

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS  
HEMÓCITOS DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi*  
ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO A SUBSTRATO  
CONTENDO LODO DE ESGOTO**

**DANIELLI GIULIANO PEREZ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro  
Março - 2011**

DANIELLI GIULIANO PEREZ

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO  
DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi* ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO A  
SUBSTRATO CONTENDO LODO DE ESGOTO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEM S. FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas (Biologia Celular  
e Molecular).

Rio Claro  
2011

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria, e à  
minha avó, Catharina, bênçãos de Deus em minha vida.

## *Agradecimentos*

*Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me dado vida e soprado sobre mim o Seu Doce Espírito Santo. Senhor Jesus, obrigada por cuidar de mim nos mínimos detalhes e ter realizado um grande sonho guardado em meu coração por muito tempo. Valeu a pena esperar, e a Tua promessa finalmente se cumpriu em mim!! Tu és fiel!*

*Agradeço à minha mãe, simplesmente por tudo. À minha querida avó, que partiu neste ano, deixando muitas saudades. Vózinha, creio que estás com Cristo e que iremos nos reencontrar um dia.*

*Ao meu namorado, por ser tão companheiro, atencioso e carinhoso. Você é mais do que pedi a Deus. Pois como diz a bíblia, “Deus é poderoso para fazer infinitamente mais do que pedimos ou pensamos” (Ef. 3:20, 21).*

*Meus agradecimentos à Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, por fornecer a estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho. À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.*

*Também não posso deixar de agradecer à minha estimada orientadora, Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti, pela excelente orientação, pela amizade, paciência, e por ter sido um dos meus maiores exemplos de profissionalismo.*

*Agradeço aos técnicos Antônio Yabuki, Mônica Iamonte, Cristiane Miléo, Sandra Veloso e Gérson Souza, pelo grande auxílio nos momentos de total desespero, hehe.*

*Aos meus colegas e amigos do Departamento de Biologia, em especial a todos os orientados da Profa. Carmem.*

*Por fim, agradeço aos Pastores Juraci e Eliane e a todo o pessoal da Igreja Evangélica Ministério Novo Nascimento, pelas orações, pela amizade e pelas muitas risadas.*

*“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”  
(Rm 11:36)*

## RESUMO

---

Embora os invertebrados sejam conhecidos pela grande facilidade de acúmulo de poluentes presentes em seu ambiente, e muitos serem utilizados como espécies sentinelas em estudos de biomonitoramento, pouco ainda é conhecido sobre o impacto de toxicantes sobre o sistema imune desses animais. Nesse sentido, os hemócitos desempenham um papel fundamental: estas células circulam livremente através da hemolinfa dos invertebrados e atuam no reconhecimento de materiais estranhos ao organismo, mediando e efetuando reações de defesa celular. Diferentes tipos morfológicos podem ser reconhecidos, mas ainda há controvérsia entre os pesquisadores sobre a exata classificação dos hemócitos, devido à diversidade de técnicas para preservação e observação dessas células. A classificação mais aceita atualmente agrupa os hemócitos em sete tipos principais: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos. Por meio da utilização de técnicas histológica, histoquímica e ultra-estrutural, o presente trabalho objetivou caracterizar morfofisiologicamente os hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, bem como aqueles encontrados por entre as células da camada de corpo gorduroso no intestino médio de animais expostos a substratos contendo diferentes amostras de lodo de esgoto, resíduo gerado nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Este resíduo tem sido cogitado como um bom condicionador de solo em áreas degradadas e como um potencial fertilizante agrícola, apesar do risco de estar contaminado com patógenos e/ou metais pesados. A partir das análises realizadas, foram identificados três tipos morfológicos distintos de hemócitos circulantes na hemolinfa dessa espécie: pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos (subtipos I e II). Também foram observadas células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos e entre plasmatócitos e granulócitos, sugerindo uma provável diferenciação celular na hemolinfa. Granulócitos e plasmatócitos também puderam ser identificados no intestino médio dos animais expostos ao lodo, enquanto pró-hemócitos estiveram ausentes. Da mesma forma, acreditamos que haja uma diferenciação celular no intestino médio, uma vez que células com características intermediárias entre plasmatócitos e granulócitos foram observadas. É possível que células mais jovens tenham migrado da hemolinfa para o tecido injuriado pelo lodo e ali completado o processo de diferenciação.

**Palavras-chave:** diplópodo; imunidade de invertebrados; hemócito; estresse ambiental; lodo de esgoto.

## ABSTRACT

---

Although invertebrates are known for ease accumulation of pollutants present in their environment and several are used as sentinel species in biomonitoring studies, little is known about the impact of toxicants on the immune system of these animals. In this sense, hemocytes play an important role: these cells circulate freely through the hemolymph of invertebrates and act in the recognition of foreign materials to the organism, mediating and performing cellular defence reactions. Different morphological types are recognized, but there is still controversy among the researchers about the exact classification of the hemocytes due to the diversity of techniques for preservation and observation of these cells. Currently, the most accepted classification groups the hemocytes into seven main types: pro-hemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, adipohemocytes, oenocytoids and coagulocytes. By histological, histochemical and ultra-structural techniques, the present study aimed to characterize morpho-physiologically the hemocytes circulating in the hemolymph of the diplopod *Rhinocricus padbergi*, as well as those found among the cells of the fat body layer of the midgut of animals exposed to substrates containing samples of sewage sludge, residue generated in the Sewage Treatment Plants (STPs). This residue has been considered as a good soil conditioner on degraded areas and as a potential agricultural fertilizer, despite the risk of being contaminated with pathogens and/or heavy metals. From the analyses carried out, it was identified three distinct morphological types of hemocytes circulating in the hemolymph of this species: pro-hemocytes, plasmatocytes and granulocytes (subtypes I and II). It was also observed cells with intermediate characteristics between pro-hemocytes and plasmatocytes, suggesting a probable cellular differentiation in the hemolymph. Granulocytes and plasmatocyte could also be identified in the midgut of the animals exposed to the sludge, while pro-hemocytes were absent. Likewise, we believe that there is a cellular differentiation in the midgut, since cells with intermediate characteristics between plasmatocytes and granulocytes were observed. It is possible that younger cells have migrated from the hemolymph into the tissue injured by the sludge and completed there the differentiation process.

**Key-words:** diplopod; immunity of invertebrates; hemocyte; environmental stress; sewage sludge.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução.....</b>                                                                                                                                                | <b>7</b>  |
| <b>Objetivos .....</b>                                                                                                                                                | <b>10</b> |
| <b>Revisão da Literatura.....</b>                                                                                                                                     | <b>11</b> |
| A Classe Diplopoda e sua utilização em estudos de bioindicação.....                                                                                                   | 11        |
| A espécie <i>Rhinocricus padbergi</i> .....                                                                                                                           | 14        |
| O Lodo de esgoto .....                                                                                                                                                | 16        |
| Defesa celular: hemócitos .....                                                                                                                                       | 19        |
| <b>Material e Métodos .....</b>                                                                                                                                       | <b>24</b> |
| <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                               | <b>27</b> |
| <b>Artigo 1.</b> Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review.....                                                                        | 28        |
| <b>Artigo 2.</b> Caracterização dos tipos celulares encontrados na hemolinfa do diplópodo <i>Rhinocricus padbergi</i> .....                                           | 40        |
| <b>Artigo 3.</b> Caracterização dos hemócitos presentes no intestino médio do diplópodo <i>Rhinocricus padbergi</i> exposto a substrato contendo lodo de esgoto ..... | 57        |
| <b>Discussão Geral.....</b>                                                                                                                                           | <b>77</b> |
| <b>Conclusão .....</b>                                                                                                                                                | <b>80</b> |
| <b>Referências Bibliográficas.....</b>                                                                                                                                | <b>81</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

---

Os diplópodos são artrópodos terrestres característicos por apresentarem dois pares de pernas em cada segmento corpóreo. São popularmente conhecidos como embuás, caramujis, gongôs, gongolôs e piolhos-de-cobra, sendo este último termo utilizado principalmente no estado de São Paulo. Na literatura científica são também denominados milípedes, devido ao grande número de pernas que apresentam.

Estes animais ocupam o nível trófico de decompositores, participando ativamente no processo de aeração e enriquecimento do solo. São típicos de habitats úmidos e com grande disponibilidade de material orgânico, sendo geralmente encontrados nos lugares sombrios das matas, vivendo sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Alimentam-se de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas e pequena quantidade de minerais do substrato em que são encontrados.

Assim, pelos seus hábitos, os diplópodos têm sido apontados como bons indicadores ambientais em análises de solo (HOPKIN et al., 1985), uma vez que, ao revolverem o substrato, podem entrar em contato direto com potenciais contaminantes. No Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Rio Claro/SP, foram feitas propostas da utilização da espécie *Rhinocricus padbergi* como bioindicadora de solos impactados, sendo realizados estudos envolvendo as análises histológica, histoquímica e ultra-estrutural do intestino médio de espécimens submetidos por diferentes períodos a substratos contendo lodo de esgoto e *landfarming* de refinaria de petróleo (BOZZATTO; FONTANETTI, 2007; 2008; NOGAROL et al., 2008; SOUSA; FONTANETTI, 2008; GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; PEREZ; FONTANETTI, 2010a; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Os resultados obtidos têm demonstrado que a utilização da espécie *R. padbergi* em análises ecotoxicológicas de solo é viável. Dentre as respostas tissulares no intestino médio dos animais expostos ao lodo, uma delas foi a identificação de aglomerados de hemócitos entre as células da camada de corpo gorduroso, indicando provável injúria tecidual com processo inflamatório (GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; PEREZ; FONTANETTI, 2010a). Também foi observado que alguns hemócitos reagiram positivamente ao PAS (ácido periódico de Schiff) (detecção de polissacarídeos neutros), enquanto outros reagiram positivamente ao azul de bromofenol (detecção de proteínas) (PEREZ; FONTANETTI, 2010a).

Os hemócitos são células circulantes na hemolinfa dos invertebrados, engajadas no processo de defesa do organismo. Podem ser definidos como uma mistura de tipos celulares com diferentes morfologias e funções biológicas, podendo também formar agregados denominados órgãos hematopoiéticos, de diferentes complexidades (CORREIA, 2008; FALLEIROS et al., 2003). As principais respostas mediadas por hemócitos são: fagocitose, nodulação, encapsulação, citotoxicidade por meio da produção de reativos intermediários de oxigênio, formação de tecido conectivo ao redor de material estranho ao organismo, secreção de enzimas e coagulação da hemolinfa após a ruptura da cutícula e epiderme (JONES, 1962; LAVINE; STRAND, 2002; FALLEIROS et al., 2003).

Diferentes tipos morfológicos de hemócitos podem ser identificados, mas sua classificação pode ser muito variada, uma vez que estas células podem apresentar diversas formas e exercer várias funções nas diferentes espécies estudadas, além de existirem muitos métodos para sua preservação e observação (GUPTA, 1979). A classificação mais aceita atualmente é aquela proposta por Gupta (1985) para hemócitos de insetos, em que o autor descreve sete tipos principais, de acordo com os aspectos morfológicos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos.

De acordo com Pipe et al. (1999), o estudo dos componentes do sistema imune pode fornecer uma medida do nível de estresse dos organismos em decorrência da contaminação ambiental. Neste sentido, uma das grandes preocupações da comunidade científica é a destinação do resíduo gerado após o tratamento do esgoto realizado nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Este resíduo, conhecido como lodo de esgoto, é rico em matéria orgânica, podendo ser utilizado na recuperação de solos degradados e como fertilizante agrícola (CORAUCCI FILHO et al., 2003; BETTIOL; CAMARGO, 2006; KITAMURA et al., 2008); porém, por conter prováveis contaminantes, principalmente metais pesados, sua aplicação em solos deve ser tratada com muita cautela (BOEIRA et al., 2002; SILVA et al., 2006; CAMARGO et al., 2008; MIELLI et al., 2009).

É importante conhecer a ação que os constituintes do lodo podem ter na fauna característica do solo onde o mesmo será aplicado. Neste contexto, apesar da importância ecológica, poucos estudos têm sido realizados para examinar as estratégias de sobrevivência e destoxificação dos milípedes em função dos metais presentes no ambiente (FONTANETTI et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho visou caracterizar morfofisiologicamente os diferentes tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, bem como aqueles presentes por entre as células da camada de corpo gorduroso no intestino médio dos

animais expostos a substratos contendo lodo de esgoto de diferentes origens. Além disso, o trabalho também buscou inferir as funções dos tipos caracterizados no processo de defesa realizado pelo diplópodo em resposta à exposição ao lodo.

## 2. OBJETIVOS

---

Este projeto teve como objetivos principais:

1. Caracterizar morfofisiologicamente os tipos de hemócitos que circulam livremente na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, por meio da técnica do esfregaço e da análise ultra-estrutural;
2. Caracterizar morfológicamente os tipos de hemócitos encontrados por entre as células da camada de corpo gorduroso no intestino médio desta espécie, após exposição dos animais a substratos contendo lodo de esgoto de diferentes origens, por meio das técnicas histológica, histoquímica e ultra-estrutural;
3. Uma vez caracterizados, inferir as funções dos hemócitos no processo de defesa realizado pelos diplópodos expostos ao lodo.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

#### **3.1. A Classe Diplopoda e sua utilização em estudos de bioindicação**

Os miriápodos são artrópodos terrestres que podem apresentar um ou dois pares de pernas em cada segmento. São divididos em quatro classes: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda e Symphyla, sendo que a classe Diplopoda caracteriza-se pela presença de dois pares de pernas por segmento.

Os diplópodos encontram-se entre os grupos de maior diversidade no meio terrestre. Cerca de 12.000 espécies já foram descritas no mundo todo, mas estima-se que exista em torno de 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002). Entre as 20 famílias de diplópodos brasileiros, as mais conhecidas são Leptodesmidae, Spirostreptidae e Rhinocricidae.

Sua distribuição é cosmopolita, podendo ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas, exceto na Antártida. São mais abundantes nos trópicos, sendo que a fauna tropical é particularmente pouco conhecida (aproximadamente 1.100 espécies). Poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou ambiente semi-aquático (KIME; GOLOVATCH, 2000). Os representantes mais conhecidos são os da América do Norte e Europa.

Os diplópodos possuem o corpo alongado, cilíndrico ou levemente achatado. O tamanho do adulto pode variar entre 2 mm e 30 cm (HOFFMAN et al., 2002) e a coloração é bastante variada, existindo tons de vermelho, marrom e amarelo; cores vivas são raras ou constituem pequenos detalhes. O tegumento externo é a primeira linha de defesa, fornecendo uma efetiva barreira físico-química contra toxicantes ambientais. A grande maioria dos representantes possui um exoesqueleto forte e resistente, devido à impregnação do tegumento por sais de cálcio. A presença de poro repugnatório em determinados segmentos é característica da grande maioria das ordens, havendo raras exceções. Esse poro corresponde à abertura da glândula repugnatória, produtora de secreção que contém basicamente cianeto e iodo, com cheiro forte e desagradável, repelindo predadores; o conteúdo e a quantidade desta secreção são diretamente influenciados pelo tipo de vegetação, e, conseqüentemente, podem estar relacionados a impactos causados no solo (NAKAMURA et al., 2005). Além da eliminação de substâncias com odor forte e do tegumento resistente, uma outra forma de defesa é o enrolamento do corpo em espiral plana.

Aliado ao rígido exoesqueleto, o trato digestório contribui para o sistema de defesa

inicial dos diplópodos, agindo como uma barreira fisiológica à entrada de elementos estranhos ao organismo. O trato digestório consiste de um tubo reto, que se estende da boca até o ânus, dividido em três regiões principais: intestino anterior, médio e posterior. A maior parte da digestão e assimilação do alimento processa-se no intestino médio, o qual é uma importante área de estocagem de minerais, como cálcio, potássio, magnésio, cobre, ferro, silício e zinco (HUBERT, 1979). O epitélio intestinal age como uma barreira entre o meio interno do animal e o alimento contido no lúmen (HOPKIN, 1990).

Quando partículas estranhas conseguem atravessar essas barreiras, alcançando a circulação, tornam-se expostas a uma variedade de mecanismos humorais e celulares de defesa do organismo. O sistema circulatório dos diplópodos é aberto; a hemolinfa está contida na cavidade geral do corpo (hemocele), e banha vários órgãos internos, sendo que a quantidade e composição variam de acordo com a espécie e estado fisiológico do animal. Consiste de uma porção líquida (plasma sanguíneo) e de numerosas células que circulam livremente, os hemócitos, os quais constituem a barreira final do sistema de defesa dos artrópodos (NEGREIRO et al., 2004; CORREIA et al., 2005).

Ecologicamente, os milípedes são reconhecidos como invertebrados saprófagos e detritívoros. Alimentam-se de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas e pequena quantidade de minerais do solo. Porém, embora essa generalização seja válida para a maioria dos diplópodos, não é incomum a existência de espécies carnívoras em certas ordens do grupo (HOPKIN; READ, 1992).

Possuem hábitos predominantemente noturnos, evitando a exposição ao sol e ao calor, exceto em condições de alagamento do solo devido às chuvas de verão ou quando migram para lugares alternativos de sobrevivência. Geralmente são encontrados em ambientes úmidos, ricos em matéria orgânica, vivendo no interior das matas, sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Muitos habitam galerias deixadas por outros animais, como minhocas, outros são cavernícolas, e ainda existem aqueles que podem ser considerados sinantrópicos. Os diplópodos com caráter sinantrópico são os que vivem na dependência direta do homem, vivendo em hortas, quintais, estufas, pomares, e até mesmo nas próprias casas, alimentando-se de detritos do lixo doméstico.

Como detritívoros, os milípedes têm um papel importante no ciclo de nutrientes do solo, redistribuindo o material orgânico e liberando elementos químicos como o nitrogênio (DANGERFIELD; MILNER, 1996). Uma vez que a reciclagem dos nutrientes é um processo fundamental para o dinamismo dos ecossistemas, os diplópodos são essenciais neste aspecto. A colonização do solo realizada por esses animais também fornece condições favoráveis ao

trabalho de decomposição de fungos e bactérias, promovendo a mineralização. Além disso, os produtos de excreção dos diplópodos (amônia e ácido úrico), quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (BOCCARDO; PENTEADO, 1997).

Pelos seus hábitos, os diplópodos têm sido considerados bons indicadores ambientais para análises de solo, podendo ser utilizados como organismos-testes (HOPKIN et al., 1985). Neste contexto, a histologia é uma ferramenta bastante utilizada em estudos com invertebrados, visando a identificação de diferentes danos causados por substâncias nocivas aos organismos, uma vez que, dependendo da intensidade do fator estressante e do tipo de órgão afetado, as alterações celulares no organismo podem ser diversas (TRIEBSKORN et al., 1999). Em diplópodos, alguns estudos com este enfoque foram realizados utilizando o tubo digestório e o corpo gorduroso (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; GODOY; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2010a; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Devido ao contato direto com contaminantes presentes no solo, vários trabalhos têm sido conduzidos em relação ao acúmulo de metais em invertebrados terrestres (HOPKIN et al., 1989; GRÄFF et al., 1997; HEIKENS et al., 2001; VELTMAN et al., 2007). No caso de diplópodos, eles têm sido utilizados com sucesso como indicadores da presença de cádmio, chumbo e zinco no solo (BEYER et al., 1985; READ; MARTIN, 1990; KÖHLER; ALBERTI, 1992).

Na maioria dos representantes da fauna edáfica, os metais são seletivamente concentrados em um ou poucos órgãos, ou então em partes específicas de um tecido; tipicamente, estes órgãos são partes do sistema digestório (DALLINGER et al., 1992). Os diplópodos podem ser muito influenciados pela deposição de toxicantes no ambiente, metabolizando e/ou acumulando vários tipos de metais, principalmente no intestino médio e no corpo gorduroso (KÖHLER et al., 1995).

Em um trabalho conduzido por Triebkorn et al. (1991), os autores destacaram a importância dos estudos com microscopia eletrônica para elucidar injúrias celulares causadas por substâncias danosas e a conveniência no uso de invertebrados em estudos de biomonitoramento. Além da utilização de organismos como camarão, planária, lesma e inseto, foi escolhida a espécie *Cylindroiulus punctatus* como representante da classe dos diplópodos. O milípede foi tratado com ágar e partículas de folhas contaminadas com chumbo em concentração subletal por 30 dias; após o tratamento, o intestino médio foi retirado e processado para microscopia eletrônica de transmissão. As análises revelaram várias alterações ultra-estruturais nas células do tecido, como condensação do citoplasma das células

epiteliais, dilatação dos espaços intercelulares no epitélio, desarranjo das mitocôndrias e das cisternas do retículo endoplasmático.

Enquanto algumas espécies de milípedes sofrem uma notável redução no número de seus representantes em áreas muito contaminadas (HOPKIN et al., 1985), outras apresentam diferentes mecanismos de destoxificação do organismo (KÖHLER et al., 1995).

Neste contexto, de acordo com Hopkin e Read (1992), uma estratégia de destoxificação muito observada em diplópodos é a formação de esferocristais em células do sistema digestório. Isto pode evitar que substâncias tóxicas, como metais, sejam distribuídas por todo o corpo do animal, além de ser um mecanismo importante na manutenção da homeostase.

Segundo Triebkorn et al. (1991), os invertebrados podem apresentar diferentes estratégias para reagir aos toxicantes presentes no ambiente, sendo que o tipo de defesa e de resposta celular irá depender do tecido, da espécie e do tóxico. Entretanto, apesar da reconhecida importância ecológica, essas estratégias ainda são pouco estudadas em diplópodos (FONTANETTI et al., 2006).

### **3.2. A espécie *Rhinocricus padbergi***

A espécie *R. padbergi* possui ampla distribuição no estado de São Paulo, sendo registrada também para o Rio de Janeiro; pertence à ordem Spirobolida e é considerada hoje uma espécie sinantrópica.

Fantazzini et al. (1998) realizaram um estudo inicial com a espécie *R. padbergi* quanto à anatomia do tubo digestório, histologia e histoquímica do intestino anterior e glândulas salivares. O intestino anterior se estende da boca à válvula esofágica, a qual pode ser definida como um estreitamento do tubo digestório que marca o fim do intestino anterior e o começo do intestino médio. Em associação com essa região encontra-se um par de glândulas salivares. O intestino médio compreende desde a válvula esofágica até o início do intestino posterior, marcado pelo piloro. O intestino posterior é caracterizado pela inserção dos túbulos de Malpighi e é a porção mais extensa do canal alimentar em *R. padbergi*.

Fantazzini et al. (2002), em um estudo posterior, analisaram a histologia e histoquímica do intestino médio de *R. padbergi*, local onde ocorre a maior parte da digestão. Do ponto de vista histológico, o intestino médio apresenta muitas vilosidades e é formado por um epitélio pseudoestratificado com bordo em escova, seguido de camada muscular, camada de corpo gorduroso, revestido por uma membrana externa. Logo abaixo da camada muscular



estão presentes células hepáticas, as quais aparecem esparsas, sem formar uma camada contínua. As células da camada de corpo gorduroso possuem morfologia irregular e citoplasma heterogêneo, em que se observam grânulos intracelulares de conteúdo variado; por entre estas células podem ser observados hemócitos, geralmente isolados.

Estudos recentes demonstram que a utilização desta espécie em análises ecotoxicológicas de solo é viável. No Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Rio Claro-SP, pesquisadores observaram alterações morfológicas no intestino médio de indivíduos da espécie *R. padbergi* submetidos por diferentes períodos a substratos contendo lodo de esgoto e *landfarming* de refinaria de petróleo (BOZZATTO; FONTANETTI, 2007; 2008; NOGAROL et al., 2008; SOUSA; FONTANETTI, 2008; GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; PEREZ; FONTANETTI, 2010a; SOUZA; FONTANETTI, 2011). As seguintes respostas tissulares foram observadas: aumento na quantidade de grânulos citoplasmáticos nas células da camada de corpo gorduroso; aumento na liberação de vesículas de secreção do epitélio em direção ao lúmen intestinal; intensa vacuolização citoplasmática das células epiteliais; aumento do processo de renovação epitelial; aumento no número de hemócitos e aglomeração dos mesmos entre as células da camada de corpo gorduroso.

O aumento na quantidade de grânulos citoplasmáticos nas células da camada de corpo gorduroso indica um provável mecanismo de destoxificação, uma vez que uma estratégia de defesa descrita para invertebrados é a precipitação de metais como grânulos intracelulares de diferentes tipos (HOPKIN, 1990). É possível que as vesículas de secreção observadas contribuam para a excreção de metais presentes no lodo e que a vacuolização do citoplasma das células do epitélio seja o início de um processo de morte celular (PEREZ; FONTANETTI, 2010a).

Com relação aos hemócitos, o aumento na quantidade dos mesmos e a organização em aglomerados indica a ocorrência de lesão tecidual com provável processo inflamatório (PEREZ; FONTANETTI, 2010a). De acordo com van de Braak (2002), os hemócitos podem migrar para o local de injúria no tecido por um processo de quimiotaxia que resulta em inflamação.

Entretanto, a função dessas células no processo de defesa da espécie *R. padbergi* deverá ser melhor investigada; para isso, a descrição dos tipos morfológicos de hemócitos torna-se essencial.

### 3.3. O Lodo de esgoto

O acelerado processo de urbanização da população brasileira nas últimas décadas resultou na formação de cidades sem infra-estrutura para destinar adequadamente os resíduos gerados pelos centros urbanos. Os resíduos domiciliares e industriais, ambos poluidores, são produzidos diariamente e, muitas vezes, dispostos no ambiente sem qualquer critério (CAMARGO et al., 2008).

Porém, em virtude da crescente pressão da sociedade pela despoluição de rios e das preocupantes previsões de escassez de água, certamente, num futuro não muito distante, o tratamento de esgotos tornar-se-á uma prática rotineira no Brasil; de fato, o número de ETEs tem crescido no país, e as já existentes têm procurado expandir sua capacidade. Neste sentido, a grande preocupação da comunidade científica tem sido a destinação do resíduo gerado após o tratamento do esgoto, isto é, o lodo de esgoto (BERTONCINI; MATTIAZZO, 1999; TSUTIYA, 2001; CAMARGO et al., 2008; MIELLI et al., 2009).

Atualmente, as ETEs de várias cidades brasileiras vêm enfrentando o problema da destinação desse lodo. De acordo com Bettiol e Camargo (2006), as alternativas mais usuais para o destino do lodo de esgoto seriam: disposição em aterro sanitário, reutilização na indústria (produção de agregado leve, fabricação de tijolos e cerâmica e produção de cimento), incineração, conversão em óleo combustível, disposição oceânica, recuperação de solos degradados e uso agrícola.

No Brasil, existe uma preferência pela utilização do lodo na agricultura (embora a prática seja ainda incipiente), uma vez que há considerável disponibilidade de terras e os gastos seriam relativamente baixos. Contudo, apesar de ser um resíduo rico em matéria orgânica e nutrientes, o lodo pode conter também contaminantes como metais pesados, compostos orgânicos tóxicos e persistentes e agentes causadores de doenças (BETTIOL; CAMARGO, 2006; CAI et al., 2007). Geralmente, as concentrações de metais encontradas neste resíduo são bem maiores que as existentes naturalmente no solo; a longo prazo, sucessivas aplicações de lodo podem acarretar em um aumento significativo nas concentrações de metais no solo, ameaçando a cadeia trófica (NASCIMENTO et al., 2004).

Segundo Tsutiya (1999), os metais pesados contidos no lodo são originários da atividade industrial, sendo os principais metais o Cu, Ni, Cd, Zn, Pb e Cr. A exata composição irá refletir diversas particularidades da população local, como hábitos alimentares, condições de saneamento, grau de industrialização, método de tratamento do esgoto e sazonalidade. A adoção de produtos de limpeza, inseticidas e medicamentos cada vez mais sofisticados, por

exemplo, causa uma variação muito grande nesta composição.

De acordo com a procedência dos resíduos, o lodo pode ser classificado em doméstico ou industrial. Bettiol e Camargo (2006) afirmam que mesmo aqueles lodos de origem exclusivamente doméstica geralmente contêm concentrações de metais maiores que aquelas encontradas no solo, o que pode levar aos problemas de contaminação da cadeia alimentar e lixiviação.

Algumas ETEs brasileiras realizam o tratamento do lodo de esgoto doméstico a fim de torná-lo útil à agricultura. De acordo com Melo et al. (2000), após o lodo passar por processos de higienização, estabilização e secagem, o termo “lodo de esgoto” deve ser substituído por “biossólido”. De fato, a *Water Environment Federation (WEF)* recomenda que se reserve a palavra “lodo” para o lodo de esgoto bruto (não submetido a nenhum processo de estabilização biológica) e “biossólido” para o lodo tratado (MALTA, 2001; QUINTANA, 2006).

Há uma previsão de que a aplicação do biossólido em solos agrícolas no Brasil cresça substancialmente nos próximos anos, uma vez que tende a aumentar o volume de esgoto tratado no país (TSUTIYA, 2001; MIELLI et al., 2009). Segundo Boeira et al. (2002), o biossólido pode atuar como condicionador de solo, por sua elevada carga de matéria orgânica, além de promover a reciclagem de nutrientes. Ele também tem um grande potencial como fertilizante orgânico, contendo alguns elementos essenciais às plantas, como nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre e micronutrientes (MELO et al., 1994; KITAMURA et al., 2008).

Do ponto de vista econômico, a substituição de fertilizantes químicos pelo biossólido geraria rendimentos equivalentes ou até maiores, reduzindo os custos, uma vez que haveria o reaproveitamento integral dos nutrientes (VIEIRA; SILVA, 2004). Porém, isso deve ser tratado com cautela, pois com relação ao teor de nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo e potássio, o lodo de esgoto é menos rico quando comparado ao fertilizante comercial (KITAMURA, 2006).

O resíduo também pode atuar de maneira positiva nas características físicas do solo, através da formação de agregados de partículas. Assim, ocorre uma melhora na infiltração, retenção da água e aeração, reduzindo a erosão e melhorando a qualidade dos recursos hídricos (FIEST et al., 1998).

Já entre os problemas resultantes da sua utilização para a adubação, estariam a contaminação do solo com metais (cádmio, cobre, zinco, níquel, cromo e chumbo), a presença de organismos patogênicos (como bactérias, protozoários e helmintos), a acidificação e

salinização do solo (BOEIRA et al., 2002; BETTIOL; CAMARGO, 2006; CAMARGO et al., 2008).

A presença de metais é uma das principais limitações ao uso do biossólido na agricultura. Geralmente, as concentrações de metais encontradas no resíduo são bem maiores que as existentes naturalmente no solo (NASCIMENTO et al., 2004). A longo prazo, pode haver um aumento significativo nas concentrações de metais no solo, ameaçando a cadeia trófica.

Embora o solo possua grande capacidade de retenção de metais, caso essa capacidade seja ultrapassada, estes metais podem entrar na cadeia alimentar, promovendo danos aos organismos, ou então podem ser lixiviados, colocando em risco a qualidade da água subterrânea (ELLIOT et al., 1986).

De acordo com Silva et al. (2006), o acúmulo de metais no solo devido ao uso sucessivo de lodo de esgoto torna-se preocupante ao colocar em risco à segurança ambiental, a qual é necessária para que o uso deste resíduo possa ser viabilizado.

Em um estudo realizado por Camilotti et al. (2007), no qual se analisou o acúmulo de metais em cana-de-açúcar após aplicação de lodo de esgoto, verificou-se que, após três aplicações anuais sucessivas, houve baixos teores de cádmio, cromo, níquel e chumbo no solo e nas diferentes partes das plantas, indicando que, neste caso, o lodo de esgoto não apresentou potencial de contaminação.

Por outro lado, Silva et al. (2006) verificaram a dinâmica de metais em latossolo adubado com lodo de esgoto durante cultivos consecutivos de milho. Os resultados demonstraram um incremento nos teores totais de cobre, níquel e zinco no solo; também foi verificado um aumento na concentração de manganês nos grãos de milho, mas os valores não ultrapassaram o limite permitido.

Em um trabalho semelhante, Dynia et al. (2006) observaram que a lixiviação de nitrato em latossolo cultivado com milho e sob aplicação sequencial de lodo de esgoto aumentava com as doses e com o número de aplicações.

Galdos et al. (2004) também analisaram a produção de milho em solo tratado com lodo de esgoto e verificaram que a aplicação do mesmo elevou os níveis de cobre, níquel e zinco no solo, aumentando também a concentração de zinco na planta.

Em um estudo recente, Mielli et al. (2009) avaliou a genotoxicidade de amostras de lodos tratados, provenientes de quatro diferentes ETES do estado de São Paulo, através da utilização do teste de micronúcleo em células germinativas de *Tradescantia*. Após três meses de exposição aos lodos em diferentes concentrações, foi verificado que três amostras testadas

tinham efeito genotóxico, embora não tenha sido clara uma resposta dose-dependente.

Sabe-se também que invertebrados encontrados em ambientes poluídos podem ser mais suscetíveis à doenças. Young e Pearce (1975) observaram que populações de caranguejos e lagostas de áreas contaminadas com lodo de esgoto apresentavam maior incidência de doenças na carapaça.

A incorporação do lodo de esgoto ao solo deve ser cuidadosamente planejada e monitorada, para que o resíduo não se transforme em um novo problema ecológico (CAMARGO et al., 2008). O desconhecimento dos impactos do lodo sobre a fauna edáfica continua sendo um importante fator de risco na sua utilização em atividades agrícolas e na recuperação de solos degradados.

### **3.4. Defesa celular: hemócitos**

Os hemócitos são células constituintes do sistema imune, presentes na hemolinfa dos artrópodos em geral, que possuem a habilidade de discriminar agentes estranhos ao organismo.

Estas células atuam no reconhecimento do material, na fagocitose, nodulação e encapsulação, reações citotóxicas por meio da produção de reativos intermediários de oxigênio, coagulação da hemolinfa após a ruptura da cutícula e epiderme e reparo de injúrias (LAVINE; STRAND, 2002; TZOU et al., 2002; FALLEIROS et al., 2003; CORREIA, 2008), sendo também observadas aglomerações de hemócitos ao redor do agente estressor, numa espécie de “armadilha” (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). Elas também podem estar envolvidas no armazenamento e distribuição de material nutritivo (RUSSO et al., 2001; SILVA et al., 2002), na formação de tecido (van de BRAAK, 2002) e na excreção, fagocitando certos materiais presentes no sangue, degradando-os e transportando-os através do corpo (HOPKIN; READ, 1992). Em alguns artrópodos, os hemócitos são responsáveis pela produção e estocagem de pigmentos respiratórios; contudo, depois da evolução de artrópodos terrestres com traquéia, esses pigmentos e os hemócitos produtores dos mesmos foram reduzidos (XYLANDER, 2009).

Os hemócitos podem reconhecer moléculas estranhas diretamente, interagindo com moléculas que invadem o organismo através de receptores presentes em sua superfície, ou então indiretamente, reconhecendo receptores humorais que entraram em contato com o invasor; após o reconhecimento, sinais inter e intracelulares coordenam a resposta defensiva (LAVINE; STRAND, 2002).

A fagocitose consiste no engolfamento de uma partícula alvo (material biótico ou abiótico) por uma célula individual; os tipos de hemócitos responsáveis pela fagocitose variam entre as espécies de invertebrados. Já a nodulação e a encapsulação são realizadas pelos hemócitos quando o material estranho é muito grande para ser fagocitado (FARALDO; LELLO, 2003; NEGREIRO et al., 2004). Ambas envolvem a aglomeração de hemócitos ao redor de um determinado alvo, sendo processos muito semelhantes quando observados ultra-estruturalmente. A principal diferença consiste no tipo de alvo: enquanto na nodulação vários hemócitos se ligam a uma agregação de pequenos corpos, como bactérias, na encapsulação os hemócitos se aderem a corpos maiores, como parasitóides e nemátodos (LAVINE; STRAND, 2002). Segundo Gregório (1997), a encapsulação ocorre tanto com partículas inertes quanto com materiais biológicos.

A degradação da partícula estranha pelo hemócito pode ocorrer de duas maneiras: intracelularmente, em que, uma vez fagocitada, a partícula é degradada por enzimas líticas presentes no citoplasma do hemócito, ou extracelularmente, onde ocorre a degranulação dos hemócitos, liberando seu conteúdo para o meio extracelular (COLES et al., 1995). Certos receptores associados à membrana dos hemócitos ou solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente a partícula estranha, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas (PATHAK, 1993).

Os hemócitos produzem e estocam substâncias que podem ser liberadas depois de uma infecção, como substâncias antibacterianas e elementos do sistema profenoloxidase (proPO), um sistema de complexo enzimático que destrói os organismos aprisionados por fagocitose (XYLANDER, 2009). A profenoloxidase é a forma inativa da enzima fenoloxidase, presente na hemolinfa da maioria dos insetos e considerada um importante mediador no sistema de defesa do grupo, atuando na melanização (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Em um estudo realizado por Silva (2002), o autor sugere que a fenoloxidase ativada adere à superfície de patógenos, aumentando a fixação dos hemócitos em seu entorno e contribuindo para sua rápida remoção da hemolinfa através da formação de nódulos. Assim, o sistema proPO é importante no reconhecimento do “não-próprio”, fornecendo sinais moleculares que ativam hemócitos durante reações de defesa, o que leva à comparação do sistema proPO de invertebrados ao sistema complemento de vertebrados (GREGÓRIO, 1997).

De acordo com Lavine e Strand (2002), nos últimos anos, grandes progressos têm sido feitos para identificar os peptídeos antimicrobianos que tomam parte na defesa humoral do organismo de invertebrados, mas pouco é conhecido sobre os mecanismos de defesa celulares. Os autores comentam que isso decorre, em parte, da dificuldade de coleta dos hemócitos

devido ao tamanho reduzido dos animais. Além disso, os hemócitos são células muito reativas e sofrem consideráveis alterações quando removidos da hemocele (BAUCHAU, 1981). Neste sentido, no decorrer dos últimos anos, foram desenvolvidos diferentes meios de manter os hemócitos próximos ao seu estado natural, principalmente através da utilização de anticoagulantes (BACHÈRE, 2000).

A microscopia de luz e a microscopia eletrônica têm sido amplamente empregadas para caracterizar e classificar hemócitos em diferentes grupos de artrópodos. Contudo, a terminologia dos hemócitos não é uniforme; a diversidade de formas que estas células aparecem nas diferentes espécies estudadas, as variadas funções que assumem ao longo do desenvolvimento, os variados métodos de preservação e observação e as divergências quanto aos critérios utilizados para distinguir os tipos morfológicos tornam qualquer tentativa de comparação muito difícil (GUPTA, 1979; van de BRAAK, 2002; NEGREIRO et al., 2004). Desta forma, a classificação de hemócitos continua sendo bastante controversa atualmente, sendo que, muitas vezes, pesquisadores acabam adotando seus próprios termos para identificar tipos celulares já descritos por outros autores.

Muitos estudos têm se voltado para a morfologia e fisiologia de hemócitos de insetos, enquanto informações similares sobre os hemócitos de outros grupos de artrópodos são raras e, geralmente, baseadas em descrições feitas para a Classe Insecta, em que se destacam os trabalhos de revisão realizados por Jones (1962) e Gupta (1985).

Jones (1962), após uma extensa revisão da literatura, agrupou os hemócitos de insetos em nove tipos, de acordo com suas características morfológicas: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, cistócitos, oenocitóides, adipohemócitos, podócitos e células vermiformes.

Posteriormente, Gupta (1985), buscou homogeneizar a nomenclatura para hemócitos de insetos, a qual era bastante heterogênea até a época, caracterizando sete tipos principais de hemócitos, também de acordo com a morfologia: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos. Esta classificação tem sido adotada pela maioria dos autores na identificação dos hemócitos de diferentes espécies.

Os pró-hemócitos exibem alto índice mitótico e são considerados células-tronco que irão se diferenciar em linhagens celulares específicas (MANDATO, 1998; FALLEIROS et al., 2003). São células pequenas, arredondadas ou ovóides, com um grande núcleo localizado centralmente e citoplasma restrito a uma estreita faixa ao redor do núcleo; os plasmatócitos são polimórficos, variáveis em tamanho, com projeções citoplasmáticas e podem ser binucleadas; os granulócitos possuem granulações que frequentemente mascaram a presença

do núcleo; os esferulócitos geralmente são maiores que os plasmatócitos e granulócitos, possuindo o citoplasma cheio de esférulas limitadas por membrana de tamanhos variáveis, podendo encobrir o núcleo; os adipohemócitos são arredondados, variáveis em tamanho, com gotas lipídicas no citoplasma; porém, sua identificação é controversa, uma vez que existe uma hipótese de que estas células seriam variantes de plasmatócitos ou granulócitos com acúmulo de lipídio (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995; FALLEIROS, 1995; FARALDO, 2000; NEGREIRO et al., 2004); os oenocitóides são células grandes, arredondadas, com núcleo pequeno em relação ao volume citoplasmático; e os coagulócitos possuem o citoplasma com vários vacúolos de tamanhos diferentes e se desintegram facilmente *in vitro* (CARNEIRO; DAEMON, 1997; 2001; CORREIA et al., 2005; CORREIA, 2008).

Negreiro et al. (2004) comentam que a função dos granulócitos e plasmatócitos está relacionada, principalmente, à fagocitose e formação da cápsula e nódulo, enquanto os oenocitóides são as células produtoras da enzima fenoloxidase. Os esferulócitos estariam relacionados à renovação tecidual, transporte de hormônios, produção de certas proteínas da hemolinfa e nutrição. Os coagulócitos seriam responsáveis pela liberação de substâncias desencadeadoras do processo de coagulação. Já os pró-hemócitos, por serem considerados células-tronco, não participariam diretamente dos processos de defesa (ANDRADE et al., 2004).

Segundo Johansson et al. (2000), experimentos com populações isoladas de hemócitos têm demonstrado que diferentes tipos celulares são responsáveis por diferentes funções na imunidade, e que a cooperação e comunicação entre hemócitos são necessárias em várias reações de defesa. Por exemplo, durante uma infecção por microrganismos em crustáceos, após o reconhecimento do invasor, hemócitos semigranulares e granulares podem sofrer degranulação, liberando o conteúdo dos grânulos; as substâncias liberadas poderão então estimular a fagocitose por células não-granulares.

Em muitos insetos, o processo de encapsulação depende também de uma cooperação entre os hemócitos, porém ainda existem controvérsias se essa resposta é mediada por uma população morfológicamente uniforme de hemócitos ou por uma interação entre diferentes tipos morfológicos das células da hemolinfa (PECH; STRAND, 1996).

De acordo com Ribeiro e Brehélin (2006), o mesmo tipo celular pode exibir diferentes funções e a mesma função pode ser desempenhada por diferentes tipos celulares. Os autores advogam que o estudo da função pode ser usado na caracterização de um tipo celular desde que seja correlacionado com a ultra-estrutura, morfologia e conteúdo bioquímico da célula.

Pech e Strand (1996) também alertam que funções imunes exercidas por um tipo



morfológico de hemócito em uma determinada espécie podem ser desempenhadas por um tipo celular diferente em uma outra espécie.

Estudos sobre hemócitos de diplópodos são escassos; um dos primeiros trabalhos realizado foi com o milípede *Thyropygus poseidon* (RAVINDRANATH, 1973), em que o autor comparou os tipos de hemócitos encontrados nesta espécie com a classificação realizada por Jones (1962) para os hemócitos de insetos. Os resultados mostraram a classificação feita para insetos também pode ser aplicada para os hemócitos de diplópodos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1. Caracterização morfológica dos hemócitos circulantes na hemolinfa**

Para a coleta da hemolinfa, foram utilizados 15 indivíduos de *R. padbergi*, coletados no campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Rio Claro, SP. Uma seringa contendo solução anticoagulante (Solução de Alsever) foi inserida na região imediatamente abaixo da cabeça do animal.

#### **4.1.1. Esfregaço**

Após a coleta, cada gota de hemolinfa foi transferida para uma lâmina limpa, sendo então realizado o esfregaço e a secagem ao ar por 20 minutos, para melhor adesão dos hemócitos à lâmina. A fixação do material foi feita em metanol e a coloração com solução Giemsa por 7 minutos.

#### **4.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para a análise ultra-estrutural, a hemolinfa foi fixada em solução Karnovsky. Foram feitas duas lavagens do material em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH = 7.2), 15 minutos cada, e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, seguida de dois banhos (15 minutos cada) no mesmo tampão. A cada etapa do protocolo, o material foi centrifugado a 3000 rpm para a decantação dos hemócitos.

Dando seqüência, foi realizada a desidratação alcoólica (álcool a 70, 90, 95, 100%), 10 minutos cada banho, seguida de embebição em resina Spurr diluída em álcool 1:1. O material foi então incluído em resina Spurr pura e polimerizado em estufa a 70°C por 24 horas. Os cortes foram feitos em ultramicrotomo, sendo colocados em telas para contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo e observação em microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM100.

### **4.2. Caracterização dos hemócitos presentes por entre as células da camada de corpo gorduroso no intestino médio dos animais expostos a substrato contendo lodo de esgoto**

Foram processados materiais já coletados pela nossa equipe do Departamento de

Biologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Rio Claro, SP, obtidos por exposição de espécimens em amostras de lodo de três coletas realizadas pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) nas ETEs SG, AT-1 e AT-2, todas localizadas no estado de São Paulo.

A ETE SG localiza-se na região da vertente paulista do Rio Grande, com uma população de 685 mil pessoas e uma economia baseada, principalmente, em atividades agropecuárias; o lodo gerado é caracteristicamente doméstico. As ETEs AT-1 e AT-2 pertencem à Bacia do Alto Tietê, com uma população aproximada de 19 milhões de pessoas, baseando sua economia em atividades industriais; dessa forma, o lodo gerado em ambas as ETEs apresenta componentes domésticos e industriais (DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo, 2006).

Os animais foram expostos ao lodo puro e ao lodo misturado com terra (proveniente do local de coleta dos animais), sendo colocadas 9 partes de terra para 1 parte de lodo. Os tempos de exposição foram 3, 7 e 21 dias, após os quais os animais foram anestesiados e dissecados em solução fisiológica para a retirada do intestino médio; este foi seccionado em três partes, sendo uma fixada em paraformaldeído 4%, outra em Carnoy e a última em glutaraldeído 2.5%, para que diferentes técnicas pudessem ser aplicadas.

#### **4.2.1. Histologia**

O material foi desidratado em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95%, durante 10 a 15 minutos cada banho, sendo então transferido para solução de resina de embebição (JB-4 – Polaron Instruments/BIO RAD), durante 24 horas em geladeira. Foi então colocado em moldes previamente preenchidos com resina contendo catalisador, sendo que, depois de polymerizados, os blocos foram colocados em suportes de madeira para a microtomia. Os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo Leica, hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

#### **4.2.2. Histoquímica**

Os testes histoquímicos foram utilizados para detectar os seguintes elementos:

##### **a. Proteínas Totais**

- Técnica do azul de bromofenol (segundo PEARSE, 1985).

Fixação do material em paraformaldeído 4%; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por 2 horas; lavagem das lâminas contendo as secções em

água e banho em ácido acético por 5 minutos.

#### **b. Polissacarídeos Neutros**

- Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação em Carnoy; oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%, exposição do reativo de Schiff por 1 hora, lavagem em água sulfurosa por 9 minutos e em água corrente por 30 minutos.

#### **4.2.3. MET**

O intestino médio dos animais foi fixado em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH = 7.2). Dando seqüência ao protocolo, foram feitas duas lavagens do material em tampão cacodilato de sódio, 15 minutos cada, e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, seguido de dois banhos (15 minutos cada) no mesmo tampão.

Em seguida, o material foi desidratado (acetona a 50%, 75%, 90%, 95%, acetona pura), 10 minutos cada banho, e embebido em resina Epon-araldite diluída em acetona 1:1 e com catalisador. O material foi então incluído em resina Epon pura e levado para a estufa, permanecendo na mesma por 48 horas. Os cortes foram feitos em ultramicrotomo, sendo colocados em telas para contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo e observação em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

## 5. RESULTADOS

---

Durante a realização desta dissertação foram produzidos três artigos científicos, dos quais um foi publicado e os outros serão enviados para revistas especializadas.

### ARTIGO 1

Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review.

Danielli Giuliano Perez; Carmem Silvia Fontanetti

Environmental Monitoring and Assessment, 2010 (*on line*). DOI: 10.1007/s10661-010-1645-7

Padrões da Revista

### ARTIGO 2

Caracterização dos tipos celulares encontrados na hemolinfa do diplópodo *Rhinocricus padbergi*

Danielli Giuliano Perez; Antonio Teruyoshi Yabuki; Carmem Silvia Fontanetti

### ARTIGO 3

Caracterização dos hemócitos presentes no intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi* exposto a substrato contendo lodo de esgoto

Danielli Giuliano Perez; Mônica Iamonte; Carmem Silvia Fontanetti

**Artigo 1****HEMOCITICAL RESPONSES TO ENVIRONMENTAL STRESS IN  
INVERTEBRATES: A REVIEW****RESPOSTAS HEMOCÍTICAS AO ESTRESSE AMBIENTAL EM INVERTEBRADOS:  
UMA REVISÃO**

Danielli Giuliano Perez; Carmem Silvia Fontanetti

Environmental Monitoring and Assessment, 2010 (*on line*)

DOI: 10.1007/s10661-010-1645-7

**Resumo:** Embora os invertebrados sejam conhecidos pela grande facilidade de acúmulo de poluentes presentes em seu ambiente, e muitos serem utilizados como espécies sentinelas em estudos de biomonitoramento, pouco ainda é conhecido sobre o impacto de toxicantes sobre o sistema imune desses animais. Nesse sentido, os hemócitos desempenham um papel fundamental: estas células circulam livremente através da hemolinfa dos invertebrados e atuam no reconhecimento de materiais estranhos ao organismo, mediando e efetuando as reações de defesa celular, tais como fagocitose, nodulação e encapsulação. Diferentes tipos morfológicos podem ser reconhecidos, mas ainda há controvérsia entre os pesquisadores sobre a exata classificação dos hemócitos, devido à diversidade de técnicas para preservação e observação dessas células. No presente trabalho, uma revisão sobre as principais respostas de hemócitos ao estresse do ambiente em diferentes organismos invertebrados é apresentada, enfatizando a contaminação por metais pesados. São discutidos parâmetros como: alteração no número de células engajadas na reação de defesa, atividade fagocítica, respostas lisossomais e produção de espécies reativas de oxigênio.

**Palavras-chave:** hemócitos, imunidade de invertebrados, defesa celular, estresse ambiental, metais pesados.

# Hemocritical responses to environmental stress in invertebrates: a review

Danielli Giuliano Perez ·  
Carmem Silvia Fontanetti

Received: 23 March 2010 / Accepted: 29 July 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Although invertebrates are recognized by the great facility to accumulate pollutants present in their environment and many of them are used as sentinel species in biomonitoring studies, little is known about the impact of toxicants on the immune system of these animals. In this regard, hemocytes play a fundamental role: these cells circulate freely through the hemolymph of invertebrates and act on the recognition of foreign material to the organism, mediating and effecting the cellular defense, such as phagocytosis, nodulation, and encapsulation. Different morphological types can be recognized but still there is controversy among the researchers about the exact classification of the hemocytes due to the diversity of techniques for the preservation and observation of these cells. In the present study, a review on the main hemocyte responses to environmental stress in different invertebrate organisms is presented, emphasizing the contamination by heavy metals. It is discussed parameters such as: alteration in the number of cells involved in the defense reaction,

phagocytic activity, lysosomal responses, and production of reactive oxygen species.

**Keywords** Hemocytes · Immunity of invertebrates · Cellular defense · Environmental stress · Heavy metals

## Immune system

It is of fundamental importance for any organism the capacity to recognize the presence of foreign substances through its immunological system. Two defense systems against infectious agents have been selected during evolution: innate immune system or natural immunity and adaptive immune system or acquired immunity. The innate system can be found in all multicellular animals, while the acquired system is phylogenetically young, being only found in vertebrates (Mandato 1998; van de Braak 2002).

Invertebrates have a complex and efficient innate immune system, which can be subdivided in humoral and cellular defense responses. The humoral response is closely related to the synthesis of antimicrobial peptides (Lowenberger 2001), production of reactive oxygen and nitrogen intermediates (Bogdan et al. 2000), besides the activation of enzymatic cascade that regulates coagulation and melanization of hemolymph, release of anti-stress proteins and of certain mole-

---

D. G. Perez · C. S. Fontanetti (✉)  
Department of Biology—Institute of Biosciences,  
UNESP, Av. 24-A, 1515-13506-900,  
Rio Claro, São Paulo, Brazil  
e-mail: fontanet@rc.unesp.br

D. G. Perez  
e-mail: dani\_sp\_03@hotmail.com

cles whose probable function is the opsonization and the iron sequestration (Muta and Iwanaga 1996; Gillespie et al. 1997; Jiravanichpaisal et al. 2006). Now, the cellular defense involves responses mediated by different morphological types of hemocytes, cells that circulate freely in the hemolymph (Correia 2008).

There are indications that the humoral and cellular responses are well coordinated between themselves. Probably, there is an overlap between them, since several humoral factors affect the hemocytes function and these, in turn, are an important source of many humoral molecules (Erold-Erickson et al. 2000; Lavine and Strand 2002; Jiravanichpaisal et al. 2006).

Hemocytes have the ability to discriminate foreign agents to the organism, mediating the recognition of the material; phagocytosis, nodulation, and encapsulation; cytotoxic reactions; coagulation of the hemolymph; and injury repair (Lavine and Strand 2002; Tzou et al. 2002; Falleiros et al. 2003; Correia 2008), it is also observed agglomerations of hemocytes around the stressor agent in a kind of “trap” (Jiravanichpaisal et al. 2006). They are also involved in the storage and distribution of the nutritive material (Russo et al. 2001; Silva et al. 2002) and in the tissue formation (van de Braak 2002).

The terminology of hemocytes is not uniform; the diversity of shapes and functions that these cells can perform in the different species studied, the different methods of preservation and observation and the divergences regarding the criteria used to distinguish the morphologic types make any attempt of comparison very difficult (Gupta 1979; van de Braak 2002). Therefore, the hemocytes classification remains quite controversial nowadays, since, in many times, the researchers end up adopting their own terms to identify cellular types already described by other authors.

In a review made by Johansson et al. (2000), it is described three morphological types of circulating hemocytes in decapods: hyaline cells, semi-granular cells, and granular cells. In the freshwater shrimp the hyaline cells are small, spherical, and may contain few granules and are capable of phagocytosis. The semi-granular cells have variable number of small eosinophil granules and are responsible for the encapsulation, pre-

senting limited phagocytic activity. The granular cells do not act in the phagocytosis and are full of eosinophil granules, which contain activators of prophenoloxidase (Jiravanichpaisal et al. 2006).

Both semi-granular and granular cells may undergo degranulation when in contact with molecules that are not recognized by the immune system, releasing their content to the extracellular media. Both can be also cytotoxic and promote the lysis of foreign cells (Jiravanichpaisal et al. 2006).

Several authors rely only on the absence or presence of cytoplasmic granules and on their relative size to characterize and classify the morphological types of hemocytes. This kind of classification is very common in species of crustacean, such as in the study conducted by Barraco and Amirante (1992), in which the hemocytes of the species *Squilla mantis* were identified as hyaline cells (few granules), small granule hemocytes and large granule hemocytes.

Nowadays, the most widely accepted classification is based on a review study conducted by Gupta (1985), in which the author groups the hemocytes of insects into seven main types: pro-hemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, adipohemocytes, oenocytoids, and coagulocytes.

Pro-hemocytes exhibit high mitotic index and are considered stem cells that will differentiate into specific cell lines (Mandato 1998; Falleiros et al. 2003). They are small, round or ovoid cells with a large nucleus located centrally and cytoplasm restricted to a narrow band around the nucleus; plasmatocytes are polymorphic, variable in size, with cytoplasmic projections and may be binucleated; granulocytes have granulations that frequently mask the presence of the nucleus; spherulocytes generally are larger than the plasmatocytes and granulocytes, having the cytoplasm full of spherules limited by membranes of varied sizes that can cover the nucleus; adipohemocytes are round, variable in size, with lipid drops in the cytoplasm; however, its identification is controversial since there is a hypothesis that these cells would be variants of plasmatocytes or granulocytes with accumulation of lipid (Bombonato and Gregório 1995; Falleiros 1995; Faraldo 2000; Negreiro et al. 2004); oenocytoids are large cells,



**Table 1** Functions of the hemocytes, according Gupta (1985) classification

| Hemocyte types (according Gupta 1985) | Function in immunity                                                           | References                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pro-hemocytes                         | Stem cells                                                                     | Mandato (1998)<br>Lavine and Strand (2002)<br>Falleiros et al. (2003)<br>Negreiro et al. (2004)<br>Jiravanichpaisal et al. (2006)                             |
| Plasmatocytes                         | Phagocytosis<br>Nodulation<br>Encapsulation                                    | Russo et al. (2001)<br>Lavine and Strand (2002)<br>Negreiro et al. (2004)<br>Andrade et al. (2004)<br>Jiravanichpaisal et al. (2006)                          |
| Granulocytes                          | Recognition of foreign material<br>Phagocytosis<br>Nodulation<br>Encapsulation | Pech and Strand (1996)<br>Gillespie et al. (2000)<br>Silva et al. (2002)<br>Lavine and Strand (2002)<br>Negreiro et al. (2004)<br>Ribeiro and Brehélin (2006) |
| Spherulocytes                         | Tissue renewal<br>Transport of hormones<br>Production of proteins<br>Nutrition | Ratcliffe et al. (1985)<br>Negreiro et al. (2004)<br>Correia (2008)                                                                                           |
| Adipohemocytes<br>Oenocytoids         | Unknown<br>Production of the phenoloxidase enzyme                              | Mandato (1998)<br>Lavine and Strand (2002)<br>Jiravanichpaisal et al. (2006)                                                                                  |
| Coagulocytes                          | Coagulation process                                                            | Negreiro et al. (2004)<br>Xylander (2009)                                                                                                                     |

round with a small nucleus in relation to the cytoplasmatic volume; and the coagulocytes have the cytoplasm with various vacuoles of different sizes and that disintegrate easily in vitro (Carneiro and Daemon 1997, 2001; Correia et al. 2005; Correia 2008).

Negreiro et al. (2004) comment that the function of the granulocytes and plasmatocytes are related, mainly, to the phagocytosis and formation of capsule and nodule, while the oenocytoids are cells that produce the phenoloxidase enzyme. The spherulocytes would be related with tissue renewal, transport of hormones, production of certain proteins of the hemolymph, and nutrition. Coagulocytes would be responsible for the release of substances that trigger the coagulation process. Now, the pro-hemocytes, as they are considered stem cells, would not participate directly of the defense processes (Andrade et al. 2004).

However, according to Pech and Strand (1996), immune functions performed by a morphological type of hemocyte in a particular species may be

carried out by a different cellular type in another species.

The Table 1 shows the different functions of hemocytes in immunity response.

### Hemocytes “versus” stress

#### Total and relative number of cells

The success of a defense response depends on the quantity of hemocytes and on the cellular types involved in the process (Russo et al. 2001). In this sense, monitoring the number of hemocytes as a measure of stress and/or physiologic condition has been suggested for some invertebrates (Truscott and White 1990; Coles et al. 1995; Pipe et al. 1999; Lorenzon et al. 2001; Mayrand et al. 2005; Correia 2008).

Heavy metals are considered pollutants in potential since they are widely distributed in the environment, be it by natural or anthropogenic

sources and they have been pointed out as a threat to the health and survival of several marine, aquatic, and terrestrial animals (Lorenzon et al. 2001).

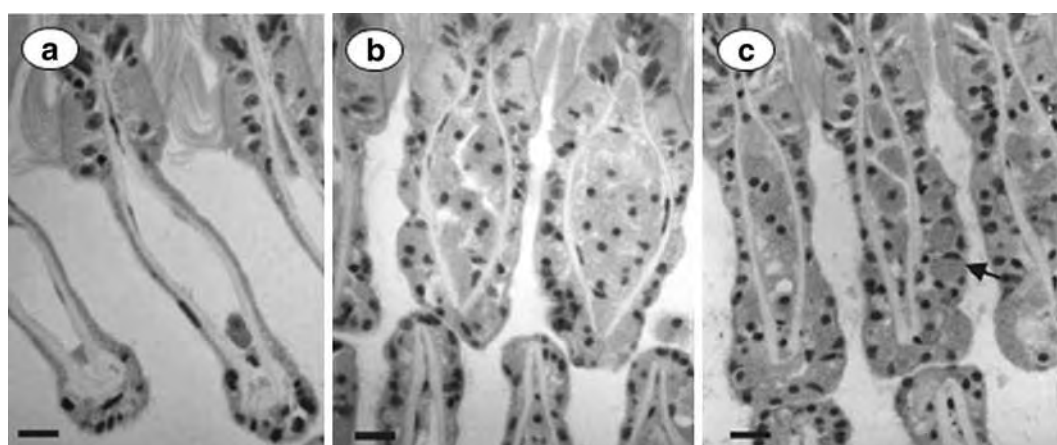
According to Robinson and Ryan (1988), hemocytes can transport metals intracellularly (within the cytoplasm or in lysosomal vesicles). Hemocytes of bivalves are known to accumulate high levels of heavy metals, mainly in lysosomes (Matozzo et al. 2001); the most common response observed in these animals exposed to different heavy metals is the increase in the number of hemocytes in circulation (Pipe and Coles 1995).

In a study conducted by Pipe et al. (1999), in which the authors investigated the effects of copper exposure on the immune system of the marine mussel *Mytilus edulis*, cell count by a hemocytometer showed an increase in the number of circulating hemocytes as well as an alteration in the proportion of different morphologic types; while the percentage of eosinophilic cells suffered a significant reduction, the quantity of basophilic cells increased in higher concentrations of the metal. Nevertheless, this increase in the quantity of circulating hemocytes was not significant in the highest concentrations of copper; the authors discuss that this may be due to the high toxicity of the metal, causing cell death, or due to migration of the hemocytes from circulation to tissues injured by the exposition.

In a similar study, using the same methodology, Coles et al. (1995) had already investigated the effects of cadmium exposure on the immune system of *M. edulis*. The results also showed an increase in the total number of circulating hemocytes; on the other hand, the exposition to the metal did not provoke significative changes in the proportion of the different morphological cell types.

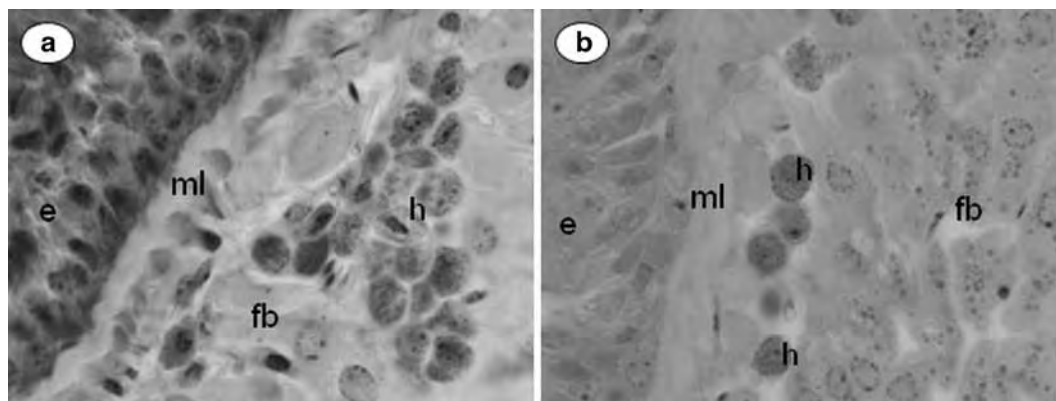
Mayrand et al. (2005) conducted a study in which it was analyzed the hemocyte responses of *M. edulis* when it was transferred from an industrialized place to a region without contamination by industry. It was verified by counting the number of cells by a hemocytometer that the mussels exposed for a long period to the conditions of industrialization presented a higher quantity of hemocytes when compared to native mussels of a clean area, and that after the transference from a contaminated place to another non-contaminated, the number of hemocytes was reduced.

David et al. (2008) analyzed morphological alterations in gills of *Mytella falcata* from three sites of a estuary with different contamination levels. Among the alterations it was verified an increase in the number of hemocytes in the hemolymph vessels as well as invasion of the hemocytes in the gill epithelium (Fig. 1). The authors discuss that such tissue responses indicate defense mechanisms and may be related to the



**Fig. 1** **a–c** Histological sections of *Mytella falcata* gill filaments. **a** Animals from less impacted site; **b**, **c** animals from more impacted site; **b** hemolymph vessel filled with

hemocytes; **c** invasion of hemocytes into the epithelium (arrow). Scale bars = 10  $\mu$ m (David et al. 2008)



**Fig. 2** **a, b** Histological sections of the midgut of *R. padbergi* stained with hematoxylin and eosin. Group exposed to sewage sludge. Note the agglomeration of hemocytes

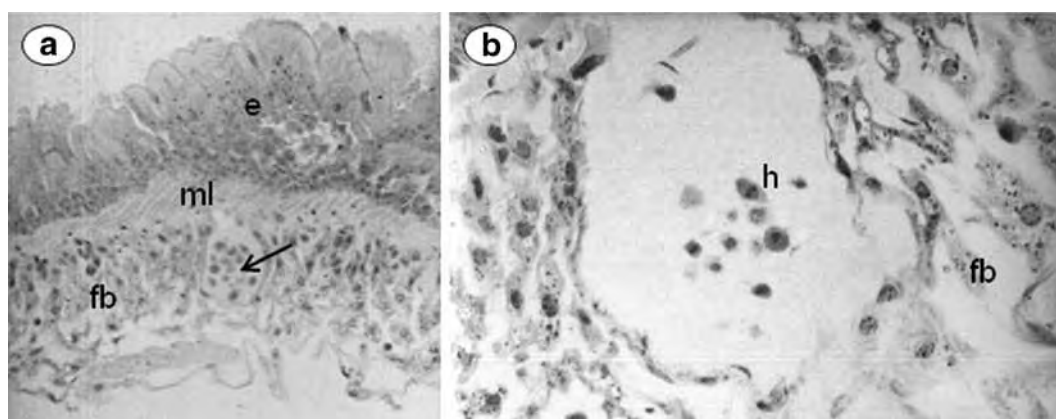
in (a). *e* epithelium, *fb* fat body, *h* hemocyte, *ml* muscular layer. Magnification,  $\times 1,200$

reabsorption process of old or injured epithelial cells.

Radford et al. (2000) studied the effects of metal pollution in the behavior of the hemocytes of the tunicate invertebrate *Styela plicata*. They observed that the animals exposed to the toxicants presented an increase in the circulating hemocytes. Furthermore, the immunohistochemical analyses of the pharynx showed differences in the distribution of the cells in the tissue of the exposed animals in relation to the non-exposed animals, which was not observed in the control group. The authors discuss that such cell accumulation may indicate an inflammatory process involved in the repair of the epithelial lesion.

Similar hemocytical responses were observed through histological analysis in the diplopod *Rhinocricus padbergi* exposed to substrate containing sewage sludge. Some studies have shown an increase in the number of hemocytes between the fat body cells of midgut of exposed animals as well as formation of several agglomerations of these cells (Figs. 2 and 3), indicating a tissue injury with inflammatory process (Perez and Fontanetti 2008; Godoy and Fontanetti 2009; Nogarol and Fontanetti 2010).

Auffret and Oubella (1997) exposed oyster of the species *Crassostrea gigas* to xenobiotics identified in a polluted estuary. They observed changes in the hemocytes aggregation behavior



**Fig. 3** **a, b** Histological sections of *R. padbergi* midgut exposed to sewage sludge. *e* epithelium, *fb* fat body, *h* hemocyte, *ml* muscular layer, arrow in (a) agglomeration of hemocytes. Magnification, **a**  $\times 100$ ; **b**  $\times 1,000$  (Godoy and Fontanetti 2009)

according to the chemical used and advocated that the aggregation activity of these cells may be altered by the stress induced by environmental contamination.

Increase or decrease in the total number of blood cells are considered a common responses to stressors present in the environment.

There are reports that the increase in the number of these cells in response to a determined type of stress can be reversible (Oubella et al. 1993). This suggests that such increase happens due to stimulation of the hemocytes migration from the tissues (Cajaraville et al. 1996), and not by cellular proliferation, which may or may not result in alterations in the proportion of the different morphological types, depending on the distribution of the types of hemocytes in the organism tissues (Coles et al. 1995; Pipe et al. 1999).

There are still divergences among the researchers in relation to the existence or not of the proliferation of circulating hemocytes. Probably, the variation in the number of hemocytes is regulated by release of cells from the hematopoietic tissue complemented by cellular migration between the several tissues of the organism. Hematopoiesis is the process by which the hemocytes mature and enter in the circulation; they are constantly produced to replace those that died or that were metabolically damaged. However, the rate that this process occurs can be altered by the influence of several environmental factors (Johansson et al. 2000; Jiravanichpaisal et al. 2006).

In a study carried out by Sorvari et al. (2007), in which it was analyzed the effect of heavy metals on the immune response of ant colonies of the species *Formica aquilonia*, it was verified that moderate levels of heavy metals led to an increase in the encapsulation performed by the hemocytes, while high doses suppressed the immune system.

Pipe et al. (1999) alert that although the increase in the number of hemocytes is a common response to environmental stress it cannot be seen as a rule. According to Pipe and Coles (1995), the decrease in the total number of hemocytes under stress conditions can be consequence of cellular lysis, reduced recruitment or movement of the cells from the circulation to the tissues.

According to Lorenzon et al. (2001), exposure to pollutants may cause an expressive diminishing in the amount of circulating hemocytes in the hemolymph. The authors exposed the shrimp *Palaemon elegans* to different concentrations of heavy metals diluted in saltwater and concluded that the number of circulating hemocytes counted in a hemocytometer significantly decreased in the animals exposed to the different heavy metals tested. They argue that the change in the quantity of hemocytes will also depend on the exposure time to the pollutant, the pollutant nature, its concentration, and of the species chosen for the study.

Victor (1993) investigated the behavior of the hemocytes in the crab *Paratelphusa hydrodromous* exposed to sub-lethal doses of cadmium. The total count of cells in the hemocytometer showed a drastic reduction in the number of circulating hemocytes, while the differential count demonstrated a variation in the percentage of morphological types after the exposition; the stress reduced the quantity of hyalinocytes and eosinophilic granulocytes and increased the number of pro-hemocytes and intermediary granulocytes, according to the classification adopted by the author. In the referred study, the gills of the exposed crabs were also analyzed histologically, being verified the hemocytes aggregation around the injured tissue and invasion of granulocytes in the gill epithelium.

Similarly, specimens of the crab *Cancer irroratus*, collected in a site of sewage discharge, also presented hemocytes aggregation in the gills, indicating a probable answer to the contamination by heavy metals (Greig et al. 1982).

On the other hand, a study carried out by Truscott and White (1990), in which the researchers examined the effects of heavy metals (copper, cadmium, and mercury) on the immune system of the crab *Carcinus maenas*, concluded that the hemocytes of the analyzed species are tolerant to the stress by heavy metals, not being observed significative changes in the number of these cells in the exposed animals.

According to Olabarrieta et al. (2001), hemocytes can accumulate toxicants present in the environment, which confer a certain resistance to stress by heavy metals. Ahearn et al. (2004)

verified that ions of zinc are sequestered and captured by circulating hemocytes as a detoxification process in the lobster *Homarus americanus*. In oysters, the hemocytes accumulate copper and zinc in vesicles limited by the membrane (Pirie et al. 1984). However, when exposed to very high concentrations of heavy metals, the hemocytes may suffer deleterious effects, such as the loss of the cytoskeleton integrity.

In general, all the organisms have mechanism of cellular defense that can be involved in the detoxification process of heavy metals, which leads to a certain tolerance to the stress caused by such elements (Hall 2002). Hemocytes of mollusks are known to synthesize metallothioneins after exposure to cadmium (Roesijadi et al. 1997). Metallothioneins are intracellular proteins of low molecular weight, responsible for maintaining the homeostasis of essential metals and are found in animals, higher plants, eukaryotic microorganisms, and in several prokaryotes (Klaassen et al. 1999; Vasak 2005). The fact that they exert oxidant activities suggests that one of their functions is to protect the cell against the action of free radicals (Andrews 2000). Metallothioneins are active in the defense against harmful effects caused by heavy metals, by binding to them by residues of cysteine (Park et al. 2001; Coutinho and Barbosa 2007). Metallothioneins have a key role in the detoxification of heavy metals when their intracellular concentration exceeds that necessary for the metabolic functions (Ahearn et al. 2004).

The increase or decrease in the total and/or differential number of circulating hemocytes in a certain organism may reflect several factors, such as physiological stress, exposure to pollutants, changes in the temperature and salinity, life stage, nutrition level as well as the occurrence of illnesses (Oliver and Fisher 1995; Lorenzon et al. 2001; van de Braak 2002).

Oliver and Fisher (1995) observed an increase in the number of hemocytes counted in a hemocytometer after they experimentally infected two species of bivalves. The authors also verified that the amount of hemocytes varied according to the temperature and salinity in *Crassostrea virginica*. According to van de Braak (2002), the increase in the temperature of the water may elevate the number of circulating hemocytes in the

hemolymph due to a higher rate and force of heart pumping, although this is not a rule, there are a conjunction of factors.

#### Phagocytic activity

Heavy metals, as the other environmental toxicants, are capable of altering the phagocytic activity of the hemocytes. Depending on the exposure time, nature, and concentration of the heavy metal, the phagocytosis carried out by the hemocytes can be stimulated, inhibited or not suffer any kind of modification (Coles et al. 1995).

In a study conducted by Olabarrieta et al. (2001), using a suspension of neutral red-stained zymosan, it was verified that hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed in vitro to cadmium presented a significant increase in the phagocytic ability, showing that the metal can enhance the capacity of cellular defense. Similarly, Coles et al. (1995) and Pipe et al. (1999) observed that hemocytes of bivalves exposed in vivo to certain concentrations of heavy metals may have their phagocytic activity stimulated.

However, Matozzo et al. (2001), studying the effects of copper and cadmium on the hemocytes of the mollusk *Tapes philippinarum*, verified a significative decrease in the phagocytic activity of the hemocytes of the animals exposed to copper, while no inhibition was observed in those cells exposed to cadmium. This shows that the hemocytic response under stress conditions by heavy metals will depend on the nature and concentration of the metal. The phagocytosis index was expressed as the percentage of cells containing ingested yeast particles (*Saccharomyces cerevisiae*).

Auffret et al. (2002) also observed a severe decrease in the phagocytosis of hemocytes of oyster of the species *Ostrea edulis* exposed to cadmium and copper in relation to a control group.

Reduction in the phagocytic activity may be due to changes in the cell cytoskeleton provoked by the heavy metal; the hemocyte under stress lose the ability to adhere to the substrate and interact with foreign particles (Matozzo et al. 2001).

Sauvé et al. (2002) analyzed the phagocytic activity of hemocytes in several species of bivalves exposed to different metals (silver, cadmium,



mercury, and zinc). The results showed a species-specific hemocytical response; the sensitivity to metals varied according to the species, although the organisms were similar and belonging to the same taxonomic group. In some species, low concentrations of mercury, zinc, and cadmium stimulated the phagocytosis; however, in high doses, all the tested metals induced an inhibition. They used flow cytometry to quantify the phagocytosis of fluorescent microspheres by hemocytes.

Indeed, some studies have demonstrated that the hemocytes activity may be stimulated in low concentrations of contaminants and inhibited in high concentrations (Fisher et al. 1990; Pipe et al. 1999).

#### Lysosomal responses and production of reactive oxygen species

Besides alterations in the quantity of cells mobilized for cellular defense and phagocytic activity, the environmental stress may affect other parameters related to the hemocytes behavior. Giamberini and Pihan (1997) assessed the lysosomal responses of the hemocytes of the mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to high concentrations of zinc and lead. The results showed an increase in the number and/or size of the lysosomes in the hemocytes of the exposed animals, although it has not been a response dependent on the dose or the exposure time.

Snyman et al. (2000) investigated the use of lysosomal responses of hemocytes of the common garden snail *Helix aspersa* as bioindicator of stress resulted from the exposition to a fungicide copper based. The authors analyzed the retention time of neutral red, since the efflux of the lysosomal content to the cytosol can be measured by the retention time of such substance. According to this method, the dye is sequestered for the lysosomal compartment when living cells are pre-incubated with neutral red. The assessment of the dye leakage to the cytosol by microscope can characterize damages in the lysosome membranes and the time that the dye takes to reach the cytosol is related to the damage degree of the membranes. The evaluation of lysosome membrane permeability by retention of neutral red is a practical and very

used method, since lysosomes are the target of many pollutants (Lowe and Pipe 1994; Viarengo et al. 2007; Freire et al. 2008).

They verified that the retention time of neutral red decreased progressively with the increase in the fungicide concentration, concluding that both the concentration and the exposure time to the toxicant may influence the lysosomal responses of the hemocytes.

Lysosomes are known for their involvement in the accumulation and detoxification of organic and/or metallic xenobiotics (Giamberini and Pihan 1997). According to Pipe (1992) and Winston et al. (1996), the lysosomal compartment is an important place of generation of reactive oxygen species (ROS) inside the hemocyte. ROS production constitutes one of the functions of the hemocytes in the organism defense and may be stimulated by the presence of toxicants in the organism, mainly in moderate concentrations; high concentrations of chemicals may lead to suppression in the production. The hemocytes protect themselves against the oxidative stress by enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase); the activity of such enzymes may also be affected by contaminants, causing oxidative damages to the cell (Pipe and Coles 1995).

Fisher et al. (2000) analyzed the defense of oyster of the species *C. virginica*, collected in different sites with varied contamination levels. They observed that oyster from sites with higher concentrations of xenobiotics, especially specific metals, exhibited higher generation of superoxide by hemocytes, besides the high density and mobility of these cells. The authors discuss that the increase in the parameters of internal defense in contamination conditions may reflect the detoxification process carried out by hemocytes.

In another study carried out with the species *C. virginica*, in which the animals were exposed to cadmium, Roesijadi et al. (1997) verified that high concentrations of the heavy metal suppressed the production of ROS by hemocytes, suggesting that cadmium is immunotoxic to this species.

Moreover, where it is verified a reduction in the phagocytic activity of the hemocytes due to stress, the metabolic process triggered by it may also be affected; one of this process is the production of

ROS, which may suffer suppression (Auffret et al. 2002).

## Final considerations

The study of the components of the immune system may provide a measure of the health state of an organism and of the stress level resulted from environmental contamination (Pipe et al. 1999). According to Wong et al. (1992), the effects of exposition to contaminants may be assessed by cellular and functional parameters of the immune system of sentinel species. In this sense, little has been studied about the impact of different toxicants on the immune system of invertebrates, although they are known for easily accumulate pollutants.

**Acknowledgements** We are thankful to José Augusto de Oliveira David and Juliana Aparecida Preto de Godoy for providing the photographs, to Márcia Hoshina for helping in the translation, and to CNPq, FUNDUNESP and CAPES for the financial support.

## References

- Ahearn, G. A., Mandal, P. K., & Mandal, A. (2004). Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174, 439–452.
- Andrade, F. G., Negreiro, M. C. C., & Falleiros, A. M. F. (2004). Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(3), 391–398.
- Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 95–104.
- Auffret, M., & Oubella, R. (1997). Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In Vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A(3), 705–712.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., & Moraga, D. (2002). Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, 54, 585–589.
- Barraco, M. A., & Amirante, G. A. (1992). Morphological and cytochemical studies of the hemocytes of *Squilla mantis* (Stomatopoda). *Journal of Crustacean Biology*, 12(3), 372–382.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12, 64–76.
- Bombonato, M. T., & Gregório, E. A. (1995). Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 12(4), 867–879.
- Cajaraville, M. P., Olabarrieta, I., & Marigomez, I. (1996). In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: A case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 253–260.
- Carneiro, M. E., & Daemon, E. (1997). Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 6(1), 1–9.
- Carneiro, M. E., & Daemon, E. (2001). Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius) Koch, 1844 e de *Haemaphysalis* sp. *Revista Brasileira de Zootecias*, 3(2), 139–145.
- Coles, J. A., Farley, S. R., & Pipe, R. K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22, 59–65.
- Correia, A. A. (2008). Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Correia, A. A., Ferreira, A. V. S., Wanderley-Teixeira, V., & Teixeira, A. A. C. (2005). Descrição morfológica dos hemócitos do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(1), 57–61.
- Coutinho, H. D., & Barbosa, A. R. (2007). Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusitana*, 15(1), 103–117.
- David, J. A. O., Salaroli, R. B., & Fontanetti, C. S. (2008). The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron* 39, 1293–1299.
- Erold-Erickson, M., Mishra, S., & Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology*, 10, 781–784.
- Falleiros, A. M. F. (1995). Células sanguíneas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Estudo citológico ultraestrutural e à microscopia de varredura. Thesis, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Falleiros, A. M. F., Bombonato, M. T. S., & Gregório, E. A. (2003). Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(2), 287–294.
- Faraldo, A. C. (2000). Hemócitos de Diptera economicamente importantes: Análise qualitativa, quantita-

- tiva e funcional. Dissertation, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Fisher, W. S., Wishkovsky, A., & Chu, F.-L. E. (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19, 354–360.
- Fisher, W. S., Oliver, L. M., Winstead, J. T., & Long, E. R. (2000). A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: Associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology*, 51, 115–138.
- Freire, M. M., Santos, V. G., Ginuino, I. S. F., & Arias, A. R. L. (2008). Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), 347–354.
- Giamberini, L., & Pihan, J. C. (1997). Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28, 221–227.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42, 611–643.
- Gillespie, J. P., Burnett, C., & Charnley, A. K. (2000). The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Insect Physiology*, 46(4), 429–437.
- Godoy, J. A. P., & Fontanetti, C. S. (2009). Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. *Water, Air and Soil Pollution*. doi:10.1007/s11270-009-0261-z.
- Greig, R. A., Sawyer, T. K., Lewis, E. J., & Galasso, M. E. (1982). A study of metal concentrations in relation to gill color and pathology in the rock crab. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 539–545.
- Gupta, A. P. (1979). *Insect hemocytes: Development, forms, functions and techniques*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gupta, A. P. (1985). Cellular elements in the hemolymph. In G. A. Kertutand & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology* (pp. 402–444). Oxford: Pergamon Press.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metals detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211, 213–236.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean hemocytes and hematopoiesis. *Aquaculture*, 191, 45–52.
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 267–294.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1295–1309.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V. J., & Ferrero, E. A. (2001). Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 459–472.
- Lowe, D. M., & Pipe, R. K. (1994). Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: An in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30, 357–365.
- Lowenberger, C. (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 219–229.
- Mandato, C. A. (1998). *Modulators of the insect cellular immune response*. Thesis, University of Waterloo.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. M., & Marin, M. G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 163–170.
- Mayrand, E., St-Jean, S. D., & Courtenay, S. C. (2005). Haemocytes responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: Can the immune system recuperate? *Aquaculture Research*, 36, 962–971.
- Muta, T., & Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 8, 41–47.
- Negreiro, M. C. C., Andrade, F. G., & Falleiros, A. M. F. (2004). Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), 293–308.
- Nogarol, L. R., & Fontanetti, C. S. (2010). Acute and sub-chronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. *Micron*, 41(3), 239–246.
- Olabarrieta, I., L'azou, B., Yuric, S., Cambar, J., & Cajarville, M. P. (2001). In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, 15, 511–517.
- Oliver, L. M., & Fisher, W. S. (1995). Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 22, 217–225.
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., & Auffret, M. (1993). Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 15, 193–197.
- Park, J. D., Liu, Y., & Klaassen, C. D. (2001). Protective effect of metallothionein against toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*, 163(2–3), 93–100.
- Pech, L. L., & Strand, M. R. (1996). Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect hemocytes. *Journal of Cell Science*, 109, 2053–2060.
- Perez, D. G., & Fontanetti, C. S. (2008). *Respostas tissulares do intestino médio do diplópodo Rhinocricus padbergi exposto a substrato contendo lodo de esgoto*. Dissertation, Universidade Estadual Paulista.



- Pipe, R. K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 16, 111–122.
- Pipe, R. K., & Coles, J. A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 581–595.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., Carissan, F. M. M., & Ramanathan, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 46, 43–54.
- Pirie, B. J. S., George, S. G., Lytton, D. G., & Thomson, J. D. (1984). Metal-containing blood cells of oysters: Ultrastructure histochemistry X-ray microanalysis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 64, 115–123.
- Radford, J. L., Hutchinson, A. E., Burandt, M., & Raftos, D. A. (2000). Effects of metal-based environmental pollutants on tunicate hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, 242–248.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgeald, S. W., & Rhodes, C. P. (1985). Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology*, 97, 183–350.
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52, 417–429.
- Robinson, W. E., & Ryan, D. K. (1988). Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, 97, 101–109.
- Roesijadi, G., Brubacher, L. L., Unger, M. E., & Anderson, R. S. (1997). Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118C(2), 171–176.
- Russo, J., Brehélin, M., & Carton, Y. (2001). Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*, 47, 167–172.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, P., Goudreau, P., et al. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: In vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58, 189–200.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. C., & Simões, Z. L. P. (2002). Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 689–699.
- Snyman, R. G., Reinecke, S. A., & Reinecke, A. J. (2000). Hemocytic lysosome response in the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 480–485.
- Sorvari, J., Rantala, L. M., Rantala, M. J., Hakkarainen, H., & Eeva, T. (2007). Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environmental Pollution*, 145, 324–328.
- Truscott, R., & White, K. N. (1990). The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*, 4, 455–461.
- Tzou, P., Gregorio, E., & Lemaitre, B. (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 102–110.
- van de Braak, K. (2002). *Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Thesis, Wageningen University.
- Vasak, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 13–17.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(3), 281–300.
- Victor, B. (1993). Responses of hemocytes and gill tissues to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24, 432–439.
- Winston, G. W., Moore, M. N., Kirchin, M. A., & Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C(2), 221–229.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banska, W., & Krzystyniak, K. (1992). Environmental immunotoxicology. In D. Peakall (Ed.), *Animal biomarkers as pollution indicators* (pp. 167–189). London: Chapman and Hall.
- Xylander, W. E. R. (2009). Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): A review. *Invertebrate Survival Journal*, 6, 114–124.

**Artigo 2****CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS CELULARES ENCONTRADOS NA HEMOLINFA  
DO DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi***

Danielli Giuliano Perez<sup>1</sup>, Antonio Teruyoshi Yabuki<sup>2</sup> e Carmem Silvia Fontanetti<sup>3</sup>

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências da UNESP  
Av. 24A, 1515 – 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil

<sup>1</sup> dani.giu@hotmail.com

<sup>2</sup> atyabuki@rc.unesp.br

<sup>3</sup> fontanet@rc.unesp.br (autora correspondente)

## Resumo

Não há informações disponíveis na literatura sobre os tipos celulares circulantes na hemolinfa do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, espécie que vem sendo utilizada com êxito como bioindicadora de solos impactados, e que tem apresentado como resposta ao estresse uma alteração no número de hemócitos encontrados nos tecidos injuriados. Para que seja esclarecida a função dessas células no processo de defesa do diplópodo, a caracterização morfológica dos diferentes tipos celulares torna-se essencial. Assim, o presente trabalho objetivou caracterizar morfofisiologicamente os hemócitos circulantes na hemolinfa da espécie *R. padbergi*, por meio da técnica do esfregaço e da análise ultra-estrutural, seguindo a nomenclatura proposta por Gupta (1985) para a classificação. A partir das análises realizadas, foram identificados três tipos morfológicos de hemócitos circulantes na hemolinfa dessa espécie: pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos (subtipos I e II), sendo os granulócitos as células mais abundantes. Também foram observadas células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos e entre plasmatócitos e granulócitos, sugerindo uma provável diferenciação celular na hemolinfa desta espécie.

**Palavras-chave:** milípede; hemócito; morfologia celular; ultra-estrutura.

## 1. Introdução

Os diplópodos fazem parte da macrofauna do solo e são animais importantes para a aeração, humificação e enriquecimento do mesmo. São típicos de habitats úmidos e com grande disponibilidade de material orgânico, sendo geralmente encontrados nos lugares sombrios das matas, vivendo sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Alimentam-se de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas e pequena quantidade de minerais do substrato em que são encontrados. Pelos seus hábitos, têm sido apontados como bons indicadores ambientais em análises de solo (HOPKIN et al., 1985), uma vez que, ao revolverem o substrato, podem entrar em contato direto com potenciais contaminantes.

O aumento do número de hemócitos, células circulantes na hemolinfa e engajadas no processo de defesa do organismo, tem sido uma resposta comumente observada no intestino médio de diplópodos expostos a condições de estresse em laboratório (GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; PEREZ; FONTANETTI, 2010a; SOUZA; FONTANETTI, 2011); de fato, dados na literatura indicam que o aumento do número total de hemócitos e a formação de aglomerados dessas células em diferentes tecidos do organismo é uma das principais respostas ao estresse ambiental em muitos invertebrados utilizados como espécies sentinelas, como demonstrado por Perez e Fontanetti (2010b) em uma revisão recente. Assim, o monitoramento do número de hemócitos como uma medida de estresse tem sido sugerido para alguns invertebrados (TRUSCOTT; WHITE, 1990; COLES et al., 1995; PIPE et al., 1999; LORENZON et al., 2001; MAYRAND et al., 2005; CORREIA, 2008).

Porém, de acordo com Russo et al. (2001), o sucesso de uma resposta de defesa depende não somente do número de hemócitos, mas também dos tipos celulares envolvidos no processo. Neste sentido, a terminologia dos hemócitos não é uniforme e sua classificação ainda gera muitas controvérsias, sendo que, muitas vezes, pesquisadores acabam adotando seus próprios termos para identificar tipos celulares já descritos por outros autores, tornando confusa a identificação das células e dificultando qualquer tentativa de comparação entre as espécies.

A classificação mais aceita entre os pesquisadores é aquela proposta por Gupta (1985) para hemócitos de insetos, em que o autor descreve sete tipos principais, de acordo com os aspectos morfológicos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos.

Com relação à caracterização e classificação de hemócitos de diplópodos, os estudos

são raros, destacando-se apenas o trabalho de Ravindranath (1973), conduzido com a espécie *Thyropygus poseidon* e, mais recentemente, os de Xylander e Nevermann (2006) e Xylander (2009), onde os autores caracterizaram os tipos celulares de *Rhapidostreptus virgator* e *Chicobolus* sp.

Devido aos estudos recentes com a espécie *R. padbergi* como bioindicadora de solos impactados, em que uma alteração no número de hemócitos foi evidenciada em vários trabalhos, é importante investigar a função dessas células no processo de defesa dos animais; para isso, a descrição dos tipos morfológicos de hemócitos nesta espécie torna-se essencial. Assim, o presente trabalho objetivou caracterizar morfofisiologicamente os hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, por meio da técnica do esfregaço e da análise ultra-estrutural.

## **2. Material e Métodos**

Para a coleta da hemolinfa, foram utilizados 15 indivíduos de *R. padbergi*, coletados no campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Rio Claro, SP. Uma seringa contendo solução anticoagulante (Solução de Alsever) foi inserida na região imediatamente abaixo da cabeça do animal.

### **2.1. Esfregaço**

Após a coleta, cada gota de hemolinfa foi transferida para uma lâmina limpa, sendo então realizado o esfregaço e a secagem ao ar por 20 minutos, para melhor adesão dos hemócitos à lâmina. A fixação do material foi feita em metanol e a coloração com solução Giemsa por 7 minutos.

### **2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para a análise ultra-estrutural, a hemolinfa foi fixada em solução Karnovsky. Após lavagem em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH = 7.2), o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratado em álcool (70%, 90%, 95% e 100%) e embebido em mistura de resina Spurr. Secções finas obtidas por ultra-micrótomo foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para análise e documentação com microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100. A cada etapa do protocolo, o material foi centrifugado a 3000 rpm para a decantação dos hemócitos.

### 3. Resultados

A partir das análises morfológicas realizadas sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, foram identificados os seguintes tipos de hemócitos na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, sendo aqui adotada a classificação e nomenclatura proposta por Gupta (1985):

#### - **Pró-Hemócitos:**

Estas células são menores que os demais tipos morfológicos, arredondadas, núcleo esférico e central, ocupando quase todo o volume celular; o citoplasma é homogêneo e restrito a uma pequena faixa ao redor do núcleo (Figs. 1A, B).

Os pró-hemócitos foram visualizados poucas vezes no esfregaço da hemolinfa, corando-se fracamente pela solução Giemsa. Não foram detectados através da microscopia eletrônica de transmissão.

#### - **Granulócitos:**

Os granulócitos foram o tipo morfológico mais abundante na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*.

Foram observadas células de tamanhos e formas variáveis, mais comumente arredondadas ou ovais. O citoplasma apresentou projeções citoplasmáticas e alguns vacúolos elétron-lúcidos, núcleo central ou excêntrico, redondo ou alongado, muitas vezes mascarado pela presença de numerosos grânulos citoplasmáticos elétron-densos, principal característica destas células.

Quanto ao tamanho dos grânulos, foram observados no esfregaço granulócitos com grânulos finos (Fig. 1C) e granulócitos com grânulos bem mais grosseiros (Fig. 1D).

Verificou-se também a existência de dois subtipos morfológicos de granulócitos, os quais serão aqui denominados como granulócito I e granulócito II.

O granulócito I apresenta o citoplasma quase que inteiramente preenchido com grânulos, os quais geralmente encobrem a presença do núcleo. O citoplasma apresenta-se mais basófilo (Fig. 1E).

O granulócito II aparentemente apresenta menor quantidade de grânulos, os quais aparecem mais espalhados no citoplasma, fazendo com que o núcleo permaneça bem evidente; já o citoplasma desta célula é mais acidófilo quando comparado ao granulócito I (Fig. 1F).

Sob microscopia de luz, devido à grande quantidade de grânulos e citoplasma basófilo, o granulócito I apresenta um aspecto mais escuro. Já no granulócito II, os grânulos dispersos no citoplasma acidófilo são mais evidentes (Fig. 1G).

Os dois subtipos de granulócitos foram também detectados sob microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 3A). A análise ultra-estrutural dessas células revelou que o granulócito I (Fig. 3B) possui o citoplasma mais elétron-denso, enquanto o granulócito II (Fig. 3C) geralmente apresenta maior número de vacúolos no citoplasma, sendo este menos elétron-denso.

#### **- Plasmatócitos:**

No esfregaço, foram observadas células polimórficas com projeções citoplasmáticas, variáveis em tamanho, núcleo central, redondo ou ovalado. Podem ser agranulares ou conter poucos grânulos no citoplasma (seta na Fig. 1H; Figs. 2A, B). Sob microscopia de luz, os plasmatócitos agranulares se diferenciam dos pró-hemócitos por serem aparentemente maiores e por apresentarem maior quantidade de citoplasma ao redor do núcleo (Fig. 2C).

Na análise ultra-estrutural, frequentemente foram vistos plasmatócitos repletos de vacúolos elétron-lúcidos (Fig. 4A).

Foram bastante observadas também células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos (Figs. 2D, E) e entre plasmatócitos e granulócitos (Figs. 2F, G e 4B), indicando provável diferenciação celular na hemolinfa.

## **4. Discussão**

Os hemócitos constituem a barreira final do sistema de defesa dos artrópodos (NEGREIRO et al., 2004; CORREIA et al., 2005) e diferentes tipos morfológicos podem ser identificados.

Muitos estudos têm se voltado para a morfologia e fisiologia de hemócitos de insetos, enquanto informações similares sobre os hemócitos de outros grupos de artrópodos são raras e, geralmente, baseadas em descrições feitas para a Classe Insecta, em que se destacam os trabalhos de revisão realizados por Jones (1962) e Gupta (1985).

Em miriápodos, os hemócitos mais numerosos são os granulócitos, também conhecidos como hemócitos granulares, seguidos pelos plasmatócitos (XYLANDER; NEVERMANN, 2006; XYLANDER, 2009). As análises do presente estudo confirmam que o mesmo ocorre para o diplópodo *R. padbergi*, uma vez que o tipo morfológico

predominantemente observado na hemolinfa dessa espécie foram hemócitos granulócitos, sendo também verificada, em frequência menor, a presença de plasmatócitos.

Em relação aos tipos morfológicos encontrados, nossos dados se assemelham aos de Xylander e Nevermann (2006), em um estudo sobre os hemócitos dos diplópodos *Rhapidostreptus virgator* e *Chicobolus sp.*, em que se verificou a presença de pró-hemócitos (aproximadamente 5% do total de hemócitos em ambas as espécies), plasmatócitos (27% e 39%, respectivamente) e granulócitos (68% e 56%, respectivamente), não sendo identificados esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides.

Em uma revisão recente feita por Xylander (2009), em que o autor compila os resultados encontrados por seu grupo de pesquisa sobre hemócitos de miriápodos, são lançadas as seguintes hipóteses: em Myriapoda, os esferulócitos seriam um tipo celular restrito aos quilópodos; os adipohemócitos representariam um artefato durante a obtenção da hemolinfa, sendo células originárias do corpo gorduroso subepidérmico; e os oenocitóides, não observados durante as investigações, seriam restritos a um curto período anterior ao crescimento do animal, não podendo ser verificados em espécimens maduros, geralmente utilizados para os estudos.

Em um trabalho de revisão sobre hemócitos de insetos, conduzido por Lavine e Strand (2002), os autores comentam que granulócitos e plasmatócitos geralmente compreendem mais de 50% da população de hemócitos. Tais células são reconhecidas como as mais eficientes nos principais mecanismos de defesa, como fagocitose, encapsulação e nodulação (PECH; STRAND, 1996; GILLESPIE et al., 2000; LAVINE; STRAND, 2002; PEREZ; FONTANETTI, 2010b). Falleiros e Gregório (1995) enfatizam que plasmatócitos e granulócitos são as células com maior capacidade fagocítica, utilizando enzimas lisossomais para destruir o invasor.

Os agentes invasores que são aprisionados por fagocitose são destruídos por um sistema denominado sistema profenoloxidase (proPO), o qual constitui uma complexa cascata de enzimas que converte a pró-enzima profenoloxidase na enzima fenoloxidase, tendo um papel importante na síntese de melanina (GREGÓRIO, 1997; NEGREIRO et al., 2004). O sistema proPO é responsável pela polimerização e deposição de melanina sobre a partícula estranha durante a reação de defesa. A melanina depositada constitui uma camada que impede a liberação de material tóxico para a hemolinfa ao redor, além de proibir a tomada de nutrientes por um possível parasita (XYLANDER, 1992).

Krishnan e Ravindranath (1973) relataram que o sistema proPO em cinco espécies de milípedes ocorre principalmente em granulócitos. Em uma revisão feita por Negreiro et al.



(2004), os autores comentam que a fenoloxidase faz parte de uma cascata enzimática ativada pelos granulócitos através da exocitose de fatores sinais, o que acarreta na síntese de proteínas que aumentam a adesividade dos plasmatócitos ao invasor, além de intensificar a exocitose de outros granulócitos.

De acordo com Pech e Strand (1996), os granulócitos e plasmatócitos atuam em conjunto na encapsulação de corpos estranhos, sendo incapazes de realizar esse processo independentemente. Os autores investigaram o processo de formação da cápsula por hemócitos no inseto *Pseudoplusia includens* e concluíram que a encapsulação envolve três etapas: primeiramente, os granulócitos aderem ao corpo estranho, formando uma camada única de células; em seguida, pode ser observada a adesão de múltiplas camadas de plasmatócitos e, por fim, uma subpopulação de granulócitos forma uma monocamada na periferia da cápsula. Além disso, foi verificado que os plasmatócitos não aderem ao alvo sem que os granulócitos tenham iniciado o processo. Dessa forma, os autores concluíram que os hemócitos granulócitos são requeridos para iniciar, mediar e terminar a encapsulação. Segundo Gillespie et al. (1997), a liberação do conteúdo granular dos granulócitos é responsável por atrair os plasmatócitos para formar a cápsula.

No presente estudo, foram observadas no esfregaço da hemolinfa células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos, e entre plasmatócitos e granulócitos. Observações de células com morfologia intermediária entre tipos de hemócitos têm sido comuns na literatura (RATCLIFFE et al., 1985; GUPTA, 1985; GREGÓRIO, 1997; SILVA et al., 2002; FALLEIROS et al., 2003; XYLANDER, 2009), porém, permanecem ainda muitas controvérsias a respeito dos estágios de diferenciação entre os tipos de hemócitos.

A maioria das células envolvidas na resposta imune são derivadas do tecido hematopoiético, onde ocorre a hematopoiese, processo pelo qual os hemócitos amadurecem e entram na circulação. A formação de células maduras envolve a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas indiferenciadas, sendo que os hemócitos mortos ou danificados são constantemente substituídos pelas novas células sintetizadas; a frequência com que este processo ocorre irá depender da influência de fatores ambientais (JOHANSSON et al., 2000; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

O mecanismo que envolve a liberação das células formadas no tecido hematopoiético para a circulação permanece incompreendido para a maioria dos invertebrados, embora este tecido tem sido bem estudado morfológicamente em crustáceos (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). Especificamente em diplópodos, carecem estudos sobre o tema.

Segundo Ratcliffe et al. (1985), a diferenciação de hemócitos em insetos não está limitada aos órgãos derivados do tecido hematopoiético, podendo ocorrer também na circulação.

Falleiros et al. (2003) observaram células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos e entre plasmatócitos e granulócitos na hemolinfa do lepidóptero *Diatraea saccharalis*. Além disso, verificaram um decréscimo simultâneo no número de pró-hemócitos e plasmatócitos com o aumento de plasmatócitos e granulócitos, respectivamente. Dados semelhantes aparecem nos trabalhos de Ratcliffe et al. (1985), Gupta (1979, 1985) e Xylander (2009).

Gupta (1985), em ampla revisão bibliográfica, elaborou um esquema geral, no qual os pró-hemócitos originariam os plasmatócitos, e estes, os granulócitos. Os granulócitos, por sua vez, dariam origem aos esferulócitos.

Na presente análise, não é possível afirmar que os pró-hemócitos e os plasmatócitos se diferenciaram em plasmatócitos e granulócitos, respectivamente; para isso, diferentes metodologias seriam necessárias. Porém, sugere-se que existam diferentes estágios de diferenciação celular na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*. Da mesma forma, com relação aos dois tipos morfológicos de granulócitos identificados, não se pode concluir se representam diferentes estágios de maturação do mesmo tipo de hemócito ou se correspondem a populações distintas. Para que tais questões sejam esclarecidas, estudos adicionais sobre os hemócitos dessa espécie tornam-se necessários.

## 5. Conclusão

Três tipos morfológicos de hemócitos puderam ser claramente identificados na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*: pró-hemócitos, granulócitos e plasmatócitos. Os granulócitos foram as células predominantes e puderam ser distinguidos dois subtipos morfológicos destas células. Também foram observadas células com morfologia intermediária entre pró-hemócitos e plasmatócitos, e entre plasmatócitos e granulócitos, sugerindo uma possível diferenciação celular na hemolinfa desta espécie.

## Agradecimentos

Agradecemos à Mônica Iamonte e Cristiane Marcia Miléo, pelo apoio técnico, ao CNPq, FUNDUNESP, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

## Referências

- COLES, J.A.; FARLEY, S.R.; PIPE, R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.22, p.59-65, 1995.
- CORREIA, A.A. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008, 57p.
- CORREIA, A.A.; FERREIRA, A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C. Descrição morfológica dos hemócitos do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.1, p.57-61, 2005.
- FALLEIROS, A.M.F.; GREGÓRIO, E.A. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.12, n.4, p.751-758, 1995.
- FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.2, p.287-294, 2003.
- GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol.**, v.42, p.611-643, 1997.
- GILLESPIE, J.P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.429-437, 2000.
- GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air & Soil Pollution**, v.210, n.1-4, p.389-398, 2010.
- GREGÓRIO, E.A. Insect hemocytes and the cellular defense reactions. **Acta Microscopica**, v.6, p.23-24, 1997.
- GUPTA, A.P. **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge, Cambridge University Press, 1979, 614p.
- GUPTA, A.P. **Cellular elements in the hemolymph**. In: KERTUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds). *Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford, Pergamon Press, p.402-444, 1985.
- HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdr. Dierk.**, v. 55, n. 1, p. 88-94, 1985.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity en arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**,

v.211, p.213-236, 2006.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v.191, p.45-52, 2000.

JONES, J.C. Current concepts concerning insect hemocytes. **Am. Zoologist**, v.2, p.209-246, 1962.

KRISHNAN, G.; RAVINDRANATH, M.H. Blood cell phenol oxidase in millipedes. **J. Insect Physiol.**, v.19, p.647-653, 1973.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; SMITH, V.J.; FERRERO, E.A. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.11, p.459-472, 2001.

MAYRAND, E.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C. Haemocytes responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? **Aquaculture Research**, v.36, p.962-971, 2005.

NEGREIRO, M.C.C.; ANDRADE, F.G.; FALLEIROS, A.M.F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.4, 293-308, 2004.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, n.3, p.239-246, 2010a.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water, Air and Soil Pollution**, 2010b (*on line*). DOI: 10.1007/s11270-010-0666-8

PECH, L.L.; STRAND, M.R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2053-2060, 1996.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010a. DOI: 10.1007/s11270-010-0657-9

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2010b. DOI: 10.1007/s10661-010-1645-7

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; CARISSAN, F.M.M.; RAMANATHAN, K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.46, p.43-54, 1999.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGEALD, S.W.; RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, v.97, p.183-350, 1985.

RAVINDRANATH, M. H. The Hemocytes of a Millipede, *Thyropygus poseidon*. **J. Morph.**, v.141, p. 257-268, 1973.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.167-172, 2001.

SILVA, J.E.B.; BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4a, p.689-699, 2002.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.1, p.10-18, 2011.

TRUSCOTT, R.; WHITE, K.N. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. **Functional Ecology**, v.4, p.455-461, 1990.

XYLANDER, W.E.R. Immune defense reactions of Myriapoda - a brief presentation of recent results. **Ber. nat.-med. Verein Innsbruck**, v.10, p.101-110, 1992.

XYLANDER, W.E.R. Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. **Invertebrate Survival Journal**, v.6, p.114-124, 2009.

XYLANDER, W.E.R.; NEVERMANN, L. Haemocytes in Diplopoda and Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda) – types, structures, and numbers. **Scand. J. Entomol.**, v.53, p.195-210, 2006.

### Legendas

**Figura 1 A – H.** Hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, obtidos pela técnica do esfregaço e corados com solução Giemsa. **A, B.** Pró-hemócitos; **C.** Granulócito com grânulos finos; **D.** Granulócito com grânulos grosseiros; **E.** Granulócito I; **F.** Granulócito II; **G.** Granulócito I (GR I) e granulócito II (GR II); **H.** Granulócito I (GR I) e plasmatócito (seta).

**Figura 2 A – G.** Hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*, obtidos pela técnica do esfregaço e corados com solução Giemsa. **A, B, C.** Plasmatócitos; **D, E.** Células com características intermediárias entre pró-hemócito e plasmatócito; **F, G.** Células com características intermediárias entre plasmatócito e granulócito.

**Figura 3 A – C.** Micrografias eletrônicas de hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*. **A.** Granulócito I (GR I) e granulócito II (GR II); **B.** Granulócito I; **C.** Granulócito II.

g = grânulo; n = núcleo; v = vacúolo.

**Figura 4 A – B.** Micrografias eletrônicas de hemócitos circulantes na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*. **A.** Plasmatócito. **B.** Célula com características intermediárias entre plasmatócito e granulócito.

g = grânulo; n = núcleo; v = vacúolo.

Figura 1

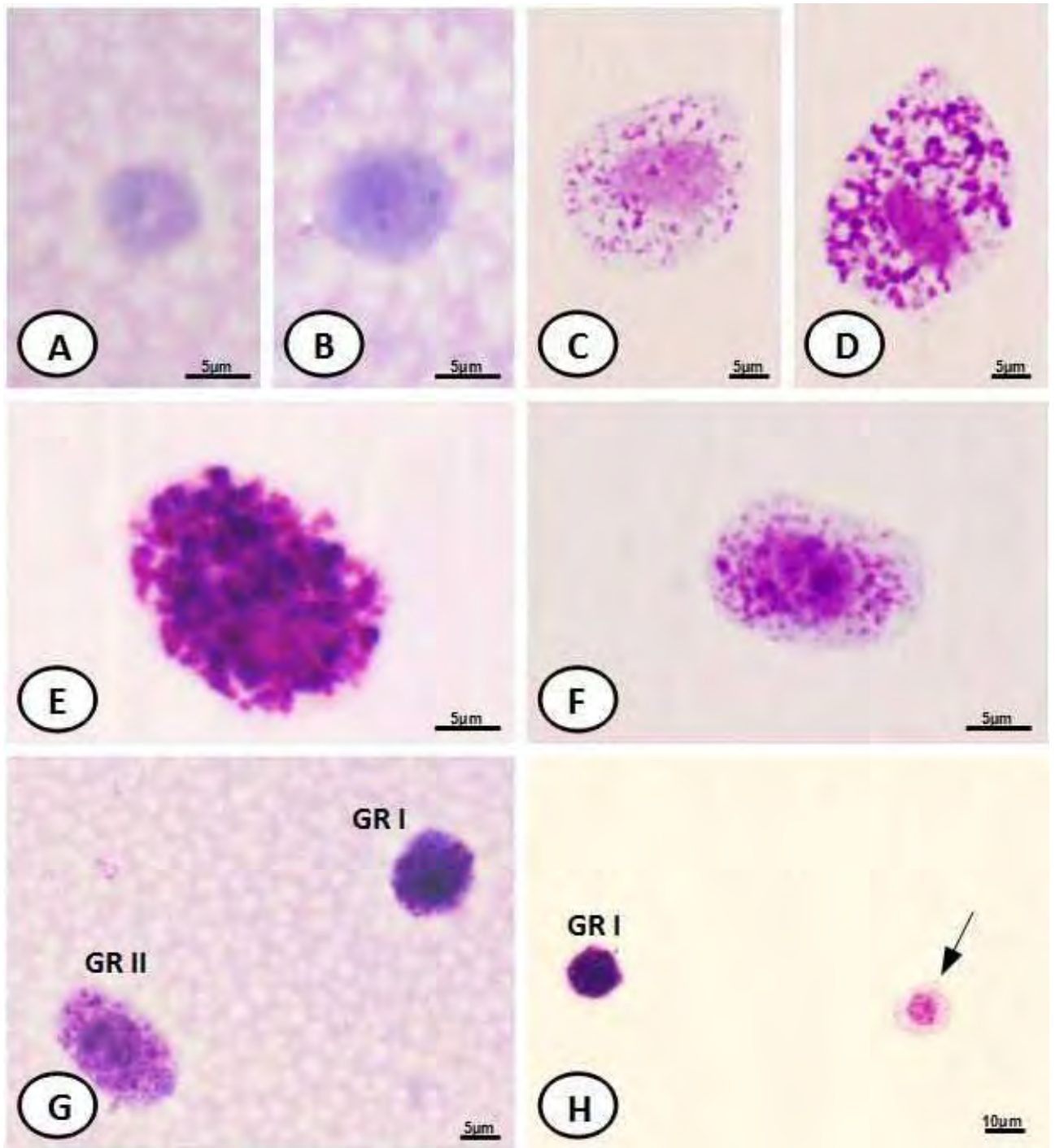


Figura 2

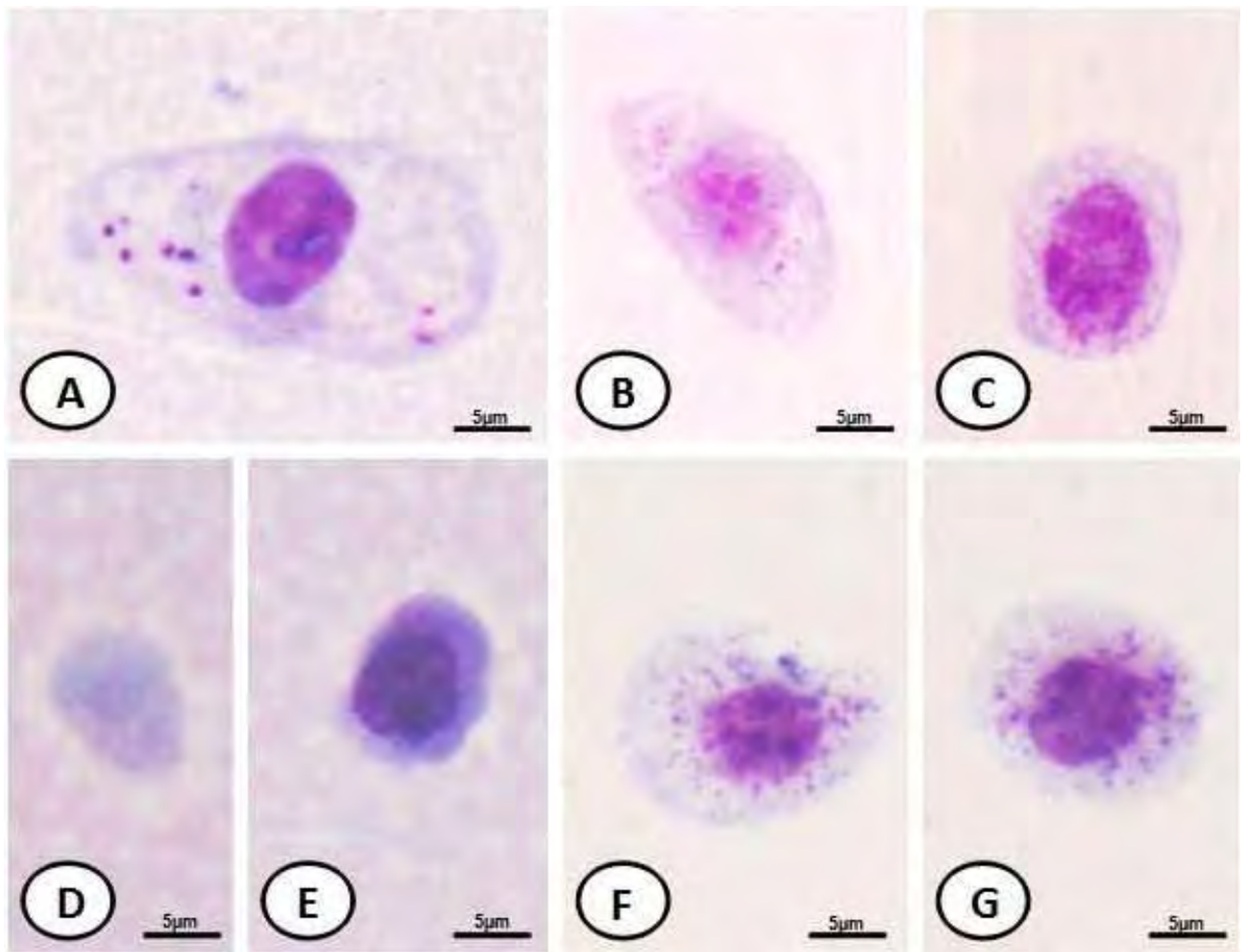




Figura 3

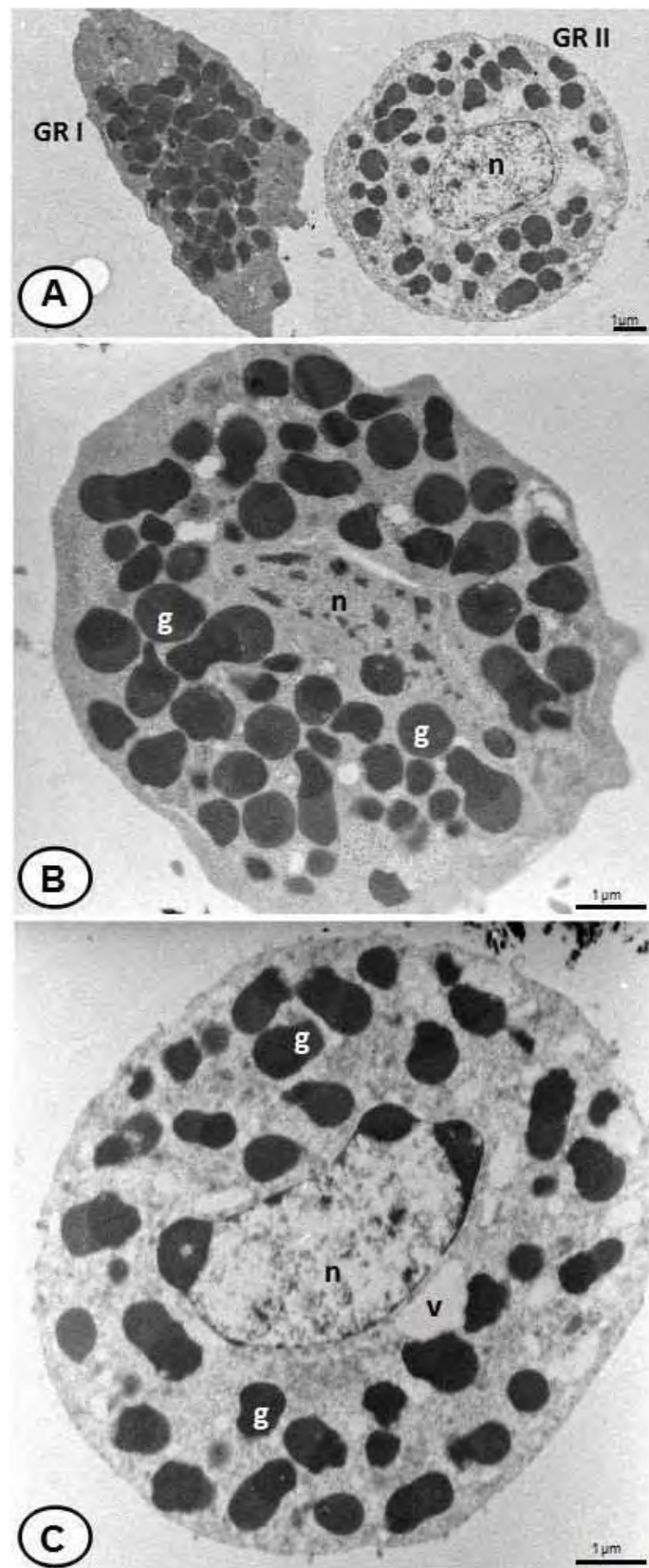
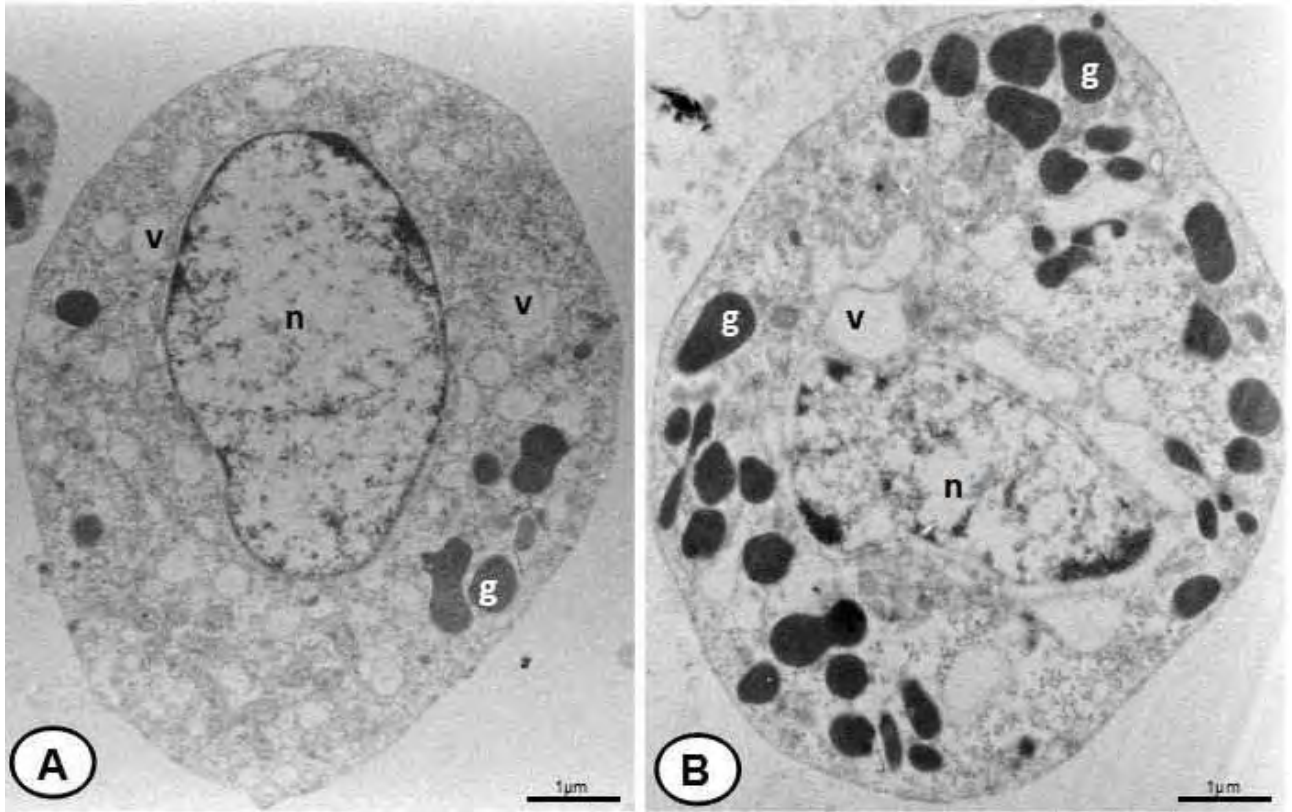


Figura 4



**Artigo 3****CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS PRESENTES NO INTESTINO MÉDIO DO  
DIPLÓPODO *Rhinocricus padbergi* EXPOSTO A SUBSTRATO CONTENDO LODO  
DE ESGOTO**

Danielli Giuliano Perez<sup>1</sup>, Mônica Iamonte<sup>2</sup> e Carmem Silvia Fontanetti<sup>3</sup>

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências da UNESP  
Av. 24A, 1515 – 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil

<sup>1</sup> dani.giu@hotmail.com

<sup>2</sup> monikai@rc.unesp.br

<sup>3</sup> fontanet@rc.unesp.br (autora correspondente)

## Resumo

A utilização do lodo de esgoto na recuperação de solos degradados e como fertilizante agrícola tem gerado inúmeras discussões no meio científico, devido ao risco de contaminação do ambiente por este resíduo. Estudos recentes apontam o diplópodo *Rhinocricus padbergi* como organismo-teste eficiente na avaliação do potencial tóxico de lodo de esgoto. A análise histológica do intestino médio têm sido usada como um bom biomarcador, e uma das respostas observadas é a aglomeração de hemócitos no tecido, como um provável mecanismo de defesa do organismo. Por meio das técnicas histológica, histoquímica e ultra-estrutural, este trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente os hemócitos presentes no intestino médio de indivíduos da espécie *R. padbergi* expostos a substratos contendo lodo de esgoto, bem como inferir a função dos tipos celulares no processo de defesa. Através das análises, foram identificados dois tipos morfológicos de hemócitos: granulócitos (subtipos I e II) e plasmatócitos, sendo os granulócitos as células mais abundantes. Também puderam ser observadas células com características intermediárias entre plasmatócitos e granulócitos, indicando uma provável diferenciação celular no tecido. Sugerimos a atuação em conjunto desses dois tipos celulares no processo de defesa em resposta ao lodo.

**Palavras-chave:** milípede; hemócito; histologia; ultra-estrutura; lodo de esgoto.

## 1. Introdução

Diante da constante liberação de substâncias potencialmente danosas no ambiente, faz-se necessário conhecer sua ação sobre os organismos ali presentes. Neste sentido, uma das grandes preocupações da comunidade científica é a destinação do resíduo gerado após o tratamento do esgoto nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), isto é, o lodo de esgoto. Devido ao alto teor de matéria orgânica e de nutrientes no lodo, tem sido muito cogitada sua utilização como fertilizante na agricultura e como condicionador de solos; entretanto, o lodo pode também conter contaminantes como metais pesados, compostos orgânicos tóxicos e persistentes e agentes causadores de doenças, o que põe em discussão o uso agrícola deste resíduo (BOEIRA et al., 2002; CORAUCCI FILHO et al., 2003; BETTIOL; CAMARGO, 2006; CAI et al., 2007; KITAMURA et al., 2008; CAMARGO et al., 2008; MIELLI et al., 2009).

De acordo com a procedência, o lodo pode ser classificado em doméstico ou industrial. Bettiol e Camargo (2006) afirmam que mesmo aqueles lodos de origem exclusivamente doméstica geralmente contêm concentrações de metais maiores que aquelas encontradas no solo, o que pode levar aos problemas de contaminação da cadeia alimentar e lixiviação.

Diante disto, torna-se importante investigar a ação que os constituintes do lodo podem ter na fauna característica do solo onde o mesmo será aplicado. Pelos seus hábitos, os diplópodos têm sido apontados como bons indicadores ambientais em análises de solo (HOPKIN et al., 1985), uma vez que estes animais ocupam o nível trófico de decompositores, revolvendo partículas minerais e orgânicas do substrato e entrando em contato direto com possíveis contaminantes. No Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Rio Claro-SP, foram feitas propostas da utilização da espécie *R. padbergi* como bioindicadora de solos impactados, sendo realizados estudos envolvendo as análises histológica, histoquímica e ultra-estrutural do intestino médio de espécimens submetidos por diferentes períodos a substratos contendo lodo de esgoto e *landfarming* de refinaria de petróleo (GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a, b; PEREZ; FONTANETTI, 2010a; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Os resultados obtidos nestes trabalhos têm demonstrado que a utilização da espécie *R. padbergi* em análises ecotoxicológicas de solo é viável, e uma das respostas constantemente observadas é o aumento do número de hemócitos e a formação de aglomerados dos mesmos por entre as células da camada de corpo gorduroso do intestino médio, principal local de

digestão e absorção de nutrientes.

Os hemócitos são células circulantes na hemolinfa dos invertebrados, envolvidas no processo de defesa do organismo. Sob certas condições de estresse, podem migrar para os diferentes tecidos injuriados (CAJARAVILLE et al., 1996). Estas células atuam no reconhecimento do material, na fagocitose, nodulação e encapsulação, reações citotóxicas por meio da produção de reativos intermediários de oxigênio, coagulação da hemolinfa e reparo de injúrias (LAVINE; STRAND, 2002; TZOU et al., 2002; FALLEIROS et al., 2003; CORREIA, 2008), sendo também observadas aglomerações de hemócitos ao redor do agente estressor, numa espécie de “armadilha” (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

Diferentes tipos morfológicos de hemócitos podem ser identificados. A classificação mais aceita entre os pesquisadores é a proposta por Gupta (1985), que agrupa estas células em sete tipos principais: pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e coagulócitos. Segundo Johansson et al. (2000), diferentes tipos celulares são responsáveis por diferentes funções na imunidade.

Assim, empregando-se as técnicas histológica, histoquímica e ultra-estrutural, o presente trabalho pretendeu caracterizar os hemócitos encontrados por entre as células da camada de corpo gorduroso do intestino médio de indivíduos de *R. padbergi* expostos a substratos contendo lodo de esgoto. Buscou-se também inferir as funções dos tipos celulares identificados no processo de defesa em resposta à exposição ao lodo.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material**

Indivíduos adultos de *R. padbergi* foram manualmente coletados no campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Rio Claro, SP, trazidos ao laboratório e mantidos em aquários de vidro contendo o mesmo substrato do local de captura, considerando as condições ambientais em que são encontrados na natureza, como fotoperíodo, umidade relativa do ar e temperatura. O período de aclimação em laboratório foi de 15 dias.

Após este período, os diplópodos foram expostos a substratos contendo diferentes amostras de lodo de esgoto, oriundas de coletas realizadas em três ETEs localizadas no estado de São Paulo (SG, AT-1 e AT-2) (Fig. 1).

A ETE SG localiza-se na região da vertente paulista do Rio Grande, com uma população de 685 mil pessoas e uma economia baseada, principalmente, em atividades agropecuárias; o lodo gerado é caracteristicamente doméstico. As ETEs AT-1 e AT-2

pertencem à Bacia do Alto Tietê, com uma população aproximada de 19 milhões de pessoas, baseando sua economia em atividades industriais; dessa forma, o lodo gerado em ambas as ETEs apresenta componentes domésticos e industriais (DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo, 2006).

## **2.2. Bioensaios**

Sete bioensaios foram montados imediatamente após a coleta:

1. O primeiro continha solo proveniente do local de coleta dos animais, sendo este o grupo controle;
2. O segundo continha lodo puro da ETE SG;
3. O terceiro continha lodo da ETE SG a 10% (lodo misturado com o solo controle, sendo 9 partes de solo para 1 parte de lodo);
4. O quarto continha lodo puro da ETE AT-1;
5. O quinto continha lodo da ETE AT-1 a 10%;
6. O sexto continha lodo puro da ETE AT-2;
7. O sétimo continha lodo da ETE AT-2 a 10%.

Em cada bioensaio foram colocados 15 indivíduos. Para as análises, o material foi coletado após 3 e 7 dias de exposição, como resposta aguda, e 21 dias de exposição, como resposta subcrônica.

## **2.3. Histologia e histoquímica**

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados e dissecados para remoção do intestino médio, o qual foi processado conforme rotina para análise histológica e corado com hematoxilina e eosina. Para a análise histoquímica, o material foi corado com azul de bromofenol para detecção de proteínas (de acordo com PEARSE, 1985) e submetido à técnica de PAS (ácido periódico-Schiff) para polissacarídeos neutros (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

## **2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

O intestino médio dos animais foi fixado em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH = 7.2). Após lavagem no mesmo tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratado em acetona (50%, 75%, 90%, 95% e pura) e embebido em mistura de resina Epon-araldite por 12h a 4°C. Secções finas obtidas em ultramicrotomo foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para análise e

documentação com microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

### 3. Resultados

O intestino médio de *R. padbergi* é constituído por um epitélio pseudoestratificado, seguido de uma camada muscular, uma camada de corpo gorduroso e revestido por uma membrana externa. No grupo controle, hemócitos isolados foram observados por entre as células da camada de corpo gorduroso (Fig. 2A); já nos grupos expostos ao lodo de esgoto, além de hemócitos isolados (Fig. 3A), foram verificados também vários aglomerados destes (seta na Fig. 2B; Fig. 3B), principalmente nos indivíduos expostos ao lodo oriundo da ETE SG, em que um maior número de aglomerados foi detectado quando comparado às amostras das ETEs AT-1 e AT-2. Ainda assim, foram observados aglomerados de hemócitos nos materiais de todas as ETEs, independente do tempo de exposição.

A partir das análises morfológicas realizadas sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, foram identificados, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao lodo, os seguintes tipos de hemócitos no intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, sendo aqui adotada a classificação e nomenclatura proposta por Gupta (1985):

#### - Granulócitos:

Os granulócitos foram o tipo celular predominantemente observado, tanto no grupo controle quanto nos grupos expostos aos substratos contendo lodo de esgoto.

Tais células caracterizam-se pela presença de numerosos grânulos citoplasmáticos (Figs. 2C-E, 3A-C, 4C, 5D), que chegam, muitas vezes, a encobrir o núcleo; este, por sua vez, pode apresentar-se central ou excêntrico, redondo ou alongado. Possuem tamanhos e formas variáveis, podendo ser verificadas projeções citoplasmáticas e alguns vacúolos; observa-se em seu citoplasma mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Quanto ao tamanho dos grânulos, podem ser observados granulócitos com grânulos finos e granulócitos com grânulos bem mais grosseiros (Fig. 4C).

Verificou-se também a existência de dois subtipos morfológicos de granulócitos, os quais serão aqui denominados como granulócito I e granulócito II. O granulócito I apresenta citoplasma mais basófilo sob microscopia de luz (Fig. 2C, D) e mais elétron-denso sob microscopia de transmissão (Fig. 3C) quando comparado ao granulócito II.



#### - Plasmatócitos:

Estas células foram observadas com menor frequência em relação aos granulócitos. São polimórficas, variáveis em tamanho, núcleo central ou excêntrico, redondo ou alongado. Geralmente, em relação aos granulócitos, possuem mais projeções citoplasmáticas, as mitocôndrias são mais numerosas e o retículo endoplasmático rugoso é mais desenvolvido; podem ser agranulares ou conter poucos grânulos (Figs. 2C-E, 3B, 4A, 5B).

Foram também bastante observados hemócitos com características intermediárias entre plasmatócitos e granulócitos (Fig. 4B, 5C), indicando uma provável diferenciação celular no tecido (Fig. 5A-D). Plasmatócitos jovens, repletos de mitocôndrias, puderam ser identificados (Fig. 5A), ao lado de células provavelmente mais diferenciadas, com alguns grânulos, muitas projeções citoplasmáticas, várias mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, caracterizando um plasmatócito típico (Fig. 5B). Células apresentando um pouco mais de grânulos no citoplasma, intermediárias entre plasmatócito e granulócito foram frequentes (Fig. 5C), juntamente com os hemócitos tipicamente granulócitos (Fig. 5D).

A análise histoquímica demonstrou a natureza proteica dos grânulos dos hemócitos granulócitos, os quais foram corados pelo azul de bromofenol (Fig. 2E). Parte dos hemócitos reagiram positivamente ao PAS, indicando a presença de carboidratos no citoplasma dos mesmos (Fig. 2F).

## 4. Discussão

O sucesso de uma resposta de defesa nos diferentes grupos de invertebrados depende não somente do número de hemócitos, mas também dos tipos celulares envolvidos no processo (RUSSO et al., 2001). Neste sentido, a microscopia de luz e a microscopia eletrônica têm sido amplamente empregadas para caracterizar e classificar hemócitos em diferentes grupos de artrópodos.

No presente trabalho, foram identificados dois tipos morfológicos de hemócitos no intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, após exposição a substrato contendo lodo de esgoto: granulócitos e plasmatócitos. Recentemente, conduzimos um estudo prévio visando caracterizar os hemócitos circulantes na hemolinfa desta mesma espécie (PEREZ et al., não publicado), e os mesmos tipos celulares puderam ser observados em ambos os materiais, isto é, tanto na hemolinfa quanto no intestino médio foram vistos numerosos granulócitos (tipos I e II) e plasmatócitos em menor frequência. Um tipo morfológico encontrado na hemolinfa e não detectado no intestino médio foi o pró-hemócito, considerado por muitos pesquisadores

como uma célula-tronco, que irá se diferenciar em linhagens específicas de hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002; FALLEIROS et al., 2003; NEGREIRO et al., 2004; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

Na literatura, granulócitos e plasmatócitos são citados como os principais tipos de hemócitos envolvidos nos mecanismos de defesa (CORREIA et al., 2005) e, segundo Lavine e Strand (2002), geralmente abrangem mais de 50% da população total de hemócitos. É possível que estas células migrem da hemolinfa para os tecidos injuriados em resposta a algum contaminante ambiental, formando aglomerações. Como os pró-hemócitos são considerados células-tronco, não participantes dos processos de defesa, provavelmente permaneçam exclusivamente na hemolinfa, não tendo sido, portanto, detectados no intestino médio dos animais expostos ao lodo de esgoto. De fato, os hemócitos são capazes de responder positivamente a estímulos quimiotáticos, movendo-se da hemolinfa para os tecidos e vice-versa, em direção ao agente invasor, o qual será posteriormente eliminado (IMAI, 1994; CAJARAVILLE et al., 1996).

O tipo morfológico predominantemente observado no intestino médio da espécie aqui estudada, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao lodo de esgoto, foi o granulócito. De acordo com a literatura, este tipo celular é o principal responsável por reconhecer partículas estranhas ao organismo e fagocitá-las. Muitos autores afirmam que o granulócito é uma das primeiras células a entrar em contato com o corpo invasor, iniciando a formação da cápsula ou nódulo (PECH; STRAND, 1996; GILLESPIE et al., 2000; SILVA et al., 2002; NEGREIRO et al., 2004; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006; PEREZ; FONTANETTI, 2010b). Isto pode explicar a grande quantidade de granulócitos encontrados em nosso material, principalmente no intestino médio dos animais expostos ao lodo. É possível que os granulócitos também façam o transporte de metais pesados oriundos do resíduo para locais de excreção do organismo, como dito por Ahearn et al. (2004).

Em um estudo realizado por Imai (1994), em que foi feita a contagem total e diferencial de hemócitos em três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, foi constatado que os granulócitos são o tipo morfológico mais abundante na hemolinfa das três espécies estudadas. A autora comenta que é possível que seja necessário uma maior quantidade de células granulocíticas para a eliminação de substâncias inorgânicas da circulação, como metais.

De acordo com Seiler e Morse (1988), bivalves existentes em regiões poluídas apresentam maior número de granulócitos na hemolinfa. Os autores descreveram a presença

de numerosos grânulos lisossômicos no citoplasma de granulócitos, ricos em fosfatase ácida, responsáveis pela quebra de substâncias inorgânicas, como metais.

Outra célula encontrada nos materiais analisados, em frequência menor, foram os plasmatócitos, cujas funções se relacionam intimamente àquelas descritas para os granulócitos, isto é, fagocitose, nodulação e encapsulação (RUSSO et al., 2001; LAVINE; STRAND, 2002; NEGREIRO et al., 2004; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; PEREZ; FONTANETTI, 2010b). Em uma revisão de literatura feita por Ribeiro e Brehélin (2006), os autores compararam a estrutura e função de hemócitos circulantes em diferentes espécies de insetos, atentando para os lepidópteros e para o gênero *Drosophila*. Segundo eles, enquanto a principal função dos granulócitos é a fagocitose, os plasmatócitos formam a maior parte das cápsulas ao redor de corpos estranhos muito grandes para serem fagocitados, ou nódulos ao redor de massas de bactérias ou material melanizado necrótico.

Vários autores descrevem uma interação entre granulócitos e plasmatócitos no desencadeamento da resposta de defesa do organismo (PECH; STRAND, 1996; GILLESPIE et al., 1997; GREGÓRIO, 1997; LAVINE; STRAND, 2002; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006). Faraldo e Lello (2003) observaram reações de defesa celular em larvas do díptero *Dermatobia hominis* contra materiais biológicos e não-biológicos; foi verificado que hemócitos granulócitos foram as células fagocíticas e que eles interagiram com plasmatócitos para isolar o material estranho ao organismo, através da formação de nódulos e cápsulas.

De fato, a maioria dos pesquisadores concorda que granulócitos e plasmatócitos são interdependentes no processo de encapsulação. Os granulócitos iniciariam o processo, entrando em contato com o invasor e liberando o conteúdo granular; tal exocitose atrairia os plasmatócitos para formar a cápsula. Contudo, também há relatos de cápsulas formadas somente por hemócitos granulares (BREHELIN et al., 1975).

Nossos dados corroboram a idéia de que ambas as células efetuem a resposta defensiva em conjunto. Em todos os materiais analisados (controle e grupo exposto), os dois tipos celulares foram identificados e a observação de aglomerados de hemócitos provavelmente evidencia a atração dessas células por quimiotaxia a partir do material estranho. O fato de haver um maior número de granulócitos em relação aos plasmatócitos pode ser devido à função dos mesmos de estabelecer o primeiro contato com o toxicante; outra possibilidade é que estas células sejam as principais responsáveis pela fagocitose no diplópodo, já que em alguns invertebrados tal função é atribuída, principalmente, a este tipo morfológico (FARALDO; LELLO, 2003). De acordo com Xylander, os granulócitos são realmente as células hemocíticas mais abundantes nos miriápodos (XYLANDER, 2009).

A análise histoquímica revelou a presença de polissacarídeos neutros no citoplasma dos hemócitos de *R. padbergi* e a natureza protéica dos grânulos. Hose et al. (1987), ao estudarem as características citoquímicas dos hemócitos do decápodo *Sicyonia ingentis*, observaram que os depósitos citoplasmáticos de hemócitos agranulares e de um subtipo de hemócitos de grânulos pequenos eram compostos de glicoproteínas, dadas as reações positivas ao PAS, carmim e azul de bromofenol. Da mesma forma, os grânulos foram fixados pelas respectivas técnicas, indicando novamente a presença de glicoproteínas.

Além de granulócitos e plasmatócitos, frequentemente foram observadas células com características intermediárias entre plasmatócitos e granulócitos, verificando-se também a presença de plasmatócitos jovens. Isto indica uma provável diferenciação celular no tecido, onde os plasmatócitos dariam origem aos granulócitos.

De acordo com Gupta (1979; 1985), os pró-hemócitos originam os plasmatócitos, e estes, por sua vez, os granulócitos. Esses últimos seriam células pluripotentes, que dariam origem aos demais tipos celulares. Falleiros et al. (2003) analisaram ultra-estruturalmente os hemócitos da lagarta da broca-da-cana-de-açúcar, *Diatracea saccharalis*, e constataram a presença de células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos, e entre plasmatócitos e granulócitos, corroborando os achados de Gupta (1979; 1985) e sugerindo uma possível diferenciação desses tipos celulares na circulação. Em um trabalho sobre caracterização de hemócitos em espécies de diplópodos, Xylander (2009) comenta que é possível que os granulócitos sejam o produto de transformação de plasmatócitos, devido à observação de formas intermediárias entre esses tipos celulares.

Contudo, muitos autores discordam quanto à origem dos vários tipos de hemócitos e ainda não há uma resposta definitiva se essas células representam variantes morfológicas de um único tipo celular ou se constituem formas distintas e imutáveis (YAMASHITA; IWABUCHI, 2001). No presente trabalho, também não é possível afirmar que plasmatócitos, granulócitos I e granulócitos II representam diferentes estágios de maturação. Entretanto, sugerimos que haja um processo de diferenciação celular no intestino médio de *R. padbergi*, devido às recorrentes observações de células com características intermediárias entre os tipos morfológicos.

## 5. Conclusão

Dois tipos morfológicos de hemócitos puderam ser reconhecidos no intestino médio do diplópodo *R. padbergi* após exposição a substrato contendo lodo de esgoto: granulócitos

(tipo celular predominante, subtipos I e II) e plasmatócitos, além de células com características intermediárias entre eles. A partir dos resultados, acreditamos que os dois tipos celulares atuem em conjunto no processo de defesa em resposta ao lodo, evidenciado pela observação de aglomerações dessas células no tecido, independente da ETE e do tempo de exposição. Sugerimos também a ocorrência de diferenciação celular no intestino médio, em que plasmatócitos originam granulócitos. Além disso, é possível que haja uma migração de células da hemolinfa para o intestino médio, principal local danificado por contaminantes presentes no lodo.

### Agradecimentos

Agradecemos à Cristiane Marcia Miléo, pelo apoio técnico, ao CNPq, FUNDUNESP, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro, e à Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Engenheira Samira Issa e Marcus da Matta, por fornecerem as amostras de lodo utilizadas.

### Referências

- AHEARN, G.A.; MANDAL, P.K.; MANDAL, A. Mechanisms of heavy metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. **J. Comp. Physiol. B**, v.174, p.439-452, 2004.
- BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A Disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.
- BOEIRA, R. C.; LIGO, M. A. V.; DYNIA, J. F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1639-1647, 2002.
- BREHÉLIN, M.; HOFFMANN, J.A.; MATZ, G.; PORTE, A. Encapsulation of implanted foreign bodies in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha*. **Cell Tissue Res.**, v.160, n.3, p.283-289, 1975.
- CAI, Q.Y.; MO, C.H.; WU, Q.T.; ZENG, Q.Y.; KATSOYIANNIS, A.; FÉRARD, J.F. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting process. **Journal of Hazardous Materials**, v.142, p.535-542, 2007.
- CAJARAVILLE, M.P.; OLABARRIETA, I.; MARIGOMEZ, I. *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.35, p.253-260, 1996.
- CAMARGO, O.A.; PIRES, A.M.M.; BETTIOL, W. Lodo na agricultura. **Ciência Hoje**, v.42, n.248, p.68-70, 2008.
- CORAUCCI FILHO, B.; CAMPOS, A.F.; PIRES, M.G.; NASCIMENTO, P.M. FEC pesquisa uso de lodo de esgoto como fertilizante. **Jornal da Unicamp**, ed.237, p.11, 2003.

CORREIA, A.A. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008, 57p.

CORREIA, A.A.; FERREIRA, A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C. Descrição morfológica dos hemócitos do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.1, p.57-61, 2005.

DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Plano Estadual de Recursos Hídricos 2004 - 2007. DAEE, 2006.

FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.2, p.287-294, 2003.

FARALDO, A.C.; LELLO, E. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera, Cuterebridae) larval hemocytes. **Biocell**, v.27, n.2, p.197-203, 2003.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol.**, v.42, p.611-643, 1997.

GILLESPIE, J.P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.429-437, 2000.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air & Soil Pollution**, v.210, n.1-4, p.389-398, 2010.

GREGÓRIO, E.A. Insect hemocytes and the cellular defense reactions. **Acta Microscopica**, v.6, p.23-24, 1997.

GUPTA, A.P. **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge, Cambridge University Press, 1979, 614p.

GUPTA, A.P. **Cellular elements in the hemolymph**. In: KERTUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds). *Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford, Pergamon Press, p.402-444, 1985.

HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdr. Dierk.**, v. 55, n. 1, p. 88-94, 1985.

HOSE, J.E.; MARTIN, G.G.; NGUYEN, V.A.; LUCAS, J.; ROSENSTEIN, T. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull.**, v.173, p.178-187, 1987.

IMAI, G.I. Hemócitos: contagem e aspectos morfológicos em três espécies do gênero *Biomphalaria* (Mollusca, Pulmonata). Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, São Paulo, 1994, 82p.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity en arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p.213-236, 2006.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v.191, p.45-52, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KITAMURA, A.E.; ALVES, M.C.; SUZUKI, L.G.A.S.; GONZALEZ, A.P. Recuperação de um solo degradado com a aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v.32, n.1, 2008.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

MIELLI, A.C.; MATTA, E.M.M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.

NEGREIRO, M.C.C.; ANDRADE, F.G.; FALLEIROS, A.M.F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.4, 293-308, 2004.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, n.3, p.239-246, 2010a.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010b. doi: 10.1007/s11270-010-0666-8

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4<sup>th</sup> ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985.

PECH, L.L.; STRAND, M.R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2053-2060, 1996.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010a. doi: 10.1007/s11270-010-0657-9

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2010b. doi: 10.1007/s10661-010-1645-7

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of**

**Insect Physiology**, v.52, p.417-429, 2006.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.167-172, 2001.

SEILER, G.R.; MORSE, M.P. Kidney and hemocytes of *Mya arenaria* (Bivalvia): normal and pollution-related ultrastructural morphologies. **J. Invertebr. Pathol.**, v.52, p.201-214, 1988.

SILVA, J.E.B.; BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4a, p.689-699, 2002.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.1, p.10-18, 2011.

TZOU, P.; GREGORIO, E.; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.102-110, 2002.

XYLANDER, W.E.R. Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. **Invertebrate Survival Journal**, v.6, p.114-124, 2009.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.325-331, 2001.



## Legendas

**Figura 1.** Localização das ETEs em que foram coletadas os lodos de esgoto. Mapa das Unidades Hidrográficas de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (Fonte: SigRH – Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente – disponível em <http://www.sigrh.sp.gov.br>). Desenho modificado.

**Figura 2A – F.** Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, corado com hematoxilina e eosina (A-D), azul de bromofenol (E) e submetido à técnica de PAS (F). **A.** Grupo controle; **B, C, D e F.** Grupo exposto ao lodo puro da ETE SG por 21 dias; **E.** Grupo exposto ao lodo a 10% da ETE AT-1 por 3 dias.

cg = camada de corpo gorduroso; cm = camada muscular; e = epitélio; h = hemócito; me = membrana externa; CI = célula intermediária entre plasmatócito e granulócito; GR = granulócito; GRI = granulócito I; GRII = granulócito II; PL = plasmatócito; seta em (B) = aglomerado de hemócitos.

**Figura 3A – C.** Micrografias eletrônicas da camada de corpo gorduroso do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* exposto ao lodo a 10% da ETE SG por 3 dias (A) e 21 dias (C) e ao lodo puro da ETE SG por 7 dias (B). **A.** Hemócito granulócito ao lado de uma célula da camada de corpo gorduroso; **B.** Aglomerado de hemócitos; **C.** Granulócitos I e II.

cl = célula da camada de corpo gorduroso com o citoplasma condensado; g = grânulo; n = núcleo; GR = granulócito; GRI = granulócito I; GRII = granulócito II; PL = plasmatócito.

**Figura 4A – C.** Micrografias eletrônicas da camada de corpo gorduroso do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* exposto ao lodo puro da ETE AT-1 por 7 dias (A) e 21 dias (B) e ao lodo puro da ETE AT-2 por 3 dias (C). **A.** Plasmatócito; **B.** Célula com características intermediárias entre plasmatócito e granulócito; **C.** Granulócitos.

g = grânulo; n = núcleo; m = mitocôndria; rer = retículo endoplasmático rugoso.

**Figura 5A – D.** Micrografias eletrônicas da camada de corpo gorduroso do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* exposto por 7 dias aos lodos puros das ETEs SG (A, D) e AT-1 (B, C). **A.** Plasmatócito jovem; **B.** Plasmatócito típico; **C.** Célula com características intermediárias entre plasmatócito e granulócito; **D.** Granulócito típico.

cl = célula da camada de corpo gorduroso; g = grânulo; n = núcleo; v = vacúolo; m = mitocôndria; setas = projeções citoplasmáticas.

Figura 1



Figura 2

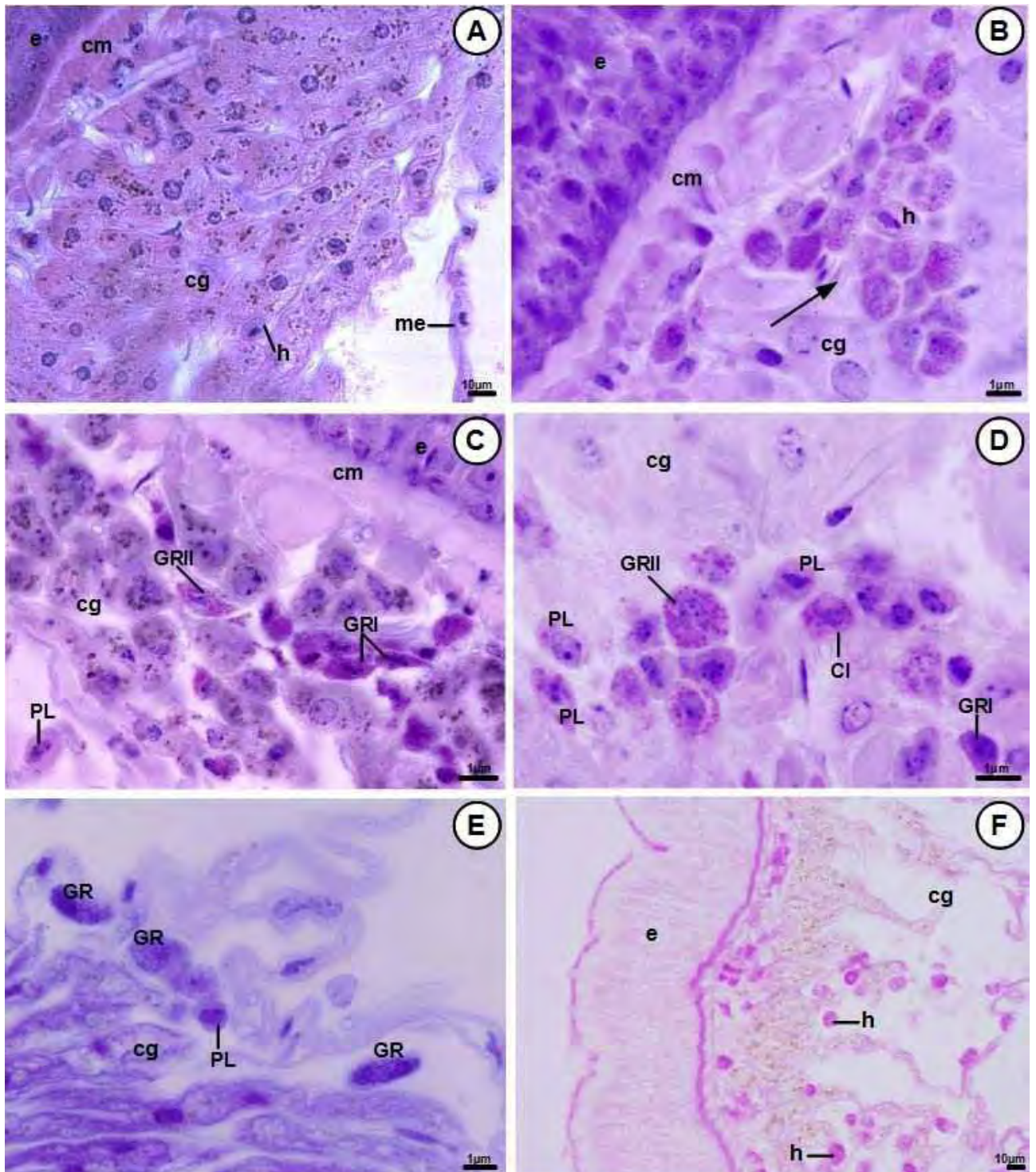


Figura 3

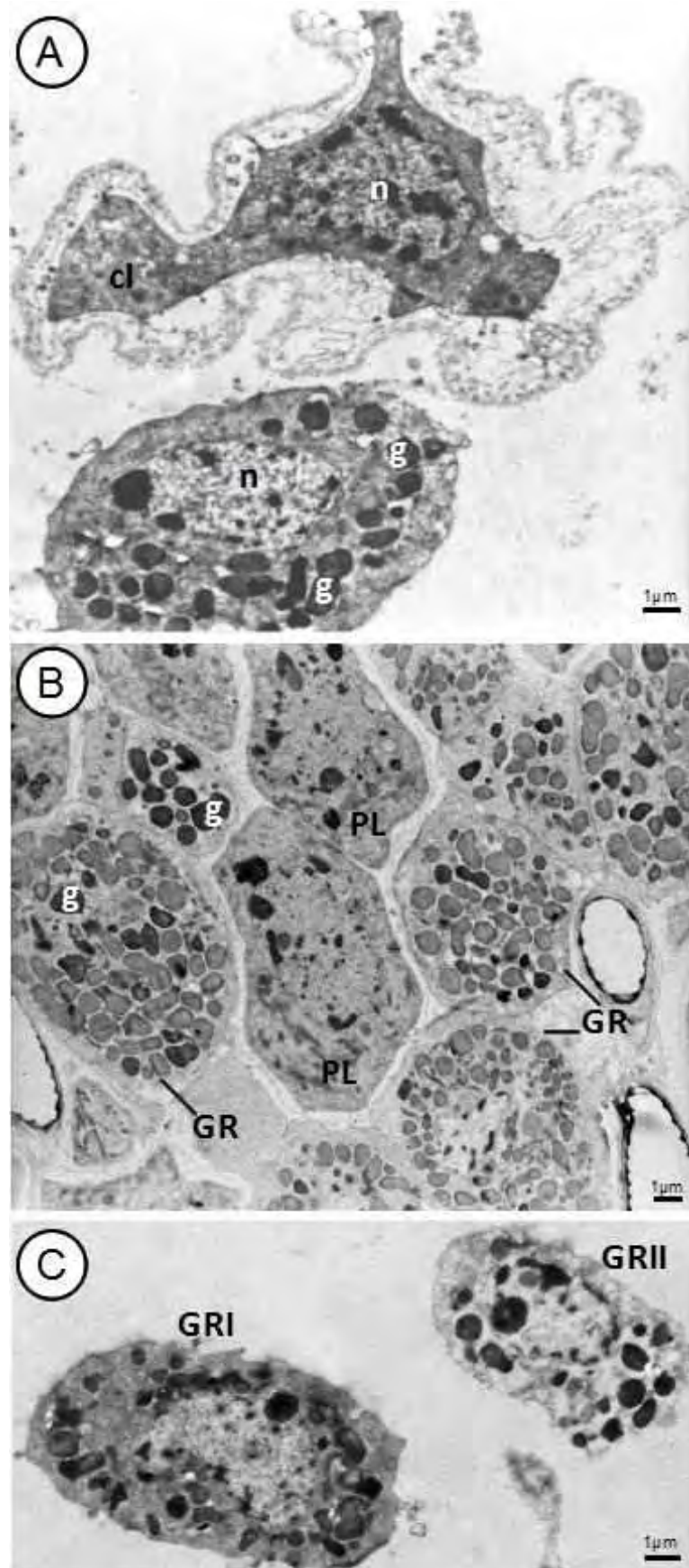




Figura 4

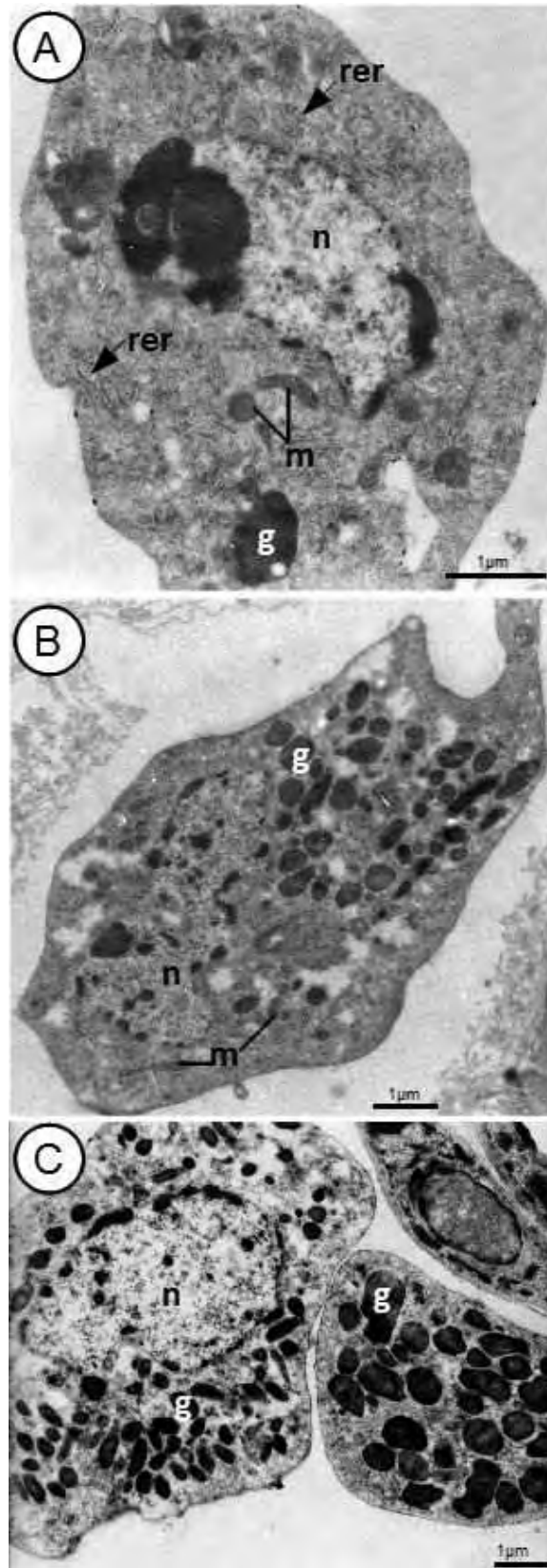
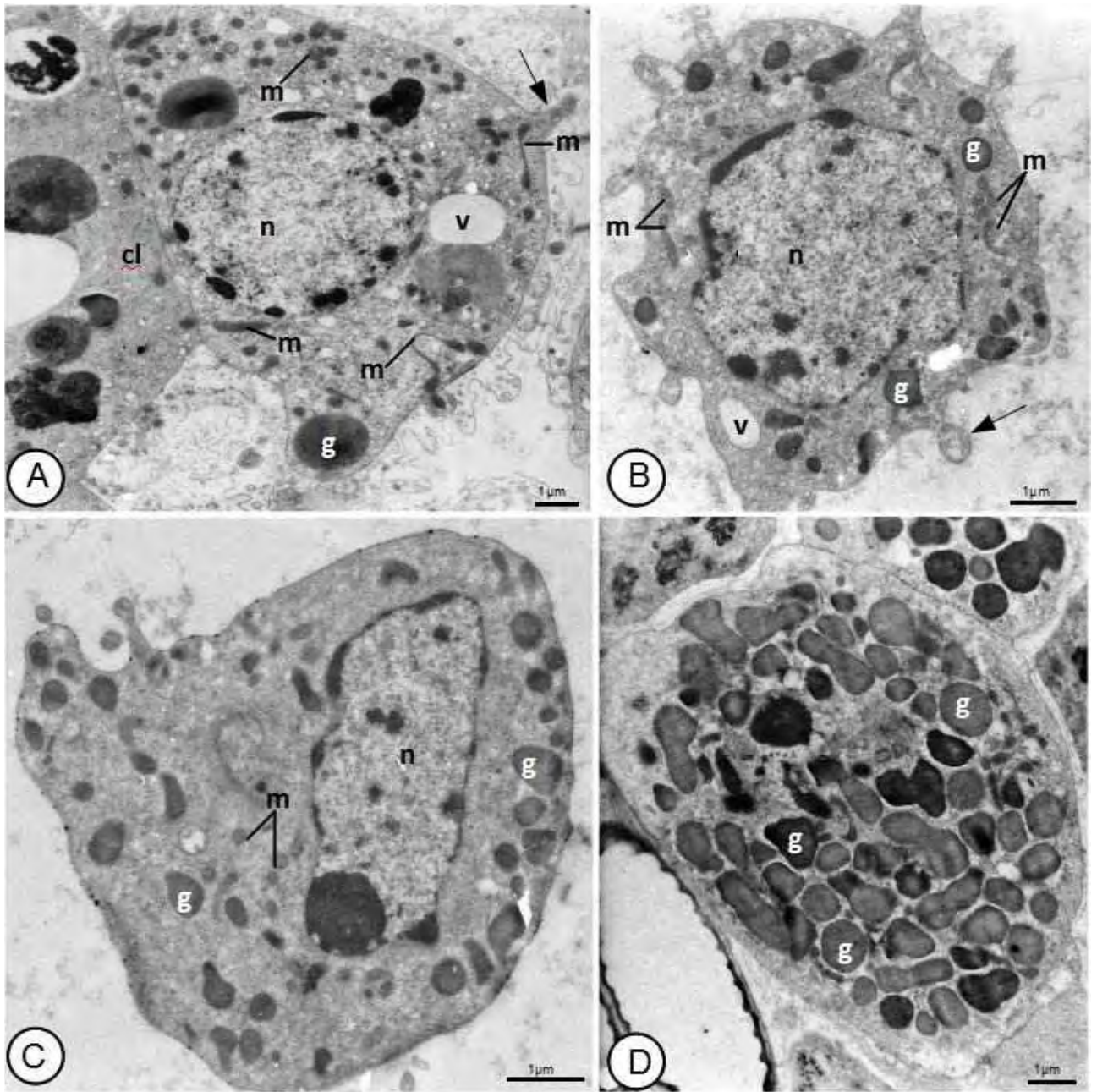


Figura 5



## 6. DISCUSSÃO GERAL

---

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de defesa hemocítica em diplópodos e para que estudos comparativos entre diferentes espécies do grupo sejam feitas, é importante que haja uma classificação morfológica dos hemócitos bem definida e padronizada.

Quando se estuda as células circulantes da hemolinfa não há uma técnica única que permite a exata determinação do tipo de hemócito, mas sim uma combinação de diferentes métodos. Isto leva à necessidade de conhecer os limites de cada método empregado. Como as características estruturais são facilmente observáveis e menos sujeitas a conflitos em relação aos outros critérios de classificação, Ribeiro e Brehélin (2006) propõem que as células sejam primeiramente caracterizadas por sua ultra-estrutura, sob microscopia eletrônica de transmissão, sendo então observadas em microscopia de luz e, por fim, estudadas do ponto de vista comportamental. Van de Braak (2002) enfatiza que a microscopia eletrônica pode ser o primeiro grande passo para se obter uma classificação mais uniforme dos hemócitos.

No presente estudo, tanto na hemolinfa quanto no intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, foram identificados, por meio da ultra-estrutura e da histologia, hemócitos granulócitos e plasmatócitos. Estes dois tipos celulares têm sido considerados, por muitos autores, os principais tipos de hemócitos envolvidos nas respostas de defesa em diferentes organismos, efetuando a fagocitose, encapsulação e nodulação (FALLEIROS; GREGÓRIO, 1995; PECH; STRAND, 1996; GILLESPIE et al., 2000; LAVINE; STRAND, 2002; PEREZ; FONTANETTI, 2010b). Na grande maioria dos estudos que adotam a classificação de Gupta (1985) para os hemócitos, granulócitos e plasmatócitos são as células mais frequentemente observadas em diferentes grupos de invertebrados.

O fato de terem sido observados granulócitos e plasmatócitos em todos os materiais, ou seja, hemolinfa e intestino médio, tanto do grupo controle quanto do grupo exposto ao lodo, pode indicar a necessidade de uma resposta imune eficiente por parte do diplópodo, já que este animal pertence à fauna edáfica, revolvendo várias camadas do solo e entrando em contato com diferentes contaminantes presentes no mesmo. Além disso, provavelmente, estes tipos celulares atuam em conjunto na resposta defensiva, como proposto em vários trabalhos com hemócitos em invertebrados (PECH; STRAND, 1996; GILLESPIE et al., 1997; GREGÓRIO, 1997; LAVINE; STRAND, 2002; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

Em miriápodos, os hemócitos mais numerosos são os granulócitos, seguidos pelos plasmatócitos (XYLANDER; NEVERMANN, 2006; XYLANDER, 2009). No milípede *R.*

*padbergi* também foi observado um maior número de granulócitos, sendo o tipo morfológico mais abundante na hemolinfa e no intestino médio dos animais.

Além de granulócitos e plasmatócitos, também foram identificados pró-hemócitos circulantes na hemolinfa da espécie em estudo. Segundo Jones (1962), estes três tipos morfológicos geralmente são reconhecidos como tipos básicos de hemócitos.

Contudo, os pró-hemócitos não puderam ser observadas por entre as células da camada de corpo gorduroso do intestino médio do diplópodo. De acordo com Andrade et al. (2004), os pró-hemócitos podem ser numerosos, raros ou ausentes, dependendo do estágio de desenvolvimento e do estado fisiológico do animal no momento da observação. Além disso, devido aos pró-hemócitos serem considerados células-tronco, não participando efetivamente dos processos de defesa, acreditamos que tais células podem não ter migrado para o local de injúria, permanecendo na hemolinfa do animal. Diferentemente, granulócitos e plasmatócitos, diretamente envolvidos com a resposta defensiva, podem ter migrado da hemolinfa para o intestino médio dos animais expostos ao lodo, formando várias aglomerações de células no tecido, provavelmente injuriado por contaminantes presentes no resíduo.

De fato, segundo Cajaraville et al. (1996), sob certas condições de estresse, os hemócitos circulantes podem migrar para os diferentes tecidos do organismo. Eles são capazes de responder positivamente a estímulos quimiotáticos, movendo-se da hemolinfa para os tecidos e vice-versa, em direção ao agente invasor, que será posteriormente eliminado (IMAI, 1994). A adesão dos hemócitos a um tecido injuriado faz com que a quantidade destas células na circulação varie consideravelmente (MARUSSIG, 1980).

Outra importante observação no presente trabalho foi a presença de células com características intermediárias entre pró-hemócito e plasmatócito e entre plasmatócito e granulócito. Apesar de não ser possível afirmar que houve uma diferenciação celular, pois, para isso seriam necessárias diferentes metodologias aqui não empregadas, acreditamos que tal diferenciação realmente possa ocorrer.

Observações de células com morfologia intermediária entre tipos de hemócitos têm sido comuns na literatura (RATCLIFFE et al., 1985; GUPTA, 1985; GREGÓRIO, 1997; SILVA et al., 2002; FALLEIROS et al., 2003; XYLANDER, 2009), porém, permanecem ainda muitas controvérsias a respeito dos estágios de diferenciação entre os tipos de hemócitos.

Yamashita e Iwabuchi (2001) confirmaram a pluripotencialidade dos pró-hemócitos ao estudarem a espécie *Bombyx mori*, o bicho-da-seda. Eles demonstraram que em culturas dessas células, aproximadamente 43% dos pró-hemócitos diferenciam-se em plasmatócitos,



granulócitos e esferulócitos.

Falleiros et al. (2003) observaram células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos e entre plasmatócitos e granulócitos no lepidóptero *Diatraea saccharalis*. Além disso, verificaram um decréscimo simultâneo no número de pró-hemócitos e plasmatócitos com o aumento de plasmatócitos e granulócitos, respectivamente. Dados semelhantes aparecem nos trabalhos de Ratcliffe et al. (1985), Gupta (1979, 1985) e Gregório (1997).

Gupta (1985) advoga que os pró-hemócitos originam os plasmatócitos, e estes, os granulócitos. Os granulócitos, por sua vez, dariam origem aos esferulócitos. O autor comenta em um estudo anterior (GUPTA, 1979) que a transformação de um determinado tipo celular em outro pode ocorrer de acordo com a exigência fisiológica do artrópodo.

Entretanto, em um trabalho conduzido por Yamashita e Iwabushi (2001), pró-hemócitos do inseto *Bombyx mori* foram cultivados *in vitro*. Foi observado que 60% das células que não estavam em divisão se diferenciaram em plasmatócitos ou granulócitos, sendo que alguns granulócitos, por sua vez, se diferenciaram em esferulócitos. Dos pró-hemócitos em divisão mitótica, 59,2% das células filhas se diferenciaram em outros tipos de hemócitos (plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos), enquanto o restante gerou novos pró-hemócitos, demonstrando a pluripotência destas células. Os autores sugerem que plasmatócitos e esferulócitos podem ser células totalmente diferenciadas, enquanto granulócitos podem constituir um estágio intermediário de esferulócitos.

Especificamente em diplópodos, Xylander (2009) sugere que plasmatócitos se diferenciem em granulócitos, dada a observação de células com características intermediárias entre eles, na hemolinfa dos milípedes *Chicobolus ssp.* e *Rhapidostreptus virgator*. Por outro lado, Ravindranath (1973), ao estudar os hemócitos do milípede *Thyropygus poseidon*, acredita que os tipos morfológicos identificados na hemolinfa representem linhagens celulares distintas e não a transformação de um tipo celular em outro, contrariando os achados de Xylander e do presente estudo.

De acordo com Pipe et al. (1999), o estudo dos componentes do sistema imune pode fornecer uma medida do nível de estresse dos organismos em decorrência da contaminação ambiental. Neste sentido, a caracterização dos tipos morfológicos de hemócitos e o entendimento das respectivas funções no processo de defesa pode ser uma ferramenta auxiliadora em estudos de biomonitoramento com espécies sentinelas de invertebrados.

## 7. CONCLUSÃO

---

A partir das análises realizadas no presente estudo, concluímos que:

- Três tipos morfológicos de hemócitos puderam ser identificados na hemolinfa do diplópodo *R. padbergi*: pró-hemócitos, granulócitos e plasmatócitos. Os granulócitos foram as células predominantes, podendo ser distinguidos dois subtipos celulares, aqui denominados como granulócito I e granulócito II;
- Dois tipos morfológicos de hemócitos puderam ser identificados por entre as células da camada de corpo gorduroso do intestino médio dos diplópodos (grupo controle e grupo exposto ao lodo): granulócitos e plasmatócitos. Os granulócitos foram as células mais abundantes, sendo também evidenciados granulócitos I e granulócitos II;
- Sugere-se que granulócitos e plasmatócitos tenham migrado da hemolinfa para o intestino médio em resposta à exposição ao lodo, formando aglomerações de células no tecido dos animais expostos, independente da ETE e do tempo de exposição. Como os pró-hemócitos são considerados células-tronco, não participantes dos processos de defesa, podem ter permanecido na hemolinfa, não sendo detectados no intestino médio;
- Provavelmente, ocorre uma diferenciação celular na hemolinfa e no intestino médio do diplópodo em estudo, evidenciada pela presença de células com características intermediárias entre pró-hemócitos e plasmatócitos e entre plasmatócitos e granulócitos.
- Sugere-se também que granulócitos e plasmatócitos atuem em conjunto no processo de defesa em resposta ao lodo de esgoto, sendo atraídos ao local de injúria por quimiotaxia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, A.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol.**, v.71, n.3, p.391-398, 2004.
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3-11, 2000.
- BAUCHAU, A.G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F., eds. **Invertebrate blood cells**, v.2, p.386-420. Academic Press, New York, 1981.
- BERTONCINI, E.I.; MATTIAZZO, M.E. Lixiviação de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto. **R. Bras. Ci. Solo**, v.23, p.737-744, 1999.
- BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A Disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.
- BEYER, W. N.; PATTEE, O. H.; SILEO, L.; HOFFMAN, D. J.; MULHERN, B. M. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. **Environ. Pollut. Ser.**, v. 38, p. 63-86, 1985.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C. H. S. Nossos amigos, os piolhos-de-cobra. **Jornal Verde**, n. 69, p. 8, 1997.
- BOEIRA, R. C.; LIGO, M. A. V.; DYNIA, J. F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1639-1647, 2002.
- BOMBONATO, M.T.; GREGÓRIO, E.A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.12, n.4, p.867-879, 1995.
- BOZZATTO, V.O.; FONTANETTI, C.S. Histoanálise do tubo digestivo de *Rhinocricus padbergi* exposto a substrato contendo lodo de esgoto. Trabalho apresentado no XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Botucatu, 2007.
- BOZZATTO, V.O.; FONTANETTI, C.S. Morfologia do intestino médio de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) como biomarcador de substrato contendo lodo de esgoto. Trabalho apresentado no XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, São José dos Campos, 2008.
- CAI, Q.Y.; MO, C.H.; WU, Q.T.; ZENG, Q.Y.; KATSOYIANNIS, A.; FÉRARD, J.F. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting process. **Journal of Hazardous Materials**, v.142, p.535-542, 2007.
- CAJARAVILLE, M.P.; OLABARRIETA, I.; MARIGOMEZ, I. *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.35, p.253-260, 1996.

CAMARGO, O.A.; PIRES, A.M.M.; BETTIOL, W. Lodo na agricultura. **Ciência Hoje**, v.42, n.248, p.68-70, 2008.

CAMILOTTI, F; MARQUES, M. O.; ANDROLI, I.; DA SILVA, A. R.; JUNIOR, L. C. T.; DE NOBILE, F. O. Acúmulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 284-293, 2007.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p.1-9, 1997.

CARNEIRO, M.E.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius) Koch, 1844 e de *Haemaphysalis* sp. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.3, n.2, p.139-145, 2001.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.116-126, 2004.

COLES, J.A.; FARLEY, S.R.; PIPE, R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.22, p.59-65, 1995.

CORREIA, A.A. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008, 57p.

CORREIA, A.A.; FERREIRA, A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C. Descrição morfológica dos hemócitos do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.1, p.57-61, 2005.

CORAUCCI FILHO, B.; CAMPOS, A.F.; PIRES, M.G.; NASCIMENTO, P.M. FEC pesquisa uso de lodo de esgoto como fertilizante. **Jornal da Unicamp**, ed.237, p.11, 2003.

DAEE - DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Plano Estadual de Recursos Hídricos 2004 – 2007**. São Paulo: DAEE, 2006.

DALLINGER, R.; BERGER, B.; BIRKEL, S. Terrestrial isopods: useful biological indicators of urban metal pollution. **Oecologia**, v.89, p.32-41, 1992.

DANGERFIELD, J.M.; MILNER, A.E. Millipede fecal pellet production in selected natural and managed habitats of southern Africa: Implications for litter dynamics. **Biotropica**, v. 28, n. 1, p. 113-120. 1996.

DYNIA, J. F.; BOEIRA, R. C.; DE SOUZA, M. D. Nitrato no perfil de um latossolo vermelho distroférico cultivado com milho sob aplicações sequenciais de lodo de esgoto. In: **Lodo de Esgoto: Impacto Ambiental do Uso Agrícola**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.

ELLIOT, H. A.; LIBERRATY, M. R.; HUANG, C. P. Effect of iron oxide removal on heavy

metal sorption by acid subsoils. **Water, Air, Soil Pollution**, Dordrecht, v. 37, n. 3/4, p. 379-389, 1986.

FALLEIROS, A.M.F. Células sanguíneas de *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae): estudo citoquímico ultraestrutural e à microscopia de varredura. Tese, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 1995.

FALLEIROS, A.M.F.; GREGÓRIO, E.A. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.12, n.4, p.751-758, 1995.

FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.2, p.287-294, 2003.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Arthropoda Selecta**, Russia, v.7, n.4, p.257-264, 1998.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v.11, n.2, p.135-142, 2002.

FARALDO, A.C. Hemócitos de Diptera economicamente importantes: análise qualitativa, quantitativa e funcional. Dissertation, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2000.

FARALDO, A.C.; LELLO, E. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera, Cuterebridae) larval hemocytes. **Biocell**, v.27, n.2, p.197-203, 2003.

FIEST, L. C.; ANDREOLI, C. V.; MACHADO, M. A. M. Efeitos da Aplicação do Lodo de Esgoto nas Propriedades Físicas do Solo. **SANARE**, v. 9, n. 9, Janeiro/ Junho – 1998.

FONTANETTI, C.S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23, n.3-4, p.487-493, 2006.

GALDOS, M. V.; DE MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A. Atributos químicos e produção de milho em um latossolo vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 28, p. 569-577, 2004.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol.**, v.42, p.611-643, 1997.

GILLESPIE, J.P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.429-437, 2000.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut

of individuals maintained in substratum containing sewage sludge. **Water, Air & Soil Pollution**, v.210, n.1-4, p.389-398, 2010.

GRÄFF, S.; BERKUS, M.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H.R. Metal accumulation strategies in saprophagous and phytophagous soil invertebrates: a quantitative comparison. **BioMetals**, v.10, p.45-53, 1997.

GREGÓRIO, E.A. Insect hemocytes and the cellular defense reactions. **Acta Microscopica**, v.6, p.23-24, 1997.

GUPTA, A.P. **Insect hemocytes**: development, forms, functions and techniques. Cambridge, Cambridge University Press, 1979, 614p.

GUPTA, A.P. **Cellular elements in the hemolymph**. In: KERTUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds). *Comprehensive insects physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford, Pergamon Press, p.402-444, 1985.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HENDRIKS, A. J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environ. Pollut.**, v. 113, p. 385-393, 2001.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: **Arachnida and Myriapoda**. Ed J. Adis, p.505-533. Sofia-Moscow: Pensoft, 2002.

HOPKIN, S. P. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. **Functional Ecology**, v. 4, p. 321-327, 1990.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. Oxford University Press, New York, 1992, 233p.

HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdr. Dierk.**, v. 55, n. 1, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S.P.; HAMES, C.A.C.; BRAGG, S. Terrestrial isopods as biological indicators of zinc pollution in the Reading area, South East England. **Monit Zool Ital**, v.4, p.477-488, 1989.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: CAMATINI, M. (ed.). **Myriapod Biology**, p. 127-134. Academic Press: London, 1979.

IMAI, G.I. Hemócitos: contagem e aspectos morfológicos em três espécies do gênero *Biomphalaria* (Mollusca, Pulmonata). Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, São Paulo, 1994, 82p.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p.213-236, 2006.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K.

Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v.191, p.45-52, 2000.

JONES, J.C. Current concepts concerning insect hemocytes. **Am. Zoologist**, v.2, p.209-246, 1962.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KIME, R.K.; GOLOVATCH, S.I. Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). **Biol. J. of the Lin. Soc.**, London, v.63, p.333-349, 2000.

KITAMURA, P. C. Prefácio. *In: Lodo de Esgoto: Impacto Ambiental do Uso Agrícola*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.

KITAMURA, A.E.; ALVES, M.C.; SUZUKI, L.G.A.S.; GONZALEZ, A.P. Recuperação de um solo degradado com a aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v.32, n.1, 2008.

KÖHLER, H.R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. *In: MEYER, E.; THALER, K.; SCHEDL, W. (eds). Advances in Myriapodology*. Innsbruck: Ber nat-med Ver. Suppl., v.10, p.257-267, 1992.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkess**, v.3, n.2, p.109-127, 1998.

KÖLHER, H. R.; KÖRTJE, K. H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v. 8, p. 37-46, 1995.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

MALTA, T.S. Aplicação de lodos de Estações de Tratamento de Esgotos na agricultura: estudo do caso do município de Rio das Ostras – RJ. Dissertação de Mestrado em Engenharia Sanitária e Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 57p., 2001.

MANDATO, C.A. Modulators of the insect cellular immune response. Tese, University of Waterloo, 1998.

MARUSSIG, A.C. Elementos figurados da hemolinfa de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, São Paulo, 1980, 21p.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R. A.; LEITE, S. A. S. Efeitos de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 18, p. 449-455, 1994.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P.; CINTRA, A.A.D. Uso de resíduos em

hortaliças e impacto ambiental. **Hortic. Bras.**, v.18, p.67-82, 2000.

MIELLI, A.C.; MATTA, E.M.M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.

NAKAMURA, K.; TAIRA, J.; HIGA, Y. Internal elements of the millipede *Chamberlinius hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae). **Appl. Entomol. Zool.**, v. 40, n. 2, p. 283-288, 2005.

NASCIMENTO, C. W. A.; BARROS, D. A. S.; MELO, E. E. C.; OLIVEIRA, A. B. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 28, p. 385-392, 2004.

NEGREIRO, M.C.C.; ANDRADE, F.G.; FALLEIROS, A.M.F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.4, 293-308, 2004.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, n.3, p.239-246, 2010a.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010b. doi: 10.1007/s11270-010-0666-8

NOGAROL, L.R.; SOUZA, R.B.; FONTANETTI, C.S. Diplópodos como bioindicadores de substratos contendo lodo de esgoto: comportamento, sobrevivência e verificação da resposta à exposição aguda no intestino médio. Trabalho apresentado no XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, São José dos Campos, 2008.

PATHAK, J.P.N. Cell-mediated defence reactions in insects. In: PATHAK, J.P.N. (ed.). **Insect Immunity**. Índia: Kluwer Academic Publishers, p.47-58, 1993.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4<sup>th</sup> ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985.

PECH, L.L.; STRAND, M.R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2053-2060, 1996.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010a. doi: 10.1007/s11270-010-0657-9

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2010b. doi: 10.1007/s10661-010-1645-7

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; CARISSAN, F.M.M.; RAMANATHAN, K. Copper induced



immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.46, p.43-54, 1999.

QUINTANA, N.R.G. Análise econômica da aplicação de biossólido na agricultura. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 111p., 2006.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGEALD, S.W.; RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, v.97, p.183-350, 1985.

RAVINDRANATH, M. H. The Hemocytes of a Millipede, *Thyropygus poseidon*. **J. Morph.**, v.141, p. 257-268, 1973.

READ, H.J.; MARTIN, M.H. A study of millipede communities in woodlands contaminated with heavy metals. In: MINELLI, A.; BRILL, E.J. (eds). **Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology**, 1990.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.417-429, 2006.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.167-172, 2001.

SILVA, C.C.A. Activation of prophenoloxidase and removal of *Bacillus subtilis* from the hemolymph of *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). **Neotropical Entomology**, v.31, n.3, p.487-491, 2002.

SILVA, J.E.B.; BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4a, p.689-699, 2002.

SILVA, C. A.; RANGEL, O. J. P.; BETTIOL, W.; MANZATTO, C. V.; BOEIRA, R. C.; DYNIA, J. F. Dinâmica de metais pesados em latossolo adubado com lodo de esgoto e em plantas de milho. In: **Lodo de Esgoto: Impacto Ambiental do Uso Agrícola**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.

SOUSA, C.M.; FONTANETTI, C.S. Resposta tissular no intestino médio de *Rhinocricus padbergi* em exposição a lodo de esgoto. Trabalho apresentado no VIII Simpósio de Iniciação Científica, Rio Claro, 2008.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.1, p.10-18, 2011.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWING, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for hazardous substances. **Fur angewandte Zool.**, v.78, p.277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R.; HENDERSON, I. F.; MARTIN, A. P. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Pestic. Sci.**, v. 55, p. 55-61, 1999.

TSUTIYA, M.T. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das Estações de Tratamento de Esgotos. *In*: Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro: ABES, p. 753-761, 1999.

TSUTIYA, M.T. Alternativas de disposição final de biossólidos. *In*: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A. et al. Biossólidos na agricultura. São Paulo, SABESP, 468p., 2001.

TZOU, P.; GREGORIO, E.; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.102-110, 2002.

VAN DE BRAAK, K. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Tese (Doutorado) - Wageningen University, 2002, 159p.

VELTMAN, K.; HUIJBREGTS, M.A.J.; VIJVER, M.G.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; HOBBELEN, P.H.F.; KOOLHAAS, J.E.; VAN GESTEL, C.A.M.; VAN VLIET, P.C.J.; HENDRIKS, A.J. Metal accumulation in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Model predictions compared to field data. **Environmental Pollution**, v.146, p.428-436, 2007.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S. Utilização do lodo de esgoto como fonte de fósforo na cultura de soja. **EMBRAPA**. Circular Técnica-6, Jaguariúna-SP, junho, 2004.

XYLANDER, W.E.R. Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. **Invertebrate Survival Journal**, v.6, p.114-124, 2009.

XYLANDER, W.E.R.; NEVERMANN, L. Haemocytes in Diplopoda and Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda) – types, structures, and numbers. **Scand. J. Entomol.**, v.53, p.195-210, 2006.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.325-331, 2001.

YOUNG, J.S.; PEARCE, J.B. Shell disease in crabs and lobsters from New York Bight. **Marine Pollution Bulletin**, v.6, p.101-105, 1975.