
Ciências Biológicas - Noturno

Cristina Moreira de Sousa

**Tubo digestório de *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda):
estrutura e função**



Rio Claro
2011

Cristina Moreira de Sousa

**Tubo digestório de *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda):
estrutura e função**

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Rio Claro
Outubro-2011

574.82 Sousa, Cristina Moreira de
S725t Tubo digestório de *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda):
estrutura e função / Cristina Moreira de Sousa. - Rio Claro :
[s.n.], 2011
82 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas Noturno) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Histologia. 2. Milípede. 3. Digestão. 4. Ultra-estrutura.
5. Histoquímica. I. Título.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por me conceder coragem e sabedoria para lidar com todas as situações com as quais me deparei no decorrer de minha vida nesta trajetória, além é claro de colocar as mais pessoas mais imprescindíveis para me ajudar a realizar este tão esperado sonho.

Agradeço à minha mãe; ao meu paizinho querido, que já cumpriu sua missão entre nós, e que tanto lutou comigo para que este sonho fosse concretizado; que em momento algum me deixou desanimar, que foi meu alicerce, meu tudo... e eu sei que continuará me dando força para seguir em frente onde quer que esteja

Meus agradecimentos à UNESP, Rio Claro, por me fornecer toda estrutura necessária para o desenvolvimento dos meus trabalhos e para minha formação como profissional. Ao PROEX, pela bolsa de apoio ao estudante concedida e à FAPESP, também por me conceder bolsa de estudos.

Estes cinco anos de Universidade só foram possíveis graças também às pessoas maravilhosas que tive a honra de conhecer e trabalhar. Então é claro que não posso deixar de agradecer primeiramente a pessoa que me acolheu de braços abertos nesta universidade, mesmo sem eu saber nada, no meu primeiro mês de curso... jamais vou me esquecer daquele dia em que apareci na sua sala Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, e desde então você foi mais que uma orientadora, foi minha amiga, minha mãe e o melhor exemplo de profissional que eu tive, tenho e terei sempre....o meu muitíssimo obrigada POR TUDO, por ter uma paciência imensa comigo, pelas risadas, pelos conselhos...rsrsrs ah os seus conselhos hein....

Agradeço aos técnicos que tanto me ajudaram e me ensinaram tudo com tanto carinho: Gerson Souza, Monika Iamonte e Antônio Yabuki, muito obrigada por salvarem minha vida todas as vezes que os resultados não davam certo... ou seja, quase sempre...rsrsr.

À Cristiane Miléo (Cris) por toda ajuda com minhas pranchas e por se tornar minha amiga...

Vocês foram meus anjos da guarda.

Agradeço a todos orientados da Prof^a Carmem, que se tornaram meus melhores amigos, uma verdadeira equipe.

Agradeço também a todos os meus amigos de classe.

SUMÁRIO

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	07
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 INFESTAÇÃO POR DIPLÓPODO.....	11
2.2 INTESTINO ANTERIOR.....	14
2.3 GLÂNDULAS SALIVARES.....	15
2.4 INTESTINO MÉDIO.....	16
2.5 INTESTINO POSTERIOR.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
4. METODOLOGIA.....	21
5. RESULTADOS.....	24
ARTIGO 1.....	25
ARTIGO 2.....	39
ARTIGO 3.....	59
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

RESUMO

Diplópodos são macro-artropodes de solo que representam um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do ecossistema, uma vez que se alimentam de matéria orgânica em decomposição e em virtude disso promovem o enriquecimento, aeração e humidificação do solo. Encontrados em locais úmidos, com pouca luminosidade, normalmente sob rochas e troncos, os diplópodos possuem um exoesqueleto bastante resistente, impregnado por sais de cálcio, e como resultados disso apresentam poucos ou nenhum inimigo natural. Por outro lado, as glândulas de defesa também contribuem com a ausência de predadores, pois quando estes animais são ameaçados liberam uma secreção de cheiro forte e desagradável que os torna impalatáveis. Não são observadas populações numerosas em diplópodos, porém explosões populacionais podem ocorrer por desequilíbrios ambientais, mudanças climáticas e pela utilização de pesticidas que podem eliminar possíveis competidores. Neste sentido, o milípede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi e Fontanetti, 2006, tem apresentado pontos de infestação em centros urbanos do estado de São Paulo, causando muitos transtornos à população humana. Por se tratar de uma espécie recém descrita, pouco se conhece de sua biologia e morfologia. Deste modo foi intuito deste trabalho, estudar a estrutura e função do tubo digestório da espécie *U. atrobrunneus*, por meio de técnicas histológica, histoquímica e ultra-estrutural. A análise permitiu verificar a semelhança do tubo digestório de *U. atrobrunneus* com as descrições feitas para outras espécies. O intestino anterior é composto por um epitélio simples formado de células de diferentes alturas, recoberto por uma íntima cuticular, apoiado a uma delgada membrana basal, seguido de uma camada muscular bem desenvolvida e uma membrana externa; ladeando todo o intestino anterior ocorre um par de glândulas salivares. O intestino médio apresenta um epitélio pseudoestratificado, apoiado por uma membrana basal espessa, seguido de uma camada muscular, uma camada de células hepáticas, uma musculatura distribuída de forma descontínua, revestido por uma membrana externa; esta porção é caracterizada pela ausência da íntima cuticular. O intestino posterior é caracterizado pelo reaparecimento da íntima cuticular; seu início é marcado por uma estrutura curta e dilatada, denominada piloro; após o piloro observa-se uma região chamada de íleo/colo, seguida da região retal. A estrutura geral do intestino posterior é semelhante nas três porções; apresenta um epitélio colunar simples, membrana basal, camada muscular e membrana externa. A íntima cuticular de todo o intestino posterior é provida de microespinhos. A estrutura observada permite corroborar os dados encontrados na literatura quanto as funções desempenhadas por cada região. O intestino anterior inicia o processo de digestão com o

auxílio das glândulas salivares; o intestino médio é o local onde de fato ocorre a digestão e assimilação de substâncias, participando também da detoxicação do organismo; e o intestino posterior é responsável por impedir o movimento anterior do bolo fecal e reabsorver fluídos e íons da matéria fecal. Após a análise minuciosa do intestino médio, sugere-se a denominação de “camada de células hepáticas” para a descrição da chamada “camada de corpo gorduroso do intestino médio”; estas células formam uma camada contínua ao longo de todo o intestino médio dos milípedes. Acredita-se que um maior conhecimento sobre a espécie possa oferecer possíveis subsídios para futuros investimentos no desenvolvimento de ferramentas no controle eficaz de pragas urbanas.

Palavras-chaves: histologia, milípede, digestão, ultra-estrutura, histoquímica.

ABSTRACT

Millipedes are macro-arthropods of soil which perform a important role in maintaining the balance of the ecosystem, since they feed on decaying organic matter and because they promotes the soil enrichment, aeration and humidification. These animals are usually found in humid with low light places, under rocks and trunks. The diplopods exoskeleton is much resistant and impregnated with calcium salts. Due the secretion of defense, with strong and unpleasant smell, the animals of this class have few or no predators. Large diplopods populations are not observed, but explosions population can occur for unbalances enviromnmental, by climate change and by use of pesticides that may eliminate potential competitors. In this sense, the millipede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006, has presented points of infestation in urban centers of Sao Paulo state, causing many disorders of the human population. Because it is a newly described species, little is known of its aspects biological and morphological. Thus, the purpose of this study was to describe the structure and function of the digestive tract of the species *U. atrobrunneus* by means of histological, histochemistry and ultrastructural techniques. The results demonstrated that the digestive tract of *U. atrobrunneus* is similar to the descriptions given for other species. The foregut consists of a simple epithelium, composed of cells of different heights, covered by a cuticular intima, leaning on a thin basal membrane, followed by a well-developed muscular layer and an external membrane, around the foregut have a pair of salivary glands. The midgut epithelium has a pseudostratified, supported by a thick basal membrane, followed by a muscular layer and a layer of hepatic cells. The muscle is distributed unevenly coated with an external membrane, this portion is marked by the absence of cuticular intima. The hindgut is characterized by the reappearance of the cuticular intima; its beginning is marked by a short and dilated structure, called the pylorus, after the pylorus there is a region called the ileum / colon, followed by the rectum. The overall structure of the hindgut is similar in three parts, presents a simple columnar epithelium, basal membrane, muscle layer and external membrane. The cuticular intima of the hindgut is composed by microspines. The observed structures and the functions performed by each region of the digestory tube are similar with the findings in the literature. The foregut begins the digestion process with the help of the salivary glands; the midgut is the site where in fact occurs digestion and assimilation of substances, also participating in the detoxification of the animal body; and the hindgut is responsible for prevents anterior movement of faecal matter. After detailed analysis of the midgut, it is suggested the name "hepatic cells layer" to describe the so-called "fat body

layer". These cells form a continuous layer throughout the midgut of millipedes. It is believed that a better understanding of the species may provide insights for future investments in the development of tools in effective control of potential urban plague.

Keywords: histology, millipede, digestion, ultrastructure, histochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Os antigos Myriapoda compreendem quatro classes: Pauropoda, Diplopoda, Symphyla e Chilopoda. Os diplópodos são conhecidos geralmente como milípedes, em alusão ao número de pernas que possuem, e mais vulgarmente como piolho-de-cobra, emboás, gongolô, etc. Esses animais possuem hábitos predominantemente noturnos, evitam a luz e vivem sob folhas, rochas, troncos e alguns habitam cavernas e ninhos de formigas e cupins. Poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou em ambiente semi-aquático (KIME; GOLOVATCH, 2000).

Dotados de um corpo cilíndrico com 25 a 100 segmentos, com cutícula geralmente impregnada com sais de cálcio, mas sem epicutícula cerosa, o exoesqueleto da maioria dos diplópodos é fortemente calcificado. Como ocorre nos demais miriápodos, o corpo é dividido em uma cabeça e corpo multissegmentado; externamente, o tronco é constituído por uma série de anéis cuticulares que parecem segmentos. A maior parte dos anéis é constituída de diplossegmentos derivados da fusão entre dois segmentos durante o desenvolvimento. Grande parte dos diplossegmentos apresenta dois pares de pernas, de onde deriva o nome Diplopoda (RUPPERT; BARNES, 2005).

Presentes em todas as regiões zoogeográficas, os diplópodos concentram-se principalmente na faixa tropical. Foram descritas cerca de 10.500 espécies, sendo as faunas dos Estados Unidos e da Europa as melhores conhecidas. Segundo Golovatch et al. (1995) a estimativa para o grupo é de cerca de 80.000 espécies, sendo esta a terceira maior classe de Arthropoda, depois de Insecta e Arachnida (GOLOVATCH, 1997); acredita-se que menos de 10% das espécies brasileiras foram descritas.

Em cada segmento estes animais apresentam um par de glândulas repugnatórias; quando são ameaçados secretam uma substância tóxica, de cheiro forte e desagradável. Uma diversidade de compostos tem sido identificada nas diferentes ordens de milípedes, incluindo benzoquinonas e hidroquinonas, fenóis, ácido benzóico, benzaldeídos e alcalóides (EISNER et al., 1998; DEML; HUTH, 2000; KUWAHARA et al., 2002; ARAB et al., 2003). Como a composição da secreção varia conforme a espécie foram identificados também iodo, cloro e cianeto; este último é formado quando necessário pela mistura entre um precursor atóxico e uma enzima; quando liberado, a reação tem o odor de amêndoas amargas e é tóxico para invertebrados e repelentes para pequenos vertebrados (KUWAHARA et al., 2002; RUPPERT; BARNES, 2005).

Em humanos essas secreções defensivas podem causar reações variadas na pele (FIZPATRICK et al., 1993). Nenhuma morte humana atribuída a milípedes foi documentada até o momento e é improvável que a exposição de crianças a essas secreções possa ser fatal; acidentes como queimaduras com esses animais já foram descritos (GIRARDIN; STEVESON, 2002).

O tubo digestório dos milípedes consiste num tubo reto que desemboca no ânus, dividindo-se em três porções diferentes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Com exceção do intestino médio, o tubo digestório é revestido internamente por uma cutícula. Glândulas salivares encontram-se ladeando o intestino anterior e são responsáveis pela produção de secreção que lubrifica o alimento e, provavelmente, pode conter enzimas digestivas.

A alimentação destes animais consiste de detritos em geral, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos, além de relativa quantidade de matéria mineral do solo (SCHUBART, 1942). Deste modo, este grupo é considerado importante na dinâmica do solo, provocando maior aeração e enriquecimento da matéria orgânica nele presente. Nos desertos, os milípedes sobrevivem consumindo detritos orgânicos que se aglomeram nas bases das plantas (CRAWFORD et al., 1987). Alguns milípedes chegam a comer plantas vivas, mas isso geralmente se consiste de material macio e facilmente digerível, tais como briófitas (BAILEY; DE MENDONCA, 1990), brotos novos, ou raízes finas.

Alguns milípedes têm uma dieta mais especializada. O milípede *Polyxenus lagurus* alimenta-se de algas que crescem nos troncos das árvores (EISENBEIS; WICHARD, 1987). Algumas poucas espécies são carnívoras (HOFFMAN; PAYNE, 1969) e várias delas se alimentam de restos de animais mortos, incluindo caramujos e lesmas (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 1967).

Os milípedes evitam alimentos que possam envenená-los. Hopkin et al. (1985) e Read e Martin (1990) descobriram que os milípedes evitam comer alimentos que estejam contaminados com zinco, cádmio e chumbo. Entretanto, isso não significa necessariamente que os milípedes possuam receptores que respondam especificamente a níveis tóxicos de zinco, cádmio e chumbo em sua dieta. Uma explicação mais provável é que eles simplesmente evitam comer qualquer coisa que tenha gosto ruim. Sendo assim, em experimentos de toxicidade ou no campo, os milípedes podem preferir morrer de fome pela rejeição de alimentos contaminados do que serem mortos diretamente pelos níveis tóxicos de poluição (GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Embora estes animais apresentem poucos inimigos naturais devido às dificuldades que eles proporcionam para sua captura e manipulação e, normalmente, não apresentem populações numerosas, eles podem por algumas razões apresentar certo desequilíbrio populacional. Muitos casos já foram relatados nesse sentido, onde diplópodos tornaram-se pragas, destruindo plantações ou infestando residências humanas. Recentemente o milípede *U. atrobrunneus* tem ocasionado este tipo de problema no estado de São Paulo (FONTANETTI et al., 2010).

Nesse sentido o estudo da espécie *U. atrobrunneus* viabiliza o conhecimento de sua biologia, servindo de auxílio para posterior controle da mesma quando em expansão populacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INFESTAÇÃO POR DIPLÓPODO

Diplópodos normalmente não apresentam populações muito numerosas, a não ser sob condições de desequilíbrio ambiental que favoreça sua proliferação. A utilização de adubação orgânica, por exemplo, aumenta as chances de uma explosão populacional de algumas espécies, bem como o depósito de lixo oriundo de podas de árvores e matos, que oferecem alimento em abundância e abrigo para estes animais.

Diante dos mecanismos de defesa que os diplópodos apresentam como as glândulas repugnatórias e a presença de sais de cálcio no tegumento que os tornam muito resistentes, estes animais dificilmente são capturados por predadores, pois são poucos ou nenhum inimigo natural que apresentam, além de serem praticamente impalatáveis.

Apesar do papel de suma importância que diplópodos apresentam na decomposição de processos naturais em ecossistemas terrestres, muitos trabalhos que tratam da importância econômica dos milípedes dão ênfase ao seu status de pragas.

Brade-Birks (1929; 1930) comentou que, embora diplópodos sejam benéficos, também são prejudiciais e isso parece ser um consenso de opiniões entre os que trabalham com plantas cultivadas. Em comparação com os insetos, seus efeitos econômicos em escala global são negligenciáveis; os tipos de perturbações podem ser manifestados em duas maneiras: primeiro como alimentadores nas culturas e segundo, quando eles ocorrem em grandes agregações especialmente em casas.

Foram feitas várias reclamações de milípedes causando danos às lavouras; a maioria dos relatos são na cultura de beterraba e batata, mas morango, pepino, pomares de frutos e as flores têm sido relatados como alvos para os milípedes *Brachydesmus superus*, *Oxidus gracilis* e vários outros blaniulídeos (Julida) em regiões temperadas (MAFF, 1984). Na África, o algodão e o amendoim são consumidos por diplópodos espirostreptídeos e os números, às vezes, podem atingir proporções epidêmicas.

Cloudsley-Thompson (1950) afirma que entre 1944 e 1949, mais de 100 casos de danos causados por milípedes foram registrados por entomologistas da Grã-Bretanha, 90% destes casos atribuídos ao milípede *Blaniulus guttulatus*, em sua maioria em culturas de batata ou de beterraba. De acordo com Biernaux (1966) danos deste tipo em uma plantação de beterraba na Bélgica em 1965, causou uma diminuição de 22% em peso total da safra e uma redução de 25% em peso de açúcar produzido; deste modo, milípedes podem ter importância econômica local considerável.

Explosões populacionais com diplópodos podem ser decorrentes de desequilíbrios no meio ambiente bem como as mudanças climáticas e a utilização de pesticidas, que também pode eliminar possíveis competidores. Em virtude disso, nos últimos anos, as migrações e explosões populacionais de milípedes, bem como infestações em centros urbanos têm se tornado comum e isso têm atraído atenção de pesquisadores (NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 2002; FONTANETTI et al., 2010).

Kania e Tracz (2005) realizaram estudos sobre a expansão populacional de diplópodos na Polônia e Europa, bem como em outras regiões do mundo. Os autores propuseram quatro possíveis razões para a ocorrência do aumento no número de indivíduos de *Ommatoiulus sabulosus*: 1- fatores climáticos; 2- abundância de alimento no ambiente, procura por novos recursos alimentares e competição com outra espécie por alimento; 3- procura por lugares para depositar seus ovos; 4- procura por lugares seguros para passar o inverno.

Fenômenos desta natureza, no Brasil, foram relatados por Boccardo et al. (1997; 2002); nos anos 90 foi observada uma explosão populacional do milípede *Plusioporus setiger* (Spirostreptida: Spirostreptidae) em plantações de café na região do Alto do Paranaíba, MG (18° 37' – 19° 00' S; 46° 52' – 47° 30' W), uma região de cerrado, desflorestada nos anos 70 para cultura de café (BOCCARDO et al., 1997). Com o propósito de controlar estes surtos populacionais, os agricultores utilizaram agrotóxicos organofosforados, carbamatos e piretróides, porém não obtiveram sucesso; segundo Boccardo e Fernandes (2000), isso se deve ao fato de que os diplópodos, principalmente na fase adulta, têm um exoesqueleto calcificado rígido que interfere na penetração de produtos aplicados topicamente.

Sendo assim há mais de uma problemática a se preocupar, pois além de se fazer necessária a adoção de outras formas de aplicação e utilização de defensivos eficientes, é necessário principalmente, o conhecimento das dosagens que acarretem em menor risco ambiental e à saúde humana. Esta é uma grande preocupação para os pesquisadores, uma vez que o controle químico de “pragas” de plantas cultivadas torna praticamente impossível prever o real impacto que os produtos químicos poderão ocasionar em longo prazo no ambiente.

Em virtude disso, têm aumentado as pesquisas em busca de alternativas para o controle de “pragas” com produtos que possam substituir os agrotóxicos tradicionais por outros naturais, biodegradáveis e de menor impacto ambiental. Um exemplo de estudo é a utilização de plantas da família Piperaceae, as quais apresentam propriedades inseticidas. Devido às características biológicas dos diplópodos, tais como a presença de um exoesqueleto rígido e calcificado, a utilização de métodos de aplicação por contato é dificultada, sugeriu-se então, a utilização de iscas tóxicas contendo extrato etanólico bruto de frutos da pimenta-do-reino como alternativa viável no controle deste grupo animal (ROMÃO et al., 2008).

A infestação do milípede *Urostreptus atrobrunneus* em Campinas/SP durante as estações de primavera e verão por três anos consecutivos causou transtornos aos moradores locais (FONTANETTI et al., 2007) . A espécie infestante *U. atrobrunneus*, foi descrita por Pierozzi e Fontanetti (2006), mas a biologia e o comportamento reprodutivo da mesma permanecem desconhecidos.

Diante da falta de informações sobre a espécie e, principalmente dos fatores que levaram a proliferação exagerada da mesma, foi sugerido como meio de prevenção para minimizar o problema da expansão populacional destes organismos a limpeza dos terrenos baldios, bem como a retirada do material vegetal próximo aos muros das casas e a incineração dos mesmos. Esse procedimento diminuiria os locais para desenvolvimento destes organismos, no entanto, seria interessante um estudo para tentar esclarecer o que poderia de fato estar conduzindo a infestação desta espécie em Campinas (FONTANETTI et al., 2007). A mesma espécie foi notificada com o mesmo comportamento também na cidade de Paulínia/SP (BOCCARDO, 2002).

2.2 INTESTINO ANTERIOR

O trato digestório dos milípedes inicia-se com o intestino anterior. Com exceção do intestino médio, todo tubo digestório é revestido internamente por uma cutícula. Abrindo-se na região do intestino anterior são encontradas glândulas salivares.

Tanto o intestino anterior quanto o posterior são invaginações epidérmicas, cujas células secretam uma camada de cutícula semelhante ao da superfície externa do corpo. Esta cutícula, chamada íntima, pode apresentar protuberâncias as quais se parecem com dentículos, espículas, microespinhos ou cerdas (ELZINGA, 1998; MIYOSHI et al. 2005).

Na grande maioria dos milípedes, a matéria vegetal morta é mastigada pelas mandíbulas formando pedaços pequenos (ENGHOFF, 1979; 1990) e depois passa pelo lúmen do intestino anterior onde recebe as secreções das glândulas salivares (NUNES; CRAWFORD, 1977).

O estudos realizado por Fantazzini et al. (1998) sobre o intestino anterior de *Rhinocricus padbergi*, demonstrou que este representa a menor porção do canal alimentar, correspondendo a cerca de 6% do comprimento total; apresenta em sua constituição uma série de vilosidades voltadas para o lúmen, cuja parede é composta por um epitélio, uma membrana basal, musculatura e membrana celular externa. O epitélio do intestino anterior é formado por células colunares que apresentam núcleos localizados preferencialmente na parte central da célula, porém em algumas áreas estes núcleos aparecem em alturas diferentes. Adjacente ao epitélio é observada uma íntima cuticular. A membrana basal não é muito perceptível no intestino anterior de *R. padbergi*. A musculatura é formada por camadas de fibras musculares estriadas, sendo mais ou menos espessa, dependendo da região observada.

No intestino anterior de *R. padbergi* observou-se a existência de uma membrana peritrófica acelular, a qual envolve o alimento e parece ser de natureza mucosa. Segundo Nunez e Crawford (1977) a presença desta estrutura é bem estabelecida no tubo digestivo da classe Diplopoda, embora não tenha sido observada no intestino anterior de *Ptyoiulus impressus* (HEFNER, 1929) e nem no intestino anterior e posterior de *Orthoporus ornatus* (NUNES; CRAWFORD, 1977). Já na espécie brasileira *Plusioporus setiger* a membrana foi observada ao longo de todo canal alimentar (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997). Esta estrutura provavelmente origina-se da delaminação das células epiteliais com bordo em escova do intestino médio.

A transição do intestino anterior para o intestino médio é marcada pelo desaparecimento gradual da íntima cuticular, a qual é ausente no intestino médio. O epitélio

nesta área apresenta células extremamente alongadas e musculatura bem desenvolvida (HOPKIN, READ, 1982).

2.3 GLÂNDULAS SALIVARES

Localizadas ao lado do intestino anterior, as glândulas salivares auxiliam na lubrificação do alimento, além de conter enzimas digestivas (NUNEZ; CRAWFORD, 1977).

Hefner (1929) citou que o intestino anterior de *Parajulus impressus* é envolvido pelas glândulas salivares, as quais se estendem até a válvula esofageana.

Em *Strongylosoma pallipes*, Seifert (1932) observou que as glândulas salivares ladeavam todo intestino anterior próximo ao esôfago.

Nunez e Crawford (1976) estudaram a distribuição de enzimas no milípede do deserto *Orthoporus ornatus* e observaram que as glândulas salivares apresentam uma participação maior na digestão de polissacarídeos e que as enzimas atuantes são as α -glucosidase e β -glucosidase, além de lipases. Os autores relataram ainda que a digestão provavelmente iniciasse depois que o alimento entra em contato com os dutos das glândulas salivares no intestino anterior.

Fontanetti e Camargo-Mathias (1997) estudaram o intestino anterior de *Plusioporus setiger* demonstrando que este é ladeado por um par de glândulas salivares, as quais se estendem desde a boca até a válvula esofageana.

Estudos realizados por Fantazzini et al. (1998) referentes às glândulas salivares de *R. padbergi*, demonstraram que, histologicamente, estas glândulas são constituídas por um túbulo contorcido e aparecem intimamente associadas ao intestino anterior. A porção secretora situa-se próxima do canal alimentar, enquanto que o ducto está situado mais externamente. A porção secretora é tubulosa, quando seccionada obliquamente assemelha-se à ácinos, apresenta um lúmen mais ou menos dilatado, dependendo da área observada, com células cilíndricas e com muitas granulações citoplasmáticas de vários tamanhos. Cada célula apresenta apenas um núcleo que está frequentemente localizado na metade apical da célula, mesmo quando observado em cortes transversais. O ducto é constituído por um epitélio colunar simples e apresenta lúmen amplo.

Camargo-Mathias et al. (2011) realizaram estudos sobre a morfologia da glândula salivar de *R. padbergi*, a partir de técnicas de reconstrução 3D e microscopia eletrônica de varredura. Neste trabalho a reconstrução 3D permitiu a determinação do real arranjo espacial da estrutura da glândula salivar, bem como sua disposição envolvendo o intestino anterior e o

íntimo contato com o mesmo; estas são formadas por duas partes distintas: acinosa e tubular. A técnica deixou claro que os dutos são em número de dois e que se localizam um em cada lado da abertura do tubo digestório voltados para cavidade oral.

2.4 INTESTINO MÉDIO

O intestino médio dos milípedes, situado após o intestino anterior e antes da região pilórica, apresenta fundamental importância na participação do processo digestivo do animal (HOPKIN, READ, 1992).

Enzimas são secretadas sobre as partículas de alimento pelas células epiteliais, e outras podem ser derivadas de microrganismos do lúmen. Os produtos da digestão são assimilados pelas células do intestino médio e algumas passam através das células hepáticas. O tamanho das partículas de alimento que passam para o intestino tem correlação com a eficiência digestiva – quanto menor as partículas, maior é a proporção de alimento assimilado (KOHLE et al., 1991).

A estrutura e a função do intestino médio de diplópodos foram descritas para poucas espécies (BOWEN, 1968; NUNEZ; CRAWFORD, 1977; HUBERT, 1979; 1988; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997; FONTANETTI et al., 2001; FANTAZZINI et al., 2002; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

Raros são os trabalhos conduzidos em espécies brasileiras. Descrito por Fontanetti e Camargo-Mathias (1997), o intestino médio da espécie *Plusiopurus setiger* é constituído por um epitélio colunar dotado de um bordo em escova, uma camada basal bem visível e uma camada muscular bem desenvolvida. As células epiteliais se tornam alongadas próximas à região de transição com o intestino posterior; abaixo da camada muscular foram observadas células hepáticas distribuídas aleatoriamente; observou-se ainda uma membrana peritrófica intimamente associada às células epiteliais. Um tecido de células com características de adipócitos foi chamado de camada de “corpo gorduroso” que abrange o intestino médio todo, representado por células irregulares com núcleos arredondados e vacúolos em seu citoplasma.

O intestino médio de *R. padbergi* foi descrito sob microscopia de luz (FANTAZZINI et al., 2002), por meio de técnica histológica e testes histoquímicos, e sob microscopia eletrônica de transmissão (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004). Os autores relataram um epitélio pseudoestratificado, constituído por células epiteliais principais intercaladas por células regenerativas e secretoras. Segundo os autores, a organização do intestino médio em *R. padbergi* é semelhante a de outros artrópodes.

De modo geral, o intestino médio é um órgão dinâmico, com uma ultra-estrutura relacionada ao ciclo digestivo e ao ciclo de muda. O principal tipo de célula do intestino médio é a célula principal ou absorptiva. Essas células interdigitam basalmente com as células hepáticas e contêm numerosos grânulos de fosfato de cálcio estruturados concentricamente. Os grânulos também podem conter outros metais, como o zinco (HUBERT, 1979a, b; KOHLER; ALBERTI, 1991). As membranas intercelulares são conectadas a junções septadas lisas, as quais são similares em estrutura com as dos outros artrópodes (DALLAI et al., 1990).

Durante a muda, todo o epitélio do intestino médio se parte e o conteúdo das células principais (incluindo produtos de dejetos acumulados) é excretado através das fezes. O epitélio do intestino médio é restaurado após a muda através do crescimento e divisão das células regenerativas.

O intestino médio dos milípedes produz uma membrana peritrófica que envolve o alimento dentro do lúmen (DE METS, 1962; HUBERT, 1977; 1979a, b). A membrana peritrófica do *Glomeris marginata* foi estudada detalhadamente por Martin e Kirkham (1989). Um marcador coloidal dourado específico foi desenvolvido para quitina, o qual permitiu que os locais de secreção dos componentes quitínicos e proteínicos da membrana peritrófica fossem identificados.

A quitina aparece primeiramente na base das microvilosidades em sincronia com todo o comprimento do intestino médio. A proteína se junta à quitina da microvilosidade, enquanto a membrana peritrófica se move distalmente pela microvilosidade até o lúmen. A membrana peritrófica completada se estende em torno de itens individuais no conteúdo do intestino enquanto forma um envelope com multicamadas. Isso pode melhorar as funções, protetora e digestiva da membrana peritrófica.

No intestino médio está presente uma camada descontínua de células hepáticas conhecidas também como “tecido hepático”; estas provavelmente realizam funções similares às das do divertículo ou hepatopâncreas do intestino médio em outros artrópodes, ou pode ser relacionada ao tecido cloragênico que envolve o intestino de minhocas de terra. As células acumulam substâncias que são eventualmente lançadas na hemolinfa para serem excretadas em algum outro lugar do corpo. Alguns autores, como Subramoniam (1972), confundiram o “fígado” com o corpo gorduroso, um órgão totalmente separado.

Segundo descrições na literatura as células hepáticas não formam um epitélio e não estão interconectadas (SEIFERT; ROSENBERG, 1977). Suas regiões basais ramificam-se entre as partes basais das células do intestino médio (HUBERT, 1988). A presença de junções “fusiformes” sugere que ocorre transporte aberto entre os dois tipos de células. Seifert e

Rosenberg (1977) demonstraram que as células hepáticas de um *Oxidus gracilis* nutrido, normalmente, contêm grande depósito de glicogênio, que é rapidamente reduzido se os animais passarem fome.

Além de funcionar como locais de armazenamento de energia, as células hepáticas também podem servir de locais de armazenamento/excreção de metais e outras substâncias descartáveis. Estes são acumulados em grânulos intracelulares (HUBERT, 1978a; b; 1979a; b). Entretanto, quando os níveis de metais poluentes são muito altos na dieta, os sistemas de desintoxicação se tornam sobrecarregados e as células podem sofrer danos.

Um par de túbulos de Malpighi abre-se na junção dos intestinos médio e posterior, evidenciando claramente a transição dos mesmos.

É interessante observar a importância que intestino médio de diplópodos representa, uma vez que experimentos realizados demonstraram que ele age como uma barreira impedindo que compostos tóxicos ou não-essenciais possam atingir o restante do corpo (HOPKIN et al., 1985). Este órgão desempenha um importante papel de desintoxicação e excreção de xenobióticos (HOPKIN et al., 1985; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

No epitélio do intestino médio, os metais são acumulados como grânulos insolúveis com a finalidade de neutralizar os efeitos tóxicos destes compostos (KÖHLER, 2002).

O processo de ativação da biotransformação de poluentes orgânicos é mais complexo porque cada classe de contaminante tem um caminho metabólico específico que pode levar a formação de metabólitos insolúveis e solúveis, os quais podem ser armazenados no corpo do animal ou podem ser eliminados (TRIEBSKORN; KÖHLER, 1996; SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Com efeito, o intestino médio representa um órgão muito importante, uma vez que ele participa não só do processo de digestão do animal, mas também na desintoxicação do corpo do mesmo.

2.5 INTESTINO POSTERIOR

O intestino posterior de diplópodo apresenta variações em sua extensão quando comparadas diferentes espécies. É limitado anteriormente pela porção posterior do intestino médio (GOLOVATCH et al., 1983).

Este órgão tem seu início marcado não só pelo reaparecimento da íntima cuticular, mas também por uma estrutura tubular denominada piloro, onde são inseridos os túbulos de

Malpighi. Estas estruturas estão envolvidas funcionalmente na osmorregulação e excreção desses animais (HUBERT, 1972, 1979a, b). O comprimento do piloro difere conforme as espécies (FANTAZZINI et al., 1998; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997).

A epicutícula do intestino posterior de *Cylindroiulus londinensis*, por exemplo, é perfurada, com pequenos orifícios de 50-100nm, que permitem o aumento da permeabilidade (HUBERT, 1981). A superfície cuticular do intestino posterior pode ser coberta por espinhos. Em *Tachypodoiulus niger*, eles são de natureza superficial, sem apoio no epitélio. Eles provavelmente evitam movimentos anteriores da matéria fecal, se prendendo aos restos da membrana peritrófica (SCHLUTER, 1980a). Em *Polydesmus angustus*, os espinhos ficam inseridos ao epitélio e cada um é dotado de um músculo longitudinal, o qual pode movê-los. Schluter (1980a) sugeriu que esse tipo de espinho é capaz de romper a membrana peritrófica para assim permitir uma maior troca de fluídos e íons com o material fecal. Em *Orthoporus ornatus*, a cutícula do intestino posterior é formada por numerosas projeções, cada qual contendo uma depressão central onde bactérias podem residir (CRAWFORD et al., 1983). A íntima cuticular do intestino posterior é perdida com o resto do exoesqueleto na época da muda.

A superfície da cutícula do intestino posterior exposta ao lúmen pode ficar coberta com uma camada de secreção derivada das glândulas exócrinas situadas na junção entre os intestinos médio e posterior. Essas glândulas, conhecidas como “glândulas pilóricas”, secretam seus produtos nos sulcos longitudinais da válvula pilórica e têm sido descritas em um número de espécies por Schluter (1979; 1980b). A camada parece influenciar na permeabilidade do intestino posterior e é de importância essencial na reabsorção de água e outros componentes importantes.

Fontanetti e Camargo-Mathias (1997) descrevendo o tubo digestório da espécie *Plusioporus setiger*, observaram que o intestino posterior desta espécie representava a porção mais extensa, além de não se observar a divisão desta porção do tubo digestório em íleo e cólon, mas somente a distinção entre piloro e reto. Para outras espécies a descrição desta região varia; segundo Hefner (1929) em *Parajulus impressus* o intestino médio é a região mais extensa do tubo digestório enquanto que seu intestino posterior apresenta seis regiões distintas. Crawford et al. (1983) mencionaram a presença de um íleo e um cólon para *Othoporus ornatus*, sendo o intestino posterior desta espécie muito maior em comparação ao comprimento das outras partes do tubo digestório.

Miyoshi et al. (2005), estudando duas espécies, *R. padbergi* (Spirobolida) e *Pseudonannolene tricolor* (Spirostreptida) observaram diferentes arranjos estruturais no

piloro das espécies; a espécie *P. tricolor* apresentou duas regiões distintas no piloro, denominadas como anterior e posterior. A porção anterior caracterizou-se pela presença de microespinhos de estrutura longa e na medida em que se avança para a região intermediária do piloro, estes microespinhos apresentavam-se de diversos tamanhos e diferentes distribuições; na parte final não se observou mais esta diferenciação de tamanho, embora grande número de microespinhos ainda fosse observado. Já em *R. padbergi*, esta diferenciação no piloro não foi encontrada; várias estruturas filamentosas foram observadas, as quais apresentam suas bases na íntima cuticular; a distribuição dos microespinhos permanecia praticamente inalterada no decorrer da estrutura. Na transição piloro/íleo observou-se expansões cuticulares maiores que dentículos (MYIOSHI et al., 2005).

Segundo ELZINGA (1998), os microespinhos encontrados ao longo do trato digestório dos artrópodes parecem ser simplesiomórficos e podem atuar na filtragem do alimento digerido, no movimento contínuo dos alimentos através do trato digestório, evitando o refluxo, na retenção de organismos simbioses e na proteção das camadas celulares de partículas ingeridas.

Como uma característica geral dos artrópodes, a cutícula que envolve internamente o piloro pode apresentar diferentes estruturas. Além das glândulas pilóricas, as glândulas anais também estão presentes em várias espécies. Em *Rhaphidostreptus virgator*, Schluter (1982; 1983) mostra que essas glândulas são mais desenvolvidas em indivíduos que estão prestes a entrar em muda. Suas secreções são como cola e são usadas para atar grãos de fezes e partículas de solo durante a construção de câmaras para a muda.

O epitélio intestinal posterior tem a aparência de um epitélio transportador de fluídos e tem como função principal reabsorver a água das fezes. As células são unidas em junções septadas pregueadas (DALLAI et al., 1990). As células do intestino posterior, de *Scaphiostreptus* sp., contêm numerosos complexos plasmalemamitocondriais, os quais são muito eficientes no transporte de água e íons (SCHLUTER, 1980c). Em *Polyxenus lagurus*, os túbulos de Malpighi ficam bem próximos uns dos outros e presos ao intestino posterior, e são embainhados por um envelope formado de várias células achatadas (SCHLUTER; SEIFERT, 1985). Esse complexo (que lembra o sistema criptoneférico dos insetos) evoluiu para maximizar a retenção de água. Os grãos de fezes são formados no reto. O reto pode virar de dentro para fora e é capaz de absorver água de substratos úmidos. Por exemplo, a espécie alpina *Mastigona mutabilis*, quando desidratada, foi capaz de reabsorver água através de seu reto virado a um nível de 79% de seu peso corporal por hora (MEYER; EISENBEIS, 1985).

Na descrição que Hefner (1929) faz para espécie *Parajulus impressus*, o reto deste animal é curto, representado por uma bolsa de paredes finas, que pode ser parcialmente evertido através das válvulas anais durante a defecação. As paredes epiteliais são relativamente finas e a musculatura circular consiste de poucas fibras. O revestimento quitinoso desta porção é espesso, mas aparentemente de consistência flexível dentro do lúmen.

3. OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar a morfologia do tubo digestório da espécie *U. atrobrunneus* relacionando os resultados às funções desempenhadas pelas diferentes regiões do intestino do diplópodo.

Os objetivos específicos são:

- Analisar histologicamente a estrutura do tubo digestório, para descrever os tecidos que o compõem;
- Realizar testes histoquímicos por meio de técnicas que detectem a presença de proteínas, polissacarídeos, cálcio e lipídeos

Uma vez que a espécie vem se tornando uma provável “praga” em centros urbanos do estado de São Paulo, acredita-se que esta pesquisa poderá fornecer subsídios para possível controle da espécie *U. atrobrunneus*.

4. METODOLOGIA

Indivíduos adultos de *U. atrobrunneus* foram coletados pelo prof. Dr Edilberto Gianotti e pelo mestrando Raphael Baston de Souza nos arredores das cidades de Rio Claro, SP. Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e folhço, umedecidos periodicamente.

O tubo digestório foi obtido por dissecação dos espécimes anestesiados, realizada em placas de dissecação contendo solução fisiológica.

Os métodos consistiram em:

4.1. Histologia

Foi utilizada a técnica de inclusão em resina (historesina) para estudos histológicos e histoquímicos. Para isso, o tubo digestório foi fixado em solução Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio durante aproximadamente 24 horas em geladeira. Em seguida o material foi desidratado em álcool 70, 80, 90, e 95% durante 30 minutos cada banho, e então transferido para uma solução de resina de Embebição (JB-4-Polaron Instruments/BIO RAD), durante 24 horas, mantido em geladeira. O material foi colocado em moldes preenchidos com resina de inclusão. Em seguida, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica (Modelo: RM 2245); as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, essas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) conforme rotina histológica.

4.2. Histoquímica

4.2.1. Proteínas Totais

4.2.1.1. Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985)

Fixação do material em paraformaldeído 4% e solução Bouin, coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora; lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético 0,5% por 5 minutos; passagem em álcool butílico terciário.

4.2.1.2. Xilidine Ponceau (MELO; VIDAL, 1980)

Fixação do material em paraformaldeído 4% e solução Bouin, coloração pela solução de xilidine ponceau por 30 minutos; passagem dos cortes em tampão acetato de sódio (pH = 2,5 – 3,5) por 1 minuto; lavagem em água destilada.

4.2.2. Polissacarídeos

Técnica do PAS (Ácido Periódico Schiff) - Polissacarídeos neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Fixação em solução Bouin; oxidação por 10 minutos em ácido periódico 0,4%; reação no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; deixar em água sulfurosa por 3 minutos; lavar em água corrente por 30 minutos.

4.2.3. Cálcio

Método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Fixação em paraformaldeído 4% ou solução Bouin; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para revelador D-75; imersão em fixador F-5 por 5 minutos; contra coloração dos núcleos com hematoxilina.

4.2.4. Lipídios

4.2.4.1. Sudan Black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Coloração pelo sudan black B por 15 minutos; lavagem em água destilada e em álcool 70%; em seguida montagem das lâminas em gelatina glicerizada.

4.2.4.2. Azul do Nilo

Coloração pelo azul do Nilo por 5 minutos à temperatura de 37°C; lavagem em água corrente; banho em ácido acético 1% por 1 minuto; em seguida montagem da lâmina em gelatina glicerizada.

4.3. Ultra-estrutura

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras do material foram previamente limpas, pequenos fragmentos do intestino médio foram fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0.1M a 4° C, lavados em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material novamente foi lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas. Em seguida, foi feita uma desidratação em série crescente de acetona, submetido à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas, embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado pra estufa a 70° C por 24 horas para a polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrotomo e as grades obtidas foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100.

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigos científicos os quais serão submetidos às revistas especializadas na área.

- **ARTIGO 1: Structure and function of the foregut and salivary glands of the *Urostreptus atrobrunneus* sinantropic diplopod (Spirostreptidae)**
- **ARTIGO 2: Intestino médio do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus*: estrutura, função e redefinição das células hepáticas**
- **ARTIGO 3: Análise histológica e histoquímica do intestino posterior da espécie sinantrópica *Urostreptus atrobrunneus***

ARTIGO 1 – Submetido à revista Animal Biology**Structure and function of the foregut and salivary glands of the *Urostreptus atrobrunneus* sinantropic diplopod (Spirostreptidae)****Estrutura e função do intestino anterior e glândulas salivares de *Urostreptus atrobrunneus* diplópodo sinantrópico (Spirostreptidae)**

Cristina Moreira de Sousa¹, Carmem Silvia Fontanetti²

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

1: cris.sousa.bio@hotmail.com; 2: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Os diplópodos são considerados importantes macro-artrópodes do solo, uma vez que estão envolvidos na manutenção do equilíbrio do ecossistema. Normalmente não apresentam população numerosa, mas podem ocorrer explosões populacionais ocasionadas por desequilíbrios ambientais, mudanças climáticas e pela utilização de pesticidas que pode eliminar possíveis competidores. O milípede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi e Fontanetti, 2006, têm apresentado pontos de infestação em centros urbanos, do estado de São Paulo, causando muitos transtornos à população humana; a falta de conhecimento de sua biologia tem dificultado um controle eficiente da mesma. Neste sentido, este trabalho pretende contribuir com o conhecimento desta potencial praga, apresentando a descrição morfológica do intestino anterior e das glândulas salivares do milípede *U. atrobrunneus*, relacionando-os com suas respectivas funções, por meio das análises histológica e histoquímica.

Keywords: Milípede, Diplopoda, Digestão, Enzimas digestivas.

INTRODUÇÃO

Os diplópodos em geral, não apresentam população numerosa, mas vários relatos já foram feitos de algumas espécies que apresentaram explosões populacionais, normalmente ocasionadas por desequilíbrios ambientais (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1949; NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 1997, 2002; KANIA; TRACZ, 2005; FONTANETTI et al., 2010). O milípede *U. atrobrunneus* é uma espécie recentemente descrita (PIEROZZI; FONTANETTI, 2006), que chamou atenção de pesquisadores devido à alta proliferação que a mesma tem apresentado em alguns centros urbanos no estado de São Paulo (BOCCARDO, 1998; FONTANETTI et al., 2007).

O tubo digestório dos milípedes apresenta-se basicamente na forma de um tubo reto que se inicia na boca e termina no ânus, dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Com exceção do intestino médio, todo o tubo digestório é revestido internamente por uma íntima cuticular. Glândulas salivares encontram-se ladeando o intestino anterior e são responsáveis pela produção de secreções que lubrificam o alimento ingerido, além de conter enzimas digestivas que auxiliam no início da digestão (NUNEZ; CRAWFORD, 1977; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997; FANTAZZINI et al., 1998).

Poucos estudos sobre histologia do trato digestório de diplópodos são encontrados na literatura e a maioria é restrita a somente algumas ordens.

Poucos estudos foram realizados com espécies de nossa fauna. Fontanetti et al. (1997) descreveram morfológica e histologicamente o trato digestório da espécie *Plusiopurus setiger* (Spirostreptida). Fantazzini et al. (1998; 2002) descreveram a anatomia do intestino anterior, das glândulas salivares e intestino médio de *Rhinocricus padbergi* (Spirobolida) por meio de análises histológicas e histoquímicas; posteriormente, Camargo-Mathias et al. (2010) apresentaram a reconstrução 3D e a ultramorfologia das glândulas salivares da mesma espécie.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é realizar a primeira descrição sobre a morfologia do tubo digestório da espécie *U. atrobrunneus* por meio de análises histológica e histoquímica, relacionando os resultados às funções desempenhadas pelas diferentes regiões do intestino anterior do diplópodo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes (n=5) foram coletados nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil, (22°23'59''S; 47° 34'18''W). Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e

folhigo, umedecidos periodicamente. O tubo digestório foi obtido por dissecação dos espécimes anestesiados, com éter sulfúrico, feita em placas de dissecação contendo solução fisiológica. O tubo digestivo foi fixado em Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio dependendo da técnica aplicada. O material foi incluído em historesina e corado com hematoxilina/eosina.

Os testes histoquímicos foram aplicados para detecção de proteínas (Xylidine Ponceau – MELO; VIDAL, 1980 e Azul de Bromofenol - PEARSE, 1985), polissacarídeos (PAS (Ácido Periódico-Schiff) e PAS/Azul de Alcian – JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e lipídios (Azul do Nilo – LISON, 1960 e Sudan Black B – JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

RESULTADOS

O intestino anterior de *U. atrobrunneus* é constituído por um epitélio, dotado de uma íntima cuticular, uma delgada membrana basal, uma camada muscular, revestido por uma membrana externa (Figs 1A, B, C). Ladeando todo o intestino anterior observa-se um par de glândulas salivares (Fig. 1A, D). O epitélio é composto por células de diferentes alturas dependendo da região observada. Na porção mais anterior apresentam-se mais baixas com núcleos mais centrais (Fig. 1B) e nas porções mediana e posterior (Fig. 1C) aparecem mais altas com núcleos localizados na região basal da célula.

Abaixo do epitélio observa-se uma musculatura bem desenvolvida (Figs 1B, C) por toda extensão do intestino; todo intestino anterior é revestido externamente por uma membrana celular chamada membrana externa (Fig. 1B); abaixo do epitélio observa-se também uma delgada membrana basal, melhor visualizada pela técnica de PAS (Fig. 2B); a transição entre intestino anterior e intestino médio é marcada pela válvula esofágica onde se observa o gradativo desaparecimento da íntima cuticular (setas nas Figs 1D, E); o epitélio nesta região apresenta células extremamente alongadas.

Por toda a extensão do intestino anterior observa-se uma membrana peritrófica acelular (Fig. 1C) que aparece em continuidade no intestino médio, intimamente associada ao epitélio (Fig. 1E). Observa-se também a presença de vários hemócitos por entre os constituintes do intestino anterior e das glândulas salivares (Fig. 1C).

As proteínas foram observadas nas células epiteliais e musculares. A íntima cuticular foi fracamente positiva ao teste para detecção destes elementos (Fig. 2A). A íntima cuticular reagiu moderadamente à técnica para detecção de polissacarídeos neutros. Foi detectada

pouca quantidade destes elementos nas células epiteliais (Figs 2B, C). Vários dos hemócitos observados reagiram positivamente a técnica para polissacarídeos neutros (Figs 2B, C).

Não foram detectados polissacarídeos ácidos, lipídios e cálcio nos constituintes do intestino anterior.

As glândulas salivares encontradas em *U. atrobrunneus* apresentam uma porção secretora e ductos excretores (Figs 1A, F). A porção secretora apresenta formas diferentes; a porção mediana e posterior, portanto, mais próxima ao intestino médio apresenta-se de forma mais tubular e formada por células menos coradas (Fig. 3A); conforme avança para a região mais anterior, suas células aumentam de coloração (Fig. 3B) e mais próxima à cavidade oral, assemelha-se mais a forma acinosa, com a maioria das células repletas de grânulos fortemente corados (Fig. 3C).

O ducto apresenta também distintas configurações; em algumas porções apresenta-se formado por células cúbicas com núcleos centrais (Fig. 1F) e em outras, por células mais altas com núcleos periféricos (Fig. 3D).

Foram detectadas poucas proteínas na porção mais posterior da glândula (tubulosa) (Fig. 4A); a porção que aparece mais acinosa apresenta células distintas, umas fortemente coradas e outras menos coradas (Fig. 4B). Os ductos apresentaram reação moderada aos testes para detecção de proteínas (Fig. 4C).

Foi detectada grande quantidade de polissacarídeos na porção secretora das glândulas salivares (Figs 4D, E), bem como na luz do ducto excretor (Figs 2B, 4D), sendo a maioria constituída por polissacarídeos neutros. Os polissacarídeos ácidos foram pouco detectados (Fig. 4D).

Não foram detectados lipídios e cálcio nas glândulas salivares.

Os resultados histoquímicos estão resumidos na tabela 1.

DISCUSSÃO

As células que compõem o epitélio do intestino anterior apresentam diferentes alturas, são mais baixas na porção mais anterior e mais altas nas porções mediana e posterior. A presença da íntima cuticular é característica desta porção e na medida em que se aproxima do intestino médio, esta gradativamente desaparece. Essa mesma morfologia, já foi descrita anteriormente para o intestino anterior dos diplópodos *Rhinocricus padbergi* (FANTAZZINI et al., 1998), *Orthoporus ornatus* (NUNEZ; CRAWFORD, 1977) e *Plusioporus setiger* (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997).

Segundo as descrições realizadas por Nunez e Crawford (1977), a presença da membrana peritrófica acelular é bem estabelecida no tubo digestório da classe Diplopoda, apesar de não ter sido observada no intestino anterior da espécie *Ptyoilus impressus* descrita por Hefner (1929) e nem no intestino anterior e posterior de *Orthoporus ornatus* (NUNEZ; CRAWFORD, 1977). Já as espécies brasileiras *P. setiger* (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997) e *R. padbergi* (FANTAZZINI et al., 1998; 2002) apresentaram a membrana peritrófica ao longo de todo canal alimentar.

De acordo com as respostas histoquímicas, o intestino anterior apresentou nos testes para detecção de polissacarídeos, fraca reação no epitélio, porém o resultado foi moderadamente positivo na área correspondente a íntima cuticular. Este resultado é indicativo de que o intestino anterior não está envolvido na assimilação e/ou digestão de polissacarídeos neutros, bom como de lipídios e cálcio.

Segundo Fantazzini et al. (1998) em *R. padbergi*, ocorre uma pequena participação do intestino anterior durante o processo de digestão, porém o papel efetivo neste processo é realizado pelas glândulas salivares através da síntese de enzimas (FANTAZZINI et al., 1998). O mesmo deve ocorrer em *U. atrobrunneus*.

A morfologia das glândulas salivares apresenta-se conforme descrições realizadas para as espécies *P. setiger* (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997) e *R. padbergi* (FANTAZZINI et al. 1998; FANTAZINI, 2002), ou seja, apresentam uma porção secretora e ductos excretores, sendo a primeira formada por uma porção acinosa e uma tubulosa.

Camargo-Mathias et al. (2010) utilizando técnicas de reconstrução 3D e microscopia eletrônica de varredura definiram a morfologia das glândulas salivares de *R. padbergi* muito semelhante a estrutura aqui observada, porém os autores descrevem que estas são unidas em estrutura única dotada de dois ductos que se abrem na cavidade oral. Segundo nossas observações, em *U. atrobrunneus*, essa estrutura parece pareada.

A mudança na forma, tanto da porção secretora como nos ductos ao longo das glândulas podem refletir diferentes funções realizadas pelas diferentes regiões da estrutura. A principal função das glândulas salivares nos organismos de uma forma geral é secretar saliva, a qual terá um papel significativo nos processos de digestão. Nos vertebrados, as glândulas salivares são descritas como sendo formadas por porções acinosas e tubulosas, onde a porção acinosa tem a função de secretar a saliva e a tubulosa, modificaria a saliva que seria liberada para o exterior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Em Fantazzini (2002), o estudo da glândula salivar de *R. padbergi* demonstrou que esse processo também ocorre no diplópodo,

deixando claro que o produto ou a saliva inicialmente produzida não tem a mesma composição química daquela que é finalmente liberada.

Os resultados histoquímicos em *U. atrobrunneus* demonstraram que a secreção final liberada pelas glândulas é de natureza glicoprotéica, com ativa participação dos ductos na síntese de proteínas. Estes resultados corroboram os de Fantazzini (2002).

Nunez e Crawford (1976) analisando as glândulas salivares do diplópodo *Orthoporus ornatus* detectaram a presença de várias enzimas, principalmente aquelas relacionadas com a digestão de carboidratos, não excluindo aquelas relacionadas especificamente com a digestão de lipídios.

Semelhante ao observado aqui, Fantazzini (2002) comenta que as glândulas salivares do diplópodo *R. padbergi* apresenta efetiva participação na síntese de compostos protéicos, provavelmente enzimas que seriam utilizadas no processo de digestão; não foi detectada a presença de quantidades significativas de lipídios nessas estruturas, como observado também no presente estudo.

O real papel das glândulas salivares nos diplópodos em geral, é ainda pouco conhecido. Alguns autores como Nunez e Crawford (1977) e Hopkin e Read (1992), propuseram que as enzimas digestivas, oriundas de secreções das glândulas salivares e das células do epitélio do intestino médio, seriam suplementadas por enzimas liberadas pelos microrganismos localizados e misturados ao alimento no lúmen.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Cristiane Miléo e Gerson Mello pelo apoio técnico, a Edilberto Giannotti pelo auxílio nas coletas e a FAPESP e CNPq pelos apoios financeiros.

REFERÊNCIAS

- BOCCARDO, L. 1998. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia- SP. In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, Recife, PE. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia - Resumos, 1998, p. 36-36.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocinio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool**, v.18, p.62-63, 1997.
- BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C.H.S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.20-223, 2002.

- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; CALLIGARIS, I. B. 3D Reconstruction and scanning electron microscopy of salivary glands of the millipede *Rhinocricus padbergi* (Verhoef, 1938) (Diplopoda: Spirobolida). **Micron**, DOI: 10.1016/j.micron.2010.10.004, 2010.
- CLOUDSLAEY-THOMPSON, J.L. Significance of migration in myriapods. **Ann. Magaz. Natur. Hyst**, v. 2, p.947-62, 1949.
- FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (1938) (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Arthropoda Selecta** , 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.
- FANTAZZINI, E. R. **Glândulas Salivares do diplópodo *Rhinocricus padbergi* (Verhoeff, 1938) (Diplopoda: Spirobolida): Citoquímica Ultra-estrutural, dosagem e quantificação de proteínas**. 2002. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histoanatomy of the digestive tract in *Plusioporus setiger* diplopod (Brolemann, 1901) (Spirostreptida, Spirostreptidae), Brazil. **J. Morphol.**, v.14, n.2, p.205-211, 1997.
- FONTANETTI, C.S.; CALLIGARIS, I.B.; SOUZA, T.S. Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades. Infestação de piolhos-de-cobra em Campinas. <http://www.baraoemfoco.com.br/barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>, 2007.
- FONTANETTI, C.S., SOUZA, T.S., CALLIGARIS, I.B., BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potencial plague in urban centers. **Animal Biology**, 60, 467-478, 2010.
- HEFNER, R. A. The micro-anatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 48, n. 4, p. 321-351, 1929.
- HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto- Atlas**. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, ed. 11, 2008, 524p.

- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. 123p.
- KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758)(Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v. 4, p.57-66, 2005.
- LISON, L. **Histochimie et cytochimie animales**. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.
- MELO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980, 69p.
- NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Jour. Ecol**, v. 38, p.257-268, 1988.
- NUNEZ, F. S.; CRAWFORD, C. S. Digestive enzymes of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae), **J. Morphol.** V. 151, p. 121-130, 1976.
- NUNES, F. S.; CRAWFORD, C. S. Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Diplopoda: Spirostrepidae), **J. Morphol.**, v.151, p. 121-130, 1977.
- PEARSE, A. T. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: J&A. Churchill, 1960, 998p.
- PIEROZZI, P. H. B.; FONTANETTI, C. S. Assesment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water Air Soil Pollut.** DOI 10.1007/s11270-010-06579.2010.

Tabela 1. Resultados da análise histoquímica realizada no intestino anterior e glândulas salivares de *U. atrobrunneus*.

		Intestino anterior		Glândula salivar			
		Células epiteliais	Íntima cuticular	Porção secretora		Ducto	
				Acinosa	Tubulosa	Epitélio	Luz
Proteínas		+++	+	+/+++	+	+++	+
Lipídios		-	-	-	-	-	-
Cálcio		-	-	-	-	-	-
Polissacarídeos	Ácidos	-	-	+	-	+	+
	Neutros	+	++	+++	+++	-	+++

+++ fortemente positivo

++ moderadamente positivo

+ fracamente positivo

- negativo

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Secções histológicas do intestino anterior (A, B, C, F) e da transição intestino anterior/ médio (D, E) de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina.

d- ducto; gs- glândula salivar; h- hemócitos; ia- intestino anterior; ic- íntima cuticular; l- lúmen; me- membrana externa; m- musculatura; ic- íntima cuticular; mp- membrana peritrófica; im- intestino médio; ps- porção secretora; setas: transição intestino anterior/ médio.

Figura 2. Secções histológicas do intestino anterior de *U. atrobrunneus* submetidas à coloração pelo xilidina ponceau (A) e às técnicas de PAS/azul de Alcian (B) e PAS (C). d- ducto; e- epitélio; h- hemócito; ic- íntima cuticular; l- lumen; mb- membrana basal; me- membrana externa.

Figura 3. Secções histológicas da glândula salivar de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina. A. Porção mais posterior da glândula; B. Porção mediana da glândula; C. Porção anterior da glândula.

d- ducto; e- epitélio; l- lúmen; ps- porção secretora.

Figura 4. Secções histológicas da glândula salivar de *U. atrobrunneus*. A, B, C. Submetidas à técnica de azul de bromofenol; D. Submetida à técnica PAS/azul de Alcian; E. Submetida à técnica de PAS.

d- ducto; ia- intestino anterior; ps- porção secretora.

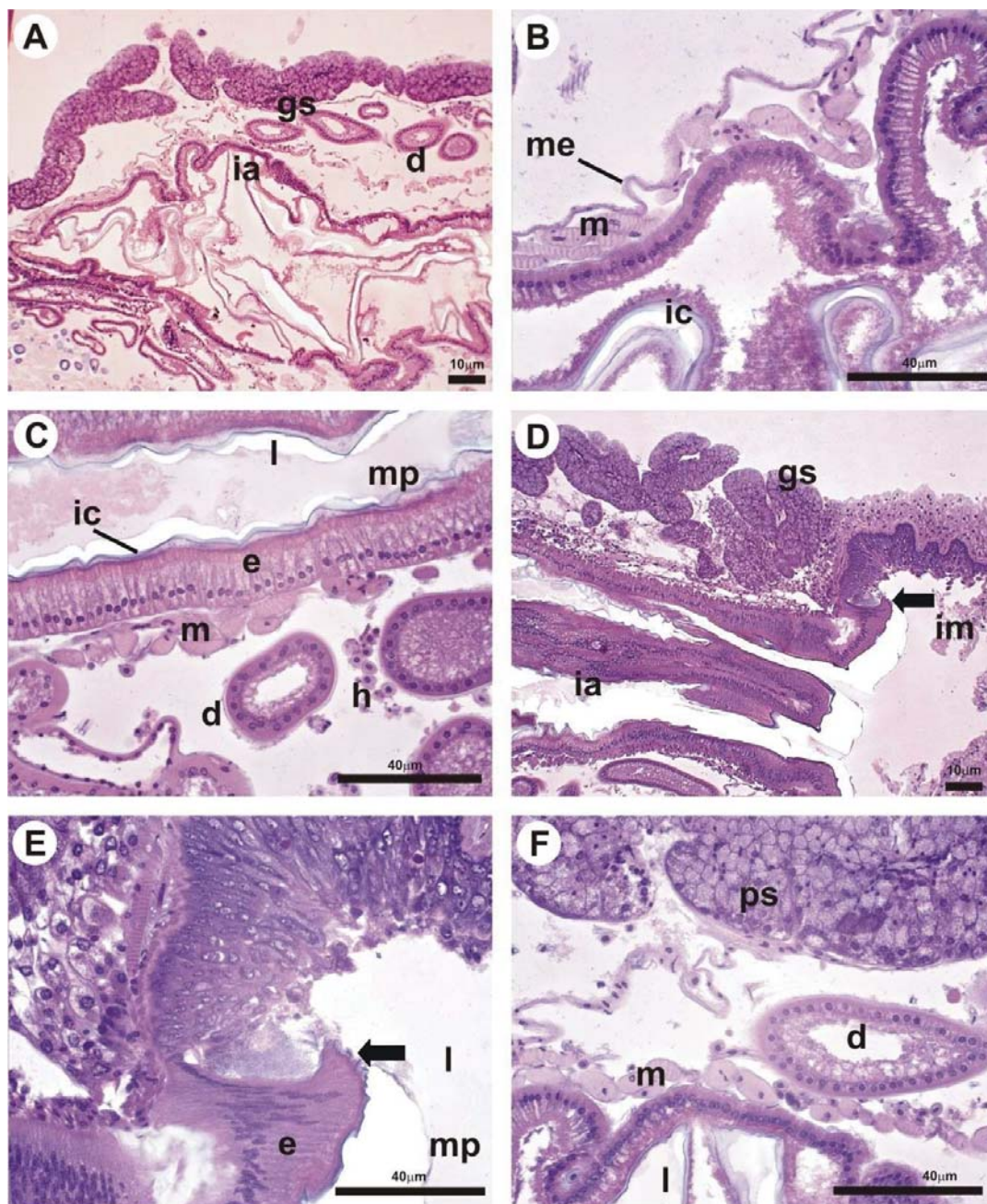


Figura 1

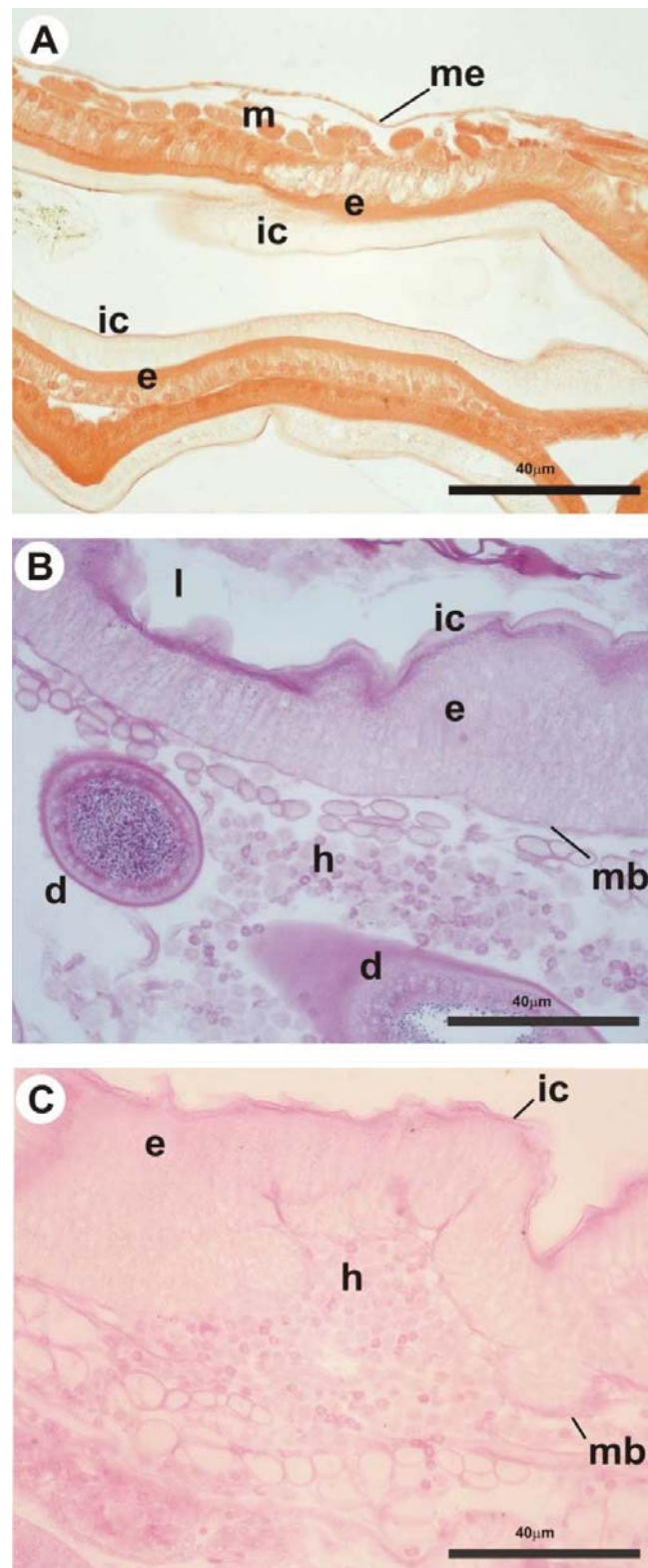


Figura 2

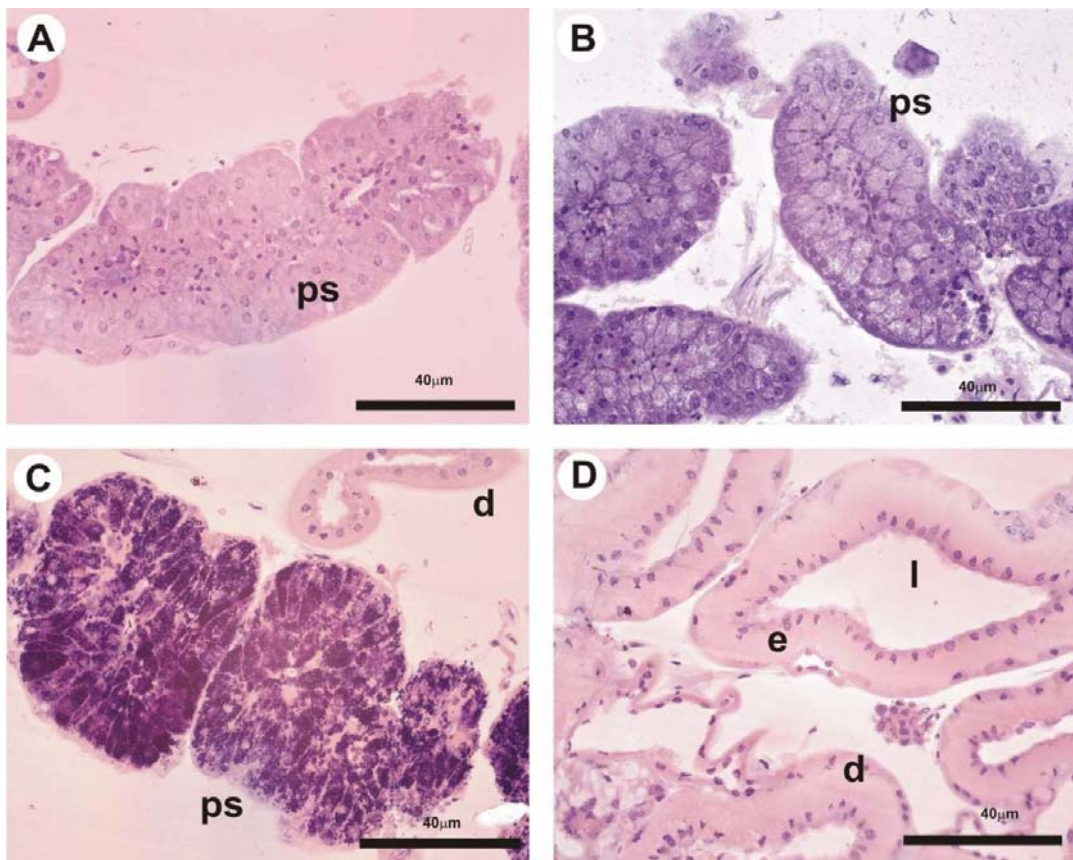


Figura 3

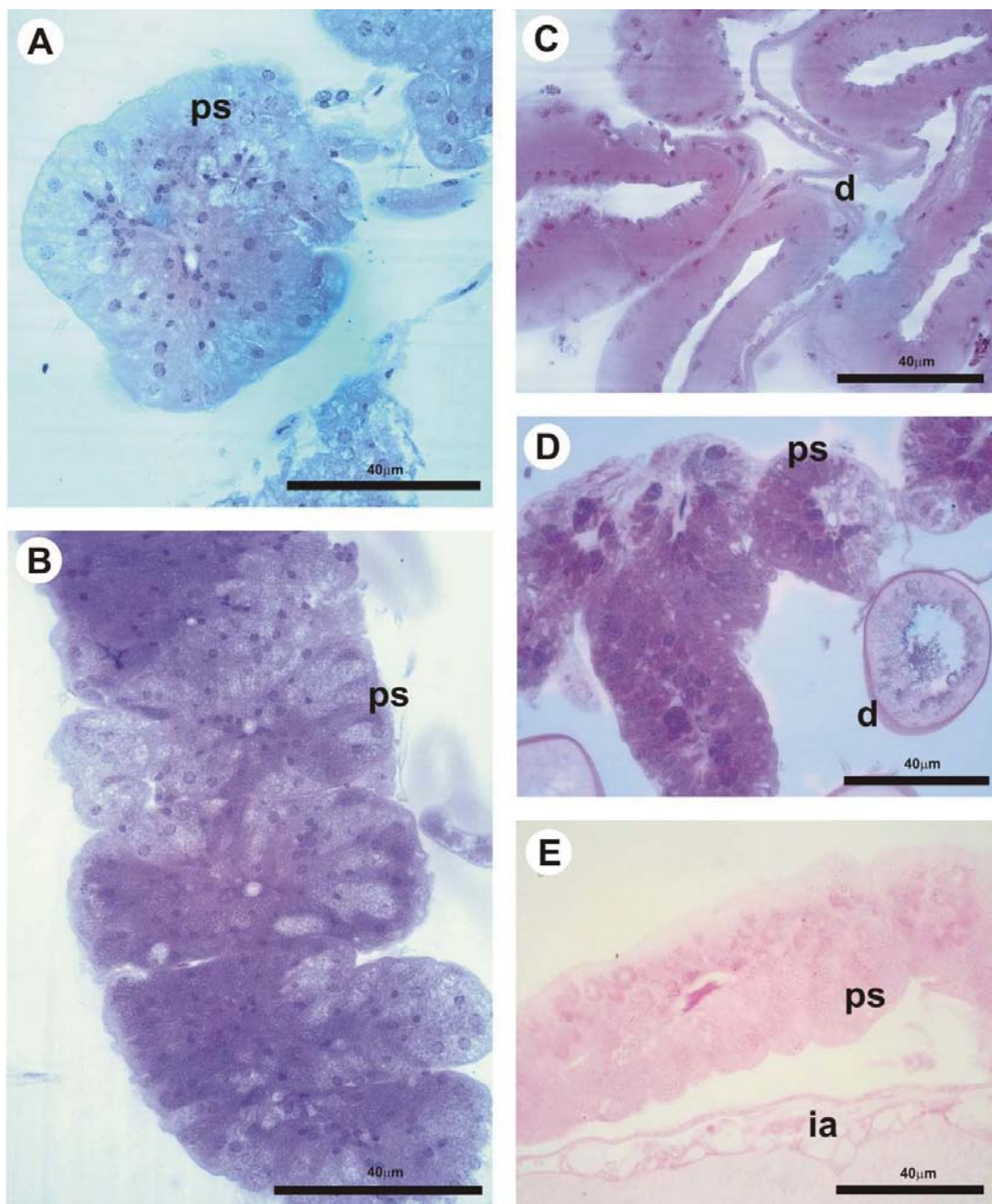


Figura 4

ARTIGO 2

Midgut of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus*: structure, function and redefinition of hepatic cells

Intestino médio do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus*: estrutura, função e redefinição das células hepáticas

Cristina Moreira de Sousa¹, Carmem Silvia Fontanetti², Mônica Iamonte

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.
Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil
1: cris.sousa.bio@hotmail.com; 2: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Diplópodos são considerados importantes macro-artrópodes do solo, devido ao fato de estarem envolvidos na manutenção do equilíbrio do ecossistema. Comumente estes animais não apresentam população numerosa, porém há relatos de explosões populacionais ocasionadas por desequilíbrios ambientais, mudanças climáticas e utilização de pesticidas que eliminam possíveis competidores. O milípede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi e Fontanetti, 2006, têm apresentado pontos de infestação em centros urbanos, do estado de São Paulo, causando muitos transtornos à população humana. Com objetivo de contribuir para o conhecimento desta potencial praga, este trabalho apresenta a descrição histológica, histoquímica e ultra-estrutural do intestino médio do milípede *U. atrobrunneus*. A região do intestino médio é caracterizada pela ausência da íntima cuticular, sendo formado por um epitélio pseudoestratificado, apoiado por uma membrana basal espessa, seguido de uma camada muscular e uma camada de células hepáticas, musculatura, revestido por uma membrana externa. A morfologia observada aqui se assemelha bastante com as descrições de outras espécies de diplópodos estudadas até o momento.

Keywords: Histologia, Histoquímica, Ultra-estrutura, Diplopoda, Trato digestório, Secreção apócrina.

INTRODUÇÃO

Diplópodos em geral, não apresentam população numerosa, no entanto relatos sobre espécies que apresentaram explosões populacionais são encontrados, normalmente ocasionadas por desequilíbrios ambientais (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1950; BIERNAUX, 1966; MAFF, 1984; NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 1997, 2002; KANIA; TRACZ, 2005; FONTANETTI et al., 2010a). Em virtude da alta proliferação que o milípede *Urostreptus atrobrunneus*, espécie recentemente descrita (PIEROZZI; FONTANETTI, 2006), tem apresentado em alguns centros urbanos no estado de São Paulo, vários pesquisadores demonstraram interesse no estudo da mesma (BOCCARDO, 1998; FONTANETTI et al., 2007; 2010b).

O tubo digestório dos milípedes apresenta-se basicamente na forma de um tubo reto que se inicia na boca e termina no ânus, dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Com exceção do intestino médio, todo o tubo digestório é revestido internamente por uma íntima cuticular. Glândulas salivares encontram-se ladeando o intestino anterior e são responsáveis pela produção de secreções que lubrificam o alimento ingerido, além de conter enzimas digestivas que auxiliam no início da digestão (NUNEZ; CRAWFORD, 1977; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997; FANTAZZINI et al., 1998).

O intestino médio dos milípedes, situado após o intestino anterior e antes da região pilórica, apresenta fundamental importância na participação do processo digestivo do animal; algumas enzimas são secretadas sobre as partículas de alimento por células epiteliais e outras podem ser derivadas de microrganismos do lúmen (HOPKIN, READ, 1992).

A estrutura e a função do intestino médio de diplópodos foram descritas para poucas espécies (BOWEN, 1968; NUNEZ; CRAWFORD, 1977; HUBERT, 1979; 1988; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997; FONTANETTI et al., 2001; FANTAZZINI et al., 2002; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

Raros são os trabalhos conduzidos em espécies brasileiras e a maioria da literatura é restrita a somente algumas ordens. Fontanetti e Camargo-Mathias (1997) descreveram morfológica e histologicamente o trato digestório da espécie *Plusiopurus setiger* (Spirostreptida). Fantazzini et al. (2002) descreveram a anatomia do intestino médio de *Rhinocricus padbergi* (Spirobolida) por meio de análises histológicas e histoquímicas; posteriormente, Camargo-Mathias et al. (2004) apresentaram a caracterização ultra-estrutural do intestino médio da mesma espécie.

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar a primeira descrição da morfologia do intestino médio da espécie *U. atrobrunneus*, por meio de análises histológica, histoquímica e ultra-estrutural, relacionando os resultados às funções desempenhadas pelo órgão. Foi objetivo também rever a designação das chamadas células hepáticas, termo controverso na literatura pertinente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes foram coletados pelo prof. Dr Edilberto Gianotti e pelo mestrando Raphael Baston de Souza nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil, (22°23'59''S; 47°34'18''W). Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e folhigo, umedecidos periodicamente. O tubo digestório foi obtido por dissecação dos espécimes anestesiados, com éter sulfúrico, feita em placas de dissecação contendo solução fisiológica. O tubo digestório foi fixado em solução Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio dependendo da técnica aplicada. O material foi incluído em historesina e corado com hematoxilina/eosina para análise histológica. Os testes histoquímicos aplicados foram: Xylidine Ponceau (MELO; VIDAL, 1980) e Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985) para detecção de proteínas; Ácido Periódico-Schiff (PAS) e técnica simultânea PAS e Azul de Alcian (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos; método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para cálcio; e Azul do Nilo (LISON, 1960) e Sudan Black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para lipídios.

O material processado para microscopia eletrônica de transmissão foi fixado em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0.1M a 4° C, lavados em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas; novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas; após este procedimento foi feita uma desidratação do material em série crescente de acetona, submetendo-o à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas; o mesmo foi embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado pra estufa a 70° C por 24 horas para a polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrotomo e as grades obtidas foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100.

RESULTADOS

Histologia

O intestino médio é composto por um epitélio pseudoestratificado, apoiado numa lâmina basal, seguido de camada muscular, uma camada de células hepáticas, musculatura irregularmente distribuída, revestido externamente por uma membrana chamada membrana externa. Intimamente associado ao intestino observou-se o corpo gorduroso perivisceral (Fig. 1A).

O epitélio é formado por três tipos celulares: as células principais ou absorptivas, em maior número, as quais apresentam um bordo em escova bem definido; na base do epitélio observam-se células menores, chamadas de células regenerativas (Fig. 1B); por entre as células absorptivas são observadas células secretoras (seta fig. 1C).

Ao longo de todo o intestino observa-se uma membrana peritrófica constituída por camadas acelulares (Figs. 1A, B).

A secreção liberada pelas células epiteliais é do tipo apócrina, ou seja, na liberação parte da célula é perdida junto com a secreção (Figs. 1B, C).

Histoquímica

As análises histoquímicas mostram que o epitélio reagiu fortemente à detecção de proteína, enquanto que as células hepáticas reagiram de moderada a fracamente positivas (Figs. 2A, B).

A secreção liberada pelas células epiteliais é de natureza glicoprotéica; algumas vesículas se coram fortemente pelas técnicas para detecção de proteínas (Figs. 2A, B) e outras se coram mais pela técnica para detecção de polissacarídeos neutros (Fig. 2C).

A presença de polissacarídeos neutros é observada no bordo em escova, na membrana basal e em algumas células hepáticas (Fig. 2C).

Há uma quantidade razoável de cálcio nas células principais (Fig. 2D).

Observa-se uma pequena quantidade de lipídios no bordo em escova das células epiteliais e em algumas células hepáticas (dados não demonstrados).

Ultra-estrutura

A análise ultra-estrutural possibilitou uma caracterização mais detalhada do epitélio, bem como das células que o compõem.

Observa-se que as células absorptivas (principais) apresentam numerosas microvilosidades em sua face livre (Fig. 3A); entre as células principais observam-se células secretoras, juntamente com a liberação da secreção apócrina (Fig. 3A), ou seja, o produto

sendo lançado com a porção do citoplasma apical. As células epiteliais são apoiadas por uma espessa lâmina basal, onde são observadas projeções citoplasmáticas das mesmas (Fig. 3B).

O citoplasma das células principais é rico em retículo endoplasmático rugoso (RER) (Fig. 4A) e esferocristais (fig. 4B); além disso em seu domínio apical é possível visualizar um grande número de mitocôndrias elétron-lúcidas (Fig. 4C).

A união das células epiteliais se dá por interdigitações e junções oclusivas, porém observa-se em várias regiões a ocorrência de espaços intercelulares dilatados (Fig. 4D).

Os esferocristais encontrados no citoplasma das células principais são facilmente removidos durante a microtomia, resultando em sítios vazios; é possível visualizar que o acúmulo de material no esferocristal ocorre de modo a formar camadas concêntricas (setas na Fig. 5A). Os esferocristais são envoltos por membrana e apresentam um íntimo contato com o retículo endoplasmático rugoso (Fig. 5B).

As células regenerativas, situadas na base do epitélio, apresentam núcleo volumoso, nucléolo bem evidente, citoplasma menos elétron-denso que o observado nas células absorptivas, com várias mitocôndrias mais elétron-densas que as observadas nas células absorptivas (Fig. 5C).

As células hepáticas apresentam um citoplasma heterogêneo (Fig. 6A), grande quantidade de mitocôndrias, vacúolos de aspectos variados e núcleo volumoso (Figs. 6D, E). Vários espaços vazios são observados no citoplasma destas células, em decorrência da microtomia que retira os grânulos aí presentes (setas nas figs. 6A, B).

Por entre as células hepáticas são observados alguns hemócitos em diferentes estágios de maturação (Fig. 5F, 6A, B, C).

DISCUSSÃO

O intestino médio de *U. atrobrunneus* apresentou um epitélio pseudoestratificado, constituído de células absorptivas ou principais, células regenerativas e células secretoras, assim como foi descrito para outras espécies de diplópodos, como por exemplo *Oxidus gracilis* (NEUMANN, 1985 apud HOPKIN; READ, 1992), *Glomeris marginata* (MARTIN; KIRKHAM, 1989 apud HOPKIN; READ, 1992), *Plusiopurus setiger* (FONTANETTI et al., 1997) e *Rhinocricus padbergi* (FANTANZZINI et al., 2002).

Bowen (1968) relatou a presença de um epitélio colunar pseudoestratificado no intestino médio de *Floridobolus penneri* e *Narceus gordanus*, ambos Spirobolida; para todas as outras espécies de diplópodos estudadas foi relatado um epitélio simples prismático. Isto foi confirmado ultra-estruturalmente por Hubert (1979b) em *Cylindroiulus londinensis*. Em

contrapartida, em *R. padbergi*, a análise ultra-estrutural revelou um epitélio pseudoestratificado (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

Ao longo do intestino médio observou-se também a presença de uma membrana peritrófica, a qual está intimamente associada às células intestinais. Nunez e Crawford (1977) comentaram que esta estrutura é bem estabelecida em Diplopoda.

Puderam ser observadas numerosas vesículas de secreção lançadas em direção ao lúmen. Estas vesículas apresentaram vários graus de coloração em seu conteúdo, sugerindo assim um grau de maturação ou um processo de desidratação das secreções durante o seu transporte, do citoplasma para o lúmen intestinal, como proposto também por Fantazzini et al. (2002) e Fontanetti et al. (2001).

É possível que as vesículas de secreção contenham diferentes materiais. Em diplópodos, o tipo de lançamento da secreção pode ser apócrina como observado aqui, e descrito por Fontanetti et al. (2001) para espécie *P. setiger* e por Fantazzini et al. (2002) para *R. padbergi*, ou merócrina como observou Hefner (1929) para *Parajulus impressus*; este último autor porém sugeriu que em outros milípedes a liberação deve ser do tipo holócrina.

A análise histoquímica mostrou uma reação positiva para proteínas no epitélio e nas células hepáticas, indicando a alta concentração de proteínas nesta região. Com exceção das células secretoras, o epitélio reage fracamente aos ensaios de polissacarídeos neutros, o que sugere que este epitélio participa da produção dos polissacarídeos neutros, mas não os armazena. Os testes realizados para a detecção de lipídios demonstraram a presença deste elemento em pequena quantidade no bordo em escova e nas células hepáticas, isto indicaria que o intestino médio de *U. atrobrunneus* pouco participa do metabolismo destes elementos.

A presença de cálcio no intestino médio de diplópodos é bem estabelecida, uma vez que estes animais revolvem terra; a presença deste elemento representa um modo de detoxicação, processo bem descrito para invertebrados, incluindo os diplópodos (FONTANETTI et al., 2006).

Segundo Fantazzini et al. (2002) essa presença de cálcio nas células principais sugere que o epitélio pode estar envolvido no transporte deste elemento; fato semelhante foi observado em *R. padbergi*; nestes casos, ocorre a precipitação de metais como grânulos intracelulares de diferentes tipos, que depois de estocados são excretados por liberação direta pelas vesículas secretoras para o lúmen intestinal ou por substituição do epitélio intestinal (HUBERT, 1979a; NOGAROL; FONTANETTI, 2010a; GODOY; FONTANETTI, 2010).

Hopkin e Read (1992) também observaram numerosos grânulos de fosfato de cálcio dispostos concentricamente dentro das células intestinais dos diplópodos. De acordo com

Hubert (1979b), como o intestino médio representa um local de acumulação de minerais e tem um papel importante na regulação iônica do organismo, conseqüentemente, a eliminação cíclica de grânulos seria uma forma de excreção. Supõe-se que a excreção de minerais em *U. atrobrunneus*, ocorra basicamente do mesmo modo, uma vez que inúmeros esferocristais também são observados no intestino médio da espécie e o acúmulo de material dentro destes também encontra-se disposto de forma concêntrica.

Segundo Fontanetti et al. (2006) esferocristais podem ser denominados também como corpos mineralizados, e que os mesmos podem variar na organização estrutural dentro de diferentes células, de diferentes regiões do corpo, com diferentes aspectos. Observaram que os corpos esféricos apresentavam-se envoltos por membrana, porém não associados a organelas como o retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi. Em *U. atrobrunneus*, os esferocristais também encontram-se envoltos por membrana, sendo possível visualizar um íntimo contato com o retículo endoplasmático rugoso.

Para Locke (1984) os esferocristais originam-se nas cisternas destes retículos e são formados pela conjugação de sais minerais com o estroma polianiónico. O acúmulo de sais minerais nestes esferocristais é considerado um importante mecanismo de manutenção da homeostase no organismo. O acúmulo de materiais em diversos casos revela um processo de equilíbrio de íons que envolvem vários fenômenos fisiológicos, especialmente a reciclagem, armazenamento e excreção de minerais.

A descrição ultra-estrutural da espécie *R. padbergi* (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004) foi muito semelhante ao encontrado no presente trabalho, ou seja, o epitélio é organizado de forma pseudoestratificada, constituído por células absorptivas (ou principais), células regenerativas e células secretoras. Foram observadas as mesmas organelas nas células epiteliais, com exceção dos aparelhos de Golgi. Em *U. atrobrunneus*, estes não foram encontrados, enquanto que em *R. padbergi* foram observados vários, liberando vesículas secretoras próximas ao núcleo. A presença de esferocristais também foi relatada para *R. padbergi*.

De acordo com este mesmo trabalho, a organização estrutural da porção basal das células absorptivas no intestino médio de *R. padbergi* suporta a idéia de que além desta região absorver compostos a partir de alimentos, essas células também podem estar envolvidas no transporte de elementos da hemolinfa; a morfologia é semelhante às células tubulares renais dos vertebrados e têm a função de transporte de íons; o grande número de mitocôndrias visto nesta região suporta a hipótese de uma função semelhante para as células absorptivas. Analisando os resultados do presente trabalho pode-se sugerir que o mesmo deva ocorrer com

U. atrobrunneus, uma vez que uma expressiva quantidade de mitocôndrias também foi verificada.

As células secretoras, consideradas comuns no intestino de várias espécies de animais, servem para lubrificar a superfície epitelial e/ou produzir substâncias de natureza mucosa e/ou serosa, a qual pode auxiliar na absorção (HOPKIN; READ, 1992).

A comparação entre insetos e diplópodos torna-se interessante, no sentido de que ambos compartilham de características semelhantes entre as estruturas observadas no intestino médio. Segundo descrições realizadas por Champman (1998) sobre o trato digestório de insetos, o intestino médio destes animais é uma região ativamente envolvida no processo de produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes.

Champman (1998) relata ainda que a maioria das células que compõem o intestino médio dos insetos são as células principais, as quais são altas e colunares, cuja membrana voltada para o lúmen apresenta numerosas microvilosidades, as quais aumentam consideravelmente a área de absorção. Durante a síntese de enzimas, as células principais são caracterizadas pela presença de pilhas de retículo endoplasmático rugoso e aparelhos de Golgi; na maioria dos insetos a síntese destas enzimas parece ocorrer somente no momento em que serão secretadas para o lúmen, para sua utilização, de modo que não ocorram reservas destas nas células.

Segundo o mesmo autor, as células principais do intestino médio têm uma vida limitada e, na maioria dos insetos, elas são constantemente substituídas a partir de células regenerativas presentes na base do epitélio do intestino médio.

Já em diplópodos, os estudos realizados até o momento e os resultados obtidos neste trabalho apontam que a disposição das células principais e a presença de microvilosidades na porção apical destas células do intestino, com o intuito de aumentar a de na base do epitélio, também ocorrem e por isso são fatores em comum entre os dois grupos taxonômicos e, provavelmente, as funções relacionadas a cada tipo celular também sejam as mesmas.

Hopkin e Read (1992) relataram que as células absorptivas dos milípedes são unidas basalmente com as células hepáticas através de interdigitações. De acordo com Seifert e Rosenberg (1977), as células hepáticas não formam um epitélio e não estão interconectadas umas as outras, no entanto, células hepáticas possuem uma membrana plasmática basal, que se ramifica entre as células absorptivas do intestino médio; a presença de junções “fusiformes” entre as células hepáticas sugere que há um transporte aberto entre estes dois tipos de células.

Neste trabalho observou-se que as células hepáticas formam uma camada contínua ao longo de todo intestino médio, mas sem conexão com as células epiteliais. Vários estudos

indicaram que as células hepáticas desempenham funções complementares com as demais células intestinais, estão envolvidas não só na absorção de produtos da digestão, mas também na retenção de minerais (HUBERT, 1978; 1979b).

Face ao exposto a análise ultra-estrutural revelou que o intestino médio da espécie em questão compartilha de características não só com outras espécies de diplópodos, mas também com de insetos.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Cristiane Miléo, Gerson Mello e Mônica Iamonte pelo apoio técnico, a Edilberto Giannotti e Raphael Baston de Souza pelo auxílio nas coletas e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BIERNAUX, J. Incidence économique des Iules en culture betteravière. *Mede-delingen van de Rijksfalculteit Landbouwwetenschappen te Gent*, n. 31, p. 717-729, 1966.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocinio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool.**, v.18, p.62-63, 1997.
- BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia-SP . In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, 1998, Recife, PE. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia–Abstract 142 , 36, 1998 .
- BOCCARDO, L; FERNANDES, M. N. Toxicidade do Carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Rev Bras Toxicol.**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S. JUCÁ-CHAGAS, R Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.220-223, 2002.
- BOWEN, R. C. Histochemical studies on two millipedes species, Ohio J. Sci. v.68, p.85-91, 1968.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida) Braz. I. Morphol. Sci., v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.
- CHAMPMAN, R. F. **The insects: Structure and Function**. Elsevier: New York, 4 ed, 769, 1998.
- CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Economics of the ‘spotted snake millipede’ *Blaniulus guttulatus* Bosc. *Annals and Magazine of Natural History*, Seireis 12, n. 2, p. 947-962, 1950.

- FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (1938) (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta*, 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.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histoanatomy of the digestive tract in *Plusioporus setiger* diplopod (Brolemann, 1901) (Spirostreptida, Spirostreptidae), Brazil. **J. Morphol.**, v.14, n.2, p.205-211, 1997.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Apocrine secretion in the midgut of *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) (Diplopoda, Spirostreptidae), *Naturalia*, v.26, p.35-42, 2001.
- FONTANETTI, C. S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Braz. J. Morphol. Sci.*, n. 23, v. 3-4, p. 487-493, 2006.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Infestação de millípedes em região urbana na cidade de Campinas, São Paulo – Brasil. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, campus de Rio Claro, 2007.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. *Arquivos do Instituto Biológico, SP*, v. 77, n. 1, p. 165-166, 2010a.
- FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CALLIGARIS, I. B.; BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. *Animal Biology*, v. 60, p. 467-478, 2010b.
- GODOY, J. A. P.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing Sewage seudge water, *Air soil Pollution* DOI 10.1007/s11270-009-0261-z, 2009.
- HEFNER, R. A. Studies of parajulid diplopods. The micro-anatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* V. 48, n.2, p. 321-339, 1929.
- HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.

- HUBERT, M. Données hidtophysiológicas complémentaires sur lès bio-accumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinenseis* (Leach, 1914), (Diplópode, Iuloidea). Archives de Zoologie Experimentale et Générale, v.119, p.669-683, 1978a.
- HUBERT, M. Les cellules hépatiques de *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814), (Diplopode, Iuloidea). Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, **286D**, p.627-630, 1978b.
- HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In Myriapod biology, ed. M. Camatini, Academic Press, London, p.127-134, 1979a.
- HUBERT, M. L'intestin moyen de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psylopygus* Latzel) (Diplopoda, Iuloidea): observations ultrastructurales en relation avec la fonction d'accumulation, Ibid. T.289D, p.749-752, 1979b.
- HUBERT, M. Le complexe anatomique et fonctionnel des cellules hépatiques-mesenteron de *Cylindroiulus londinenses* Leach (*psylopygus* Latzel): etude ultrastructurale et spectrographique, Bull. Soc. Zool. France. T.113, p.191-198, 1988.
- KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v.4, p.57-66, 2005.
- LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: Insect Ultrastructure. V. 2, (King RC, Akai H, ed). P.151-197, Plenum Press: New York, 1984.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. 123p.
- LISON, L. Histochimieetcytochimieanimales. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.
- MAFF. Millipedes and Centipedes. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Advisory Leaflet. HMSO, London, 1984.
- MELO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Práticas de biologia celular. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980, 69p.
- NIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Jour. Ecol**, v.38, p.257-268, 1988.
- NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water Air Soil Pollut.** DOI 10.1007/s11270-020-0666-8. 2010.

- NUNES, F. S.; CRAWFORD, C. S. Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Diplopoda: Spirostreptidae); J. Morphol., v.151, p. 121-130, 1977.
- PEARSE, A. T. E. Histochemistry: theoretical and applied. London: J&A. Churchill, 1985, 998p
- PIEROZZI, P.H.B; FONTANETTI, C.S. A new species of *Urostreptus* (Diplopoda, Spirostreptidae): description and chromosome number. **Iheringia**, v. 96, n.2, p.209-212, 2006.
- SEIFERT, G.; ROSENBERG, J. Feinstruktur der leberzellen von *Oxidus gracilis* (C. L. Koch, 1847), (Diplopoda, Paradoxosomatidae). Zoomorphogy, v.88, p.145-162, 1977.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1A, B, C. Secções histológicas do intestino médio de *U. atrobrunneus*, coradas com hemtoxilina/eosina.

cgp- corpo gorduroso perivisceral; ch- célula hepática; cr- célula regenerativa; cm- camada muscular; e- epitélio; l- lúmen; me- membrana externa; mp- membrana peritrófica; s- secreção; seta- célula secretora.

Figura 2. Secções histológicas do intestino médio de *U. atrobrunneus*. A- submetida à técnica de azul de bromofenol; B- submetida à técnica de xilidina ponceau; C- submetida à técnica de PAS; D- submetida à técnica de von kossa.

ch- camada de células hepáticas; cm- camada muscular; e- epitélio; l- lúmen; mb- membrana basal; mp= membrana peritrófica; s- secreção.

Figura 3: Micrografias eletrônicas do intestino médio de *U. atrobrunneus*. A. Detalhe da região apical do intestino; B. Detalhe da lâmina basal.

cs= célula secretora; cp= célula principal; e= epitélio; ec= esferocristal; lb= lâmina basal; m= mitocôndria; mv= microvilosidades; n= núcleo; s= secreção.

Figura 4: Micrografias eletrônicas das células absorptivas do intestino médio de *U. atrobrunneus*. A. Detalhe do citoplasma, mostrando a abundância de retículo endoplasmático rugoso; B. Células com esferocristais; C. Detalhe do domínio apical da célula; D. Detalhe das junções celulares.

jo= junção de oclusão; ec= esferocristal; ei= espaço intercelular; m= mitocôndrias; mv= microvilosidades; n= núcleo; rer= retículo endoplasmático rugoso.

Figura 5: Micrografias eletrônicas do intestino médio de *U. atrobrunneus*. A, B. Detalhes de esferocristais; C. Célula regenerativa; D. Hemócito.

cr= célula regenerativa; ec= esferocristal; h= hemócito; lb= lâmina basal; rer= retículo endoplasmático rugoso; n= núcleo; m= mitocôndria; setas em A= camadas concêntricas observadas nos esferocristais; seta em B= membrana envolvendo o esferocristal.

Figura 6: Micrografias eletrônicas do intestino médio de *U. atrobrunneus*. A. Camada muscular + camada de células hepáticas; B, C. Detalhe dos hemócitos; D, E. Detalhes das células hepáticas.

cm= camada muscular; ch= célula hepática; m= mitocôndrias; n= núcleo; v= vacúolo; setas em A- grânulos; setas em B- espaços vazios onde se localizavam os grânulos.

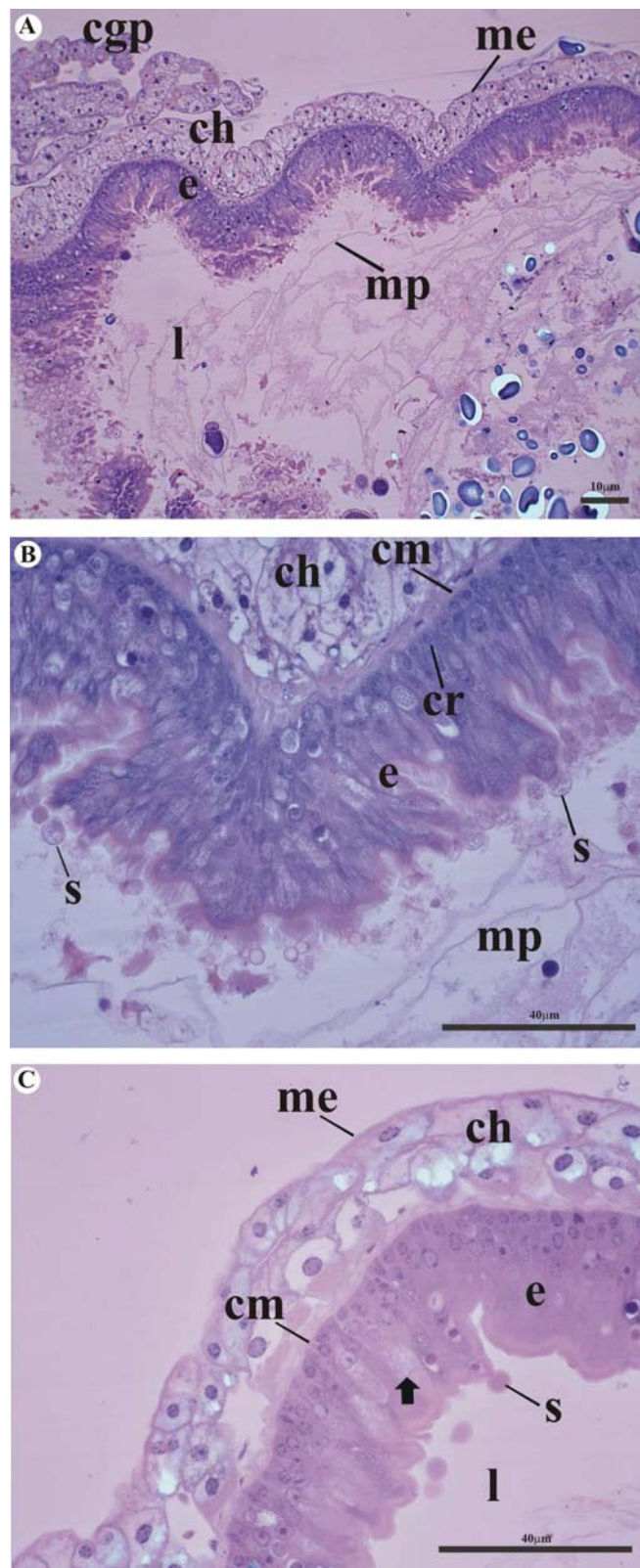


Figura 1

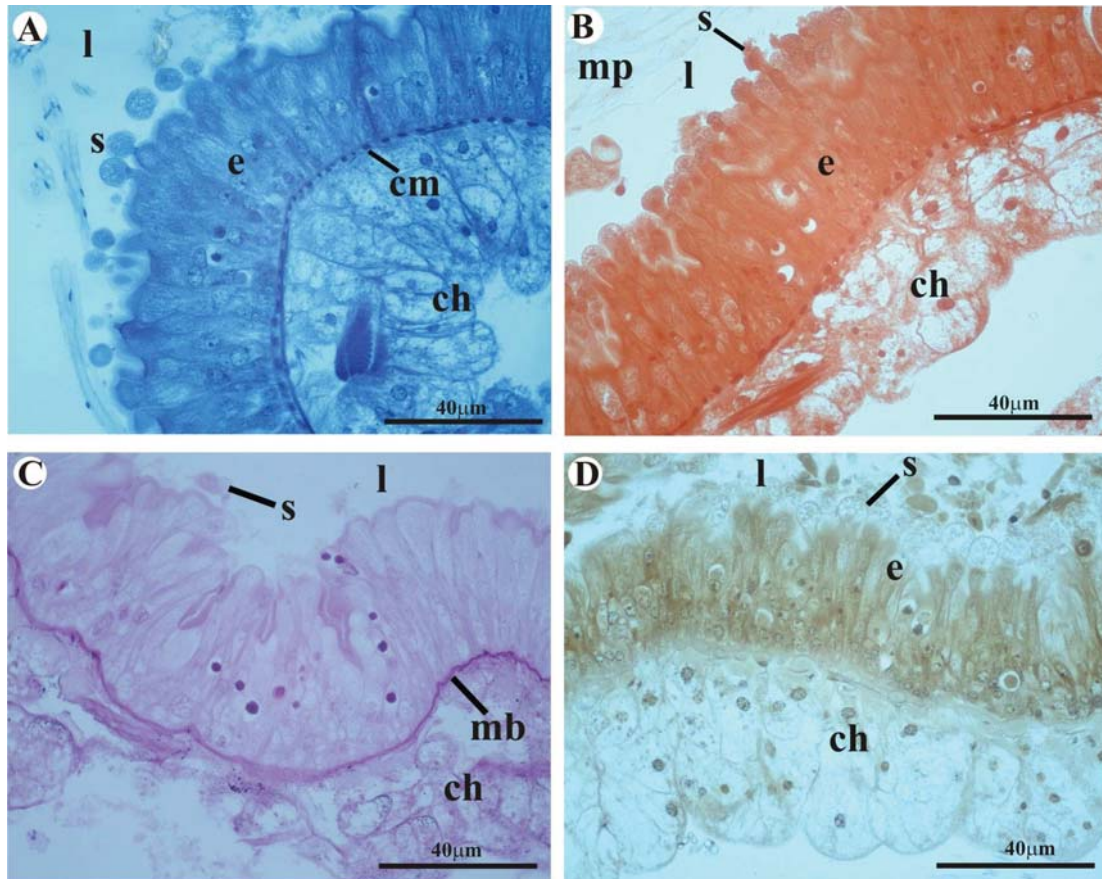


Figura 2

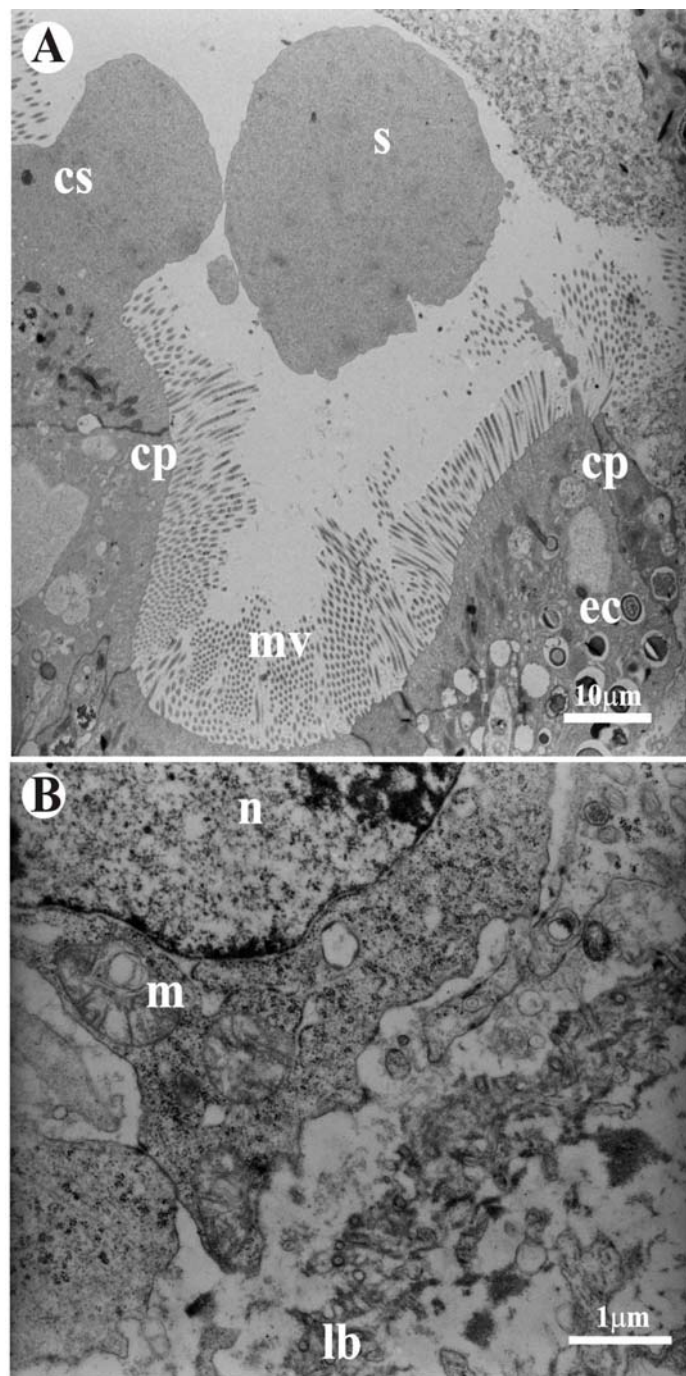


Figura 3

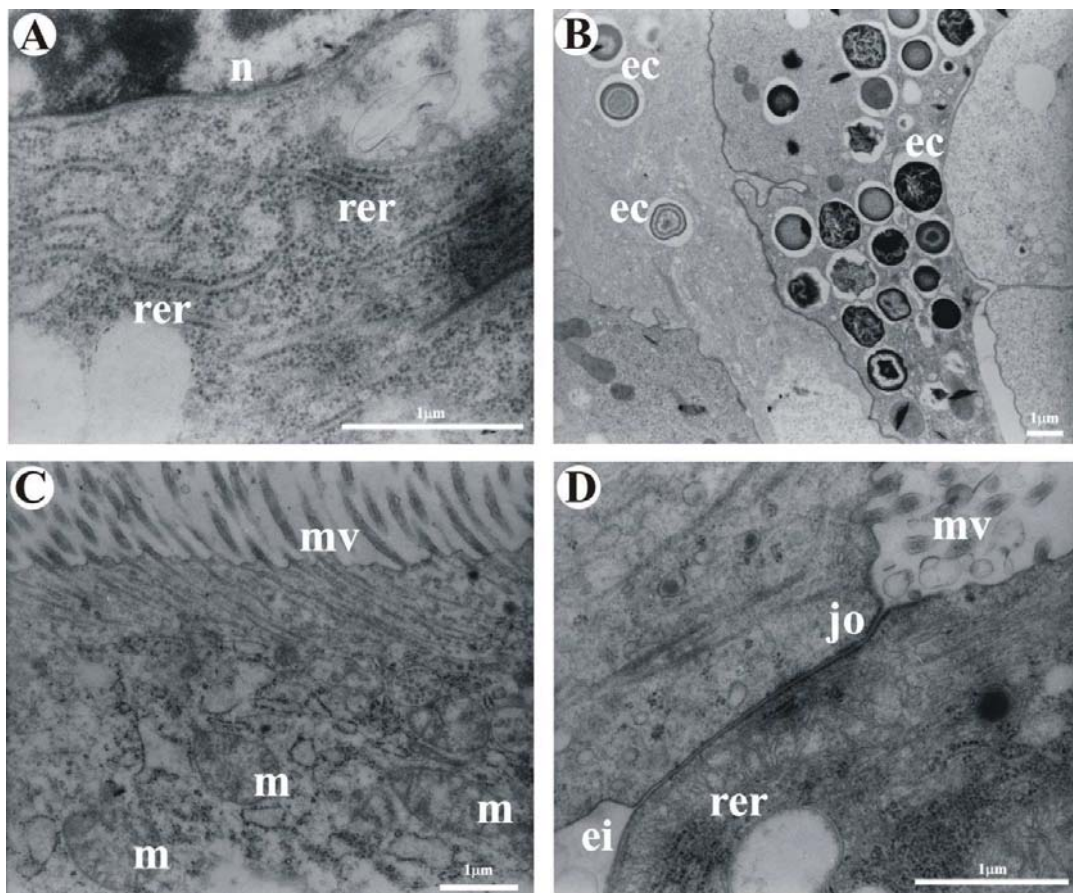


Figura 4

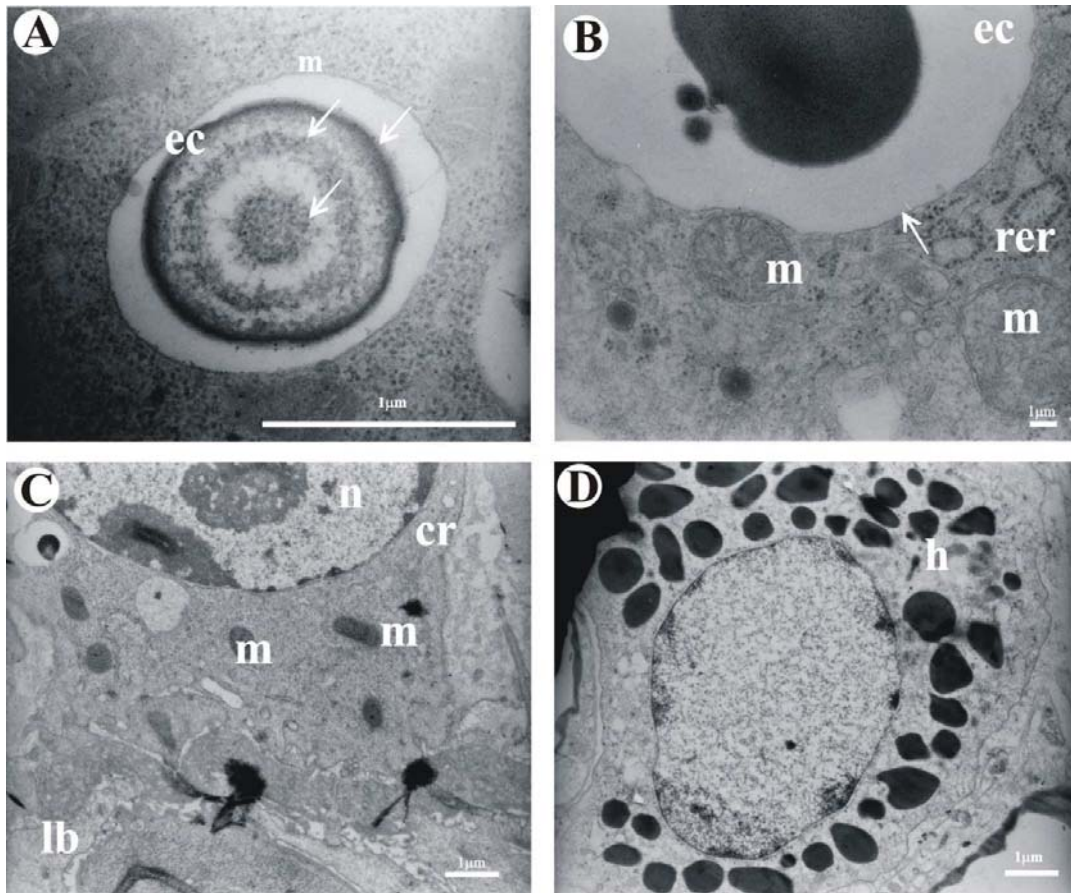


Figura 5

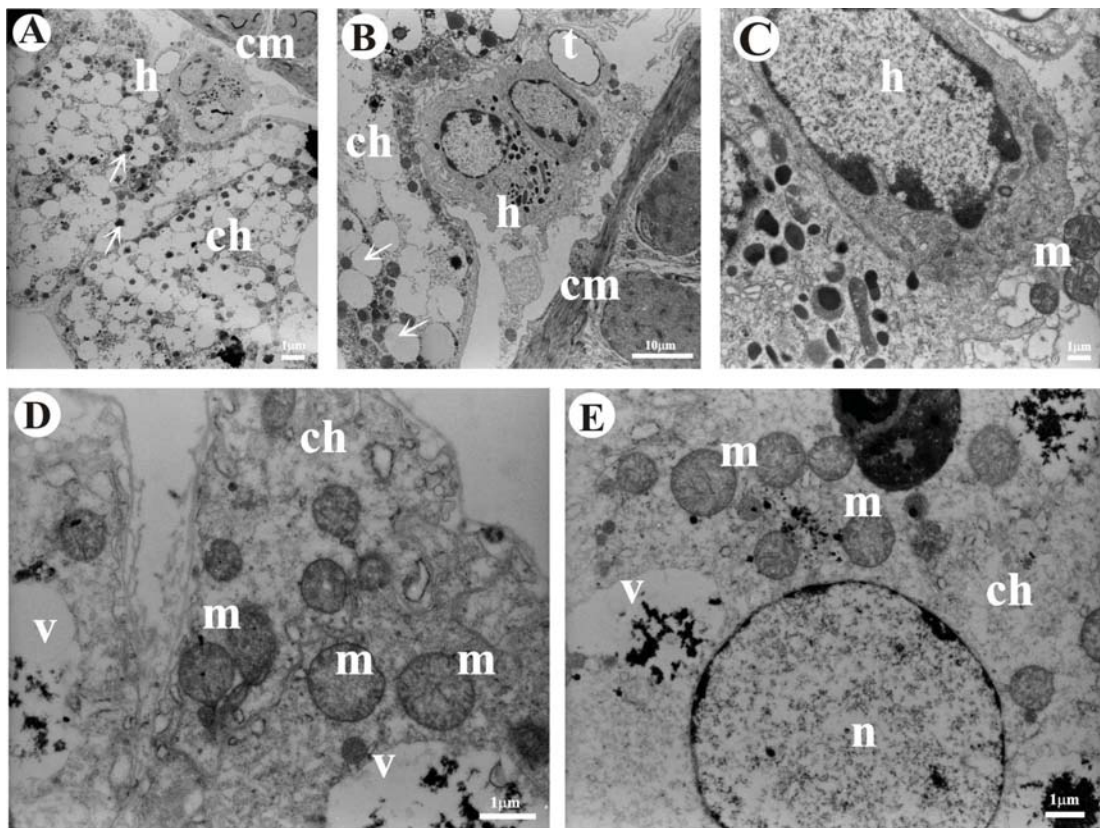


Figura 6

ARTIGO 3**Histological and histochemical hindgut of synanthropic diplopod *Urostreptus atrobrunneus*****Análise histológica e histoquímica do intestino posterior do diplópodo sinantrópico *Urostreptus atrobrunneus*****Cristina Moreira de Sousa¹, Carmem Silvia Fontanetti²****Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.****Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil****1: cris.sousa.bio@hotmail.com; 2: fontanet@rc.unesp.br****RESUMO**

Diplópodos são importantes macro-artrópodes do solo; desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do ecossistema, visto que se alimentam de matéria orgânica em decomposição, promovendo o enriquecimento, aeração e humidificação do solo; apresentam pouco ou nenhum inimigo natural devido à presença de sais de cálcio em seu tegumento que os torna muito resistentes, além da presença das glândulas de defesa, que liberam uma substância tóxica de odor forte e desagradável, quando estes animais são ameaçados. Não apresentam população numerosa, porém explosões populacionais podem ocorrer causadas por desequilíbrios no meio ambiente, mudanças climáticas e utilização de pesticidas que podem eliminar possíveis competidores. Neste sentido, o milípede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi e Fontanetti, 2006, têm apresentado pontos de infestação em centros urbanos do estado de São Paulo, causando muitos transtornos à população humana. Por se tratar de espécie recém descrita, sua biologia, morfologia e comportamento reprodutivo permanecem desconhecidos o que dificulta um controle eficaz da espécie. Assim, foi objetivo deste trabalho, estudar a estrutura e função da região do intestino posterior do tubo digestório desta espécie, para maior conhecimento de sua biologia visando oferecer subsídios para elaboração de meios de controle da mesma. O intestino posterior de *U. atrobrunneus* é formado pelo piloro, seguido de uma região denominada de íleo/colo e de uma região retal. Histologicamente é formado por um epitélio colunar simples e uma musculatura mais ou

menos desenvolvida, dependendo da região observada. Toda a íntima cuticular é provida de microespinhos.

Keywords: Tubo digestório; Milípede; Spirostreptidae; Espécie praga.

INTRODUÇÃO

Cientificamente denominados diplópodos ou milípedes, os piolhos-de-cobra formam um grupo de aproximadamente 10.000 espécies recentemente descritas. Os Diplopoda formam o maior táxon de miriápodos, e os especialistas estimam que, podem existir quase 80.000 espécies viventes. A distribuição destes animais é cosmopolita, mas são especialmente abundantes nos trópicos (RUPPERT; BARNES, 2005).

Estes animais geralmente vivem em lugares úmidos e escuros e possuem exoesqueleto bastante resistente, impregnado por sais de cálcio, com exceção da subclasse Pselaphognata.

Não é comum que diplópodos apresentem populações numerosas, mas ao que parece, explosões populacionais estão relacionadas a desequilíbrios no meio ambiente, mudanças climáticas e utilização de pesticidas que pode eliminar possíveis competidores. Nos últimos anos, migrações e explosões populacionais de milípedes têm ocorrido com certa frequência, o que têm atraído atenção de pesquisadores (NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 2002; FONTANETTI et al., 2007). Recentemente a espécie *Urostreptus atrobrunneus* vem apresentando focos de infestação no estado de São Paulo, preocupando a população humana afetada (BOCCARDO, 1997; FONTANETTI et al., 2010).

O trato digestório dos milípedes apresenta-se na forma de um tubo reto que se divide em três porções diferentes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Exceto o intestino médio, todo o tubo digestório é revestido internamente por uma cutícula (HOPKIN; READ, 1992); assim, tanto o intestino anterior como o intestino posterior são invaginações epidérmicas, cujas células secretam uma camada de cutícula semelhante ao da superfície externa do corpo. Esta cutícula, chamada íntima, pode apresentar protuberâncias as quais se parecem com dentículos, microespinhos ou cerdas (ELZINGA, 1998; MYIOSHI et al., 2005).

O intestino posterior tem seu início marcado não só pelo reaparecimento da íntima cuticular, mas também por uma estrutura tubular denominada piloro, onde são inseridos os túbulos de Malpighi. Estas estruturas estão envolvidas funcionalmente na osmorregulação e excreção desses animais (HUBERT 1979a, b). O comprimento do piloro difere conforme as espécies (FANTAZZINI et al., 1998; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 1997).

Fontanetti e Camargo-Mathias (1997) descrevendo o tubo digestório da espécie *Plusioporus setiger* citaram que o intestino posterior é formado pelo piloro e reto, não sendo observadas subdivisões de outros compartimentos. Em outras espécies foram observados compartimentos ao longo do intestino posterior; segundo Hefner (1929), *Parajulus impressus* apresenta seis regiões distintas. Crawford et al. (1983) mencionaram a presença de um íleo e um cólon para *Othopurus ornatus*.

O piloro é uma região diversificada quanto ao aspecto da íntima cuticular. Miyoshi et al. (2005), estudando duas espécies, *Rhinocricus padbergi* (Spirobolida) e *Pseudonannolene tricolor* (Spirostreptida) observaram diferentes arranjos estruturais dos microespeinhos no piloro das espécies.

Segundo Elzinga (1998), os microespinhos encontrados ao longo do trato digestório dos artrópodes parecem ser simplesiomórficos e podem atuar na filtragem do alimento digerido, no movimento contínuo dos alimentos através do trato digestório, evitando o refluxo, na retenção de organismos simbiontes e na proteção das camadas celulares de partículas ingeridas.

Em decorrência dos relatos acerca das infestações causadas pelo milípede *U. atrobrunneus* e da necessidade de uma melhor investigação referente à espécie, este estudo visou esclarecer a morfologia da região correspondente ao intestino posterior do tubo digestório do mesmo, através de análises histológica e histoquímica e por meio de comparações com os estudos já realizados com outras espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes foram coletados pelo prof. Dr. Edilberto Gianotti e pelo mestrando Raphael Baston de Souza nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil, (22°23'59''S; 47° 34'18''W). Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e folhigo, umedecidos periodicamente. O tubo digestório foi obtido por dissecação dos espécimes anestesiados, com éter sulfúrico, feita em placas de dissecação contendo solução fisiológica. O tubo digestório foi fixado em solução Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio dependendo da técnica aplicada. O material foi incluído em historesina e corado com hematoxilina/eosina.

Os testes histoquímicos aplicados foram: Xylidine Ponceau (MELO; VIDAL, 1980) e Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985) para detecção de proteínas; Ácido Periódico-Schiff (PAS) e técnica simultânea PAS e Azul de Alcian (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos; método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para cálcio; e

Azul do Nilo (LISON, 1960) e Sudan Black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para lipídios.

RESULTADOS

Foram observadas três regiões distintas compondo o intestino posterior do diplópodo *U. atrobrunneus*: piloro, íleo/colo e porção retal. O intestino posterior tem seu início no piloro, histologicamente marcado pela presença da íntima cuticular; na transição intestino médio/piloro observa-se gradativamente o aparecimento desta estrutura (seta na Fig. 1A).

O piloro apresenta um epitélio simples composto por células colunares com núcleos localizados preferencialmente na região centro/basal (Fig. 1B). A altura deste epitélio é pouco variável.

O epitélio do intestino médio é dotado de uma íntima cuticular que se distribui ao longo do intestino em diferentes espessuras (Figs 1B, C, D); observa-se também, que ao longo de toda estrutura a presença de expansões cuticulares, distribuídas de forma heterogênea, denominadas aqui de microespinhos; aparecem em maior tamanho e menor quantidade no início do piloro (setas na fig. 1C), diminuindo em tamanho e aumentando em quantidade conforme se aproxima da região final do piloro (setas na fig. 1D).

Abaixo do epitélio observa-se uma musculatura bem desenvolvida ao longo de toda estrutura. Revestindo externamente o piloro observa-se uma fina membrana denominada membrana externa, firmemente aderida à musculatura (Fig. 1B). Uma membrana peritrófica foi observada ao longo de todo intestino (Figs 1A, B, C).

O epitélio reagiu fortemente à detecção de proteínas (Fig. 2A), porém não foram detectados polissacarídeos neutros (Fig. 2B), cálcio (Fig 2C) e lipídios (Figs 2D, F). Pela reação de PAS pode-se observar uma delgada membrana basal abaixo do epitélio (Fig. 2B).

A íntima cuticular reagiu moderadamente às reações para proteínas (Fig. 2A) e para polissacarídeos neutros (Fig. 2B).

Embora se observe uma transição estrutural entre piloro e a porção seguinte denominada íleo/colo, com a presença de uma válvula (seta na fig. 3A) e de numerosas vilosidades (Fig. 3B), histologicamente a composição da estrutura é praticamente a mesma, ou seja, apresenta um epitélio colunar simples e uma musculatura bem desenvolvida (Fig. 3B, C). Nesta região, porém ocorre uma pequena porção de tecido conjuntivo abaixo do epitélio (Fig. 3C). O epitélio é formado por células mais baixas na região próxima ao final da estrutura, ou seja, próxima da região retal (Fig. 3D). A íntima cuticular nesta porção também apresenta microespinhos (setas nas figs 3C, D).

Os testes histoquímicos demonstraram, para as demais regiões do intestino posterior, a mesma constituição observada na região do piloro.

Próximo da transição da região íleo/colo para região retal observa-se um maior desenvolvimento da musculatura (Fig.4A). O epitélio nesta região é formado por células mais baixas e a íntima cuticular apresenta-se discretamente mais espessa (Fig. 4B). A transição entre as duas porções é marcada por uma válvula (seta na fig. 4A).

A porção retal apresenta uma região média com o formato de uma câmara, a qual chamamos de câmara pré-anal, que precede o final do tubo digestório, que se abre nas válvulas anais (Fig. 4A, C). Esta região apresenta muitas vilosidades, um epitélio dotado de uma espessa íntima cuticular e uma musculatura bem desenvolvida e organizada (Fig. 4D).

O início da região anal é marcado por várias reentrâncias voltadas para o lúmen (setas na fig. 5A), cujo epitélio aparentemente é formado por células mais cúbicas que colunares (Fig. 5B). A região anal apresenta a mesma estrutura descrita até então (Fig.5C).

Foram observados microespinhos ao longo de toda estrutura. A análise histoquímica apresentou o mesmo padrão descrito para o piloro.

DISCUSSÃO

A composição básica do tubo digestório dos artrópodes consiste em três regiões: sistema digestório anterior (estomodeu), sistema digestório médio (mesêntero) e sistema digestório posterior (proctodeu), sendo que cada uma dessas regiões apresenta histologia, função e origem embrionária características. Devido à origem ectodérmica, o sistema digestório anterior e o posterior apresentam-se revestidos por epiderme e por uma cutícula, o que não ocorre no intestino médio (RUPPERT; BARNES, 2005).

De um modo geral, as características comuns aos artrópodes nos servem de suporte para compreender as estruturas presentes no tubo digestório dos diplópodos, bem como suas funções.

Comumente o intestino posterior de diplópodos apresenta algumas divisões. Crawford et al. (1983) observaram na espécie *Orthoporus ornatus* a presença de um íleo e um colo, além do piloro e do reto. A descrição tanto do íleo quanto do colo de *O. ornatus* é semelhante ao restante do intestino posterior, sendo a separação das duas porções feita por uma leve constrição. Já a espécie *Parajulus impressus* descrita por Hefner (1929) apresentou seis regiões distintas pouco definidas pelo autor.

Em *U. atrobrunneus* foram verificadas poucas diferenças histológicas entre as diferentes regiões, nesse sentido não foi possível distinguir o íleo do colo. O mesmo foi

observado em outra espécie de Spirotreptidae, *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) estudada por Fontanetti e Camargo-Mathias (1997).

À semelhança de outros artrópodes, expansões são observadas na íntima cuticular do trato digestório dos diplópodos, as quais recebem diferentes denominações por diferentes autores; podem ser chamadas de espinhos, microespinhos, denticúlos, cerdas, entre outros (ELZINGA, 1998; HOPKIN; READ, 1992; MYIOSHI et al., 2005). Em diplópodos estas estruturas podem ocorrer somente no intestino posterior.

Elzinga (1998) sugeriu que estas expansões presentes na íntima cuticular fossem denominadas microespinhos, pois se referem a minúsculas estruturas articuladas.

Myioshi et al. (2005) realizaram estudo sobre a morfologia e a distribuição de microespinhos restritos ao piloro, das espécies *Pseudonannolene tricolor* (Pseudonannolenidae) e *Rhinocricus padbergi* (Rhinocricidae). O arranjo destas estruturas mostrou-se bastante diferentes nas duas espécies; os autores sugeriram que uma análise mais detalhada de diferentes táxons poderia auxiliar em discussões taxonômicas no grupo, como observado em outros artrópodes.

Microespinhos também foram encontrados em outras espécies de diplópodos, Schlüter (1980), por exemplo, estudando *Tachypodoiulus niger* e *Polydesmus angustus*, observou que em *T. niger* os microespinhos não são ligados ao epitélio e que possuem a função de impedir o movimento contrário do bolo fecal. Já em *P. angustus* os microespinhos estão associados ao epitélio e cada um é anexado a camada muscular longitudinal, que lhes confere movimento. O autor sugeriu ainda que estas estruturas podem ser capazes de romper a membrana peritrófica para permitir assim maior troca de íons e fluidos com o material fecal.

Elzinga (1998) descreveu que os microespinhos no piloro de *Spirobolus sp.* e *Orthoporus sp.* apresentavam-se curtos no início do piloro (1 a 2 μm) e que aumentavam consideravelmente atingindo até 50-60 μm , porém sem qualquer alteração morfológica. Além disso, estes microespinhos apareciam isolados, ou seja, numa conformação denominada uniespinose.

Os resultados em *U. atrobrunneus* sugerem que os microespinhos da espécie ocorrem inicialmente em uniespinose no início do piloro e em multiespinose na porção final desta estrutura; porém conforme avança o final do intestino posterior, estes voltam a aparecer na conformação de uniespinose. É bom salientar que somente a observação ao microscópio eletrônico de varredura poderá detalhar a forma e a organização destas estruturas.

Hefner (1929) descreve a porção retal como uma pequena divisão do intestino posterior, a qual apresenta um fino epitélio, envolto por musculatura circular bem

desenvolvida. Crawford et al. (1983) mostrou que em *O. ornatus* o reto aparecia a partir de um esfíncter que o separa do cólon; a íntima cuticular persiste em todo o reto de modo a formar uma cobertura que se dobra, onde ocorre a formação de pequenos grumos de bacilos.

A espécie *U. atrobrunneus* apresentou um reto relativamente grande, dotado de numerosas vilosidades e uma câmara pré-anal bem desenvolvida, cuja função é desconhecida. A análise ultra-estrutural desta região poderia fornecer dados sobre a função desta estrutura.

Estudos mais detalhados sobre a morfologia do intestino posterior de diplópodos são escassos, o que torna a comparação com outras espécies um tanto difícil.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Cristiane Miléo e Gerson Mello pelo apoio técnico, e ao Prof. Dr. Edilberto Giannotti pelo auxílio nas coletas e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocinio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool.**, v.18, p.62-63, 1997.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S. JUCÁ-CHAGAS, R Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.220-223, 2002.
- CRAWFORD, C. S.; MINION, G. P.; BOYERS, M. D. Intima morphology, bacterial morphotypes, and effects of annual molting microflora in the hindgut of the desert millipede, *Orthoporus ornatus* (GIRARD) (Diplopoda: Spirostreptidae), *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* V. 12, n. 5/6, p. 301-312, 1983.
- ELZINGA, R. J. Microspines in the alimentary canal of arthropoda, Onychophora, Annelida. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 27 (3): 341- 349, 1998.
- FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (1938) (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta* , v.7, n.4 p. 257-264, 1998.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histoanatomy of the digestive tract in *Plusioporus setiger* diplopod (Brolemann, 1901) (Spirostreptida, Spirostreptidae), Brazil. *J. Morphol.*, v.14, n.2, p.205-211, 1997.

- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Infestação de millípedes em região urbana na cidade de Campinas, São Paulo – Brasil. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, campus de Rio Claro, 2007.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi, 2010.
- HEFNER, R. A. Studies of parajulid diplopods. The micro-anatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. Trans. Amer. Microsc. Soc. V. 48, n.2, p. 321-339, 1929.
- HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In Myriapod biology, ed. M. Camatini, Academic Press, London, p.127-134, 1979a.
- HUBERT, M. L'intestin moyen de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psilopygus* Latzel) (Diplopoda, Iuloidea): observations ultrastructurales en relation avec la fonction d'accumulation, Ibid. T.289D, p.749-752, 1979b.
- HOPKIN, S.P.; READ, H.J. *The biology of millipedes*. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica Texto- Atlas. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, ed. 11, 2008, 524p.
- LISON, L. Histochimie et cytochimie animales. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.
- MELO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Práticas de biologia celular. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980, 69p.
- MIYOSHI, A. R.; GABRIEL, V. A.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). Iheringia, v. 95, n. 2, p. 183-187, 2005.
- NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Jour. Ecol**, v.38, p.257-268, 1988.
- PEARSE, A. T. E. Histochemistry: theoretical and applied. London: J&A. Churchill, 1960, 998p.
- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 6ª ed., 2005. 1029p.
- SCHLÜTER, U. Ultrastruktur der Pyloruszähnnchen zweier Tausendfüßler (*Tachypodoiulus niger*, *Polydesmus angustus*). **Acta Zoologica** (Stockholm), v.61, p.171-178, 1980.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Secções histológicas da transição do intestino posterior (A) e do piloro (B, C, D) de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina. cmc- camada muscular circular; cml- camada muscular longitudinal; ic- íntima cuticular; e- epitélio; im- intestino médio; ip- intestino posterior; me- membrana externa; mp- membrana peritrófica; seta grossa- transição intestino médio/posterior; setas finas- microespinhos.

Figura 2. Secções histológicas do piloro de *U. atrobrunneus* submetidas às técnicas de azul de bromofenol (A), PAS (B), von Kossa (C), sudan black B (D) e azul do Nilo (E). ic- íntima cuticular; e- epitélio; cmc- camada muscular circular; cml- camada circular longitudinal; l- lúmen; mp- membrana peritrófica.

Figura 3. Secções histológicas do intestino posterior de *U. atrobrunneus* coradas com azul de bromofenol (A) e com hematoxilina/eosina (B, C, D). A- transição piloro/íleo/colo; B, C, D- íleo/colo e- epitélio; cm- camada muscular; i/c- íleo/colo; ic- íntima cuticular; tc- tecido conjuntivo; p- piloro.

Figura 4. Secções histológicas do intestino posterior de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C, D). ic- íntima cuticular; i/c- íleo/colo; cm- camada muscular; cmc- camada muscular circular; cml- camada muscular longitudinal; cpa- câmara pré-anal; e- epitélio; me- membrana externa; mp- membrana peritrófica; r- retal; ra- retal anal.

Figura 5. Secções histológicas do intestino posterior de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C). cmc- camada muscular circular; cml- camada muscular longitudinal; ic- íntima cuticular; e- epitélio; setas- vilosidades.

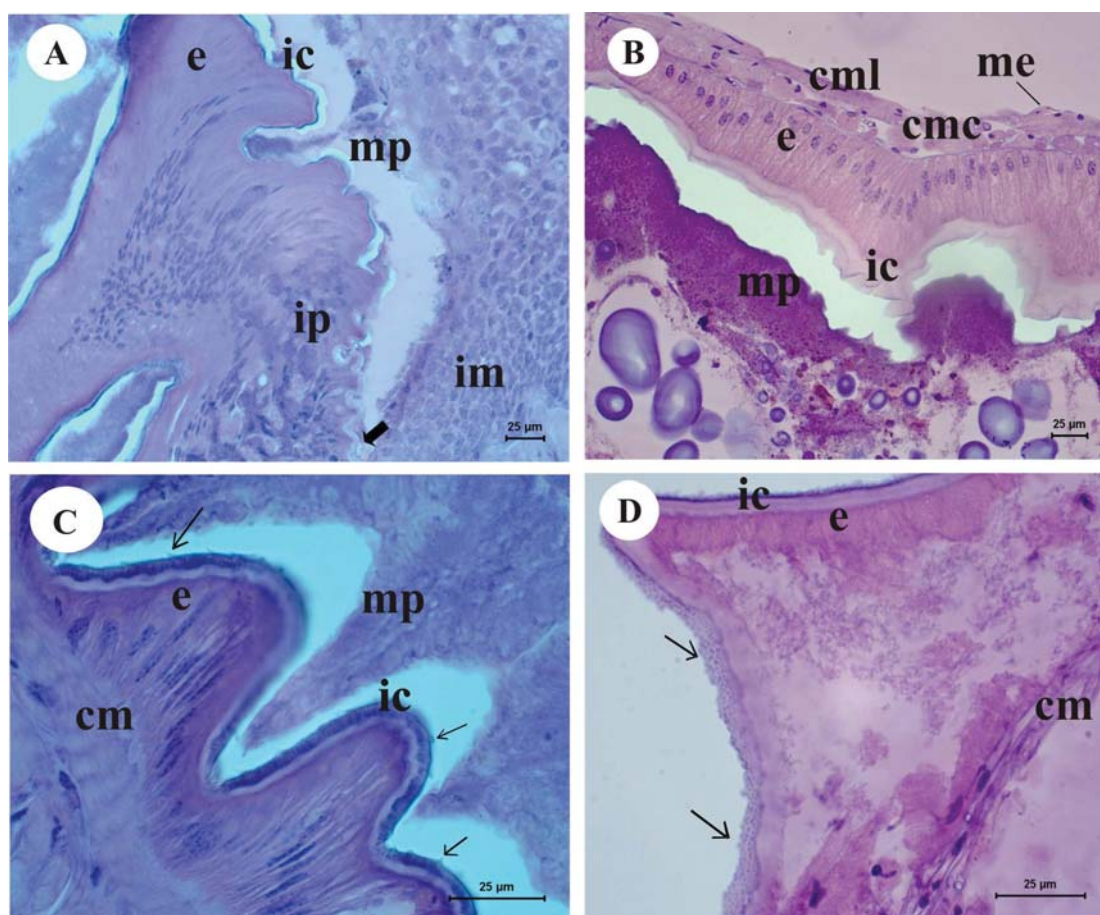


Figura 1

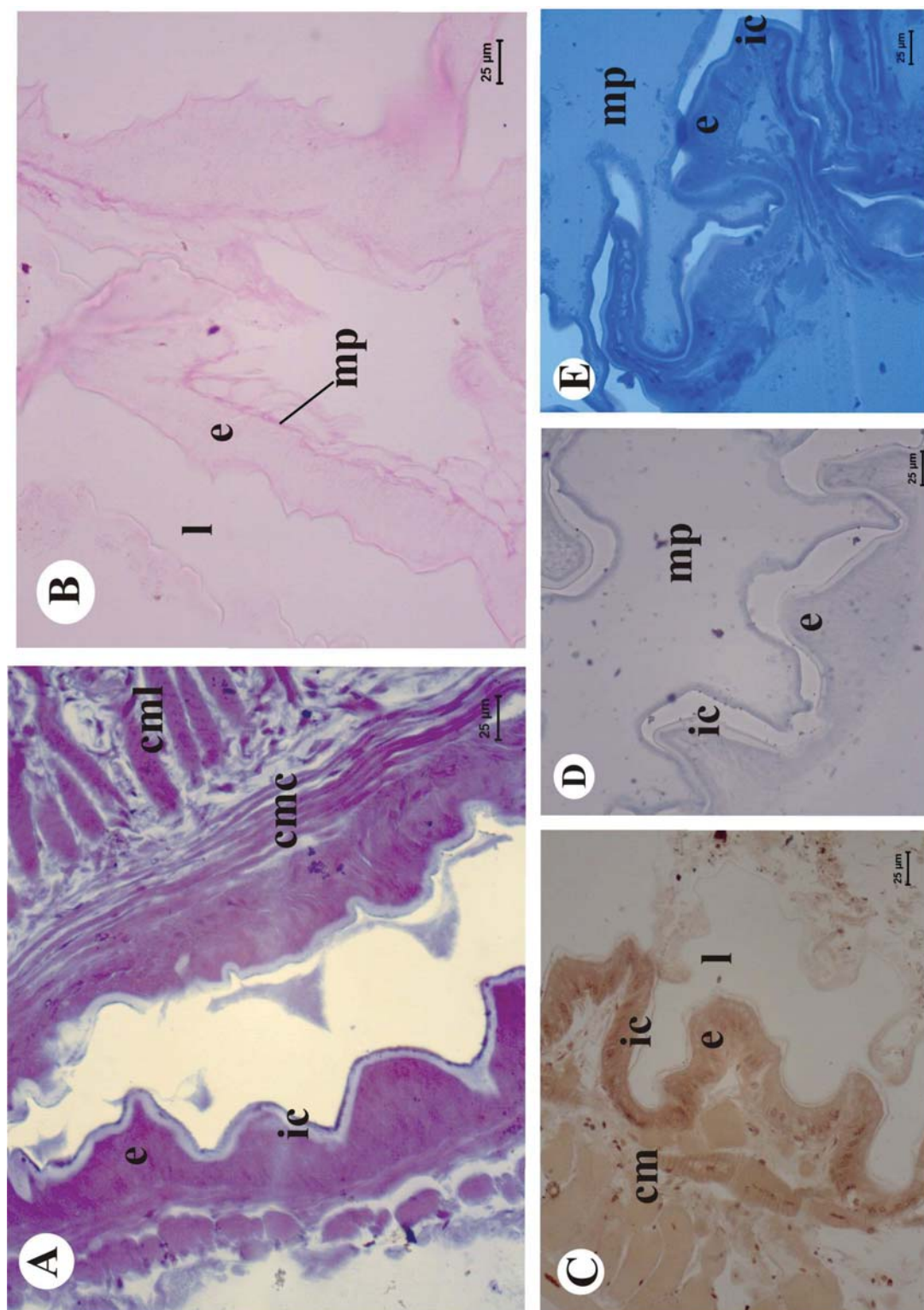


Figura 2

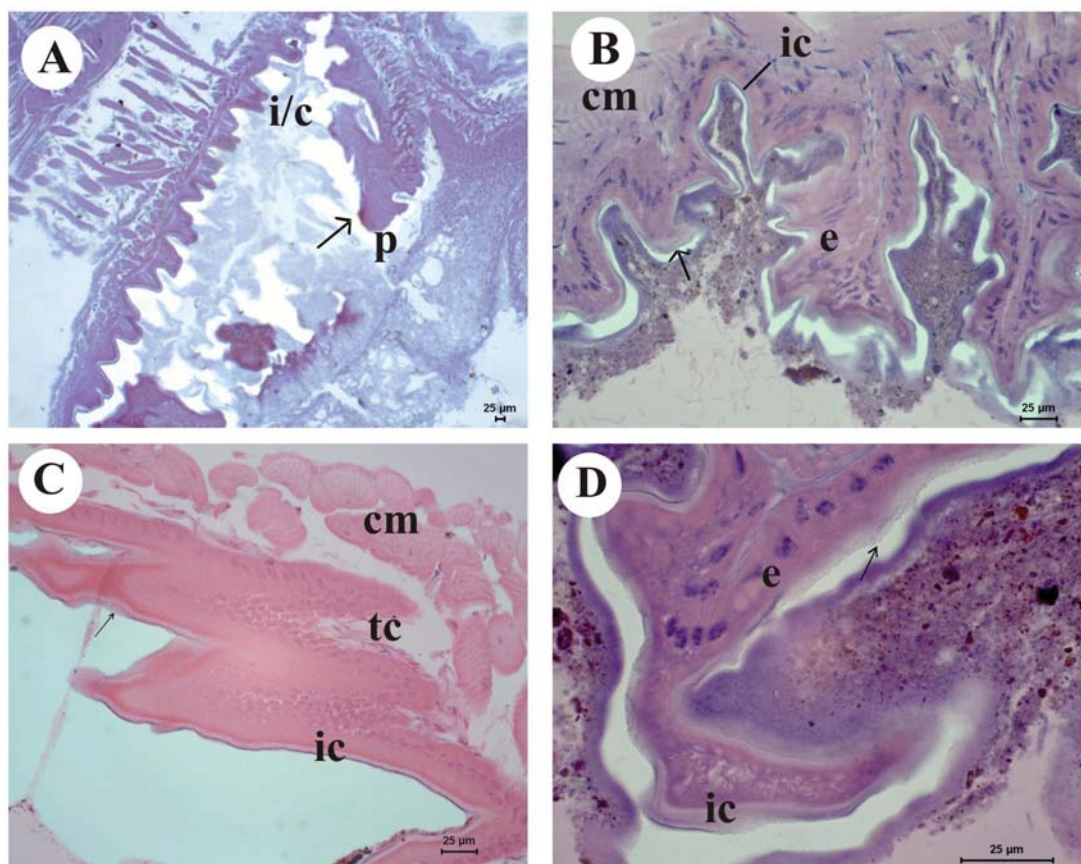


Figura 3

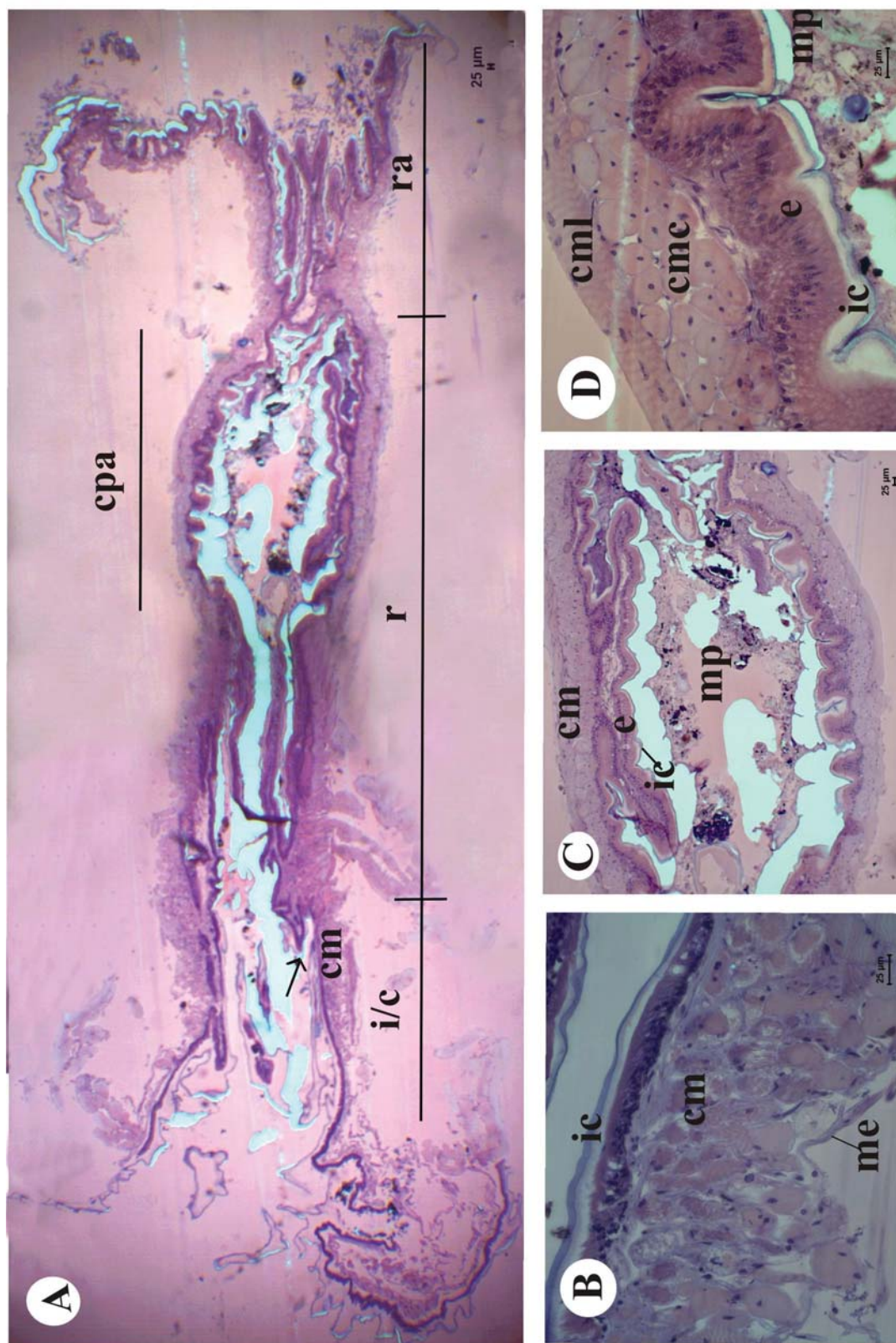


Figura 4

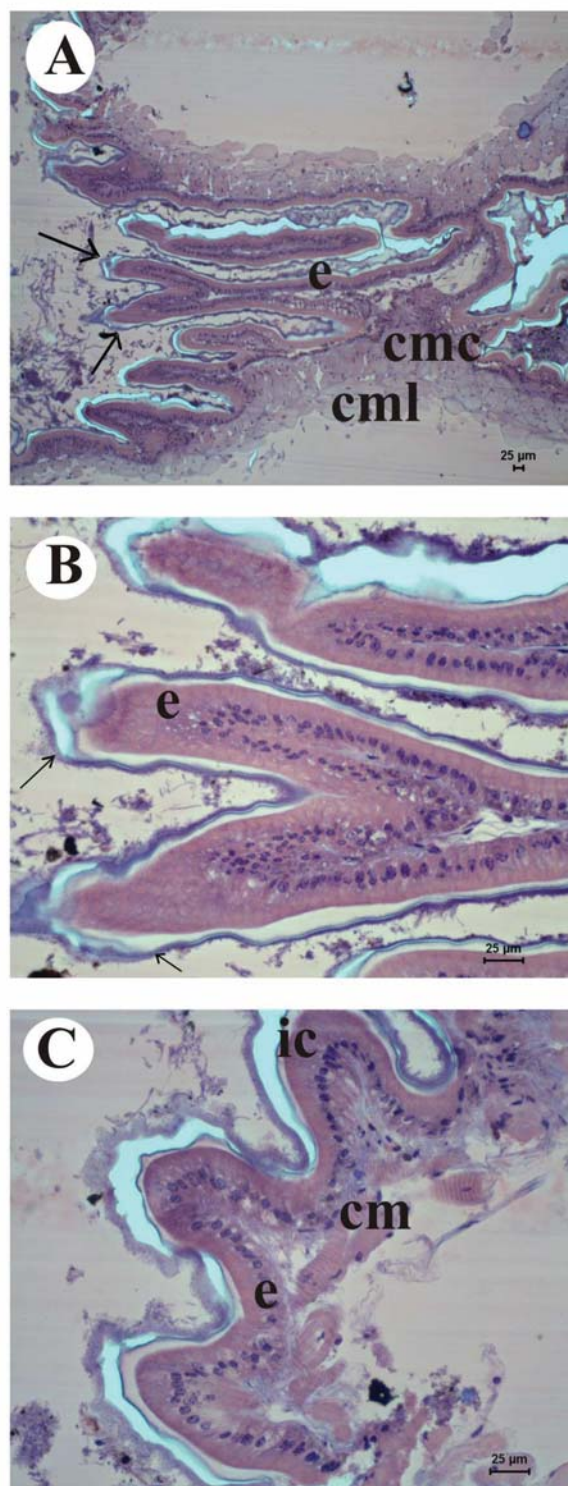


Figura 5

6. CONCLUSÃO

Diante das análises realizadas com o tubo digestório da espécie *U. atrobrunneus*, o presente trabalho apresenta as seguintes conclusões:

- Na região correspondente ao intestino anterior foi possível verificar que este apresenta um epitélio com células de diferentes alturas, dotado de uma íntima cuticular, apoiado em uma delgada membrana basal; em seguida ocorre uma musculatura bem desenvolvida e uma membrana externa; ladeando o intestino anterior há um par de glândulas salivares. A função desta porção é dar início ao processo de digestão, uma vez que as glândulas salivares promovem não só a lubrificação para o alimento, mas também liberam enzimas digestivas; o mesmo ocorre nas demais espécies de diplópodos estudadas até o momento.
- O intestino médio apresenta em sua formação um epitélio pseudoestratificado que está apoiado numa membrana basal espessa, seguido de uma camada muscular e por uma camada de células com morfologia semelhante às aquelas presentes no corpo gorduroso perivisceral, a qual tem sido chamada até o momento de camada de “corpo gorduroso” constituinte do intestino médio; observa-se também uma musculatura pouco desenvolvida e descontínua; toda a estrutura é revestida por uma membrana externa. O observado aqui é bastante similar ao que já foi descrito na literatura para outras espécies. A denominação até então utilizada como camada de “corpo gorduroso” não é adequada, pois tem provocado confusões com o corpo gorduroso perivisceral; estas células são na verdade, células hepáticas, as quais foram descritas como distribuídas aleatoriamente sem formar uma camada; nossas observações demonstram que estas células foram uma camada continua ao longo de toda a estrutura do intestino médio.
- No intestino posterior, a estrutura geral consiste de um epitélio colunar simples, membrana basal, camada muscular bem desenvolvida, revestida por membrana

externa. O piloro apresenta pregas internas, uma cutícula que se torna gradativamente mais espessa ao longo da estrutura, dotada de pequenas projeções denominadas microespinhos. Aqui observa entre a região pilórica e retal, uma região diferenciada, denominada íleo/cólon.

- A região retal é relativamente longa, provida de íntima cuticular não muito espessa, provida de microespinhos; estes são aparentemente dispostos em multiespinose.
- Toda a descrição apresentada neste trabalho para o tubo digestório da espécie *U. atrobrunneus* se assemelha a outras existentes na literatura, quanto ao intestino anterior e médio; porém, diverge em alguns aspectos quanto aos compartimentos observados no intestino posterior de outras espécies; isso ressalta que esta porção do tubo digestório de diplópodos é a mais diversificada no grupo, como também ressaltado por outros autores.
- Propõe-se uma nova designação para a camada até então chamada de “corpo gorduroso do intestino médio”, uma vez que uma nossas observações permitiram defini-la como sendo formada por células hepáticas; assim, a denominação correta é “camada de células hepáticas”, a qual constitui uma camada contínua de células ao longo de todo o intestino médio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SANTOS, M. G.; CABRERA, A. C. Compositions of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, Maracay. v.18, n.2, p.79-82. 2003.
- BAILEY, P. T.; MENDONCA, T. R. The distribution of the millipede *Ommatoiulus moreleti* (Diplopoda: Julida: Julidae) in relation to other *Ommatoiulus* species on the south- western Iberian Peninsula. *Journal of Zoology*, v.221, p.99-111, 1990.
- BIERNAUX, J. Incidence économique des Iules en culture betteravière. *Mede-delingen van de Rijksfalculteit Landbouwwetenschappen te Gent*, n. 31, p. 717-729, 1966.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocinio – MG - Brazil. *J. Adv. Zool*, v.18, p.62-63, 1997.
- BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N. Toxicidade do Carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Rev Bras Toxicol.**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.
- BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S. JUCÁ-CHAGAS, R Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. *Holos Environment*, v.2, p.220-223, 2002.
- BRADY-BIRKS, S. G. Notes on Myriapoda XXXIII. The economic status of Diplopoda and Chilopoda and their allies. Part I. *Journal of the South-Eastern Agricultural College, Wye, Kent*, n. 26, p. 178-216, 1929.
- BRADY-BIRKS, S. G. Notes on Myriapoda XXXIII. The economic status of Diplopoda and Chilopoda and their allies. Part II. *Journal of the South-Eastern Agricultural College, Wye, Kent*, n. 27, p. 103-146, 1930.
- BOWEN, R. C. Histochemical studies on two millipedes species, Ohio J. Sci. v.68, p.85-91, 1968.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida) Braz. I. Morphol. Sci. , v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; CALLIGARIS, I. B. 3D Reconstruction and scanning electron microscopy of salivary glands of the millipede *Rhinocricus padbergi* (Verhoef, 1938) (Diplopoda: Spirobolida). **Micron**, DOI: 10.1016/j.micron.2010.10.004, 2011.

- CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Economics of the 'spotted snake millipede' *Blaniulus guttulatus* Bosc. *Annals and Magazine of Natural History, Seireis* 12, n. 2, p. 947-962, 1950.
- CRAWFORD, C. S.; MINION, G. P.; BOYERS, M. D. Intima morphology, bacterial morphotypes, and effects of annual molting microflora in the hindgut of the desert millipede, *Orthoporus ornatus* (GIRARD) (Diplopoda: Spirostreptidae), *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* V. 12, n. 5/6, p. 301-312, 1983.
- CRAWFORD, C. S.; BERCOVITZ, K.; WARBURG, M. R. Regional environments, life-history patterns and habitat use of Spirostreptid millipedes in arid regions. *Zoological Journal of the Linnean Society of London*, v.98, p.63-88, 1987.
- DALLAI, R.; BIGLIARDI, E.; LANE, N. J. Intercellular junctions in myriapods. *Tissue and cell*, v.22, p.359-369, 1990.
- DE METS, R. Submicroscopic structure of the peritrophic membrane in arthropods. *Nature*, v.196, p.77, 1962.
- DEML, R.; HUTH, A. Benzoquinones and hydroquinones in defensive secretions of tropical millipedes. *Naturwissenschaften, Berlin*, v. 87, p.80-82, 2000.
- EISNER, T.; EISNER, M.; ATTYGALLE, A. B.; DEYMEINWALD, J. Rendering the inedible edible: Circumvention of a millipede's chemical defense by a predaceous beetle larva (Phengodidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.1108-1113, 1998.
- EINSEBEIS, G.; WICHARD, W. *Atlas on the biology of soil arthropods*. Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- ELZINGA, R. J. Microspines in the alimentary canal of arthropoda, Onychophora, Annelida. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 27 (3): 341- 349, 1998.
- ENGNOFF, H. Taxonomic significance of the mandibles in the millipede Order Julida. In *Myriapod biology*, ed. M. Camatini, Academic Press, London, p.27-38, 1979.
- ENGNOFF, H. The ground-plan of chilognathan millipedes (external morphology). In *Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology*, ed. A. Minelli, E. J. Brill, Leiden, p.1-24, 1990.
- FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (1938) (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta* , 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.

- FANTAZZINI, E. R. **Glândulas Salivares do diplópodo *Rhinocricus padbergi* (Verhoeff, 1938) (Diplopoda: Spirobolida): Citoquímica Ultra-estrutural, dosagem e quantificação de proteínas.** 2002. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.
- FITZPATRICK, T.; EISEN, A.; WOLF, K.; FREEDBERG, I.; AUSTEN, K. F. *Dermatology in general medicine.* 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1993, v.2.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histoanatomy of the digestive tract in *Plusioporus setiger* diplopod (Brolemann, 1901) (Spirostreptida, Spirostreptidae), Brazil. *J. Morphol.*, v.14, n.2, p.205-211, 1997.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Apocrine secretion in the midgut of *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) (Diplopoda, Spirostreptidae), *Naturalia*, v.26, p.35-42, 2001.
- 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, p. 487-493, 2006.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Infestação de millipedes em região urbana na cidade de Campinas, São Paulo – Brasil. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, campus de Rio Claro, 2007.
- GIRARDIN, B. W.; STEVESENS. Millipedes – Health consequences. **J. Emerg. Nurs.**, Saint Louis, v.28, 0.2, p.107-110, 2002.
- GODOY, J. A. P.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing Sewage seudge **Water, Air soil Pollution** DOI 10.1007/s11270-009-0261-z, 2010.
- GOLOVATCH, S. I.; HOFFMAN, R. L.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Identification plate for the millipede orders populating the neotropical region south of Central Mexico (Myriapoda, Diplopoda). **Studies on Neotrop. Fauna and Envir.**, Lisse, v.30, n.3, p.159-164, 1995.
- GOLOVATCH, S. I. On the identity of some millipede species described by C. O. Von Porat in 1888 (Diplopoda, Spirobolida). **Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg. Sci. Entomol.**, Bruxelles, v.7, p.95-106, 1997.
- HEFNER, R. A. Studies of parajulid diplopods. The micro-anatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* V. 48, n.2, p. 321-339, 1929.
- HUBERT, M. Contribution à l'étude des organes excréteurs et de l'excrétion chez les Diplópodes. Thèse de Doctorat d'État, Université de Rennes, France, 1977.

- HUBERT, M. Données hidtophysiológicas complémentaires sur lès bio-accumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinenseis* (Leach, 1914), (Diplópode, Iuloidea). Archives de Zoologie Experimentale et Générale, v.119, p.669-683, 1978a.
- HUBERT, M. Les cellules hépatiques de *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814), (Diplopode, Iuloidea). Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, **286D**, p.627-630, 1978b.
- HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In Myriapod biology, ed. M. Camatini, Academic Press, London, p.127-134, 1979a.
- HUBERT, M. L'intestin moyen de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psylopygus* Latzel) (Diplopoda, Iuloidea): observations ultrastructurales en relation avec la fonction d'accumulation, Ibid. T.289D, p.749-752, 1979b.
- HUBERT, M. La cuticle procdodéale de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psylopygus* Latzel), (Diplopode, Iuloidea): etude ultrastructurale des depressions épicuticulaire. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Série IV*, **3A**, p.815-823, 1981.
- HUBERT, M. Le complexe anatomique et fonctionnel des cellules hépatiques-mesenteron de *Cylindroiulus londinenses* Leach (*psylopygus* Latzel): etude ultrastructurale et spectrographique, Bull. Soc. Zool. France. T.113, p.191-198, 1988.
- HOFFMAN, R. L.; PAYNE, J. A. Diplopods as carnivores. Ecology, n. 50, p. 1096-1098, 1969.
- HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil.; Dipl.), Bijdr. Dierk., v. 55, p. 88-94, 1985.
- HOPKIN, S.P.; READ, H.J. *The biology of millipedes*. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. 123p.
- KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. *Peckiana*, v.4, p.57-66, 2005.
- 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.
- KÖHLER, H. R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress of the intestine of diplopods. *Proceedings of the 8th International Congress of Myriapodology*. Veröffentlichungen der Universität Innsbruck, In Press, 1991.

- KÖHLER, H.R., TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers* N. 3, p. 109–127, 1998.
- KUWAHARA, Y.; ÔMURA, H.; TANABE, T. 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretion. *Naturwissenschaften*, Berlin, v.98, p.308-310, 2002.
- LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales*. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.
- MAFF. *Millipedes and Centipedes*. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Advisory Leaflet. HMSO, London, 1984.
- MARTIN, J. S.; KIRKHAM, J. B.; Dynamic role of microvilli in peritrophic membrane formation. *Tissue and Cell*, v.21, p.627-638, 1989.
- MELO, M. L. S.; VIDAL, B. C. *Práticas de biologia celular*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1980, 69p.
- MEYER, E.; EISENBEIS, G. Water relations in millipedes from some alpine habitat types (Central Alps, Tyrol), (Diplopoda). *Bijdragen tot de Dierkunde*, v.55, p.131-142, 1985.
- MIYOSHI, A. R.; GABRIEL, V. A.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). *Iheringia*, v. 95, n. 2, p. 183-187, 2005.
- NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). *Japan Jour. Ecol*, v.38, p.257-268, 1988.
- NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water Air Soil Pollut.** DOI 10.1007/s11270-020-0666-8. 2010.
- NUNES, F. S.; CRAWFORD, C. S. Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Diplopoda: Spirostreptidae); *J. Morphol.*, v.151, p. 121-130, 1977.
- PEARSE, A. T. E. *Histochemistry: theoretical and applied*. London: J&A. Churchill, 1960, 998p.
- 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 Pollut.** DOI 10.1007/s11270-010-06579. 2010.
- PIEROZZI, P.H.B & FONTANETTI, C.S. A new species of *Urostreptus* (Diplopoda, Spirostreptidae): description and chromosome number. *Iheringia*, v. 96, n.2, p.209-212, 2006.

- READ, H. J.; MARTIN, M. H. A study of millipede communities in woodlands contaminated with heavy metals. In Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology, ed. A. Minelli, E. J. Brill, Leiden, p.289-298, 1990.
- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. *Zoologia dos Invertebrados*. São Paulo: Roca, 6^a ed., 2005. 1029p.
- ROMÃO, J. A.; BOCCARDO, L.; DE PAULA, U. F.; CHAGAS, R. J.; MOREIRA, B. O. Toxicidade de extratos de *Pipernigrum*, piperina e piperamidas para o diplópodo *Orthoporus fuscipes* em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2008.
- SEIFERT, G.; ROSENBERG, J. Feinstruktur der leberzellen von *Oxidus gracilis* (C. L. Koch, 1847), (Diplopoda, Paradoxosomatidae). *Zoomorphology*, v.88, p.145-162, 1977.
- SCHLÜTER, U. The ultrastructure of the exocrine gland complex in the hindgut of *Scaphiostreptus* sp. (Diplopoda: Spirostreptidae). In *Myriapod biology*, ed. M. Camatini, Academic Press, London, p.143-155, 1979.
- SCHLÜTER, U. Ultrastruktur der Pyloruszähnnchen zweier Tausendfüßler (*Tachypodoiulus niger*, *Polydesmus angustus*). *Acta Zoologica (Stockholm)*, v.61, p.171-178, 1980a.
- SCHLÜTER, U. Die Feinstruktur der pylorusdrüsen von *Polydesmus angustus* Latzel und *Glomeris marginata* Villers (Diplopoda). *Zoomorphology*, v.94, p.307-319, 1980b.
- SCHLÜTER, U. Cytopathological alterations in the hindgut of a millipede induced by atypical diet. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.36, p.133-135, 1980c.
- SCHLÜTER, U. The anal glands of *Rhapidostreptus virgator* (Diplopoda, Spirostreptidae). I. Appearance during the intermoult cycle. *Zoomorphology*, v.100, p.65-73, 1982.
- SCHLÜTER, U. The anal glands of *Rhapidostreptus virgator* (Diplopoda, Spirostreptidae). II. Appearance during a moult cycle. *Zoomorphology*, v.102, p.79-86, 1983.
- SCHLÜTER, U.; SEIFERT, G. Functional morphology of the hindgut-malpighian tubule-complex in *Polyxenus lagurus* (Diplopoda; Penicillata). *Bijdragen tot de Dierkund*, v.55, p.209-218, 1985.
- SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 10-18, 2011.
- SRIVASTAVA, P.D.; SRIVASTAVA, Y. N. *Orthomorpha* sp., a new predatory millipede on *Achatenia fulica* in Andamans. *Experientia*, v.23, p.776, 1967.

SUBRAMONIAM, T. Studies on the fat body of millipedes. I. Histological and histochemical features millipede *Spirostreptus asthenes* Pocock. Zoologischer Anzeiger, v.189, p.200-208, 1972.

TRIEBSKORN, R., KÖHLER, H.-R. The impact of heavy metal on the gray garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. Environ. Pollut. N. 3, p. 327–343, 1996.

Rio Claro, 07 de outubro de 2011

Prof^a Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
(Orientadora)

Cristina Moreira de Sousa
(Aluna)