Emiliano Carneiro Monteiro

O sistema digestivo do “bicho-pau”
***Phibalosoma phyllinum* (Phasmida,**
Phasmatidae): uma análise morfológica,
fisiológica e bioquímica

The digestive system of the “stick bug”
***Phibalosoma phyllinum* (Phasmida,**
Phasmatidae): a morphological, physiological
and biochemical analysis

São Paulo

2012

Emiliano Carneiro Monteiro

O sistema digestivo do “bicho-pau”

***Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae):
uma análise morfológica, fisiológica e bioquímica**

The digestive system of the “stick bug”

***Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae): a
morphological, physiological and biochemical
analysis**

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Augusto
Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro

São Paulo

2012

Monteiro, Emiliano Carneiro

O sistema digestivo do “bicho-pau” *Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae): uma análise morfológica, fisiológica e bioquímica

166f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de genética e biologia evolutiva.

1. Digestão em insetos 2. Morfologia do sistema digestivo 3. Phasmida

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociência. Departamento de genética e biologia evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof (a.). Dr(a).

Prof (a.). Dr(a).

Prof (a.). Dr(a).

Prof (a.). Dr(a).

Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro
(Orientador)

Esta tese é dedicada :

Aos meus pais, Zé e Vera, por tudo que me ensinaram e por tudo que me deram.

À Lua "*dihn*" (*in memorian*), que também é família.

À Karoll, por me fazer acreditar nas coisas, inclusive em mim mesmo.

À Deus

Agradecimentos

Ao Orientador e amigo Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, pela atenciosa orientação desde o início da minha vida acadêmica, pelos sábios conselhos, por acreditar e ajudar a desenvolver meu potencial, apesar das 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 por seus conselhos.

Ao Prof. Dr. Evoneo Berti Filho, do departamento de Entomologia da ESALQ/USP, por gentilmente fornecer os primeiros exemplares do “bicho-pau” *Phibalosoma phyllinum*, objeto deste estudo, e pelas instruções de como manter a criação destes animais no laboratório.

Aos técnicos e amigos Marcio Valentin Cruz e Waldir Caldeira pelo treinamento metodológico, pelos ótimos conselhos, disposição e pelo companheirismo ao longo de todos esses anos.

Ao amigo Dr. Fábio Kendi Tamaki (Pererê) do Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP). Pelo treinamento em métodos bioquímicos, pela paciência e disposição bem humorada.

Aos companheiros de laboratório Alexandre (Mamão), Fernanda, Felipe e Camila por todo o conhecimento compartilhado e pela convivência ao longo de todos estes anos.

Às secretárias do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP Deisy Santos de Moraes e Helenice Emiko Higo Hirata, e também à Erika Harumi Takamoto da secretaria de pós-graduação do IB-USP, pela paciência e pelo auxílio com os trâmites burocráticos da vida acadêmica.

Aos amigos da faculdade, e aos amigos “da ogradá” pelos momentos memoráveis e por todo o incentivo.

Ao pessoal do “Coletivo por uma espiritualidade libertária”, ao Nilbberth, ao Régener, ao Alberto Malta e sua família, e a todos aqueles que – uma hora ou outra – foram Igreja junto comigo.

Ao “Naka” e ao Jorge pelo companheirismo.

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

Introdução	07
O sistema digestivo dos insetos	08
A membrana peritrófica	09
A digestão em insetos	11
Estudos da digestão em insetos	12
Os Phasmida	13
Os túbulos de Malpighi	15
Objetivos	16
Material e Metodos	18
1) Manipulação dos insetos	19
2) Análise anatômica e histológica	19
2.1) Fixação	19
2.2) Desidratação e inclusão	20
2.3) Microtomia e coloração	20
3) Microscopia confocal: visualização da membrana peritrófica	20
3.1) Fixação	21
3.2) Desidratação e inclusão	21
3.3) Microtomia	21
3.4) Microscopia de fluorescência	22
4) Experimentos com corante	22
4.1) Tempo de tráfego	23
4.2) Experimentos com ingestão e injeção de corante	23
5) Microscopia eletrônica de transmissão	24
5.1) Fixação e pós-fixação	24
5.2) Contrastação em bloco	25
5.3) Desidratação	25
5.4) Inclusão	25
5.5) Ultramicrotomia	26
5.6) Contrastação e análise das preparações	26
6) Microscopia eletrônica de varredura	26
7) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas com a utilização de anticorpos heterólogos	27

7.1) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	27
7.2) “Western blot” e imunoensaio.....	28
7.3) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas.....	29
8) Métodos bioquímicos.....	31
8.1) Ensaio enzimáticos e determinação da concentração de proteínas.....	31
8.1.1) Preparação das amostras.....	31
8.1.2) Ensaio enzimáticos de enzimas digestivas.....	31
8.1.3) Determinação de proteínas.....	33
8.1.4) Ensaio enzimáticos de ATPase e anidrase carbônica.....	33
8.2) Medidas de pH luminal.....	34
8.3) Efeito do pH sobre a atividade de tripsina e amilase.....	34
Resultados.....	36
1) Descrição anatômica do sistema digestivo de <i>P. phyllinum</i>	37
2) Descrição histológica do sistema digestivo de <i>P. phyllinum</i>	38
3) Descrição anatômica e histológica dos túbulos de Malpighi de <i>P. phyllinum</i>	40
4) Microscopia confocal: comprovação da presença de uma Membrana peritrófica.....	41
5) Experimentos com corante.....	41
5.1) Tempo de tráfego.....	41
5.2) Experimentos com ingestão e injeção de corantes.....	41
6) Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
6.1) Descrição ultraestrutural das regiões do ventrículo de <i>P. phyllinum</i>	43
6.2) Descrição ultraestrutural dos apêndices ventriculares.....	47
6.2.1) Região de transição entre o ventrículo e as protuberâncias Ventriculares.....	47
6.2.2) Protuberâncias ventriculares.....	47
6.2.3) Canalículos.....	48
6.3) Descrição ultraestrutural dos túbulos de Malpighi de <i>P. phyllinum</i>	48
7) Microscopia eletrônica de varredura.....	49
8) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas com a utilização de anticorpos heterólogos.....	50
8.1) “Western blot” e imunoensaio.....	50
8.2) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas.....	51
9) Ensaio enzimáticos.....	52
9.1) Distribuição das enzimas digestivas.....	52

9.2) Distribuição de ATPase e anidrase carbônica.....	53
10) Medidas de pH luminal.....	53
11) Efeito do pH sobre a atividade de tripsina e amilase.....	54
Discussão	55
Anatomia e histologia do sistema digestivo em <i>P. phyllinum</i>	56
Anatomia.....	56
Histologia.....	57
Membrana peritrófica e fluxos de água no ventrículo de <i>P. phyllinum</i>	60
Análise ultraestrutural do ventrículo de <i>P. phyllinum</i>	68
Aspectos gerais da ultraestrutura das células ventriculares.....	68
A organização das invaginações da membrana plasmática basal nos enterócitos.....	71
Mecanismos de secreção existentes nos enterócitos.....	75
Imunolocalização ultraestrutural de amilase e tripsina.....	78
Os túbulos de Malpighi e os apêndices ventriculares	79
Aspectos funcionais dos túbulos de Malpighi.....	80
Análise morfológica dos túbulos de Malpighi.....	81
Análise morfológica comparativa entre os túbulos de Malpighi e os apêndices ventriculares.....	82
Aspectos bioquímicos	84
Ensaio de atividade enzimática.....	84
Compartimentalização da digestão e reciclagem de enzimas digestivas.....	86
Medidas de pH luminal e efeito do pH sobre tripsina e amilase.....	87
O papel fisiológico do sistema de apêndices ventriculares.....	90
Conclusão	92
Resumo	93
Abstract	98
Referências bibliográficas	103
Figuras	116

Introdução

Os insetos são o grupo de animais predominante na Terra e estão presentes em quase todos os ambientes. Acredita-se que o número total de espécies de insetos possa chegar a 30 milhões (Triplehorn & Johnson, 2005). Desde a sua origem, no período Devoniano, há 400 milhões de anos, os insetos conseguiram colonizar de maneira muito eficiente os mais diversos habitats (Grimaldi & Engel, 2005).

Atualmente os insetos representam 75% das espécies animais e 57% das espécies vivas, incluindo plantas e protozoários (Grimaldi & Engel, 2005). Sendo assim, a adaptação de tantas espécies a diferentes ambientes acarretou em uma enorme diversidade de hábitos e dietas e no surgimento de uma grande variedade de adaptações morfológicas, de acordo com as necessidades ecológicas e fisiológicas específicas de cada região habitada (Smith, 1968; Ross *et al.*, 1982; Gillot, 1995). As estimativas são de que 10% da biomassa vegetal é consumida, por ano, pelos insetos e, mesmo com o uso de inseticidas, as perdas agrícolas causadas por estes animais nos Estados Unidos chegam a 13% (Schoonhoven *et al.*, 2005). Desta forma, quase todo material orgânico que se encontra hoje na natureza pode ser utilizado como alimento pelos insetos, o que cria uma vasta opção de dietas (Wigglesworth, 1972; Hagen *et al.* 1984). Assim, a grande variedade alimentar fez com que o sistema digestivo, que constitui uma importante interface entre os insetos e o ambiente, desenvolvesse uma imensa diversidade morfológica e funcional, adequando-se a uma melhor digestão e assimilação dos diferentes tipos de alimento ingeridos.

O sistema digestivo dos insetos

Anatomicamente, o sistema digestivo dos insetos pode ser dividido em três regiões principais: o intestino anterior ou estomodeo, o intestino médio ou mesêntereo, e o intestino posterior ou proctodeu (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1985; Terra 1990). O intestino anterior, de origem ectodérmica, é revestido por cutícula e, em alguns insetos, é reduzido, limitando-se a um tubo estreito. Ele inicia-se na boca e inclui a cavidade bucal, a faringe, o esôfago, o papo e o proventrículo (estes dois últimos ausentes em algumas espécies). O papo é um órgão de estocagem

em muitos insetos e também funciona como um local para digestão em outros (Terra, 1990). O proventrículo é um órgão triturador em certas espécies e, na grande maioria, forma uma válvula, controlando a passagem do alimento para o intestino médio. O intestino médio, de origem endodérmica, é o sítio principal do sistema digestivo, onde ocorrem os eventos centrais da digestão e absorção de nutrientes. Ele inclui um tubo simples, denominado ventrículo, do qual podem se originar sacos em fundo cego, chamados cecos gástricos. Pode ser observada, também, no intestino médio dos membros da maioria das ordens de insetos, a ocorrência de uma membrana acelular revestindo o epitélio ventricular, denominada de membrana peritrófica.

Na região do esfíncter (piloro), que separa o intestino médio do intestino posterior, inserem-se os túbulos de Malpighi, que são órgãos pertencentes ao sistema excretor. O intestino posterior também é de origem ectodérmica e revestido por cutícula. Inclui o íleo, o cólon e o reto, este último envolvido na absorção de água e íons, terminando no ânus.

A membrana peritrófica

Como mencionado acima, a maioria dos insetos apresenta, no lúmen do intestino médio, envolvendo o conteúdo alimentar e revestindo o epitélio ventricular, uma membrana acelular denominada membrana peritrófica. Ela está ausente apenas em Hemiptera e Thysanoptera (Lehane, 1997). Trata-se de uma membrana cilíndrica constituída por uma rede de quitina imersa numa matriz de proteína-carboidrato, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico (no interior da membrana) e o espaço ectoperitrófico (entre a membrana e o epitélio ventricular) (Waterhouse, 1957; Terra & Ferreira, 1994; Terra 1996; Lehane, 1997; Tellam & Eisemann, 2000; Bolognesi *et al.*, 2001; Terra 2001; Hegedus *et al.*, 2009). Sua ocorrência acarreta numa compartimentalização nos eventos digestivos nos insetos, exercendo um papel vital nos processos fisiológicos que ocorrem durante a digestão (ver revisão em: Terra, 2001).

A membrana peritrófica é normalmente classificada em dois tipos diferentes, que variam entre as espécies dos principais táxons (Peters, 1992; Terra, 2001). A membrana peritrófica do tipo I é a mais comum e pode ser encontrada em todos os Polineoptera e na maioria dos Holometabola. Este tipo de membrana pode ser observada em baratas (Dyctioptera), grilos e gafanhotos (Orthoptera), besouros (Coleoptera), abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), mariposas e borboletas (Lepidoptera) e em mosquitos hematófagos adultos (Diptera). A membrana peritrófica do tipo I é produzida por todo o epitélio do intestino médio ou por apenas uma parte dele (que pode ser tanto a região anterior quanto a posterior) e envolve o bolo alimentar ao longo de toda a extensão do ventrículo (Terra, 2001). A membrana peritrófica do tipo II ocorre em larvas e adultos de moscas e mosquitos não-hematófagos (Diptera) e em alguns Lepidoptera adultos. Nestes casos, a membrana é secretada por algumas fileiras de células na entrada do intestino médio (uma região chamada cárdia), sendo normalmente observada independentemente da ingestão de alimentos, o que nem sempre ocorre na membrana do tipo I (Terra, 2001).

As primeiras observações sobre as funções da membrana peritrófica a relacionavam com a proteção do epitélio contra a ação de microorganismos, com a proteção contra abrasão das células pela passagem do alimento durante a digestão, com a permeabilidade diferencial às enzimas digestivas e aos produtos da digestão e com a conservação dessas enzimas (Terra, 1988). No entanto, alguns estudos mais detalhados sobre a permeabilidade da membrana peritrófica e sobre a compartimentalização dos eventos digestivos indicam que esta estrutura exerce outras funções importantes no evento da digestão. Entre elas, encontra-se a prevenção da ligação não específica de material não digerido na superfície das células do ventrículo, a prevenção da excreção das enzimas digestivas junto com o bolo alimentar e a produção de monômeros nas proximidades da superfície celular (Terra, 2001).

A digestão em insetos

Os principais eventos do processo digestivo podem ser subdivididos em três fases distintas: a digestão inicial, a intermediária e a final (Ribeiro *et al.*, 1990; Terra, 1990). A fase inicial da digestão consiste na dispersão e na diminuição do peso molecular das partículas de alimento, através da ação de hidrolases poliméricas. A digestão intermediária envolve a quebra, por ação de hidrolases oligoméricas, de oligômeros em dímeros e/ou oligômeros menores. Estes são reduzidos, durante a digestão final, a monômeros por hidrolases diméricas (ver revisão em: Terra, 1988).

A primeira tentativa de relacionar os compartimentos do intestino médio com cada uma das fases da digestão foi feita em larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera, Nematocera) (Ferreira *et al.*, 1981). Esta larva possui um intestino médio constituído por um ventrículo e por dois cecos gástricos, localizados anteriormente. Determinações enzimáticas feitas em células do intestino médio e nos espaços endo e ectoperitróficos da larva levaram à proposição de que a digestão inicial deva ocorrer no espaço endoperitrófico, enquanto que a digestão intermediária e a final devam ocorrer, respectivamente, no espaço ectoperitrófico e nas células dos cecos gástricos.

Análises morfobioquímicas permitiram aos autores concluir que as células da maior parte do ventrículo de *R. americana* secretam água, enquanto que as dos cecos, absorvem. Isso gera uma corrente de água no espaço ectoperitrófico no sentido postero-anterior. Assim, o alimento chega ao intestino médio, via espaço endoperitrófico, e é hidrolisado por enzimas digestivas enquanto é levado em direção à região posterior. Uma vez que a redução de seu peso molecular assim o permita, o alimento passa através da membrana peritrófica, entrando no espaço ectoperitrófico. Ao ser levado de volta à região anterior pelo fluxo de contracorrente de água, este alimento passa pela digestão intermediária e final, sendo absorvido pelas células do epitélio que revestem os cecos. As enzimas, liberadas durante a absorção, voltam para o espaço endoperitrófico, iniciando um novo ciclo digestivo. Isto proporciona uma economia notável de enzimas, já que as mesmas podem ser reutilizadas várias vezes.

A ocorrência deste modelo de circulação endo-ectoperitrofica de enzimas digestivas foi confirmada em diversos insetos de outras ordens e com diferentes hábitos alimentares, incluindo aqueles que não possuem cecos gástricos. Nestes animais, o epitélio da região anterior do intestino médio responde pela absorção de água e digestão final do alimento (ver revisões em: Terra, 1988; Ribeiro *et al.*, 1990; Terra, 1990).

Estudos da digestão em insetos

Na busca por relações entre forma e função, muitos autores têm tentado associar a morfologia do sistema digestivo dos insetos com o tipo de dieta ingerida. Um dos trabalhos mais bem sucedidos desta linha de raciocínio (Dow, 1986) sugere que os insetos devam ser classificados baseando-se em suas preferências alimentares, com suas dietas separadas de acordo com a consistência física do alimento (se sólidas ou líquidas) e composição nutricional (se de origem animal ou vegetal).

Apesar deste tipo de abordagem fornecer informações importantes sobre a fisiologia da digestão nos insetos, ainda permanecem muitos pontos a serem esclarecidos (Terra 1988; Ribeiro *et al.*, 1990). Baseando-se nessas informações, não se pode explicar, por exemplo, a presença de semelhanças óbvias na morfologia do sistema digestivo de insetos com diferentes dietas. Tampouco podem-se esclarecer as diferenças morfológicas entre os sistemas digestivos de insetos de grupos divergentes que, no entanto, possuem fontes de alimento semelhantes. Estas dúvidas sugerem que os estudos na busca de relações entre forma e função no sistema digestivo dos insetos devam incluir, além de considerações sobre os tipos de dietas ingeridas, dados sobre as relações filogenéticas entre os organismos (Ribeiro *et al.*, 1990).

Os Phasmida

Dentro deste contexto, foi proposto um estudo morfofisiológico detalhado do sistema digestivo de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae), popularmente conhecido como “bicho-pau”, tendo, como principal motivação, a quase total ausência de informação sobre a organização de seu processo digestivo. Esta espécie pertence à ordem Phasmida, que, juntamente com os Orthoptera, compõem o grupo dos Orthopteroidea. Sendo assim, uma análise detalhada do sistema digestivo de um membro da ordem Phasmida torna-se ainda mais atraente no sentido de melhor conhecer como se organiza o fenômeno de digestão dentro dos Orthopteroidea. Embora pouco se conheça à respeito da digestão em Phasmida, já existem informações detalhadas de espécies de Orthoptera (Dow, 1981; Ferreira *et al.* 1990; Marana *et al.* 1997; Woodring & Lorenz, 2007; Biagio *et al.*, 2009), possibilitando uma comparação consistente entre esses dois grupos de insetos.

Tendo sido primeiramente classificados como Coleoptera por Linnaeus (1758), os “bichos-pau” foram, por muito tempo, tratados como uma família dentro dos Orthoptera (Tilgner, 2002). Hoje, eles estão reunidos em uma ordem própria, mas sob uma variedade de nomes. Além de Phasmida (mais empregado), eles são conhecidos por: Cheleutoptera, Phasmodea, Phasmatodea, Phasmoptera, Phasmatoptera (Key, 1970). Pertencem à super classe Hexapoda, classe Insecta, infra-classe Pterigota, divisão Neoptera (Grimaldi & Engel, 2005).

Existem mais de 3000 espécies descritas dentro dos Phasmida (Triplehorn & Johnson, 2005). No entanto, este número não é muito representativo, visto que ocorre uma grande sinonímia neste grupo e muitas espécies novas ainda não foram formalmente descritas (Tilgner, 2002).

Os Phasmida são insetos de hábito noturno e fitófagos. Algumas espécies possuem tamanho muito grande, podendo atingir mais de 30cm de comprimento. Eles são encontrados em quase todos os ecossistemas temperados e tropicais (Gunther, 1953; Bedford, 1978), sendo que, nestes últimos, existe uma maior diversidade de espécies (Brock, 1999). Muitos “bichos-pau”, como o próprio nome popular indica, possuem uma semelhança considerável com galhos ou folhas. Utilizando-se desse artifício, os Phasmida geralmente vivem sobre as plantas com as

quais se confundem, em um método de defesa contra predadores (Key, 1970). Habitualmente, ficam horas a fio completamente imóveis (Lima, 1938).

A maioria dos Phasmida são insetos com baixa densidade populacional. Não se conhece, no entanto, o que determina este fenômeno (Key, 1970). Além disso, muitas espécies possuem acentuado dimorfismo sexual, sendo que os machos, na maioria dos casos, são menores e mais graciosos que as fêmeas e podem delas diferir em diversas características morfológicas. A reprodução desses animais é tipicamente sexuada, mas a partenogênese pode ocorrer em diversas espécies (Bedford, 1978). Os ovos desses animais são frequentemente ovais ou em forma de barril, assemelhando-se, em muitos casos, a sementes de plantas (Bernardi, 2001). Além disso, a cápsula dos ovos possui, geralmente, uma “tampa”, denominada opérculo e, ainda, uma depressão lateral chamada de micrópila (Sellick, 1997).

A cabeça desses animais é tipicamente prognata, apresentando peças bucais mastigadoras. Seu formato é variável, indo de retangular a oval. Os olhos são pequenos e situados antero-lateralmente. Ocelos estão presentes apenas em algumas espécies, normalmente em número de três. Os Phasmida possuem todas as pernas gressórias, usualmente longas e finas. Suas asas, quando presentes, são, em geral, completamente desenvolvidas e funcionais nos machos, mas reduzidas ou ausentes nas fêmeas. Asas anteriores apresentam-se espessadas e opacas (tégminas) e quase sempre são curtas, cobrindo apenas a base das asas posteriores membranosas quando em repouso. Órgãos auditivos especializados estão ausentes. Apresentam metamorfose incompleta e as ninfas são terrestres (Key, 1970).

O objeto do presente estudo é uma espécie da família Phasmatidae, subfamília Phibalosominae, gênero *Phybalosoma*, espécie *Phybalosoma phyllinum*. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil, com fêmeas que podem atingir até 220 mm de comprimento e são ápteras. Os machos são menores, atingindo 150 mm de comprimento e, ao contrário das fêmeas, são alados (Lima, 1938). Além disso, eles possuem as antenas proporcionalmente maiores.

Assim, os Phasmida constituem um grupo de insetos com peculiaridades muito interessantes, não só com relação à sua morfologia externa singular, muito conhecida pela sua engenhosa camuflagem que os protege de predadores, como

também pelo quase total desconhecimento de muitos aspectos de sua morfofisiologia interna, que inclui o sistema digestivo, explorado neste trabalho.

Os túbulos de Malpighi

Apesar de não fazerem parte funcional do sistema digestivo, o presente estudo se estendeu também aos túbulos de Malpighi de *P. phyllinum*. Estes órgãos abrem-se diretamente no tubo digestivo e compõem, juntamente com as papilas retais do intestino posterior, o sistema excretor dos insetos (Nation, 2008). Tal análise foi motivada pelo fato de que em *P. phyllinum*, além do conjunto de túbulos de Malpighi que se inserem no piloro, foram observadas estruturas muito semelhantes se abrindo diretamente no ventrículo. Estas estruturas, aqui denominadas de canalículos, só foram descritas em espécies da ordem Phasmida e não têm função conhecida. Assim, um estudo comparativo entre os túbulos de Malpighi e os canalículos torna-se atraente e altamente significativo.

Os túbulos de Malpighi são tubos longos e finos que se protraem do intestino dos insetos, numa região próxima à junção entre o ventrículo e o intestino posterior (piloro). Eles encontram-se livres na cavidade corporal e terminam em fundo cego. Tais estruturas variam de tamanho nas diferentes espécies, indo desde 2 mm até 100 mm de comprimento e de 10 μm a 30 μm de diâmetro. Estão presentes na maioria dos grupos de insetos, variando em número, indo desde 2 em alguns coleóptera até mais de 250 em algumas espécies de gafanhotos (Chapman, 1998).

Os túbulos de Malpighi possuem um papel chave na osmoregulação em insetos (Dow & Davies, 2006; Nation, 2008). Eles são responsáveis pela filtração da hemolinfa, produzindo a urina primária, que contém sais inorgânicos e moléculas encontradas na hemolinfa (como açúcares, aminoácidos, íons e outros compostos). A urina primária é modificada no reto, através da reabsorção seletiva de seus componentes, embora esta possa ser realizada, também, no íleo ou nos próprios túbulos de Malpighi (Chapman, 1998; Nation, 2008).

Objetivos

Levando-se em conta a carência de dados, na literatura, sobre a morfologia funcional do sistema digestivo entre os membros da ordem Phasmida, o presente trabalho visa fornecer informações que possam ser utilizadas na melhoria do conhecimento acerca deste grupo, particularmente com relação à morfofisiologia digestiva e sua inserção no panorama evolutivo dos insetos. Assim, os objetivos propostos neste trabalho são:

1. Realizar uma análise detalhada da organização morfofuncional do sistema digestivo de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae) do ponto de vista anatômico, histológico e ultraestrutural e identificar os principais tipos celulares presentes ao longo do tubo digestivo, com ênfase nos mecanismos de secreção existentes; comprovar a ocorrência de uma membrana peritrófica;
2. Com a utilização de ingestão e injeção de corantes na hemolinfa, detectar os possíveis sítios de absorção e secreção de água ao longo do epitélio ventricular, a fim de detectar e caracterizar o fenômeno de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas nesta espécie.
3. Caracterizar as principais enzimas digestivas que atuam no processo digestivo deste inseto, assim como sua distribuição ao longo do intestino, levando à proposição de um modelo de digestão para esta espécie.
4. Detectar a possível existência de homologia entre as enzimas presentes no tubo digestivo de *P. phyllinum* e os anticorpos disponíveis no laboratório, possibilitando a imunolocalização destas enzimas e, eventualmente, a caracterização de seu mecanismo de secreção.
5. Com base nas informações obtidas neste estudo, complementar os trabalhos já realizados em nosso laboratório, com o sistema digestivo de outras espécies de insetos, contribuindo, assim, para a elucidação de aspectos funcionais e filogenéticos desses organismos.

Material e Métodos

1) Manipulação dos insetos

Em todos os experimentos, foram utilizados animais da espécie *Phibalosoma phyllinum* (Gray, 1835) (Phasmida, Phasmatidae), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Evoneo Berti Filho do Laboratório de Entomologia Florestal da ESALQ/USP de Piracicaba (SP). Estes animais estão sendo mantidos e criados em nosso próprio laboratório em caixas de papelão, contendo folhas de goiabeira (*Psidium sp.*) como alimento. Para todos os experimentos, foram utilizadas fêmeas adultas com tamanhos em torno de 20 cm (Figura 1).

Para o estudo do sistema digestivo, os animais foram anestesiados em gelo e dissecados ao microscópio estereoscópico, com o auxílio de pinças de ponta fina e tesoura oftalmológica.

2) Análise anatômica e histológica

2.1) Fixação

Após a dissecação e isolamento das peças anatômicas do sistema digestivo, elas foram fixadas e processadas segundo técnicas de rotina utilizadas no laboratório e descritas a seguir.

Para estudos histológicos, foi utilizado o fixador de Bouin (Beçak & Paulete, 1976), contendo três partes de ácido pícrico, uma parte de formol a 37% e 5% de ácido acético. Foi, também, utilizada uma solução fixadora de paraformaldeído 4% (Junqueira *et al.*, 1989), com intuito de facilitar a análise anatômica, visto que este fixador mantém a coloração natural dos tecidos. Este fixador foi preparado com a dissolução de 4 g de paraformaldeído em PBS (“Phosphate Buffer Saline”), 0,1 M. Este tampão foi feito com 8,79 g de NaCl, 0,27 g de KH_2PO_4 e 1,14 g de Na_2HPO_4 em um litro de água destilada.

Depois de dissecado, o sistema digestivo dos animais foi mantido no fixador “overnight” a uma temperatura de 4 °C.

2.2) Desidratação e inclusão

Após a fixação, o material foi submetido a banhos sucessivos de 30 minutos de etanol a 70%, a 90%, e a 100%. A seguir, foi imerso, durante duas horas, em uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina sem adição do ativador. A historesina utilizada foi a da marca Leica (hidroxietilmetacrilato). Sua preparação e utilização foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as peças foram colocadas em historesina pura, em dois banhos de uma hora, seguido pela adição do ativador e a emblocagem do material. Os blocos foram, então, colocados em uma estufa a 40 °C, “overnight”, para polimerização da resina.

2.3) Microtomia e coloração

Após inclusão, o material foi cortado, numa espessura de 5 µm, em um micrótomo Leica RM 2145, sendo que os cortes foram colocados em lâminas histológicas. Em seguida, as preparações permaneceram em estufa a 37 °C, por duas horas, para secagem. Após a secagem, o material foi corado com hematoxilina de Delafield durante 10 minutos, e, após lavagem com água, com eosina amarela durante 45 segundos, ambas em banho-maria a 40 °C. A montagem final das lâminas foi realizada com o uso de Entellan (Merck).

Para o registro fotográfico das peças anatômicas e das preparações histológicas, foi utilizada uma câmera digital Sony DSC-S75 Cyber-Shot, acoplada a um microscópio estereoscópico Zeiss, modelo Stemi 200-C, ou a fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop.

3) Microscopia confocal: visualização da membrana peritrófica

Para a realização de experimentos para visualização da membrana peritrófica, foi utilizada apenas a região correspondente ao intestino médio de *P. phyllinum*.

3.1) Fixação

Para confirmar a presença de membrana peritrófica no intestino médio de *P. phyllinum*, o material foi fixado com o fixador de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967). Este foi preparado adicionando-se 8,5 ml de uma solução composta por tampão fosfato de Sorensen 0,1 M e paraformaldeído a 2% a 1,5 ml de uma solução aquosa saturada de ácido pícrico. O tampão foi inicialmente preparado na concentração de 0,2 M e pH 7,4 a partir de uma mistura da solução (A) (1,56 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 50 ml de água destilada) com a solução (B) (1,42 g de Na_2HPO_4 em 50 ml de água destilada). Para a obtenção do pH 7,4, foram misturados 9,5 ml da solução A com 40,5 ml da solução B. O paraformaldeído foi preparado a uma concentração de 4% em água destilada e foi misturado em volumes iguais com o tampão fosfato de Sorensen a 0,2 M, originando a solução a 0,1 M e paraformaldeído a 2%.

O material foi mantido no fixador “overnight” a uma temperatura de 4 °C.

3.2) Desidratação e inclusão

Depois de fixado, o material foi desidratado em uma série de concentração crescente de álcool etílico. Concluído o processo de desidratação, as peças foram colocadas em uma solução composta de volumes iguais de álcool etílico e xilol por 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi substituída por xilol, permanecendo assim por uma hora. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente. As peças foram, então, emblocadas em parafina.

3.3) Microtomia

Os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo Reichert-Jung modelo 820-II, com uma navalha de aço inoxidável. Os cortes foram obtidos a uma espessura de 8 μm . Estes foram colocados gentilmente sobre a superfície de uma solução de gelatina histológica mantida a 45 °C, procedimento este que teve a finalidade de distender e facilitar a adesão dos cortes às lâminas histológicas.

Os cortes, depois de recolhidos nas lâminas, foram colocados para secar em uma estufa a 37 °C, “overnight”.

3.4) Microscopia de fluorescência

As lâminas com os cortes de parafina foram submetidas a dois banhos em xilol para retirada da parafina. A hidratação foi realizada utilizando soluções com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95% e 70%), em banhos de 5 minutos cada, seguidos por um banho com água. A seguir, as preparações foram colocadas em contato com tampão PBS e, em seguida, com uma solução 0,2% de Triton X-100 em PBS. Depois, foram transferidas para uma câmara úmida e recobertas com uma solução de conjugado WGA-FITC (“wheat germ agglutinin-fluorescein isothiocyanate”) e N-acetilglicosamina a 0,2 M, em tampão PBS. Permaneceram nessa solução por um período de 18 horas, ao abrigo da luz e à temperatura de 4 °C. Segundo Peters & Latka (1986), na presença de excesso de N-acetilglicosamina livre na solução reativa, a ligação do WGA à quitina, presente na membrana peritrófica, é específica.

Após o período de incubação, as lâminas passaram por três banhos em PBS, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente e foram montadas para observação ao microscópio, utilizando-se o VectaShield (Vector, USA), que retarda a perda de fluorescência das preparações. Estas foram, então, finalmente observadas ao microscópio confocal Zeiss, modelo LSM-410.

4) Experimentos com corante

Para determinar o tempo de tráfego do alimento ao longo do tubo digestivo de *P. phyllinum*, bem como as possíveis regiões responsáveis pela absorção e secreção de água, foram realizados experimentos com a utilização do corante amaranto. Soluções contendo este corante foram administradas oralmente aos animais ou injetadas na hemolinfa. O amaranto foi considerado um corante apropriado como marcador, visto que não é difusível através do epitélio ventricular,

não sendo adsorvido de forma específica, exceto nas regiões onde ocorre transporte de água (Treherne, 1958; Dow, 1981; Biagio *et al.*, 2009). Da mesma forma, sua cor não é afetada pelas diferenças de pH encontradas no intestino de insetos (Evans & Payne, 1964).

4.1) Tempo de tráfego

Primeiramente, para verificar o tempo de tráfego do alimento no intestino de *P. phyllinum*, foi utilizada uma solução de 100 mM de amaranho saturada com sacarose. Esta solução foi administrada oralmente a animais alimentados *ad libitum* com auxílio de uma seringa de insulina. A solução foi gotejada da seringa à medida em que os animais voluntariamente sorviam as gotas (não foi possível injetar o líquido diretamente na boca do animal sem danificar a sua faringe). Após os animais terem ingerido entre 20 µl e 80 µl da solução de amaranho, eles foram colocados em gaiolas separadas e mantidos sem alimento. Suas fezes foram, então, coletadas e observadas ao microscópio estereoscópico até que traços de corante fossem constatados.

4.2) Experimentos com ingestão e injeção de corante

Para experimentos de ingestão de corante, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima para estimar o tempo de tráfego. Animais, tanto em jejum por um período de 5 dias, quanto alimentados *ad libitum*, ingeriram de 20 µl e 80 µl da solução de amaranho com sacarose descrita acima. Eles foram dissecados em solução de 250 mM de NaCl após períodos de 6 h, 14 h e 18 h e, a seguir, observados ao microscópio estereoscópico. Foi realizado, ainda, com um bisturi, um corte longitudinal no sistema digestivo, afim de revelar a luz do tubo e a face luminal do epitélio ventricular. Os lados do tubo foram rebatidos e a peça anatômica lavada com solução salina, com a finalidade de verificar regiões onde houve adsorção de corante no epitélio.

Para experimentos de injeção do corante na hemolinfa, foi utilizada a mesma solução de 100 mM de amaranho, porém sem a adição de sacarose. Foram injetados

50 µl da solução, com o auxílio de uma seringa de insulina, no quarto segmento abdominal dos animais. Estes experimentos foram realizados tanto em animais com 5 dias de jejum, quanto em animais alimentados *ad libitum*. Após períodos de 2 h, 4 h e 16 h, os animais foram dissecados em solução salina, seus tubos digestivos isolados e observados ao microscópio estereoscópico. Foi verificada a presença de regiões ao longo da face do ventrículo voltada para hemolinfa nas quais houve adsorção de corante.

5) Microscopia eletrônica de transmissão

Os animais foram anestesiados e dissecados como descrito acima.

5.1) Fixação e pós-fixação

Para a análise ultraestrutural, foram testadas três soluções fixadoras distintas, com finalidade de comparar seus resultados e utilizar a metodologia que melhor mantivesse a preservação das estruturas e organelas celulares. Assim, foram empregadas as seguintes metodologias: (A) fixação segundo Lane *et al.* (1972); (B) fixação segundo Karnovsky (1965), com modificações (ver abaixo); e (C) a fixação dupla (glutaraldeído + tetróxido de ósmio). Segue a descrição detalhada de cada uma destas técnicas:

A) Fixação segundo Lane *et al.* (1972): O material foi submetido por 2 horas a uma solução fixadora composta por glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,4 a 4 °C. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M, com duração de 10 minutos cada, a 4 °C.

Após a lavagem, o material foi pós-fixado com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, a 4 °C, por uma hora.

B) Fixação segundo Karnovsky (1965), com modificações: Foi misturado 10 ml do tampão cacodilato 0,2 M com 2 ml de glutaraldeído 25%, 4 ml de paraformaldeído 10%, 20 ml de água bidestilada e 10 mg de CaCl_2 . O material foi submetido à solução fixadora por 2 horas, à 4 °C. Em seguida, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M, em processo idêntico ao realizado para a fixação segundo Lane *et al.* (A) e, da mesma forma, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%.

C) Fixação dupla: O material foi submetido, simultaneamente, à uma solução de glutaraldeído 2% e outra de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 1 hora, a 4 °C, seguido de lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M.

5.2) Contrastação em bloco

Para materiais fixados nas soluções de Lane *et al.* e de Karnovsky (fixações A e B), foi utilizada a técnica de contração em bloco. Nestes casos, o material foi submetido por 18 horas à uma solução aquosa de acetato de uranila 1%, por 18 horas, a 4 °C.

5.3) Desidratação

Após a contração em bloco ou, no caso da fixação dupla (C), após a lavagem em tampão, o material foi desidratado com banhos em concentrações crescentes de álcool etílico. Primeiramente, o material foi submetido a uma solução de álcool 70% por 15 minutos, em seguida, uma de álcool 95% por 20 minutos e, por fim, álcool 100% em dois banhos de 30 minutos cada.

5.4) Inclusão

Foi utilizado, como meio de inclusão, a resina de Spurr (Spurr, 1969). Para facilitar o processo de infiltração da resina no material fixado, as peças foram

submetidas a banhos em soluções de álcool etílico e resina nas seguintes proporções: 2:1, 1:1, 1:2, nesta ordem e por períodos de uma hora em cada solução, com agitação contínua. A seguir, as peças foram embebidas em meio de Spurr puro, em dois banhos de duas horas cada, e emblocadas em moldes de silicone, permanecendo por 72 horas em uma estufa a 58 °C, para completar o processo de polimerização da resina.

5.5) Ultramicrotomia

Cortes semi-finos, com espessura de 1 µm, foram obtidos com o uso de navalha de vidro em um ultramicrotomo Sorvall, modelo MT2-B. Os cortes foram, então, corados com uma solução de azul metileno-azur II e observados ao microscópio de luz Zeiss, modelo Axioskop. Os cortes ultrafinos de áreas selecionadas, com espessuras entre 70 e 90 nm, foram obtidos no mesmo ultramicrotomo e recolhidos em telas de cobre 200 mesh.

5.6) Contrastação e análise das preparações

Cortes tirados de blocos cujo material não passou pelo processo de contração em bloco (material proveniente do processo de fixação dupla [C]), foram contrastados durante 10 minutos em uma solução de acetato de uranila 2%, lavados em água destilada e, a seguir, contrastados com solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

Cortes provenientes de material submetido à técnica de contração em bloco foram contrastados apenas com citrato de chumbo.

Os cortes ultra-finos foram observados e fotografados ao microscópio eletrônico Zeiss, modelo EM 900, operado a 80 kV.

6) Microscopia eletrônica de varredura

Os animais foram anestesiados e dissecados como descrito anteriormente.

A fixação teve início com o material sendo banhado, à uma temperatura de 4 °C, em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,4, “overnight”. A seguir, foram feitas três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com sacarose 0,2 M, com duração de 10 minutos cada, a 4 °C. Após a lavagem, o material foi pós-fixado com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, a 4 °C, por 30 minutos. Em seguida, as peças foram imersas por 15 minutos em ácido tânico aquoso 10% e, depois disso, foram novamente submetidas à solução com ósmio. O material foi, então, lavado em três banhos de água destilada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi desidratado em banhos de soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90% e 100%), sendo que cada banho teve uma duração de 10 minutos, à temperatura ambiente. Após esse processo, o material foi submetido à secagem em ponto crítico de CO₂, em aparelho de marca Balzers, modelo CDP 030. Depois disso, as peças foram montadas em “stubs” apropriados, com a utilização de cola condutiva de prata e metalizadas em “sputter” Balzers modelo SCD 050.

O material foi, finalmente, observado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM-940.

7) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas com a utilização de anticorpos heterólogos

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

Para a detecção de possível homologia entre as enzimas digestivas de *P. phyllinum* com os anticorpos presentes no laboratório, foram realizados experimentos de eletroforese seguidos de Western blot e imunoensaio.

As amostras a serem aplicadas em SDS-PAGE foram, primeiramente, misturadas à tampão de amostra contendo Tris 60 mM, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v). A seguir, as amostras foram aquecidas por 4 minutos a 95 °C e, em seguida, aplicadas em um gel

de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v) (Laemmli, 1970). As placas de eletroforese foram submetidas a uma voltagem de 200V constante na presença de tampão Tris-Base 25 mM pH 8,3 contendo glicina 192 mM.

Para tripsina, foi realizada, também, uma eletroforese, em condições semi-desnaturantes, em gel de poliacrilamida (sem β -mercapto-etanol). Amostras não fervidas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% em condições iguais às aquelas descritas anteriormente, exceto pelo fato de que todo o experimento foi efetuado a 4 °C. Após o gel ter sido submetido à corrente elétrica, ele foi retirado das placas de eletroforese e o substrato Z-FR-MCA (carbobenzoxy-Phe-Arg-4-methylcoumarin-7-amido) 1 mM foi gentilmente espalhado pela superfície do gel. Com o auxílio de uma luz UV, a fluorescência emitida pela liberação de MCA pôde ser observada indicando a banda referente à tripsina identificada e seu peso molecular comparado com aquele estimado a partir do “Western blot”. Padrões de massa molecular pré-corados foram utilizados para verificar a massa da banda de atividade obtida.

7.2) “Western blot” e imunoenensaio

Após eletroforese em SDS-PAGE, as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose de tamanho de poro 0,45 μ m, utilizando-se o método descrito por Towbin *et al.* (1976). O gel, a membrana de nitrocelulose e quatro papéis de filtro do tamanho aproximado do gel foram, inicialmente, equilibrado durante 20 minutos em tampão Towbin. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose utilizando-se um sistema de transferência de proteína semi-seco da Bio-Rad, com uma voltagem acima de 15 V durante 30 minutos. A eficiência da transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi averiguada através do monitoramento da transferência de padrões pré-corados.

Antes de ser ensaiada, a membrana de nitrocelulose permaneceu imersa em uma solução 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) durante uma noite. Esta solução é capaz de bloquear os sítios da membrana que não contém

proteínas transferidas dos géis, evitando, assim, ligações inespecíficas dos anticorpos nos passos descritos adiante.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T duas vezes por 15 minutos. A seguir, a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo primário. Foram utilizados dois anticorpos primários, ambos com a mesma diluição (1:100) em TBS-T. O primeiro deles foi o anticorpo anti-amilase de *Tenebrio molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001). O segundo foi o anticorpo anti-tripsina de *Musca domestica* (Jordão *et al.*, 1996a). Ambos os anticorpos foram gentilmente cedidos pelos professores Walter R. Terra e Clélia Ferreira.

Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T como anteriormente e, então, incubadas com o anticorpo secundário diluído 1000 vezes em TBS-T, por 2 horas. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG polivalente de coelho conjugado à peroxidase (Sigma). Depois da incubação, a membrana foi lavada com TBS.

Em seguida, a membrana foi incubada com uma solução contendo 20 ml de TBS aquecido a 37 °C e 15 µl de H₂O₂, à qual foram adicionados 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvido em 4 ml de metanol. A membrana foi incubada até a visualização das bandas. Após visualização das bandas, a membrana foi lavada com água destilada e seca ao ar. As bandas obtidas para material homogeneizado do epitélio ventricular de *P. phyllinum*, tanto para amilase quanto para tripsina, foram comparadas com bandas obtidas a partir de amostras de homogeneizados dos ventrículos de *Tenebrio molitor* e *Musca domestica*, respectivamente, que serviram como controle positivo.

7.3) Imunolocalização ultraestruktural de enzimas digestivas

As peças correspondentes ao intestino médio de *P. phyllinum* foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 0,3% em tampão fosfato (Sorensen) 0,1 M e paraformaldeído 4% por 2 horas a 4 °C. A seguir, foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M e desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico e incluídas em resina acrílica L. R. White (“hard grade”).

Posteriormente, foram obtidos cortes ultrafinos do material, que foram recolhidos em telas de níquel. Em seguida, as preparações foram lavadas em água

bidestilada (dois banhos sucessivos de 5 minutos cada), depois submetidas a uma solução de 1% de albumina de soro bovino (BSA – “Bovine Serum Albumin”) em tampão TBS (“Tris Buffer Saline”) contendo 0,05% NaN₃ (pH 7,2), por 5 minutos.

As telas foram, então, colocadas em contato com soro normal de cabra (“Normal Goat Serum”, NGS – Amersham, Little Chalfont, U. K.) diluído 1:30, por 30 minutos a 4 °C. As preparações foram, a seguir, incubadas com o anticorpo primário diluído 1:100 em TBS contendo 1% de BSA e 0,05% NaN₃ (pH 7,2), “overnight” a 4 °C. Os anticorpos utilizados foram: anti-amilase de *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001), e anti-tripsina de *M. domestica* (Jordão *et al.*, 1996a). Como controle, alguns cortes foram incubados em soro não-imune, nas mesmas condições.

Depois da lavagem em TBS com 0,2% de BSA, 0,05% de NaN₃ e 0,1% de Tween20 em pH 7 (quatro banhos de 5 minutos cada, com agitação), os cortes foram submetidos a uma solução de TBS com 1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (pH 8,2) por 30 minutos em temperatura ambiente e incubados com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho acoplado à partículas de ouro de 15 nm (Amersham, Little Chalfont, U. K.) diluído 1:20 em TBS contendo 1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (pH 8,2) por 1 hora, em temperatura ambiente.

As telas foram, então, lavadas em TBS contendo 0,2% BSA, 0,05% de NaN₃ e 1% de Tween20 (quatro banhos de 5 minutos cada, com agitação), seguido por banho na mesma solução sem o BSA. Após a passagem pelas soluções acima citadas, os cortes foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 10 minutos.

Em seguida, as preparações foram lavadas em água bidestilada (três banhos de 2 minutos cada, com agitação contínua) e contrastadas em uranila 2% (10 minutos, ao abrigo de luz) e citrato de chumbo por 10 minutos (Reynolds, 1963). Finalmente, os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM-900, operado a 80 kV.

8) Métodos bioquímicos

8.1) Ensaios enzimáticos e determinação da concentração de proteínas

8.1.1) Preparação das amostras

Após a dissecação, o intestino dos animais foi dividido de acordo com suas regiões anatômicas distintas: intestino anterior (IA), ventrículo anterior (VA), ventrículo médio (VM), ventrículo posterior proximal (VPI), ventrículo posterior distal (VPD) e intestino posterior (IP). Nas porções pertencentes ao intestino médio (VA, VM, VPI e VPD), foram, ainda, cuidadosamente separadas as porções contendo a membrana peritrófica e seus conteúdos, e a dos epitélios de cada região, os quais foram lavados em água bidestilada a 4 °C.

Cada porção intestinal (epitélios e conteúdos) foi homogeneizada em água bidestilada mantida a 4 °C, utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjem, a seguir, cada porção epitelial foi centrifugada por 30 minutos a 20.000 G em centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. Os sobrenadantes resultantes foram recolhidos e seus volumes foram acertados com auxílio de um balão volumétrico. Os sedimentos epiteliais, após centrifugação, foram ressuspensos em água bidestilada (a 4 °C) e seus volumes acertados com auxílio de um balão volumétrico. As amostras ficaram armazenadas a -20 °C.

8.1.2) Ensaios enzimáticos de enzimas digestivas

A distribuição da atividade de tripsina ao longo do intestino de *P. phyllinum* foi determinada pela emissão de fluorescência de metil-coumarina (excitação 360 nm e emissão 460 nm) liberada pela incubação do material a ser ensaiado com B-R-MCA (benzoyl-L-arginin-7-amido-4 methylcoumarin; Sigma-Aldrich) 10 µM em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Os ensaios foram interrompidos pela adição de ácido acético 30%.

A atividade de quimotripsina no ventrículo de *P. phyllinum* foi medida pela utilização de S-AAPF-MCA (Chymotrypsin Substrate II, Calbiochem) 10 µM em

tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Os ensaios foram interrompidos pela utilização de ácido acético 30% e as leituras foram feitas medindo-se a fluorescência de 360-460 nm.

A determinação de atividade de aminopeptidase foi realizada segundo Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se LpNa (L-leucina-p-nitroanilida, Sigma-Aldrich), na concentração de 1 mM, em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,8. Para interrupção dos ensaios, foi adicionado ácido acético a 30%. A quantificação da p-nitroanilina produzida foi feita utilizando espectrofotômetro (Pharmacia) a 410 nm.

A atividade de amilase foi medida utilizando-se amido 0,5% em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0, contendo 10 mM NaCl. Os ensaios foram interrompidos por fervura e a determinação de grupos redutores foi feita pelo método de DNS (ácido dinitrosalicílico) (Noelting & Bernfeld, 1948). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Pharmacia) a 550 nm.

A atividade de maltase foi medida utilizando-se o substrato p-nitrofenil- α -glucosídeo, segundo Terra *et al.* (1979), na concentração de 4 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0. A interrupção dos ensaios foi feita acrescentando-se tampão carbonato-bicarbonato contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). Este tampão revela a cor de acordo com a quantidade de grupos p-nitrofenolato liberados durante o ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia) a 420 nm.

Foi realizada, ainda, para amilase e tripsina, um ensaio para verificar a existência de inibidores enzimáticos para essas enzimas na região posterior do ventrículo. Os ensaios foram realizados como descrito acima. Para tal, foram feitos ensaios de homogeneizados correspondentes às diferentes regiões anatômicas, contendo tanto homogeneizado correspondente à região do VA, quanto homogeneizados correspondentes às sub-regiões do VP. Foram feitos os ensaios com as seguintes misturas: 1 parte de VA para 9 partes de VPI; 1 parte de VA para 9 partes de VP II; 1 parte de VA para 9 partes de água; 1 parte de água para 9 partes de VPI e 1 parte de água para 9 partes de VP II.

8.1.3) Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteína nas amostras foi realizada utilizando-se Comassie Blue G (Bradford, 1976) e ovoalbumina como padrão.

8.1.4) Ensaio enzimáticos de ATPase e anidrase carbônica

Foram medidas as atividades enzimáticas tanto de ATPase quanto de anidrase carbônica para a região posterior do ventrículo, túbulos de Malpighi e apêndices ventriculares de *P. phyllinum*. Tais experimentos foram realizados como uma tentativa de esclarecer o alto pH observado nesta região (ver Resultados) e sua possível relação com o sistema de apêndices ventriculares.

Para ensaios de ATPase, o material foi incubado juntamente com o substrato, constituído por tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0; MgSO₄ 1 mM e ATP 1 mM. Para discriminar entre a atividade de K⁺ATPase e HCO₃⁻ ATPase, foi adicionado, ainda, 20 mM KCl ou 25 mM de NaHCO₃ a diferentes ensaios. Foi, ainda, adicionada ao ensaio oligomicina 0,1% em álcool, de forma que a concentração final fosse de 0,02 mg de oligomicina/ml e 2% de etanol. A atividade foi medida através da liberação de fosfato inorgânico por ATP, segundo Baginski *et al.* (1967).

A atividade de anidrase carbônica foi determinada através da taxa da catálise da hidratação de dióxido de carbono através de uma modificação da metodologia empregada por Wilbur & Anderson (1948), já utilizada em nosso grupo de trabalho (Terra *et al.*, 1988). Um volume de 500 µl do material a ser ensaiado foi adicionado à 1 ml de uma solução de tampão HEPES 16 mM, pH 8,3. Imediatamente, foi adicionado 1 ml de uma solução de H₂O saturada com CO₂ (substrato). O tempo necessário para que o pH caísse de 8,0 à 6,5 foi medido. As unidades de atividade enzimática (U) foram estimadas de acordo com Wilbur & Anderson (1948), segundo a equação: $U = (t_0 - t_{cat}) / t_{cat}$, sendo que t_0 corresponde ao tempo da alteração de pH na solução de 8,0 à 6,5 na reação não catalisada e t_{cat} corresponde ao tempo para a mesma alteração de pH na reação catalisada.

8.2) Medidas de pH luminal

Fêmeas adultas de *P. phyllinum* foram imobilizadas a frio e dissecadas conforme descrito anteriormente. O tubo digestivo, após ter sido lavado com solução 250 mM de NaCl gelada, foi transferido para uma placa de vidro e dividido nas seguintes regiões: intestino anterior, ventrículo anterior, ventrículo médio proximal, ventrículo médio distal, ventrículo posterior proximal, ventrículo posterior distal e intestino posterior (tal divisão foi realizada para que fosse possível ter uma resolução mais fina das alterações de pH ao longo do tubo digestivo de *P. phyllinum*). A partir daí, foram realizadas duas formas distintas de medição do pH. Na primeira, os conteúdos de cada região foram dispersos em 5 ml de solução salina, aos quais foram adicionados uma gota de um indicador universal de pH (Merk, Darstadt, pH 4 a 10). As cores obtidas foram comparadas com a escala de cores fornecida pelo fabricante do indicador.

Outra medida de pH luminal também foi realizada. O conteúdo luminal de cada região do tubo digestivo de *P. phyllinum* foi diluído 100x e, em seguida, a medida de pH foi obtida com a utilização de um medidor de pH (Digimed, DHPH-1). As medidas obtidas dessa forma foram equivalentes às aquelas obtidas através da utilização do medidor universal. Tais medições foram realizadas tanto em animais alimentados *ad libitum*, quanto para animais previamente mantidos em jejum por 5 dias.

8.3) Efeito do pH sobre a atividade de tripsina e amilase

A determinação do efeito do pH sobre tripsina e amilase foi feita utilizando-se o homogeneizado do conteúdo do tubo digestivo de *P. phyllinum* em ensaios de atividade enzimática semelhante aos descritos acima. Foram substituídos, porém, os tampões utilizados nos ensaios por tampões diferentes em diversos pHs. Estes foram preparados para a concentração de 50 mM e força iônica acertada pela adição de 200 mM de NaCl. Os tampões utilizados foram os seguintes: 1) para tripsina: tampão MES-HCl nos pHs (6,0 - 7,0); tampão TRIS-HCl nos pHs (7,0 - 9,0); tampão GLY-

NaOH nos pHs (9,0 - 10). 2) para amilase: tampão citrato nos pHs (2,0 - 4,0); tampão citrato-fosfato nos pHs (4,0 - 6,0); tampão fosfato nos pHs (6,0 - 8,0).

Resultados

1) Descrição anatômica do sistema digestivo de *P. phyllinum*

O sistema digestivo de *P. phyllinum* é constituído por uma estrutura tubular, o intestino, que se estende, aproximadamente, por 2/3 do corpo do animal e se mostra totalmente distendido. O intestino conecta a boca ao esfíncter anal e apresenta-se dividido, anatomicamente, em três regiões: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior, sendo que o intestino médio pode ser subdividido em três regiões distintas, bem visíveis (Figuras 2, 3A). Anexa ao intestino, ainda é possível observar a presença de uma glândula salivar acinosa. Esta possui dois lobos que chegam quase a envolver totalmente a porção proximal do intestino anterior (Figura 3B). A glândula salivar bilobada comunica-se com o tubo digestivo através de dois ductos, que se abrem diretamente na boca do animal.

O intestino anterior constitui cerca de um terço de todo o tubo digestivo e é composto por uma estreita faringe, que se abre de forma abrupta num esôfago, estendendo-se até a região do proventrículo. Esta última apresenta uma musculatura um pouco mais desenvolvida em relação ao restante do intestino anterior (Figuras 2, 3A).

O intestino médio, ou ventrículo, é, em extensão, um pouco maior que o intestino anterior e, como já foi dito, pode ser subdividido em três regiões visivelmente distintas. A mais anterior delas, denominada de ventrículo anterior (VA), caracteriza-se pela presença externa de faixas de musculatura circular que formam inúmeros dobramentos na superfície do tubo digestivo a intervalos regulares, o que ocorre ao longo de, aproximadamente, 1/3 da extensão do ventrículo. A partir daí, o tubo se estreita um pouco e sua superfície se torna lisa, sem invaginações, o que caracteriza a segunda região do intestino médio, ou ventrículo médio (VM) (Figuras 2, 3A).

A terceira região, o ventrículo posterior (VP), pôde ser, ainda, subdividida em duas sub-regiões distintas, o ventrículo posterior proximal (VPI), e o ventrículo posterior distal (VPII) (Figura 2). Na primeira delas, o VPI, o diâmetro do tubo se dilata um pouco e nota-se a presença de inúmeras pequenas protuberâncias em forma de botão, as protuberâncias ventriculares, com cerca de 1 mm de diâmetro, que se projetam da superfície do tubo digestivo. A partir da região apical de cada

uma dessas protuberâncias, inicia-se um fino e delgado tubo ou canalículo, que corre paralelamente ao tubo digestivo em direção à região posterior (Figuras 2, 3C). Foi elaborada, inicialmente, a hipótese de que estes canalículos se estendessem até a região do piloro e ali, juntamente aos túbulos de Malpighi, se inserissem, conectando-se novamente ao intestino de *P. phyllinum*. No entanto, observações anatômicas e histológicas posteriores mais detalhadas revelaram que os canalículos, na verdade, terminam em fundo cego como os túbulos de Malpighi, ficando livres na hemolinfa. Com cerca de 4 cm de comprimento, os canalículos se estendem até, aproximadamente, $2/3$ do intestino posterior (Figura 2). Ao sistema de protuberâncias ventriculares e canalículos, foi dado o nome de apêndices ventriculares.

Após a região do VPI, o tubo volta ao seu diâmetro anterior e se mantém com a superfície lisa, o que caracteriza a porção final do ventrículo, o VPII. Esta região se estende até o piloro, onde o intestino médio termina (Figuras 2, 3A).

O intestino posterior é a porção final do sistema digestivo e inicia-se após o intestino médio, tendo início na região do piloro. Ele pode ser dividido, anatomicamente, em cólon e reto (Figuras 2, 3A).

2) Descrição histológica do sistema digestivo de *P. phyllinum*

O intestino anterior de *P. phyllinum* não apresenta grandes variações histológicas, sendo, basicamente, composto por um epitélio simples pavimentoso e revestido por uma cutícula conspícua que envolve toda a luz da parte anterior do tubo digestivo. Ao longo de toda a extensão da cutícula, são visíveis pequenas espículas voltadas para a parte posterior do intestino (Figura 4A). Envolvendo o intestino anterior, existe, ainda, uma camada de musculatura que se encontra disposta de forma longitudinal, adjacente ao epitélio, que é revestida por uma outra camada com orientação circular. O mesmo padrão de orientação das fibras musculares pode ser encontrado envolvendo o restante do tubo digestivo. Na região do proventrículo, observa-se um leve espessamento da cutícula, bem como um aumento no número de espículas. Esta apresenta uma válvula muscular simples que

separa o intestino anterior do ventrículo, projetando-se por uma curta distância no intestino médio (Figura 4B).

O epitélio do ventrículo se apresenta como um epitélio colunar, simples, composto por células altas e bem coradas que possuem microvilosidades apicais. São visíveis ninhos de células regenerativas na base do epitélio, próximos à membrana basal, que ocorrem a intervalos regulares (Figuras 4B, 4C, 4D, 4E).

Foi constatada a presença, ao longo de todo o intestino médio, de uma membrana peritrófica composta por diversas lamelas sobrepostas envolvendo a luz do intestino. Esta pôde ser observada de forma bastante conspícua nas regiões média e posterior do ventrículo e de forma menos evidente na região anterior (Figuras 4B, 4C, 4D, 4E, 5A, 5B, 5E).

Como já foi mencionado, a região do VA possui uma série de dobramentos em sua superfície, sendo que, nesta porção, o epitélio segue estas dobras externas apresentando, portanto, diversas invaginações (Figuras 4B, 4C). Após o final da série de dobramentos, já no VM, as células se tornam mais altas e menos coradas (Figura 4E).

Na região do VP, o epitélio se apresenta similar ao do VM, sendo que, na sua porção proximal (VPI), ocorrem os apêndices ventriculares. As protuberâncias dos apêndices ventriculares são constituídas, histologicamente, por um epitélio simples, composto por células grandes, com núcleos arredondados e que possuem microvilosidades na região apical. Na região de transição entre o epitélio do ventrículo e o das protuberâncias, é notória a continuidade de ambos e as diferenças na morfologia histológica (Figuras 5A, 5B). Da região distal da protuberância, ocorre a saída de um pequeno tubo, ou canalículo, bastante fino, semelhante aos túbulos de Malpighi, porém ainda mais delgado, com um diâmetro variando entre 5 μm e 10 μm (Figura 5B). Tais canalículos são revestidos por um epitélio formado por um único tipo de células. Tratam-se de células binucleadas, que possuem microvilosidades apicais. Além disso, possuem núcleos bem evidentes e ovalados, geralmente com um ou dois nucléolos visíveis (Figura 5C).

É possível observar, em algumas das protuberâncias, acúmulos de uma substância fortemente corada por eosina amarela. Estes acúmulos ocorrem na pequena abertura da protuberância para a luz do tubo digestivo (Figura 5A).

A região de inserção dos túbulos de Malpighi marca o final do intestino médio e início do intestino posterior (Figura 5E). O intestino posterior se caracteriza por um epitélio simples, cúbico revestido por uma cutícula delgada (Figura 5F). É revestido externamente por musculatura, que se encontra organizada da mesma forma que no restante do tubo digestivo. A membrana peritrófica parece se estender pela porção proximal do intestino posterior. Na região final do intestino posterior, ocorrem áreas de epitélio colunar correspondentes às papilas retais, associadas com a absorção de água e íons da luz do intestino (Figura 5G).

3) Descrição anatômica e histológica dos túbulos de Malpighi de *P. phyllinum*

Juntamente com a análise morfológica do ventrículo e apêndices ventriculares de *P. phyllinum*, foi realizado, também, um estudo morfológico dos túbulos de Malpighi desta espécie.

Os túbulos de Malpighi são tubos longos e finos que se originam do intestino dos insetos, numa região próxima à junção entre o ventrículo e o intestino posterior (piloro). Eles ficam livres na cavidade corporal e terminam em fundo cego. *P. phyllinum* possui mais de 100 túbulos de Malpighi, cada um deles medindo, em fêmeas adultas, cerca de 4 cm de comprimento e cerca de 10 µm a 30 µm de diâmetro (Figura 2). Eles se unem junto ao ponto de inserção no sistema digestivo em grupos de três. Foi observado que os túbulos de Malpighi possuem faixas musculares organizadas helicoidalmente ao seu redor (ver adiante).

Histologicamente, os túbulos são constituídos por um epitélio simples, com algumas células, geralmente de três a cinco, envolvendo o lúmen. Tratam-se de células histologicamente semelhantes às dos canalículos ventriculares, porém seus núcleos possuem um formato mais arredondado (Figura 5D). Além disso, nota-se a presença de diversas estruturas cristaloides na luz dos túbulos. Não foram observadas, ao longo dos túbulos, células do “Tipo 2”, com morfologia e função diferenciada, descritas em outras espécies de Phasmida (Taylor, 1971a).

4) Microscopia confocal: comprovação da presença de uma membrana peritrófica

A observação dos cortes histológicos do ventrículo incluídos em parafina e que foram incubados com WGA conjugado com fluoresceína, na presença de excesso de N-acetilglicosamina, mostrou que, por toda a extensão do intestino médio, existe uma estrutura fluorescente, próxima às microvilosidades, na luz do tubo, que caracteriza uma membrana peritrófica típica (Figura 6).

Esta membrana peritrófica mostrou-se menos evidente na região do VA e de forma muito intensa nas regiões VM e VP, principalmente na região média do ventrículo, onde se observou uma fluorescência bastante intensa (Figura 6).

5) Experimentos com corante

5.1) Tempo de tráfego

O tempo de tráfego do alimento ao longo do tubo digestivo de *P. phyllinum* foi estimado com base no intervalo entre a ingestão do corante e seu aparecimento nas fezes. O tempo transcorrido entre estes dois eventos foi de 10-12 horas.

5.2) Experimentos com ingestão e injeção de corantes

Experimentos nos quais a solução de amarantho foi injetada diretamente na boca dos insetos produziram os seguintes resultados:

Em fêmeas alimentadas *ad libitum*, dissecadas 6 horas após a ingestão de corante, foi possível observar o lado interno (voltado para o lúmen) do epitélio do VA marcado com amarantho, o que é um indicativo da ocorrência de um sítio de absorção de água nessa região. Além disso, o conteúdo do ventrículo apresentou-se corado nas regiões correspondentes ao VM e VP. Em animais dissecados 14 horas após a ingestão, também foi observada uma marcação de corante no epitélio do VA e no conteúdo do VP e intestino posterior. Neste caso, não foi constatada marcação

no conteúdo do VM. Em animais dissecados 18 horas após ingestão do amarantho, foi verificada marcação no conteúdo apenas do intestino posterior, bem como a adsorção de corante no epitélio do VA (Tabela 1, Figura 7).

Em animais previamente mantidos em jejum, foram obtidos resultados semelhantes aos observados em animais alimentados, exceto pelo fato de que o conteúdo intestinal se manteve corado mesmo após longos períodos de tempo. Em animais dissecados 18 horas depois da ingestão de corante, por exemplo, todo conteúdo do ventrículo e do intestino anterior continuava fortemente corado (Tabela 1, Figura 7).

Experimentos nos quais a solução de amarantho foi injetada na hemolinfa dos insetos produziram os seguintes resultados:

Para animais alimentados *ad libitum*, dissecados 2 horas após injeção de corante, foi observada forte marcação nos túbulos de Malpighi, bem como no conteúdo do intestino posterior, indicando que o amarantho foi avidamente tomado pelos túbulos de Malpighi. Para este tempo de dissecação após a injeção foi observada, também, uma tênue marcação no conteúdo do VP. Não foi constatada marcação no epitélio ventricular (Tabela 2).

Este experimento foi repetido em intervalos de tempo diferentes, sendo observadas poucas alterações. Assim, animais dissecados 4 horas após injeção de corante apresentaram resultados semelhantes, com a exceção de que a marcação no conteúdo do VP se encontrava um pouco mais forte. Em animais dissecados 16 horas após a injeção de corante, foi observada apenas marcação no intestino posterior e uma fraca marcação nos túbulos de Malpighi (Tabela 2, Figura 8).

Para animais em jejum foram observados os seguintes resultados:

Animais dissecados 2 horas após a injeção de corante apresentaram forte marcação nos túbulos de Malpighi e conteúdo do intestino posterior. Foi observada, também, uma forte marcação no conteúdo do VP e do VM. Animais dissecados 4 horas após a injeção na hemolinfa mostraram resultados semelhantes, com a diferença que, após 4 horas, o corante já havia atingido o conteúdo do VA. Animais dissecados após 16 horas da injeção de amarantho não mostravam marcação intensa nos túbulos de Malpighi, mas constatou-se a presença de corante ao longo de toda a

extensão do conteúdo ventricular, além de uma leve marcação na face luminal do epitélio do VA (Tabela 2, Figura 8).

Em nenhum dos experimentos acima relatados, foi observada marcação de corante nos canalículos.

6) Microscopia eletrônica de transmissão

Todas as três técnicas de fixação empregadas produziram resultados satisfatórios. Desta forma, a técnica de fixação adotada foi aquela segundo Lane *et al.* (1972), por ser a técnica mais rotineiramente empregada no laboratório.

6.1) Descrição ultraestrutural das regiões do ventrículo de *P. phyllinum*

Ao longo de todo o ventrículo de *P. phyllinum*, foram encontrados, basicamente, três tipos celulares: as células regenerativas, as células endócrinas e as células colunares (ou enterócitos) (Figuras 9, 10, 11, 12, 13).

Como constatado em observações histológicas, as células regenerativas organizam-se em ninhos na base do epitélio colunar. Tratam-se de células pequenas, com um núcleo comparativamente grande e arredondado, pouco heterocromatinizado e que apresenta um ou dois nucléolos (Figura 11E).

As células endócrinas ocorrem de forma isolada. São células que se localizam, tipicamente, na base do epitélio e não se estendem até a luz do ventrículo. Possuem formato arredondado, contendo inúmeras vesículas com eletrondensidades variadas, com citoplasma pouco eletrodenso e exibindo um grande número de áreas de Golgi, na forma de dictiossomos, ao redor do núcleo (Figura 10F).

As células colunares do epitélio do intestino médio de *P. phyllinum* são células altas e polarizadas. Possuem muitas microvilosidades na região apical, que se projetam para a luz do intestino, confirmando os dados histológicos. Com relação às superfícies laterais destas células, nota-se a ocorrência de especializações juncionais na forma de desmossomos, seguidas por junções septadas lisas, próximas à região apical do epitélio (Figura 10B). Na região da base dos enterócitos, foram

observadas invaginações da membrana plasmática basal, que formam uma rede de canais estreitos que penetram no citoplasma basal e cujas aberturas basais comunicam-se diretamente com a lâmina basal. Tais invaginações formam verdadeiros labirintos que estão, frequentemente, associados à mitocôndrias (Figuras 9, 10E, 11D, 12F, 13E). Os núcleos dos enterócitos são ovalados e ocorrem próximos à região mediana da célula, possuindo, frequentemente, um ou dois nucléolos bastante característicos (Figuras 9, 10C, 12E, 13D).

No citoplasma das células colunares nota-se, ainda, uma abundância de retículo endoplasmático rugoso, distribuindo-se por todo o citoplasma, a presença de várias áreas de Golgi (na forma de dictiossomos) ao redor do núcleo, bem como de muitas mitocôndrias, as quais se concentram um pouco mais nas regiões apical e basal das células (Figuras 9, 10C, 10D, 11C, 12D, 13D).

Foi constatada a existência de diferenças morfológicas significativas entre as células colunares das diferentes regiões do ventrículo (Figura 9). Na região do VA, foram observadas diversas vesículas secretoras características. São limitadas por uma única membrana, possuem forma arredondada e apresentam, em seu interior, duas regiões distintas: uma mais eletrodensa, que forma uma meia-lua ao longo da borda interna da vesícula, e outra menos eletrodensa, em sua região central. Estas vesículas foram encontradas, principalmente, na região apical das células, junto à membrana plasmática na base das microvilosidades, bem como associadas às áreas de Golgi (Figuras 9A, 10A, 10B, 10C). Nesta região do ventrículo, as invaginações da membrana plasmática basal se caracterizam por possuírem poucas aberturas para a lâmina basal e por serem comparativamente menos desenvolvidas. Também apresentam um número menor de mitocôndrias associadas do que as demais regiões (Figuras 9A, 10E).

Na região do VM, as vesículas de secreção apresentam características morfológicas diferentes daquelas encontradas na região do VA. Foram observadas, no citoplasma apical dos enterócitos dessa região, várias vesículas de formato arredondado e bastante eletrodensas em todo seu conteúdo (Figuras 9B, 11A, 11B). Tais vesículas foram, também, detectadas próximas às áreas de Golgi. A membrana plasmática basal possui um labirinto de invaginações semelhante ao do VA, porém um pouco mais desenvolvido em extensão e com uma maior quantidade de

mitocôndrias associadas. Além disso, o número de aberturas para a lâmina basal é ligeiramente superior (Figuras 9B, 11D).

Como anteriormente mencionado, a região do VP foi dividida em duas sub-regiões distintas: VPI e VPIL. Anatomicamente, o VPI se localiza na zona de inserção do sistema de apêndices ventriculares. Na região onde não existem mais as inserções desses apêndices, tem início o VPIL, que se estende até o final do intestino médio.

Os enterócitos que compõem a região do VPI são caracterizados por possuírem, em primeiro lugar, microvilosidades pequenas, com o comprimento em torno de 4,5 μm (Figuras 9C, 12A, 12B, 12C), em contraste com as microvilosidades das regiões anterior e média, que possuem por volta de 7-9 μm . Além disso, pode-se observar, no citoplasma apical do VPI, uma série de características peculiares. Esta área do citoplasma é pouco eletrondensa, de aparência granulosa e pobre em organelas. As poucas mitocôndrias que puderam ser notadas nesta região das células são de tamanho caracteristicamente reduzido (Figuras 9C, 12A, 12B). É clara, ainda, a presença de um grande número de elementos do citoesqueleto, em particular microtúbulos, no citoplasma apical e também na porção mediana dessas células (Figura 12E). Já na área do citoplasma próxima ao núcleo, pôde ser observada uma grande abundância de áreas de Golgi (Figura 12D).

Os dados obtidos sugerem que no VPI (bem como no VPIL, ver abaixo) ocorre um mecanismo de secreção distinto daquele existente nas regiões do VA e do VM. De fato, foi constatada, nesta região, a presença de dilatações nas pontas das microvilosidades, bem como de pequenas vesículas no interior dessas dilatações ou mesmo ao longo do comprimento das microvilosidades (Figuras 9C, 12A, 12B, 12C). Estas observações sugerem a ocorrência de uma secreção do tipo microapócrina, que consiste na eliminação de pequenas vesículas, com uma ou duas membranas, do ápice das microvilosidades celulares (*cf.* Santos *et al.*, 1986; Cristofolletti *et al.*, 2001). Estas características não foram observadas nas demais regiões do ventrículo, onde a secreção parece se dar através de um mecanismo merócrino (exócitose) (ver discussão).

As invaginações da membrana plasmática basal das células da região do VPI também possuem uma série de características peculiares que as distinguem daquelas

observadas nas demais regiões. Elas são extremamente desenvolvidas, estendendo-se até quase metade da altura da célula. Possuem um grande número de aberturas para a lâmina basal, bem como um padrão característico: as invaginações encontram-se, geralmente, organizadas paralelamente umas às outras e em um plano perpendicular à lâmina basal. As mitocôndrias associadas, encontradas em um número muito grande, também se encontram numa disposição paralela às invaginações (Figuras 9C, 12F).

Após a região do VPI, onde são encontradas as inserções dos apêndices ventriculares, estende-se a região do VP II, que termina na região de inserção dos túbulos de Malpighi. A região do VP II caracteriza-se, ultraestruturalmente, por possuir microvilosidades bastante longas, estendendo-se até uma distância de 20 μ m na luz ventricular (Figuras 9D, 13A). Exceto pela ausência de vesículas secretoras evidentes, seu citoplasma é semelhante àquele presente nas regiões do VA e do VM, distinto, portanto, do VPI. O VP II apresenta retículo endoplasmático rugoso abundante e muitas áreas de Golgi (Figuras 9D, 13D). Da mesma forma, as mitocôndrias nos enterócitos desta região encontram-se presentes em todo o citoplasma, concentradas, entretanto, junto ao ápice, e na base, da célula. A região basal dos enterócitos apresenta-se de forma semelhante àquela do VPI, apresentando invaginações da membrana plasmática basal muito desenvolvidas e com um grande número de mitocôndrias associadas (Figuras 9D, 13E). As invaginações se estendem, também, até, aproximadamente, a região mediana das células e possuem muitas aberturas para a lâmina basal. No entanto, ao contrário do observado no VPI, na região do VP II, as invaginações não se apresentam tão regularmente organizadas, além de se mostrarem mais dilatadas (Figura 13E).

Com relação ao aspecto secretor, também na região do VP II, foram constatadas dilatações nas extremidades e ao longo de toda a extensão das microvilosidades, com pequenas vesículas em seu interior. Vesículas livres na luz ventricular foram igualmente observadas (Figuras 9D, 13A, 13B, 13C). Como mencionado acima, estas características morfológicas são indicativas da ocorrência de um mecanismo de secreção microapócrino (*cf.* Santos *et al.*, 1986; Cristofolletti *et al.*, 2001).

6.2) Descrição ultraestrutural dos apêndices ventriculares

6.2.1) Região de transição entre o ventrículo e as protuberâncias ventriculares

Como já relatado, o epitélio se apresenta de forma continua na região do ventrículo e das protuberâncias ventriculares no VPI de *P. phyllinum*. Ultraestruturalmente, pôde-se observar a ocorrência de uma região de transição bem diferenciada, uma vez que as células da região que compõem a transição entre as protuberâncias ventriculares e o epitélio ventricular possuem características morfológicas distintas (Figuras 9E, 14). Nessa zona de transição, as células exibem microvilosidades maiores do que as da região epitelial (VPI), se estendendo até cerca de 13 μm . O citoplasma é mais rico em organelas, podendo ser observada uma abundância de retículo endoplasmático rugoso, áreas de Golgi e, especialmente, mitocôndrias. Estas podem ser vistas com relativa abundância ao longo de todo o citoplasma apical (Figuras 14A, 14B, 14E). As células da região da transição apresentam, também, um labirinto de invaginações da membrana plasmática basal bem desenvolvido, mas não tanto quanto no VPI, com muitas aberturas para a lâmina basal, porém, com poucas mitocôndrias associadas (Figuras 9E, 14C, 14D).

6.2.2) Protuberâncias ventriculares

As células que compõem as protuberâncias ventriculares possuem uma morfologia distinta das demais células do ventrículo (Figuras 9F, 15). Tratam-se de células arredondadas, exibindo microvilosidades apicais que contêm mitocôndrias em seu interior. O citoplasma é rico em organelas como o retículo endoplasmático rugoso, áreas de Golgi e, principalmente, mitocôndrias, abundantes por todo o citoplasma (Figuras 9F, 15A, 15B). Estas células também possuem um labirinto basal, formado por invaginações da membrana plasmática bastante desenvolvido e com muitas mitocôndrias associadas. As invaginações possuem muitas aberturas para a lâmina basal e apresentam um diâmetro relativamente pequeno, quando comparadas as do VPI (Figuras 9F, 15C).

6.2.3) Canalículos

As células que compõem os canalículos apresentam-se muito semelhantes àquelas que formam os túbulos de Malpighi (descritas abaixo) e não foram observadas diferenças morfológicas ao longo de sua extensão. Tratam-se de células polarizadas, com microvilosidades apicais, no interior das quais mitocôndrias podem, frequentemente, ser encontradas. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e áreas de Golgi (Figuras 9G, 16A, 16B). Sua porção basal possui invaginações da membrana plasmática formando um labirinto com muitas aberturas para a lâmina basal. No entanto, ocorrem poucas mitocôndrias associadas a estas especializações (Figuras 9G, 16A, 16C). Nas membranas laterais dessas células, bem como nas que compõem os túbulos de Malpighi (abaixo), foi constatada a presença de junções septadas escalariformes, que mantêm a adesão celular (Figura 17B).

6.3) Descrição ultraestrutural dos túbulos de Malpighi de *P. phyllinum*

As células que compõem os túbulos de Malpighi possuem, ao longo de toda sua extensão, uma série de características que as distinguem das demais células descritas até o momento (Figuras 9H, 17). As microvilosidades destas encontram-se densamente agrupadas e possuem, em seu interior, numerosas mitocôndrias (Figuras 9H, 17A, 17C). Muitas mitocôndrias são igualmente encontradas por todo o citoplasma, embora apresentem-se mais agrupadas no citoplasma apical. A membrana plasmática basal possui diversas invaginações, formando um labirinto com numerosas mitocôndrias associadas. Nas células dos túbulos de Malpighi, tal labirinto é extremamente desenvolvido, atingindo quase a metade da altura da célula e com muitas mitocôndrias associadas (Figuras 9H, 17A, 17D). Foi constatado, ainda, que nas membranas laterais dessas células, a adesão intercelular dos epitélios é realizada por junções septadas escalariformes (Figura 17B), como é comum nas células que compõem os túbulos de Malpighi (Lane, 1984).

Foram notadas, ainda, algumas diferenças nas células que compõem os túbulos de Malpighi ao longo da sua extensão. Para uma observação mais refinada

dos túbulos de Malpighi, estas estruturas foram divididas em três regiões: A região distal, composta pelos 3 mm finais dos túbulos de Malpighi; a região média, composta pelos 2-3 cm seguintes; e, por fim, a região proximal, composta pela região dos túbulos de Malpighi que se insere no intestino de *P. phyllinum*.

Foi verificado que as células da região distal dos túbulos possuem uma altura menor e núcleo marcadamente mais ovalado. Além disso, possuem um número caracteristicamente reduzido de mitocôndrias no interior das microvilosidades, em comparação ao observado na região média.

A região média dos túbulos de Malpighi, no entanto, é composta por células maiores, de núcleo arredondado. As microvilosidades destas células se caracterizam por apresentarem um grande número de mitocôndrias em seu interior. Podem ser observadas, ainda, estruturas cristalinas presentes na luz dos túbulos desta região.

Por fim, a região proximal dos túbulos se caracteriza pela presença de uma lâmina basal mais espessa que a das regiões já descritas. As fibras musculares que envolvem os túbulos são, também, visivelmente mais desenvolvidas. Além disso, as microvilosidades das células da região proximal apresentam um número menor de mitocôndrias em seu interior, em comparação com a região média dos túbulos. No entanto, as microvilosidades desta região possuem um tamanho maior com cerca de 12 μm , em comparação a 7,5 μm na região média e 5 μm na região distal.

7) Microscopia eletrônica de varredura

Foram realizadas observações através de microscopia eletrônica de varredura da região posterior do ventrículo de *P. phyllinum*, partindo da região onde se encontram os apêndices ventriculares, até a região do piloro. Desta forma, os apêndices ventriculares puderam ser melhor estudados, obtendo-se imagens mais detalhadas do aspecto externo deste sistema, que, morfológicamente, fica encoberto e confunde-se com os numerosos túbulos de Malpighi enovelados. Além disso, a morfologia externa dos apêndices ventriculares pôde ser comparada com a dos túbulos de Malpighi com maior riqueza de detalhes.

Recordando, as protuberâncias ventriculares são pequenas estruturas em forma de botão, com cerca de 1 mm de diâmetro, que se projetam da superfície ventricular (Figura 18A). Foi possível verificar que, anexo a muitas delas, encontram-se muitas ramificações terminais de traquéias, indicando uma alta atividade metabólica nestas regiões (Figura 18B). Os canalículos possuem faixas musculares distribuídas helicoidalmente ao seu redor, bastante evidentes nas imagens de varredura (Figura 18C).

Os túbulos de Malpighi, por sua vez, se inserem no tubo digestivo na região do piloro em grupos de três. Eles se encontram livres na cavidade corporal e terminam em fundo cego. Nas imagens de varredura, ficam claras as diferenças de calibre entre os canalículos e os túbulos de Malpighi, bem como as semelhanças na morfologia externa de ambas as estruturas, como, por exemplo, as faixas musculares em disposição helicoidal (Figuras 18C, 18D).

8) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas com a utilização de anticorpos heterólogos

8.1) “Western blot” e imunoensaio

Os experimentos de “western blot” comprovaram que, tanto o anticorpo anti-amilase de *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001), quanto o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* (Jordão, *et al.*, 1996a), reconhecem as enzimas digestivas homólogas em *P. phyllinum* (Figura 19). A banda correspondente à amilase de *P. phyllinum* apresentou um peso molecular ao redor de 65 kDa, de forma semelhante ao controle positivo utilizado (homogeneizado do epitélio ventricular de *T. molitor*) (Figura 19A). Em experimentos de reconhecimento de tripsina, por outro lado, a banda correspondente em *P. phyllinum* apresentou um peso molecular próximo de 60 kDa, enquanto que o controle positivo utilizado (homogeneizado do epitélio ventricular de *M. domestica*) exibiu um peso molecular próximo de 27,8 kDa. Para confirmar se a banda revelada pelo “western blot” corresponde, de fato, à tripsina em *P. phyllinum*, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições

semi-desnaturantes (sem a utilização de β -mercapto-etanol e sem ferver o material antes de aplicá-lo ao gel). Após a eletroforese, o substrato Z-FR-MCA foi espalhado pela superfície do gel e, com a utilização de uma luz UV, a fluorescência emitida pela liberação de MCA (com a quebra do substrato devido à ação enzimática), revelou uma banda de atividade com cerca de 60 kDa, indicando que a proteína reconhecida pelo anticorpo deve ser a tripsina (Figura 19B).

8.2) Imunolocalização ultraestrutural de enzimas digestivas

Os mesmos anticorpos utilizados em experimentos de “western blot” acima mencionados (anti-amilase de *T. molitor* e anti-tripsina de *M. domestica*) foram empregados em experimentos de imunolocalização ultraestrutural dessas enzimas nas regiões do ventrículo de *P. phyllinum*.

Imagens obtidas a partir da observação das preparações ao microscópio eletrônico de transmissão revelaram que, para a enzima amilase, foram obtidas marcações, principalmente, nas regiões do VA e, com menor intensidade, do VM (Figuras 20A, 20B, 20C). As duas sub-regiões do VP não mostraram marcação (Figuras 20D, 20E). Tanto no VA como no VM, a marcação com conjugado de ouro foi observada na luz do tubo digestivo, em especial, junto à membrana peritrófica, por entre as microvilosidades apicais, e, particularmente, no interior dos enterócitos. No VA, foi possível seguir a marcação, começando nas áreas de Golgi e em vesículas a eles associados, em vesículas secretoras próximas ao ápice do enterócito e, como mencionado, no espaço luminal (Figuras 20A, 20B). No VM, a marcação, apesar de sua menor intensidade, apresentou-se de forma semelhante, ocorrendo, principalmente, no interior de vesículas secretoras características desta região (Figura 20C).

A observação dos cortes ultraestruturais revelou um padrão semelhante de marcação imunocitoquímica para a tripsina. Assim, a marcação se concentrou nas regiões do VA e do VM, com maior intensidade no VA. Da mesma forma, foi observada marcação no espaço luminal, por entre as microvilosidades apicais e junto à membrana peritrófica. No interior dos enterócitos, também foi possível constatar uma marcação no conteúdo das vesículas secretoras características de cada região,

bem como nas áreas de Golgi e em vesículas associadas (Figuras 21A, 21B, 21C). Não foi observada marcação na região do VP (Figuras 21D, 21E).

9) Ensaio enzimáticos

9.1) Distribuição das enzimas digestivas

Foi determinada a distribuição de atividade das enzimas amilase, maltase, tripsina, quimotripsina e aminopeptidase ao longo do sistema digestivo de *P. phyllinum*, com o intuito de definir os sítios de digestão inicial (amilase, tripsina e quimotripsina) e final (maltase e aminopeptidase) de proteínas e carboidratos (Figura 22).

De acordo com os resultados obtidos, pôde ser constatado que a atividade tanto de amilase, quanto de tripsina se concentram, principalmente, no intestino anterior e ventrículo anterior, sendo que, para ambas, a atividade observada no intestino anterior foi maior do que no VA. A atividade de ambas as enzimas apresenta um claro gradiente ao longo do tubo digestivo, sendo mais alta nas regiões do intestino anterior e VA e mais baixa nas regiões mais posteriores do ventrículo (VP) (Figura 22).

A atividade de quimotripsina segue o mesmo padrão de amilase e tripsina, com a distinção de que a sua atividade concentra-se, na maior parte, no ventrículo anterior e não no intestino anterior, como ocorre com tripsina e a amilase (Figura 22).

A aminopeptidase pôde ser detectada na fração que resultou do precipitado da centrifugação das porções epiteliais do intestino de *P. phyllinum*, o que indica que tal enzima encontra-se ancorada à membrana do ápice dos enterócitos. A sua atividade concentrou-se, majoritariamente, no epitélio dos ventrículos médio e posterior (Figura 22).

A atividade de maltase foi detectada, principalmente, na fração solúvel das regiões epiteliais, indicando que tal enzima encontra-se aderida fracamente à membrana plasmática apical dos enterócitos (provavelmente, presa ao glicocálix).

Foi constatada atividade no epitélio do ventrículo anterior e das sub-regiões posteriores do ventrículo (Figura 22).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de atividade enzimática, bem como medições do volume ventricular e do intestino posterior, permitiram, ainda, estimar a taxa de excreção para as enzimas ensaiadas em *P. phyllinum*. Foi constatado que a taxa de excreção de todas as enzimas ensaiadas foi igual ou inferior à 35% (Tabela 3).

Não foi constatada a existência de inibidores enzimáticos endógenos nas regiões posteriores do ventrículo para as enzimas ensaiadas (dados não mostrados).

9.2) Distribuição de ATPase e anidrase carbônica

Os resultados para anidrase carbônica revelaram atividade nos tubúlos de Malpighi e uma intensa atividade nos apêndices ventriculares. Regiões do ventrículo posterior apresentaram uma atividade reduzida, enquanto que nos ventrículos anterior e médio não foi detectada atividade (Tabela 4).

Ensaio para ATPase, por outro lado, não revelou uma atividade significativa dessa enzima nas regiões estudadas (ventrículo, apêndices ventriculares e túbulos de Malpighi).

10) Medidas de pH luminal

A medida de pH estimada através de um indicador universal e com a utilização de um pHmetro (a partir de diluições do conteúdo intestinal) foram equivalentes, indicando a confiabilidade de ambas as metodologias. Foi observada uma grande amplitude nos valores de pH no conteúdo intestinal ao longo de todo o tubo digestivo de *P. phyllinum*, desde 5,3 no intestino anterior, até 9,1 no VPI. Os valores obtidos em medições realizadas em animais em jejum e alimentados foram semelhantes (Figura 23).

11) Efeito do pH sobre a atividade de tripsina e amilase

Foi determinado o efeito do pH sobre a atividade das enzimas tripsina e amilase. A maior atividade para tripsina foi observada no pH 9,0. Já para amilase, a maior atividade foi observada no pH 5,0 (Figura 24).

Discussão

Anatomia e histologia do sistema digestivo de *P. phyllinum*

Anatomia

O sistema digestivo de insetos possui diferentes níveis de complexidade, bem como grande diversidade morfológica (Waterhouse, 1957; Wigglesworth, 1972; Cruz-Landim, 1985; Terra, 1988; Ribeiro *et al.*, 1990; Chapman, 1998; Nation, 2008). A morfologia externa e a histologia do intestino de *P. phyllinum* correspondem, em linhas gerais, àquelas descritas para outras espécies de Phasmida (Bartheau, 1963; Gangrade, 1965; Beadle, 1972; Richards & Davies, 1977). Assim, o canal alimentar é constituído por um tubo simples distendido, sem dobras ou enovelações, que começa na boca e termina no ânus.

O intestino anterior se inicia em uma estreita faringe que se abre em uma estrutura tubular revestida por cutícula, correspondente ao esôfago. Na porção distal do intestino anterior, observa-se uma pequena dilatação do tubo e um espessamento da musculatura que o envolve, que corresponde à região do proventrículo. Como na maioria dos insetos (Chapman, 1998), esta porção termina em uma válvula muscular simples que divide o intestino anterior do intestino médio. O intestino anterior em *P. phyllinum* não possui uma região especializada para a trituração do alimento (moela). Tal estrutura é observada em diversos Orthoptera (Biagio *et al.*, 2009), Blatodea (de Lima, 2004) e demais polineópteros, que possuem uma moela conspícua. Tampouco ocorre uma estrutura especializada para o armazenamento (o papo), presente em muitos insetos (Chapman, 1998). É possível que o proventrículo aja como sítio de trituração do alimento e que o próprio esôfago atue como região de armazenamento na espécie estudada, uma vez que, na maioria dos animais dissecados, o esôfago se encontrava cheio de material ingerido.

O intestino médio é uma continuação do intestino anterior. Ao contrário do que é observado na maioria dos Polineoptera (Chapman, 1998), cecos gástricos estão ausentes. O ventrículo pode ser dividido em três regiões distintas: o ventrículo anterior (VA), que se caracteriza pela presença de inúmeros dobramentos na superfície do tubo digestivo, o ventrículo médio (VM), onde a superfície se torna lisa, e o ventrículo posterior (VP), que tem início na região de inserção dos

apêndices ventriculares e vai até o piloro. Esta última região foi, ainda, subdividida em ventrículo posterior proximal (VPI), onde estão presentes os apêndices ventriculares, e ventrículo posterior distal (VPII), onde estas estruturas não são mais observadas. Cada apêndice ventricular é composto por uma protuberância que se protraí do tubo digestivo e por um canalículo que emerge da sua região apical e termina em fundo cego.

Na região do piloro, onde ocorre a inserção dos túbulos de Malpighi, termina o ventrículo e tem início o intestino posterior. Em alguns insetos, existe, nesta região, uma válvula separando o ventrículo do intestino posterior (Waterhouse, 1957; Wigglesworth, 1972). Em *P. phyllinum*, isso não ocorre. O intestino posterior pode ser dividido em cólon e reto, sendo que nesta última região estão presentes as papilas retais, relacionadas com a reabsorção de água (Chapman, 1998; Nation, 2008).

Histologia

O intestino anterior de *P. phyllinum*, semelhantemente à maioria dos insetos (Smith, 1968), é formado por um epitélio simples, composto por células pavimentosas e revestido por uma delgada cutícula, modificada na forma de espículas. Este epitélio é circundado por feixes de fibras musculares circulares, mais internas, e longitudinais, mais externas. Na porção do proventrículo, observa-se um espessamento destas fibras musculares, bem como da cutícula, que apresenta um maior número de espículas em relação ao restante do intestino anterior. Em algumas espécies de Phasmida, como em *Necrosia sparaxes*, tal região parece, de fato, realizar o papel de triturar o alimento (Gangrade, 1965), o que pode, ao menos em parte, ser válido também para *P. phyllinum*, como já comentado, dado o maior número de espículas nessa região e à presença de uma musculatura mais desenvolvida. Na maioria das espécies, o proventrículo apresenta uma válvula que controla a passagem do alimento do intestino anterior para o intestino médio (Wigglesworth, 1972). Em algumas espécies, ainda, tal estrutura pode apresentar projeções da cutícula em forma de pequenos dentes, atuando como um verdadeiro

órgão triturador de alimento (Richards & Davies, 1977). Em *P. phyllinum*, no entanto, observa-se uma válvula simples.

Na região do intestino médio, verifica-se a presença de um epitélio simples, do tipo colunar (Billingsley & Lehane, 1996; Cavalcante & Cruz Landim, 1999; Junqueira & Carneiro, 2005), que se estende por todo o ventrículo. Como anteriormente mencionado, o tipo principal de célula que compõe o epitélio ventricular é normalmente chamado de célula colunar ou enterócito (Terra, 1988; Ribeiro *et al.*, 1990). Na maioria dos insetos, incluindo *P. phyllinum*, o ventrículo é, de fato, revestido por células do tipo colunar (Priester, 1971; Hecker, 1977; Billingsley, 1990; Ribeiro *et al.*, 1990; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999; Caldeira *et al.*, 2007; Biagio *et al.*, 2009). Com base nessa característica, o termo “célula colunar” vem sendo utilizado há um bom tempo para designar as células que desempenham as principais funções no processo digestivo de insetos (Wigglesworth, 1972; Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984; Ribeiro *et al.*, 1990; Terra, 1990), de forma que essa denominação ultrapassou os limites da morfologia, incorporando um caráter fisiológico. Em alguns casos, entretanto, essa nomenclatura é inadequada, visto que as células principais do epitélio ventricular não possuem a morfologia colunar. Esse é o caso, por exemplo, do piolho *Haematopinus suis* (Gonçalves, 2002), bem como da cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Utiyama, 2011). Assim, no presente estudo adotou-se o nome enterócito que melhor define o principal tipo celular presente no intestino médio.

A porção basal do epitélio ventricular de *P. phyllinum* repousa sobre uma delgada membrana basal. Na região do VA, o epitélio se apresenta com diversas dobras e invaginações. Nas demais regiões do ventrículo, o epitélio se encontra distendido, sem dobras. Os enterócitos apresentam pequena diferenciação ao longo do ventrículo, sendo que, na região anterior, as células são menores e com seu citoplasma mais fortemente corado. Nas demais regiões, as células são mais altas e exibem o citoplasma menos intensamente corado. É possível, também, verificar a presença de células indiferenciadas, denominadas células regenerativas (*cf.* Ribeiro *et al.*, 1990). Estas podem ser observadas organizadas em ninhos, compostos por duas a quatro células, na base do epitélio, regularmente espaçadas ao longo de toda a sua extensão. As células regenerativas se dividem por mitose e substituem as células

colunares mais velhas, que se degeneram e são liberadas para a luz do tubo (Terra, 1988; Chapman, 1998). Células regenerativas também podem dar origem às células endócrinas (Dow, 1981; Billingsley & Lahane, 1996). Estas últimas, geralmente, podem ser visualizadas apenas através de microscopia eletrônica (ver adiante).

Na região do VPI, encontram-se as protuberâncias ventriculares. Tais estruturas são constituídas, histologicamente, por um epitélio simples, composto por células grandes e de núcleos arredondados e com microvilosidades apicais. Os canalículos, que se projetam das protuberâncias, são compostos por células arredondadas com microvilosidades apicais, semelhantes às células que compõe os túbulos de Malpighi. A importância de tais estruturas e a comparação de sua morfologia com a dos túbulos de Malpighi será comentada mais adiante. Foi possível constatar, em algumas das protuberâncias, acúmulos de uma substância fortemente corada por eosina amarela. Estes acúmulos ocorrem na pequena abertura da protuberância para a luz do tubo digestivo e parecem indicar a ocorrência de uma secreção de substâncias de caráter básico nos apêndices ventriculares, visto que a eosina é ácida e cora substâncias acidófilas.

Ao longo de toda extensão do ventrículo, de forma mais conspícua nas regiões VM e VP, observa-se a ocorrência de uma membrana peritrófica bastante espessa. Esta membrana envolve o bolo alimentar ao longo do ventrículo e sua importância na digestão de *P. phyllinum* será discutida no tópico seguinte.

O intestino posterior se inicia na região do piloro e é composto por um epitélio simples cúbico e revestido por uma cutícula delgada. Pode-se observar que a membrana peritrófica se estende até o início do intestino posterior, o que já foi observado em alguns insetos (Nation, 2008). No reto, ocorrem áreas de epitélio colunar, muito provavelmente, correspondentes às papilas retais, associadas com a absorção de água e íons da luz do intestino (Wigglesworth, 1972; Cruz-Landim, 1985; Terra, 1988).

Membrana peritrófica e fluxos de água no ventrículo de *P. phyllinum*

Como previamente mencionado e reiterado, a membrana peritrófica constitui uma importante estrutura no sistema digestivo de insetos. Trata-se de uma membrana acelular composta por uma rede de quitina e proteínas (ver revisões em Tellam, 1996; Terra, 2001 e Hegedus, 2009). Esta membrana está presente no intestino médio da maioria dos insetos, com exceção dos Hemiptera e Thysanoptera. Particularmente, nestes últimos grupos, foram observadas estruturas chamadas membranas perimicrovilares. Trata-se de um sistema de membranas lipoprotéicas que revestem as microvilosidades apicais dos enterócitos (Silva *et al.*, 1996; Terra, 2001; Utyiama, 2011). Os relatos da inexistência de membrana peritrófica devem ser vistos com cautela (Terra, 2001), uma vez que em certos insetos, como mosquitos hematófagos, a membrana peritrófica só é secretada após a distensão do tubo digestivo com a alimentação (Richards & Davies, 1997) e, em outros, a membrana peritrófica é parcialmente solubilizada durante a fixação e só pode ser detectada durante a dissecação (Terra, 2001).

A membrana peritrófica apresenta diversas funções. Tradicionalmente, muitos autores ressaltavam apenas a importância do papel de proteção do epitélio contra danos mecânicos causados pelo alimento ingerido (Peters, 1992). Posteriormente, uma função de barreira contra microrganismos foi reconhecida (Peters, 1992; Jacobs-Lorena & Oo, 1996; Tellam, 1996; Lehane, 1997) e muitos autores presumiram ser esta a sua principal função (Lehane, 1997). No entanto, dados mais recentes salientam o papel da membrana peritrófica na compartimentalização da digestão (Terra, 2001).

A título de recordação, a membrana peritrófica pode ser classificada em dois tipos diferentes (Peters, 1992; Terra, 2001): a membrana peritrófica do tipo I e a membrana peritrófica do tipo II. A membrana peritrófica do tipo I é produzida por todo ou por parte do epitélio do intestino médio e envolve o bolo alimentar em toda a extensão do ventrículo. Esse tipo de membrana peritrófica ocorre em todos os Polineoptera e na maioria dos Holometabola. Já a membrana peritrófica do tipo II é secretada por uma região especializada chamada cárdia, sendo observada sempre independentemente da ingestão de alimentos (o que nem sempre ocorre na

membrana do tipo I). A membrana peritrófica do tipo II ocorre em larvas e adultos de moscas e mosquitos não-hematófagos (Diptera) e em alguns Lepidoptera adultos (Terra, 2001).

Em alguns grupos de insetos, a membrana peritrófica pode se organizar na forma de um gel peritrófico, uma substância de consistência gelatinosa e sem uma estrutura membranosa. Isso se deve, provavelmente, à ausência de quitina em sua composição. Em alguns casos, o gel recobre toda a extensão do ventrículo, como nos Bruchidae (Coleoptera). Provavelmente, tal organização se deve ao fato de, nesses insetos, ser necessária uma barreira extremamente permeável entre o conteúdo luminal e o epitélio (Terra, 2001). Em outras espécies de insetos, o gel ocupa apenas uma região do ventrículo (anterior ou posterior), sendo que, nas demais regiões, está presente uma membrana peritrófica estruturada. Isto é devido, provavelmente, ao fato de, nestes insetos a membrana peritrófica ser secretada apenas por uma região do ventrículo. Assim, em insetos onde a membrana é secretada apenas pelo ventrículo posterior, a região anterior é composta por um gel peritrófico, e vice-versa. Um exemplo de tal organização é encontrado no besouro *Dermestes maculatus* (Caldeira *et al.* 2007), no qual a região anterior do ventrículo é recoberta por um gel peritrófico, enquanto que, nas regiões media e posterior, observa-se uma membrana peritrófica estruturada. Uma organização semelhante foi observada em *Apis melífera* (Hymenoptera) por Jimenes & Gillian (1990), bem como em imagos de *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera) (Ferreira & Terra, 1989).

Estudos realizados com o piolho parasita de suínos *Haematopinus suis* (Phytiraptera) mostraram uma ausência de compartimentalização no ventrículo deste animal. Assim, não se observou quaisquer estruturas na luz do tubo digestivo que realizassem tal função. Não se constatou a presença nem de uma membrana peritrófica, nem de um gel peritrófico ou mesmo de uma membrana perimicrovilar (Gonçalves, 2002). Neste caso, o autor propôs a formação de coágulos de sangue ingerido no interior do ventrículo do animal, onde as enzimas digestivas agiriam a partir de suas periferias, digerindo-os gradualmente de fora para dentro. Desta forma, o coágulo proporcionaria uma certa compartimentalização do processo digestivo nessa espécie.

Em Orthoptera, grupo proximamente relacionado aos Phasmida, geralmente está presente, ao longo de todo o ventrículo, uma conspícua membrana peritrófica do tipo I. Nos gafanhotos *Abracris flavolineata* e *Locusta migratória*, foi constatada, ainda, a presença de um gel peritrófico na região dos cecos gástricos (Terra, 2001). O mesmo foi identificado no grilo *Gryllus bimaculatus* (Woodring & Lorenz, 2007), bem como em *Gryllodes sigilatus* (Biagio *et al.*, 2009).

Na espécie estudada no presente trabalho, *P. phyllinum*, também, pôde ser observada, de forma clara, a presença de uma membrana peritrófica do tipo I ao longo de todo o ventrículo, envolvendo o bolo alimentar. Tal constatação pôde ser feita tanto durante as dissecções, quanto em cortes histológicos. Entretanto, também foi realizada a comprovação experimental de sua existência através de microscopia de fluorescência com a utilização de WGA-FITC (aglutinina do gérmen do trigo ligada à fluoresceína). Como já visto, o WGA é uma lectina que se liga especificamente à quitina na presença de excesso de N-acetilglicosamina (Peters & Latka, 1986; Bolognesi *et al.*, 2001; Terra, 2001), servindo, portanto, como marcador para a presença de membrana peritrófica. Estes experimentos confirmaram as observações morfológicas prévias, constatando a ocorrência de uma conspícua membrana peritrófica ao longo de todo o ventrículo de *P. phyllinum*. Pôde-se comprovar, ainda, que a fluorescência da membrana peritrófica parece mais intensa, refletindo um maior número de camadas, nas regiões do VM e do VP, sendo, entretanto, menos intensa na região do VA.

Como já relatado, a presença de uma membrana peritrófica acarreta numa compartimentalização dos eventos da digestão, dividindo a luz do intestino em um espaço endoperitrófico (no interior da membrana peritrófica) e um espaço ectoperitrófico (no exterior da membrana peritrófica). Tal organização permite a criação de um contra-fluxo de água na região ectoperitrófica da região posterior para a região anterior do ventrículo, contrário ao fluxo antero-posterior do alimento ingerido. Tal contra-fluxo geralmente é estabelecido pela secreção de água realizada por células da região posterior do ventrículo e por sua absorção na região anterior (ou pelos cecos gástricos, quando presentes) (Santos & Terra, 1986; Ribeiro *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1990; Jordão *et al.*, 1996a, b). Esta organização do sistema

digestivo permite uma economia de enzimas digestivas, uma vez que estas podem ser reutilizadas diversas vezes.

Este modelo de recirculação de enzimas digestivas já foi observado em insetos de diferentes ordens (ver revisões em Terra, 1988; Terra, 1990; Ribeiro *et al.*, 1990 e Terra & Ferreira, 1994) e foi, como previamente relatado, primeiramente constatado em larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera, Nematocera) (Ferreira *et al.*, 1981). Nestes animais, o conteúdo da membrana peritrófica apresenta-se pastoso, enquanto que o conteúdo do espaço ectoperitrófico, praticamente, se restringe à região luminal dos dois cecos gástricos presentes nesta espécie. Tais características facilitaram os estudos realizados, pois permitiram a dissecação e o isolamento da membrana peritrófica com seus conteúdos sem quase nenhuma perda de enzimas, bem como a obtenção quase total de material ectoperitrófico através da perfuração dos cecos gástricos com um capilar. Desta forma, ensaios enzimáticos realizados tanto na fração epitelial, quanto nas amostras provenientes dos espaços endo e ectoperitróficos mostraram que algumas das enzimas secretadas penetram no espaço endoperitrófico (tripsina, amilase e celulase), enquanto outras enzimas são secretadas e permanecem no espaço ectoperitrófico (trease e aminopeptidase). Finalmente, as dissacaridases (exceto a trease), dipeptidases e fosfatases são encontradas, principalmente, nas células dos cecos gástricos (Terra *et al.*, 1979).

Estes resultados, aliados a dados provenientes de técnicas de fracionamento celular (Ferreira & Terra, 1980; Klinkowstrom *et al.*, 1994), levaram à proposta de que, neste inseto, a digestão inicial se dá no espaço endoperitrófico pela ação de enzimas como a tripsina e a amilase. Uma vez que o alimento tenha sido inicialmente digerido, este, então, atravessa a membrana até o espaço ectoperitrófico, onde a digestão intermediária prossegue reduzindo o alimento até dímeros e/ou oligômeros. Finalmente, a maior parte da digestão final ocorre nas microvilosidades das células dos cecos e, em menor extensão, nas microvilosidades das células da região posterior do ventrículo.

Estudos semelhantes àqueles descritos acima para *R. americana*, realizados na larva de Lepidoptera *Erinnyis ello*, mostraram que, nesta espécie, a compartimentalização de enzimas digestivas, bem como a circulação endo-ectoperitrófica, eram semelhantes à presente em Diptera (Santos *et al.*, 1983; 1984;

1986). Em *E. ello*, no entanto, cecos gástricos estão ausentes. Sendo assim, nestes insetos, a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, enquanto que a digestão intermediária e final ocorrem junto ao epitélio ventricular. O contra-fluxo neste inseto é estabelecido através da água é secretada pelo ventrículo posterior e absorvida pela região anterior do ventrículo. Assim, a região anterior do ventrículo realiza, em *E. ello*, um papel semelhante aos cecos gástricos em *R. americana* (Santos *et al.*, 1986).

Não existe até o momento, na literatura, nenhum estudo que descreva a organização espacial da digestão em Phasmida. Entretanto, é interessante comparar aspectos da fisiologia digestiva em *P. phyllinum* com aqueles apresentados por representantes da Ordem proximamente relacionada dos Orthoptera (Wheeler *et al.*, 2001; Grimaldi & Engel, 2005). A ordem Orthoptera pode ser dividida em duas subordens: os Ensiphera (que incluem os grilos e esperanças), e os Caeliphera (grupo composto pelos gafanhotos).

Dentro da sub-ordem Ensiphera, a organização fisiológica dos eventos da digestão parece ser semelhante à descrita em *R. americana*. Em estudos com a espécie de grilo *Grillus bimaculatus*, foi constatado que a digestão tem início na região do papo por enzimas secretadas pelos cecos e ventrículo (Woodring & Lorenz, 2007; Woodring *et al.*, 2007). O alimento semi-digerido é, então, mecanicamente triturado pelo proventrículo, que, nesta espécie, porta fileiras de dentes quitinosos desenvolvidos (constituindo uma moela), e segue para o ventrículo anterior. O alimento atravessa a membrana peritrófica à medida em que vai sendo digerido, sendo carregado pelo contra-fluxo de água do espaço ectoperitrófico. A digestão intermediária e final provavelmente ocorre junto aos cecos gástricos.

Nosso grupo de pesquisa, trabalhando com o grilo *Grylodes sigillatus* (Biagio *et al.*, 2009), mostrou uma fisiologia digestiva semelhante à descrita acima, com a digestão inicial tendo início no papo e ventrículo anterior e a digestão intermediária e final ocorrendo junto aos cecos gástricos. Para esta espécie, foram realizadas, ainda, experimentos com ingestão e injeção na hemolinfa do corante amarantho, com a finalidade de identificar sítios de absorção e secreção de água ao longo do ventrículo. Foi verificado que, enquanto o ventrículo posterior secreta água na luz do

ventrículo, o principal sítio de sua absorção neste inseto se encontra no ventrículo anterior, sendo que os cecos gástricos constituem um sítio secundário de absorção.

Por outro lado, trabalhos realizados com membros da outra sub-ordem que compõe os Orthoptera, Caeliphera, revelaram diferenças significativas na organização da digestão. Estudos realizados em *Abracris flavolineata*, pelo nosso grupo, revelaram que, neste animal, a digestão se inicia no papo por enzimas provenientes dos cecos gástricos, sendo que o conteúdo do intestino médio passa para o intestino anterior através de anti-peristaltismo (Ferreira *et al.*, 1990; Marana *et al.*, 1997). Três horas após a refeição, o alimento entra no ventrículo e a digestão final de carboidratos, bem como a digestão inicial e final de proteínas, ocorre nos cecos gástricos localizados anteriormente. É interessante notar que tais animais não apresentaram uma taxa de excreção reduzida de enzimas digestivas, indicando a ausência de circulação endo-ecto peritrófica. De fato, experimentos com a administração de corantes revelaram que, nestes animais, um contra-fluxo de água é estabelecido apenas na condição de jejum. Os autores constataram que, nesta condição, os cecos gástricos são os principais sítios de absorção, enquanto que os túbulos de Malpighi funcionam como sítios de secreção de água para a luz do intestino. Parte da água secretada pelos túbulos de Malpighi segue para o intestino posterior (para re-absorção e excreção) e parte segue para o ventrículo, estabelecendo um contra-fluxo de água. Foi observado, ainda, que, nestes animais, ocorre uma intensa salivação durante a alimentação. É provável, portanto, que quando o animal se alimenta, ocorra a saturação dos sítios de absorção de água nos cecos gástricos e cesse, assim, a contra-corrente de água que assegura a recirculação de enzimas digestivas. Um fenômeno semelhante ao de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas também foi comprovado em outra espécie de gafanhoto, *Schistocerca gregária*, por Dow (1981). Da mesma forma, nesta espécie, este contra-fluxo ocorre apenas quando o animal se encontra em jejum.

A ausência de um sistema de contra-corrente nos gafanhotos, apesar de todas as suas evidentes vantagens, provavelmente tem a função de evitar um acúmulo excessivo de substâncias tóxicas nos cecos gástricos (como alcalóides e taninos), possibilitando, assim, a intensa taxa de ingestão de alimento observada nestes animais (Dow, 1981; Terra, 1990). Na grande maioria dos insetos, o acúmulo de

substâncias tóxicas no sistema digestivo é mitigado pelo fato de que, nesses animais, o sítio de secreção de água é o ventrículo posterior e não os túbulos de Malpighi (Terra, 1988; 1990; Ferreira *et al.*, 1990).

Experimentos com corante foram, também, realizados em *P. phyllinum* ao longo deste trabalho. Animais submetidos à injeção na hemolinfa ou ingestão de amarantho foram dissecados após diferentes períodos de tempo. Os períodos foram determinados a partir de estimativas do tempo de trânsito do alimento no sistema digestivo do animal, que é de cerca de 12 horas.

A ingestão de corante revelou uma marcação no epitélio junto à face voltada para a luz do tubo digestivo na região do VA, o que é um indicativo de que este deve ser o sítio principal de absorção de água em *P. phyllinum*. Esta marcação no epitélio foi constatada tanto em animais alimentados *ad libitum*, como em animais em jejum. Foi observado, ainda, que, em animais em jejum, o corante se acumulava no conteúdo do ventrículo de forma que, mesmo após 18 horas, foi constatada sua presença ao longo do conteúdo ventricular. Em animais alimentados, por outro lado, após o mesmo período de tempo, o amarantho havia atravessado todo o ventrículo, não mais se acumulando em sua luz. Entretanto, nos dois casos, detectou-se marcação no epitélio do VA.

Experimentos de injeção do corante na hemolinfa, por outro lado, não revelaram qualquer marcação na face externa do tubo digestivo em nenhuma região do ventrículo em *P. phyllinum*. Este resultado indica a não existência de um transporte de água muito significativo entre a hemolinfa e a luz do ventrículo através de seu epitélio. Contudo, tanto em animais alimentados *ad libitum*, quanto em animais mantidos em jejum, observou-se uma marcação significativa de corante nos túbulos de Malpighi, indicando ser este o principal sítio de tomada de água da hemolinfa para o tubo digestivo. Em animais alimentados *ad libitum*, a marcação do corante no conteúdo foi detectada, principalmente, no intestino posterior, embora uma pequena faixa de marcação tenha sido, também, constatada no VP, na região do VP II. Este padrão de marcação foi observado nos diferentes tempos em que os experimentos foram realizados. A injeção de corante na hemolinfa em animais previamente mantidos em jejum mostrou, igualmente, a tomada de corante pelos túbulos de Malpighi. No entanto, nesta condição, foi observada a existência de

amaranto em porções variadas no conteúdo ventricular, além de sua presença no intestino posterior. Assim, após 2 horas, foi detectada a presença de corante no conteúdo do VM e, após 4 horas, o amaranto já havia se difundido em direção à região anterior, já na luz do VA. Em animais dissecados mais de 16 horas após injeção do corante na hemolinfa, pôde-se observar, além da difusão do corante por todo o conteúdo ventricular e do intestino posterior, uma leve marcação na face luminal da região do VA. Tal marcação corrobora os dados obtidos com experimentos de ingestão de corante, indicando a ocorrência de absorção de água no epitélio do VA. É importante salientar que, em nenhum dos experimentos, foi constatada a marcação nos canalículos, sugerindo que essas estruturas possuem um papel fisiológico distinto daquele apresentado pelos túbulos de Malpighi.

É interessante notar, em experimentos de injeção de corante na hemolinfa, a presença do corante no interior do tubo digestivo. O corante foi observado no VP e no intestino posterior em animais alimentados *ad libitum* e ao longo de todo o ventrículo (incluindo o VP) e intestino posterior em animais em jejum. Estas observações indicam que o corante está sendo tomado da hemolinfa e transportado para o interior do tubo digestivo pelos túbulos de Malpighi, uma vez que apenas nestas estruturas, e em nenhuma região do ventrículo, foi possível observar a difusão do amaranto pelo epitélio. Experimentos com o mesmo corante revelaram resultados semelhantes no grilo *G. supplicans* (Biagio *et al.*, 2009). Nesta espécie, o amaranto injetado no animal é transferido da hemolinfa para a luz do tubo digestivo (na região do intestino posterior) pelos túbulos de Malpighi, enquanto que a marcação com amaranto nas regiões ventriculares, responsáveis pela secreção de água para a luz do ventrículo, se dá através da presença do corante adsorvido à face externa do epitélio. O mesmo ocorre no gafanhoto *A. flavolineata* (Marana *et al.*, 1997), no qual o corante injetado na hemolinfa é transportado pelos túbulos de Malpighi para a luz do intestino posterior, difundindo-se, neste caso, para o ventrículo do animal em jejum. Assim, em resumo, os túbulos de Malpighi parecem ser capazes de transportar o amaranto através de seu epitélio, ao contrário do ventrículo, onde o corante não se difunde pelo epitélio, ficando apenas a ele adsorvido, identificando as regiões de tomada de água.

À primeira vista, os resultados obtidos através de experimentos com a utilização de amaranço parecem mostrar que, em *P. phyllinum*, a organização dos eventos da digestão deve se dar de forma semelhante ao que ocorre no gafanhoto *A. flavolineata*. Assim, ocorre, nos dois casos, o estabelecimento de um contra-fluxo de água apenas na condição de jejum, sendo que os túbulos de Malpighi atuam como principal região de tomada de água da hemolinfa. Experimentos de ingestão de corante revelaram, ainda, que o VA deve ser a região absorptiva preferencial em *P. phyllinum*, fazendo o papel dos cecos gástricos de *A. flavolineata*, ausentes na espécie estudada.

Esta hipótese, de que os fluxos de água em *P. phyllinum* são semelhantes aos observados em gafanhotos, entretanto, não leva em consideração observações de natureza morfológica ultraestrutural dos enterócitos que compõem o ventrículo, e nem dados acerca da distribuição de enzimas digestivas neste animal. Ambos parecem mostrar que existe uma maior complexidade nos fluxos de água estabelecidos ao longo do ventrículo desta espécie de bicho-pau, do que aquela revelada pelos experimentos com corante, como será discutido adiante.

Análise ultraestrutural do ventrículo de *P. phyllinum*

Aspectos gerais da ultraestrutura das células ventriculares

A análise ultraestrutural foi restrita à região do ventrículo de *P. phyllinum*, uma vez que, em insetos, esta região é responsável pelos eventos mais importantes da digestão, como produção e secreção de enzimas digestivas, além da absorção de nutrientes (Terra, 1988; Ribeiro *et al.*, 1990). Como será discutido, foi possível identificar diferenças na morfologia dos enterócitos nas diferentes regiões, relacionadas, principalmente, aos aspectos da atividade secretora, do tamanho e aparência das microvilosidades e com relação à organização das especializações da membrana plasmática basal.

O epitélio do ventrículo de *P. phyllinum* segue o padrão morfológico geral observado na maioria dos insetos (Ribeiro *et al.*, 1990), apresentando três tipos celulares distintos: células regenerativas, células endócrinas e enterócitos.

As células regenerativas, como descrito nos resultados deste trabalho, são bem evidenciadas nas preparações histológicas e se organizam em agrupamentos (ou ninhos) na base do epitélio. Apresentam características típicas de células indiferenciadas, com o núcleo ocupando a maior parte do volume da célula, bem como um citoplasma pobre em organelas (Fawcett, 1981). O processo de renovação do epitélio a partir da diferenciação das células regenerativas parece ser um mecanismo comum entre os insetos (Cavalcante & Cruz-Landim, 1999), tendo sido observado em várias espécies deste grupo (Terra 1988; Chapman, 1998). Observações experimentais realizadas por Endo & Nishiitsutsuji-Uwo (1982) em *Periplaneta americana* revelaram que, nesta espécie, as células regenerativas se diferenciam tanto em enterócitos, quanto em células endócrinas, sendo que as que dão origem às últimas se caracterizam por seu tamanho reduzido e citoplasma pouco eletrondenso.

As células endócrinas, por sua vez, puderam ser visualizadas em *P. phyllinum* apenas em preparações para microscopia eletrônica. Tratam-se de células de formato piramidal, que não exibem invaginações na membrana plasmática basal e sua superfície apical não atinge o ápice do epitélio. Estas células possuem o citoplasma rico em vesículas pequenas e de alta eletrondensidade. Tais células seguem o padrão das células endócrinas encontradas em diversos insetos que, em geral, apresentam um formato piramidal ou em garrafa (Cavalcante & Cruz-Landim, 1999). Estas células, como o próprio nome indica, devem participar no processo de regulação hormonal da fisiologia dos insetos. Em *P. americana*, por exemplo, as células endócrinas correspondem, ultraestruturalmente e também imunohistoquimicamente, às células endócrinas dos vertebrados (Endo *et al.*, 1983). Além disso, estudos realizados nesse mesmo inseto demonstraram a existência de hormônios polipeptídicos semelhantes aos pancreáticos, somatostatina e enteroglucagon. Isto sugere que as células endócrinas do sistema digestivo dos insetos são funcionalmente similares às células endócrinas do sistema digestivo de vertebrados,

com a função de produzir e secretar hormônios que devem atuar no epitélio intestinal (Iwanaga *et al*, 1981).

O terceiro e principal tipo celular encontrado no epitélio do ventrículo de *P. phyllinum* é o enterócito, que possui uma morfologia bastante característica. Como todas as células colunares, os enterócitos se caracterizam por serem células altas e polarizadas, possuindo uma região apical claramente distinta da região basal. A membrana plasmática apical apresenta especializações na forma de microvilosidades. Tais microvilosidades encontram-se recobertas por um glicocálix e, em seu interior, podem ser observados feixes longitudinais de microfilamentos que se estendem na direção ao citoplasma apical, fazendo parte da chamada trama terminal (Junqueira & Carneiro, 2005). Nas membranas laterais de células adjacentes é possível identificar as junções intercelulares. Assim, podem ser observados, apicalmente, desmossomos, que possuem função adesiva (Lane, 1984), seguidos por zonas de junções septadas lisas. Estas últimas, por sua vez, são responsáveis por promover a coesão celular e proporcionar a formação de uma barreira de permeabilidade no epitélio, controlando, assim, a difusão paracelular de pequenas moléculas e íons, bem como impedindo a passagem de moléculas maiores. Desempenham, pois, um papel semelhante ao das zônulas de oclusão presentes no epitélio de vertebrados (Lane & Skaer, 1980; Weiss, 1983; Lane, 1984). As barreiras de permeabilidade possuem uma grande importância fisiológica, pois contribuem para a manutenção das diferenças de composição extracelular nas duas faces do epitélio (Green *et al.*, 1983; Lane, 1984; Junqueira & Carneiro, 2005).

O citoplasma dos enterócitos é rico em organelas relacionadas com a rota secretora (Rothman & Orcy, 1992), compreendendo um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, várias áreas de Golgi e muitas vesículas secretoras, especialmente nas regiões do VA e do VM.

Ao contrário do observado nas células de vertebrados, nos insetos não existe um único complexo de Golgi por célula. Nestes animais, diversas áreas de complexo de Golgi, denominadas dictiossomos, são frequentemente observadas (Mollenhauer & Moore, 1994; Pirch & Greven, 1994). Em *P. phyllinum*, estas organelas localizam-se, principalmente, próximas ao núcleo e na metade apical da célula. São formadas por conjuntos de cisternas, muitas vezes com extremidades dilatadas e em

número variável. Associadas à essas cisternas, podem ser encontradas diversas vesículas de secreção, de perfil circular, cuja morfologia varia de acordo com a região ventricular ocupada pela célula (ver adiante).

Na porção do VPI, como descrito nos resultados, os enterócitos apresentam características muito peculiares quando comparadas com as demais regiões do ventrículo. Assim, a região apical das células desta região apresenta um citoplasma pouco eletrondenso e pobre em organelas. As microvilosidades também mostram um tamanho reduzido em relação às demais regiões e exibem dilatações em suas extremidades. A realização de diversas técnicas de fixação produziu resultados idênticos, descartando a hipótese de que a tais características representassem artefatos em resposta a uma fixação inapropriada.

Foi observada, ainda, uma grande quantidade de mitocôndrias, em especial nas regiões apicais e basais das células. Na região apical, elas podem ser encontradas, principalmente, em uma faixa logo abaixo às microvilosidades, o que deve ser resultado de um maior consumo de energia por enzimas e sistemas de transporte ligados a membrana apical. Já na região basal, as mitocôndrias são observadas associadas às invaginações da membrana plasmática basal, cujas características serão discutidas a seguir.

A organização das invaginações da membrana plasmática basal nos enterócitos

Um importante aspecto morfológico presente nos enterócitos das diversas ordens de insetos é a ocorrência, nessas células, de especializações da membrana plasmática basal, que se invaginam formando verdadeiros labirintos membranosos, com muitas mitocôndrias associadas. Tal arranjo da membrana plasmática basal está, normalmente, relacionado com o transporte de água e íons através do epitélio (Threadgold, 1976; Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984; Junqueira & Carneiro, 2005). O estudo realizado com a espécie *Rhynchosciara americana* por Ferreira *et al.* (1981), previamente descrito, também analisou a organização deste sistema de invaginações da membrana plasmática basal dos enterócitos, introduzindo a base morfológica para o modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas.

Os autores verificaram que as invaginações presentes nos cecos gástricos formam um compartimento extracelular que possui acesso restrito à hemolinfa, devido à presença de poucas aberturas das invaginações para o espaço extracelular. Tal organização estrutural deve permitir à célula concentrar solutos nesse compartimento, criando, assim, um gradiente de pressão osmótica entre o mesmo e o lúmen ventricular, auxiliando, portanto, na tomada de água da luz, como deve ocorrer na região do reto (Berridge, 1970; Ribeiro *et al.*, 1990). Em contraste, células que compõem os primeiros dois terços do ventrículo de *R. americana* possuem invaginações da membrana plasmática basal mais elaboradas, associadas à mitocôndrias, que se estendem até quase o ápice do enterócito. Essas invaginações apresentam um grande número de aberturas para o espaço extracelular, organização semelhante à encontrada em células com função secretora, como os túbulos de Malpighi (Berridge, 1970; Ribeiro *et al.*, 1990). Estas observações estão de acordo com a idéia de que os cecos gástricos são responsáveis pela absorção de água e que o ventrículo esteja ligado à sua secreção, movimentando a circulação endo-ectoperitrofica de enzimas digestivas em *R. americana* (Ferreira *et al.*, 1981).

Como se recorda, na larva da mariposa *Erinnyis ello*, o fluxo de água estabelecido no sentido póstero-anterior é semelhante ao descrito para *R. americana*, com a diferença de que, em *E. ello*, os cecos gástricos estão ausentes. De fato, experimentos com a utilização de corantes confirmaram que a parte anterior do ventrículo é responsável pela absorção de água da luz, realizando, neste inseto, o papel dos cecos. Observações ultraestruturais, por sua vez, mostraram que as células que compõem esta região ventricular parecem estar muito bem adaptadas a tal função. Assim, os enterócitos apresentam superfície apical modificada na forma de microvilosidades e membrana plasmática basal exibindo numerosas invaginações, com muitas mitocôndrias associadas e poucas aberturas para a hemolinfa (Santos *et al.*, 1983). Ainda, segundo o modelo, admite-se que a região posterior do ventrículo de *E. ello* deva ser capaz de secretar água para a luz do ventrículo. Mais uma vez, a utilização de corantes como traçadores e as características morfológicas exibidas pelas células desta região são compatíveis com a função presumida. Sendo assim, os enterócitos apresentam uma membrana plasmática apical modificada na forma de microvilosidades, bem como uma membrana plasmática basal muito invaginada,

com inúmeras mitocôndrias associadas e numerosas aberturas para a hemolinfa (Santos *et al.*, 1983).

Foi feita, também, uma análise morfológica detalhada do tubo digestivo de larvas de *Musca domestica* (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987; Terra *et al.*, 1988). Mais uma vez, experimentos realizados com corantes evidenciaram os locais de tomada e secreção de água ao longo do tubo digestivo. Assim, nesta espécie, a região mediana do ventrículo parece ser o principal sítio de absorção de água (Terra *et al.*, 1988). De fato, esta região é rica em células denominadas células intersticiais, caracterizadas pela presença de invaginações da membrana plasmática basal formando uma rede complexa de pequenos canais longos e estreitos, em arranjo paralelo, com muitas aberturas para a hemolinfa e mitocôndrias associadas. A concentração de íons no interior desses canais, que por serem muito longos e estreitos, apresentam um acesso restrito para a hemolinfa, gerando um gradiente osmótico responsável pela tomada de água da luz ventricular. Este arranjo da membrana plasmática basal, apresentado pelas células intersticiais em *M. domestica*, é funcionalmente equivalente ao arranjo em que as invaginações da membrana plasmática basal formam canais dilatados e ramificados com poucas aberturas para a hemolinfa, representados pelos cecos gástricos de *R. americana*, comentados acima.

Dentro dos Orthoptera, nosso grupo realizou estudos morfológicos do sistema digestivo tanto no grilo *Grylodes supplicans* (Biagio *et al.*, 2009), quanto no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Marana *et al.*, 1997). No caso do grilo, observou-se que tanto os cecos gástricos, quanto a região proximal do ventrículo anterior constituem os principais sítios de absorção de água do intestino médio. De fato, verificou-se que os enterócitos dessas regiões possuem labirintos basais com mitocôndrias associadas e poucas aberturas para a lâmina basal. Da mesma forma, constatou-se, nesta espécie, que as regiões média e posterior do ventrículo são responsáveis pela tomada de água da hemolinfa e sua secreção na luz ventricular. Labirintos basais das células destas regiões apresentam-se bastante elaborados, com muitas mitocôndrias associadas e com um número grande de aberturas para a lâmina basal.

Como relatado em gafanhotos, a circulação endo-ectoperitrófica de enzimas ocorre apenas quando os animais estão em jejum. Estudos realizados em *A.*

flavolineata (Marana *et al.*, 1997) evidenciaram que, nesses insetos, os cecos gástricos, ventrículo anterior e ventrículo médio possuem características morfológicas de absorção de fluídos. De fato, enterócitos dessas regiões possuem invaginações da membrana plasmática basal formando canais estreitos e ramificados bem desenvolvidos que se abrem para a hemolinfa. No ventrículo posterior, por sua vez, o labirinto formado pela invaginação da membrana plasmática basal é pouco desenvolvido.

Em *P. phyllinum*, também foram observadas diferenças na organização dos labirintos basais ao longo do ventrículo. Na região do VA, pôde ser verificada a ocorrência de um labirinto pouco desenvolvido em extensão, formado por invaginações de pequeno calibre e com poucas aberturas para a lâmina basal. A presença de um sistema de um labirinto basal com estas características é indicativa, tanto no VA quanto no VM, de atividade absorptiva de água nessas células (Ribeiro *et al.*, 1990). É importante recordar que estas observações estão de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de ingestão de corante, nos quais apenas a região do VA mostrou-se corada, indicando que, aparentemente, esta é a região onde deve ocorrer uma absorção luminal significativa de água, impulsionando a circulação endo-ectoperitrofica de enzimas digestivas. No VM, observou-se um labirinto com invaginações de calibre semelhante ao do VA, porém mais desenvolvido em extensão e com um número um pouco maior de aberturas para a lâmina basal. Em contraste, ao longo de todo o VP, o labirinto basal exibe características claramente distintas. Esta região se apresenta bastante extensa, com invaginações da membrana plasmática basal se estendendo até metade das células, com inúmeras aberturas para a lâmina basal. Pôde ser observado, ainda, um grande número de mitocôndrias associadas a este labirinto basal. Estas características morfológicas apresentadas pelo VP são indicativas de uma atividade de transporte de água e íons da hemolinfa para a luz ventricular (Ribeiro *et al.*, 1990). Entretanto, experimentos de injeção de corante na hemolinfa não revelaram transporte de água nesta região do ventrículo. Existe, pois, a possibilidade de que a região do VP possa contribuir para o transporte de água da hemolinfa para a luz ventricular, mas em níveis não detectáveis pelos experimentos com corante.

Mecanismos de secreção existentes nos enterócitos

São conhecidos três mecanismos principais para a liberação de secreções sintetizadas pelas células: o merócrino, o apócrino e o holócrino (Weiss, 1983; Junqueira & Carneiro, 2005). No mecanismo de secreção do tipo merócrino, ocorre um processo de fusão da membrana envolvente das vesículas secretoras com a membrana plasmática apical da célula, num processo denominado de exocitose (Avery *et al.*, 1999), que resulta na liberação do conteúdo da vesícula para o meio externo. Em vertebrados, este é o mecanismo de secreção que ocorre em células do pâncreas exócrino e nas glândulas salivares (Segawa, 1998; Junqueira & Carneiro, 2005). Em insetos, este mecanismo de secreção foi observado no sistema digestivo de diversas espécies como, por exemplo, em *Tenebrio molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001), em *Erinnys ello* (Santos *et al.*, 1986), em *Periplaneta americana* (de Lima, 2004), em *Stomoxys calcitrans* (Jordão *et al.*, 1996b) e em *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999).

Na secreção apócrina, as vesículas de secreção são eliminadas com porções do citoplasma apical (Gesase & Satoh, 2003). Em vertebrados, este tipo de secreção é observado em glândulas sudoríparas e mamárias de mamíferos (Junqueira & Carneiro, 2005). No sistema digestivo de insetos, secreção do tipo apócrina foi constatada no ventrículo de *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001), bem como no de *Dermestes maculatus* (Caldeira *et al.* 2007). Um modelo variante da secreção apócrina foi, também, reconhecido em diversas espécies de insetos. Trata-se do mecanismo de secreção denominado de microapócrino (Santos *et al.*, 1983), onde as vesículas de secreção penetram pelo interior das microvilosidades e, então, são liberadas para a luz como vesículas exibindo dupla membrana, através da porção lateral ou apical das microvilosidades. Tal mecanismo foi por nós constatado em espécies de Lepidoptera, como *E. ello* (Santos, *et al.*, 1983), *S. frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999), bem como no piolho *Haematopinus suis* (Gonçalves, 2002).

Por fim, na secreção do tipo holócrina, todo o conteúdo celular, inclusive o núcleo, é liberado junto com o produto da secreção (Junqueira & Carneiro, 2005). Tal mecanismo é observado em glândulas sebáceas de mamíferos, bem como em glândulas salivares de moluscos (Junqueira & Carneiro, 2005; Moura *et al.*, 2004).

Em insetos, secreção holócrina foi descrita no tubo digestivo de *Apis mellifera* (Jimenez & Gilliam, 1990).

No caso da espécie estudada no presente trabalho, foram constatadas diferenças importantes entre os enterócitos das diferentes regiões do ventrículo quanto ao aspecto secretor. Assim, enterócitos do epitélio do VA e do VM apresentaram evidências da ocorrência de um mecanismo de secreção do tipo merócrino. No VA, foram observadas vesículas secretoras delimitadas por uma membrana simples e de contorno circular, exibindo um conteúdo com duas regiões distintas: uma região eletrondensa em forma de “meia lua” e uma região menos eletrondensa. Tais vesículas puderam ser observadas junto à dictiossomos, no citoplasma apical, assim como junto ao ápice da célula, seguindo a rota intracelular de secreção.

No VM, por sua vez, foi constatada a ocorrência de vesículas secretoras com características diferentes daquelas observadas em VA. Junto ao ápice, no citoplasma apical e próximas aos dictiossomos elas apresentavam-se bastante eletrondensas.

É importante salientar que tanto na região do VA, quanto na região do VM não foi observada a ocorrência de figuras típicas e inequívocas de exocitose. No entanto, a extrema proximidade das vesículas de secreção com a membrana plasmática apical, a observação de imagens sugerindo uma fusão das membranas vesiculares com membranas apicais, bem como os resultados de experimentos de imunocitoquímica, apontam fortemente para a ocorrência de um processo exocítico nessas regiões do ventrículo de *P. phyllinum*. Exemplos semelhantes foram descritos no intestino de outros insetos, como *D. maculatus* (Caldeira *et al.*, 2007), *G. sigilatus* (Biagio *et al.*, 2009), *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001), *A. flavolineata* (Marana *et al.*, 1997), *P. americana* (de Lima, 2004), *E. ello* (Santos *et al.*, 1986) e *M. domestica* (Jordão *et al.*, 1996a).

Por outro lado, nos enterócitos que compõem o VP, foi observada uma forma diversa de secreção. Na região do VPI, foram evidenciadas dilatações nas pontas das microvilosidades, algumas das quais exibindo pequenas vesículas de baixa eletrondensidade em seu interior. O mesmo foi constatado na região do VP II. Entretanto, como nesta última região as microvilosidades possuem um tamanho maior, foi possível evidenciar a presença de dilatações contendo pequenas vesículas

não apenas nas pontas das microvilosidades, mas também ao longo de seu comprimento. A presença de vesículas associadas com microvilosidades já foi observada em diversos insetos. Tais observações sugerem a ocorrência de uma secreção do tipo microapócrina, que consiste na eliminação de pequenas vesículas, com uma ou duas membranas, do ápice das microvilosidades celulares ou ao longo de seu comprimento (Santos *et al.*, 1986; Cristofolletti *et al.*, 2001). Alguns pesquisadores interpretaram tais estruturas como se tratando de artefatos (Cruz-Landim *et al.*, 1996). No entanto, secreção do tipo microapócrina foi experimentalmente demonstrada como refletindo um mecanismo funcional natural do enterócito, com comprovação imunocitoquímica tanto em *E. ello* (Santos *et al.*, 1986), quanto em *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999).

A ocorrência de dois mecanismos de secreção diferentes ao longo do tubo digestivo de *P. phyllinum* sugere que cada uma dessas regiões contribua de maneira diversa para a formação do produto secretor final na luz ventricular. De fato, como veremos mais adiante, experimentos de imunomarcagem mostram que apenas as regiões do VA e do VM apresentam vesículas secretoras contendo amilase e tripsina, estando as duas enzimas ausentes em VP.

A presença de dois mecanismos de secreção distintos no ventrículo de *P. phyllinum* não é um fato inusitado, uma vez que tal constatação já foi feita para representantes de diversas ordens de insetos. No besouro *D. maculatus*, por exemplo, foi constatada, em seus enterócitos, a ocorrência tanto de secreção merócrina por exocitose, quanto de secreção apócrina, sendo que este último tipo de secreção concentrava-se nos cecos e ventrículo anterior (Caldeira *et al.*, 2007). Da mesma forma, em outro Coleoptera, *T. molitor*, também foram constatados esses dois tipos de secreção. Nesta espécie, verificou-se que a secreção apócrina era realizada por células da região anterior do ventrículo, enquanto que a secreção merócrina estava presente apenas na região posterior. Um padrão semelhante foi observado em *G. supplicans*, no qual células dos cecos gástricos realizavam secreção do tipo apócrina, enquanto que a secreção merócrina, através de exocitose, foi constatada ao longo do ventrículo e também nos cecos. Entre os Lepidoptera, foi verificado que, em *E. ello* e em *S. frugiperda*, o ventrículo anterior realiza secreção

do tipo microapócrina, enquanto que o ventrículo posterior secreta através de um mecanismo merócrino (Santos *et al.*, 1983; Jordão *et al.*, 1999).

Imunolocalização ultraestrutural de amilase e tripsina

Como apresentado nos resultados deste trabalho, experimentos de “western blot” apontaram a ocorrência de homologia entre os anticorpos anti-tripsina de *M. domestica* e anti-amilase de *T. molitor* e as respectivas enzimas em *P. phyllinum*. As bandas correspondentes à amilase de *P. phyllinum* apresentaram, juntamente com o controle positivo (homogeneizado do intestino de *T. molitor*), um peso molecular em torno de 65 kDa, o que é esperado para tal enzima (Cristofolletti *et al.*, 2001). Já para tripsina, a banda obtida a partir do controle positivo (homogeneizado do intestino de *M. domestica*), indicou um peso molecular próximo de 30 kDa, o que, mais uma vez, está de acordo com o peso molecular apresentado para essa enzima (Jordão *et al.*, 1996a). A banda obtida a partir do homogeneizado do epitélio ventricular de *P. phyllinum*, por outro lado, apontou uma massa molecular de aproximadamente 60 kDa. Foi proposta, então, a possibilidade da tripsina encontrar-se organizada na forma de dímeros no ventrículo de *P. phyllinum*. Tal hipótese foi testada através da realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições semi-desnaturantes (ver material e métodos). A atividade de tripsina foi, então, detectada através da aplicação de substrato Z-FR-MCA 1 mM sobre o gel e constatação da fluorescência emitida pela liberação do MCA, indentificando, assim, a banda referente à tripsina no gel. O procedimento revelou, em homogeneizados de *P. phyllinum*, uma banda de atividade de tripsina com cerca de 60 kDa, confirmando que a banda de 60 kDa visualizada a partir do “western blot” corresponde, de fato, à tripsina.

Uma vez constatada esta homologia, foi possível a detecção destas duas enzimas nos enterócitos a nível ultraestrutural, com a utilização de anticorpos conjugados com partículas de ouro, permitindo não só localizar a região do ventrículo onde se dá a síntese e secreção destas enzimas, como também o mecanismo pelo qual são secretadas para a luz ventricular.

Assim, tanto para amilase quanto para tripsina, foi observada marcação por imuno-ouro nos enterócitos do VA e VM. Tal marcação foi detectada nas áreas de Golgi, nas vesículas secretoras características dessas regiões e na luz do ventrículo, em especial entre as microvilosidades e junto à membrana peritrófica. Estas observações corroboram os resultados obtidos a partir de ensaios de atividade enzimática para essas enzimas, discutidos adiante, e indicam que tanto a amilase quanto a tripsina devem ser secretadas para a luz do ventrículo por um processo merócrino. É importante notar que, tanto no ventrículo anterior quanto no médio, as vesículas responsáveis pela secreção de amilase e tripsina são morfologicamente idênticas, o que indica que ambas as enzimas digestivas devem ser secretadas conjuntamente através da mesma via secretora.

Tais resultados contrastam com experimentos de imunolocalização realizados em outras espécies de insetos. Um estudo feito com larvas de *T. molitor* (Cristofolletti *et al.*, 2001) mostrou que a amilase é secretada por um mecanismo apócrino no ventrículo anterior, enquanto que a tripsina é secretada através de um processo merócrino no ventrículo posterior. Assim, parece haver, nesta espécie, uma separação espacial entre a digestão de açúcares e de proteínas, sendo que a primeira deve ocorrer, majoritariamente, no ventrículo anterior, enquanto que a segunda deve ocorrer no ventrículo posterior. Já em *P. phyllinum*, as duas enzimas, aparentemente, são secretadas na mesma região do ventrículo, embora pareça haver uma separação espacial em termos funcionais, devido ao pH ótimo dessas enzimas serem diferentes, como será discutido mais adiante.

Os túbulos de Malpighi e os apêndices ventriculares

Os apêndices ventriculares são estruturas formadas por canalículos que se protraem das protuberâncias ventriculares associadas ao VP, na região do VPI. Anatomicamente e histologicamente, os canalículos são muito similares aos túbulos de Malpighi, com os quais devem partilhar algumas de suas funções. No entanto, os túbulos de Malpighi estão, na grande maioria dos insetos, inseridos na interface entre o ventrículo e o intestino posterior, enquanto que os canalículos se inserem

diretamente no ventrículo, colocando em dúvida sua real função. Uma visão comparativa entre essas duas estruturas torna-se, pois, fundamental para se tentar compreender a razão da existência deste sistema canalicular entre os Phasmida.

Aspectos funcionais dos túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi são os principais órgãos de excreção em insetos. Tratam-se de tubos longos e finos que se encontram livres na hemocoele, com sua região proximal se abrindo no tubo digestivo na região do piloro e sua região distal terminando em fundo cego. Tais estruturas variam em tamanho nas diferentes espécies, indo desde 2 mm até 100 mm de comprimento e de 10 μm a 30 μm de diâmetro. Estão presentes na maioria dos grupos de insetos e variam em número, de apenas 2 em alguns coleópteros, até mais de 250 em certas espécies de gafanhotos. Em espécies com poucos túbulos de Malpighi, eles se apresentam como tubos longos, finos e com muitas enovelações (Ruppert *et al.*, 2003). Em espécies com um grande número de túbulos de Malpighi, por outro lado, eles são mais curtos e, frequentemente, se apresentam agrupados formando emaranhados (Ruppert *et al.*, 2003; Chapman, 1998). Os túbulos de Malpighi são responsáveis pela retirada de excretas da hemolinfa, sendo suas células responsáveis pela produção de um filtrado inicial (chamado urina primária), contendo ureia, uratos, sais e outros compostos removidos da hemolinfa e descarregados na luz intestino posterior (Chapman, 1998; Beyenbach, 2003). A urina primária é, então, modificada na região do reto através da reabsorção seletiva de água, sais e outras substâncias pelas papilas retais e excretada como urina pelo ânus, juntamente com as fezes (Chapman, 1998).

O movimento de água da hemolinfa para os túbulos de Malpighi depende do transporte ativo de íons para a luz do túbulo. Geralmente, o íon predominantemente transportado é o potássio, mas o sódio pode ter um papel importante em alguns insetos, como, por exemplo, em espécies hematófagas, que obtém quantidades abundantes deste cátion a partir de sua dieta (Chapman, 1998). Uma ATPase na membrana plasmática apical bombeia prótons (H^+) para a luz dos túbulos, os quais são, então, trocados por uma proteína transportadora, por potássio ou sódio das células dos túbulos de Malpighi. Ânions de cloro seguem o mesmo trajeto devido ao

gradiente eletroquímico estabelecido e a água passa através das células por conta do gradiente osmótico estabelecido pelo acúmulo de íons na luz dos túbulos (Van Kerkhove, 1994; Beyenbach, 1995; Pannabecker, 1995; Al-Fifi *et al.*, 1998; Chapman, 1998).

Análise morfológica dos túbulos de Malpighi

Anatomicamente, os túbulos de Malpighi são tubos delgados que se protraem da região do piloro em insetos, ficando livres na cavidade corporal e terminando em fundo cego (Chapman, 1998; Nation, 2008). Em *P. phyllinum* estão presentes mais de 100 túbulos de Malpighi, cada um deles medindo cerca de 40 mm de comprimento e por volta de 10 a 30 μ m de diâmetro. Nesta espécie, se inserem no ventrículo na região do piloro em agrupamentos de três túbulos.

Observou-se, em *P. phyllinum*, que os túbulos de Malpighi possuem faixas musculares organizadas helicoidalmente ao seu redor, bem evidentes nas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Tal organização muscular também foi verificada em outros ortopteróides, em Odonata e em alguns Hymenoptera (Chapman, 1998). Acredita-se que essas faixas musculares produzam movimentos ondulantes dos túbulos na hemocele, fazendo com que estes entrem em maior contato com a hemolinfa, contribuindo, também, para o movimento de fluido em seu interior (Chapman, 1998). De fato, em tubos digestivos de *P. phyllinum* observados imediatamente após dissecação, convenientemente isolados e imersos em solução salina, foi constatada a ocorrência de um nítido movimento serpenteante dos túbulos de Malpighi.

Histologicamente, os túbulos de Malpighi em *P. phyllinum* são muito semelhantes àqueles descritos em outras espécies de insetos (Wigglesworth & Salpeter, 1961; Martoja & Ballan-Dufrançais, 1982), incluindo algumas da ordem Phasmida (Ramsay, 1955; Bartheau, 1963; Taylor, 1971b). Ultraestruturalmente, também pôde ser constatado que as células que compõe os túbulos de Malpighi da espécie estudada possuem características essencialmente similares às encontradas em outras espécies (Smith, 1968; Taylor, 1971b; Garrett *et al.*, 1988;). Tratam-se de células arredondadas, com microvilosidades apicais modificadas, exibindo

mitocôndrias em seu interior. Tal arranjo reflete a intensa atividade metabólica nesta região, relacionada, principalmente, ao transporte ativo de íons através dessa membrana (Nation, 2008). O citoplasma é rico em dictiossomas, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias. Na membrana plasmática basal, pôde ser verificada a presença de um labirinto basal bastante desenvolvido, com invaginações que se estendem até metade das células, com muitas aberturas para a lâmina basal e inúmeras mitocôndrias associadas. Como se recorda, tais especializações também foram observadas nos enterócitos ventriculares e são indicativas de um intenso transporte de água e íons através das células. Enquanto que, nos enterócitos de insetos, esse arranjo está ligado com os fluxos de água no ventrículo (Ribeiro *et al.*, 1990), no caso dos túbulos de Malpighi, a presença de um labirinto basal altamente desenvolvido está relacionada à principal função fisiológica realizada por essas estruturas, que é a produção de urina primária através da retirada de íons e água da hemolinfa, juntamente com substâncias a serem excretadas. Nas membranas laterais das células que compõe os túbulos de Malpighi foi, ainda, identificado um tipo de junção intercelular diferente daquele encontrado nos enterócitos do ventrículo. Tratam-se de junções septadas escalariformes, comumente observadas em túbulos de Malpighi, e que constituem a principal barreira de permeabilidade deste epitélio (Lane, 1984).

Análise morfológica comparativa entre os túbulos de Malpighi e os apêndices ventriculares

O sistema de protuberâncias ventriculares e canalículos constituem uma característica anatômica sem paralelo em outros grupos de insetos. A presença deste sistema já havia sido constatada em outras espécies de Phasmida, mas de modo muito geral e sem qualquer atribuição funcional, sendo, geralmente, considerado como túbulos de Malpighi modificados (Ramsay 1955; Bertheau, 1963; Gangrade, 1965; Beadle, 1972; Richards & Davies, 1982). De fato, muitas são as semelhanças entre as duas estruturas, tanto do ponto de vista anatômico, quanto histológico e ultraestrutural. Além do próprio aspecto anatômico dessas estruturas, pôde-se, ainda,

constatar, em ambas, a presença de uma musculatura helicoidal ao seu redor. Histologicamente, são formadas por uma camada única de células binucleadas, de aparência pavimentosa. Ultraesturalmente, foi verificado que, tanto nos túbulos de Malpighi, quanto nos canalículos, estão presentes células polarizadas com microvilosidades apicais modificadas, contendo mitocôndrias em seu interior, bem como invaginações da membrana plasmática basal com mitocôndrias associadas.

Por outro lado, existem algumas diferenças morfológicas significativas entre as duas estruturas. Além da diferença de diâmetro, verificou-se que as células dos canalículos são menores e de formato mais achatado que as dos túbulos de Malpighi. No lúmen de muitos túbulos de Malpighi, pôde ser observada a presença de cristais, provavelmente de sais de cálcio ou uratos (Chapman, 1998 ; Nation, 2008), ausentes na luz dos canalículos. Ultraestruturalmente, o maior contraste entre as células que compõe os túbulos de Malpighi e as que compõem os canalículos foi constatado na organização das invaginações da membrana plasmática basal. Nos canalículos, observou-se que essas especializações são menos extensas, apesar de possuírem, igualmente, muitas aberturas para a lâmina basal. Um outro aspecto é a ocorrência de um número reduzido de mitocôndrias associadas a essas especializações nos canalículos. Além das diferenças morfológicas apresentadas, experimentos com a utilização de corante indicaram um comportamento fisiológico diverso para essas estruturas. Assim, injeções de amaranto na hemolinfa de animais, tanto em jejum, quanto alimentados, mostraram que o corante é transportado avidamente através dos túbulos de Malpighi para o intestino do animal, enquanto que os canalículos não ficam corados, mesmo após longos períodos de tempo depois da injeção de corante.

Todas essas observações indicam que os apêndices ventriculares devem possuir um papel fisiológico diverso daquele realizado pelos túbulos de Malpighi. Como se discutirá mais adiante, a ocorrência de um pH alcalino no conteúdo do VP, principalmente no VPI, região da inserção dos apêndices ventriculares, parece indicar que uma das funções dos canalículos seja a de alcalinizar esta região do ventrículo. De fato, a constatação da presença de um acúmulo de uma substância fortemente eosinófila, histologicamente detectada nas aberturas das protuberâncias ventriculares, é um fato muito sugestivo de que esta hipótese possa ser verdadeira.

Aspectos bioquímicos

Ensaio de atividade enzimática

No que diz respeito à digestão de proteínas e carboidratos, foram analisadas, quantitativamente, as atividades de amilase, tripsina, quimotripsina, maltase e aminopeptidase ao longo do intestino de *P. phyllinum*. Esta espécie de inseto é estritamente herbívora, alimentando-se exclusivamente de folhas de vegetais, que contém, principalmente, amido como reserva energética, passível de digestão por *P. phyllinum*, que necessita ser quebrado em monômeros (glicose) para ser absorvido. Este amido deve ser quebrado por uma amilase (endoglucanase), com a liberação de fragmentos menores (oligossacarídeos) que, por sua vez, devem ser quebrados em glicose, sendo que esta hidrólise é realizada por glicosidases, liberando, finalmente, os monômeros. Portanto, uma análise da atividade tanto de amilase, quanto de maltase devem fornecer uma visão geral da digestão de carboidratos nesta espécie de inseto.

A digestão de proteínas é iniciada, normalmente, pela ação de enzimas despolimerizadoras, como serina-proteinases ou cisteína-proteinases, as quais atuam clivando uma região interna de cadeias polipeptídicas (endopeptidases), quebrando-as em fragmentos menores. Esses fragmentos, por sua vez, são quebrados por oligopeptidases, como aminopeptidases e carboxipeptidases, ou ainda, dipeptidases, liberando aminoácidos livres passíveis de absorção pelo epitélio intestinal. Assim, mais uma vez, a análise da atividade de tripsina, quimotripsina e aminopeptidase devem dar um panorama de como e em quais regiões do intestino ocorre a digestão de proteínas, desde a despolimerização inicial por endopeptidases até a liberação final de aminoácidos livres (Rawlings *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos permitem afirmar que as enzimas tripsina, amilase e quimotripsina são secretadas, principalmente, pela região do VA e, em menor escala, pela região do VM. A elevada atividade destas enzimas no intestino anterior, bem como a sua virtual ausência nos homogeneizados de glândula salivar e em macerados de folhas de *Psidium sp.*, nos permitem levantar a hipótese de que tais enzimas, na verdade, se difundem a partir do VA para o intestino anterior. Isto se

dá, provavelmente, através de atividade anti-peristáltica da musculatura do sistema digestivo. Tal mecanismo, provavelmente, ocorre em diversas espécies de insetos, sendo observado de forma particularmente clara em alguns Orthoptera (*cf. Biagio et al.*, 2009).

Atividade da enzima aminopeptidase, por sua vez, foi obtida em frações do precipitado do tecido epitelial, que correspondem à membrana apical dos enterócitos. Já a maltase foi encontrada, principalmente, na fração solúvel do tecido epitelial centrifugado, que corresponde à enzimas fracamente aderidas ao epitélio, provavelmente ligadas ao glicocálix.

A partir desses resultados, foi possível constatar que a digestão de carboidratos deve ter início no intestino anterior, pela atuação da enzima amilase, responsável pela quebra inicial de grandes cadeias de carboidratos (Terra & Ferreira, 1994). A quebra de carboidratos prossegue à medida que o material ingerido passa para o ventrículo (atingindo o VA). Oligômeros de carboidratos, uma vez digeridos a um tamanho suficientemente pequeno, se difundem através da membrana peritrófica e são quebrados a dímeros ou monômeros de carboidratos por maltases associadas ao epitélio intestinal. Estas enzimas estão presentes em toda a região ventricular (em menor escala no epitélio do VM). Os monômeros resultantes são, então, absorvidos pelos enterócitos.

As proteínas, por sua vez, são digeridas primeiramente pela tripsina. Esta enzima ataca, particularmente, sítios hidrofílicos de proteínas, os quais, geralmente, se localizam na região mais externa da estrutura terciária da proteína. A quebra inicial das proteínas presentes no alimento pela tripsina revela seus sítios hidrofóbicos, que geralmente se localizam no interior da estrutura terciária das moléculas. Tais sítios hidrofóbicos são, então, atacados pela enzima quimotripsina que possui especificidade para eles. As enzimas digestivas tripsina e quimotripsina geralmente possuem uma distribuição semelhante no sistema digestivo de insetos (Applebaum, 1985).

Em *P. phyllinum*, a atividade de tripsina se concentra, principalmente, no intestino anterior e, em seguida, no VA, enquanto que a distribuição da atividade de quimotripsina é semelhante, apenas se concentrando mais no VA do que no intestino anterior. É possível, no entanto, que a digestão de proteínas por tripsina ocorra, de

forma mais significativa, nas regiões do VM e do VP. Apesar de sua atividade nessas regiões não ser majoritária, o pH ótimo dessa enzima se aproxima mais do pH encontrado no lúmen dessas regiões (ver abaixo). Sendo assim, após a digestão inicial de proteínas no espaço endoperitrófico ventricular, os peptídeos suficientemente digeridos se difundem através da membrana peritrófica para o espaço ectoperitrófico. Ao atingirem o epitélio ventricular, ocorre a digestão final realizada pela aminopeptidase presente na membrana plasmática apical dos enterócitos. É importante notar que a atividade da aminopeptidase se concentra nas regiões do VM e, principalmente, no VP, regiões onde a digestão final de proteínas, bem como a absorção de aminoácidos, deve ocorrer majoritariamente.

É interessante comparar este modelo de digestão para *P. phyllinum* ao observado para outros Polineoptera, em particular com membros da ordem Orthoptera, que, como dito acima, são proximamente relacionados aos Phasmida (Grimaldi & Engel, 2005). Estudos realizados tanto com membros da ordem Caeliphera – gafanhotos (Ferreira *et al.*, 1990; Marana *et al.*, 1997), quanto da ordem Ensiphera – grilos (Woodring *et al.*, 2007; Biagio *et al.*, 2009) mostram que, nestes animais, a digestão de carboidratos ocorre, principalmente, no intestino anterior e no lúmen dos cecos gástricos, localizados na região anterior do ventrículo, enquanto que a digestão de proteínas acontece, principalmente, nos cecos gástricos e no epitélio ventricular (ver também Terra *et al.*, 1996). Em *P. phyllinum*, os cecos estão ausentes e os principais sítios de digestão de carboidratos são o intestino anterior e o VA, enquanto que a digestão de proteínas deve ocorrer principalmente, como vimos, no VM e no VP.

Compartimentalização da digestão e reciclagem de enzimas digestivas

As taxas de excreção de enzimas digestivas do ventrículo de *P. phyllinum*, tanto em animais alimentados, quanto em jejum, foram iguais ou inferiores a 35%. Apesar disso, não foram detectados inibidores endógenos no ventrículo do animal e, ao menos para tripsina (ver adiante), foi constatado que as alterações de pH ao longo do ventrículo não são responsáveis pela inativação da enzima. Além disso, amilase, tripsina e quimotripsina ocorrem, principalmente, na região do intestino anterior e

VA, o que seria esperado se as enzimas fossem recuperadas a partir do bolo alimentar antes de serem excretadas. Baseado nesses resultados, bem como no modelo de reciclagem de enzimas desenvolvido para *R. americana* (Ferreira *et al.*, 1981), é possível propor que, também nesta espécie, a reciclagem de enzimas digestivas ocorra, tanto animais alimentados quanto em animais em jejum, através de um contra-fluxo causado pelo transporte de água a partir dos túbulos de Malpighi (e, possivelmente, pelo epitélio do VP) e sua absorção na região do VA. Análises ultraestruturais, discutidas acima, dão suporte ao mecanismo proposto, uma vez que a região do VA possui características morfológicas associadas à absorção de água, enquanto que os enterócitos do VP possuem características morfológicas associadas com a secreção de água. No entanto, os túbulos de Malpighi parecem ser os principais responsáveis pela tomada de água da hemolinfa para a luz do tubo digestivo, como mostraram os resultados com a utilização de corante como traçador.

De fato, os resultados com o emprego de corante deram, como já dito, um suporte importante para o modelo proposto de circulação de enzimas em *P. phyllinum*. Assim, a ingestão de amaranth mostrou que o VA é o principal sítio de absorção de água, tanto em animais em jejum, quanto alimentados. Entretanto, a injeção de corante na hemolinfa evidenciou a existência de um contra-fluxo de água apenas em animais mantidos em jejum, o que seria equivalente ao observado em gafanhotos (Dow, 1981; Marana *et al.*, 1997). Uma vez que as medidas bioquímicas de taxa de excreção de enzimas secretadas em *P. phyllinum* são baixas, tanto em animais em jejum, quanto alimentados, o mecanismo de contra-fluxo de enzimas parece ocorrer em ambas as situações. Deste modo, em animais alimentados, este contra-fluxo não seria detectável pelos experimentos com corante, justificando os resultados obtidos, aparentemente conflitantes.

Medidas de pH luminal e efeito do pH sobre tripsina e amilase

As medidas de pH luminal em *P. phyllinum* evidenciaram grandes diferenças de pH no tubo digestivo desta espécie. Enquanto o pH no intestino anterior e VA se apresenta ácido (em torno de 5,5), as medidas apontam para valores de pH cada vez mais alcalinos ao longo do ventrículo, atingindo o máximo valor de pH na região do

VPI (9,1). A partir daí, o valor de pH diminui um pouco no VP e, no intestino posterior, ele tende a neutralidade (7,3).

Segundo Terra & Ferreira (1994), o pH luminal é uma importante característica do intestino de insetos, pois sua variação pode afetar o desempenho de enzimas digestivas. No entanto, segundo os próprios autores, não é necessário que haja uma correlação direta entre o pH ventricular e o pH ótimo das enzimas digestivas. No caso de *P. phyllinum*, foram estimados o pH ótimo de amilase e de tripsina. Enquanto o pH ótimo de amilase - em torno de 5,0 - parece corresponder com pH da região intestinal onde foi observada maior atividade desta enzima (intestino anterior e ventrículo anterior), o valor de pH ótimo para tripsina - em torno de 9,0 - por outro lado, foi bastante discrepante com o valor do pH no intestino anterior e ventrículo anterior onde a maior parte da enzima está presente. Essa divergência entre o pH ótimo de tripsina e o pH do conteúdo luminal onde esta enzima atua já foi observada em *Dermestes maculatus* (Caldeira *et al.*, 2007), bem como em *Periplaneta americana* (Junior, 2000) e pode se tratar de um fenômeno comum em insetos.

É importante salientar que o pH ótimo para atividade de tripsina (9,0) aproxima-se do pH presente no VP e na parte distal do VM. Assim, como já comentado, é possível que grande parte da digestão de proteínas se dê nestas regiões do ventrículo.

A presença de um pH alcalino no lúmen do sistema digestivo de insetos não é inédita e já foi constatada em alguns grupos, particularmente, em larvas de besouros da família Scarabaeidae, e larvas de lepidópteros fitófagos e dípteros da família Nematocera (Terra, 1988; Biggs & McGregor, 1996; Terra & Ferreira, 2012). Acredita-se que a alta alcalinidade presente no ventrículo das larvas de lepidópteros permita a estes animais se alimentarem de vegetais ricos em taninos, visto que tal composto se liga a proteínas e reduz a eficiência da digestão em pHs mais ácidos (Berembaum, 1980), o que pode ser o caso, também, para larvas de Nematocera. Por outro lado, nas larvas de besouros da família Scarabaeidae, o alto pH no lúmen do intestino parece estar relacionado com o auxílio na extração de polissacarídeos da parede celular (Biggs & McGregor, 1996; Terra, 1988). Em particular, um pH alcalino pode ter um papel em liberar hemicelulose da parede

celular das plantas ingeridas por insetos, visto que, em experimentos de química analítica, a extração de hemicelulose geralmente é realizada com auxílio de substâncias alcalinas (Blake *et al.*, 1971). Larvas de *E. ello*, por exemplo, são capazes de digerir hemicelulose sem alterar a celulose presente nas folhas que elas ingerem (Terra, 1988). Ainda existem outras explicações funcionais possíveis para o alto pH medido no conteúdo intestinal de alguns insetos. Um pH alcalino poderia ser responsável pela inativação de enzimas potencialmente danosas presentes nos vegetais dos quais estes insetos se alimentam (Felton *et al.*, 1992), ou, ainda, poderia ajudar na extração de proteínas vegetais solúveis em pH alcalino (Felton & Duffey, 1991).

No caso de *P. phyllinum*, por sua vez, é pouco provável que o pH alcalino na região de VPI tenha qualquer uma das funções citadas. De fato, esta espécie se alimenta, preferencialmente, de folhas de plantas da ordem Myrtaceae (Sottoriva *et al.*, 2008), algumas das quais acumulam compostos tanínicos em suas folhas. Entretanto, no caso deste Phasmida, o pH alcalino se encontra na região do VP e a digestão primária de alimento por polimerases tem início na região do intestino anterior e VA. Assim sendo, a presença de um pH alcalino na região do VP, provavelmente, não é responsável por impedir que os taninos se liguem às polimerases digestivas nesta espécie. Além disso, um pH de cerca de 8,0 é suficiente para prevenir que o tanino se ligue à proteínas (Terra, 1988) e o pH no VPI de *P. phyllinum* chega a 8,9. Da mesma forma, é nas regiões do intestino anterior e do VA onde ocorre a digestão majoritária de carboidratos, o que torna, também, pouco provável a hipótese de que o pH alcalino esteja auxiliando na digestão de hemicelulose nesta espécie. Assim, a ideia mais plausível continua sendo a de que, em *P. phyllinum*, as diferenças de pH ao longo do ventrículo estejam relacionadas a uma separação espacial da atividade enzimática da amilase e da tripsina, com pHs ótimos diferentes. Esta diferença de pH também pode ter algum papel na atividade de outras enzimas digestivas não ensaiadas neste trabalho.

A grande variação do pH ao longo do ventrículo de *P. phyllinum*, em particular a constatação de um pH bastante alcalino na região posterior do ventrículo, motivou a investigação dos processos fisiológicos atuantes nesta região responsáveis pela manutenção desse pH. Assim, levantou-se a hipótese de que o

sistema de apêndices ventriculares, presentes nesta região do ventrículo, pudesse estar relacionado com a alcalinização de sua luz. Com o intuito de testar tal hipótese, foi tentada a realização de ensaios enzimáticos de enzimas com papel conhecido no processo de transporte de prótons ou outras formas de alteração de pH, como ATPases e anidrase carbônica, por exemplo (Terra *et al.*, 1988), para as diversas regiões do ventrículo, além dos túbulos de Malpighi e canalículos. Tais resultados serão discutidos a seguir.

O papel fisiológico do sistema de apêndices ventriculares

Como se recorda, a constatação de diferenças morfológicas entre os canalículos ventriculares e os túbulos de Malpighi, bem como o comportamento diverso dessas estruturas frente à tomada de corante da hemolinfa, indicam que os apêndices ventriculares devem possuir um papel fisiológico diferente daquele realizado pelos túbulos de Malpighi. A partir destes dados, foi levantada, então, a hipótese de que a função dos apêndices ventriculares esteja relacionada com a manutenção do pH alcalino luminal na região do VP, onde se inserem. Alguns resultados obtidos são compatíveis com esta suspeita. Assim, na análise histológica, foram observados acúmulos de uma substância fortemente corada por eosina amarela nas pequenas aberturas das protuberâncias ventriculares para a luz do tubo digestivo. Este resultado indica ser, esta, uma substância acidófila e, portanto, de caráter básico, o que pode significar que os apêndices ventriculares possam, realmente, estar secretando substâncias alcalinas (como íons bicarbonato) para a luz do ventrículo, contribuindo, assim, para a sua alcalinização. Os ensaios para ATPase, realizados em *P. phyllinum*, não revelaram uma atividade significativa dessa enzima nas regiões estudadas (ventrículo, apêndices ventriculares e túbulos de Malpighi). Tal resultado não é compatível com a função conhecida de algumas dessas regiões, como os túbulos de Malpighi, por exemplo (Towle, 1984). Dessa forma, não se pode considerá-lo como conclusivo, havendo, pois, a necessidade de realizar novos experimentos para se esclarecer este aspecto. Os ensaios de anidrase carbônica, por outro lado, mostraram que, nos canalículos, ocorre uma intensa atividade desta enzima, superior àquela observada nos túbulos de Malpighi e no

ventrículo. Desta maneira, é possível que as células dos canalículos (e, possivelmente, das protuberâncias ventriculares) secretem íons bicarbonato (HCO_3^-), alcalinizando o conteúdo da região do VP (especialmente o VPI) nestes animais. Segundo esta hipótese, a anidrase carbônica, presente nos canalículos, produziria ácido carbônico (H_2CO_3), que, então, se dissociaria em um íon bicarbonato (HCO_3^-) e um próton (H^+). O bicarbonato seria, então, secretado para a luz canalicular através da ação de uma ATPase ativada por bicarbonato. Tal processo se daria de forma similar ao que ocorre no duodeno de mamíferos, onde, da mesma forma, o conteúdo estomacal ácido é alcalinizado através de íons bicarbonato secretados para a luz do intestino (Humphreys & Choul, 1979; Sachs *et al.*, 1982; Garner *et al.*, 1983). Terra *et al.* (1988), em estudos com o sistema digestivo de *M. domestica*, propôs, primeiramente, para este inseto, a ocorrência de um sistema de tamponamento similar ao descrito acima para *P. phyllinum*. Neste caso, na região mediana do ventrículo, exibindo um pH ácido (3,1), ocorreria uma secreção de prótons (H^+) (resultado da ação de uma anidrase carbônica) e de Cl^- para a luz ventricular, acidificando seu conteúdo. A alcalinização do ventrículo posterior (com pH 6,8), principalmente, assim como do ventrículo anterior (6,1), seria por ação de uma ATPase ativada por bicarbonato, também originado da ação de uma anidrase carbônica nessas regiões ventriculares. Entretanto, estudos subsequentes (Terra & Regel, 1995), revelaram que, neste caso, a alcalinização do ventrículo, muito provavelmente, é realizada por um sistema de secreção de amônia e não de bicarbonato. Se o mesmo sistema de tamponamento ocorre em *P. phyllinum*, é uma questão ainda em aberto, que merece estudos mais detalhados.

No caso de *P. phyllinum*, os resultados obtidos no presente estudo permitiram levantar a hipótese de que os canalículos dos apêndices ventriculares sejam estruturas homólogas aos túbulos de Malpighi, mas que, ao longo do processo evolutivo, se diferenciaram no sentido de promoverem a alcalinização da porção do VP, interagindo, desse modo, com o processo digestivo do inseto.

Conclusão

O presente estudo do sistema digestivo de *P. phyllinum* constatou a existência de uma intensa atividades secretora nos enterócitos ao longo do ventrículo, que é a região mais importante do sistema digestivo nos insetos. Esta atividade é mais intensa, principalmente, no VA e no VM. Estas regiões constituem o principal sítio de produção e secreção das polimerases que atuam na primeira fase da digestão, enquanto que a digestão final e absorção do alimento deve se dar ao longo de todo ventrículo. As vesículas de secreção apresentam aspectos ultraestruturais diversos, de acordo com a região estudada, e parecem ser eliminadas através de dois mecanismos diferentes: o merócrino, que ocorre nas regiões do VA e VM, e o microapócrino, que ocorre em enterócitos ao longo de todo VP. Foi constatado, através de experimentos de imunolocalização ultraestrutural, que a tripsina e a amilase são secretadas pelas regiões do VA e do VM, mas que, com relação à tripsina, sua atividade só deva ser significativa na luz do VP, onde o pH alcalino se aproxima do pH ótimo desta enzima. A presença de uma membrana peritrófica conspícua, aliada a informações de natureza bioquímica, à experimentos com corante e às características ultraestruturais dos enterócitos das diferentes regiões do ventrículo permitem concluir que ocorre uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas nesta espécie, tanto em animais alimentados, quanto em jejum. No entanto, ao contrário do que se observa na maioria dos insetos, tal circulação parece depender, principalmente, da tomada de água da hemolinfa pelos túbulos de Malpighi em ambas as situações. Foi observado, ainda, na região do VPI, a ocorrência de um complexo sistema de apêndices ventriculares, composto por protuberâncias e canalículos, sendo, estes últimos, semelhantes aos túbulos de Malpighi. Estudos comparados entre a morfologia dos túbulos de Malpighi e a dos canalículos ventriculares, bem como análises bioquímicas complementares, levaram à hipótese de que os canalículos sejam túbulos de Malpighi modificados, especializados para o transporte de bicarbonato para a luz ventricular, alcalinizando, assim, a região do VP, onde se inserem.

Resumo

Este trabalho consiste em um estudo detalhado do sistema digestivo de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae) num enfoque morfofuncional. Do ponto de vista anatômico, o seu sistema digestivo é constituído por um intestino anterior, um intestino médio e um intestino posterior. O intestino anterior é composto por uma cavidade bucal (onde se abre o ducto da glândula salivar bilobada), uma faringe, que se continua para o esôfago, terminando em um proventrículo, que forma uma válvula em seu interior. O intestino médio é formado por um ventrículo tubular, dividido em três regiões: ventrículo anterior (VA), ventrículo médio (VM) e ventrículo posterior (VP). Este último foi, ainda, subdividido em proximal (VPI) e distal (VP II). Na região do VPI, foi constatada a presença de estruturas denominadas de apêndices ventriculares, formadas por protuberâncias, que se inserem no tubo digestivo, e canalículos, que se projetam da região apical de cada uma delas e terminam em fundo cego. O intestino posterior é dividido em um íleo e um reto que termina no ânus.

A análise histológica mostrou que o intestino anterior é formado por um epitélio simples, composto por células pavimentosas, revestido por uma cutícula, que se modifica na forma de pequenas espículas ao longo desta região. O proventrículo é composto por uma válvula muscular simples, que separa o intestino anterior e o intestino médio. Este último é formado por um epitélio simples, constituído por células do tipo colunar, chamadas de enterócitos, principais responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e pela absorção dos nutrientes, por células regenerativas, que se apresentam reunidas em ninhos na base do epitélio, e por células endócrinas. Os apêndices ventriculares, por sua vez, possuem um epitélio simples e contínuo com o epitélio ventricular. As células das protuberâncias apresentam-se grandes e arredondadas, enquanto que os canalículos são compostos por um epitélio de células achatadas, semelhante ao dos túbulos de Malpighi. Na região de transição entre o epitélio ventricular e o intestino posterior se inserem os túbulos de Malpighi. O epitélio do intestino posterior é do tipo cúbico, simples, revestido por cutícula.

A luz do intestino médio (ou ventrículo) é revestida por uma estrutura tubular, denominada de membrana peritrófica, cuja existência foi comprovada por

microscopia de fluorescência com a utilização da técnica WGA-FITC (aglutinina do gérmen do trigo conjugada à fluoresceína).

Com a finalidade de identificar regiões específicas do ventrículo onde ocorre a absorção ou secreção de água através do epitélio, foram realizados experimentos fisiológicos de ingestão e injeção do corante amaranto em solução. Verificou-se que, quando o corante é ingerido pelos insetos, o VA apresenta-se corado, tanto em animais em jejum quanto alimentados, indicando ser este o possível sítio de absorção de água no ventrículo. Por sua vez, a partir de experimentos com a injeção do mesmo corante na hemolinfa, foi constatada a sua tomada pelos túbulos de Malpighi, indicando serem estes os principais sítios de tomada de água da hemolinfa e de sua secreção para a luz do tubo digestivo. Tanto em animais em jejum, quanto alimentados, o corante injetado é encontrado na luz do intestino posterior. Entretanto, nos animais em jejum, o corante é capaz de se difundir, também, pelo ventrículo até a sua região anterior.

A análise ultraestrutural do intestino médio revelou que a superfície apical dos enterócitos constituintes apresenta-se modificada na forma de microvilosidades. Nas membranas laterais, observam-se especializações juncionais na forma de desmossomos apicais, seguidos por junções septadas lisas. A membrana plasmática basal, por sua vez, exibe diversas invaginações, formando uma rede complexa de canais com mitocôndrias associadas. Nas células do VA e VM, essa rede exibe um número limitado de aberturas para a lâmina basal, o que indica um maior potencial de absorção de água pelo epitélio ventricular, a partir de sua luz. Nas células da região do VP, o número de aberturas é bem maior, o que sugere que pode ocorrer secreção de água e íons através desta região, não detectável nos experimentos com corantes. Por outro lado, as células regenerativas exibem características típicas de células indiferenciadas, com núcleo grande e poucas organelas. Células endócrinas, por sua vez, são, eventualmente, detectadas na base do epitélio, sem se prolongarem até a superfície apical do epitélio. Foi observado, ainda, que tanto os canalículos ventriculares, quanto os túbulos de Malpighi são formados por células achatadas, com microvilosidades apicais modificadas portando mitocôndrias em seu interior e membrana plasmática basal formando um labirinto complexo, com muitas aberturas para a lâmina basal e com muitas mitocôndrias associadas.

Com relação a atividade secretora do epitélio ventricular, verifica-se a existência de grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso e diversas áreas de Golgi concentradas, principalmente, no citoplasma perinuclear. Nas regiões VA e VM, é detectado um grande número de vesículas secretoras, cujo mecanismo de secreção parece ser o merócrino. Ao longo de todo VP, por outro lado, vesículas secretoras estão, aparentemente, ausentes no citoplasma apical, mas pode ser constatada a presença de dilatações nas microvilosidades, algumas das quais apresentem pequenas vesículas em seu interior. Esta observação é sugestiva da ocorrência de secreção do tipo microapócrina nesta região. Devem ocorrer, portanto, dois mecanismos de secreção diferentes ao longo do ventrículo de *P. phyllinum*: o merócrino (no VA e no VM) e o microapócrino (no VP)

O local de produção e secreção das enzimas amilase e tripsina pôde ser localizado através de experimentos de imunomarcacão ultraestrutural com a utilização de anticorpos heterólogos. Ambas as enzimas foram detectadas na região do VA e do VM, podendo ser traçadas nas áreas de Golgi, nas vesículas secretoras e na luz do epitélio, junto às microvilosidades, seguindo, pois, a rota secretora. Ambas as enzimas foram identificadas no interior do mesmo tipo de vesículas de secreção, indicando que devem ser eliminadas conjuntamente através da mesma via secretora.

Medidas de pH luminal revelaram grandes diferenças de pH ao longo do tubo digestivo nesta espécie. Enquanto que na região anterior o pH é mais ácido (5,3 no intestino anterior e 5,6 no VA), ele vai se tornando mais alcalino nas regiões mais posteriores do ventrículo (6,3 no VM anterior, 8,0 no VM posterior, 9,1 no VPI e 8,5 no VPII) e é neutro no intestino posterior (7,3). Foi determinado, ainda, o efeito do pH sobre a atividade das enzimas tripsina e amilase. A maior atividade para tripsina foi observada no pH 9,0. Já para amilase, a maior atividade foi observada em pH 5,0.

No que diz respeito a atividade de enzimas digestivas, ficou evidente que a atividade de amilase e tripsina se concentra no conteúdo do intestino anterior e VA. Apesar disso, é possível que tripsina atue, principalmente, nas regiões do VM e VP, onde o pH luminal alcalino se aproxima do pH ótimo desta enzima. A quimotripsina segue o mesmo padrão com a diferença de que, para esta enzima, a atividade majoritária se localiza no VA. Maltase foi encontrada na fração solúvel dos epitélios

do VA e VP, indicando que esta enzima se encontra ligada ao glicocálix. Aminopeptidase, por sua vez, foi localizada, principalmente, na fração de membrana dos epitélios do VM e VP, mostrando que esta enzima deve se encontrar integrada à membrana apical dos enterócitos dessas regiões.

A taxa de excreção das enzimas ensaiadas foi igual ou inferior a 35%. Isso indica que deve ocorrer, nesta espécie, uma recirculação endo ecto-peritrófica de enzimas digestivas, tanto na condição de jejum quanto alimentado. É possível que, quando o animal estiver alimentado, tal contra-fluxo seja reduzido, não podendo ser detectado através de experimentos com corante. Deste modo, os dados obtidos no presente trabalho apontam para a ocorrência de uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas em *P. phyllinum*, sendo o VA o principal sítio de absorção de água e os túbulos de Malpighi, o principal sítio de secreção. A digestão inicial de carboidratos deve se dar no intestino anterior e no conteúdo do VA, no espaço endoperitrófico, enquanto que a sua digestão final deve se dar junto ao epitélio. A digestão de proteínas, por sua vez, deve se dar principalmente no VM e VP, tendo início no espaço endoperitrófico e se concluindo junto ao epitélio dessas regiões.

Ensaio de anidrase carbônica revelaram uma alta atividade dessa enzima nos apêndices ventriculares. Este fato, aliado à comparação morfológica entre canalículos ventriculares e túbulos de Malpighi, permitiu levantar a hipótese de que os canalículos sejam estruturas homólogas aos túbulos de Malpighi que, ao longo da evolução, se diferenciaram no sentido de promoverem a alcalinização da região do VP, principalmente no VPI.

Abstract

This work presents a detailed morphofunctional study of the digestive system of *Phibalosoma phyllinum* (Phasmida, Phasmatidae). From an anatomical point of view, the digestive system of this insect is formed by a foregut, a midgut and a hindgut. The foregut is composed by the buccal cavity (where the salivary gland's duct open), a pharynx and an aesophagus that ends in the proventriculus. The midgut consists of a tubular ventriculus and it can be divided in three regions: the anterior ventriculus (AV), the middle ventriculus (MV), and the posterior ventriculus (PV) which can be further subdivided in its proximal (PVI), and distal (PVII) sub-regions. The presence of a complex system of ventricular appendices was observed in the PVI sub-region, which are formed by protuberances, in the external ventricular surface, and by blind-ended canaliculi, which are connected to the protuberances. The hindgut is divided into an ileum and a rectum that ends in the anus.

Seen by light microscopy, the foregut is made up by a simple epithelium, which is composed of squamous cells and covered by a cuticle layer. Through the whole foregut the cuticle forms spines. The proventriculus is formed by a simple muscular valve that separates the foregut from the midgut. The midgut itself is formed by a simple epithelium, which is made up of three different cell types: columnar cells (enterocytes), which are the main site of enzyme production and secretion, and nutrient absorption, the regenerative cells, which are clustered in nidi at the basal portion of the epithelium, and the endocrine cells. The ventricular appendices, in turn, are formed by a simple epithelium that is continuous with the ventricular epithelium. Cells from the protuberances are large showing a round shape, while canalicular cells are short, and very similar to the ones presented in the Malpighian tubules. In the transition between the midgut and the hindgut, several Malpighian tubes branch off. The hindgut is formed by a simple epithelium, lined by cuticle.

The ventricular lumen is covered by a tubular structure called peritrophic membrane whose presence was confirmed by fluorescence microscopy, using chitin-binding lectin WGA (wheat germ agglutinin) coupled with FITC (fluorescein isothiocyanate).

In order to identify specific ventricular regions where water absorption and secretion through the epithelium take place, physiological experiments, using

amaranth dye solution were performed. This solution was either orally administered, or injected in the hemolymph of both fed and starved insects. These experiments revealed that, both in fed and starved animals, the AV is the main site of water absorption, whereas the Malpighian tubules are the main sites of water secretion into the ventricular lumen.

Ultrastructural analysis showed that enterocytes present an apical surface modified into well-developed microvilli. In their lateral surface, the adjacent plasma membranes are linked by desmosomes and smooth septate junctions. The basal plasma membrane shows several infoldings, forming a labyrinth of channels with associated mitochondria. In the AV and MV, these infoldings present a limited number of openings to the basal lamina, which indicates a greater water absorption potential of these regions from the gut lumen. In the PV cells, the number of openings is greater, indicating that these regions may be involved in water secretion (although occurring in levels that are undetectable through dye experiments). Regenerative cells *nidi*, in turn, can be observed in the basal portion of the epithelium throughout the midgut. This cell type shows characteristics of undifferentiated cells, such as large nuclei and few organelles. Endocrine cells are confined to the basal portion of the epithelium. Both the ventricular canaliculi and the Malpighian tubules are made up by cuboidal cells with modified apical microvilli bearing mitochondria in their interior, and basal plasma membrane forming a labyrinth with many well developed infolds and openings to the basal lamina, as well as many associated mitochondria.

An intense secretory activity was observed along the entire midgut. Large amounts of rough endoplasmic reticulum, well developed Golgi areas were observed in the enterocytes. In the AV and MV a large number of secretory vesicles could be observed concentrated in the apical portion of the cells, and their contents are probably eliminated by a merocrine mechanism. Along the PV, secretory vesicles are apparently absent but microvilli display dilated tips frequently showing small vesicles in their interior. This observation may indicate the occurrence of a microapocrine secretory mechanism in this ventricular region.

The enzymes amylase and trypsin were immunolocalized in the cells from the AV and MV. In these regions, the two enzymes were detected in Golgi areas,

secretory vesicles and in the the ventricular lumen, between the microvilli. Thus, both enzymes seem to be produced and eliminated through the same secretory pathway.

Luminal pH measurements revealed a great variation of the pH along the intestine of this species. While in its anterior region the pH is acid (5,3 in the foregut and 5,6 in the AV), it becomes gradually alkaline towards the posterior regions (6,3 in the anterior MV, 8,0 in the posterior MV, 9,1 in the PVI and 8,5 in the PVII); in the hindgut the pH is neutral (7,3). The effect of the pH on amylase and trypsin activities was also measured. It was determined that trypsin's optimal pH was 9,0, and amylase's optimal pH was 5,0.

Biochemical assays of digestive enzymes revealed the presence of amylase and trypsin in the luminal contents, mainly in the foregut and AV. In spite of that, it is possible that trypsin's activity is greater in the MV and PV, where the alkaline luminal pH matches the optimal pH for this enzyme. Chymotrypsin is also present in the lumen of the foregut and AV, but, unlike amylase and trypsin, its major activity is found in the AV. Aminopeptidase is found in the ventricular epithelium, mainly in the MV and PV, and maltase is detected associated with the microvillar glicocalix in the AV and PV regions. The hindgut showed low levels of digestive enzyme excretion, both in fed and starved animals, suggesting that these enzymes are recovered during the digestive process. Thus, these results point to the occurrence of an endo-ectoperitrophic circulation of digestive enzymes in both fed and starved animals, in which the AV is the main absorption site of water and the Malpighian tubules, the main secretion site. Initial carbohydrates digestion should occur in the foregut and in the AV, in the endoperitrophic space, whereas its final digestion should take place in the epithelial surface. Protein digestion should take place in the MV and in the PV; initial digestion should occur in the luminal endoperitrophic space, whereas final digestion takes place in the epithelial surface of these regions.

Carbonic anhydrase assays revealed a high activity of this enzyme in the ventricular appendices. This fact, along with the morphological similarity between ventricular canaliculi and Malpighian tubules suggest that the canaliculi and the Malpighian tubules are homologous structures. Along the evolutionary process, the

canaliculi probably acquired the capability to promote the alkalization of the PV lumen (mainly in the PVI region) thus affecting the digestive process.

Referências Bibliográficas

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

- AL-FIFI, Z. I. A.; MARSHALL, S. L.; HYDE, D.; ANSTEE, J. H.; BOWLER, K. **Characterization of ATPases of apical membrane fractions from *Locusta migratoria* Malpighian tubules.** Insect Biochem Mol Biol, v. 28, 1998. p. 201-211.
- APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (eds.) **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.** v.4, Pergamon Press, Oxford, 1985. p. 279-312.
- AVERY, J.; JAHN, R.; EDWARDSON, J. M. **Reconstitution of regulated exocytosis in cell-free systems: a critical appraisal.** Ann Ver Physiol, v. 61, 1999. p. 777-807.
- BAGINSKI, E. S.; FOÀ, P. P.; ZAK, B. **Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids and total phosphate in biologic material.** Clin Chem, v. 13, 1967. p. 326-332.
- BARTHEAU, P. **Le tube digestif et ses annexes, l'évolution du mésentéron et des tubes de Malpighi au cours de la vie larvaire chez *Carausius morosus*, BR.** Bull Soc Zool Fr, v. 88, 1963. p. 521-539.
- BEADLE, D. J. **Structural differentiation in the mid-gut epithelium of the phasmid *Carausius morosus* Brunner.** J. Ent (A), v.47, 1972. p.71-83.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v. 1, 1976. p. 242-251.
- BEDFORD, G. O. **Biology and ecology of the Phasmatodea.** Annu Rev Entomol, v. 23, 1978. p. 125-149.
- BEREMBAUM, M. **Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera.** Am Natural, v. 115, 1980. p. 138-146.
- BERNARDI, E. R. **Biologia de *Echetus evoneobertii* sp. n. Zompro (Phasmatodea: Phasmatidae: Platycraninae) em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake E *Psidium gajava* L. (Myrtaceae).** Tese (Doutorado). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo Brasil, 2001. p. 1-18.
- BERRIDGE, M. **A structural analysis of intestinal absorption.** Symp R Ent Soc London, v. 5, 1970. p. 135-151.
- BEYENBACH, K. W. **Mechanism and regulation of electrolyte transport in Malpighian tubules.** J Insect Physiol, v. 41, 1995. p. 197-207.

- BEYENBACH, K. W. **Transport machanisms of diueresis in Malpighian tubules of insects.** J Exp Biol, v. 206, 2003. p. 3845-3856.
- BIAGIO, F. P.; TAMAKI, F. K.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F. **Digestive morphophysiology of *Grillodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae).** J Insect Physiol, v. 55, n. 12, 2009. p. 1125-1133.
- BIGGS, D. R.; MCGREGOR, P. G. **Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zeland grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors.** Insect Biochem Mol Biol, v. 26, nº 1, 1996. p. 69-75.
- BILLINGSLEY, P. F. **The midgut ultrastructure of haematophagous insects.** Ann Rev Entomol, v. 35, 1990. p. 219-248.
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M. J.; Billingsley, P. F. **Biology of the insect midgut.** London, Chapman and Hall, 1996. p. 3-30.
- BLAKE, J. D.; MURPHY, P. T.; RICHARDS, G. N. **Isolation and A/B classification of hemicelluloses.** Carbohydr Res, v. 16, 1971. p. 49-57.
- BOLOGNESI, R.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. **The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes.** Arch Insect Biochem Phisiol, v. 47, 2001. p. 62-75.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** Analyt Biochem, v. 72, 1976. p. 248-254.
- BROCK, P. D. **The amazing world of stick and leaf-insects.** The Amateur Entomologist, v. 26, 1999. p. 1-165.
- CALDEIRA, W.; DIAS, A. B.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F. **Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae.** Arch of Insect Biochem Physiol, v. 64, 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. Structure of the digestive system. In: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 4, p. 165-211.

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

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Apocrine secretion of amylase and exocytosis 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.; SERRÃO, J. E.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M. **Cytoplasmic protrusion from digestive cells of bees**. Cytobios, v. 88, 1996. p. 95-194.

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

DOW, J. A. T. **Countercurrent flow, water movements and nutrient absorption in the locust midgut**. J Insect Physiol, v. 27, 1981. p. 579-585.

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

DOW, J. A. T.; DAVIES, S. A. **The Malpighian tubule: rapid insights from post-genomic biology**. J Insect Physiol, v. 52, 2006. p. 365-378.

ENDO, Y.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. **Fine structure of developing endocrine cell and columnar cells in the cockroach midgut**. Biomed Res, v. 3, 1982. p. 637-644.

ENDO, Y.; SUGIHARA, H.; FUJITA, S.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. **Kinetics of columnar and endocrine cells in the cockroach midgut**. Biomed Res, v. 4, 1983. p. 51-60.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. **The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin**. Archs Biochem Biophys, v. 91, 1961. p. 271-278.

- ESPINOZA-FUENTES, F. P.; TERRA, W. R. **Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut.** Insect Biochem, v. 17, 1987. p. 809-817.
- EVANS, W. A. L.; PAYNE, D. W. **Carbohydases of the alimentary tract of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk.** J Insect Physiol, v. 10, 1964. p. 657-674.
- FAWCETT, D. W. **The cell.** 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1981.
- FELTON, G. W; DUFFEY, S. S. **Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory.** J Chem Ecol, v. 17, 1991. p. 1821-1836.
- FELTON, G. W; WORKMAN, J.; DUFFEY, S. S. **Avoidance of antinutritive plant defense: role of midgut pH in Colorado potato beetle.** J Chem Ecol, v. 18, 1992. p. 571-583.
- FERREIRA, C.; TERRA, W. R. **Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes.** Comp Biochem Physiol [B], v. 66, 1980. p. 467-473.
- FERREIRA, C.; TERRA, W. R. **Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae).** Insect Biochem v. 19, n° 4, 1989. p. 383-391.
- FERREIRA, C.; OLIVEIRA, M. C.; TERRA, W. R. **Compartmentalization of the digestive process in *Abracris flavolineata* (Orthoptera Acrididae) adults.** Insect Biochem, v. 20, 1990. p. 267-274.
- FERREIRA, C.; RIBEIRO, A. F.; GARCIA, E. S.; 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.
- GANGRADE, G. A. **Digestive system of *Necroscia sparaxes* Westwood (Phasmidae: Phasmida).** The Entomologist, v. 98, 1965. p. 256-264.
- GARNER, A.; PETERS, T. J.; WILKES, J. **Demonstration of HCO₃⁻-activated Mg²⁺-dependent ATPase activity in rat duodenal microvillus membranes.** J Physiol, v. 342, 1983. p. 13-14.
- GARRET, M. A.; BRADLEY, T. J.; MEREDITH, J. E.; PHILLIPS, J. E. **Ultrastructure of the Malpighian tubules of *Schistocerca gregaria*.** J Morphol, v. 195, 1988. p. 313-325.

GESASE, A. P.; SATOH, Y. **Apocrine secretory mechanism: recent findings and unresolved problems.** v. 18, 2003. p. 597-608.

GILLOT, C. **Entomology.** 2nd ed. New York: Plenum Press, 1995. p. 157-163.

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.

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

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of insects.** Cambridge [U.K.]; New York: Cambridge University Press, 2005. p. 1-41, 188-261.

GÜNTHER, K. **Über die taxonomische Gliederung und die geographische Verbreitung der Insektenordnung der Phasmatodea.** Beiträge zur Entomologie, v. 3, 1953. p. 541-563.

HAGEN, K. S.; DADD, R. H.; REESE, J. The food of insects. In: Huffaker, C. B.; Rabb, R. L. (eds). **Ecological entomology.** New York: John Wiley & Sons, 1984. p. 80-107.

HECKER, H. **Structure and function of the midgut epithelial cells in *Culicidae* mosquitoes (Insecta, Diptera).** Cell Tissue Res, v. 184, 1977. p. 321-343.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOT, C.; TOPRAK, U. **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** Annu Rev Entomol, v. 54. 2009. p. 285-302.

HUMPHREYS, M. H.; CHOUL, L. Y. N. **Anionstimulated ATPase activity of brush border from rat small intestine.** Am J Physiol, v. 236, 1979. p. 70-76.

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

JACOBS-LORENA, M.; Oo, M. M. The peritrophic matrix of insects. In: Beaty, B.; Marquardt, W. **Biology of disease vectors: a molecular, physiological and populational approach.** Denver: University Press of Colorado, 1996. p. 318-443.

- 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. 432- 443.
- JORDÃO, B. P.; CAPELLA, A. N.; 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 stablefly, *Stomoxys calcitrans*.** Insect Biocem Mol Biol, v. 26, 1996b. p. 445-453.
- JORDÃO, B. P.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; LEHANE, M. J.; FERREIRA, C. **Trypsin secretion in *Musca domestica* midguts: a biochemical and immunocytochemical study.** Insect Biochem Molec Biol, v. 26, n^o. 4, 1996a. p. 337-346.
- JUNIOR, A. B. D. **Evolução dos sistemas digestivos dos insetos.** Tese (Doutorado em Bioquímica) Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 2000.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Basic histology.** 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; SILVA, M. D. A.; TPRLONI, H. **A simple procedure to obtain one-micrometer sections of routinely embedded paraffin material.** Stain Technol, v. 64, 1989. p. 39-42.
- KARNOVSKY, M. J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy.** J Cell Biol, v. 27, 1965. p. 137.
- KEY, K. H. L. Phasmatodea (Stick-insects). In: CSIRO (ed.) **The insects of australia. A textbook for students and research workers.** Melbourne: Melbourne University Press, 1970. p. 348–359.
- KLINKOWSTROM, A. M.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. **Aminopeptidase A from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larval midguts: properties and midgut distribution.** Arch Insect Biochem Physiol, v. 27, 1994. p. 301-315.
- LANE, N. J. Insect intercellular junctions: their structure and development. In: King, R. C.; Akai, H. **Insect ultrastructure.** New York. Plenum Press, v. 1, 1984. p. 402-433.

- LANE, N. J.; SKAER, H. I. **Intercellular junctions in insect tissues**. Adv Insect Physiol, v. 15, 1980. p. 43-54.
- LANE, N. J.; CARTER, Y. R.; ASHBURNER, M. **Puffs and salivary gland function: the fine structure of the larval and prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster***. Wilhelm Roux's Arch Dev Biol, v.38, 1972. p.169-216.
- LEHANE, M. J. **Peritrophic matrix structure and function**. Annu Rev Entomol, v. 42, 1997. p. 525-550.
- LIMA, C. **Insetos do Brasil. Série didática N° 2**. Escola Nacional de Agronomia Rio de Janeiro. RJ, 1938. p. 189-204.
- MARANA, S. R.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. **Ultrastructure and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midguts**. J Insect Physiol, v. 43, 1997. p 465-473.
- MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: King, R. C.; Akai, H. **Insect ultrastructure**. New York: Plenum Press, v. 2, 1984. p. 199-261.
- MOLLENHAUER, H. H.; MOORE, D. J. **Structure of Golgi-apparatus**. Protoplasma, v. 180, 1994. p. 14-28.
- MOURA, K. R. S.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F. **The functional organization of the salivary gland of *Biomphalaria straminea* (Mollusca, Planorbidae): secretory mechanisms and enzymatic determinations**. J Moll Stud, v. 70, 2004. p. 21-29.
- NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. 2nd ed., CRC press, Boca Raton. 2008.
- NOELTING, G.; BERNFELD, P. **Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase**. Helv Chim Acta, v. 31, 1948. p. 286-290.
- PANNABECKER, T. **Physiology of the Malpighian tubule**. Annu Rev Entomol, v. 40, 1995. p. 493-510.
- PETERS, W. **Peritrophic membranes**. Berlin: Springer, 1992. 238 p.

- PETERS, W.; LATKA, I. **Electron-microscopic localization of chitin using colloidal gold labeled with wheat-germ-agglutinin.** Histochemistry, v. 84, 1986. p. 155-160.
- PIRCH, J.; GREVEN, H. **Fine-structure of the midgut and the hindgut in *Echiniscustestudo doyere* (Heterotardigrada).** Zoo Anz, v. 232, 1994. p. 161-175.
- PRIESTER, W. **Ultrastructure of the midgut epithelial cells in *Calliphora eritrocephala*.** J Ultrastruc Res, v. 36, 1971. p. 783-805.
- RAMSAY, J. A. **The excretory system of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae).** J Exp Biol, v. 32, 1955. p.183-199.
- RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. **Merops: the peptidase database.** Nucleic Acids Res, v. 32, 2004. p.160-164.
- REYNOLDS, E. S. **The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscope.** 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. Nutrition in wild and domestic animals.** Basel: Karger, v. 5, 1990. p. 96-105.
- RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **Imms' general textbook of entomology.** 10th ed., London. Chapman and Hall, v.2, 1977. p. 563-571.
- ROSS, H. H.; ROSS, C. A.; ROSS, J. R. P. **A textbook of entomology.** 4th ed., John Wiley, New York, 1982. 666 p.
- ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. **Molecular dissection of the secretory pathway.** Nature, v. 355, 1992. p. 409-415.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach.** 7th ed. Brooks Cole. 2003. 1008 p.
- SACHS, G.; FALLER, L. D.; RABON, E. **Proton/hydroxyl transport in gastric and intestinal epithelia.** J Membrane Biol, v. 64, 1982. p. 123-135.
- SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. **Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnys ello* caterpillar and inferences concerning secretory mechanism and the permeability of the peritrophic membrane.** Insect Biochem, v. 16, 1986. p. 691-700.

- 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.
- SANTOS, C. D.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C; TERRA, W. R. **The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnys ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and secretory activity in relation to the organization of digestion**. Cell Tissue Res, v. 237, 1984. p. 565-574.
- SANTOS, C. D.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnys ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms**. Can J Zool, v. 64, 1986. p. 490-500.
- SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. 2th ed. Oxford University Press, 2005. p. 1-28.
- SEGAWA, A. **Serous and mucous granule exocytosis visualized in living salivary glands**. J Dent Res, v. 77, 1998. p. 905-909.
- SELLICK, J. T. C. **Descriptive terminology of the phasmid egg capsule, with an extended key to the phasmid genera based on egg structure**. Syst Entomol v. 22, 1997. p. 97-112.
- SILVA, C. P.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. **Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells**. Insect Biochem Mol Biol, v. 26, nº 10, 1996. p. 1001-1018.
- SMITH, D. S. **Insect cells: their structure and function**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1968. p. 223-262.
- SOTTORIVA, L. D. M.; PICOLO, L.; RAMOS, L. C. H.; ROEL, A. R. **Preferência alimentar e biologia reprodutiva do bicho-pau *Phibalosoma phyllinum* Gray, 1835 (Phasmatodea, Phasmatidae) em criações de laboratório**. Multitemas (UCDB), v.35, 2008. p. 135-148.
- SPURR, A. R. **A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy**. J Ultrastruct Res, v. 26, 1969. p. 31-43.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. **Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy**. Nature, v. 216, 1967. p. 173-174.

TAYLOR, H. H. **The fine structure of the type 2 cells in the Malpighian tubules of the stick insect, *Carausius morosus***. Z Zellforsch, v. 122, 1971a. p. 411-424.

TAYLOR, H. H. **Water and solute transport by the Malpighian tubules of the stick insect, *Carausius morosus*. The normal ultrastructure of the type I cells.** Z Zellforsch, v. 118, 1971b. p. 333-368.

TELLAM, R. L. The peritrophic matrix. In: **Biology of the insect midgut**. Lehane, M. L.; Billingsley P. F. (eds.), Chapman & Hall, London, 1996. p. 86-114.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C. **Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina***. Insect Biochem Mol Biol, v. 30 (12), 2000. p. 1189-1201.

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

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

TERRA, W. R. **Evolution and function of 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 Biochem Physiol, v. 47, 2001. p. 47-61.

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. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L. I. **Insect molecular biology and biochemistry**. London: Elsevier, 2012. p. 366-418.

TERRA, W. R.; REGEL, R. **pH buffering in *Musca domestica* midguts**. Comp Biochem Physiol (A), v. 112, 1995. p. 559-564.

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**. v. 34, 1988. p. 463-472.

- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. **Distribution of digestive enzymes among the endo- and ecto-peritrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance.** J Insect Physiol, v. 25, 1979. p. 487-499.
- THREDAGOLD, L. T. **The ultrastructure of the animal cell.** Oxford: Pergamon, 1976.
- TILGNER, E. H. **Systematics of Phasmida.** Ph.D. Dissertation, Graduate Faculty of the University of Georgia, 2002.
- TOWBIN, H.; STAELHEIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 76, 1976. p. 4350-4354.
- TOWLE, D. W. **Membrane-bound ATPases in arthropod ion-transporting tissues.** Amer Zool, v. 24, 1984. p. 177-185.
- TREHERNE, J. E. **The absorption and metabolism of some sugars in the locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.).** J Exp Biol, v. 35, 1958. p. 611-25.
- 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, 227-230.
- UTIYAMA, A. H. **Estudo morfofuncional do sistema digestivo da cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae).** Dissertação (Mestrado em Genética/Biologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- VAN KERKHOVE, E. **Cellular mechanisms of salt secretion by the Malpighian tubules of Insects.** Belg J Zool, v. 124, 1994. p. 73-90.
- WATERHOUSE, D. F. **Digestion in insects: review.** Annu Rev Entomol, v. 2, 1957. p. 1-18.
- WEISS, L. **Histology.** New York: Elsevier. 1983.
- 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.
- WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology.** 7th ed. London. Chapman and Hall, 1972. p. 476-552.

WIGGLESWORTH, V. B.; SALPETER, M. M. **Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera).** J Insect Physiol, v. 8, 1962. p. 299-307.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. **Electrometric and a colorimetric determination of carbonic anhydrase.** J Biol Chem, v. 176, 1948. p. 147-154.

WOODRING, J.; LORENZ, M. W. **Feeding flow, and functional gut morphology in the cricket *Gryllus bimaculatus*.** J Morfphol, v. 268, 2007. p. 815-825.

WOODRING, J.; HOFFMANN, K. H.; LORENZ, M. W. **Activity, release and flow of digestive enzymes in the cricket, *Grillus bimaculatus*.** Physiological Entomology, v. 32, 2007. p. 56-63.

Figuras

Figura 1: Exemplar de fêmea adulta de *Phibalosoma phyllinum*.

Figura 2: Representação esquemática do sistema digestivo de *Phibalosoma phyllinum*.

VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VP: ventrículo posterior;
VPI: ventrículo posterior proximal; VPII: ventrículo posterior distal; PV:
protuberâncias ventriculares.

Figura 3: Imagens anatômicas do intestino de *P. phyllinum*.

A: Visão geral do sistema digestivo de *P. phyllinum*.

B: Detalhe da glândula salivar (Gl). IA: intestino anterior.

C: Detalhe da região do VPI, mostrando as protuberâncias ventriculares (PV), onde se inserem os canalículos (Cn).

Figura 4: Histologia do intestino anterior, VA e VM de *P. phyllinum*.

A: Corte histológico do epitélio da região do esôfago, evidenciando a presença do epitélio pavimentoso revestido por uma cutícula (Ct) contendo espículas pequenas (E) voltadas para a luz (L). M: musculatura.

B: Imagem da região do proventrículo, onde ocorre a transição entre o intestino anterior (IA) e o ventrículo anterior (VA). L: luz; M: musculatura; T: traquéia.

C: Corte histológico da região do ventrículo anterior, mostrando os dobramentos do epitélio colunar. L: luz ventricular.

D: Detalhe mostrando os enterócitos da região do VA. N: núcleos; Ni: ninhos de células regenerativas; L: luz.

E: Corte histológico da região do VM, evidenciando um epitélio colunar composto por células altas e isento de dobras. Ninhos de células regenerativas (Ni) também podem ser observados, bem como a presença de membrana peritrófica (MP). N: núcleo; L: luz.

Figura 5: Histologia do VP e intestino posterior de *P. phyllinum*.

A: Epitélio do VPI, evidenciando uma protuberância ventricular (PV) com acúmulo de uma substância fortemente corada por eosina amarela (seta). MP: membrana peritrófica; L: luz do tubo digestivo.

B: Epitélio do VPI, mostrando uma protuberância ventricular (PV) ligada a um canalículo (C). L: luz do tubo digestivo; MP: membrana peritrófica.

C: Detalhe mostrando dois canalículos paralelos. L: luz dos canalículos; N: núcleo.

D: Detalhe mostrando um túbulo de Malpighi. L: luz do túbulo de Malpighi N: núcleos.

E: Imagem da região final do ventrículo posterior (VP), e início do intestino posterior (IP), mostrando também o local da inserção dos túbulos de Malpighi (seta). TM: Túbulos de Malpighi; MP: membrana peritrófica; L: luz do tubo digestivo.

F: Corte histológico exibindo a região do cólon. É possível visualizar o epitélio cúbico revestido por uma fina cutícula (Ct). L: luz do tubo digestivo; N: núcleos.

G: Corte histológico da região do reto evidenciando as papilas retais (PR). L: luz do tubo digestivo

Figura 6: Visualização da membrana peritrófica através de imunofluorescência com WGA-FITC.

A-C: Foi observada marcação em todas as regiões do ventrículo de *P. phyllinum*, porém de forma um pouco menos intensa na região do VA (A) e mais intensa nas regiões do VM (B) e VP (C). L: luz do tubo digestivo; MP: membrana peritrófica.

Tabela 1: Resultados de experimento com a ingestão de corante realizado tanto em animais alimentados, quanto em animais mantidos em jejum, em diferentes tempos. A marcação por amaranto foi observada tanto na face interna do epitélio (Ep), quanto no conteúdo (C). Os sinais de positivo (+) representam a marcação do corante amaranto: - = sem marcação; + = marcação fraca; ++ = marcação média; +++ = marcação forte.

IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VP: ventrículo posterior; IP: intestino posterior.

Figura 7: Imagens dos resultados dos experimentos com a ingestão de amaranto. Nas imagens A, C e D, o tubo digestivo foi cortado longitudinalmente e o epitélio rebatido para os lados, evidenciando, assim, tanto o conteúdo intestinal, quanto a face interna do epitélio.

A: Imagem da região do ventrículo anterior (VA) e médio (VM) de um animal que não ingeriu corante.

B: Intestino de *P. phyllinum* alimentado *ad libitum*, dissecado 18 horas após ingestão da solução de amaranto. Note a marcação evidente no ventrículo anterior (VA). IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VP: ventrículo posterior; IP: intestino posterior. Setas: regiões marcadas com corante.

C: Imagem do ventrículo de um animal alimentado, dissecado 16 horas após ingestão do corante. Note o epitélio da região VA marcado com o amaranto. VM: ventrículo médio. Seta: região marcada com corante.

D: Imagem do intestino de um animal em jejum, dissecado 16 horas após a ingestão do corante. Note a leve marcação na região do VA, bem como ao longo de todo conteúdo e no IP. Seta: região marcada com corante.

Tabela 1:

Alimentado <i>ad libitum</i> após ingestão										Tempo após ingestão /hs	Mantido em Jejum após ingestão									
IA	VA		VM		VP		IP	Malp.	Can.		IA	VA		VM		VP		IP	Malp.	Can.
	Ep.	C.	Ep.	C.	Ep.	C.						Ep.	C.	Ep.	C.	Ep.	C.			
-	+	-	-	++	-	++	+	-	-	6hs	++	-	++	-	+++	-	+++	+++	-	-
-	+	-	-	-	-	++	+++	-	-	14hs	+++	+	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-
-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	18hs	+++	++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-

Tabela 2: Resultados de experimento com a injeção de corante realizado tanto em animais alimentados, quanto em animais mantidos em jejum, em diferentes tempos. A marcação por amaranto foi observada tanto na face externa do epitélio (Ep), quanto no conteúdo (C). Os sinais de positivo (+) representam a marcação do corante amaranto: - = sem marcação; + = marcação fraca; ++ = marcação média; +++ = marcação forte.

IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VP: ventrículo posterior; IP: intestino posterior.

Figura 8: Imagens dos resultados dos experimentos com a injeção de amaranto. Nas imagens A e C, o tubo digestivo foi cortado longitudinalmente e o epitélio rebatido para os lados, evidenciando, assim, tanto o conteúdo intestinal, quanto a face interna do epitélio.

A: Imagem do ventrículo e intestino posterior de um animal mantido em jejum, dissecado 16 horas após injeção do corante. Note a presença de corante no conteúdo tanto do ventrículo, quanto do intestino posterior. Note, também, a marcação nos túbulos de Malpighi (seta).

B: Detalhe da região do VP e intestino posterior em um animal alimentado, dissecado 4 horas após injeção do corante. Note os túbulos de Malpighi fortemente corados (seta), ao contrário dos canalículos (cabeça de seta) e protuberâncias ventriculares (PV). IP: intestino posterior. O epitélio do ventrículo posterior (VPI e VPII) também não se apresenta corado.

Tabela 2:

Alimentado <i>ad libitum</i> após injeção										Tempo após injeção /hs	Mantido em jejum após injeção									
IA	VA		VM		VP		IP	Malp.	Can.		IA	VA		VM		VP		IP	Malp.	Can.
	Ep.	C.	Ep.	C.	Ep.	C.						Ep.	C.	Ep.	C.	Ep.	C.			
-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	-	2hs	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-
-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	-	4hs	-	-	+	-	++	-	-	+++	+++	-
-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	16hs	-	+	+	-	+	-	+++	+++	+	-

Figura 9: Esquema mostrando a morfologia das células que compõem o ventrículo, os apêndices ventriculares e os túbulos de Malpighi de *P. phyllinum*.

I: Representação esquemática do sistema digestivo de *P. phyllinum*.

II: Detalhe esquemático do aspecto histológico das protuberâncias ventriculares.

Representações esquemáticas das células do VA (A), VM (B), VPI (C), VPII (D) e dos seguintes epitélios: transição entre o ventrículo e os apêndices ventriculares (E), protuberâncias ventriculares (F), canalículos (G) e túbulos de Malpighi (H).

Figura 10: Aspecto ultraestrutural das células do VA.

A: Visão geral do ápice de célula colunar do ventrículo anterior, mostrando as vesículas secretoras características dessa região (setas) e as microvilosidades apicais (Mv). Mit: mitocôndria.

B: Detalhe do ápice de uma célula colunar, onde podem ser observadas vesículas de secreção (seta), bem como desmossomos apicais (cabeça de seta) e a região de ocorrência das junções septadas lisas (JS) entre células.

C: Imagem do citoplasma próximo ao núcleo (N), na qual pode ser observada abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER). Note a presença de um nucléolo conspicuo (Nu) no interior do núcleo (N). Mit: mitocôndria.

D: Detalhe da região de Golgi (G), onde se nota a presença de uma vesícula de secreção associada (seta).

E: Imagem do citoplasma basal de um enterócito da região do ventrículo anterior, mostrando as invaginações na membrana plasmática basal (setas), bem como a lâmina basal (LB). Mit: mitocôndria.

F: Figura que evidencia uma célula endócrina (CE), próxima à membrana plasmática basal. Notar a presença de inúmeros grânulos no citoplasma. LB: lâmina basal.

Figura 11: Imagens ultraestruturais mostrando células da região do VM.

A: Visão geral da região apical do enterócito exibindo vesículas secretoras características (setas). Mv: microvilosidades.

B: Detalhe do ápice da célula colunar mostrando as vesículas (setas) e as microvilosidades apicais (Mv). Mit: mitocôndria.

C: Detalhe da região de complexo de Golgi (G). RER; retículo endoplasmático rugoso.

D: Imagem da região basal da célula colunar evidenciando, além da lâmina basal (LB), as invaginações da membrana plasmática basal (setas). Mit: mitocôndria.

E: Imagem de um ninho de células regenerativas localizado no ventrículo médio. Note os núcleos (N) grandes em relação aos citoplasma das células regenerativas. Nu: nucléolo; LB: lâmina basal.

Figura 12: Aspecto ultraestrutural da região do VPI.

A: Imagem exibindo uma visão geral do ápice de um enterócito da região posterior do ventrículo. Note as dilatações na ponta das microvilosidades (seta). Mv: microvilosidades.

B: Detalhe da região apical evidenciando as microvilosidades (Mv) com as extremidades dilatadas (seta).

C: Detalhe das microvilosidades mostrando as dilatações em seu ápice que indicam secreção microapócrina. Nota-se, ainda, a presença de vesículas no interior das dilatações (seta).

D: Imagem da região do complexo de Golgi (G).

E: Detalhe mostrando a região próxima ao núcleo (N). Pode-se observar a presença de feixes de microtúbulos (Mt).

F: Micrografia evidenciando as invaginações da membrana plasmática basal e suas aberturas para a lâmina basal (setas). Mit: mitocôndrias; LB: lâmina basal.

Figura 13: Imagens ultraestruturais da região do VPIL.

A: Micrografia exibindo uma visão geral do ápice desta região do ventrículo. Note o grande tamanho das microvilosidades (Mv), bem como a presença de dilatações no interior das mesmas (setas).

B: Detalhe do ápice das microvilosidades. Note a presença de dilatações nas pontas das microvilosidades, algumas das quais possuindo pequenas vesículas em seu interior (seta).

C: Detalhe do citoplasma apical. Note a presença de pequenas vesículas de baixa eletrondensidade (seta). Mv: microvilosidades.

D: Micrografia da região próxima ao núcleo (N). G: áreas de Golgi; Mit: mitocôndrias.

E: Imagem da região basal mostrando o complexo de invaginações da membrana plasmática basal com muitas aberturas (setas), associado a mitocôndrias (Mit). LB: lâmina basal.

Figura 14: Imagens ultraestruturais das células da região de transição entre o VPI e as protuberâncias ventriculares.

A: Micrografia mostrando a região apical das células da região de transição. Nota-se a presença de longas microvilosidades (Mv). Mit: mitocôndrias; N: Núcleo; Nu: nucléolo.

B: Imagem mostrando o limite entre uma célula do epitélio de transição (T) e uma célula característica do epitélio que forma as protuberâncias ventriculares (PV). Mv: microvilosidades.

C: Detalhe da base das células do epitélio de transição. Note o elaborado labirinto composto por invaginações da membrana plasmática basal com muitas aberturas para a lâmina basal (setas), sem mitocôndrias associadas. LB:lâmina basal.

D: Micrografia eletrônica evidenciando o detalhe da região basal. À direita, pode-se observar a base de uma célula do epitélio do ventrículo posterior proximal (VPI); note a abundância de mitocôndrias (Mit) entre as invaginações da membrana plasmática basal. À esquerda, evidencia-se a base de uma célula do epitélio de transição (T), onde é notória a ausência de mitocôndrias no labirinto basal. LB: lâmina basal.

E: Detalhe do ápice de uma célula do epitélio de transição (T) e de uma célula do epitélio ventricular (VPI). Notar a diferença de eletrondensidade entre o citoplasma das duas células.

Figura 15: Imagens ultraestruturais de células do epitélio que compõem as protuberâncias ventriculares.

A: Aspecto geral da célula do epitélio. Note o núcleo grande e arredondado (N) e a abundância de mitocôndrias (Mit) por toda a extensão da célula. É possível observar, ainda, a presença de diversas áreas de Golgi (G), bem como as invaginações da membrana plasmática basal formando um labirinto (setas). LB: lâmina basal; Nu: nucléolo.

B: Detalhe da região apical da célula que compõe esse epitélio. Note a presença de mitocôndrias no interior das microvilosidades (setas). Mit: mitocôndrias; G: área de Golgi; Mv: microvilosidades.

C: Micrografia eletrônica evidenciando em detalhe a região basal das células que formam as protuberâncias ventriculares. As setas apontam para as aberturas das invaginações da membrana plasmática. LB: lâmina basal; Mit: mitocôndrias; G: área de Golgi.

Figura 16: Micrografias eletrônicas das células que compõem os canalículos.

A: Aspecto geral de uma célula do canalículo. Notar o núcleo (N) ovalado, com um nucléolo (Nu) conspícuo, bem como a presença de microvilosidades (Mv), com mitocôndrias em seu interior (setas). G: áreas de Golgi; Mit: mitocôndrias; LB: lâmina basal.

B: Micrografia exibindo um detalhe da zona apical de uma célula do canalículo. Mit: mitocôndrias; Mv: microvilosidades.

C: Detalhe da região basal da célula, mostrando o labirinto formado pelas invaginações da membrana plasmática basal, possuindo muitas aberturas para a lâmina basal (setas), porém sem mitocôndrias associadas. LB: lâmina basal.

Figura 17: Imagens evidenciando a ultraestrutura de células que compõe os túbulos de Malpighi.

A: Aspecto geral de uma célula do túbulo de Malpighi. Note o núcleo conspícuo (N), bem como a abundância de mitocôndrias (Mit) nas regiões apical e basal da célula, em particular, suas projeções para o interior das microvilosidades (setas). Mv: microvilosidades; LB: lâmina basal.

B: Detalhe mostrando a presença de uma junção septada escalariforme (seta) entre as membranas laterais de duas células.

C: Detalhe mostrando o ápice de uma célula que compõe esse epitélio. Note a presença de mitocôndrias no interior das microvilosidades apicais (setas). Mv: microvilosidades; Mit: mitocôndrias.

D: Micrografia eletrônica evidenciando a região da base de uma célula do túbulo de Malpighi. Note o labirinto formado por invaginações da membrana plasmática basal, associadas às mitocôndrias (Mit). As setas indicam as aberturas das invaginações para a lâmina basal. LB: lâmina basal.

Figura 18: Imagens do ventrículo posterior, obtidas através de microscopia eletrônica de varredura.

A: Micrografia eletrônica do ventrículo posterior, evidenciando uma protuberância ventricular (PV) e um canalículo saindo da região apical da protuberância (C).

B: Imagem de uma protuberância ventricular (PV) e canalículo associado (C), ambos próximos a uma traquéia (T). Notar ramificação da traqueia se conectando a protuberância (seta).

C: Imagem exibindo um canalículo. Notar a presença de uma faixa muscular espiralada ao redor do canalículo (seta).

D: Detalhe de um túbulo de Malpighi. Notar as faixas musculares espiraladas ao redor do túbulo, semelhantes às dos canalículos (seta).

Figura 19: Experimentos de “western blot”.

A: Reconhecimento da amilase de *P. phyllinum* por anti-amilase de *T. molitor*. M: marcador de peso molecular; 1: amilase de *P. phyllinum*; 2: amilase de *T. molitor*.

B: Reconhecimento de tripsina de *P. phyllinum* por anti-tripsina de *M. domestica*. M: marcador de peso molecular; 1: tripsina de *P. phyllinum*; 2: tripsina de *M. domestica*; 3: gel de atividade evidenciando a atividade de tripsina de *P. phyllinum*.

(A)

(B)

Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das regiões do ventrículo de *P. phyllinum* tratadas com anticorpo anti-amilase de *T. molitor*.

A: Região apical do epitélio do VA. Note microvilosidades (Mv) e vesículas secretoras (Vs) marcadas com conjugado de ouro.

B: Detalhe de um enterócito do VA, mostrando uma área de Golgi (G), bem como vesículas secretoras (Vs), ambos marcados com conjugado de ouro.

C: Imagem do ápice de um enterócito do VM mostrando partículas de ouro associadas com as microvilosidades (Mv) e vesículas secretoras (Vs).

D: Detalhe da região do ápice do epitélio da região do VPI. Cit: citoplasma; Mv: microvilosidades. Note a ausência de marcação.

E: Ápice de um enterócito da região do VP II. Mv: microvilosidades; Cit: citoplasma. Note a ausência de marcação.

Figura 21: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do ventrículo de *P. phyllinum* tratado com o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica*.

A: Ápice de um enterócito do VA. Note marcação nas vesículas secretoras (Vs).

B: Detalhe mostrando uma área de Golgi (G), bem como vesículas secretoras (Vs) marcadas com partículas de ouro.

C: Imagem do ápice do epitélio do VM, evidenciando vesículas secretoras (Vs) marcadas com partículas de ouro. Note também a presença de partículas de ouro associados às microvilosidades (Mv).

D: Detalhe da região apical de um enterócito da região do VPI. Cit: citoplasma; Mv: microvilosidades.

E: Ápice de um enterócito do VPIL. Mv: microvilosidades.

Figura 22: Distribuição da atividade enzimática (mU/animal) em diferentes porções do tubo digestivo de *P. phyllinum*. C: refere-se ao conteúdo do tubo digestivo; M: fração de membrana do epitélio; S: fração solúvel dos epitélios.

IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VPI: ventrículo posterior proximal; VPPI: ventrículo posterior distal; IP: intestino posterior.

As medidas de erro padrão ficaram entre 10% - 20%. A atividade (mU/animal) total de cada enzima no intestino foi: tripsina = 246000; quimotripsina = 1458000; aminopeptidase = 11700; maltase = 414,0. A quantidade de proteína por animal em cada região intestinal foi: IA= 675 mg; VA = 101 mg; VM = 76 mg; VPI = 51,4 mg; VPPI 31,3 mg; IP = 102 mg.

Atividade Relativa (%)

Tabela 3: Excreção (%) de enzimas do ventrículo de *P.phyllinum* a cada vez que o intestino médio se esvazia. Apenas foram consideradas as enzimas com atividade majoritária no conteúdo ou na fração solúvel do epitélio, visto que é esta porção das enzimas passíveis de serem excretadas.

*Porção da atividade de enzimas ventriculares que podem ser excretadas.

**A atividade foi medida somente no cólon, pois em Phasmida (Ramsay, 1955), como em muitos insetos (Chapman, 1998), o reto possui uma função de reabsorção de água, o que pode inativar enzimas digestivas.

***A taxa de excreção foi calculada através da seguinte fórmula: (Atividade de enzima no cólon X 3,77)/ (atividade de enzima no conteúdo ventricular e fração solúvel) x 100. A atividade do cólon foi multiplicada por 3,77, pois medições do volume do sistema digestivo de 3 animais distintos nos permitiram estimar que o conteúdo do ventrículo, ao ser esvaziado é capaz de encher 3,77 vezes o cólon.

Tabela 4: Resultados de atividade (U/animal) e atividade específica (U/mg de proteína) de anidrase carbônica no epitélio das diferentes regiões do ventrículo, apêndices ventriculares e túbulos de Malpighi de *P. phyllinum*.

VA/VM: ventriculos anterior e médio; VPI: ventriculo posterior proximal; VPII: ventriculo posterior distal; Malpighi: túbulos de Malpighi; Ap. vent: apêndices ventriculares.

Tabela 3:

ENZIMA	atividade no conteúdo ventricular e fração solúvel *	atividade no intestino posterior **	% excreção ***
Tripsina	125000 ± 18100	11600 ± 280	35,1
Amilase	11100 ± 1390	0	0,0
Quimotripsina	1105000 ± 85200	15400 ± 2010	5,3
Maltase	336 ± 65	9,5 ± 1,9	10,7

Tabela 4:

Atividade de anidrase carbônica	at/animal	at. específica (U/mg)
VA/VM	1520 ± 244	1,27 ± 0,11
VP1	4802 ± 619,4	1,52 ± 0,21
VP2	1470 ± 249,9	1,03 ± 0,18
Malpighi	13900 ± 2500	7,0 ± 1,2
Ap. vent.	25300 ± 2860	11,88 ± 0,88

Figura 23: Esquema do sistema digestivo de *P. phyllinum* indicando os valores de pH luminal ao longo das regiões intestinais, obtidos a partir de medições com o pHmetro.

IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VMI^{*}: ventrículo médio proximal; VMII^{*}: ventrículo médio distal; VPI: ventrículo posterior proximal; VPII: ventrículo posterior distal; IP: intestino posterior.

*A região do ventrículo médio (VM) foi subdividida em ventrículo médio proximal (VMI) e ventrículo médio distal (VMII), para que fosse possível ter uma resolução mais fina das alterações de pH ao longo do tubo digestivo de *P. phyllinum*.

Figura 24: Efeito do pH na atividade de amilase e de tripsina no ventrículo de *P. phyllinum*. Os tampões (50 mM) utilizados foram: tampão citrato (▲); tampão citrato-fosfato (■); tampão fosfato (□); tampão MES-HCl (◆); tampão TRIS-HCl (●); tampão GLY-NaOH (o).

Atividade Relativa (%)