1988).

A morfologia do sistema digestivo dos insetos tem sido relacionada, por muitos autores, com o tipo de dieta ingerida pelo animal. Segundo Dow (1986), em um dos trabalhos mais bem sucedidos abordando este ponto de vista, sugere que os insetos devem ser analisados com base em suas preferências

alimentares, classificando-se as dietas de acordo com o estado físico (sólidas ou líquidas) e composição nutricional (origem animal ou vegetal). Embora esta aproximação ofereça informações importantes sobre a fisiologia da digestão nos insetos, muitos outros aspectos devem ser abordados para uma análise mais precisa desta relação (revisto por Terra, 1988; 1990; Terra & Ferreira, 1994).

Anatomicamente, podemos dividir o sistema digestivo dos insetos em três regiões básicas: o intestino anterior ou estomodeo, o intestino médio ou mesêntero e o intestino posterior ou proctodeo (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1998).

O intestino anterior se inicia na boca e inclui a cavidade bucal, a faringe, o esôfago, o papo e o proventrículo (ou moela), sendo que estes dois últimos podem não estar presentes em todos os insetos. Em boa parte das espécies, o papo é um órgão de armazenamento, mas existem casos nos quais ele também é um sítio de digestão. O proventrículo é um órgão triturador e, em alguns casos, apresenta uma válvula que controla a passagem do alimento para o intestino médio. O intestino anterior tem origem ectodérmica e apresenta uma fina camada de cutícula sobre suas células, podendo apresentar projeções na forma de denticulos ou espículas (Wigglesworth, 1972).

Os principais eventos de digestão e absorção de nutrientes ocorrem no intestino médio. Ele é formado por um tubo simples, denominado ventrículo, que pode apresentar projeções na forma de sacos em fundo cego, os cecos gástricos (Terra, 1988). Estas estruturas estão presentes em número variável e, geralmente, na região anterior do ventrículo. O epitélio do intestino médio é formado por um tipo principal de célula denominada célula colunar ou enterócito. Frequentemente se observa, também, células regenerativas e endócrinas. O enterócito é responsável pelos eventos mais significativos do processo digestivo em insetos, como, por exemplo, a absorção de nutrientes e água, a secreção de água e enzimas digestivas e a digestão final do alimento (Terra, 1988). As células regenerativas são indiferenciadas e se localizam individualmente ou formando pequenos agrupamentos (ninhas) na base do epitélio, sendo responsáveis pela renovação celular (Terra, 1988; Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996; Chapman, 1998). As células endócrinas estão relacionadas com a síntese de hormônios, que podem atuar na diferenciação celular e na regulação da produção de enzimas digestivas (Iwanaga et al., 1981; Chapman, 1998).

Na região de transição entre o intestino médio e o posterior há um esfíncter (piloro), no qual se inserem os túbulos de Malpighi, que são órgãos do sistema excretor. Assim como o intestino anterior, o intestino posterior é de origem ectodérmica e também apresenta uma camada de cutícula sobre suas células (Wigglesworth, 1972; Terra, 1990; Chapman, 1998). Em algumas espécies, este segmento do intestino é formado por um tubo estreito, enquanto em outras está modificado em uma câmara de fermentação ou pança, que abriga microorganismos simbiotes envolvidos na digestão de celulose. O intestino posterior inclui o íleo, o cólon e o reto, terminando no ânus. O reto tem papel na absorção de água e íons (Wigglesworth, 1972; Terra, 1990; Chapman, 1998).

Grande parte dos insetos, com exceção dos Hemiptera e Thysanoptera, possui uma membrana acelular no lúmen do intestino médio denominada membrana peritrófica (Terra, 1996; 2001; Lehane, 1997). Ela é constituída por uma rede de quitina inserida em uma matriz de proteínas e carboidratos e separa o conteúdo luminal do epitélio intestinal em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico, correspondente ao interior da membrana peritrófica, e o espaço ectoperitrófico, que corresponde ao espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio (Terra, 2001).

Sua função foi primeiramente relacionada com a proteção do epitélio contra microorganismos, contra abrasão das células epiteliais pela passagem do alimento durante a digestão, com a permeabilidade diferencial às enzimas digestivas e aos produtos de digestão e com a conservação dessas enzimas (Terra, 1988). No entanto, estudos posteriores mostram que a membrana peritrófica tem um papel ainda mais importante no processo de digestão em insetos. Aparentemente, ela previne significativamente a ligação não-específica de material não digerido à superfície das células do ventrículo, a remoção de moléculas oligoméricas do espaço endoperitrófico e a prevenção da excreção das enzimas digestivas junto com o bolo alimentar (Terra, 2001).

A primeira tentativa de relacionar os compartimentos do intestino médio com as diferentes fases da digestão foi realizada em larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera) por Ferreira et al. (1981). Determinações enzimáticas em células do intestino médio e nos espaços endo e ectoperitrófico desta larva indicaram que a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, enquanto que a digestão intermediária e a final acontecem no espaço ectoperitrófico e ao nível

das células do intestino médio, respectivamente (Ferreira et al., 1981). Análises morfobioquímicas posteriores mostraram a capacidade das células da região posterior do ventrículo de secretar água, enquanto as células do ceco são capazes de absorvê-la, criando, desta forma, um contra fluxo de líquido no espaço ectoperitrófico, no sentido póstero-anterior.

Em seu trajeto pelo interior do espaço endoperitrófico, da região anterior para a posterior do intestino médio, o alimento é hidrolisado continuamente pelas enzimas digestivas e, à medida que os produtos da hidrólise de proteínas, peptídeos e polissacarídeos atingem pesos moleculares menores, eles são capazes de atravessar os poros da membrana peritrófica e entrar no espaço ectoperitrófico. Neste compartimento, os produtos da digestão são levados pelo fluxo contracorrente de volta para a região anterior, onde são submetidos à digestão intermediária e final. Finalmente, o alimento digerido é absorvido pelas células do ceco gástrico. As enzimas digestivas são conduzidas junto com os produtos da digestão para a região anterior do intestino médio, podendo atravessar novamente os poros da membrana peritrófica de volta para o espaço endoperitrófico para iniciar um novo ciclo digestivo. Este mecanismo resulta em uma grande economia para o organismo, uma vez que as enzimas digestivas podem ser reutilizadas várias vezes. O resultado da análise realizada no intestino posterior de *R. americana* mostrou que pelo menos 80% das enzimas digestivas presentes no espaço endoperitrófico deixam de ser excretadas para serem recuperadas do bolo alimentar (Ferreira et al., 1981).

O modelo de circulação endo-ectoperitrófico de enzimas digestivas foi demonstrado em insetos de outras ordens, com diferentes hábitos alimentares, inclusive naquelas que não possuem cecos gástricos. No caso da ausência de cecos, como foi descrito em *Erinnys ello* (Lepidoptera), a absorção de água e nutrientes, além da digestão final, é feita pelas células colunares do ventrículo anterior (Terra, 1988; 1990; Ribeiro et al., 1990).

Outro modelo de digestão em insetos é observado em espécies das ordens Hemiptera e Thysanoptera. Estes insetos não possuem membrana peritrófica (Silva et al., 1995; Terra, 2001), mas sim, um complexo sistema luminal de membranas associado às microvilosidades. Algumas espécies possuem uma membrana lipoprotéica que reveste as microvilosidades da superfície apical das células colunares do ventrículo, denominada membrana perimicrovilar (MPM)

(Lane & Harrison, 1979). Acredita-se que as MPM tenham surgido em um ancestral do grupo Hemiptera, que se alimentava de seiva das plantas (Terra, 1988). Esta membrana reveste as microvilosidades a uma distância regular e suas extremidades projetam-se em direção ao lúmen do intestino médio, terminando em fundo cego. Cria-se, assim, um espaço, denominado espaço perimicrovilar (EPM), entre as microvilosidades e a membrana perimicrovilar (Silva et al., 1995; Terra, 2001). A membrana das microvilosidades é rica em proteínas integrantes, em contraposição às MPM, que possui poucas delas. As microvilosidades transportam, ativamente, íons potássio (o íon mais importante na seiva) para o interior dos enterócitos a partir do EPM, formando, deste modo, um gradiente de concentração entre a seiva no lúmen intestinal e o espaço perimicrovilar. Este gradiente pode ser a força motriz que permite a absorção ativa de componentes orgânicos, tais como aminoácidos, por proteínas carreadoras apropriadas presentes na membrana perimicrovilar. Em seguida, estes nutrientes orgânicos difundem-se para a membrana das microvilosidades, onde poderão ser incorporados pelas células colunares por transportadores específicos (Terra, 1988).

A ausência da membrana peritrófica em Hemiptera está, provavelmente, relacionada à adaptação do ancestral deste grupo, que utilizava o floema das plantas como alimento. Pelo fato do floema das plantas ser composto de monômeros e dímeros orgânicos, como a sacarose e minerais, praticamente nenhuma digestão do alimento é necessária, além da hidrólise dos dímeros (Terra, 1988). Atualmente, os hemípteros são capazes de se alimentar tanto de xilema quanto de floema. Esta fonte de alimento é extremamente pobre em aminoácidos, que podem ser absorvidos pelo mecanismo descrito acima, dependente da membrana perimicrovilar (Terra & Ferreira, 1994).

Estudos realizados pela nossa equipe comprovaram a existência de membrana perimicrovilar em duas espécies de hemípteros: o hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) (Ferreira et al., 1988) e o sugador de sementes *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) (Silva et al., 1995; 1996). No afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) (Cristofolletti et al., 2002), não existe uma membrana perimicrovilar como as descritas para estas duas espécies de Heteroptera, mas sim um sistema de membranas enoveladas

ligadas às lamelas (microvilosidades modificadas) na região apical dos enterócitos, denominada membrana perimicrovilar modificada (MPMm).

Nas últimas décadas, ampliou-se a pesquisa no campo dos processos digestivos em insetos, com ênfase na biologia celular das células intestinais e na caracterização das enzimas digestivas desses animais, incluindo mecanismos de secreção e sua distribuição celular (Terra, 1988; 1990; Terra & Ferreira, 1994; Terra et al., 1996 a, b). Espera-se que um maior conhecimento nessa área leve ao desenvolvimento de inibidores específicos de enzimas digestivas que poderão ser usados como uma nova geração de praguicidas.

A ordem Hemiptera é um grupo grande e diverso de insetos, com metamorfose simples, que variam consideravelmente em forma corporal, asas, antenas, biologia e hábitos alimentares. Devido a esta diversidade, estes insetos eram classificados em duas diferentes ordens: Hemiptera e Homoptera. Os homópteros dividiam-se em duas subordens denominadas Auchenorrhyncha, grupo das cigarras e cigarrinhas, e Sternorrhyncha, que compreende os afídeos. A classificação atual dos Hemiptera abrange três subordens: Heteroptera (percevejos), Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) e Sternorrhyncha (afídeos) (Gillot, 1995; Resh & Cardé, 2003; Triplehorn & Johnson, 2005).

Esta ordem é de grande importância econômica, já que muitas de suas espécies interagem com o homem. Praticamente todos os Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha se alimentam de plantas, enquanto que os Heteroptera, em geral, são predadores, embora existam alguns grandes grupos mais recentes desta subordem que tenham retornado ao comportamento fitofágico. A eficiência destes animais para se alimentarem de plantas deve-se em grande parte ao seu aparelho bucal, que também sofreu adaptações para o hábito predatório (Grimaldi & Engel, 2005) e para a hematofagia, como os integrantes da família Reduviidae. Muitos destes insetos são vetores de doenças de vertebrados de sangue quente, incluindo o homem. Existem muitos hemípteros que são sérias pragas de plantas cultivadas (Triplehorn & Johnson, 2005).

Atualmente, os membros da subordem Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) são classificados em duas infraordens: Cicadomorpha, que compreende as superfamílias Cercopoidea, Cicadoidea e Membracoidea, e Fulguromorpha, que contém apenas a superfamília Fulgoroidea (Grimaldi & Engel, 2005; Resh & Cardé, 2003). Embora seja aceito que estas quatro

superfamílias sejam monofiléticas, ainda há controvérsia sobre a relação entre estes grupos e com os grupos fósseis. Consequentemente, nenhuma classificação foi aceita universalmente e a nomenclatura de alguns grupos não é definitiva (Resh & Cardé, 2003).

Os membros da subordem Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas) são insetos ativos, sendo bons voadores ou saltadores. Os adultos desta subordem, tanto machos como fêmeas, comunicam-se especificamente por sons. Os machos de muitas espécies de Auchenorrhyncha são capazes de emitir sons para atrair fêmeas, mas, com exceção das cigarras, estes sons são praticamente inaudíveis ao homem (Triplehorn & Johnson, 2005).

Grande parte das espécies de Auchenorrhyncha alimenta-se de angiospermas. Ao contrário dos Sternorrhyncha, os quais perfuram os tecidos vegetais intercelularmente, ou seja, os estiletes atravessam os tecidos do hospedeiro pelos espaços entre as células, os Auchenorrhyncha utilizam-se de perfuração intracelular, na qual os estiletes perfuram as células do tecido da planta. Após a inserção dos estiletes, os insetos secretam uma camada de saliva que endurece em contato com o ar ou outro fluido, formando uma camada salivar ao redor dos estiletes, impedindo o vazamento de seiva ou entrada de ar durante a alimentação. Neste processo, a planta pode ser infectada por patógenos, geralmente bactérias, pelos insetos parasitas (Resh & Cardé, 2003).

Os indivíduos da subordem Auchenorrhyncha adaptaram-se à alimentação baseada em uma fonte nutricional não balanceada, como o floema que possui muito açúcar e o xilema que é extremamente diluído. Muitos Cicadomorpha têm, em seus sistemas digestivos, um arranjo denominado câmara de filtração (Resh & Cardé, 2003), que consiste na aposição entre o ventrículo anterior e o posterior e na diminuição da espessura de seus epitélios, permitindo que o excesso de água passe diretamente do intestino anterior para o posterior, acumulando seiva concentrada no ventrículo médio (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974). Em outros grupos estas adaptações vão desde o desenvolvimento de células especializadas na absorção de nutrientes do conteúdo intestinal até a formação de micetócitos, que abrigam procariontes endossimbiontes (Resh & Cardé, 2003).

O grupo Auchenorrhyncha contém algumas das mais destrutivas pragas agrícolas. Os danos causados às plantas podem ser diretos, tanto pela

alimentação dos insetos quanto pela sua oviposição, ou indireto, pela transmissão de patógenos (Resh & Cardé, 2003). As famílias Cicadellidae e Cercopidae são as principais pragas dos pomares de citricultura nacional (De Negri, 1990). Espécies de ambos os grupos são vetores de estirpes de *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora da clorose variegada dos citros (CVC) (Beretta et al., 1993; Rossetti et al., 1990). Entretanto, dentro da família Cicadellidae, apenas a subfamília Cicadellinae apresenta espécies vetores de CVC (Donadio & Moreira, 1997).

Existem também espécies desta subordem que são consideradas benéficas. As cigarras são utilizadas como alimento por algumas culturas e outras espécies começaram a ser exploradas para biocontrole de ervas daninhas (Resh & Cardé, 2003).

O controle tradicional das pestes deste grupo com inseticidas resultou no desenvolvimento de resistência em muitas delas. O manejo atual de pestes promove a adoção de alternativas para controlar estas pestes, como variedades de plantas resistentes e a utilização de parasitóides e patógenos como controle biológico (Resh & Cardé, 2003).

A cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Cicadellidae; Cicadellinae), objeto de estudo deste trabalho, alimenta-se de xilema tanto de gramíneas quanto de espécies de citros. É uma das espécies responsáveis pela transmissão de *X. fastidiosa* e, conseqüentemente, pela dispersão da CVC pelos pomares brasileiros. Recentemente, foi descoberto que a espécie *B. xanthophis* também transmite as estirpes de *X. fastidiosa* responsáveis pela doença da folha queimada em cafeeiros (Marucci et al., 1999; Marucci et al., 2001).

Este projeto se insere em uma perspectiva mais ampla de estudo do sistema digestivo de espécies representativas das diferentes ordens de insetos, em uma abordagem evolutiva, na qual informações de natureza morfológica estão sendo integradas a dados bioquímicos de caracterização e distribuição de enzimas digestivas. Dentro deste contexto, um estudo do sistema digestivo de insetos representantes da ordem Hemiptera tem um interesse bastante grande, dada sua importância econômica e à escassez de trabalhos acerca de sua morfofisiologia. Existem trabalhos realizados, sob esta perspectiva, pelo nosso grupo de pesquisadores em três representantes desta ordem, sendo um deles feito por Ferreira et al. (1988), com a espécie *Rhodnius prolixus*, subordem

Heteroptera, família Reduviidae, outro por Silva et al. (1995;1996), com a espécie *Dysdercus peruvianus*, subordem Heteroptera, família Pyrrhocoridae, e um terceiro por Cristofolletti et al. (2002), com a espécie *Acyrtosiphon pisum*, subordem Sternorrhyncha, família Aphididae. Deste modo, o presente trabalho realizado a com cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis*, subordem Auchenorrhyncha, infraordem Cicadomorpha, família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae, torna-se importante no sentido de se conhecer melhor a organização do fenômeno digestivo dentro dos Hemiptera, comparando com as informações já obtidas em *R. prolixus*, *D. peruvianus* e em *A. pisum*.

OBJETIVOS

1. Realizar uma análise detalhada da organização morfofuncional do digestivo de *Bucephalogonia xanthophis*, (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) do ponto de vista anatômico, histológico e ultraestrutural e identificar os principais tipos celulares presentes ao longo do tubo digestivo, enfatizando os mecanismos de secreção existentes;
2. Verificar a presença de um sistema luminal de membranas associado às microvilosidades, característica de Hemiptera e Thysanoptera, e sua forma de organização;
3. Detectar a possível existência de homologia entre as enzimas presentes no tubo digestivo de *B. xanthophis* e os anticorpos disponíveis em nosso laboratório, possibilitando a imunolocalização destas enzimas e, eventualmente, sua distribuição e seu mecanismo de secreção;
4. Dar continuidade aos estudos realizados em nosso laboratório sobre a morfofisiologia da digestão em insetos, em uma perspectiva evolutiva, para a elucidação de aspectos funcionais que envolvem este fenômeno e suas relações filogenéticas, procurando contribuir para a melhoria do conhecimento deste fenômeno.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Foram utilizados insetos adultos da espécie *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae) em todos os experimentos. Eles foram anestesiados com gelo para, em seguida, serem dissecados em fixador adequado, sob microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C, utilizando-se de pinças oftalmológicas de ponta fina e alfinetes entomológicos para a manipulação e remoção de seus tubos digestivos.

2. MÉTODOS

2.1. Microscopia de Luz

2.1.1. Anatomia

Os sistemas digestivos recém isolados dos animais foram mantidos em solução salina 0,1 M para evitar o dessecamento e analisados ao microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 200-C. O registro das imagens foi feito por uma câmara digital Sony DSC-S75 Cyber-Shot acoplada ao microscópio.

2.1.2. Histologia

A utilização de um bom fixador é fundamental para a qualidade na preservação das estruturas, que resultará em uma maior riqueza em detalhes nas observações histológicas. Com a finalidade de otimizar as análises, foram testados dois tipos de soluções fixadoras das mais usadas no laboratório: a) Bouin e b) Paraformaldeído 4% em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 0,1 M.

Os tubos digestivos já fixados foram desidratados em uma série de banhos sucessivos em álcool etílico 70 (15 minutos), 95 (15 minutos) e 100% (duas séries de 20 minutos). Em seguida, procedeu-se à inclusão dos materiais em historesina da Leica (hidroxietilmetacrilato), pelo procedimento fornecido pelo fabricante.

Após a polimerização da resina, os blocos foram cortados em micrótomo Leica RM 2145, utilizando-se de navalhas com fio de tungstênio. Os cortes

obtidos entre 3 e 5 μm de espessura, foram recolhidos em lâminas histológicas e colocados em placa aquecida a 45° C para secagem.

Para a coloração das preparações, os corantes foram previamente aquecidos em banho Maria a 45°C para aumentar a eficiência do processo. Os materiais foram imersos em hematoxilina de Delafield por 10 minutos, lavados em água corrente, e, em seguida, imersos em eosina amarela por mais 30 segundos. Depois de corados, os cortes foram secos novamente em placa aquecida a 45° C.

Para a montagem permanente das lâminas foi utilizado o Entellan (Merck, USA). O registro das observações histológicas foi feito por uma câmera digital Sony DSC-S75 Cyber-Shot, acoplada a um fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop.

2.2. Microscopia Eletrônica

2.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para o estudo ultraestrutural do material, assim como para as análises histológicas, foram testadas duas soluções fixadoras usualmente utilizadas em nosso laboratório. A primeira delas foi uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,4, por duas horas a 4° C. Seguem-se três lavagens em tampão cacodilato 0,1 M com sacarose 0,2 M. Uma segunda solução fixadora utilizada foi uma modificação daquela descrita por Karnovsky (1965), composta por 10 ml de tampão cacodilato 0,2 M com 2 ml de glutaraldeído 25%, 4 ml de paraformaldeído 10%, 20 ml de água destilada e 10 mg de cloreto de cálcio. A lavagem foi feita com três banhos em tampão cacodilato de sódio 0,2 M e pH 7,4.

Após o procedimento de lavagem, o material foi pós-fixado em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, também a 4° C, seguido por mais três banhos em solução salina de NaCl 0,1 M, 4° C para lavagem.

Em seguida, as peças foram submetidas a uma contrastação em bloco (“en bloc” staining), com solução aquosa de acetato de uranila 1% por um período de 18 horas, a 4° C.

Precedendo a inclusão, o material foi submetido a uma bateria de desidratação, que consiste em uma série de banhos sucessivos em soluções de álcool etílico 50, 70, 95 e 100% por 10 minutos cada, em temperatura ambiente.

Como meio de inclusão foi utilizada a resina de Spurr (1969). A embocagem final das peças foi feita em moldes de silicone e a polimerização da resina obtida em estufa a 56° C, por 72 horas.

Os cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo Sorvall MT2-B, recolhidos em telas de cobre de 200 mesh, recobertas previamente com um filme de parlódio e carbono. Em seguida, os cortes foram contrastados em uma solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

Os cortes ultrafinos, devidamente contrastados, foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM-900, operado a 80 kV.

Para os experimentos utilizando o lantânio como um traçador foi adotado a mesma metodologia acima. Entretanto, para todo o processo de fixação, lavagem e pós-fixação foi utilizado uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,2 M com nitrato de lantânio a 2%. A contrastação em bloco com acetato de uranila 1% foi substituída por uma contrastação posterior à ultramicrotomia, antecedendo a contrastação com citrato de chumbo.

2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para os estudos em microscopia eletrônica de varredura, os materiais foram fixados em solução modificada de Karnovsky (1965) em tampão cacodilato de sódio seguido de três banhos em tampão cacodilato 0,2 M e pH 7,4, como descrito na metodologia de microscopia eletrônica de transmissão. A seguir, o material passou por um banho em ósmio 1% por 1 hora, outro em ácido tânico 1% por 10 minutos e retornou ao ósmio 1% por 30 minutos. Foi, então, lavado três vezes em água destilada por 5 minutos.

O procedimento de desidratação adotado é semelhante ao utilizado para a microscopia eletrônica de transmissão, descrita anteriormente. Após a bateria de banhos em concentrações crescentes de etanol, os materiais foram secos em unidade de ponto crítico de CO₂ da Balzers, modelo CPD-030.

Finalmente, as preparações foram montadas em “stubs” adequados, metalizados em metalizador Balzers, modelo SCD-050 e examinadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM-940.

2.3. Métodos Bioquímicos

Nesta etapa bioquímica do trabalho, os animais foram dissecados imersos em solução salina para o isolamento de seus sistemas digestivos, evitando seu dessecamento. Em seguida, os tubos digestivos foram divididos em três partes: câmara de filtração, V1 e V2 e, em seguida, homogeneizados em homogeneizador de Potter-Ehveljem acoplado a um homogeneizador mecânico (Tecnal, modelo TE-039) em água bidestilada gelada (dez movimentos de subida e descida do pistilo).

2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras a serem submetidas ao SDS-PAGE foram aquecidas previamente por 4 minutos a 95° C para, em seguida, serem aplicadas a um gel de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v; Laemli, 1970). Aplicou-se, então, uma corrente elétrica de 0,2 mA/cm² às placas de eletroforese, na presença de tampão Tris-Base 25 mM pH 8,3 contendo glicina 192 mM e coradas com azul de Coomassie ou Ponceau-S 2% em ácido acético 1% (Blum et al., 1987).

2.3.2. Western Blot e imunoensaio

Finalizada a eletroforese em SDS-PAGE, as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose de tamanho de poro de 0,45 µm, utilizando-se o método descrito por Towbin et al. (1976). O conjunto formado pelo gel, a membrana de nitrocelulose e 4 papéis filtro de tamanho aproximado ao do gel foram inicialmente equilibrados durante 20 minutos em tampão Towbin. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando-se um sistema de transferência de proteína

semi-seco da Bio-Rad na presença do tampão utilizado anteriormente, por 30 minutos e com uma voltagem constante de 15 V.

Com a finalidade de bloquear os sítios da membrana de nitrocelulose que não contém proteínas transferidas dos géis, ela foi imersa em uma solução de 5% de leite em pó desnatado dissolvido em TBS (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 mM) contendo Tween20 0,05% (TBS-T) por uma noite.

Depois de bloqueada, a membrana foi lavada três vezes, de modo que a primeira ocorre rapidamente e as demais por 15 minutos cada em TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada por duas horas com o anticorpo primário anti- α -glicosidase de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), diluído na proporção de 1:200 em TBS-T. Passadas as duas horas, a membrana foi lavada novamente em TBS-T como descrito anteriormente e, então, incubada com o anticorpo secundário diluído em 1000 vezes em TBS-T, por mais duas horas. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho, polivalente conjugado à peroxidase (Sigma). Depois da incubação, a membrana foi lavada com TBS três vezes.

Finalmente, a membrana foi incubada com uma solução recém preparada contendo 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvidas em 4 mL de metanol, à qual foram adicionados 20 mL de TBS aquecido a 37° C e 15 μ L de H₂O₂. A membrana foi incubada até a visualização das bandas escuras (aproximadamente 15 minutos) para, então, ser extensivamente lavada em água bidestilada e seca ao ar.

RESULTADOS

1. ANATOMIA

Anatomicamente, o sistema digestivo de *Bucephalogonia xanthophis* pode ser dividido em três regiões distintas: o intestino anterior, intestino médio (ou ventrículo) e intestino posterior. O tubo digestivo tem início na boca e termina no ânus do animal, passando por estas três regiões básicas e não apresenta cecos gástricos na região do intestino médio. Entretanto, esta espécie exibe uma estrutura extremamente complexa, ainda do ponto de vista anatômico, chamada de câmara de filtração (CF) (figuras 1, 2), que é o órgão central do sistema digestivo nesta espécie. A câmara de filtração é uma estrutura expandida, recoberta por uma membrana, na qual ocorre o íntimo contato entre a porção proximal dos quatro túbulos de Malpighi, órgãos do sistema excretor, com três segmentos do intestino, o intestino médio anterior, o médio posterior e um curto segmento inicial do intestino posterior, denominado piloro, a partir do qual se originam os quatro túbulos de Malpighi (figuras 1, 2).

A partir da boca, o sistema digestivo deste inseto segue como um longo intestino anterior sem diferenciações, o esôfago, e comunica-se com a câmara de filtração (figuras 1, 2). O esôfago estende-se desde o aparelho bucal até, aproximadamente, a região de transição entre o tórax e o abdômem. O ventrículo tem início no interior da câmara de filtração e continua, também, externamente a esta estrutura, atravessando-a. Ao sair da câmara, o intestino médio se expande, originando o domínio cônico do ventrículo (VC), cujo epitélio apresenta muitas dobras, resultando no aspecto enrugado desta estrutura (figuras 1, 2). Ao final desta expansão, o ventrículo segue como um longo tubo delgado, caracterizando, assim, o domínio tubular do ventrículo (VT). Esta região encontra-se bastante compactada no interior do corpo do animal e segue pósterio-anteriormente, com sutil e gradual diminuição no diâmetro do tubo, retornando à câmara de filtração. A transição do intestino médio para o posterior é denominada piloro e acontece no interior da CF. Esta região caracteriza-se pela comunicação entre os epitélios dos quatro túbulos de Malpighi com o do sistema digestivo e ocorre no segmento do tubo digestivo próximo à saída da câmara de filtração. A partir do piloro, o intestino posterior segue para fora da câmara de filtração em direção ao ânus, localizado na região posterior do animal, enquanto que os túbulos de Malpighi seguem no sentido oposto, justapostos ao intestino médio e saem da câmara de

filtração pelo mesmo ponto de entrada do ventrículo, continuando seu trajeto para a região posterior do animal (figura 1). O intestino posterior é observado como um tubo delgado achatado e, assim como a região tubular do ventrículo, bastante compactado na cavidade corporal do inseto (figuras 1, 2). O reto, porção terminal do intestino posterior, apresenta-se como uma estrutura expandida, de coloração amarelada e de difícil preservação durante a dissecação. Nesta região associam-se as extremidades distais dos túbulos de Malpighi, que possuem fundo cego (figura 1). O reto associa-se ao exoesqueleto, formando o ânus.

A porção livre dos túbulos de Malpighi (regiões dispersas pela hemocela) possui três domínios: um proximal, um secretor e um distal (figura 1). O segmento proximal dos túbulos de Malpighi é o mais próximo da câmara de filtração e consiste em um tubo extremamente fino, apresentando uma superfície rugosa. A região secretora é aquela que se segue à porção proximal e se apresenta como uma dilatação, com epitélio liso e com aspecto branco leitoso. O segmento distal é o último segmento dos túbulos de Malpighi e é morfologicamente muito semelhante ao proximal, diferindo apenas em extensão, sendo menores, e no tamanho dos nódulos, que são maiores. Como descrito anteriormente, as regiões distais dos túbulos de Malpighi terminam em fundo cego e associam-se ao reto.

2. HISTOLOGIA

2.1. Padronização da metodologia

O sistema digestivo de *B. xanthophis* mostrou ser de difícil preservação. Assim, para os estudos histológicos foram testados dois fixadores dos mais utilizados em nosso laboratório. Das duas soluções fixadoras utilizadas, Bouin e paraformaldeído 4% em tampão PBS 0,1M, a segunda foi a que apresentou melhores resultados, permitindo uma visualização mais detalhada das estruturas celulares sem a formação de artefatos, além de facilitar a dissecação dos animais para o isolamento do sistema digestivo. O fixador de Bouin dificultou a dissecação e a preservação da câmara de filtração, embora as demais estruturas apresentassem resultados semelhantes quanto à preservação histológica.

2.2. Análise histológica do sistema digestivo

Do ponto de vista histológico, o intestino anterior é formado por um longo esôfago sem nenhum tipo de especialização. O epitélio desta região é simples e formado por células achatadas, sem microvilosidades, recobertas por uma fina camada de quitina e que não apresenta projeções na forma de dentículos ou espículas (figura 3).

O intestino médio é composto, principalmente, por dois tipos celulares: as células colunares ou enterócitos e as células regenerativas. O termo célula colunar é comumente adotado como sinônimo para enterócito, pois os primeiros estudos morfológicos sobre o sistema digestivo de insetos mostravam que estas células possuíam morfologia colunar. Entretanto, conforme evoluíram os estudos nesta área, foi observado que os enterócitos podem apresentar outras formas além da colunar. Portanto, utilizaremos a nomenclatura enterócito como padrão para designar as células que compõem o intestino médio, por ser um termo mais abrangente do que célula colunar. Além dos enterócitos e das células regenerativas, não foram observadas células endócrinas, comuns em outras espécies de insetos.

O intestino médio tem início na câmara de filtração. A complexidade deste órgão esperada pelas análises anatômicas pôde ser observada histologicamente (figura 4). A íntima justaposição de estruturas neste órgão dificulta a observação de seus componentes. Por se tratar de um sistema de tubos curvos, delgados e compactados, os planos de corte raramente coincidiram com o plano longitudinal dos tubos, resultando em um conjunto de seções transversais e oblíquas do ventrículo e dos túbulos de Malpighi (figura 4). Os diferentes tecidos no interior da câmara de filtração têm aspecto semelhante, dificultando sua identificação (figura 4). As células são achatadas, com citoplasma reduzido e pouco basófilo. Eventualmente, podemos identificar alguns trechos do ventrículo pela presença de bactérias, representadas por bacilos basófilos, na luz do tubo (figura 4A). Pelo fato do epitélio desta região ser bastante fino, torna difícil a identificação de células regenerativas. Próximo ao ponto de saída da câmara, o ventrículo dá origem ao intestino posterior, passando por uma região de transição denominada piloro (figura 4B). As células do piloro são colunares e possuem citoplasma basófilo.

Os enterócitos do VC são células grandes, com citoplasma mais basófilo do que aqueles encontrados na câmara de filtração e com aspecto heterogêneo, apresentando estruturas esféricas com basofilia de diferentes intensidades imersas em seu interior (figura 5A). A presença e quantidade de inclusões no citoplasma parecem variar de indivíduo para indivíduo. Os núcleos são grandes e localizados no centro das células. Borda em escova ou estriada, que correspondem às microvilosidades, pode ser observada na superfície apical das células voltadas para a luz do intestino e, muitas vezes, associadas a bactérias, abundantes na região. O epitélio do VC é bastante irregular, exibindo muitas invaginações, de acordo com o aspecto enrugado constatado pelas análises anatômicas.

As células regenerativas são observadas na base do epitélio, próximas à lâmina basal e não formam agrupamentos, denominados ninhos. Estas células são pequenas, possuem núcleo arredondado, basófilo e citoplasma bastante reduzido (figura 5A).

O VT segue o VC e possui características semelhantes. Suas células são menores e mais achatadas do que no segmento cônico, além de exibirem citoplasma menos basófilo (figura 5B). As microvilosidades são menos evidentes e os núcleos celulares são menores e mais arredondados do que no segmento anterior, localizando-se basalmente. A presença de inclusões citoplasmáticas, assim como as observadas no VC, parece variar de indivíduo para indivíduo.

A transição do intestino médio para o posterior (IP) ocorre no interior da câmara de filtração em uma região denominada piloro, como já descrito anteriormente, e emerge da câmara de filtração. O intestino posterior é histologicamente simples, apresentando células achatadas, núcleos ovalados, basófilos e relativamente pequenos, citoplasma acidófilo que exibem uma série de grânulos basófilos, muitas vezes agrupados em regiões específicas do citoplasma (figura 5C). Estas células não possuem borda em escova e, a exemplo do intestino anterior, são recobertas por uma fina camada de quitina sem qualquer tipo de projeções. Ao final do intestino posterior temos o reto, que é composto, basicamente, por células cuboidais, núcleos ovalados e basófilos, citoplasma acidófilo e grânulos basófilos, semelhantes ao padrão observado no segmento anterior (figura 5C). O reto se conecta ao exoesqueleto, formando o ânus.

3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.1. Padronização da metodologia

As análises ultraestruturais foram restritas ao intestino médio (câmara de filtração e domínios cônico e tubular do ventrículo) e aos túbulos de Malpighi, devido à suas importâncias no processo digestivo nesta espécie. A exemplo do que ocorreu nos estudos histológicos, a preservação da ultraestrutura destas células é bastante difícil.

Entre as duas soluções fixadoras testadas, a modificação do fixador descrito por Karnovsky (1965) foi a que resultou em melhores resultados e, portanto, foi adotada como padrão para fixação dos sistemas digestivos para os estudos ultraestruturais deste trabalho. A solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M resultou em regiões mal fixadas no citoplasma dos enterócitos.

3.2. Ultraestrutura da câmara de filtração

Do ponto de vista ultraestrutural, a câmara de filtração é bastante característica (figura 6A, 7A). As dificuldades obtidas nas análises histológicas deste órgão não se repetiram na ultraestrutura, pois podemos distinguir com clareza entre as células componentes dos túbulos de Malpighi (figura 7B) e do ventrículo (figura 7C), embora não seja possível diferenciar as células do ventrículo anterior das do posterior. No entanto, existem, ainda, muitas semelhanças entre as células dos túbulos de Malpighi e do ventrículo (figuras 7B, 7C).

Os dois tipos celulares que caracterizam esta região, células do ventrículo e dos túbulos de Malpighi, possuem uma membrana plasmática apical modificada em microvilosidades, presentes em grande número e bastante compactadas (figuras 7B, 7C). Elas possuem cerca de 750 nm de comprimento, em média, e podemos observar filamentos de actina em seu interior, dispostos formando feixes longitudinais. Estes feixes prolongam-se para o interior do citoplasma apical, compondo a trama terminal. Logo acima das microvilosidades foi observado um

material de aspecto granuloso fino, correspondendo, provavelmente, ao glicocálix. O citoplasma destas células é reduzido e contém algumas poucas organelas da rota secretora, como elementos do retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi formando agrupamentos discretos de cisternas e vesículas, denominados de dictiossomos. Várias mitocôndrias podem ser observadas, principalmente, no citoplasma apical das células, na base das microvilosidades (figuras 7B, 7C). O domínio basal da membrana plasmática destas células apresenta-se modificado na forma de uma extensa região de invaginações da membrana, presentes em grande número e com muitas aberturas para a lâmina basal (figuras 7, 8). Estas invaginações se estendem profundamente, avançando para o interior do citoplasma, chegando a ocupar cerca de 80% de seu volume. A diferença mais marcante entre os enterócitos e as células dos túbulos de Malpighi está na morfologia destas invaginações. Nos túbulos de Malpighi encontramos invaginações formando um padrão lamelar (figura 7B), em contraposição ao tubular observado nos enterócitos (figura 7C). Uma segunda diferença ocorre entre o citoplasma destes dois tipos de célula, sendo relativamente mais eletrondenso nos túbulos de Malpighi.

Regiões de contato entre lâminas basais de células de ventrículo e túbulos de Malpighi (figura 8A) e entre túbulos (figura 8B) podem ser observadas.

Os núcleos destas células têm forma ovalada e estão posicionados centralmente. O envoltório nuclear é formado por membrana dupla, associada externamente a ribossomos e a zonas eletrondensas de heterocromatina, internamente (figura 9A). Seu nucleoplasma é pouco eletrondenso e podemos observar regiões de cromatina imersas, com eletrondensidade variável.

A adesão intercelular dos epitélios presentes na câmara de filtração, tanto do ventrículo quanto dos túbulos de Malpighi, é realizada por junções septadas do tipo lisa (figura 9B).

Eventualmente, observamos no lúmen dos túbulos de Malpighi algumas partículas secretadas por regiões específicas dos túbulos, que possuem formato regular, lembrando uma bola de golfe, denominadas brocossomos (cf. Raikitov, 1995; 1999) (figuras 10).

3.3. Ultraestrutura dos túbulos de Malpighi

Além da câmara de filtração e do ventrículo, foi analisada, também, a ultraestrutura das regiões dos túbulos de Malpighi livres na hemocela. Apesar de serem estruturas componentes do sistema excretor, devido sua importância no processo digestivo de *B. xanthophis*, realizou-se uma breve descrição ultraestrutural destes órgãos.

Para esta análise, os túbulos de Malpighi (TM) foram divididos em três regiões distintas, de acordo com suas diferenciações anatômicas (figura 1): uma região proximal (TMP) (figura 10D), uma secretora (TMS) (Figura 10E) e uma distal (TMD) (figura 10F).

Assim como anatomicamente, a ultraestrutura das regiões TMP e TMD apresentam algumas semelhanças (figura 11A, 11B). Suas células possuem sua membrana plasmática apical modificada em microvilosidades muito abundantes. No caso do TMP, estas estruturas se projetam em direção ao lúmen e têm um comprimento médio de 3 μm . As microvilosidades do TMD são mais finas e curtas, possuindo, em média, 750 nm de comprimento. O citoplasma apical, logo abaixo das microvilosidades, possui mitocôndrias em grande quantidade. A membrana plasmática basal das células de ambas as regiões apresentam invaginações, cuja morfologia se assemelha àquelas observadas nos túbulos de Malpighi presentes no interior da câmara de filtração (figuras 7B, 11B). Estas invaginações da membrana plasmática basal associam-se a mitocôndrias e possuem muitas aberturas para a lâmina basal.

A região secretora dos túbulos de Malpighi tem características distintas das demais regiões. Estas células apresentam seu citoplasma completamente ocupado por vesículas de secreção contendo brocossomos (figuras 6E, 11B, 11C). Nas pequenas regiões de citoplasma observáveis, nota-se a presença de elementos do retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi.

3.4. Ultraestrutura do ventrículo

O ventrículo, segmento do intestino médio que têm início e término na câmara de filtração, possui células mais complexas, do ponto de vista ultraestrutural, do que aquelas descritas para a câmara de filtração. O ventrículo

possui dois domínios anatomicamente distintos: o domínio cônico (VC) e o tubular (VT) (figuras 1). O VT foi dividido arbitrariamente em três sub-regiões de comprimento aproximadamente iguais, que foram denominadas de ventrículo tubular anterior (VTA), ventrículo tubular médio (VTM) e ventrículo tubular posterior (VTP) (figura 1).

Dois tipos celulares compõem o epitélio do ventrículo: as células regenerativas e os enterócitos, sendo este último tipo celular responsável pela síntese de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (figuras 6B, 6C).

As células regenerativas são raramente observadas e são de difícil preservação para as análises ultraestruturais. Como já descrito histologicamente, tratam-se de células localizadas na base do epitélio e não formam ninhos (figuras 6B, 6C). Possuem um grande núcleo arredondado e central, que ocupa grande parte do volume celular, limitando o citoplasma à periferia da célula. Sua membrana plasmática não apresenta nenhuma especialização evidente. Este tipo celular está presente por toda a extensão do ventrículo.

O domínio cônico do ventrículo (VC) (figuras 6C, 12) é formado por células que possuem sua membrana plasmática apical modificada na forma de microvilosidades que se projetam para o lúmen (figura 6C, 12A). Tais estruturas estão presentes em grande quantidade e possuem, em média, um comprimento de 1µm. Assim como nas microvilosidades descritas para a câmara de filtração, também podemos visualizar em seu interior filamentos de actina formando feixes paralelos longitudinais. Estes feixes se prolongam avançando no citoplasma apical dos enterócitos, formando a trama terminal. No citoplasma apical, pode-se observar um acúmulo de mitocôndrias (figura 6C, 12A). O citoplasma destas células exibe eletrondensidade mediana, no qual é possível identificar organelas como retículo endoplasmático granular (figuras 6C, 12A, 12B), presente por toda a célula, porém não muito abundante; áreas de Golgi (figuras 6C, 12B, 12D), localizadas, em geral, próximas ao núcleo e em pouca quantidade; e vesículas de secreção, pouco frequentes e com conteúdo de aspecto variável quanto a eletrondensidade (figuras 6C, 12C, 12E). Seus núcleos possuem formatos variados, podendo apresentar perfis desde circulares até irregulares. O envoltório nuclear possui membrana dupla, associada a ribossomos em sua face externa e a regiões eletrondensas de heterocromatina em sua face interna. O nucleoplasma tem baixa eletrondensidade e apresenta algumas regiões de cromatina de variada

eletrondensidade. A membrana plasmática basal destes enterócitos mostra especializações formando invaginações que adentram o citoplasma basal das células e se associam a mitocôndrias. Estas invaginações formam uma complexa rede de canais com diversas aberturas para a lâmina basal (figura 13A). Junções septadas lisas, assim como na câmara de filtração, realizam a adesão entre os enterócitos nesta região (figura 13B).

Pelas evidências obtidas através das observações ultraestruturais, acredita-se que o mecanismo de secreção predominante em *B. xanthophis* seja o merócrino (exocitose). Apesar de ser rara a visualização de figuras típicas de exocitose, foram observadas algumas vesículas de secreção localizadas no citoplasma apical e na base das microvilosidades (figuras 12C, 12E). Não há qualquer evidência de secreção holócrina, apócrina ou microapócrina.

Pode-se observar, ao longo de todo o ventrículo, uma grande quantidade de bactérias associadas externamente as microvilosidades e no citoplasma dos enterócitos, onde estão alojadas em vacúolos (figuras 12A, 12D), sendo que algumas delas aparentam estar sendo lisadas (figura 12D). Estes dados estão de acordo com as observações histológicas, nas quais foram constatadas bactérias presentes no lúmen do ventrículo e inclusões citoplasmáticas de caráter basófilo, que variavam em frequência de indivíduo para indivíduo.

No VC, é possível visualizar um complexo sistema luminal de membranas, associadas às extremidades das microvilosidades, que avançam pela luz do ventrículo formando figuras semelhantes a pequenas “chamas”, delimitando regiões com maior eletrondensidade (figuras 6C, 12E, 14, 15, 16). Este sistema luminal de membranas foi denominado de membranas luminais em forma de chama (MLC). As microvilosidades destas regiões apresentam, com frequência, constrições próximas ao seu ápice, formando vesículas que, muitas vezes, permanecem ligadas entre si e com o ápice das microvilosidades por membranas, assemelhando-se a um colar de contas. Também se observa grande quantidade de vesículas de diversos diâmetros nas proximidades destas microvilosidades, associadas às MLC (figuras 15, 16). Algumas destas vesículas se alinham pelo lúmen ventricular exibindo um perfil alongado (figura 16B).

A utilização do lantânio como traçador em microscopia eletrônica de transmissão nos permite identificar a presença de compartimentos fechados em materiais biológicos, pois ele é incapaz de atravessar as membranas das células

e acaba por se depositar em sua face externa. Os resultados obtidos com a aplicação de lantânio no sistema digestivo de *B. xanthophis* mostram que ele se acumula externamente às MLC, sugerindo que este sistema delimita compartimentos fechados (figura 17). Uma análise mais acurada de algumas regiões permite a observação de depósitos de lantânio em estreitas trilhas no interior das MLC, indicando que se tratam de inúmeros compartimentos menores que se agrupam em estruturas maiores (figura 17D).

O domínio tubular do ventrículo segue o VC e é dividido em VTA, VTM e VTP (figura 1). Os enterócitos do VTA e VTM possuem, basicamente, as mesmas características quando comparadas ao VC, mas com algumas peculiaridades. As microvilosidades das células do VTA e VTM são ligeiramente maiores, com uma média de 1,25 μm de comprimento. Os enterócitos deste segmento possuem quantidade semelhante de retículo endoplasmático granular e de mitocôndrias, sendo que estas continuam agrupadas nas mesmas regiões: associadas às invaginações da membrana basal e formando aglomerados na base das microvilosidades. Ocorre um pequeno aumento na frequência de bactérias, áreas de Golgi e de vesículas de secreção. Os núcleos e as invaginações da membrana plasmática basal apresentam as mesmas características das demais regiões. Podemos observar aumento na quantidade do sistema luminal de membranas e de vesículas associadas no VTA e VTM.

O VTP traz algumas diferenças em relação ao VTA e VTM (figura 18). As MLC e vesículas associadas estão ausentes nesta região (figura 18A). Nota-se uma redução na quantidade de vesículas de secreção e de mitocôndrias, principalmente aquelas agrupadas na base das microvilosidades. Observam-se algumas vesículas lipídicas distribuídas pelo citoplasma (figura 18B), com perfis circulares de tamanho variável, representadas por regiões de eletrondensidade muito baixa. O retículo endoplasmático granular possui regiões expandidas e com conteúdo bastante eletrondenso, espalhadas pelo citoplasma (figura 18B).

4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As análises realizadas através de microscopia eletrônica de varredura tiveram como objetivo visualizar a organização espacial das MLC. Para tanto,

utilizou-se apenas o domínio cônico do ventrículo, devido ao seu tamanho relativamente maior.

Os resultados mostram que as microvilosidades estão recobertas por uma camada de membranas, que se estendem a partir das extremidades das microvilosidades para a luz do ventrículo, num arranjo que reforça as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão (figura 19).

5. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Os resultados dos *western blots* não foram conclusivos, pois não houve qualquer indício de marcação significativa do anticorpo testado. Assim, foi testada uma possível homologia entre a enzima α -glicosidase presente na câmara de filtração e nos dois domínios do ventrículo de *B. xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae) com a α -glicosidase encontrada em *D. peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), utilizando-se anticorpos primários específicos contra esta enzima, produzidas em coelho. Como controle utilizou-se um extrato do epitélio do ventrículo anterior de *D. peruvianus*, região esta utilizada para a produção dos anticorpos primários.

A α -glicosidase foi escolhida por ser uma proteína integrante de membrana encontrada nas membranas perimicrovillares de *R. prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) e *D. peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) e na membrana perimicrovilar modificada em *A. pisum* (Hemiptera: Aphididae) e acredita-se ser uma enzima marcadora destas estruturas. Caso fosse observada a presença de α -glicosidase nas MLC, ter-se-ia uma comprovação da similaridade entre as MLC e os demais sistemas luminiais de membrana. Assim, uma detecção em *B. xanthophis* seria importante no sentido de corroborar sua homologia com as membranas perimicrovilar, encontrada em *R. prolixus* e *D. peruvianus*, e perimicrovilar modificada, observada em *A. pisum*.

DISCUSSÃO

O sistema digestivo dos insetos pode apresentar grande diversidade anatômica e variados graus de complexidade (Waterhouse, 1957; Wigglesworth, 1972; Cruz-Landim, 1985; Terra, 1988; Ribeiro et al., 1990; Chapman, 1998). O intestino de *B. xanthophis* é uma estrutura bastante complexa já do ponto de vista anatômico, com algumas especializações adaptativas características destes insetos sugadores de seiva. Entre estas peculiaridades, podemos observar a presença de uma câmara de filtração, um ventrículo com dois domínios bem definidos, o cônico e o tubular, e quatro túbulos de Malpighi, que apesar de serem órgãos do sistema excretor, possuem, também, um papel fundamental no processo digestivo nestes animais.

O intestino anterior de *B. xanthophis* é uma estrutura tubular, o esôfago, sem qualquer diferenciação anatômica, como descrito nos resultados. É formado por um epitélio pavimentoso simples, recoberto por uma fina camada de quitina, que conecta a boca à câmara de filtração. Em outros insetos, o intestino anterior pode apresentar modificações na forma de um papo e um proventrículo. O papo é descrito como um órgão de armazenamento (Chapman, 1998) e, segundo Wigglesworth (1972), é um sítio onde o processo digestivo pode ter início, pela ação de enzimas digestivas provenientes do intestino médio ou das glândulas salivares. Em grande parte das espécies de insetos, o proventrículo forma uma válvula que controla a passagem do alimento do intestino anterior para o médio. Em alguns casos, esta estrutura pode apresentar projeções na forma de dentículos de quitina voltadas para o lúmen do intestino, atuando como um órgão de trituração (Terra, 1988). Estes dentículos ou espículas de quitina podem ser encontradas ao longo de todo o intestino anterior, como nos casos da barata *Periplaneta americana* (Dictyoptera) (De Lima, 2004) e do grilo *Gryllodes sigillatus* (Orthoptera) (Biagio, et al., 2009) ou apenas em algumas regiões, como na larva do besouro *Dermestes maculatus* (Coleoptera) (Caldeira et al., 2007). Deste modo, do ponto de vista morfológico, o intestino anterior de *B. xanthophis*, assim como de outros hemípteros, apresenta, de uma forma geral, uma estruturação bastante simples.

O intestino médio tem início no interior da câmara de filtração (CF). A CF é um órgão típico de insetos sugadores da infraordem Cicadomorpha, composta por espécies sugadoras de fluidos vegetais (xilema, floema ou mesofilo) (Resh & Cardé, 2003). Este órgão consiste na aposição de segmentos do intestino médio

anterior, do intestino médio posterior e dos quatro túbulos de Malpighi proximais. Nesta região, o epitélio dos tecidos envolvidos é menos espesso, formado por células pavimentosas, pouco basófilas e com citoplasma bastante reduzido, que facilitam o transporte de água diretamente do início do intestino médio para o intestino posterior através dos túbulos de Malpighi, resultando numa maior concentração de nutrientes ao longo do ventrículo (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974). Externamente à CF, o sistema digestivo segue pela porção média do ventrículo, que apresenta dois domínios: o cônico (imediatamente após a saída da CF) e o tubular (que retorna para a CF). De volta à câmara de filtração, temos o intestino médio posterior, com características semelhantes àsquelas do intestino anterior, localizado, também, no interior da CF. Antes de deixar a CF, observa-se o piloro, transição entre o intestino médio e o posterior e que também corresponde à região na qual ocorre a inserção dos quatro túbulos de Malpighi.

A seiva das plantas, tanto o xilema quanto o floema, é uma fonte nutricional bastante desbalanceada. O xilema é pobre em aminoácidos, contém monossacarídeos, ácidos orgânicos, íons potássio e outros minerais também em baixas concentrações, sendo, portanto, um alimento extremamente diluído. O floema é, também, pobre em aminoácidos, mas possui alta concentração de sacarose (Terra, 1988; Terra et al., 1996a; b). Insetos sugadores de xilema, como a cigarrinha *B. xanthophis*, ou algumas que se alimentam de floema precisam concentrar os nutrientes orgânicos de modo a aumentar a eficiência de absorção destes componentes. Este fenômeno ocorre na CF destes animais, permitindo que o excesso de água passe diretamente do intestino médio anterior para o posterior, acumulando os nutrientes na região mediana do próprio ventrículo (Gouranton, 1968; Cheung & Marshall, 1973a; b; Terra, 1988). Este órgão é particularmente desenvolvido nos insetos que se alimentam de xilema (Terra, 1988). A eficiência deste mecanismo é tão grande, que é capaz de concentrar o xilema em até 10 vezes (Cheung & Marshall, 1973a; b) e o floema em 2,5 vezes (Lindsay & Marshall, 1981)

A porção externa do intestino médio possui dois domínios, já descritos nas análises anatômicas: o domínio cônico (VC) e o tubular (VT) do ventrículo. Apesar da diferenciação anatômica evidente, do ponto de vista histológico não são observadas grandes diferenças. Os epitélios do VC e do VT são formados por

células cúbicas, com citoplasma mais basófilo que as células da CF e que apresentam uma quantidade variável de inclusões citoplasmáticas basófilas. Em sua face voltada ao lúmen, os enterócitos apresentam borda em escova que, em muitos casos, se associam a estruturas bastantes basófilas existentes na luz do intestino, provavelmente bactérias. Uma importante característica destas regiões é a ausência de qualquer evidência da existência de membrana peritrófica, comum em espécies da maioria das ordens de insetos. De fato, integrantes da ordem Hemiptera e Thysanoptera não possuem membrana peritrófica, mas sim um complexo sistema luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos (revisão em Terra, 1988; 1990; 2001; Silva et al., 1995). Membranas desta natureza não podem ser observadas por microscopia de luz. Estas observações serão discutidas com maiores detalhes durante as ponderações com relação aos aspectos ultraestruturais dos enterócitos.

Podem ser encontrados alguns poucos trabalhos acerca da anatomia do sistema digestivo de espécies da família Cicadellidae e, em sua grande maioria, a morfologia geral do sistema digestivo descritos nestes estudos é semelhante ao observado em *B. xanthophis*, independente do tipo da fonte nutricional da qual estas espécies se alimentam (xilema, floema ou mesofilo). As espécies sugadoras de floema *Dalbulus maidis* e *Graminella nigrifrons* (Hemiptera: Cicadellidae) (Tsai & Perrier, 1996), assim como a espécie *Euscelidius variegatus* (Hemiptera: Cicadellidae) (Cheung & Purcell, 1993) possuem sistemas digestivos que diferem de *B. xanthophis* apenas na aparência do epitélio do VC, que é lisa nas três primeiras espécies e rugosa nesta última. Em *Opsius stactogalus* (Hemiptera: Cicadellidae) (Wiesenborn, 2004), o VC possui aspecto irregular, mas ainda em um grau menor do que em *B. xanthophis*. Espécies da subfamília Cicadellinae que se alimentam de fluidos do mesofilo das plantas não possuem uma câmara de filtração como as espécies discutidas até o momento. Neste caso, ocorre apenas uma associação pouco especializada entre o ventrículo posterior e o ventrículo anterior (Saxena, 1955; Ammar, 1985).

Saindo da CF, o sistema digestivo segue pelo intestino posterior. O epitélio desta região possui células achatadas e recobertas por uma camada de quitina sem qualquer tipo de projeções, semelhantes às encontradas no intestino anterior. Nas espécies *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) (Levy et al., 2004), *P.*

americana (De Lima, 2004) e *D. maculatus* (Caldeira et al., 2007), por exemplo, o intestino posterior apresenta projeções da quitina na forma de espículas.

Ao final do segmento anterior, antes do ânus, há o reto, ao qual se associam as extremidades distais dos quatro túbulos de Malpighi, que terminam em fundo cego. O reto tem papel importante na reabsorção ativa de água, íons e substâncias dissolvidas (como alguns nutrientes) provenientes da urina primária excretada pelos túbulos de Malpighi (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1998; Nation, 2008). Diversos insetos possuem células especializadas em absorção no reto que se agrupam formando papilas, denominadas papilas retais, que atuam reabsorvendo a água que passa pelo reto, diminuindo as perdas hídricas por excreção pelo organismo. Segundo Chapman (1998), insetos que se alimentam de fluidos nos quais a água não é escassa, como no caso de *B. xanthophis*, não possuem papilas retais.

De um modo geral, os insetos apresentam as extremidades dos túbulos de Malpighi livres pela hemocela. O que se observa em *B. xanthophis*, entretanto, é a associação das extremidades distais dos túbulos de Malpighi com o epitélio do reto, similar a um sistema descrito em larvas de algumas espécies de Coleoptera, como *Tenebrio molitor* (Ramsay, 1964; Hansen et al., 2004) e *D. maculatus* (Caldeira et al., 2007), nos quais estas extremidades distais dos túbulos se agrupam e se associam ao reto sob uma membrana, em um arranjo denominado de sistema de túbulos criptonefrídicos ou criptosolênicos (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1998; Nation, 2008). Este complexo, descrito para estas espécies, é uma adaptação encontrada em insetos que habitam ambientes áridos ou que se alimentam de uma fonte nutricional pobre em água (Ramsay, 1964; Chapman, 1998). Segundo Chapman (1998), as larvas de *T. molitor* são capazes de absorver entre 5 a 10% de água das próprias fezes por este mecanismo. Aparentemente, esta associação observada em *B. xanthophis* não possui a mesma função dos túbulos criptonefrídicos, dada a sua dieta abundante em água.

Em alguns casos, o intestino posterior dos insetos pode apresentar dilatações que abrigam microrganismos simbiotes, como protozoários e bactérias. Estas estruturas são conhecidas como pança ou câmara de fermentação e sua função é auxiliar na digestão em espécies que se alimentam de celulose (Chapman, 1998), como no caso de *P. americana* (De Lima, 2004). Tais estruturas não são observadas no intestino posterior de *B. xanthophis*.

Os túbulos de Malpighi de todos os Cicadomorpha, infraordem que agrupa as famílias Cicadellidae e Cercopidae (cigarrinhas), além de Cicadidae (cigarras), seguem o mesmo padrão básico (Licent, 1912). O segmento mais proximal destes túbulos, próximos ao piloro, estão enclausurados no interior da CF, como já comentado anteriormente. Externamente à câmara, é possível identificar três domínios bastante evidentes nos túbulos de Malpighi, denominados de túbulos proximais (TMP), secretores (TMS) e distais (TMD). Os nódulos observados no TMS correspondem a regiões secretoras de brocossomos (discutidas adiante).

As células regenerativas, que serão discutidas em maiores detalhes posteriormente, são encontradas individualmente na base do epitélio ventricular e em pouco número. Estas células são muito basófilas devido a seu núcleo, que ocupa a maior parte do volume celular, limitando o citoplasma à periferia da célula.

O intestino médio do sistema digestivo de *B. xanthophis* é responsável pelos principais eventos do processo digestivo, como os fenômenos de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Terra, 1988; 1990; Ribeiro et al., 1990). Dadas a importância desta região, as análises ultraestruturais foram restritas à câmara de filtração e aos domínios cônico e tubular do ventrículo. Foi realizado, também, um breve estudo ultraestrutural dos túbulos de Malpighi devido ao seu importante papel no processo digestivo em *B. xanthophis*, apesar de serem órgãos do sistema excretor.

A câmara de filtração é, sem dúvida, a estrutura mais característica do intestino médio. Os tipos celulares que compõem este órgão possuem algumas particularidades marcantes. Talvez o aspecto mais interessante é a semelhança na organização celular do ventrículo e dos túbulos de Malpighi no interior da câmara, apesar de serem órgão com funções tão distintas. Assim, na CF ocorre, aparentemente, uma convergência do ponto de vista morfofuncional. Deste modo, tanto as células ventriculares quanto as dos túbulos de Malpighi presentes na CF possuem microvilosidades, citoplasma reduzido e invaginações da membrana plasmática basal, sendo que esta última característica pode ser utilizada como diagnóstica para diferenciar entre um tipo celular e outro. Assim, células ventriculares possuem invaginações tubulares da membrana plasmática basal, enquanto que nas células dos túbulos de Malpighi elas formam estruturas

lamelares. A morfologia destas células é condizente com especializações relacionadas ao transporte de íons e água através da célula (Ribeiro et al., 1990). A grande quantidade de microvilosidades e as extensas invaginações da membrana plasmática basal associada a mitocôndrias, aliadas ao citoplasma reduzido destas células, aumentam significativamente a capacidade absorviva destes epitélios e sugerem que o transporte de água e íons é realizado do lúmen do ventrículo para os túbulos de Malpighi. Este mecanismo deve permitir a tomada de grandes volumes de água em excesso que passam pela CF, visando a concentração dos nutrientes no ventrículo, como já comentado anteriormente (Cheung & Marshall, 1973a, b; Marshall & Cheung, 1974).

A pequena quantidade de organelas da rota secretora, que incluem o retículo endoplasmático granular e áreas de Golgi, indica que não há produção significativa de proteínas para a exportação na câmara de filtração.

Estes resultados são semelhantes ao encontrados para outras espécies da família Cicadellidae, como a *Cicadella viridis* (Hubert et al., 1989) e *Euscelidius variegatus* (Cheung & Purcell, 1993). Outros trabalhos com espécies de famílias diferentes relatam diferentes morfologias da câmara de filtração, mas as células desta estrutura apresentam sempre um aumento de superfície de membrana plasmática apical por microvilosidades e invaginações da membrana plasmática basal (Lindsay & Marshall, 1980; Le Cahérec et al., 1997). Associadas a essas membranas foram constatadas a presença de grandes quantidades de aquaporinas, como esperado, que são uma família de proteínas integrantes de membrana que atuam no transporte específico de moléculas de água, impedindo a passagem de prótons, íons ou solutos neutros (Hubert et al., 1989; Beuron et al., 1995; Le Cahérec et al., 1997).

As análises ultraestruturais dos túbulos de Malpighi livres pela hemocela tiveram como objetivo principal auxiliar na identificação das células de túbulos de Malpighi no interior da câmara de filtração. Como discutido anteriormente, a morfologia membrana plasmática basal das células da CF nos permite diferenciar entre os dois tipos celulares presentes no interior da câmara: o ventrículo e os túbulos de Malpighi proximais. Os domínios dos túbulos de Malpighi livres na hemocela, tanto o proximal (TMP) quanto o distal (TMP), também possuem invaginações da membrana plasmática basal com mitocôndrias associadas

formando um padrão lamelar, bastante similar ao encontrado no interior da CF. Portanto, estes resultados sugerem que as células da câmara de filtração com invaginações lamelares da membrana plasmática basal sejam realmente as células dos túbulos de Malpighi, enquanto que aquelas que possuem invaginações tubulares correspondem ao ventrículo. Resultados semelhantes foram descritos em outras espécies em Hemiptera (Lindsay & Marshall, 1980; Le Cahérec et al., 1997).

O domínio secretor dos túbulos de Malpighi (TMS) possui seu citoplasma repleto de vesículas contendo brocossomos. Como já discutido anteriormente, tratam-se de estruturas formada por lipídios e proteínas e que possuem uma forma regular (Raikitov, 1995). Após secretadas pelas células do TMS, estes produtos são liberados na luz do intestino e aplicados no tegumento com as pernas traseiras, após saírem pelo ânus, cobrindo o animal com uma camada de brocossomos. Esta camada tem a propriedade de repelir água e outras excreções das cigarrinhas (Raikitov, 1995). A visualização destas estruturas através de análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostra uma morfologia esférica e com uma superfície formada por depressões regulares. Entretanto, a forma destes brocossomos varia entre as diferentes espécies de cigarras e cigarrinhas (Raikitov, 1995; 1999).

Com relação aos domínios cônico (VC) e tubular do ventrículo (VT), os enterócitos compartilham características ultraestruturais semelhantes. Trata-se de células polarizadas, como qualquer célula epitelial típica, ou seja, a membrana plasmática apical é bastante distinta do seu domínio basal (Junqueira & Carneiro, 2005). Estes resultados mostram que as células do ventrículo não associadas à câmara de filtração também estão adaptadas para o transporte de substâncias através da membrana, com microvilosidades apicais e invaginações da membrana plasmática basal associadas a mitocôndrias (Ribeiro et al., 1990). Esta associação das mitocôndrias às invaginações da membrana plasmática basal indica que as células desta região possuem grande atividade de transporte de íons e água através do epitélio (Ribeiro et al., 1990). Todavia, o transporte de água e íons não deve ser tão intenso como o que deve ocorrer na CF, como sugerido pela menor quantidade de invaginações da membrana plasmática basal e pela maior espessura deste epitélio.

As microvilosidades dos enterócitos apresentam, em seu interior, os usuais feixes paralelos de filamentos de actina que se alongam por todo seu comprimento até o citoplasma apical, em uma região denominada trama terminal (Junqueira & Carneiro, 2005). Estas microvilosidades aumentam a área absorptiva do epitélio intestinal (Fawcett, 1981) e possuem, também, um papel fisiológico importante na digestão final de proteínas e carboidratos, pois possuem enzimas digestivas associadas à sua membrana ou ao seu glicocálix (Ferreira et al., 1981; 1988; Silva et al., 1996). Externamente à membrana das microvilosidades, é possível notar a ocorrência de um glicocálix, de aspecto amorfo. Em *B. xanthophis*, esta estrutura é, entretanto, pouco desenvolvida.

Poucas diferenças foram observadas entre as características citoplasmáticas dos enterócitos das diferentes regiões do ventrículo. No VC e nos dois terços iniciais do VT, o ventrículo tubular anterior (VTA) e o médio (VTM), as células variam apenas no tamanho das microvilosidades e na quantidade de bactérias, dictiossomos, vesículas de secreção e na organização das membranas luminais em forma de chama (MLC), que será discutido mais adiante. No VTP, a principal diferença é a ausência deste sistema de membranas.

Os enterócitos ventriculares possuem organelas da rota secretora em abundância, envolvendo o retículo endoplasmático granular, áreas de Golgi e vesículas de secreção (Rothman & Orci, 1992). Em insetos não existe apenas um complexo de Golgi, como o que ocorre em vertebrados. Nestes animais, os vários complexos de Golgi se dispõem espalhados em diversas áreas discretas, em arranjos denominados dictiossomos (Mollenhauer & Moore, 1994). Estas organelas são observadas, frequentemente, ao redor do núcleo, em associação a elementos do retículo endoplasmático granular. Os dictiossomos possuem cisternas em número variável, com vesículas semelhantes de às vesículas de secreção associadas.

Observamos, com frequência, bactérias alojadas em vacúolos no citoplasma destes enterócitos. Em alguns casos, menos comuns, encontramos, também, bactérias associadas externamente às microvilosidades. Bactérias simbiontes são observadas em associação com várias espécies de insetos. Provavelmente, esta relação auxilia no processo metabólico dos hospedeiros, fornecendo nutrientes (vitaminas, por exemplo) que não podem ser sintetizados pelos insetos (Ribeiro & Perondini, 1991). Na espécie *E. variegatus* (Cheung &

Purcell, 1993), foi constatada a presença de bactérias no interior dos enterócitos de indivíduos aparentemente saudáveis. Entretanto, algumas bactérias patogênicas semelhantes às simbiontes podem, também, infectar as células do sistema digestivo, perturbando o metabolismo do hospedeiro e resultando em um glicocálix reduzido, favorecendo a infecção por patógenos a partir do lúmen do tubo digestivo (Cheung & Purcell, 1993). Em alguns casos, como no díptero *Musca domestica* (Terra et al., 1988), estes simbiontes podem ser utilizadas como uma fonte nutricional de proteína, através da digestão destas bactérias.

Junções septadas do tipo lisa são as principais especializações de membrana responsáveis pela adesão de enterócitos adjacentes (Lane, 1982). Este tipo de especialização juncional se dispõe em uma faixa ao redor do bordo luminal dos enterócitos, atuando como uma barreira de permeabilidade no epitélio, limitando a passagem paracelular de pequenas moléculas e impedindo o acesso de macromoléculas, em um papel semelhante ao exercido pelas zônulas de oclusão nos vertebrados (Lane, 1982). A restrição da passagem destes solutos entre os enterócitos submete estas moléculas à seletividade da membrana plasmática das células, formando grandes barreiras de permeabilidade. A importância fisiológica desta barreira de permeabilidade é grande, pois contribuem para a formação e manutenção de diferenças na composição extracelular entre as duas faces do epitélio (Lane, 1982; Green et al., 1983; Junqueira & Carneiro, 2005).

As junções septadas lisas são consideradas um tipo particular de junções septadas, diferindo das junções septadas típicas, encontradas em outros insetos, por apresentarem septos transversais evidentes apenas nas observações pela microscopia eletrônica de transmissão em cortes oblíquos favoráveis. Todavia, ao se utilizar traçadores, como o lantânio, estes septos tornam-se facilmente visíveis (Lane, 1982). De um modo geral, epitélios que apresentam uma alta taxa de renovação, como no caso de *D. maculatus* (Caldeira et al., 2007), possuem junções septadas lisas (Lane, 1982). Entretanto, este não parece ser o caso do epitélio de *B. xanthophis*, dada sua escassez em células regenerativas, resultando em uma reduzida taxa de renovação celular, que deve ser característica desta espécie.

As células regenerativas são encontradas individualmente ao longo de todo o ventrículo, tanto o VC quanto o VT. Entretanto, como já foi discutido, este tipo

celular é pouco frequente no epitélio e, como o esperado, de difícil visualização nas análises pela microscopia eletrônica de transmissão. Assim, é provável que este epitélio possua um mecanismo pouco ativo de substituição de suas células. As células regenerativas são, pois, responsáveis pela renovação de todo o epitélio, por divisões mitóticas, repondo enterócitos e células endócrinas não mais funcionais (Endo & Nishitsutsuji-Uwo, 1982; Terra, 1988; Chapman, 1998). Nestas células, um número reduzido de organelas pode ser observado em seu citoplasma pouco desenvolvido, tais como mitocôndrias, elementos do retículo endoplasmático granular e dictiossomos. Estas são características típicas de células indiferenciadas (Fawcett, 1981). Segundo Cavalcante & Cruz-Landim (1999), a quantidade de células regenerativas presentes em ninhos em insetos adultos Holometabola parecem ter relação com o tempo de vida e do tipo de dieta. Algumas espécies de Lepidoptera e Diptera possuem uma fase adulta curta ou não se alimentam durante este período. Nestes casos, observam-se poucas ou nenhuma célula regenerativa (Cruz-Landim et al., 1996). Por outro lado, insetos que possuem uma longa fase imatura, como castas de termitas operárias, possuem muitas células regenerativas com intensa atividade mitótica (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996).

Poucos estudos foram encontrados descrevendo células regenerativas em espécies de Hemiptera. A espécie de afídio *Acyrtosiphon pisum* (Cristofolletti et al., 2002) também possui células regenerativas em pouca quantidade e raramente observadas. Possivelmente, a baixa quantidade de células regenerativas em *B. xanthophis* está relacionada com o tipo de dieta líquida desta cigarrinha. Assim sendo, o epitélio do intestino destes animais sofre pouca abrasão pela passagem do alimento, diminuindo, deste modo, a necessidade de reposição dos enterócitos.

As células endócrinas são o terceiro tipo celular que pode ser encontrado no epitélio do ventrículo. Quando presentes, estas células apresentam morfologia variada, mas, de modo geral, se localizam na região basal do epitélio, ou seja, o ápice das células endócrinas normalmente não alcança o lúmen ventricular. Não foram encontrados, na literatura, trabalhos descrevendo células endócrinas em Hemiptera. A possível função destas células é a secreção de hormônios que atuam no próprio epitélio intestinal, a exemplo do que ocorre com as células

endócrinas de vertebrados (Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999).

De acordo com a literatura, existem, basicamente, três tipos de mecanismos de secreção de proteínas sintetizadas pelas células: o merócrino, o apócrino e o holócrino (Weiss, 1983; Junqueira & Carneiro, 2005).

O mecanismo merócrino é, certamente, o mais comum, sendo observado em espécies de insetos como os coleópteros *T. molitor* (Cristofolletti et al., 2001) e *D. maculatus* (Caldeira et al., 2007), a barata *P. americana* (De Lima, 2004), o díptero *Stomoxys calcitrans* (Jordão et al., 1996) e o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Jordão et al., 1999). Neste mecanismo, as vesículas de secreção, originadas no complexo de Golgi, fundem-se com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o meio extracelular em um processo denominado exocitose. Este processo é comum, também, em células de vertebrados, como, por exemplo, nas células do pâncreas exócrino e em glândulas salivares de mamíferos (Junqueira & Carneiro, 2005).

O mecanismo apócrino consiste na eliminação dos grânulos de secreção com as porções do citoplasma apical das células (Aumüller et al., 1999). Este processo foi descrito em enterócitos da região anterior do intestino médio de *T. molitor* (Cristofolletti et al., 2001) e em células de glândulas sudoríparas e mamárias de mamíferos (Junqueira & Carneiro, 2005). Existe, ainda, uma variação deste mecanismo apócrino de secreção, denominado de microapócrino, no qual vesículas de secreção adentram as microvilosidades e são secretadas como vesículas de membrana dupla, através da porção lateral ou apical das microvilosidades. Este processo peculiar foi descrito em *Erinnys ello* (Lepidoptera) (Santos et al., 1983), *S. frugiperda* (Jordão et al., 1999), *Anticarsia gemmatalis* (Levy et al., 2005) e no piolho de porco *Haematopinus suis* (Phthiraptera) (Gonçalves, 2002).

No mecanismo holócrino de secreção, todo o conteúdo celular, incluindo o núcleo, é eliminado juntamente com os conteúdos de secreção (Lehane, 1988; Jimenez & Gilliam, 1990). Tal processo ocorre em glândulas salivares de moluscos (Moura, 2001), glândulas paracloacais de marsupiais (Helder & Freymüller-Haapalainen, 1995) e glândulas sebáceas de mamíferos (Junqueira &

Carneiro, 2005). Em insetos, foi descrito o mecanismo holócrino em *Apis mellifera* (Hymenoptera) (Jimenez & Gilliam, 1990).

Pelas evidências obtidas através das observações ultraestruturais, acredita-se que o mecanismo de secreção predominante em *B. xanthophis* seja o merócrino (exocitose), pois se observam, com frequência, vesículas de secreção associadas aos dictiossomos e localizadas no citoplasma apical, na base das microvilosidades (Junqueira & Carneiro, 2005). Não há quaisquer sinais de secreção apócrina/microapócrina ou holócrina no sistema digestivo de *B. xanthophis*. A não observação de figuras de exocitose típicas é comum em várias espécies de insetos (Santos et al., 1983; Cristofolletti et al., 2001; Caldeira et al., 2007; Biagio et al., 2009), provavelmente por se tratar de um processo muito rápido e, portanto, difícil de ser visualizado.

O fato dos insetos hemípteros se alimentarem de uma fonte nutricional desbalanceada, composta, basicamente, por monômeros e dímeros orgânicos (Terra, 1988) pode ser um fator que resultou na pouca distinção entre as células de diferentes segmentos do ventrículo (VC, VTA e VTM), uma vez que praticamente nenhuma digestão de alimentos é necessária. Segundo Terra (1988), a adaptação dos Hemiptera a este tipo de alimentação resultou na perda da membrana peritrófica, visto que só ocorre a digestão final nestes insetos (Ferreira et al., 1981). Deste modo, sem a compartimentalização do processo digestivo pela membrana peritrófica, não há secreção de água pelo ventrículo posterior e nem absorção pelo ventrículo anterior, ou seja, não ocorre a formação de um contrafluxo de água como descrito por Ferreira et al. (1981) e, portanto, não é esperado que haja diferenças morfológicas entre os enterócitos destas regiões no que diz respeito às invaginações da membrana plasmática basal e às microvilosidades, assim como em relação aos mecanismos de secreção.

Como já era esperado, não foi observada a presença de membrana peritrófica no sistema digestivo de *B. xanthophis*, mas sim, um complexo sistema de membranas que se associa às microvilosidades. De fato, como mencionado anteriormente, os insetos da ordem Hemiptera não possuem membrana peritrófica verdadeira, mas sim um sistema luminal de membranas associado às microvilosidades. O primeiro tipo de organização destas membranas e o mais descrito na literatura é conhecido como sistema de membranas perimicrovilares

(MPM), que reveste as microvilosidades formando dois compartimentos distintos: o espaço externo às MPM e o espaço perimicrovilar (EPM) (Lane & Harrison, 1979; Terra, 1988; 1990; 2001; Silva et al., 1995). A ausência de membrana peritrófica está, provavelmente, relacionada com a adaptação dos hemípteros ancestrais ao hábito de se alimentar de floema, uma vez que se trata de uma fonte de alimento composta por minerais e monômeros orgânicos e, portanto, não se torna necessária a digestão polimérica do alimento, exceto a hidrólise de dímeros (Terra, 1988). Assim sendo, a formação destes compartimentos é fundamental para a absorção ativa de componentes orgânicos, que pode envolver, por exemplo, um simporte com íons potássio, como sugerido por Terra (1988; 1990), aspecto que será discutido mais adiante.

Foram estudadas três espécies de hemípteros em nosso laboratório e todos eles possuem um sistema luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos, substituindo a membrana peritrófica. As MPM de duas destas espécies, a hematófaga *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) (Ferreira et al., 1988) e a sugadora de sementes *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae) (Silva et al., 1995), recobrem as microvilosidades dos enterócitos, projetando-se para o lúmen e terminando em fundo cego, formando um compartimento denominado espaço perimicrovilar (EPM). Nestes insetos, a fonte nutricional é composta por macromoléculas orgânicas e ocorre digestão luminal do alimento. Assim sendo, as MPM possuem, nestes casos, um papel similar ao da membrana peritrófica na compartimentalização do processo digestivo.

Estudos realizados por imunolocalização de α -glicosidase, que é um marcador bioquímico de MPM, em *D. peruvianus*, sugere que o sistema de membranas perimicrovilar é oriundo da membrana interna de vesículas de secreção de membrana dupla, após dois eventos de fusão de membrana consecutivos (Silva et al., 1995). O primeiro evento consiste na fusão da membrana externa das vesículas de membrana dupla com a membrana das microvilosidades. Em seguida, a membrana interna desta mesma vesícula funde-se à membrana perimicrovilar (Silva et al., 1995). Tais vesículas são formadas a partir de cisternas trans-Golgi, que são envoltas por cisternas adjacentes que se rearranjam (Andries & Torpier, 1982; Werner et al., 1991; Silva et al., 1995). A

existência desta dupla barreira na superfície apical nestas células impede o mecanismo exocítico clássico. Foi proposto um modelo para explicar a formação de tais vesículas de membrana dupla, que são formados a partir de cisternas trans do complexo de Golgi reorganizadas com cisternas adjacentes. Uma destas cisternas, contendo proteínas a serem secretadas, é envolvida por uma segunda cisterna. Em seguida, a membrana interna da segunda cisterna desaparece, formando a cisterna trans do complexo de Golgi que irá produzir as vesículas de membrana dupla (Silva et al., 1995). Um fenômeno semelhante foi descrito por Dunn (1990), no processo de formação de vacúolos autofágicos em regiões livres de ribossomos do retículo endoplasmático granular, no qual o desaparecimento da membrana interna deste vacúolo deve ocorrer por proteólise.

A terceira espécie estudada por nossa equipe foi o afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), sugadora de floema (Cristofolletti et al., 2002). Ao contrário do que foi observado nas outras duas espécies, a região apical das células do ventrículo deste inseto apresenta um sistema de lamelas (microvilosidades modificadas) bastante coesas, pois há a ocorrência de trabéculas entre elas. Estas trabéculas também ocorrem entre células adjacentes, conferindo, ao tecido, resistência à tensão. Este aumento de resistência é atribuído ao fato de que o floema é uma fonte de alimentação rica em sacarose. A seiva absorvida pelos afídeos pode chegar a uma concentração de até 1,0 M de sacarose, cerca de três vezes a concentração da hemolinfa (Ashford et al., 2000). Esta concentração diminui ao longo do intestino do afídeo, de modo que a concentração da solução ao final do sistema digestivo é igual ao da hemolinfa (Fisher et al., 1984). Assim sendo, as regiões mais anteriores do tubo digestivo estão submetidas à maior pressão hidrostática do que os segmentos mais posteriores, havendo necessidade de maior resistência do tecido (Cristofolletti et al., 2002).

Membranas de aspecto enovelado são encontradas associadas às extremidades das lamelas do sistema digestivo dos afídeos e são denominadas de membranas perimicrovilares modificadas (MPMm). Ao contrário das MPM, as MPMm não forma um compartimento fechado. Acredita-se que ela tenha origem no sequestro de vesículas de secreção, oriundas do complexo de Golgi, por membranas do retículo endoplasmático granular (Cristofolletti et al., 2002). Os ribossomos se desassociam do retículo e uma vesícula é formada, que, por sua

vez, poderá se fundir com a base das lamelas apicais das células do ventrículo, liberando seu conteúdo no espaço interlamelar. Este material secretado segue em direção ao lúmen intestinal e fixa-se no ápice das lamelas, formando as MPMm. Esta membrana exerce alguns papéis fisiológicos (Cristofolletti et al., 2002), que incluem facilitação da absorção de aminoácidos pela sua concentração, ligando-se à membrana perimicrovilar de modo reversível, e ancorar moléculas de α -glicosidase em uma maior área, para que estas enzimas não sejam excretadas e libere frutose a partir de sacarose sem que haja aumento da osmolaridade. O mecanismo de absorção de aminoácidos nos afídeos não é conhecido, embora se saiba que este processo é influenciado pela presença da bactéria *Buchnera* nos micetócitos dos micetomos, situados na hemocela destes insetos (Prosser et al., 1992). Existem várias evidências que indicam que estas bactérias utilizam aminoácidos não essenciais, absorvidos pelo afídeo, para a produção de aminoácidos essenciais (Prosser & Douglas, 1992; Shiguenobu et al., 2000).

Ao longo do ventrículo do sistema digestivo de *B. xanthophis*, com exceção do VTP, observa-se um complexo sistema de membranas associada às extremidades apicais das microvilosidades e que avançam pelo lúmen, aqui denominado de membranas luminais em forma de chama (MLC). As MLC delimitam compartimentos fechados, observadas como regiões de maior eletrondensidade na luz ventricular e serão discutidos em detalhes adiante. Acredita-se que estas MLC sejam equivalentes às MPM ou às MPMm, que possuem papel fundamental, como vimos, na compartimentalização do processo digestivo em insetos da ordem Hemiptera.

As observações feitas em *B. xanthophis* nos mostram que o sistema luminal de membranas nesta espécie é totalmente diferente dos descritos até o momento para insetos da ordem Hemiptera (ver esquema 1). Entretanto, as MLC compartilham algumas semelhanças tanto com o modelo de membrana perimicrovilar, descrito para os insetos da subordem Heteroptera, quanto com o modelo de MPMm, descrito para *A. pisum*, da subordem Sternorrhyncha (ver esquema 2). Assim como as MPM, as MLC forma, aparentemente, um compartimento fechado no lúmen do ventrículo na forma de pequenas “chamas”, além de possuir membranas ligadas às extremidades apicais das microvilosidades, como acontece com as MPMm. Em todos os casos estudados, os sistemas luminais de membranas aumentam consideravelmente a área de

contato com o conteúdo intestinal. A adição de lantânio como traçador às preparações permitiu observar sua deposição apenas na superfície luminal das MLC, indicando que este sistema de membranas forma, de fato, um compartimento fechado. A precipitação do lantânio em pequenos canais entre as MLC sugere que ocorre um aumento significativo na área de contato destas membranas com o alimento ingerido. Todavia, as MLC, aparentemente, não se originam diretamente a partir da rota intracelular de secreção, como com as MPM e as MPMm. De fato, no caso de *R. prolixus* e *D. peruvianus*, as MPM tem sua origem a partir de vesículas secretoras de dupla membrana, formadas nos dictiossomos, de modo que as MPM são produtos da membrana mais interna destas vesículas, após o processo de exocitose. No caso dos afídeos, as MPMm também são produtos da rota secretora, a partir de vesículas oriundas dos dictiossomos que originam as membranas enoveladas. Estas membranas são envoltas por outra membrana, de origem desconhecida, formando uma vesícula. Após um processo de exocitose, estas membranas enoveladas fixam-se ao ápice das microvilosidades, formando as MPMm. No caso da espécie *B. xanthophis*, as MLC são, aparentemente, formadas por uma vesiculação das extremidades das microvilosidades. Assim, do ponto de vista da sua gênese, as MLC, aparentemente, não são originadas diretamente a partir da rota intracelular de secreção, como ocorre com as MPM e as MPMm. No caso das MLC, as microvilosidades do VC, VTA e VTM de *B. xanthophis* parecem sofrer constrições em seus ápices, originando pequenas vesículas que são liberadas para o lúmen do ventrículo. Estas vesículas permanecem ligadas às microvilosidades por membranas, enquanto as microvilosidades continuam o processo de gênese de vesículas. Deste modo, formam-se estruturas semelhantes a um colar de contas que avançam pela luz ventricular. Conforme estas vesículas se afastam das microvilosidades, elas se alongam progressivamente até tornarem-se membranas simples, originando as MLC. As vesículas oriundas de uma microvilosidades fundem-se com outras provenientes da microvilosidades vizinha, formando os compartimentos fechados. As análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura corroboram estas idéias, pois observamos, de fato, uma membrana associada ao ápice das microvilosidades que recobre as células, projetando-se, muitas vezes, em direção ao lúmen do ventrículo, em um padrão similar ao observado nas imagens obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão.

Esquema 1 - Modelo mostrando o modelo proposto para a origem das membranas luminais em forma de chama (MLC). *L* – Lúmen; *Mv* – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndria; *VS* – Vesícula de secreção; *G* – Complexo de Golgi; *REG* – Retículo endoplasmático granular; *N* – Núcleo.

Segundo Terra (1988), a membrana perimicrovilar teria surgido em um inseto ancestral de Hemiptera e Thysanoptera, adaptado a um hábito de raspar a superfície de plantas e sugar o floema. Como já discutido anteriormente, a seiva das plantas é um alimento que possui nutrientes orgânicos na forma de monômeros e dímeros, de modo que não é necessário qualquer tipo de digestão luminal do alimento, a não ser a digestão destes dímeros, como, por exemplo, a sacarose, resultando na perda da membrana peritrófica como uma adaptação a este hábito alimentar. O fato de esta fonte nutricional ser extremamente diluída torna-se difícil a absorção dos componentes orgânicos, presentes em concentrações muito baixas, especialmente, aminoácidos. Neste ancestral hipotético de Condylgnatha (táxon que inclui as ordens Thysanoptera e Hemiptera), o mecanismo de absorção de aminoácidos dependeu do surgimento de uma da membrana perimicrovilar como uma adaptação a absorção destes nutrientes, como já descrito anteriormente (Terra, 1988, 1990; Terra & Ferreira, 1994). Entretanto, mesmo após a evolução destes insetos para um novo hábito alimentar, que exigiu a digestão luminal do alimento, como no caso de *R. prolixus* e *D. peruvianus*, as MPM foram mantidas e passaram a atuar compartimentalizando o processo digestivo, em um papel similar ao da membrana peritrófica, encontrada na grande maioria dos insetos (Terra, 1988).

Todavia, este modelo proposto por Terra (1988; 1990) e Terra & Ferreira (1994) entra em conflito com dados mais recentes sobre os hábitos alimentares destes ancestrais hipotéticos. Segundo Grimaldi & Engels (2005), o ancestral do grupo Condylgnatha, no qual teria surgido as MPM, não era um inseto sugador de fluidos vegetais, mas sim se alimentaria de detritos ou microrganismos. Portanto, a fonte nutricional destes animais possuía macromoléculas, exigindo um processo de digestão luminal deste alimento, conflitando, pois, com a hipótese de Terra (1988; 1990) e Terra & Ferreira (1994). Outro fato complicante para o suporte desta hipótese diz respeito aos mecanismos de digestão observados nos Hemiptera. Dadas as peculiaridades das fontes nutricionais destes insetos, acredita-se que o tipo de alimento tenha atuado como pressão seletiva, direcionando para a seleção de mecanismos de absorção de nutrientes mais eficientes. Neste contexto, as MPM descritas para os heterópteros *R. prolixus* e *D. peruvianus*, teriam sido originadas, na visão de Terra (1988; 1990) e Terra & Ferreira (1994), em um ancestral hipotético de Hemiptera, como uma adaptação

que aumentaria a eficiência na absorção dos nutrientes da seiva, como já discutido. Entretanto, estudos realizados com o afídeo *A. pisum* e com a cigarrinha *B. xanthophis*, sendo, este último, objeto de estudo do presente trabalho, mostram que, apesar de possuírem uma fonte nutricional semelhante ao do ancestral hipotético, estes hemípteros possuem, como já discutido, uma organização do sistema luminal de membranas muito diferente do proposto para este ancestral, que, aparentemente, foi mantida em Heteroptera (como em *R. prolixus* e *D. perivianus*), o que conflita, mais uma vez, com a hipótese de Terra (1988; 1990) e Terra & Ferreira (1994). Neste caso, o modelo de um ancestral sugador para a origem das MPM fica comprometido, havendo necessidade de uma maior quantidade de dados sobre a organização deste complexo sistema de membranas em diferentes espécies de Hemiptera, relacionando-os aos seus hábitos alimentares.

As classificações filogenéticas dos insetos são baseadas, geralmente, na morfologia externa de indivíduos adultos e não leva em conta aspectos da morfologia interna, incluindo o sistema digestivo (Terra, 1988; 1990). Deste modo, o estudo do sistema digestivo dos insetos, ou demais características internas, pode contribuir para a obtenção de uma visão mais abrangente e completa das relações filogenéticas entre os grupos de insetos.

Sob o ponto de vista filogenético, a classificação da ordem Hemiptera ainda é assunto de debate (Gillot, 1995; Resh & Cardé, 2003; Grimaldi & Engels, 2005; Triplehorn & Johnson, 2005). Antigas classificações consideravam duas subordens em Hemiptera: Homoptera (atuais Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha) e Heteroptera. De acordo com alguns autores, os grupos Homoptera e Heteroptera deveriam ser elevados ao nível de ordem, mas trabalhos mais recentes os mantiveram como subordens e os agruparam em uma única ordem. Assim, a classificação mais aceita atualmente considera uma única ordem monofilética, Hemiptera, composta por três subordens: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera (Gillot, 1995; Resh & Cardé, 2003; Grimaldi & Engels, 2005; Triplehorn & Johnson, 2005). Enquanto o caráter monofilético dos grupos Sternorrhyncha e Heteroptera não são contestados, a subordem Auchenorrhyncha é considerada parafilética por alguns autores, apesar de ser aceito pela maioria como sendo monofilética. A subordem Auchenorrhyncha é

classificada, ainda, em duas infraordens: Cicadomorpha, que inclui a família Cicadellidae (a qual pertence a cigarrinha *B. xanthophis*), e Fulgoromorpha. Em um estudo realizado com a espécie sugadora de seiva *Phylloscelis atra* (Hemiptera: Fulgoridae) (Reger, 1974), integrante da infraordem Fulgoromorpha, foi evidenciada a presença de membrana perimicrovilar típica, como a observada em *R. prolixus* e *D. peruvianus*. A presença de MPM também foi constatada na espécie *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) (Silva et al., 2004), representante da infraordem Cicadomorpha. A cigarrinha *B. xanthophis*, também da infraordem Cicadomorpha, possui uma organização diferente do sistema luminal de membranas, as MLC. Assim, com base nas análises do sistema digestivo das poucas espécies descritas de Auchenorrhyncha, podemos observar uma variação significativa na organização do sistema luminal de membranas neste grupo, apesar de terem uma fonte nutricional semelhante. Estas informações podem ser de grande ajuda para a resolução da situação filogenética desta subordem, pois, de acordo com Ribeiro et al. (1990), a relação entre a organização espacial da digestão e a morfologia do intestino dependem, em proporções variáveis, da dieta ingerida pelos insetos e suas relações filogenéticas.

Assim sendo, o presente trabalho apresenta uma proposta diferente para o panorama atual da morfofisiologia digestiva da ordem Hemiptera. De um modo resumido, num ancestral hipotético do grupo Condylgnatha, que não possuía membrana peritrófica e alimentava-se de detritos e/ou microrganismos, evoluiu um sistema de membranas lipoprotéicas revestindo as microvilosidades no lúmen do ventrículo, semelhante às MPM observadas nos atuais Heteroptera, cuja função provável seria a de compartimentalizar o processo digestivo. Nesta subordem, as MPM foram observadas nas espécies *R. prolixus* (hematófago) e *D. peruvianus* (sugador de sementes) e possui, provavelmente, uma função semelhante daquela suposta para o ancestral de Hemiptera. Nos afídeos (subordem Sternorrhyncha), que se alimentam de floema, observamos um sistema de membranas enoveladas associadas às extremidades das microvilosidades denominadas MPMm, cuja função provável é aumentar a área de distribuição de enzimas digestivas no sentido de otimizar o processo digestivo. Um terceiro tipo de organização de membranas foi observado na subordem Auchenorrhyncha, na espécie *B. xanthophis*, estudada neste trabalho, que se

alimenta de xilema. Neste caso, membranas se associam aos ápices das microvilosidades e se projetam para o lúmen do ventrículo, formando, compartimentos, aparentemente, fechados, como os espaços perimicrovilares das espécies que possuem MPM. Nesta mesma subordem, encontramos as espécies *P. atra* (Reger, 1971) e *M. posticata* (Silva et al., 2004), que também são insetos sugadores, mas possuem MPM típicas, semelhante ao constatado em Hemiptera. Assim sendo, as MPM não são uma característica evolutiva de todos os Hemiptera, como se cogitava originalmente (Terra, 1988; 1990; Terra & Ferreira, 1994; Silva et al., 2004). Por outro lado, em todos os três modelos de organização do sistema luminal de membranas descritos até o momento, sendo, aparentemente, o sistema de MPM o mais comum, ocorre um aumento significativo de superfície de membrana do epitélio, com o consequente aumento de eficiência da digestão e/ou da absorção de nutrientes. Todavia, parece que foram encontradas diferentes soluções evolutivas para um mesmo problema, possivelmente, relacionadas à perda da membrana peritrófica face a mudanças de hábitos alimentares.

Estendendo a análise do sistema digestivo para toda a superordem Paraneoptera, que incluem as ordens Psocoptera (piolhos de livro), Phthiraptera (piolhos), Thysanoptera (trips), além dos Hemiptera, encontram-se espécies bastante peculiares. As espécies *Haematopinus suis* (Phthiraptera) (Gonçalves, 2002), *Pediculus humanus* (Phthiraptera) e um representante da ordem Psocoptera (Silva et al., 2004), por exemplo, foram estudadas sob o ponto de vista da morfofisiologia do sistema digestivo e não possuem um sistema luminal de membranas de qualquer tipo. Estes resultados mostram que a perda da membrana peritrófica em Hemiptera e Thysanoptera tenha ocorrido, provavelmente, em um ancestral comum a todos os Paraneoptera, ao invés de ter ocorrido no ancestral hipotético de Condylgnatha, como proposto por Terra (1988; 1990). Deste modo, a superordem Paraneoptera mostra-se como um grupo de grande interesse para estudos morfofisiológicos do processo digestivo, dada as peculiaridades encontradas nas poucas espécies estudadas deste grupo.

Outro tema polêmico refere-se às relações filogenéticas entre as ordens dos Paraneoptera. Alguns autores, como Wheeler et al. (2001), propõem uma filogenia diferente da abordada até o momento, sugerida por Kristensen (1981), para esta superordem. Segundo Kristensen (1981), os Paraneoptera seriam

formados por dois grandes grupos irmãos: Psocodea, que inclui as ordens Psocoptera e Phthiraptera, e Condylgnatha. Na classificação de Wheeler et al. (2001), Hemiptera seria o grupo mais basal e irmão de todos os outros paraneópteros. Como se pode notar, a situação filogenética de toda a superordem Paraneoptera é bastante polêmica e requer estudos adicionais. Assim sendo, o estudo de um maior número de espécies dos grupos de Hemiptera, Thysanoptera e outras ordens de Paraneoptera, sob o ponto de vista da morfofisiologia do processo digestivo, podem contribuir significativamente para a elucidação dos graus de parentesco entre estes grupos.

Assim sendo, a origem dos Paraneoptera requer um estudo mais detalhado e abrangente de seus vários integrantes, no sentido de elucidar os fatores adaptativos que levaram à perda da membrana peritrófica e a suposta origem de um sistema luminal de membranas em Thysanoptera e Hemiptera. Este tipo de informação pode ser muito valioso no sentido de esclarecer as relações filogenéticas entre os diferentes grupos desta superordem.

Em suma, verificou-se que o sistema luminal de membranas encontrado nos Hemiptera é mais complexo e diversificado do que se imaginava inicialmente. Até o momento, constatou-se a ocorrência de três modelos de organização deste sistema (ver esquema 2): o MPM (considerado, originalmente, como padrão em Condylgnatha e descrito em diversas espécies, de diferentes infraordens), o MPMm (encontrado em afídeos) e o MLC (detalhado na espécie *B. xanthophis* neste trabalho). Deste modo, a continuidade deste estudo aponta para uma análise morfofuncional do sistema digestivo bem mais abrangente, envolvendo vários representantes dos diferentes grupos dos Paraneoptera. Por outro lado, há, também, a necessidade de um maior detalhamento das funções exercidas por estes complexos sistemas luminiais de membranas. Para tanto, há que se utilizar de metodologias da área de Biologia Molecular, no sentido de isolar enzimas digestivas chave e marcadores do sistema luminal de membranas, como α -glicosidase, e produzi-las em grandes quantidades, com o intuito de produzir anticorpos específicos contra estas enzimas. Com isto, será possível a imunolocalização citológica das enzimas digestivas, por técnicas de imunocitoquímica, especialmente aquelas associadas ao sistema luminal de membranas.

Esquema 2 - Comparação entre os três modelos propostos para a organização do sistema luminal de membranas associadas às microvilosidades descritos em insetos da ordem Hemiptera: o modelo de membranas perimicrovilares (MPM) (Silva et al. 1995), o de membranas perimicrovilares modificadas (MPMm) (Cristofolletti et al., 2002) e o de membranas luminais em forma de chama (MLC) (presente trabalho). VS – Vesícula de secreção; G – complexo de Golgi; N – Núcleo.

RESUMO

Este trabalho aborda um estudo detalhado sobre o sistema digestivo da cigarrinha sugadora de xilema, *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae), num enfoque morfofuncional. Sob o ponto de vista anatômico, o sistema digestivo é constituído, como na maioria dos insetos, por três regiões: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior. O intestino anterior é formado por um tubo simples, o esôfago, sem qualquer diferenciação anatômica. O intestino médio tem início na câmara de filtração (CF) e segue por um ventrículo com dois domínios, o cônico (VC) e o tubular (VT), retornando para a câmara de filtração. A CF é uma estrutura característica principalmente de insetos sugadores de xilema de uma infraordem da ordem Hemiptera, a Cicadomorpha, e consiste na aposição entre o intestino médio anterior com o posterior, além dos segmentos proximais dos quatro túbulos de Malpighi. A função da CF é permitir a passagem do excesso de água presente no xilema diretamente do intestino médio anterior para o posterior, concentrando, assim, seus nutrientes no ventrículo. O sistema digestivo continua por um intestino posterior, apresentando, antes de terminar no ânus, um reto dilatado, ao qual se associam as extremidades distais dos quatro túbulos de Malpighi, livres na hemocela.

Análises por microscopia de luz revelaram que o intestino anterior é formado por um epitélio simples, composto por células pavimentosas revestidas por cutícula. O epitélio da CF é bastante fino e não há diferenças significativas entre as células do ventrículo e dos túbulos de Malpighi. O VC e o VT são compostos por células cúbicas, os enterócitos, e células regenerativas. A transição do intestino médio para o posterior, denominada de piloro, ocorre no interior da CF. Nesta região, inserem-se os quatro túbulos de Malpighi, órgãos do sistema excretor. O intestino posterior é formado por um epitélio pavimentoso, recoberto por uma camada de quitina.

Observadas através da microscopia eletrônica de transmissão, as células da CF possuem sua superfície apical modificada em microvilosidades e a membrana plasmática basal com invaginações desenvolvidas associadas a mitocôndrias, além de um citoplasma bastante reduzido. Estas características sugerem que se trata de células especializadas no transporte de água e íons, provavelmente a partir do intestino médio para os túbulos de Malpighi. O VC e o VT são formados por enterócitos e células regenerativas. Estas últimas são raras, estão localizadas na base do epitélio, sem formar agrupamentos (ninhos), e

possuem características típicas de células indiferenciadas, com núcleos grandes e poucas organelas. Os enterócitos, as células mais importantes no processo digestivo, possuem sua membrana plasmática apical modificada em microvilosidades e invaginações da membrana plasmática basal, menos desenvolvidas do que as das células do CF.

No que diz respeito à atividade de secreção observada nos enterócitos de *B. xanthophis*, verifica-se a existência de grandes quantidades de retículo endoplasmático granular, diversas áreas de Golgi e algumas vesículas de secreção concentradas no citoplasma apical. Parece haver apenas um mecanismo de secreção, o merócrino, ao longo de todo o ventrículo.

No lúmen do ventrículo de *B. xanthophis*, não foi constatada a presença de uma membrana peritrófica, comum em insetos de diversas ordens, exceto Hemiptera e Thysanoptera. Ao invés disso, nas regiões do VC e nos dois terços iniciais do VT (o ventrículo tubular anterior – VTA – e o médio – VTM), se observa um complexo sistema luminal de membranas associado às microvilosidades dos enterócitos, formando padrões em forma de “chama”, sendo denominados de membranas luminais em forma de chama (MLC). Este sistema se origina, aparentemente, a partir de constrições das extremidades das microvilosidades que formando membranas que avançam pelo lúmen ventricular, mantendo-se associadas às microvilosidades. Originalmente, acreditava-se que os insetos das ordens Hemiptera e Thysanoptera possuíam um sistema luminal de membranas associadas às microvilosidades, denominado de membranas perimicrovilares (MPM). Este modelo foi considerado como padrão para a ordem Hemiptera, sendo descrito, principalmente, em espécies da subordem Heteroptera. Estudos posteriores com o afídeo *Acyrtosiphon pisum*, revelaram um sistema luminal de membranas diferente das MPM, que foi denominado, na ocasião, de membranas perimicrovilares modificadas (MPMm). A ocorrência de um novo tipo de organização deste sistema luminal de membranas, as MLC, evidencia uma possível diversidade de tipos de organização destas membranas em Hemiptera. Acredita-se, com base nas características destes sistemas luminais de membranas, que as MLC sejam equivalentes às MPM e às MPMm. Preparações deste material utilizando o lantânio como traçador, revelaram que o MLC forma, aparentemente, compartimentos fechados.

A descoberta de um terceiro sistema de organização de membranas em *B. xanthophis*, que difere significativamente das MPM e das MPMm, abre uma nova discussão sobre o panorama atual da morfofisiologia digestiva da ordem Hemiptera, que pode fornecer subsídios importantes no sentido de melhor compreender as relações filogenéticas entre os grupos de espécies que compõem esta ordem. Com base nos resultados obtidos neste e em outros trabalhos sobre a organização do sistema digestivo dos Hemiptera, fica evidente a importância de estudos mais abrangentes, sob este ponto de vista, envolvendo outras espécies integrantes das diferentes subordens de Hemiptera. Do mesmo modo, um maior detalhamento das funções exercidas por estes sistemas luminais de membrana mostra-se de extrema importância para uma melhor compreensão dos processos digestivos que ocorrem nestes insetos.

ABSTRACT

This work presents a detailed study concerning the digestive system of the xylem-sucking sharpshooter *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae), in a morphofunctional approach. In the majority of insects, three anatomical regions constitute the digestive system: the foregut, the midgut, and the hindgut. A simple tube, the esophagus, without any anatomical differentiation, forms the foregut. The midgut starts in the filter chamber (FC) and proceeds in a ventriculum with two domains, the conical one (CV) and the tubular one (TV), returning to the filter chamber. The FC is a structure normally found in the xylem-sucking insects of the infraorder Cicadomorpha. It is formed by the apposition between the fore-midgut and the hind-midgut, along with the proximal segments of the four Malpighian tubules. The function of the FC is to allow the passage of the excess of water in the xylem directly from the fore-midgut to the hind-midgut, concentrating its nutrients in the mid-midgut. The digestive system proceeds through a hindgut, presenting, before ending in the anus, a dilated rectum, to which the distal ends of the Malpighian tubules associate.

Light microscopy analysis revealed that the midgut is formed by a simple epithelium, composed of flattened cells covered by a cuticle. The epithelium of the FC is very thin and there are no significant differences between ventricular cells and Malpighian tubule cells. Cubic enterocytes and regenerative cells compose the CV and TV. The transition between the midgut and the hindgut occurs inside the FC and is called pylorus, where four Malpighian tubules insert, presenting excretory function. The hindgut is made up by flattened cells, covered by a layer of chitin.

Observed by transmission electron microscopy, the FC cells have a reduced cytoplasm with their apical surface modified into microvilli, whereas the basal plasma membrane presents several invaginations associated with mitochondria. These features suggest that these cells are specialized in the transport of water and ions, probably from the midgut to the Malpighian tubules. The CV and TV are formed by enterocytes and regenerative cells. The latter are very rare and are localized at the base of the epithelium, without forming clusters (nests or nidi), and have typical undifferentiated cell features, such as large nuclei and few organelles. The enterocyte, the most important cell type in the digestive process, have their apical plasma membrane modified into microvilli and basal plasma membrane showing infoldings, less developed than the FC cells.

The *B. xanthophis* enterocytes exhibit signs of secretory activity, with large amounts of rough endoplasmic reticulum, many Golgi areas and some secretory vesicles mainly clustered in the apical cytoplasm. This secretory vesicles seems to be eliminated by a merocrine secretion process throughout the ventriculum.

In the ventricular lumen of *B. xanthophis*, a peritrophic membrane, observed in most insects other than Hemiptera and Thysanoptera, is not present. Instead, in the CV and the two initial thirds of the TV (the anterior tubular ventriculum – ATV – and the medium tubular ventriculum – MTV), a complex luminal membrane system associated with the enterocyte microvilli can be detected, forming flame-like patterns, named flame-like luminal membranes (FLM). This system originates, apparently, from constrictions of the microvillar tips, which form membranes that project into the ventricular lumen, keeping their association with the microvilli. Formerly, it was assumed that Hemiptera and Thysanoptera insects have a luminal membrane system associated with the microvilli, called permicrovillar membranes (PMM). This membrane system was considered as a structure present in the whole order Hemiptera, mainly in Heteroptera suborder species. Posterior studies with the aphid *Acyrtosiphon pisum*, revealed the occurrence of a luminal membrane system very different from the PMM model. This system was called modified permicrovillar membranes (MPM). The occurrence of a new kind of luminal membranes system, the FLM, suggests the existence of a not yet described diversity in these luminal membranes organizations in Hemiptera. Thus, it is assumed that FLM, PMM and MPM are probably homologous luminal membranes systems with similar function roles. The use of lanthanum as a tracer revealed that the FLM forms, apparently, closed compartments, as postulated to PMM.

The discovery of a third type of luminal membrane organization system in *B. xanthophis*, which differs significantly from PMM and MPM, opens a new discussion concerning the actual origin and function of these complex luminal membranes system in the digestive system of Hemiptera. More detailed studies of the occurrence of different types of luminal membranes systems in Hemiptera species, may improve the knowledge about the phylogenetic relationships among the several groups, which constitutes this order. Furthermore, the actual role of the luminal membranes system in the digestive process has to be investigated in detail.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas: Agosto, 2002.

AMMAR, E. D. Internal morphology and ultrastructure of leafhoppers and planthoppers. In: L. R. Nault & J. G. Rodrigues (eds.), **The leafhoppers and planthoppers**. Willey, New York, NY, 1985. p. 127-162.

ANDRIES, J. C.; TORPIER, G. **An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis**. Biol Cell, v. 46, 1982. p. 195-202.

ASHFORD, D. A.; SMITH, W. A.; DOUGLAS, A. E. **Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum***. J Insect Physiol, v. 46, 2000. p. 335-341.

AUMÜLLER, G.; WILHELM, B.; SEITZ, J. **Apocrine secretion – fact or artifact?**. Ann Anat, v. 18, n. 5, 1999. p. 437-446.

BERETTA, M. J. G.; GARCIA, JR. A.; LEE, R. F.; DERRICK, K. S.; BARTLE, G.; TOMÉ NETO, J. Observation on citrus variegated chlorosis in Brazil. Proc of the 12th In: **Conference of the international**. IOCV. 12, India, 1993. p. 291-293.

BEURON, F.; LE CAHEREC, F.; GUILLAM, M. -T.; CAVALIER, A.; GARRET, A.; TASSAN, J. -P.; DELAMARCHE, C.; SCHULTZ, P.; MALLOUH, V.; ROLLAND, J. -P.; HUBERT, J. -F.; GOURANTON, J.; THOMAS, D. **Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis***. J Biol Chem, v. 270, n. 29, 1995. p. 17414-17422

BIAGIO, F. P.; TAMAKI, F. K.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F. **Digestive morphophysiology of *Gryllodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae)**. J Insect Physiol, v. 55, n. 12, 2009. p. 1125-1133.

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels**. Electrophoresis, v. 8, 1987. p. 93-99.

CALDEIRA, W.; DIAS, A. B.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. R. **Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion**

along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae. Arch Insect Biochem Physiol, v. 64, n. 1, 2007. p. 1-18.

CAVALCANTE, V. M. & CRUZ-LANDIM, C. **Types of cells present in the midgut of the insects: a review**. Naturalia, São Paulo, v. 24, 1999. p. 19-40.

CHAPMAN, R. F. **The insects**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998. p.38-68.

CHEUNG, W. W. K.; MARSHALL, A. T. **Water and ion regulation in cicadas in relation to xylem feeding**. J Insect Physiol, v. 19, 1973a. p. 1801-1816.

CHEUNG, W. W. K.; MARSHALL, A. T. **Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopid midgut**. Tissue and Cell, v. 5, 1973b. p. 651-669.

CHEUNG, W. W. K.; PURCELL, A. H. **Ultrastructure of the digestive system of the leafhopper *Euscelidius variegatus* (Homoptera: Cicadellidae), with and without congenital bacterial infections**. Int J Insect Morphol Embryol, v. 22, n. 1, 1993. p. 49-61.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; DERAISON, C.; RAHBÉ, Y.; TERRA, W. R. **Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum***. J Insect Physiol, v. 49, 2002. p. 11-24.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Apocrine secretion of amylase and exocytoses of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae**. J Insect Physiol, v. 47, 2001. p. 143-155.

CRUZ-LANDIM, C. **Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos**. Aciesp, v. 44, n. 6, 1985. p. 28-49.

CRUZ-LANDIM, C.; COSTA-LEONARDO, A. M. **Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 91, 1996. p. 129-130.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAIS, R. L. M.; SERRÃO, J. E. **Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae).** J Comp Biol, v. 1, n. 1/2, 1996. p. 29-40.

DE LIMA, H. **Estudo morfofuncional do sistema digestivo de *Periplaneta americana* L. (Dictyoptera: Blattellidae).** Dissertação (Mestrado em Genética/Biologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DE NIGRI, J. D. **Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais.** Com Tec, n. 82, Ect. Rural, CATI, Campinas. 1990.

DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. **Clorose Variegada dos Citros.** Edição Comemorativa do 15º Aniversário da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro. 1997.

DOW, J. A. T. **Insect midgut function.** Adv Insect Physiol, v. 19, 1986. p. 187-328.

DUNN, W. A. **Studies on the mechanism of autophagy: formation of the autophagic vacuole.** J Cell Biol, v. 110, 1990. p.1923-1933.

ENDO, Y.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. **Fine structure of developing endocrine cells and columnar cells in the cockroach midgut.** Biomed Res, v. 3, 1982. p. 673-644.

FAWCETT, D. W. **The cell.** 2nd ed., Philadelphia: Saunders, 1981.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara americana* and its physiological implications.** J Insect Physiol, v. 27, 1981. p. 559-570.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; GARCIA, E. S.; TERRA, W. R. **Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma**

membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. Insect Biochem, v. 18, n. 6, 1988. p. 521-530.

FISHER, D. B.; WRIGHT, J. P.; MITTLER, T. E. **Osmoregulation by the aphid *Myzus persicae*: a physiological role for the honeydew oligosaccharides.** J Insect Physiol, v. 30, 1984. p. 387-393.

GILLOT, C. **Entomology.** 2nd Ed. New York. Plenum Press, 1995. p. 195-232.

GONÇALVES, E. K. **Estudo morfofuncional do sistema digestivo de *Haematopinus suis* L. (Phthiraptera, Anoplura).** Dissertação (Mestrado em Genética/Biologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GOURANTON, J. **Ultrastructures en rapport avec un transit d'eau. Etude de la chambre filtrante de *Cicadella viridis*.** J Microsc (Paris), v. 7, 1968. p. 559-574.

GREEN, C. R.; NOIROT-TIMOTHÉE, C.; NOIROT, C. **Isolation and characterization of invertebrate smooth septate junctions.** J Cell Sci, v. 62, 1983. p. 351-370.

GRIMALDI, D.; ENGELS, M. S. **Evolution of the insects.** Cambridge [U.K.]; New York: Cambridge University Press, 2005. p. 287-312.

HANSEN, L. L.; RAMLOV, H.; WESTH, P. **Metabolic activity and water absorption in the mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): real-time measurements by two-channel microcalorimetry.** J Exp Biol, v. 207, 2004. p. 545-552.

HELDER, J.; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, E. **Morphological and ultrastructural study of the paracloacal (Scent) glands of the marsupial *Metachirus nudicaudatus* Geoffroy 1803.** Acta Anat, v. 153, 1995. p. 31-38.

HUBERT, J. -F.; THOMAS, D.; CAVALIER, A.; GOURANTON, J. **Structural and biochemical observations on specialized membranes of the “filter chamber”, a water shunting complex in sap-sucking homopteran insects.** Biol Cell, v. 66, 1989. p. 155-163.

IWANAGA, T.; FUJITA, T.; NISHITSUTSUJI-UWO, J.; ENDO, Y. **Immunohistochemical demonstration of PP-, somatostatin-, enteroglucagon- and VIP-like immunoreactivities in the cockroach midgut.** Biomed Res, v. 2, 1981. p. 202-207.

JIMENEZ, D. R.; GILLIAM, M. **Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase.** Cell Tissue Res, v. 261, 1990. p. 431-443.

JORDÃO, B. P.; CAPELLA, N. A.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. **Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells.** J Insect Physiol, v. 45, 1999. p. 29-37.

JORDÃO, B. P.; LEHANE, M. J.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. **An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*.** Insect Biochem Mol Biol, v. 26, n. 5, 1996. p. 445-453.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Basic histology.** 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

KARNOVSKY, M. J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.** J Cell Biol, v. 27, 1965. p.137.

KRISTENSEN, N. P. **Phylogeny of insect orders.** Ann Rev Entomol, v. 26, 1981. p. 135-157.

LAEMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, 1970. p. 680-685.

LANE, N. J. Insect intercellular junctions: their structure and development. In: King, R. C.; Akai, H. **Insect Ultrastructure.** New York: Plenum Press, v. 1, 1982. p. 402-433.

LANE, N. J.; HARRISON, J. B. **Unusual cell-surface modification – double plasma-membrane.** J Cell Sci, v. 39, 1979. p. 355-372.

LE CAHEREC, F.; GUILLAM, M. –T.; BEURON, F.; CAVALIER, A.; THOMAS, D.; GOURANTON, J.; HUBERT, J. –F. **Aquaporin-related proteins in the filter chamber of homopteran insects.** Cell Tissue Res, v. 290, 1997. p. 143-151.

LEHANE, M. J. **Evidence for secretion by the release of cytoplasmic extrusions from midgut cells of *Stomoxys calcitrans*.** J Insect Physiol, v. 34, n. 10, 1988. p. 949-953.

LEHANE, M. J. **Peritrophic matrix structure and function.** Annu Rev Entomol, v. 42, 1997. p.525-550.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E. A.; TOLEDO L. A. **Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera : Noctuidae).** Neotrop Entomol, v. 33, 2004. p. 427-431.

LICENT, E. **Recherches d'anatomie et de physiologie comparées sur le tube digestif des Homoptères supérieurs.** La Cellule, v. 28, 1912. p. 1-161.

LINDSAY, K. L.; MARSHALL, A. T. **Ultrastructure of the filter chamber complex in the alimentary canal of *Eurymela distinct* Signoret (Homoptera, Eurymelidae).** Int J Insect Morphol Embryol, v. 9, 1980. p. 179-198.

LINDSAY, K. L.; MARSHALL, A. T. **The osmoregulatory role of the filter-chamber in relation to phloem-feeding in *Eurymela distincta* (Cicadelloidea, Homoptera).** *Physiol Entomol*, v. 6, 1981. p. 413-419.

MARSHALL, A. T.; CHEUNG, W. W. K. **Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopid Malpighian tubules and filter chamber.** *Tissue and Cell*, v. 6, 1974. p. 153-171.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: King RC, Akai H. **Insect ultrastructure.** New York: Plenum Press, v. 2, 1984. p.199-261.

MARUCCI, R. C.; CAVICHIOLI, C. C.; ZUCCHI, R. A. **A key to five sharpshooter leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) vectors of citrus variegated chlorosis (CVC).** *An Soc Entomol Bras*, v. 28, 1999. p. 439-446.

MARUCCI, R. C.; GIUSTOLIN, T. A.; MIRANDA, M. P.; FERRAZ, P. C.; LOPES, J. R. S. **Sharpshooter transmission of a coffee strain of *Xylella fastidiosa* to coffee seedlings.** *Fitopatol Bras*, v. 26, 2001.

MEDEIROS, M. A. **As pragas também morrem pela boca.** *Revista Pesquisa Fapesp*, v. 54, 2000. p.1-5.

MOLLENHAUER, H. H.; MOORE, D. J. **Structure of Golgi-apparatus.** *Protoplasma*, v. 180, 1994. p. 14-28.

MOURA, K. R. S. **Estudo morfofuncional da glândula salivar de *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae).** Dissertação (Mestrado em Genética/Biologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

NATION, J. L. **Insect Physiology and Biochemistry.** 2nd ed, CRC Press, Boca Raton. 2008.

PROSSER, W. A.; DOUGLAS, A. E. **A test of the hypothesis that nitrogen is upgraded and recycled in aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis.** J Insect Physiol, v. 38, 1992. p. 93-99.

PROSSER, W. A.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **How an aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis responds to variation in dietary nitrogen.** J Insect Physiol, v. 38, 1992.

RAKITOV, R. A. **The covering formed by brochosomes on the cuticle of leafhoppers (Homoptera, Cicadellidae).** Entomol Rev, v. 74, 1995. p. 90-103.

RAKITOV, R. A. **Secretory products of the Malpighian tubules of Cicadellidae (Hemiptera, Membracoidea): an ultrastructural study.** Int J Insect Morphol Embryol, v. 28, 1999. p. 179-193.

RAMSAY, J. A. **The rectal complex of the mealworm *Tenebrio molitor*, L. (Coleoptera, Tenebrionidae).** Phil Tran (B), v. 248, 1964. p. 279-314.

REGER, J. F. **Fine structure of the surface coat of midgut epithelial cells in the homopteran *Phylloscelis atra* (Fulgorid).** J Submicr Cytol, v. 3, 1971. p. 353-358.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects.** Amsterdam, Boston: Academic Press, 2003. p. 66-74.

REYNOLDS, E. S. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.** J Cell Biol, v. 17, 1963. p. 208-212.

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological basis of insect digestion. In: Mellinger, J. (ed.) – **Animal nutrition and transport processes. 1. Nutrition in wild and domestic animals.** Basel: Karger, v.5, 1990. p.96-105.

RIBEIRO, A. F.; PERONDINI, A. L. P. **Symbiont bacteroids in eggs and germ cells of *Sciara ocellaris* (Diptera, Sciaridae).** Invert Rep Develop, v. 19, n. 2, 1991. p. 123-129.

ROSSETI, V.; GARNIER, M. B.; GARNIER, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; DE NIGRI, D. **Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chorose variegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil.** Paris: C.R.S. Acad Sci, Séries, v. 3. 1990. p. 345-349.

ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. **Molecular dissection of the secretory pathway.** Nature, v. 335, 1992. p. 409-415.

SANTOS, C. D.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. **Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm *Erinnys ello*.** J Insect Physiol, v. 29, 1983. p. 707-714.

SAXENA, K. N. **The anatomy and histology of the digestive organs and Malpighian tubes of the Jassidae (Homoptera).** J Zoo Soc India, v. 7, 1955. p. 41-52.

SHIGUENOBU, S.; WATANABE, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; ISHIKAWA, H. **Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp.** APS. Nature, v. 407, 2000. p. 81-86.

SILVA, C. P.; RIBEIRO, A. F.; GULBENKIAN, S.; TERRA, W. R. **Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells.** J Insect Physiol, v. 41, i. 12, 1995. p. 1093-1103.

SILVA, C. P.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. F. **Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells.** Insect Biochem Mol Biol, v. 26, n. 10, 1996. p. 1001-1018.

SILVA, C. P.; SILVA, J. R.; VASCONCELOS, F. F.; PETRESKI, M. D. A.; DAMATTA, R. A.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance.** Arthropod Struct Dev, v. 33, 2004. p. 139-148.

SPURR, A. R. **A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.** J Ultrastruct Res, v. 26, 1969. p.31-43.

TERRA, W. R. **Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective.** Brazilian J Med Res, v. 21, 1988. p. 675-734.

TERRA, W. R. **Evolution of digestive system of insects.** Annu Rev Entomol, v. 35, 1990. p. 181-200.

TERRA, W. R. **Evolution and function of the insect peritrophic membrane.** Front Braz Res, v. 48, 1996. p. 317-324.

TERRA, W. R. **The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel.** Arch Insect Biochem Physiol, v. 47, 2001. p. 47-61.

TERRA, W. R.; ESPINOZA-FUENTES, F. P.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. **The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion.** J Insect Physiol, v. 25, 1988. p. 487-494.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** Comp Biochem Physiol, v. 109(B), 1994. p.1-62.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E. **Compartmentalization of digestion.** In: Lehane MJ, Billingsley PF. **Biology of the Insect Midgut.** London: Chapman and Hall, 1996a. p.206-235.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B. P.; DILLON, R. J. Digestive enzymes. In: Lehane MJ, Billingsley PF. **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman and Hall, 1996b. p.154-194.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. Proc Natl Acad Sci USA; 76; p. 4350-4. 1976.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Borror and Delong's introduction to the study of insects**. 7th ed. Thomson Brooks/Cole, 2005. p.1-4, 672-673, 737-774.

TSAI, J. H.; PERRIER, J. L. **Morphology of the digestive and reproductive systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae)**. Florida Entomologist, v. 79, n. 4, 1996. p. 563-78.

WATERHOUSE, D. F. **Digestion in insects: review**. Ann Rev Entomol, v. 2, 1957. p. 1-18.

WEISS, L. **Histology**. New York: Elsevier, 1983.

WERNER, K.; MOUTAIROU, K.; WERNER, G. **Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider, *Gerris najas* Deg. (Heteroptera: Gerridae)**. Int J Insect Morphol Embriol, v. 20, 1991. p. 69-77.

WHEELER, W. C.; WHITING, M. F.; WHEELER, Q. D.; CARPENTER, J. M. **The phylogeny of the extant hexapod orders**. Cladistics, v. 17, 2001. p. 113-169.

WIESENBERG, W. D. **Mouth parts and alimentary canal of *Opsius stactogalus* Fieber (Homoptera: Cicadellidae)**. J Kans Entomol Soc, v. 77, n. 2, 2004. p. 152-155.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. 7th ed. London: Chapman and Hall, 1972. p.476-552.

FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do sistema digestivo de *Bucephalogonia xanthophis*.

E – Esôfago; *CF* – Câmara de filtração; *VC* – Domínio cônico do ventrículo; *VT* – Domínio tubular do ventrículo; *VTA* – Domínio tubular anterior; *VTM* – Domínio tubular médio; *VTP* – Domínio tubular posterior; *IP* – Intestino posterior; *R* - Reto; *TMP* – Túbulo de Malpighi proximal; *TMS* – Túbulo de Malpighi secretor; *TMD* – Túbulo de Malpighi distal.

Figura 2 – Imagem anatômica do sistema digestivo de *B. xanthophis*.

A – Visão geral do sistema digestivo de *B. xanthophis*.

B – Detalhe da câmara de filtração (CF) e do domínio cônico do ventrículo (VC). Note a CF como estrutura central do sistema digestivo e o epitélio enrugado do VC.

E – Esôfago; *CF* – Câmara de filtração; *VC* – Domínio cônico do ventrículo; *VT* – Domínio tubular do ventrículo; *IP* – Intestino posterior; *TM* – Túbulos de Malpighi.

Figura 3 – Histologia do intestino anterior (esôfago). O intestino anterior é formado por células achatadas e recobertas por uma camada de quitina (pontas de setas).

Pontas de setas – Camada de quitina.

Figura 4 – Histol6gia da c6mara de filtra76o.

A – C6lulas dos t6bulos de Malpighi s6o achatadas e predominam na c6mara de filtra76o (CF). Sec76es transversais do intestino m6dio ou ventr6culo (IM) tamb6m podem ser visualizadas.

B – Sec76o evidenciando a por76o final do ventr6culo (IMP) saindo da c6mara de filtra76o (CF) e sua transi76o para o intestino posterior (IP) em uma estrutura denominada piloro (P).

CF – C6mara de filtra76o; *IMA* – Intestino m6dio anterior; *IM* – Intestino m6dio; *IMP* – Intestino m6dio posterior; *VC* – Dom6nio c6nico do ventr6culo; *VT* – Dom6nio tubular do ventr6culo; *P* – Piloro; *IP* – Intestino posterior.

Figura 5 – Histologia do ventrículo e intestino posterior.

A – Secção longitudinal do domínio cônico do ventrículo. Note as invaginações do epitélio, responsáveis pelo aspecto enrugado observado na anatomia. Podemos observar células regenerativas (setas) e bactérias no lúmen (L) do intestino.

B – Secção longitudinal do domínio tubular do ventrículo. O epitélio possui características semelhantes ao domínio cônico, mas sem as invaginações epiteliais.

C – Secções longitudinais do intestino posterior (IP) e reto (R). O IP possui uma fina camada de quitina recobrindo as células (pontas de setas).

L – Lúmen; *IP* – Intestino posterior; *R* – Reto; *Setas* – Células regenerativas; *Pontas de setas* - Quitina.

Figura 6 – Morfologia dos tipos celulares das diferentes regiões do sistema digestivo de *B. xanthophis*.

A – Câmara de filtração. Células dos túbulos de Malpighi (acima) e do intestino médio (abaixo);

B – Segmento posterior do domínio tubular do ventrículo. Note a presença de uma célula regenerativa (seta) na base do epitélio;

C – Domínio cônico e segmentos anterior e médio do domínio tubular do ventrículo. Note a presença de uma célula regenerativa (seta) na base do epitélio;

D – Segmento proximal dos Túbulos de Malpighi;

E – Segmento secretor dos Túbulos de Malpighi;

F – Segmento distal dos Túbulos de Malpighi.

Figura 7 – Ultraestrutura da câmara de filtração de *B. xanthophis*.

A – Vista geral da ultraestrutura da câmara de filtração.

B – Célula de túbulo de Malpighi no interior da câmara de filtração, com desenvolvidas invaginações lamelares da membrana plasmática basal (IL) com aberturas para a lâmina basal (setas).

C – Célula do ventrículo do interior da câmara de filtração, com características semelhantes às observadas em “**B**”, mas com invaginações da membrana plasmática basal formando túbulos (IT), exibindo, também, aberturas para a lâmina basal (setas).

Mv – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *G* – complexo de Golgi; *IL* – Invaginações lamelares da membrana plasmática basal; *IT* – Invaginações tubulares da membrana plasmática basal; *Setas* – Aberturas para a lâmina basal.

Figura 8 – Ultraestrutura de regiões de contato entre epitélios da câmara de filtração.

A – Pontos de contato entre as lâminas basais de células de ventrículo e túbulos de Malpighi (pontas de setas).

B – Pontos de contato entre as lâminas basais de células de túbulos de Malpighi (pontas de setas).

IT – Invaginações tubulares da membrana plasmática basal; *IL* – Invaginações lamelares da membrana plasmática basal; *Pontas de setas* – Regiões de contato das lâminas basais.

Figura 9 – Ultraestrutura do núcleo e da junção intercelular das células da câmara de filtração.

A – Secção do núcleo (N), evidenciando o envoltório nuclear e os complexos poro-nucleares (pontas de setas).

B – Junções septadas lisas (seta) observadas como especializações nas membranas plasmáticas laterais.

Mv – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *N* – Núcleo; *Pontas de setas* – Complexos poro-nucleares; *REG* – Retículo endoplasmático granular; *IL* – Invaginações da membrana plasmática basal; *Setas* – Junção septada lisa.

Figura 10 – Ultraestrutura de brocossomos na câmara de filtração.

A – Brocossomos (Br) visualizados no lúmen dos túbulos de Malpighi no interior da câmara de filtração;

B – Detalhe dos brocossomos (Br).

Br – Brocossomos; *B* – Bactéria.

Figura 11 – Ultraestrutura das diferentes regiões dos túbulos de Malpighi livres na hemocela.

A – Domínio apical das células da região proximal dos túbulos de Malpighi, mostrando microvilosidades bem desenvolvidas (Mv). As células da região distal dos túbulos de Malpighi possuem características semelhantes;

B – Domínio basal das mesmas células em “**A**”. Note invaginações da membrana plasmática basal (IMB) associadas à mitocôndrias (Mi) similares às observadas nas células dos túbulos de Malpighi no interior da câmara de filtração.

C – Região secretora dos túbulos de Malpighi. O citoplasma destas células é repleto de vacúolos (V) contendo brocossomos;

D – Detalhe dos brocossomos.

L – Lúmen; *Mv* – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *IMB* – Invaginações da membrana plasmática basal; *N* – Núcleo; *V* – Vacúolos.

Figura 12 – Ultraestrutura das células do domínio cônico do ventrículo e regiões anterior e média do domínio tubular do ventrículo.

A – Região apical de um enterócito típico do intestino médio. Microvilosidades (Mv) abundantes, com muitas mitocôndrias em suas bases (Mi). Podemos observar regiões com retículo endoplasmático granular (REG) e diversas bactérias inclusas em vacúolos (B).

B – Retículo endoplasmático granular (REG) e complexo de Golgi (G) podem ser observados ao redor do núcleo (N).

C – Vesículas de secreção (VS) são observadas próximas à base das microvilosidades (Mv).

D – Região próxima à base do enterócito, exibindo desenvolvidas invaginações da membrana basal (IMB) associada a mitocôndrias (Mi), alguns complexos de Golgi (G) e bactérias no interior de vacúolos (B). Note que algumas bactérias aparentam estar sendo digeridas (*).

E – Detalhe da luz do ventrículo com membranas luminais em forma de chama (MLC) associadas às microvilosidades (Mv), formando regiões de alta ou baixa eletrondensidade.

Mv – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *REG* – Retículo endoplasmático granular; *B* – Bactéria; *G* – Complexo de Golgi; *VS* – Vesícula de secreção; *IMB* – Invaginações da membrana plasmática basal; *MLC* – Membranas luminais em forma de chama; * - Bactérias sendo digeridas.

Figura 13 – Ultraestrutura das junções intercelulares e invaginações da membrana plasmática basal dos enterócitos.

A – Domínio basal dos enterócitos, evidenciando invaginações da membrana plasmática basal (IMB) bem desenvolvidas e associadas à mitocôndrias (Mi), com diversas aberturas para a lâmina basal.

B –Especializações da membrana plasmática lateral dos enterócitos na forma de junções septadas lisas (seta).

Mv – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *IMB* – Invaginações da membrana plasmática basal; *M* – Célula muscular; *Seta* – Junção septada lisa.

Figura 14 – Membranas luminais em forma de chama associadas às microvilosidades dos enterócitos.

A – Vista geral, evidenciando as membranas luminais em forma de chama (MLC) associada ao ápice das microvilosidades (Mv), formando compartimentos fechados;

B – Secções transversais do MLC. O sistema de membranas avança em direção ao lúmen do ventrículo;

C – Detalhe do ápice das microvilosidades (Mv), mostrando a associação das MLC com a extremidade das microvilosidades;

D – Idem a “**C**”.

MLC – Membranas luminais em forma de chama; *Mv* – Microvilosidades; *Setas* – Associação do MLC com o ápice das Mv.

Figura 15 – Origem das membranas luminais em forma de chama.

A – Micrografia eletrônica exibindo inúmeras pequenas vesículas próximas ao ápice das microvilosidades (Mv), no lúmen do ventrículo;

B – As vesículas se associam entre si, formando membranas que se projetam ao lúmen ventricular (setas largas);

C – Vesículas brotando (setas finas) a partir das microvilosidades (Mv);

D – Detalhes das vesículas;

E – Detalhe de duas vesículas entre as microvilosidades (Mv) unidas por membrana (ponta de seta).

Mv – Microvilosidades; *Setas largas* – Membranas fundidas; *Setas finas* – Vesículas brotando a partir do ápice das microvilosidades; *Ponta de seta* – Membrana unindo duas vesículas.

Figura 16 – Origem das membranas luminais em forma de chama.

A – Vista geral das membranas luminais em forma de chama (MLC) associadas às microvilosidades (Mv);

B – Detalhe do ápice das microvilosidades (Mv), evidenciando vesículas que brotam a partir das extremidades das Mv;

C – Micrografia eletrônica mostrando as membranas luminais em forma de chama conectando microvilosidades (Mv) e vesículas.

MLC – Membranas luminais em forma de chama; *Mv* – Microvilosidades.

Figura 17 – Imagens ultraestruturais mostrando a utilização do lantânio como traçador.

A – Note a deposição do lantânio (setas) somente do lado externo das membranas luminais em forma de chama (MLC);

B – Idem a “**A**”;

C – O lantânio apenas se precipita externamente às membranas luminais em forma de chama (MLC) (setas), sugerindo que as MLC formam compartimentos fechados;

D – Note que as membranas luminais em forma de chama são compostas por diversos compartimentos menores.

MLC – Membranas luminais em forma de chama; *Mv* – Microvilosidades; *Setas* – Deposição do lantânio.

Figura 18 – Ultraestrutura da região posterior do domínio tubular do ventrículo.

A – Detalhe do lúmen do tubo digestivo nesta região. Não há a ocorrência das membranas luminais em forma de chama e vesículas associadas, observadas nas demais regiões do ventrículo;

B – Detalhe do citoplasma das células do ventrículo tubular posterior. Mitocôndrias (Mi) ocorrem em grande quantidade na base das microvilosidades (Mv). Podemos observar gotículas lipídicas (L) e regiões expandidas do retículo endoplasmático granular com conteúdo bastante eletrondenso (REG).

Mv – Microvilosidades; *Mi* – Mitocôndrias; *REG* – Retículo endoplasmático granular; *L* – Gotícula lipídica; *G* – Complexo de Golgi.

Figura 19 – Imagens de micrografia eletrônica de varredura das membranas luminais em forma de chama.

A – Micrografia exibindo um sistema de membranas associadas às extremidades das microvilosidades (Mv);

B – Note que as membranas associadas às microvilosidades (Mv) formam projeções morfologicamente similares às observadas pela microscopia eletrônica de transmissão (seta);

C – Detalhe destas projeções, evidenciando vesículas associadas (seta).

Mv – Microvilosidades; *Setas* – projeções da membrana luminal associada às microvilosidades.