



Variações regionais nas células epiteliais do
intestino médio de *Diatraea saccharalis*, Fabricius
1794 (Lepidoptera: Crambidae), em larvas não-
parasitadas e na vigência do parasitismo por
Cotesia flavipes (Hymenoptera: Braconidae)

DANIELA DE OLIVEIRA PINHEIRO

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Aparecida Gregório

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista, Campus
de Botucatu, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Zoologia.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Pinheiro, Daniela de Oliveira.

Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de *Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae), em larvas não-parasitadas e na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) / Daniela de Oliveira Pinheiro. – Botucatu: [s.n.], 2006

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2006

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Aparecida Gregório

Assunto CAPES: 20400004

1. Inseto. 2. Parasitismo. 3. Morfologia. 4. Zoologia.

CDD 592

Palavras-chave: Broca da cana; Endoparasitismo; Morfologia; Morfometria; Morte celular; Ultra-estrutura.

Dedico esse trabalho, com muito orgulho para:

* **Profa. Elisa**, minha querida e inesquecível professora, amiga, confidente, orientadora e mãezona de coração que em todos os momentos pode me acompanhar, ensinar e orientar sempre com muito carinho e disponibilidade. Sei que não há nada no mundo que possa retribuir o que fez e continua fazendo por mim em todos esses anos. Você é muito importante para mim. Muito obrigada por tudo!

* Melhor família do mundo: **Minha Mãe, Madrinha, Vovó Anita e Mônica**, além da minha querida **Vovó Tina** (em memória) e meu **Pai Paulo** (em memória) por estarem presente em todos os momentos, compreender e apoiar meu trabalho durante todas as etapas. Amo todos vocês e sei que é o pouco de mim que pude dedicar, vocês merecem muito mais...

*"Mãe e Pai,
consegui realizar o nosso maior sonho..."*

**A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo – FAPESP**

Obrigada pelo apoio financeiro (Processos: 01/10868-0 e 03/05690-3). Espero ter cumprido meu dever, e realizado plenamente o proposto.

* Ao **Centro de Microscopia Eletrônica IBB - Unesp** em especial:

- À **Profa Dra. Elisa A. Gregório**, minha orientadora e mãe de coração, mestra que me ensinou muito, muito além do que está escrito nesta tese. Meu eterno agradecimento, reconhecimento e admiração. Obrigada também por sempre estar me apoiando, incentivando e orientando em todos os momentos. Não tenho palavras pra agradecer. QUE DEUS TE RECOMPENSE porque eu jamais conseguirei terminar de te agradecer por tudo que fez. Muitíssimo obrigada!

- Aos técnicos: **Claudete dos Santos Tardivo, Maria Euleda Lino Peres, Maria Helena Moreno e Nivalde Antônio Basso**, pelo apoio técnico e incentivo além da grande e sincera amizade conquistada nesse período, meu profundo agradecimento por tudo.

* A todos os docentes, técnicos, funcionários e alunos do **Depto. de Morfologia IBB - Unesp**, em especial a (o):

- **Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos** pela atenção, incansável ajuda e orientação, principalmente com os experimentos de morte celular, mas acima de tudo pela amizade sincera e companheirismo. É com muito orgulho que a considero como uma das minhas melhores amigas. Muito Obrigada!

- **Profa. Dra. Edy de Lello Montenegro**, que tenho muito orgulho por ter sido sua aluna. Reconheço e admiro sua capacidade, competência e dedicação a todos os seus alunos. Obrigada por todas as dicas e por nossos rápidos comentários nos corredores (sempre serão válidos e importantes para mim). Não posso deixar de agradecer por me ensinar a dissecar a primeira larva de inseto, que foi o ponto primordial para chegar aonde cheguei, além da excelente contribuição para o trabalho de esferitos.

- **Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto**, agradeço muito pelos conselhos, incentivos e aprendizado durante todo o processamento e análise em Microscopia de Luz; além disso, obrigada pelas dicas na disciplina de Biologia Celular nos períodos dos vários Estágios Docência, aprendi muito. Obrigada também pelas muitas caronas, não sei nem como te agradecer.

- **Profa. Dra. Maeli Dal-Pai Silva**, agradeço pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar no processamento e análise de atividade de metabolismo oxidativo, e também pelas dicas nas técnicas, resumos, relatórios e na disciplina de Histologia, que contribuiu muito para meu aprendizado.

- Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular, **Ricardo André Santos** e **Antônio Vicente Salvador**, pela dedicação e paciência, sempre me ensinando e ajudando etapa por etapa nos processamentos e inclusão em historesina, além da sincera amizade.

- Aos amigos de laboratório **Rinaldo José Ortiz**, por me ajudar em vários experimentos, principalmente com os cortes no micrótomo e com as colorações de microscopia de luz, e **Rafael Henrique Nóbrega**, por colaborar com a complexa técnica do Túnel, além das nossas trocas de experiências. Torço muito por vocês e quero que saibam que sou muito grata por tudo que fizeram e que sempre poderão contar comigo.

- Aos técnicos do Laboratório de Histologia, **Sueli Cruz Michelin** e **Jarbas do Amaral** pelo auxílio técnico nos procedimentos dos cortes no criostato, além das horas de descontração e carinho. Sou grata e honrada pela amizade de vocês.

* A todos os docentes, técnicos, funcionários e alunos do **Depto. de Parasitologia IBB - Unesp**, em especial a (o):

- **Prof. Dr. Reinaldo José Silva**, obrigada por tudo que me ensinou de morfometria, análise estatística, relatórios, resumos, e principalmente sobre nossos “papers”. A convivência com você me fez subir não só um, mas vários degraus nessa caminhada. Agradeço pela paciência e pelos inúmeros conselhos, que jamais esquecerei e que me ajudaram a crescer tanto como profissional quanto como pessoa. Tenho orgulho dos nossos trabalhos publicados, que foram os frutos também da sua dedicação, competência, companheirismo e boa vontade, até mesmo nos fins de semana.

- **Profa. Dra. Semírames Guimarães Viana**, muitíssimo obrigada pela ajuda, colaboração, boa vontade e tempo que teve de dedicação comigo nos vários experimentos, principalmente ensinando a interpretar os resultados bioquímicos, além dos conselhos, dicas e pelas nossas ricas conversas, tenho muito que te agradecer.

- **Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla**, obrigada pela ajuda nas complicadas contas dos resultados de atividade específica de amilase.

- A técnica **Márcia Maria Fattori Bueno**, pelo auxílio quando realizei o estágio com morfometria e, acima de tudo, pela amizade e boa vontade em sempre me ajudar.

*Aos docentes e alunos do **Depto. de Bioquímica IBB - Unesp**, em especial:

- A **Profa. Dra. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli** pela amizade, apoio e incentivo, além dos importantes auxílios no processamento para determinação de atividade enzimática. Meu profundo agradecimento, admiração e respeito.

- Aos amigos de laboratório **Luciane Aparecida Faine** e **Christiano Machado Galhardi**, que me ajudaram a realizar e interpretar os experimentos bioquímicos. Não tenho palavras para agradecer, pois sempre tiveram boa vontade, disponibilidade, carinho e competência.

*Ao **Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp**, em especial aos:

- Técnicos **Paulo Roberto Cardoso** e **Maria Luisa Falaguera Ardanaz**, pelo processamento de inclusão em parafina. Muito obrigada!

* Aos docentes, técnicos, funcionários e alunos do **Centro de Microscopia Eletrônica e Microscopia Confocal do Instituto de Biociências – USP – SP**, em especial a (o):

- **Prof. Dr. Alberto A. Freitas Ribeiro**, agradeço pela oportunidade de conviver e aprender muito, principalmente sobre microscopia confocal. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar nos momentos que precisava, além da amizade e conselhos. Um dos conselhos que jamais esquecerei é que a vida tem bifurcações e que em cada caminho escolhido haverá pontos positivos e negativos. Obrigada! Tenho

orgulho de ter convivido com você...

- Aos técnicos **Márcio Valentim Cruz** e **Waldir Caldeira**, pelo auxílio técnico no processamento para Microscopia Confocal e pelas inúmeras dicas e experiências trocadas, além dos divertimentos nos congressos. Muitíssimo obrigada por tudo, além da importante ajuda, inclusive nas caronas, quando estava em São Paulo.

* **Profa. Dra. Ana Carolina Faraldo da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE- Unidade Acadêmica de Garanhuns**, obrigada à minha eterna amiga de relatórios, resumos, congressos e, principalmente, de experimentos como os do ácido bicinconínico, amilase, proteínas totais e óxido nítrico, além de todas as nossas trocas de experiências e divertimentos. Você foi muito importante nesse período. Obrigada!

* **Prof. Dr. Mauro Masson Lerco da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP**. Não tenho palavras para agradecer, muitíssima obrigada por me ajudar na hora que eu mais precisei e quero que saiba que se não fosse por você, não estaria finalizando com saúde este trabalho. Deixo aqui registrado meu eterno e profundo agradecimento e gratidão. Obrigada também por confiar no meu trabalho. Que Deus continue te iluminando!

* Ao **Prof Dr. Hélio Conte da Universidade Estadual de Maringá -UEM** que me incentivou desde a minha iniciação científica e que colaborou principalmente com os meus resultados de esféritos. Obrigada pelas dicas, pelos conselhos e pela boa vontade em me ajudar sempre que precisei.

* A todos os funcionários da **Seção de Pós-Graduação IBB-UNESP**, obrigada pelas facilidades e pelos imprevistos resolvidos, sempre com muita boa vontade e alegria.

* Aos funcionários do **Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande-Lençóis Paulista-SP** especialmente ao **Antônio Marino Comedian** e **Maria José Pinto** e também aos funcionários do **Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) - Piracicaba-SP** especialmente ao **Luiz Carlos de Almeida** e **Sueli Aparecida Piacentini**, pelo fornecimento dos insetos e também pela amizade adquirida nesse período.

* Aos eternos amigos do **Laboratório de Microscopia Eletrônica**, em especial a **Christiane, Daniela, Eliane, Rosi e Sheila**, que conviveram comigo ao longo desses anos; sei que posso contar com vocês e que nem o tempo ou a distância poderão nos afastar. Obrigada pelos conselhos, cumplicidade, pelas trocas de experiência, divertimentos e especialmente pela amizade de vocês!

* A todos os funcionários da **Biblioteca**, em especial a **Marluce, Meirinha e Bráz** pela incansável ajuda em vários momentos, desde o início até a hora da redação final dessa tese. Muito obrigada!

* A minha **MÃE LUCIMAR**, que me ajudou em todas as fases dessa tese, desde a etapa de dissecar até a de redigir esse trabalho, além de ter catalogado todas as minhas referências bibliográficas. Jamais conseguirei agradecer pela incansável e interminável ajuda. Deixo aqui registrado meu eterno agradecimento, admiração e respeito. Você é meu maior exemplo de vida e também a melhor mãe do mundo! EU TE AMO!

* A **todos da minha família, em especial a Madrinha e Mônica, todos os meus amigos e a família Sales** pelas orações, palavras de conforto, momentos de descontração, cumplicidade, companheirismo, almoços, passeios, viagens, encontros, conselhos sinceros e, acima de tudo, obrigada por estarem sempre presentes quando eu precisava. Vocês são imprescindíveis e importantíssimos para mim...

* À **Deus**, pela oportunidade de aprender, convivendo nesse privilegiado meio e conseguir concluir a minha tese, realizando meu maior sonho. Obrigado por sempre estar presente em minha vida!

MUITO OBRIGADA!

Canção Da América

Milton Nascimento

Amigo é coisa para se guardar
Debaixo de sete chaves,
Dentro do coração,
assim falava a canção que na América ouvi,
mas quem cantava chorou ao ver o seu amigo partir,
mas quem ficou, no pensamento voou,
o seu canto que o outro lembrou
E quem voou no pensamento ficou,
uma lembrança que o outro cantou.
Amigo é coisa para se guardar
No lado esquerdo do peito,
mesmo que o tempo e a distância digam não,
mesmo esquecendo a canção.
O que importa é ouvir a voz que vem do coração.
Seja o que vier,
venha o que vier
Qualquer dia amigo eu volto pra te encontrar
Qualquer dia amigo, a gente vai se encontrar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - “Variações regionais na morfologia das células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)”

1.1 - Introdução Geral	03
1.2 - Objetivos Gerais	10
1.3 - Artigo 01 - Ultra-estrutura das células colunares ao longo do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	12
1.4 - Artigo 02 - Estudo morfométrico do epitélio do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae).....	21
1.5 - Artigo 03 - Diferenças morfológicas regionais das células epiteliais ao longo do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera).....	35
1.6 - Conclusões Gerais	52
1.7 - Referências Bibliográficas	54

CAPÍTULO 2 - “Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes*”

2.1 - Introdução Geral	65
2.2 - Objetivos Gerais	72
2.3 - Artigo 04 - Morfometria do epitélio do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> Cameron, 1891 (Hymenoptera).....	74
2.4 - Artigo 05 - Esferitos nas células epiteliais do intestino médio da broca da cana parasitada pela <i>Cotesia flavipes</i>	86
2.5 - Artigo 06 - Morte celular de células epiteliais do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera) parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera).....	100
2.6 - Artigo 07 - Mitocôndrias das células epiteliais do intestino médio de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera) parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera).....	116
2.7 - Artigo 08 - Células colunares do intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera) parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera).....	134
2.8 - Artigo 09 - Óxido nítrico no intestino médio de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela <i>Cotesia flavipes</i> Cameron, 1891 (Hymenoptera).....	155
2.9 - Conclusões Gerais	166
2. 10- Referências Bibliográficas	168

RESUMO	174
---------------------	-----

ABSTRACT	176
-----------------------	-----

CAPÍTULO 1

“Variações regionais na morfologia das células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)”

Artigo 1: “Ultra-estrutura das células colunares ao longo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)”;

Artigo 2: “Estudo morfométrico do epitélio do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae)”;

Artigo 3: “Diferenças morfológicas regionais das células epiteliais ao longo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)”.

INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos são animais bem sucedidos na natureza, sendo responsáveis pela destruição de percentual importante de plantações, de alimentos armazenados, além de serem vetores de grande número de doenças que afetam o homem e os animais de criação (Gillott, 1995).

Dentre os inúmeros Lepidoptera de interesse econômico, a broca da cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794 (Crambidae, Crambinae) merece destaque especial, pois afeta direta e indiretamente o cultivo e o aproveitamento industrial da cana-de-açúcar, além de atacar outras gramíneas como arroz, sorgo, milho e trigo (Charpentier *et al.*, 1967; Long & Hensley, 1972; Botelho & Macedo, 2002; Rossi & Fowler, 2003).

As espécies do gênero *Diatraea* foram por muitos anos enquadrados como pertencentes à família Pyralidae, sendo separadas sistematicamente, por identificação morfológica. Recentemente, com os avanços dos estudos filogenéticos baseados em técnicas moleculares, houve uma mudança e reorganização da árvore filogenética, incluindo o gênero *Diatraea* na família Crambidae e sub-família Crambinae (Lange *et al.*, 2004). Durante alguns anos, numa fase de transição, alguns trabalhos foram publicados considerando ainda a antiga classificação da *D. saccharalis*.

A broca da cana é um inseto que apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Seus ovos são depositados frequentemente nas folhas ainda verdes, tanto na face superior como inferior da folha; a duração dessa fase é bastante variável, dependendo principalmente da temperatura, sendo, nas condições brasileiras de 1 a 2 semanas. Após a eclosão do ovo, a lagarta migra para a região do cartucho da planta à procura de abrigo, permanecendo ali por um período que varia de 1 a 2 semanas, alimentando-se pela raspagem da folha da cana ou da casca. Durante essa fase, a larva passa por 1 ou 2 ecdises, quando então inicia a perfuração da casca do colmo. Geralmente essa perfuração ocorre próxima a base do entrenó, porção mais mole, abrindo galeria no sentido ascendente. Em certas situações, por razões ainda desconhecidas, a lagarta alimenta-se abrindo uma galeria de forma circular, enfraquecendo com isso o entrenó, que pode se quebrar principalmente pela ação do vento (para revisão, ver Botelho & Macedo, 2002).

Muitos são os danos diretos causados pela broca da cana nas plantas hospedeiras. Quando o ataque se dá próximo a região de crescimento da planta, ocorre a morte da gema apical, sendo denominado de “coração morto” ou “olho morto”, ocasionam também perda de peso (pela abertura de galerias no entrenó), encurtamento

do entrenó, brotamento lateral, enraizamento aéreo, canas quebradas e entrenós atrofiados; esses danos podem ocorrer isoladamente ou associados, agravando os prejuízos (Gallo *et al.*, 1978; Botelho & Macedo, 2002).

A lagarta, uma vez tendo penetrado no colmo da cana passa toda a fase larval ali protegida. Durante este período o inseto sofre um número variável de ecdises, frequentemente 6. A duração dessa fase é a mais longa, sendo em média de 70 dias nas condições do estado de São Paulo. A lagarta de *D. saccharalis* apresenta coloração branco-leitosa, com cápsulas cefálicas marrom-escuro e pequenas manchas de cor marrom-claro, distribuídas ao longo do corpo. Quando completamente desenvolvida, a larva mede cerca de 25 mm. Próximo à pupação a lagarta abre um orifício na casca e o fecha parcialmente com fios de seda e restos de sua alimentação, e assim protegida passa a fase de pupa, que tem duração média de 10 dias, quando emerge o adulto. O período de vida do adulto é de 5 dias, em média. A fêmea atrai o macho para a cópula, pela liberação de feromônio e, após o acasalamento, deposita cerca de 300 ovos (Parra *et al.*, 2002).

A cana-de-açúcar sofre o ataque dessa praga durante todo o seu desenvolvimento. Sua incidência é menor quando a cana é jovem e não apresenta entrenós formados, aumentando os danos com o crescimento da planta. Esse comportamento, entretanto, pode variar, principalmente em função da época do ano e da variedade da planta. Os danos indiretos dessa praga nas plantas hospedeiras são causados por microorganismos que invadem o entrenó, através do orifício aberto na casca pela lagarta. Esses microorganismos, predominantemente fungos (*Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotricum falcatum*), invertem a sacarose ocasionando a "podridão vermelha", determinando queda no seu rendimento industrial na produção de açúcar e de álcool (Graça, 1976; Gallo *et al.*, 1978; Téran, 1988).

Embora existam grandes laboratórios direcionados à criação da *D. saccharalis*, poucos são os estudos visando o conhecimento preciso e detalhado da morfologia interna desse inseto, nas diferentes fases do desenvolvimento (Barduco *et al.*, 1988; Bombonato & Gregório, 1995; Falleiros & Gregório, 1995; Bombonato & Gregório, 1996; Santos & Gregório, 2002, 2006; Falleiros *et al.*, 2003; Rigoni *et al.*, 2004; Victoriano & Gregório, 2002; Victoriano *et al.*, 2003). Poucos são os estudos sobre o seu trato digestivo (Conte, 1985; Ferreira *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2003; Mota *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2004; Rang *et al.*, 2004), que é considerado uma das principais vias de acesso a inseticidas químicos e biológicos.

O canal alimentar dos insetos é um tubo contínuo entre a boca e o ânus e compreende três regiões: o intestino anterior ou estomodeo onde o alimento pode ser armazenado, filtrado e parcialmente digerido; o intestino médio (IM), ventrículo ou mesêntero onde se realiza a digestão e absorção do alimento e o intestino posterior ou proctodeo onde pode ocorrer alguma absorção e a formação de fezes (Wigglesworth, 1972; Maranhão, 1978; Chapman, 1985, 1998; Eaton, 1988; Terra, 1990).

O intestino anterior, na maioria dos insetos, apresenta-se como um tubo longo, tendo sua parte mediana dilatada como uma câmara armazenadora de alimentos. Segundo Chapman (1998), o intestino anterior pode ser dividido em cavidade bucal, faringe, esôfago, inglúvio ou papo (reservatório de alimentos), pró-ventrículo ou moela (porção terminal que pode funcionar como esfíncter) e válvula cardíaca ou válvula estomodeal. O IM tem início na base do pró-ventrículo e termina um pouco antes das inserções dos tubos de Malpighi. Já o intestino posterior, em sua estrutura mais simples, é um tubo que forma um conduto direto para o ânus. Para Judy & Gilbert (1969), o intestino posterior é dividido em quatro regiões: piloro, íleo, cólon e reto. Na passagem do IM para o intestino posterior encontra-se uma dobra do epitélio deste último formando a válvula pilórica.

O IM de Lepidoptera é constituído por um epitélio colunar, esse epitélio é revestido por uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais, sendo permeado por traquéias e células adiposas (Barth, 1972; Chapman, 1985, 1998; Conte, 1985). O IM é onde ocorrem os principais eventos da digestão, assimilação de nutrientes, manutenção da homeostase e liberação de neurohormônios, que regulam a atividade de vários outros processos fisiológicos; também funciona como barreira física contra a invasão de microorganismos patogênicos (para revisão ver Lehane & Billingsley, 1996). Vários são os estudos, em diferentes Ordens de insetos, mostrando a importância do IM na absorção de alimentos, troca de íons e entrada de inseticidas, vírus e toxinas (Santos *et al.*, 1984; Lehane & Billingsley, 1996; Marana, 1997; Jordão *et al.*, 1999; Cristofolletti *et al.*, 2001). A digestão nos insetos é um processo complexo e compartimentalizado, tendo sido amplamente estudado (Terra *et al.*, 1988; Terra, 1988, 1990, 1996, 2001; Terra & Ferreira, 1994; Lehane & Billingsley, 1996).

Na maioria dos insetos, o IM apresenta uma membrana acelular (membrana ou matriz peritrófica), que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (no interior da membrana) e o espaço ectoperitrófico (entre a membrana

e o epitélio) (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1985; Dow, 1986; Lehane & Billingsley, 1996; Terra, 2001). A membrana peritrófica é uma camada basófila, composta principalmente por quitina, um polímero linear N-acetyl-D-glucosamina (Terra, 1996; Tellam *et al.*, 1999; Tellam & Eisemann, 2000) e glicoproteínas, entre elas destacando-se as peritrofinas (Tellam *et al.*, 1999; Bolognesi *et al.*, 2001; Terra, 2001); esta estrutura está ausente nos insetos que se alimentam de fluidos, como em Hemiptera e adultos de Lepidoptera (Wigglesworth, 1972; Colwell, 2006). Sabe-se que em larvas de Lepidoptera a membrana peritrófica é secretada ao longo do IM pelas células colunares (De Priest, 1971; Santos *et al.*, 1984; Terra, 1996; Harper & Hopkins, 1997; Harper *et al.*, 1998; Harper & Granados, 1999; Hopkins & Harper, 2001), sendo, por isso caracterizada como membrana peritrófica do tipo I (Richards & Richards, 1977; Peters, 1992). Embora impeça o contato direto do alimento com a bordadura estriada das células colunares, esta membrana permite a passagem das enzimas digestivas em direção à luz intestinal e a absorção dos produtos resultantes da digestão, sendo posteriormente eliminada com as fezes (Tellam, 1996). Sabe-se que também previne injúrias mecânicas às células do IM e parece dificultar ou impedir a entrada de microrganismos na hemocele (Barth, 1972; Chi *et al.*, 1975; Terra, 1988; Terra, 1996; Terra, 2001). Esta estrutura apresenta um espessamento ao longo do IM de larvas de Lepidoptera, e essa variação regional tem sido descrita para muitas espécies (Harper & Hopkins, 1997; Harper *et al.*, 1998; Harper & Granados, 1999; Hopkins & Harper, 2001; Levy, 2005). Além dessa variação ao longo do IM, alguns insetos possuem, somente na região anterior do IM, um gel viscoso, denominado de gel peritrófico, ao invés de uma membrana peritrófica propriamente dita; este gel apresenta as mesmas funções da membrana peritrófica, não possuindo quitina em sua composição (Terra, 2001).

A grande maioria dos trabalhos caracteriza morfologicamente as células epiteliais do IM de insetos, correlacionando-as com suas possíveis funções (Akai, 1970; Nopanitaya & Misch, 1974; Burgos & Gutiérrez, 1976; Cioffi, 1979; Baker *et al.*, 1984; Santos *et al.*, 1984; Del-Bene *et al.*, 1991; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Hung *et al.*, 2000; Levy, 2000, 2005; Caetano & Rodrigues, 2001; Caetano & Zara, 2001; Lello & Vieira, 2001; Levy *et al.*, 2004, entre muitos outros).

O epitélio do IM em Lepidoptera é constituído, principalmente, por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Lehane & Billingsley, 1996).

As células colunares ou enterócitos, as mais abundantes, são consideradas

responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e da membrana peritrófica, além de atuarem na absorção dos produtos da digestão (Santos *et al.*, 1984; Richards & Davies, 1994; Lehane & Billingsley, 1996; Jordão *et al.*, 1999). As células caliciformes ou acidófilas auxiliam as colunares na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos (Anderson & Harvey, 1966; Akai, 1970; Chi *et al.*, 1975; Klein *et al.*, 1991; Moffett *et al.*, 1995; Chapman, 1998). As células regenerativas estão relacionadas com o processo de renovação epitelial (Maranhão, 1978; Chapman, 1985, 1998; Dow, 1986; Lehane & Billingsley, 1996; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999). Já as células endócrinas estão principalmente relacionadas com o controle hormonal: dos movimentos peristálticos (Scoofs *et al.*, 1993; Nässel *et al.*, 1995), da digestão (Brown *et al.*, 1985), diurese (Coast & Kay, 1994; Patel *et al.*, 1995), do desenvolvimento e reprodução (Pratt *et al.*, 1989; Woodhead *et al.*, 1989), entre outras funções (para revisão ver Sehnaal & Zitnan, 1996; Edwards & Weaver, 2001). Iwanaga *et al.* (1981) sugerem que estas células são funcionalmente semelhantes às células endócrinas dos vertebrados.

As células colunares do epitélio do IM exibem núcleo alongado, superfície apical com longas, inúmeras microvilosidades e projeções citoplasmáticas volumosas (Richards & Davies, 1994; Lehane & Billingsley, 1996). No citoplasma apical predomina retículo endoplasmático liso; já a membrana plasmática basal apresenta algumas invaginações profundas formando o chamado labirinto basal, associado às muitas mitocôndrias densas (Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984; Dow, 1986; Lehane & Billingsley, 1996). Estas células colunares podem apresentar variações ultra-estruturais ao longo do IM, caracterizando regiões morfo-funcionais distintas, denominadas de anterior, mediana e posterior, como observado em outros Lepidoptera como: *Manduca sexta* (Cioffi, 1979), *Erynnis ello* (Santos *et al.*, 1984), *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999) e *Anticarsia gemmatilis* (Levy, 2000; Levy *et al.*, 2004), entre muitas outras espécies (para revisão, ver Lehane & Billingsley, 1996). Várias são as alterações regionais descritas para as células colunares em larvas de Lepidoptera: aquelas da região anterior podem apresentar dilatação na extremidade das microvilosidades e exibir também grandes vesículas secretoras no citoplasma apical (Cioffi, 1979; Jordão *et al.*, 1999); também tem sido descrito predomínio de invaginações da membrana basal nas células da região posterior (Santos *et al.*, 1984; Lehane & Billingsley, 1996).

As células caliciformes recebem esta denominação por possuírem invaginação da membrana plasmática apical formando uma cavidade semelhante a um cálice; o interior desta cavidade é margeado por projeções citoplasmáticas semelhantes a

microvilosidades, contendo mitocôndrias (Anderson & Harvey, 1966; Akai, 1970; Chi *et al.*, 1975; Cioffi, 1979; Chapman, 1985; Dow, 1986; Binder & Bowers, 1994; Chapman, 1998; Levy *et al.*, 2004). Embora menos freqüente, tem sido descrito que as células caliciformes também podem apresentar variação morfológica ao longo do IM; em *M. sexta* estas células na região anterior do IM apresentam a cavidade caliciforme localizada basalmente, enquanto na região posterior esta cavidade localiza-se na porção apical da célula (Cioffi, 1979). Essa mudança no formato da câmara pode estar relacionada à sua função e já foi observado em várias outras espécies de insetos (Lello *et al.*, 1984; Lehane & Billingsley, 1996; Jordão *et al.*, 1999; Levy, 2000, 2005).

Outros tipos de células epiteliais funcionalmente similares às células caliciformes de Lepidoptera foram descritos no epitélio do IM de alguns insetos, como as células pseudo-caliciforme descritas em *Pachycondyla striata* (Hymenoptera) e as células caliciformes atípicas descritas em larvas de Trichoptera (Cavalcante & Cruz-Landim, 1999); as células oxínticas ou cuprófilas, observadas em Diptera como *Drosophila melanogaster* possuem também a função de acumular cobre (Filshie *et al.*, 1971 apud Martoja & Ballan-Dufrançais, 1984; Terra, 1988; Lehane & Billingsley, 1996).

As células regenerativas são observadas isoladas, em pares ou formando grupos (nidi) de regeneração, localizados na base do epitélio (Barth, 1972; Maranhão, 1978; Chapman, 1985; Dow, 1986; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999). Esta célula apresenta citoplasma escasso, com poucas organelas (Smith *et al.*, 1969; De Priester, 1971; Turbeck, 1974; Conte, 1985; Billingsley & Lehane, 1996; Levy *et al.*, 2004). O número e morfologia de células regenerativas dependem da proximidade das ecdises e da duração do ciclo de vida dos insetos (Terra, 1988; Lehane & Billingsley, 1996). Existem vários trabalhos na literatura que mostram diferenciação da célula regenerativa em célula colunar, ao nível de microscopia eletrônica de transmissão (Turbeck, 1974; Endo *et al.*, 1983; Terra, 1988). Na renovação do epitélio intestinal, as células velhas separar-se-iam da membrana basal, que continuaria intacta, sendo empurradas em direção ao lúmen pelas células regenerativas em divisão, que teriam assim papel de reposição celular (Snodgrass, 1935; Endo *et al.*, 1983; Chapman, 1985). O propósito da renovação celular do epitélio intestinal está relacionado com o crescimento do canal alimentar a cada ecdise (Snodgrass, 1935) e com a substituição de células envelhecidas ou que sofreram qualquer tipo de agressão ou mesmo envelhecimento celular (Endo *et al.*, 1983; Lehane & Billingsley, 1996; Illa-Bochaca & Montuenga, 2006).

As células endócrinas estão localizadas na base do epitélio, sendo caracterizadas pela presença de grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (Brown *et al.*, 1985; Andries & Beauvillain, 1988; Sehnal & Zitnan, 1996; Edwards & Weaver, 2001). Células com funções endócrinas têm sido descritas no IM de muitos insetos, como em alguns Lepidoptera (Gül *et al.*, 2001; Levy, 2005), Orthoptera (Endo *et al.*, 1982; Montuenga *et al.*, 1989), Hymenoptera (Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003 a, b), Odonata (Andries, 1976) e Heteroptera (Andries & Beauvillain, 1988), entre outros. Segundo Billingsley & Downe (1986), os produtos de secreção hormonal das células endócrinas (peptídeos) atuam na diferenciação das células regenerativas. As células endócrinas podem estar associadas com ninhos de células regenerativas, como observado no IM de algumas espécies, devido à origem das células endócrinas a partir da extremidade dos ninhos das células regenerativas (Endo & Nishiitsutsuji-Uwo, 1982; Andries, 1976; Montuenga *et al.*, 1989; Illa-Bochaca & Montuenga, 2006). Sabe-se que a proporção de células endócrinas em muitos insetos aumenta progressivamente da região anterior para a região posterior do IM (Cassier & Fain-Maurel, 1977; Andries & Tramu, 1985; Edwards & Weaver, 2001).

Assim, tendo em vista o interesse econômico de *Diatraea saccharalis* e a inexistência de estudos mais aprofundados sobre o epitélio do seu IM, seria interessante definirmos a morfologia de seus diferentes tipos de células epiteliais, com enfoque em eventuais diferenças regionais, que possibilitassem entender o papel destas células, no inseto em questão e em Lepidoptera em geral.

A inexistência, na literatura, de estudos sobre a morfometria destas células ao longo do IM, é uma lacuna a ser preenchida, pois contribuiria para uma definição numérica e precisa da existência ou não de diferenças regionais ao longo do IM de *D. saccharalis*.

OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista as lacunas existentes na literatura quanto a morfo-fisiologia do intestino médio de Lepidoptera, em geral, e o de larvas de *Diatraea saccharalis*, em especial, este primeiro capítulo tem como objetivos principais:

1. Descrição detalhada da morfologia histológica, ultra-estrutural e morfométrica do intestino médio de *D. saccharalis*, comparando-a com a de outros Lepidoptera.
2. Identificação de diferenças regionais que possam ocorrer ao longo do intestino médio, visando caracterizar regiões morfo-funcionais diferenciadas.

ARTIGO 1

“Ultra-estrutura das células colunares ao longo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)”

Publicado como: Pinheiro, D.O.; Gregório, E.A. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Acta Microscópica, 12(1): 27-30, 2003.

Resumo

As características morfológicas das células colunares do intestino médio de *Diatraea saccharalis* foram estudadas em microscopia eletrônica de transmissão. Existem diferenças ultra-estruturais na morfologia das células colunares dependendo da sua localização ao longo do intestino médio. A superfície apical das células colunares exibe projeções citoplasmáticas, além dos proeminentes microvilos associados a vesículas de secreção microapócrina; estas projeções citoplasmáticas contêm organelas, e aumentam em número e conteúdo da região anterior para a região posterior do intestino médio. A distribuição das mitocôndrias no citosol destas células também é variável. Na superfície apical da célula são poucas as mitocôndrias na região anterior e são numerosas na região posterior; o oposto é observado no citoplasma basal, onde as mitocôndrias são mais abundantes na região anterior. Nossos resultados mostram que a variação morfológica observada nas células colunares ao longo do intestino médio de *Diatraea saccharalis* é similar ao descrito para outras espécies de Lepidoptera. A secreção executada pelas células colunares do intestino médio devem ser relacionadas aos processos de secreção microapócrina e liberação de projeções citoplasmáticas.

Palavras-chave: intestino médio, célula colunar, ultra-estrutura, Lepidoptera, larva.

Abstract

The morphological features of the columnar epithelial cell in the midgut of *Diatraea saccharalis* larvae were studied by transmission electron microscopy. There are ultrastructural differences in the columnar cell morphology depending on their localization along the midgut. The apical columnar cell surface exhibit protrusions besides the conspicuous microvilli related with microapocrine vesicles; these cytoplasmic protrusions contain many organelles and they increase in number and size from the anterior to the posterior midgut regions. The mitochondria distribution is also variable. They are few in the apical surface of the anterior region and numerous in the posterior one; the opposite is observed in the basal cytoplasm, where the mitochondria are more abundant in the anterior region. Our results show that the morphological variations in the columnar cell morphology along midgut of the sugarcane borer are similar to the ones described for other Lepidoptera species. The secretion carried out by the midgut columnar cell may be related with both the microapocrine process and cytoplasmic protrusion release.

Keywords: midgut, columnar cell, ultrastructure, Lepidoptera, larvae.

Introdução

O intestino médio é estruturalmente e funcionalmente diferenciado ao longo do seu comprimento, na maioria das larvas de Lepidoptera (2, 6). O epitélio do intestino médio é composto principalmente por 4 tipos celulares: células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (6). As células colunares são predominantes, sendo responsáveis pelo processamento dos alimentos, absorção dos produtos da digestão e secreção de enzimas digestivas (6). As células epiteliais colunares em *Manduca sexta* apresentam modificações ultra-estruturais graduais da região anterior para a região posterior do intestino médio (1). Em *Spodoptera frugiperda* as células colunares da região anterior do intestino médio apresentam dilatação na extremidade das microvilosidades e exibem também grandes vesículas secretoras no citoplasma apical (5). As células colunares da região posterior do intestino médio de *Erinnyis ello* apresentam invaginações da membrana basal bem evidente, enquanto que na região anterior essas invaginações são escassas (7). É comum, na porção apical das células colunares, a presença de projeções citoplasmáticas que se desprendem em direção ao lúmen intestinal, e que podem ser responsáveis pela liberação de material secretor, embora estas projeções, frequentemente não contenham grânulos secretores em seu interior (6). Muito frequentemente os microvilos apresentam liberação de vesículas ou bolhas para o lúmen intestinal, condizente com o processo de secreção microapócrina (2, 5, 6). As células colunares de *E. ello* liberam porções de microvilosidades contendo vesículas em direção ao lúmen, e também corpos esféricos recobertos por membrana (7). A broca da cana, *Diatraea saccharalis*, é considerada a praga mais importante para a cultura da cana-de-açúcar, afetando também muitas outras plantas (3). Não existem estudos descrevendo aspectos ultra-estruturais das diferentes células epiteliais ao longo do seu intestino médio. Este trabalho tem como objetivo descrever a ultra-estrutura das células colunares nas diferentes regiões do intestino médio de *D. saccharalis*, em larvas de último instar.

Material e Métodos

Larvas de *D. saccharalis* foram mantidas em dieta artificial (4) com temperatura (25-27°C) e umidade (70%) controladas. Fragmentos do intestino médio (regiões anterior, mediana e posterior) foram coletados de larvas do último instar e processados convencionalmente para microscopia eletrônica de transmissão. Os fragmentos de intestino médio foram fixados em solução de glutaraldeído 2% - paraformaldeído 4%

em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24h, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h, desidratados com seqüência crescente de soluções de acetona e incluído em resina Araldite. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados em microscópio eletrônico de transmissão CM100 da Philips.

Resultados

A superfície apical das células colunares ao longo de todo intestino médio de *Diatraea saccharalis* exibe microvilosidades (Figs. 1-3; 5-7). Existem projeções citoplasmáticas por entre os microvilos; estas projeções aumentam em número, volume e conteúdo da região anterior (Figs. 1, 2) para a região posterior (Figs. 5-6) do intestino médio. As mitocôndrias são escassas no citoplasma apical da região anterior (Fig. 4), enquanto que numerosas e bastante elétrôn-densas na região posterior (Figs. 5-7). A membrana plasmática basal das células colunares apresenta invaginações paralelas associadas às mitocôndrias que se estendem até a metade da altura da célula (Figs. 4, 8). Esta célula é também diferenciada ao longo do intestino médio: na região anterior, existem poucas aberturas das invaginações de membrana plasmática basal no espaço extracelular subjacente (Fig. 4), comparado com aquelas observadas na região posterior (Fig. 8). Além disso, as mitocôndrias associadas às invaginações são mais numerosas na região anterior (Fig. 4) enquanto que são poucas na região posterior do intestino médio (Fig. 8).

Discussão

A morfologia ultra-estrutural geral do intestino médio de *D. saccharalis* é similar a descrita para outros Lepidoptera como *M. sexta* (1), *E. ello* (7) e *S. frugiperda* (5).

Existem modificações ao longo do intestino médio com relação ao número e morfologia das projeções citoplasmáticas que se desprendem das células colunares em direção ao lúmen intestinal. As projeções citoplasmáticas aumentam em número e tamanho da região anterior para a posterior do intestino médio, onde exibem um grande número de organelas citoplasmáticas, sugerindo que estas células estão envolvidas com o processo de secreção apócrina. Ao mesmo tempo, as células colunares podem liberar materiais, por processo de secreção microapócrina como descrito para *E. ello* (7), como também mostrado em nossas observações de microvesículas com conteúdo elétrôn-

lucente por entre os microvilos, principalmente na região anterior do intestino médio. A secreção microapócrina consiste na eliminação de pequenas vesículas delgadas revestidas por membrana simples ou dupla, que se desprendem dos microvilos celulares (2). A ausência de grânulos secretores nas células colunares nos leva a acreditar que essas células devem estar secretando enzimas digestivas de uma maneira diferente, estando relacionada tanto com o processo de secreção apócrina como microapócrina, como observado em *E. ello* (7), *Tenebrio molitor* (2) e *S. frugiperda* (5). Acredita-se que a secreção apócrina seja uma adaptação celular para aumentar a dispersão do conteúdo das vesículas secretoras liberados a partir de um epitélio que absorve água, enquanto que a exocitose é um mecanismo de secreção eficiente em um epitélio secretor de água (2).

As invaginações de membrana plasmática basal na região posterior do intestino médio de *D. saccharalis*, ao contrário da região anterior, revelam abertura regular subjacente ao espaço extracelular, semelhante aos achados de *E. ello* (7). É possível que tal organização facilite a secreção de água, em associação com a extrusão de potássio, principalmente na região posterior do intestino médio. A existência de uma borda estriada desenvolvida, um grande número de mitocôndrias presente no citoplasma apical e das invaginações basais associadas a mitocôndrias, devem capacitar às células colunares no transporte de íons e água (7). O fato das invaginações de membrana plasmática basal constituir um compartimento extracelular com acesso restrito para a hemolinfa (devido às aberturas restritas para o espaço extracelular subjacente), deve permitir que as células colunares da região anterior do intestino médio concentrem solutos nesse compartimento e no lúmen, que deve auxiliar a absorção de água (7).

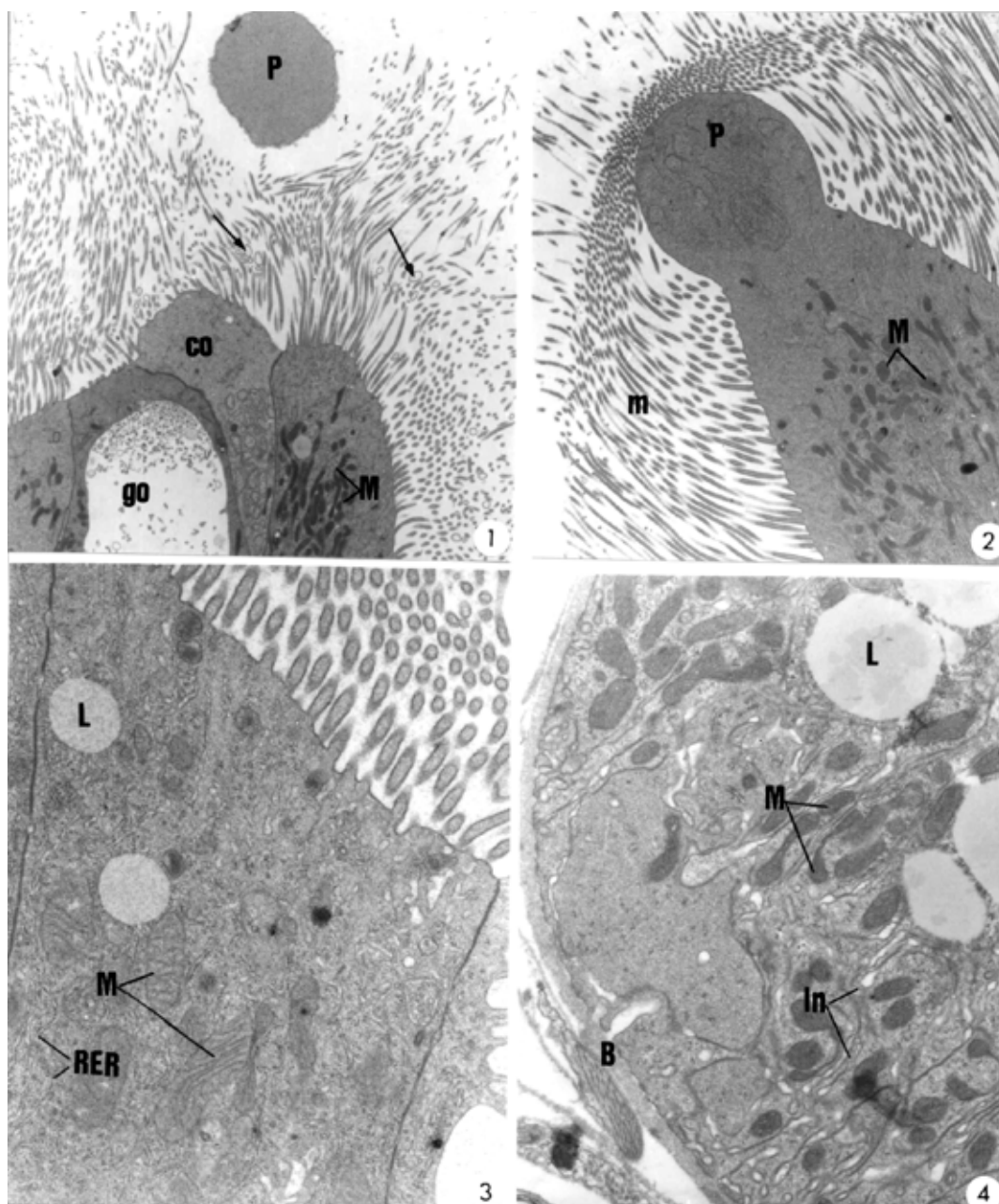
Existem modificações ao longo do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* relacionadas com o processo de secreção e com o número e morfologia das projeções citoplasmáticas que se desprendem das células colunares em direção ao lúmen. A região anterior do intestino médio está principalmente envolvida no processo de secreção microapócrina enquanto que a região posterior do intestino médio predomina a liberação de projeções citoplasmáticas. Outra diferença é relacionada com a quantidade de mitocôndrias no citoplasma apical e basal: na região anterior do intestino médio são numerosas na base da célula colunar enquanto que na região posterior existem muitas mitocôndrias concentradas no citoplasma apical.

Agradecimentos

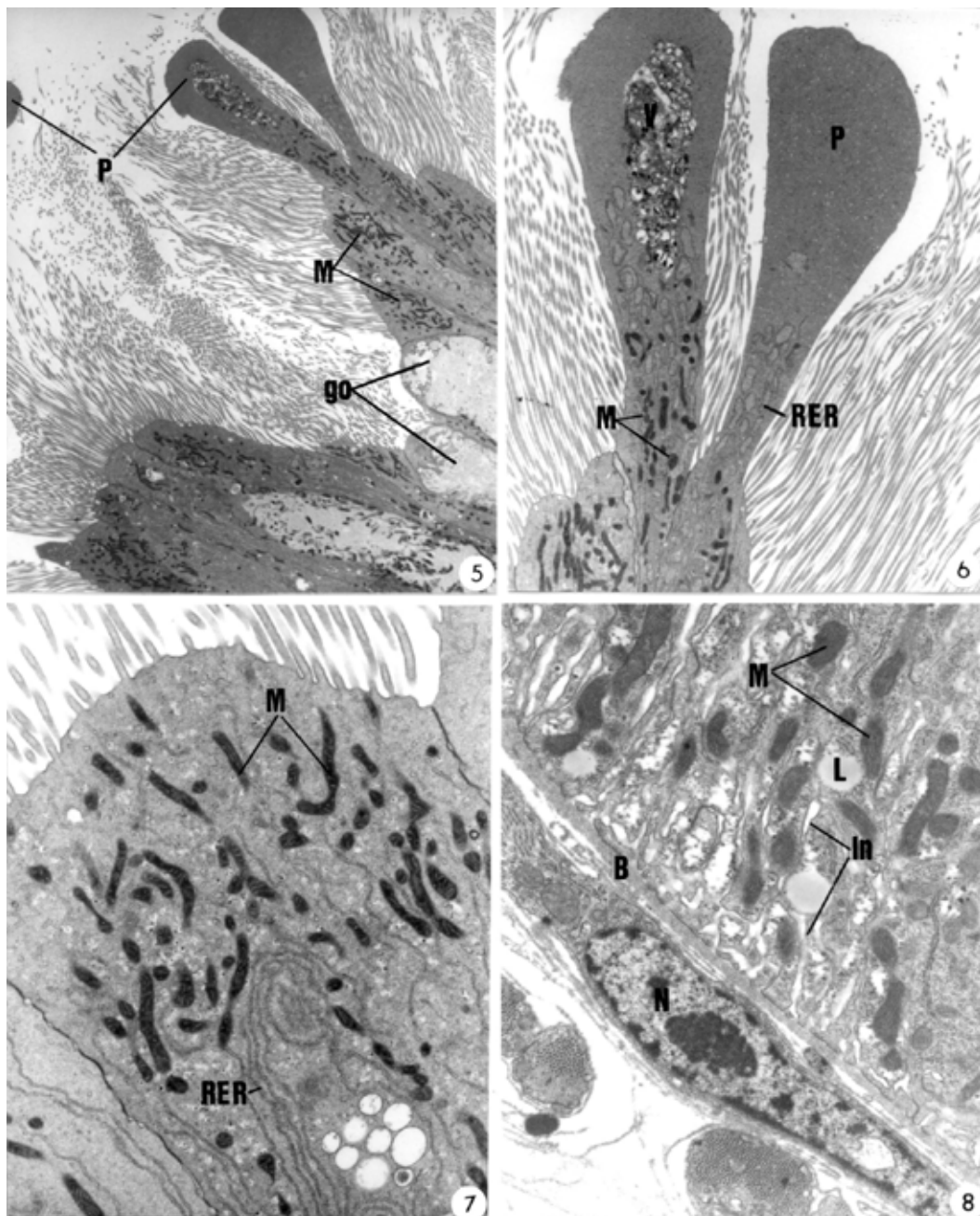
Agradecemos ao Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista, S.P., Brasil, pelo fornecimento dos insetos. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP (Proc. 00/01223-3).

Referências

1. Cioffi, M. - Tissue Cell, 11, p.467 (1979).
2. Cristofolletti, P.T.; Ribeiro, A.F. & Terra, W.T. - J. Insect Physiol., 47, p.143 (2001).
3. Hensley, S.D. - Proc. I.S.S.C.T., 14, p.454 (1971).
4. Hensley, S.D. & Hammond, A.M. - J. Econ. Entomol., 61, p.1742 (1968).
5. Jordão, B.P.; Capella, A.N.; Terra, W.R.; Ribeiro, A.F. & Ferreira, C. - J. Insect Physiol., 45, p.29 (1999).
6. Lehane, M.J. & Billingsley, P.F., in "Biology of the insect midgut". Chapman & Hall, London (1996).
7. Santos, C.D.; Ribeiro, A.F.; Ferreira, C. & Terra, W.R. - Cell Tissue Res., 237, p.565 (1984).



Figuras 1- 4. Região anterior do intestino médio da broca da cana. **Fig. 1:** Projeção citoplasmática (P) e vesículas (seta) de secreção microapócrina entre as microvilosidades das células colunares (co); mitocôndria (M); célula caliciforme (go). X 4.600. **Fig. 2:** Uma bordadura estriada de microvilosidades (m) reveste o lumen; mitocôndrias (M) e projeção citoplasmática (P) com retículo endoplasmático. X 5.800. **Fig. 3:** Superfície apical com microvilos; citoplasma com mitocôndrias (M), gotas lipídicas (L) e retículo endoplasmático rugoso (RER). X 16.800. **Fig. 4:** Citoplasma basal com invaginações da membrana plasmática (In) com mitocôndrias (M) associadas; gotas lipídicas (L); lâmina basal (B). X 16.800.



Figuras 5-8. Região posterior do intestino médio da broca da cana. **Fig. 5:** Projeções citoplasmáticas (P) entre as microvilosidades; mitocôndrias densas (M); células caliciformes (go). X 2.800. **Fig. 6:** Detalhe da superfície apical com projeções citoplasmáticas (P) entre os microvilos e contendo retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias (M) e grandes vacúolos (V) com conteúdo heterogêneo. X 6.400. **Fig. 7:** Citoplasma apical com muitas mitocôndrias densas (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER). X 13.200. **Fig. 8:** Citoplasma basal com invaginações da membrana plasmática (In) associadas com mitocôndrias (M); gotas lipídicas (L); lâmina basal (B); núcleo (N) de célula muscular. X 16.800.

ARTIGO 2

“Estudo morfométrico do epitélio do intestino médio
de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius
(Lepidoptera: Pyralidae)”

Publicado como: Pinheiro, D.O.; Silva, R.J.; Quagio-Grassiotto, I.; Gregório, E.A. Morphometric study of the midgut epithelium in larvar of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Neotropical Entomology, 32(3): 453-459, 2003.

Resumo

A larva de *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794 (broca da cana) tem grande interesse econômico, pois afeta o cultivo e aproveitamento industrial da cana-de-açúcar. Entretanto, poucos são os estudos sobre a morfologia interna deste inseto. O objetivo deste trabalho foi estudar morfometricamente, o seu epitélio intestinal, ao longo de seu comprimento, visando caracterizar regiões estruturalmente diferentes. O intestino médio de larvas no último instar foi subdividido em três regiões: anterior, mediana e posterior e os fragmentos foram processados para observação em microscopia de luz. Os cortes histológicos foram analisados em sistema computadorizado de análise de imagens para medir comprimento, largura e área do epitélio, das diferentes células epiteliais, dos seus respectivos núcleos e do lúmen intestinal. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e à análise multivariada. Nossos resultados mostraram que o intestino médio apresentou-se constituído, morfometricamente, por duas diferentes regiões, anterior e posterior; a região mediana apresentou valores coincidentes tanto com a região anterior quanto com a posterior, sugerindo ser região intermediária. As células epiteliais (colunares, caliciformes e regenerativas), quando avaliadas pela análise estatística multivariada, não apresentaram diferença morfométrica nas diferentes regiões do intestino médio. Entretanto, a análise de variância, realizada para variáveis isoladas, mostrou que as células regenerativas apresentaram maior variabilidade morfométrica.

Palavras-Chave: Morfometria, célula epitelial, inseto, broca da cana, mesêntero

Abstract

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* Fabricius has great economical interest as it affects the culture and industrial use of the sugarcane. However, there are few studies concerning the internal morphology of this insect. This work aims to study morphometrically the midgut and the epithelium along their length, trying to characterize different regions. Midgut of last instar larvae was divided in three regions: anterior, middle and posterior, and the fragments were processed for light microscopic observation. Histological sections were analyzed in a computerized system concerning the length, width and area of the epithelium, their cells, and the midgut lumen. The obtained data were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis test and by multivariate analysis. Our results showed that the midgut has two different regions, the anterior and the posterior; the middle region presents values that are coincident with the ones of either the anterior and the posterior portions, suggesting that there is an intermediate region between the other two ones. The epithelial cells (columnar, goblet and regenerative cells), when evaluated by multivariate analysis, do not present significant morphometric differences in the different midgut regions. However, the analysis of variance for separate variables show that the regenerative cells present wide morphometric variability along the midgut.

Keywords: Morphometry, epithelial cell, insect, sugarcane borer, mesenteron

Introdução

O epitélio do intestino médio em Lepidoptera é constituído, principalmente, por 4 tipos de células: colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Lehane & Billingsley 1996). As células colunares, as mais abundantes, são responsáveis pelo processamento da dieta, pela secreção de enzimas digestivas e pela absorção dos produtos finais da digestão (Lehane & Billingsley 1996). As células caliciformes auxiliam as colunares na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos (Lello *et al.* 1984, Chiang *et al.* 1986). Existem células regenerativas relativamente indiferenciadas espalhadas por todo o epitélio, observadas isoladas, em pares ou formando grupos (Turbeck 1974, Cavalcante & Cruz-Landim 1999). As escassas células endócrinas possuem forma variada, sendo piramidais, ovais e fusiformes (Andries & Beauvillain 1996, Cavalcante & Cruz-Landim 1999).

Embora todos os tipos celulares possam ser encontrados ao longo do intestino médio, muitos trabalhos sugerem que a distribuição e a morfologia destas células são variáveis ao longo do intestino médio de Lepidoptera (Cioffi 1979, Lello *et al.* 1984, Santos *et al.* 1984, Chiang *et al.*, 1986; Lehane & Billingsley 1996, Cristofolletti *et al.* 2001). Estas diferenças morfológicas são principalmente detectadas ao nível ultra-estrutural em todos os tipos celulares (Cioffi 1979, Lello *et al.* 1984, Santos *et al.* 1984, Lehane & Billingsley 1996).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius, é uma importante praga que ataca a cana-de-açúcar e muitas outras plantações incluindo milho, sorgo, trigo e arroz (Long & Hensley 1972). Estudo preliminar mostrou que suas células colunares epiteliais apresentam diferenças na organização ultra-estrutural que podem ser relacionadas com a sua localização no intestino médio (Pinheiro & Gregório 2001). Este achado foi previamente descrito para outros Lepidoptera, como *Manduca sexta* L. (Cioffi 1979), *Spodoptera frugiperda* Smith (Jordão *et al.* 1999) e *Erinnyis ello* L. (Santos *et al.* 1984).

Entretanto, existem poucos trabalhos de estudos morfométricos das células epiteliais no intestino médio de insetos, a maioria deles em Diptera (Nopanitaya & Misch 1974, Wood & Lehane 1991, Andrade-Coelho *et al.* 2001), poucos em Heteroptera (Ranjini & Mohamed 2000) e Hemiptera (Billingsley 1988), mas até o momento nenhum em Lepidoptera.

Este trabalho tem por objetivo estudar morfometricamente o lúmen e epitélio do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*. Medidas do seu intestino médio, bem como das células colunares, caliciformes e regenerativas foram obtidas ao longo do seu comprimento na tentativa de distinguir regiões diferentes nesse órgão.

Material e Métodos

Larvas de *D. saccharalis* foram mantidas em dieta artificial (Hensley & Hammond 1968) com temperatura (25-27°C) e umidade (70%) controladas. Cinquenta insetos no começo do último instar larval (12-17 dias de desenvolvimento) foram dissecados em microscópio estereoscópio, e o intestino médio imediatamente fixado em solução de glutaraldeído 2% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24 horas.

O intestino médio foi igualmente sub-dividido em 3 fragmentos, nomeados de região anterior, mediana e posterior. Estes fragmentos foram processados e incluídos em Historesina (JB4 – Polysciences); os cortes obtidos foram corados com azul de Toulidina (Pearse 1972) ou com reagente de Schiff - azul de Bromofenol – hematoxilina de Ehrlich (Coello 1989).

Os cortes histológicos foram analisados morfometricamente em sistema computadorizado para análise de imagens (QWin Lite 2.5 - Leica), adaptado em fotomicroscópio DMLB (Leica). As medidas obtidas foram: 1- Eixo maior (L_{Ax}) e menor (S_{Ax}), e a área (A) do a) lúmen; b) cada tipo celular epitelial e seu núcleo; c) intestino médio (epitélio + lúmen); 2) a altura (H) do epitélio, expresso como a média de 20 medidas obtidas ao longo do perímetro do intestino médio de cada corte examinado, bem como os valores máximo (H_{Max}) e mínimo (H_{Min}) destas medidas. Todas as medidas foram realizadas na região central das células e do lúmen do intestino médio.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, e a diferença entre grupos foi determinada pelo método de Dunn, usando o software Sigma-Stat 2.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Empregamos também o teste de análise multivariada, realizada pelo software MVSP 3.2, para compararmos os valores do lúmen e dos diferentes tipos celulares epiteliais nas diferentes regiões do intestino médio.

Resultados

O intestino médio de larvas de *D. saccharalis* é um tubo simples composto por uma camada simples de células epiteliais delimitando um lúmen (Fig. 1A); diferentes tipos celulares, principalmente células colunares, caliciformes e regenerativas constituem o epitélio do intestino médio (Fig. 1B). A altura do epitélio é muito variada em cada uma das três regiões estudadas (Tabela 1); existem diferenças, até o dobro, entre H_{Max} e H_{Min} obtidas na mesma região. Entretanto, não existe diferença significativa entre as diferentes regiões, considerando-se os valores de H e H_{Max} , mas a H_{Min} das regiões anterior e mediana são significativamente diferentes. Para o lúmen intestinal, o L_{Ax} e S_{Ax} das regiões mediana e posterior são similares entre si, mas estas medidas, em ambas as regiões, são significativamente diferentes das medidas obtidas na região anterior; a mesma diferença entre as três regiões foi observadas para o intestino médio como um todo (epitélio + lúmen).

A análise multivariada dos dados obtidos das medidas do lúmen epitelial (Fig. 2) mostra que o intestino médio tem duas regiões distintas, a anterior e a posterior; a região mediana apresenta valores que são coincidentes tanto com aqueles da anterior, como com os da posterior, bem como valores diferentes destas duas regiões.

A análise morfométrica de variância (Tabela 2) mostra que algumas das medidas separadas obtidas das diferentes células epiteliais são variáveis ao longo do intestino médio. Nas células colunares, a maioria das variáveis não apresenta diferença significativa entre as regiões anterior e mediana, entretanto o L_{Ax} da célula e o S_{Ax} e a A do seu núcleo, das duas regiões, anterior e posterior, eram diferentes dos valores para a região posterior. A célula caliciforme mostra pouca variabilidade entre as regiões do intestino médio; o L_{Ax} da célula e do seu núcleo na região anterior é significativamente diferente daqueles das regiões mediana e posterior. As células regenerativas são morfometricamente variáveis ao longo do intestino médio; o S_{Ax} e a A da célula e do núcleo nas regiões anterior e posterior são significativamente diferente, e estes valores para a região mediana não diferem daqueles das regiões anterior ou posterior.

A análise multivariada dos valores relacionados com todas as medidas das células epiteliais no intestino médio (Figs. 3-5) mostra que as células colunares, caliciformes e regenerativas não constituem populações celulares morfometricamente distintas, nas três regiões analisadas do intestino médio.

Discussão

A avaliação morfométrica do intestino médio de *D. saccharalis* (epitélio e lúmen) mostrou que as regiões anterior e posterior são distintas; a região mediana apresenta valores intermediários entre as regiões anterior e posterior, sugerindo que esta porção pode ser considerada uma transição. Não existem, na literatura, estudos morfométricos do intestino médio de insetos ao nível de microscopia de luz. Nossos resultados confirmam a idéia geral que o intestino médio, em larvas de insetos, é estruturalmente diferenciado ao longo do seu comprimento, como sugerido por observações ultra-estruturais (Cioffi 1979, Lello *et al.* 1984, Santos *et al.* 1984).

Entretanto, quando cada tipo celular foi individualmente analisado morfometricamente, não foi possível caracterizar diferenças nas células ao longo do intestino médio. A análise multivariada compara dois ou mais parâmetros, usando o maior conjunto numérico possível para estas entidades. Moço *et al.* (2002) usaram este tipo de análise para caracterização e identificação de *Hepatozoon*, um protozoário que parasita eritrócitos de serpentes; medindo variáveis das células e núcleos (comprimento, largura e área), estes autores foram capazes de identificar diferentes populações deste parasita sanguíneo.

Relato preliminar sobre a ultra-estrutura das células colunares no intestino médio da broca da cana (Pinheiro & Gregório 2001) mostrou diferenças na sua organização subcelular que puderam ser relacionadas com sua localização ao longo do comprimento do intestino médio; estas diferenças foram principalmente relacionadas com as projeções citoplasmáticas apicais, a quantidade de mitocôndrias e as invaginações de membrana plasmática basal. Entretanto, nossos resultados sugerem que estas características ultra-estruturais não interferem nos parâmetros morfométricos analisados tanto para esta célula como para seu núcleo (LAX, SAX e A) nas mesmas regiões.

Dados morfométricos referentes à organização da ultra-estrutura das células epiteliais do intestino médio foram descritos em muitas ordens de insetos, como em Diptera (Nopanitaya & Misch 1974, Wood & Lehane 1991, Andrade-Coelho *et al.* 2001), Orthoptera (Srivastava 1997), Heteroptera (Ranjini & Mohamed 2000), e Hemiptera (Billingsley 1988). Entretanto, esses trabalhos não comparam as células ao longo da extensão do intestino médio; eles estão, principalmente, relacionados com aspectos experimentais durante o processo de digestão (Billingsley 1988, Wood & Lehane 1991, Ranjini & Mohamed 2000, Andrade-Coelho *et al.* 2001), diferenças sexuais (Rudin & Hecker 1976) e desenvolvimento dos insetos (Nopanitaya & Misch

1974). A aplicação da análise multivariada, apresentada neste trabalho, pode ser um instrumento importante para uma melhor interpretação das diferenças fisiológicas, sexuais e ontogênicas, como mostrados pelos autores acima.

As células endócrinas não foram consideradas em nossos estudos, por ser escassa e de difícil observação ao nível de microscopia de luz, principalmente usando técnicas de colorações convencionais (Endo *et al.* 1983, Montuenga *et al.* 1989). O pequeno número de células endócrinas no epitélio do intestino médio também foi descrito em muitas outras espécies de insetos (Andries & Beauvillain 1988, Montuenga *et al.* 1989).

As células regenerativas apresentaram uma ampla variabilidade morfométrica nas diferentes regiões do intestino médio. Nossos resultados mostram que existem diferenças nesta célula quando localizadas na região anterior ou posterior. A região mediana apresenta características intermediárias para os parâmetros das células regenerativas, apoiando a idéia de que existe uma porção de transição no intestino médio entre as regiões anterior e posterior.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista, SP, pelo fornecimento dos insetos e os Ricardo André Santos Teixeira e Antônio Vicente Salvador pela assistência técnica. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP (proc. 01/10868-0).

Referências Bibliográficas

- Andrade-Coelho, C.A., J. Santos-Mallet, N.A. Souza, U. Lins, M.N.L. Meirelles & E.F. Rangel. 2001. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 1141-1151.
- Andries, J.C. & J.C. Beauvillain. 1988. Ultrastructural study of cholecystokininlike immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. Biol. Cell. 46: 195-202.
- Billingsley, P.F. 1988. Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) midgut cells during blood digestion. Tissue Cell 20: 291-301.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. Naturalia 24: 19-40.

- Chiang, A.S., D.F. Yen & W.K. Peng. 1986 Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 47: 333-339.
- Cioffi, M. 1979. The morphology, fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. Tissue Cell 11: 467-479.
- Coello, S. 1989. A new staining schedule for formalin-fixed, glycol methacrylate-embedded fish ovaries. J. Fish Biol. 34: 329-330.
- Cristofolletti, P.T., A.F. Ribeiro & W.T. Terra. 2001. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. J. Insect Physiol. 47: 143-155.
- Endo, Y., H. Sugihara, S. Fujita & J. Nishiitsutsuji-Uwo. 1983. Kinetics of columnar and endocrine cells in the cockroach midgut. Biomedical Res. 4: 51-60.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61: 1742-1743.
- Jordão, B.P., A.N. Capella, W.R. Terra, A.F. Ribeiro & C. Ferreira. 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. J. Insect Physiol. 45: 29-37.
- Lehane, M.J. & P.F. Billingsley. 1996. (eds.) Biology of the insect midgut. London, Chapman and Hall, 486p.
- Lello, E., W.K. Hanton, S.T. Bishoff & D.W. Misch. 1984. Histopathological effects of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): Low doses compared with fasting. J. Invertebr. Pathol. 43: 169-181.
- Long, W.H. & S.D. Hensley. 1972. Insect pests of sugarcane. Annu. Rev. Entomol. 17: 149-176.
- Moço, T.C., L.H. O'Dwyer, F.C. Vilela, T.H. Barrella & R.J. Silva. 2002. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon spp.* (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 1169-1176.
- Montuenga, L.M., M.A. Barrenechea, P. Sesma, J. López & J.J. Vázquez. 1989. Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Cell Tissue Res. 258: 577-583.
- Nopanitaya, W. & D.W. Misch. 1974. Developmental cytology of the midgut in the Flesh-fly, *Sarcophaga bullata* (Parker). Tissue Cell 6: 487-502.
- Pearse, A.G.E. 1972. (eds.) Histochemistry: theoretical and applied. Edinburgh, Churchill Livingstone, v.1/2, 1055p.

- Pinheiro, D.O. & E.A. Gregório. 2001. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microscopica* 2 (B): 171-172.
- Ranjini, K.R. & U.V.K. Mohamed. 2000. Morphometric analysis of the midgut epithelium of *Iphita limbata* Stal (Heteroptera: Pyrrhocoridae) during digestion. *J. Adv. Zool.* 21: 7-11.
- Rudin, W. & H. Hecker. 1976. Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). *Tissue Cell* 8: 459-470.
- Santos, C.D., A.F. Ribeiro, C. Ferreira & W.R. Terra. 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.* 237: 565-574.
- Srivastava, C.N. 1997. Morpho-histological studies on the digestive system of *Gryllus domesticus* (Linn.) (Orthoptera: Gryllidae). *J. Entomol. Res.* 21: 321-328.
- Turbeck, B. 1974. A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue Cell* 6: 627-40.
- Wood, A.R. & M.J. Lehan. 1991. Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). *J. Insect Physiol.* 37: 161-166.

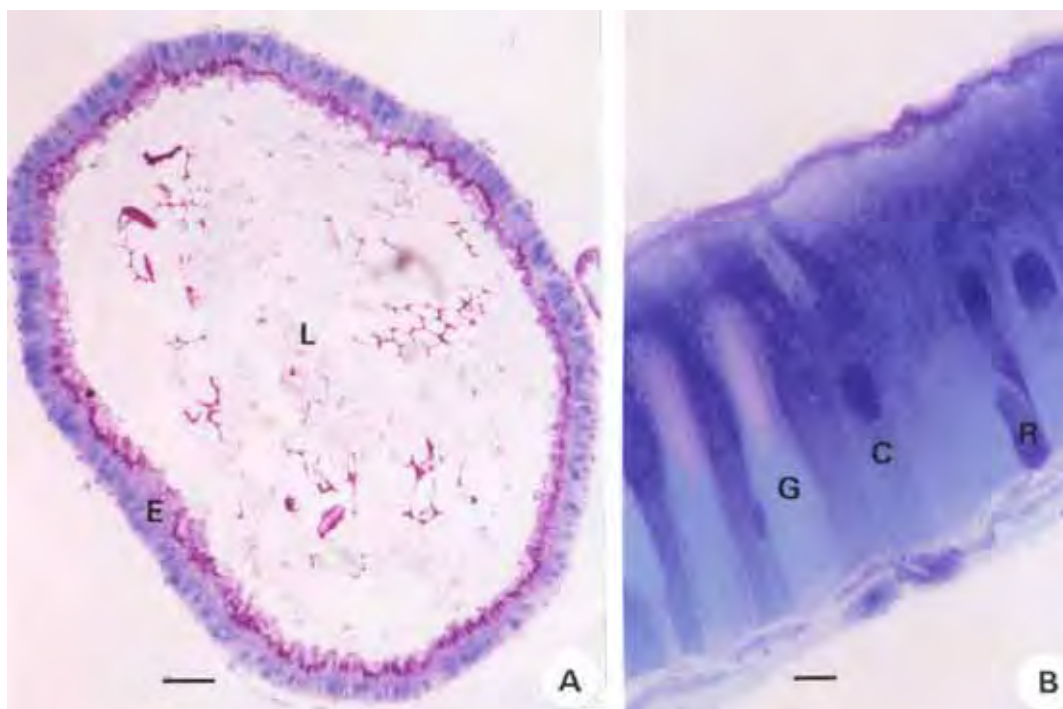


Figura 1. Corte histológico do intestino médio de *D. saccharalis*: **A)** lúmen (L) e células epiteliais (E) da região mediana, corados com o reativo de Schiff- azul de Bromofenol- hematoxilina de Ehrlich (Bar = 100 μ m); **B)** célula colunar (C), caliciforme (G) e regenerativa (R) no epitélio da região anterior, corado com azul de Toluidina (Bar = 10 μ m).

Tabela 1. Dados morfométricos do lúmen e do epitélio das regiões anterior, mediana e posterior do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*.

Regiões	Epitélio			Lúmen			Epitélio + Lúmen		
	H (μ m)	H _{Max} (μ m)	H _{Min} (μ m)	Lax (mm)	Sax (mm)	A (mm ²)	Lax (mm)	SAx (mm)	A (mm ²)
Anterior (n = 32)	93.1 (4.7)a	124.3 (12.6)a	70.9 (5.6)a	1.5 (0.2)a	0.4 (0.1)a	471.2 (173.7)a	1.6 (0.2)a	0.6 (0.1)a	826.9 (231.3)a
Mediana (n = 42)	89.2 (12.0)a	123.8 (18.9)a	62.9 (5.7)b	1.0 (0.2)b	0.5 (0.1)b	374.2 (197.8)a	1.2 (0.2)b	0.7 (0.1)b	671.6 (222.4)a
Posterior (n = 47)	97.1 (23.1)a	130.7 (31.3)a	61.7 (13.6)ab	1.0 (0.5)b	0.7 (0.3)b	607.8 (472.9)a	1.2 (0.5)b	0.9 (0.3)b	843.3 (572.4)a

Nota: Todos os valores representam a mediana e a amplitude semi-interquartílica. Mesmas letras nas colunas representam $p > 0.05$ e diferentes letras representam $p < 0.05$. H – altura; H_{Max} – altura máxima do epitélio; H_{Min} – altura mínima do epitélio; LAx – eixo maior; SAx – eixo menor; A – área.

Tabela 2. Dados morfométricos das células colunares, caliciformes e regenerativas das regiões anterior, mediana e posterior do intestino médio de larvas *D. saccharalis*.

Tipos	Célula			Núcleo		
	Lax (μm)	SAX (μm)	A (μm^2)	LAX (μm)	SAX (μm)	A (μm^2)
Celulares						
Colunar						
Anterior (n = 51)	68.4 (5.3)a	8.0 (2.0)a	577.3 (127.7)a	11.3 (0.9)a	4.9 (0.9)a	44.6 (8.9)a
Mediana (n = 55)	64.2 (6.0)ab	9.9 (2.3)a	615.1 (124.6)a	11.3 (1.1)a	4.7 (1.0)a	44.8 (11.0)a
Posterior (n = 57)	60.4 (3.1)b	9.1 (1.9)a	565.5 (105.7)a	10.8 (0.9)a	4.0 (0.6)b	38.5 (7.6)b
Caliciformes						
Anterior (n = 54)	58.4 (4.2)a	7.2 (0.9)a	408.3 (42.7)a	5.4 (0.7)a	3.4 (0.5)a	17.1 (3.0)a
Mediana (n = 44)	56.2 (6.8)b	7.7 (1.2)a	421.1 (61.8)a	6.8 (1.2)b	2.9 (0.8)a	17.5 (2.9)a
Posterior (n = 50)	63.2 (4.4)b	7.6 (1.6)a	418.5 (83.7)a	7.2 (1.2)b	3.0 (0.6)a	17.8 (2.9)a
Regenerativa						
Anterior (n = 51)	14.1 (5.0)a	5.9 (1.3)a	69.2 (18.3)a	6.0 (1.6)a	4.1 (1.2)a	20.3 (4.9)a
Mediana (n = 61)	14.4 (2.4)a	5.4 (0.9)ab	60.5 (16.1)ab	6.3 (0.8)a	3.7 (0.6)ab	19.9 (3.8)ab
Posterior (n = 54)	13.9 (3.6)a	5.4 (0.9)b	58.5 (19.7)b	6.0 (2.5)a	3.4 (0.5)b	17.3 (5.4)b

Nota: Todos os valores representam a mediana e a amplitude semi-interquartilica. Mesmas letras nas colunas representam $p > 0.05$ e diferentes letras representam $p < 0.05$. LAX – eixo maior; SAX – eixo menor; A – área.

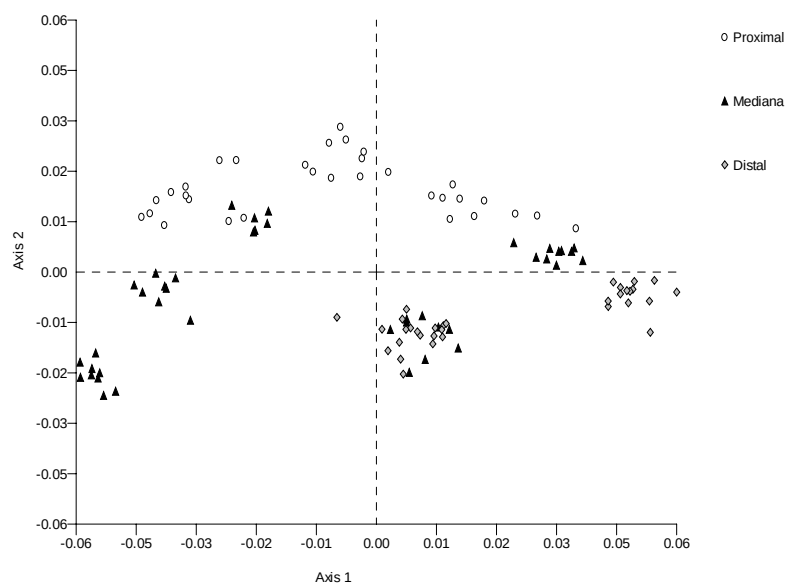


Figura 2. Análise multivariada dos principais componentes para comparar dados morfométricos na região anterior, mediana e posterior do intestino médio de *D. saccharalis*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

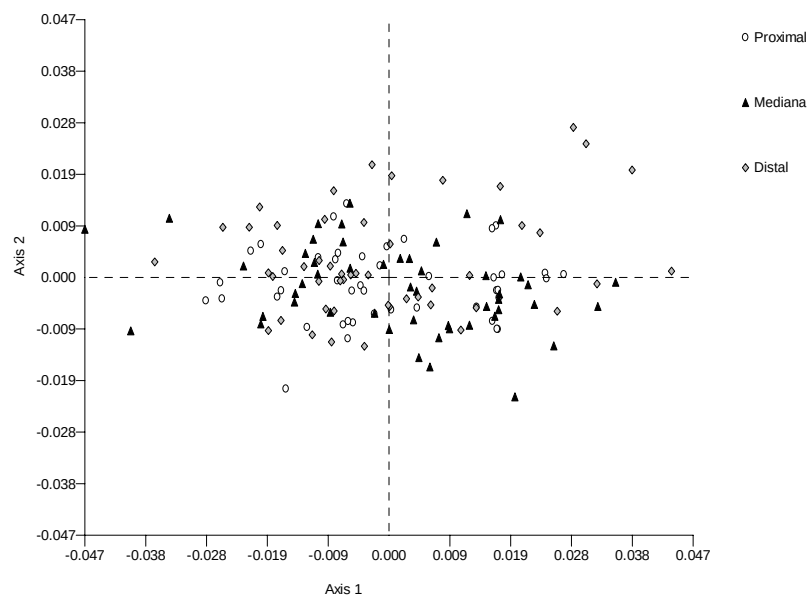


Figura 3. Análise multivariada dos dados morfométricos das células colunares na região anterior, mediana e posterior do intestino médio de *D. saccharalis*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

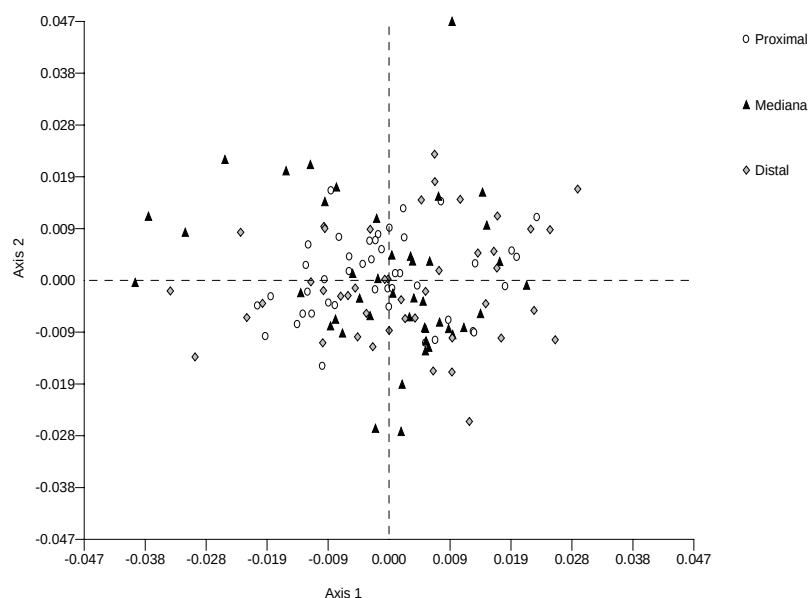


Figura 4. Análise multivariada dos dados morfométricos das células caliciformes na região anterior, mediana e posterior do intestino médio de *D. saccharalis*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

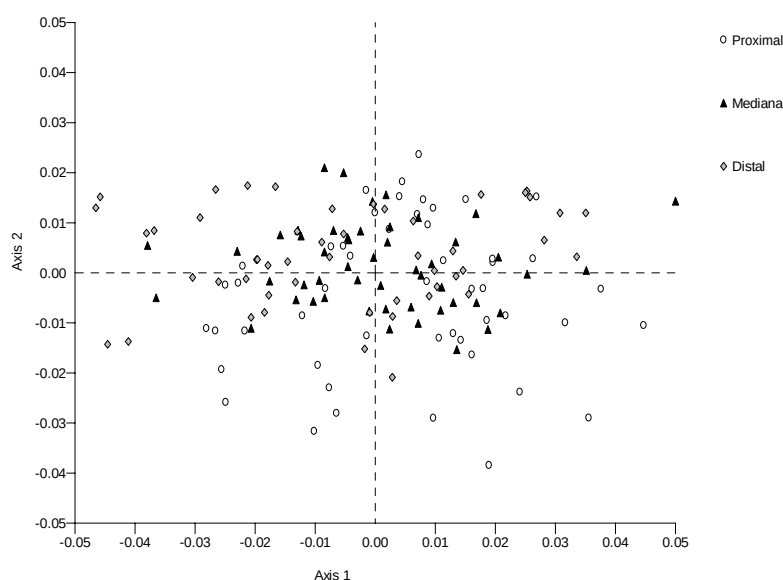


Figura 5. Análise multivariada dos dados morfométricos das células regenerativas na região anterior, mediana e posterior do intestino médio de *D. saccharalis*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

ARTIGO 3

“Diferenças morfológicas regionais das células epiteliais ao longo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)”

A ser enviado para a revista Neotropical Entomology como: Pinheiro, D.O.; Quagio-Grassiotto, I.; Gregório, E.A. Morphological regional differences of epithelial cells along of the midgut in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) larvae.

Resumo

A *Diatraea saccharalis* (broca da cana) Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga da cana-de-açúcar e outras plantações. O objetivo deste trabalho foi caracterizar possíveis variações morfológicas nas células epiteliais (colunares, caliciformes, regenerativas) ao longo do intestino médio (IM) de larvas de *D. saccharalis*. Fragmentos do IM (anterior, mediana e posterior) foram fixados e processados para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Existem diferenças morfológicas citoquímicas e ultra-estruturais nas células epiteliais, dependendo da sua localização no IM. A superfície apical de algumas células colunares exibe projeções citoplasmáticas que aumentam em número e volume da região anterior para a posterior do IM. Existe aumento dos grânulos PAS-positivos no citoplasma apical das células colunares e regenerativas, da região anterior para a posterior. A câmara das células caliciforme na região anterior do IM mostra seu ápice estreito, enquanto que na posterior esta porção da câmara é alargada; os microvilos da câmara são pequenos e finos no ápice, sendo numerosos, longos e mais espessos na porção basal. Nossos resultados sugerem que o IM da broca da cana apresenta duas regiões morfolologicamente distintas, a anterior e posterior; a região mediana é uma região de transição.

Palavras-Chave: células epiteliais, intestino médio, Lepidoptera, morfologia, *Diatraea saccharalis*

Abstract

The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) is a pest for the sugarcane and many other crops. This work aims to characterized morphological variability in the epithelial cells (columnar, goblet and regenerative) along the midgut of *D. saccharalis* larvae. Fragments of the midgut (anterior, middle and posterior regions) were fixed and processed by light and scanning electron microscopy. There are both cytochemical and ultrastructural differences in the morphology of the epithelial cells, depending on their localization along the midgut. The apical surface of columnar cell shows an increase in both number and size of the apical protrusions from the anterior to the posterior midgut regions. There is an increase in the amount of PAS-positive granules are detected in the cytoplasm of both the columnar and regenerative cells, from the anterior to the posterior region. The apical surface of goblet cell is narrow in the anterior region, and enlarged in the posterior midgut; the microvilli of the cavity are small and thin at the apical cavity surface, being thicker, longer and numerous at the basal portion of the cavity. Our results suggested that the sugarcane borer midgut has two morphological different regions, the anterior and the posterior; the middle region is a transitional region.

Keywords: Epithelial cell; midgut; Lepidoptera; Morphology; *Diatraea saccharalis*

Introdução

Estudos, em diversas Ordens de insetos, mostram a importância do intestino médio (IM) na absorção de alimentos, troca de íons, entrada de inseticidas, vírus e toxinas, e liberação de neurohormônios que regulam a atividade de vários outros processos fisiológicos (Santos *et al.* 1984; Chapman 1985, 1998; Dow 1986; Lehane & Billingsley 1996; Jordão *et al.* 1999; Edwards & Weaver 2001, entre outros).

O IM de insetos é constituído por um epitélio colunar, revestido por uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais (Chapman 1985). O epitélio apresenta, na maioria dos insetos, quatro tipos celulares: colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Lehane & Billingsley 1996). Muitos dos trabalhos referentes as células epiteliais correlacionam sua morfologia com possíveis funções (Cioffi 1979; Santos *et al.* 1984; Hung *et al.* 2000; Caetano & Zara 2001; Pinheiro & Gregório 2003; Levy *et al.* 2004).

O epitélio do IM é revestido internamente por uma membrana acelular (membrana ou matriz peritrófica), na maioria dos insetos (Chapman 1985; Dow 1986; Lehane & Billingsley 1996; Terra 2001). Em larvas de Lepidoptera, essa membrana é secretada ao longo do IM pelas células colunares (De Priester 1971; Terra 1988, 1996; Harper & Hopkins 1997; Hopkins & Harper 2001). Embora impeça o contato direto do alimento com a bordadura estriada das células colunares, esta membrana permite a passagem das enzimas digestivas em direção à luz intestinal e a absorção dos produtos resultantes da digestão, sendo posteriormente eliminada com as fezes (Tellam 1996), prevenindo injúrias mecânicas e dificultando ou impedindo a entrada de patógenos (Terra 1988, 2001).

As células colunares, mais abundantes, são responsáveis pela produção de enzimas e absorção dos produtos da digestão (Lehane & Billingsley 1996). Sua superfície apical exibe microvilosidades regulares e exuberantes, enquanto que no citoplasma basal observa-se labirinto basal associado às mitocôndrias (Nopanitaya & Misch 1974; Lehane & Billingsley 1996; Hung *et al.* 2000; Pinheiro & Gregório 2003). Projeções citoplasmáticas têm sido detectadas em diversas espécies de insetos (Lello *et al.* 1984; Ryerse *et al.* 1992; Caetano & Zara 2001; Cristofolletti *et al.* 2001; Lello & Vieira 2001; Levy *et al.* 2004).

As células caliciformes recebem esta denominação por possuírem invaginação da membrana plasmática apical formando uma cavidade, semelhante a um cálice; a morfologia desta cavidade é variável em larvas de Lepidoptera, dependendo de sua

localização no IM. A cavidade ocupa a maior parte da célula na região anterior do IM ou somente a parte apical naquelas da região posterior (Anderson & Harvey 1966; Cioffi 1979; Santos *et al.* 1984; Lehane & Billingsley 1996). O interior desta cavidade é margeado por projeções citoplasmáticas semelhantes a microvilosidades, contendo mitocôndrias (Anderson & Harvey 1966; Cioffi 1979; Santos *et al.* 1984; Chapman 1985, 1998; Lehane & Billingsley 1996; Cavalcante & Cruz-Landim 1999; Levy *et al.* 2004). Estas células estão envolvidas no processo de homeostasia iônica e absorção de metabólitos, função esta desempenhada em cooperação com as células colunares (Anderson & Harvey 1966; Chapman 1985, 1998; Dow 1986; Lehane & Billingsley 1996; Terra *et al.*, 2006).

As células regenerativas são observadas isoladas, em pares ou formando grupos (nidi) de regeneração, localizados na base do epitélio (Chapman 1985; Dow 1986; Cavalcante & Cruz-Landim 1999); apresentam citoplasma escasso, com poucas organelas (Turbeck 1974; Lehane & Billingsley 1996; Levy *et al.* 2004). O número e morfologia de células regenerativas dependem da proximidade das ecdises e da duração do ciclo de vida dos insetos (Turbeck 1974; Terra 1988). É consenso que as células regenerativas teriam papel de reposição de células epiteliais (Endo *et al.* 1983; Chapman 1985; Lehane & Billingsley 1996).

As células endócrinas estão localizadas na base do epitélio, sendo caracterizadas pela presença de grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (Sehnal & Zitnan 1996; Edwards & Weaver 2001). Vários são os papéis atribuídos a esta célula: controle hormonal dos movimentos peristálticos, da digestão, diurese, do desenvolvimento e reprodução, entre outras funções (para revisão ver Sehnal & Zitnan 1996; Edwards & Weaver 2001).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga que afeta de maneira significativa a produtividade agrícola e industrial da cultura da cana-de-açúcar, sendo encontrada nas Antilhas, América Central e do Sul. As lagartas também atacam outras gramíneas, sendo consideradas prejudiciais ao milho, arroz, sorgo, trigo e algumas espécies de capim (Rossi & Fowler 2003). Apesar da importância desse inseto, poucos são os trabalhos sobre a sua morfologia interna, especialmente no que se refere ao IM. As descrições existentes referem-se as diferenças ultra-estruturais das células colunares (Pinheiro & Gregório 2003), e morfométricas nos diferentes tipos celulares (Pinheiro *et al.* 2003, 2006), além de diferenças bioquímicas de atividade enzimática (Ferreira *et al.* 1997; Azevedo *et al.* 2003). Entretanto, nenhum

deles caracteriza variações morfológicas nos diferentes tipos celulares, ao longo do IM da broca da cana, que é o objetivo desse trabalho.

Material e Métodos

Larvas de *D. saccharalis* foram mantidas em dieta artificial, com temperatura (25-27°C) e umidade (70%) controladas. Os insetos, no último instar larval, foram dissecados em microscópio estereoscópio e o IM imediatamente fixado de acordo com a técnica utilizada.

Microscopia de luz (ML): os IM coletados foram sub-divididos em 3 regiões: anterior, mediana e posterior; os materiais foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3 por 6h, sendo desidratados em seqüência crescente de soluções de álcool etílico. A inclusão foi realizada em resina JB4 da Polysciences, sendo polimerizado em estufa à 37°C por 24h. Os cortes de 3-7 µm foram submetidos às técnicas de colorações por hematoxilina- eosina e PAS (Pearse, 1972).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): o IM não foi retirado do inseto, sendo apenas realizada incisão longitudinal para expor a superfície luminal, bem como a superfície lateral do epitélio. Os materiais foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3 por 24h e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2h no mesmo tampão. A desidratação foi realizada com seqüência crescente de soluções de álcool etílico, sendo a secagem realizada por meio do ponto crítico em CPD 020 (Balzer Union), com CO₂ líquido. Os espécimes foram colados em suporte adequado e recobertos com camada de 20nm ouro em aparelho MED 010 (Balzer Union). A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM 515 da Philips.

Resultados

O IM de *D. saccharalis* é revestido por epitélio colunar simples onde identificamos células colunares, caliciformes e regenerativas, distribuídas em toda sua extensão (Figs. 1-8). A superfície epitelial é recoberta internamente por fina membrana peritrófica (Figs. 9).

Célula colunar: de forma prismática, são as mais numerosas em todo o IM; mostram citoplasma basófilo e núcleo basal alongado com cromatina descondensada (Figs. 1-8). Discretos grânulos PAS-positivos estão presentes no citoplasma apical e dentro das projeções citoplasmáticas na região anterior (Fig. 3), havendo aumento

desses grânulos para a região mediana (Fig. 5) e posterior (Figs. 7-8). Raras imagens sugestivas de morte celular são visualizadas (Fig. 2). Projeções citoplasmáticas são observadas na superfície apical entre a bordadura estriada; poucas são as projeções na região anterior do IM (Figs. 1-3), aumentando em número da região mediana (Figs. 4-5) para a região posterior, onde podem ser volumosas (Figs. 6-8). Este achado é confirmado em MEV (Figs. 9-14). Muitas dessas projeções, na região mediana (Figs. 11-12), são arredondadas e com superfície lisa. Poucos e pequenos microvilos são eventualmente observados na membrana dessas projeções (Fig. 15). Na região posterior as projeções citoplasmáticas formam um tapete recobrimdo toda a superfície do epitélio, dificultando a observação das microvilosidades. Estas, quando visualizadas, são curtas e ficam restritas à superfície das projeções citoplasmáticas (Fig. 16). Existem imagens que mostram as projeções ligadas à superfície celular por fino pedúnculo citoplasmático (Fig. 21).

Células Caliciformes. Apresentam citoplasma acidófilo, com raros grânulos PAS-positivos, e núcleo basal em forma de U, acompanhando a base da câmara (Figs. 3, 4, 6-8). Apresentam grande cavidade, em forma de cálice, cuja superfície interna possui projeções semelhantes a microvilos; na região anterior e mediana, esta cavidade é localizada predominantemente no ápice da célula (Figs. 3-4), enquanto que na região posterior observa-se com freqüência alargamento da base da célula (Fig. 7). Em MEV as células caliciformes são identificadas apenas quando observada a superfície lateral do epitélio (Figs. 15-18), pois sua superfície apical é estreita e recoberta pelas microvilosidades das células colunares. A câmara caliciforme, nas células da região anterior do IM, mostra ápice estreito (Figs. 3), enquanto que, na região posterior do IM, esta porção da câmara é alargada (Figs. 6-8). Na região mediana do IM estão presentes células com dois formatos de câmara (Figs. 4). Ao longo do IM, os microvilos da câmara são pequenos e finos no ápice da câmara, sendo numerosos, longos e mais espessos na porção basal da mesma (Figs. 15-18) e apresentam uma discreta dilatação na extremidade (Figs. 18). A quantidade dos microvilos da câmara parece aumentar da região anterior do IM para a posterior (Figs. 15-18).

Células Regenerativas. São células pequenas com formato arredondado ou alongado, sendo encontradas isoladas, em pares ou em grupos na base do epitélio; apresentam núcleo central e citoplasma escasso e basófilo (Figs. 1, 3-6, 8). Observamos poucos grânulos PAS-positivos no citoplasma supra-nuclear das células situadas na

região anterior do IM (Fig. 3), grânulos estes que aumentam em número da região mediana (Fig. 5) para a região posterior (Fig. 8).

Discussão

A morfologia geral do epitélio do IM de larvas de *D. saccharalis* é similar àquela descrita para muitos Lepidoptera, como *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) (Cioffi 1979), *Erynnis ello* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) (Santos *et al.* 1984), *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Jordão *et al.* 1999), *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Levy *et al.* 2004) entre muitas outras espécies (para revisão, ver Lehane & Billingsley 1996).

Nossas observações indicam que as células epiteliais (colunares, caliciformes e regenerativas) apresentam diferenças regionais na morfologia, ao longo do IM de *D. saccharalis*. As células endócrinas não foram detectadas nas nossas preparações por serem escassas e de difícil observação usando técnicas de coloração histológicas convencionais, como também apontados em outros trabalhos (Endo & Nishiitsutsuji-Uwo 1982; Endo *et al.* 1983).

As células colunares mostram um aumento no número de projeções citoplasmáticas (desprendendo-se do ápice celular em direção ao lúmen intestinal) e na quantidade de grânulos citoplasmáticos PAS-positivos, da região anterior para a região posterior do IM. Essa grande quantidade de material PAS-positivo no citoplasma de células colunares também foi observada no IM de *Dermatobia hominis* Linnaeus (Díptera: Cuterebridae) (Lello & Vieira 2001) e em *Triatoma infestans* Klug (Heteroptera: Reduviidae) (Burgos & Gutiérrez 1976).

O significado fisiológico da liberação de projeções citoplasmáticas para o lúmen intestinal não está totalmente esclarecido. Alguns autores relacionam este processo com mecanismo de degeneração celular, decorrente da renovação epitelial (Anderson & Harvey 1966; De Priester 1971; Terra & Ferreira 1994) ou mesmo artefato técnico (Ryerse *et al.* 1992), enquanto outros apontam relação com processo de secreção apócrina, para liberação de enzimas digestivas (Santos *et al.* 1984; Wood & Lehane 1991; Cristofolletti *et al.* 2001). Uma vez que os insetos utilizados em nosso trabalho não estavam próximos de muda, e que realizamos controle das condições técnicas de processamento dos IM, nossos resultados em *D. saccharalis* concordam com a idéia de que estas projeções devem estar relacionadas com o processo de secreção apócrina.

Poucos trabalhos descrevem a morfologia destas projeções em microscopia de luz (Caetano & Zara 2001; Lello & Vieira 2001; Levy *et al.* 2004); e embora os autores não enfatizem a variabilidade do número de projeções dependente da localização das células colunares no IM, os aspectos morfológicos descritos são semelhantes aos observados em *D. saccharalis*. Nossas observações ultra-estruturais mostram que as escassas projeções da região anterior exibem microvilosidades em parte de sua superfície e que estão ausentes naquelas da região posterior, onde sua superfície fica lisa. Uma vez que o número de projeções é exuberante na região posterior do IM, onde ocupam extensa área do ápice das células colunar em detrimento das microvilosidades, é de se supor que em *D. saccharalis* a liberação de parte do citoplasma apical pode não estar relacionado com a liberação de enzimas digestivas; em outros insetos, sabe-se que a liberação de enzimas digestivas está relacionada com o processo de secreção microapócrina, que ocorre a partir das microvilosidades como sugerido para *E. ello* (Santos *et al.* 1984), *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (Diptera: Muscidae) (Wood & Lehane 1991) e para *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) (Cristofolletti *et al.* 2001). Observações prévias da organização sub-celular das células colunares, em *D. saccharalis* (Pinheiro & Gregório 2003) mostraram que o conteúdo destas projeções na região anterior é pobre em organelas, enquanto que aquelas volumosas da região posterior contêm inúmeras organelas, incluindo retículo endoplasmático, mitocôndrias e vacúolos digestivos, reforçando a idéia de que exista diferença funcional destas projeções, e conseqüentemente das células colunares, dependente da localização espacial no IM.

A quantidade de grânulos PAS-positivos, observados no citoplasma apical das células colunares, aumenta da região anterior para a região posterior do IM. O material PAS-positivo pode representar depósitos de glicogênio e/ou grânulos de secreção contendo polissacarídeos. Depósitos de glicogênio têm sido raramente descritos no citoplasma de células colunares em Lepidoptera. Sabe-se, entretanto, que a membrana peritrófica é composta principalmente por quitina, um polímero linear N-acetyl-D-glucosamina (Terra 1996; Tellam *et al.* 1999) e glicoproteínas (Tellam *et al.* 1999; Terra 2001). Como quitina é passível de ser corada por PAS, nossos achados apontam para a existência de precursores de quitina, que podem estar concentrados no citoplasma apical para secreção (Harper & Hopkins 1997; Hopkins & Harper 2001; Terra 2001). O fato de aumentar a quantidade de material citoplasmático PAS-positivo da região anterior para a posterior, sugere que as células colunares da região posterior podem estar

secretando mais intensamente os precursores de quitina para a membrana peritrófica do que as células da região anterior.

O formato da câmara da célula caliciforme tem sido estudado em outros Lepidoptera, sendo apontado que a porção apical desta cavidade é mais alargada nas células da região posterior do IM (Cioffi 1979; Lello *et al.* 1984; Santos *et al.* 1984; Jordão *et al.* 1999). Em larvas de *D. saccharalis*, diferenças na morfologia desta cavidade não foram consistentes em ML; entretanto, as análises ao MEV mostram que além deste alargamento da câmara da região anterior para a posterior, ocorre ainda um aparente aumento no número dos microvilos da câmara em toda sua extensão. Em nossas preparações fica claro que a câmara, nas células da região posterior, alcança a base da célula, diferentemente do apontado em outros Lepidoptera (Cioffi 1979; Terra 1988). O maior diâmetro dos microvilos da base da câmara pode ser explicado pela presença de mitocôndrias dentro destas projeções citoplasmáticas, como descrito em inúmeros insetos (Anderson & Harvey 1966; Lehane & Billingsley 1996; Cavalcante & Cruz- Landim 1999; Levy *et al.* 2004).

As células regenerativas apresentam citoplasma escasso com poucas organelas e possuem a função de renovação celular (De Priester 1971; Turbeck 1974; Lehane & Billingsley 1996). Os dados da literatura mostram diferenciação da célula regenerativa em célula colunar à microscopia eletrônica de transmissão (Endo *et al.* 1983; Lehane & Billingsley 1996). A detecção de material PAS-positivo no citoplasma apical das células regenerativas, concomitante com o aumento destes grânulos na região posterior, semelhante ao observado para as células colunares, reforça o papel precursor destas células, especialmente na reposição das células colunares. Na renovação do epitélio intestinal, as células senescentes separar-se-iam da membrana basal, que continuaria intacta, sendo deslocadas em direção ao lúmen pelas células regenerativas em divisão, que teriam assim papel de reposição celular (Endo *et al.* 1983; Chapman 1985, 1998). O propósito da renovação celular do epitélio intestinal está relacionado com o crescimento do canal alimentar a cada ecdise e com a substituição de células senescentes ou que sofreram qualquer tipo de agressão (Lehane & Billingsley 1996).

Assim, nossos resultados mostram que existem diferenças morfológicas regionais nas células epiteliais nas regiões anterior e posterior do IM de *D. saccharalis*. A região mediana apresenta características morfológicas intermediárias entre as outras duas regiões, tanto para as células colunares com relação à quantidade de projeções citoplasmáticas e marcação PAS-positiva, quanto para a morfologia da câmara da célula

caliciforme. Estes achados reforçam os dados morfométricos indicativos de que existe área de transição entre a região anterior e posterior do IM (Pinheiro *et al.* 2003).

Referências

- Anderson, E. & W.R Harvey. 1966. Active transport by the *Cecropia* midgut: ii. fine structure of the midgut epithelium. *J. Cell. Biol.* 31: 107-134.
- Azevedo, T.R., W.R. Terra & C. Ferreira. 2003. Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33: 81-92.
- Burgos, M.H. & L.S. Gutiérrez. 1976. The intestine of *Triatoma infestans*. *J. Ultrastruct. Res.* 57: 1-9.
- Caetano, F.H. & F.J. Zara. 2001. Ultramorphology and histology of the foregut and midgut of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Fabricius) larvae (Formicidae: Ponerinae). *J. Hymenopt. Res.* 10: 251-260.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia (Rio Claro)* 24: 19-40.
- Chapman, R.F. 1985. Structure of the digestive system, p.165-211. In Kerkut G.A. & L.I. Gilbert (eds.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford and New York, Pergamon Press, p.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects: Structure and Function*. 4^a ed. Cambridge, Harvard University Press, 770p.
- Cioffi, M. 1979. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue & Cell* 11: 467-479.
- Cristofoletti, P.T., A.F. Ribeiro & W.T. Terra. 2001. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47: 143-155.
- De Priester, W. 1971. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. *J. Ultrastruct. Res.* 36: 783-805.
- Dow, J.A.T. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19: 187-328.
- Edwards, J.P. & R.J. Weaver. 2001. Endocrine interactions of insect parasites and pathogens. The Cromwell Press, Trowbridge, 314 p.
- Endo, Y. & J. Nishiitsutsuji-Uwo. 1982. Fine structure of development endocrine cells and columnar cells in the cockroach midgut. *Biomed. Res.* 3: 637-644.
- Endo, Y., H. Sugihara, S. Fujita & J. Nishiitsutsuji-Uwo. 1983. Kinetics of columnar

- and endocrine cells in the cockroach midgut. *Biomed. Res.* 4: 51-60.
- Ferreira, C., J.R. Parra & R.W. Terra. 1997. The effect of dietary plant glycosides on larval midgut b-glicosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 55-59.
- Harper, M.S. & T.L. Hopkins. 1997. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue & Cell* 29: 463-475.
- Hopkins, T.L. & M.S. Harper. 2001. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary Wheat Germ Agglutinin on their formation and structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 100-109.
- Hung, C.N., T.L. Lin & W.Y. Lee. 2000. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2): The structure of the midgut. *Zool. Stud.* 39: 387-394.
- Jordão, B.P., A.N. Capella, W.R. Terra, A.F. Ribeiro & C. Ferreira. 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45: 29-37.
- Lehane, M.J. & P.F. Billingsley. 1996. *Biology of the insect midgut*. London, Chapman & Hall, 486p.
- Lello, E. & A.M. Vieira. 2001. Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae). *Rev. Bras. Zool.* 18: 91-98.
- Lello, E., W.K. Hanton, S.T. Bishoff & D.W. Misch. 1984. Histopathological effects of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): Low doses compared with fasting. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 169-181.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64: 1-8.
- Nopanitaya, W. & D.W. Misch. 1974. Developmental cytology of the midgut in the Flesh-fly, *Sarcophaga bullata* (Parker). *Tissue & Cell* 6: 487-502.
- Pearse, A.G.E. 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1055p.
- Pinheiro, D.O., R.J. Silva & E.A. Gregório. 2006. Morphometry of the midgut epithelium of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, no prelo.

- Pinheiro, D.O., R.J. Silva, I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2003. Morphometric Study of the Midgut Epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Neotrop. Entomol.* 32: 453-459.
- Pinheiro, D.O. & E.A. Gregório. 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microscop.* 12: 27-30.
- Rossi, M.N. & H.G. Fowler. 2003. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Crambidae) and its parasitoids: a synchrony approach to special and temporal dynamics. *J. Appl. Entomol.* 127: 200-208.
- Ryerse, J.S., J.P. Pursell, R.D. Sammon & P.B. Lavrix. 1992. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue & Cell* 24: 751-771.
- Santos, C.D., A.F. Ribeiro, C. Ferreira & W.R. Terra. 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell & Tissue Res.* 237: 565-74.
- Sehnal, F. & D. Zitnan. 1996. Midgut endocrine cells, p. 55-78. In Lehane, M.J. & P.F. Billingsley (eds.), *Biology of the insect midgut*. London, Chapman & Hall, 486p.
- Tellam, R.L. 1996. The peritrophic matrix, p. 86-114. In Lehane, M.J. & P.F. Billingsley (eds.), *Biology of the insect midgut*. London, Chapman & Hall, 486p.
- Tellam, R.L., G. Wijffels & P. Willadsen. 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 87-101.
- Terra, W. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 675-734.
- Terra, W.R. 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência Cultura* 48: 317-324.
- Terra, W.R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47-61.
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006. Plasmic membranes from insect midgut cells. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 78: 255-269.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 1-62.
- Turbeck, B. 1974. A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue & Cell* 6: 627-640.

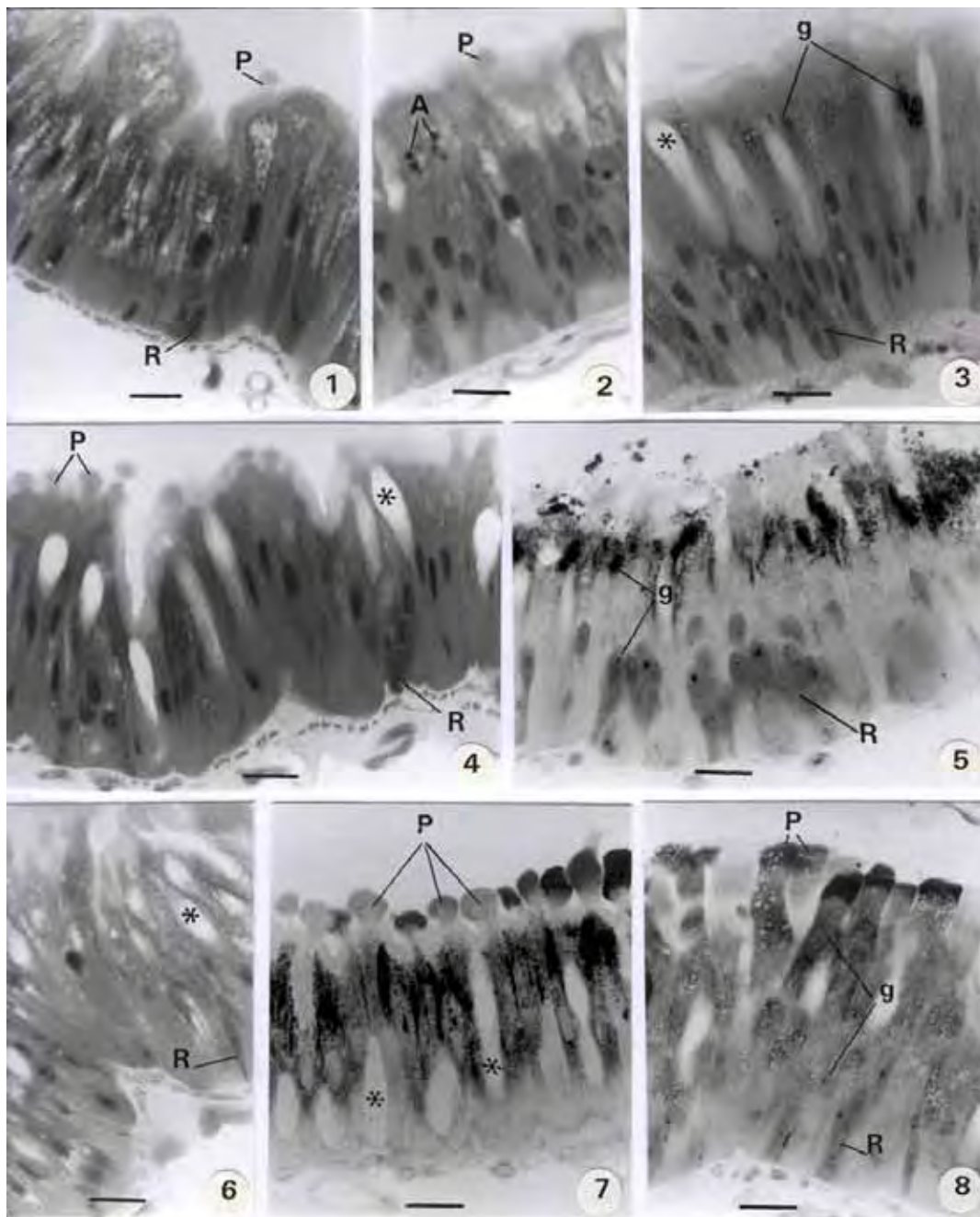
Wood, A.R. & M.J. Lehane. 1991. Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). J. Insect Physiol. 37: 161-166.

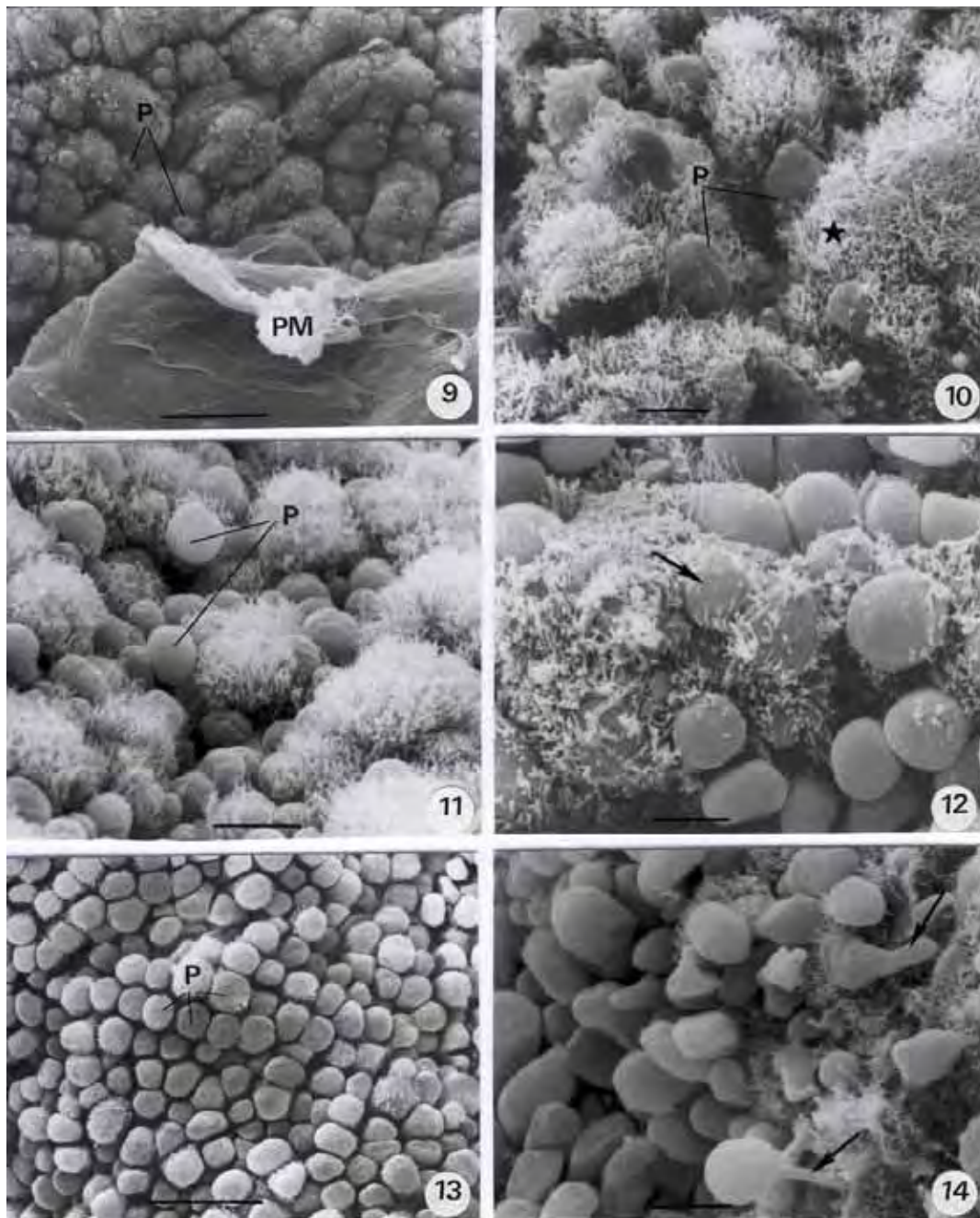
Legenda das Figuras

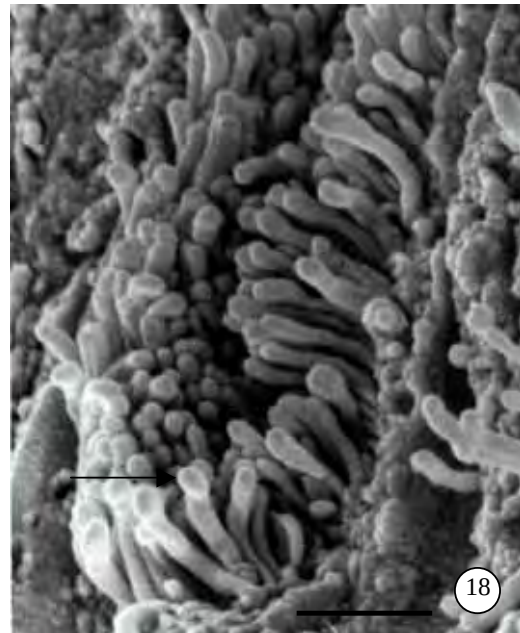
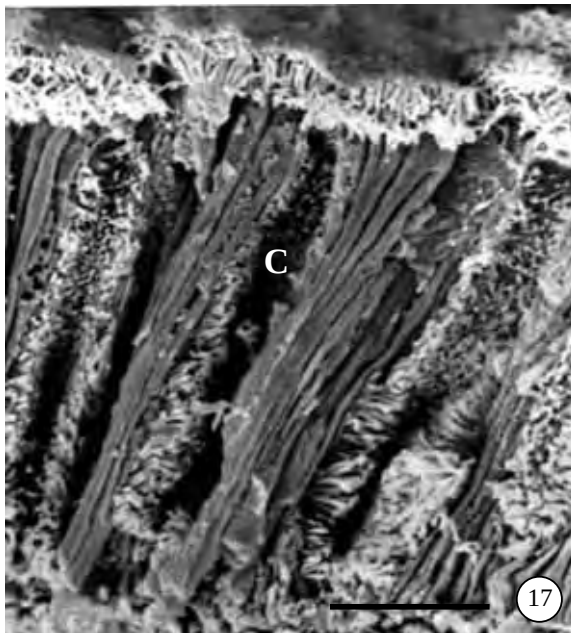
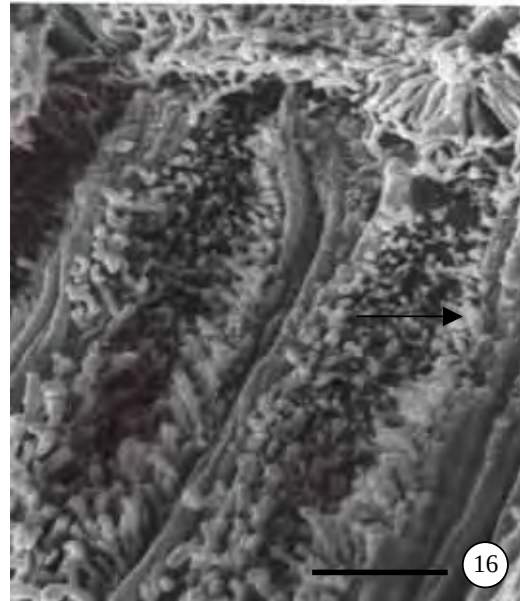
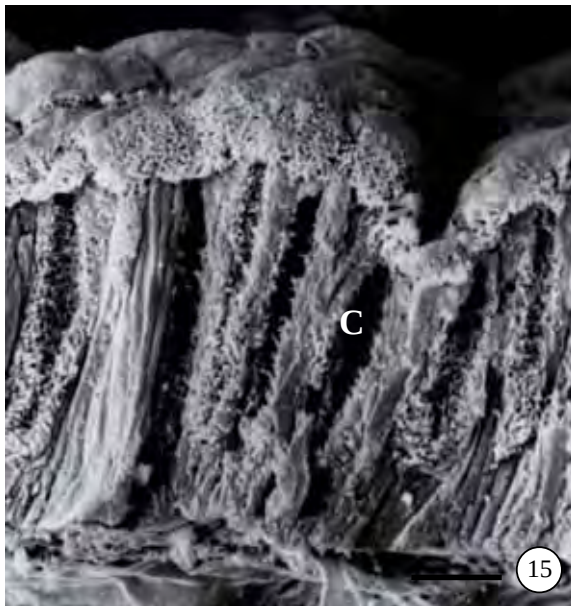
Figs 1-8. Histologia do epitélio do intestino médio. **Fig. 1-** Região anterior. HE. **Fig. 2-** Região anterior: imagem sugestiva de corpos apoptóticos (A). HE. **Fig. 3-** Região anterior. PAS+H. **Fig. 4-** Região mediana. HE. **Fig. 5-** Região mediana: PAS+H. **Fig. 6-** Região posterior: HE. **Figs. 7-8-** Região posterior. PAS+H. Projeções citoplasmáticas (P) das células colunares; cavidade das células caliciformes (*), células regenerativas (R), grânulos PAS-positivo (g). Barras=20 µm.

Figs 9-14 Superfície epitelial do intestino médio em MEV. **Fig. 9-** Região anterior: membrana peritrófica rompida (PM); poucas projeções citoplasmáticas (P). Barra=50µm. **Fig. 10-** Região anterior: projeções (P) por entre os proeminentes microvilos (★). Barra=10µm. **Fig. 11-** Região mediana: projeções citoplasmáticas (P). Barra=10µm. **Fig.12-** Região mediana: muitas projeções arredondadas, algumas delas com poucos microvilos (seta). Barra=5µm. **Fig. 13-** Região posterior: muitas projeções citoplasmáticas (P). Barra=25µm. **Fig. 14-** Região posterior: abundantes projeções conectadas as células colunares por fino pedúnculo citoplasmático (setas). Barra=10µm.

Figs 15-18 Superfície lateral do epitélio do intestino médio em MEV: cavidade (C) da câmara das células caliciformes. **Fig. 15-** Região anterior. Barra=10µm. **Fig. 16-** Região mediana. Barra=10µm. **Fig. 17-** Região posterior: pequenos e finos microvilos (seta) nas células caliciformes. Barra=5µm. **Fig. 18-** Região posterior: espessos e longos microvilos na cavidade, com espessamento na extremidade (seta). Bar = 2,5µm







CONCLUSÕES GERAIS

Tendo em vista as técnicas utilizadas e os resultados obtidos, podemos concluir:

- 1) Existem diferenças morfológicas e morfométricas nas células epiteliais ao longo do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*, que apontam para a existência de duas regiões morfo-funcionais distintas, anterior e posterior, com área de transição.
- 2) A morfologia geral das células epiteliais ao longo do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* é semelhante à de outros Lepidoptera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
BIOSIS. Serial source for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

- AKAI, H. An electron microscopic study of the alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori* The ultrastructure of the midgut epithelium. **Bull. Seric. Exp. Stn**, v.24, p.315-45, 1970.
- ANDERSON, E., HARVEY, W.R. Active transport by the *Cecropia* midgut: ii. fine structure of the midgut epithelium. **J. Cell. Biol.**, v.31, p.107-34, 1966.
- ANDRIES, J.C. Presence de deux types cellulaires endocrines et d'un type exocrine au sein du mesenteron de la larve d'*Aeshna cyanea* Müller (Odonata: Aeshnidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v.5, p.393-407, 1976.
- ANDRIES, J.C., BEAUVILLAIN, J.C. Ultrastructural study of cholecystokininelike immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. **Biol. Cell.**, v.46, p.195-202, 1988.
- ANDRIES, J.C., TRAMU, G. Ultrastructural and immunohistochemical study of endocrine cells in the midgut of the cockroach *Blaberus craniifer* (Insecta, Diptera). **Cell Tissue Res.**, v.240, p.323-32, 1985.
- AZEVEDO, T.R., TERRA, W.R., FERREIRA, C. Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.33, p.81-92, 2003.
- BAKER, J.E., WOO, S.M., BYRD, R.V. Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. **Can. J. Zool.**, v.62, p.1251-9, 1984.
- BARDUCO, M.C., GREGÓRIO, E.A., TOLEDO, L.A. Hemócitos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) no período larval. Estudo morfológico e quantitativo. **Rev. Bras. Biol.**, v.48, p. 925-32, 1988.
- BARTH, R. **Entomologia geral**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 1972. p.105-214.
- BILLINGSLEY, P.F., LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p.3-30.
- BINDER, B.F., BOWERS, W.S. Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **Int. J. Insect Morphol. Embriol.**, v.3, p.127-34, 1994.
- BOLOGNESI, R., RIBEIRO, A.F., TERRA, W.R., FERREIRA, C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**,

- v.47, p.62-75, 2001.
- BOMBONATO, M.T.S., GREGÓRIO, E.A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.12, p.867-79, 1995.
- BOMBONATO, M.T.S., GREGÓRIO, E.A. Hemócitos em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). Avaliação das técnicas para análise me microscopia de contraste de fase. **Iheringia Sér. Zool.**, v.80, p.105-10, 1996.
- BOTELHO, P.S., MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M. (Eds). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. p.409-21.
- BROWN, M.R., RAIKEL, A.S., LEA, A.D. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue Cell**, v.17, p.709-22, 1985.
- BURGOS, M.H., GUTIÉRREZ, L.S. The intestine of *Triatoma infestans*. **J. Ultrastruct. Res.**, v.57, p.1-9, 1976.
- CAETANO, F.H., RODRIGUES, P. Ultrastructure of the ventriculus of the ant *Odontomachus bauri* (Formidae: Poneridae). **Naturalia**, v.26, p.43-51, 2001.
- CAETANO, F.H., ZARA, F.J. Ultramorphology and histology of the foregut and midgut of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Fabricius) larvae (Formicidae: Ponerinae). **J. Hymenopt. Res.**, v.10, p.251-60, 2001.
- CARNEIRO, C.N.B., ISEJIMA, E.M., SAMUELS, R.I., SILVA, C.P. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. **J. Insect Physiol.**, v.59, p.1093-101, 2004.
- CASSIER, P., FAIN-MAUREL, M.A. Sur la presence d'un systeme endocrine diffus dans le mesenteron de quelques insectes. **Arch. Zool. Exp. Gen.**, v.118, p.197-209, 1977.
- CAVALCANTE, V.M., CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, v.24, p.19-40, 1999.
- CHAPMAN, R.F. Structure of the digestive system. In: KERKUT, G.A, GILBERT, L.I. (Eds). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.4. p.165-211.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998. 770p.

- CHARPENTIER, J.J., GMATHES, R., MCCORMICK, W.J., SANFORD, J.W. Injury and losses caused by the sugar cane borer in Louisiana. **Proc. ISSCT**, v.12, p.1383-7, 1967.
- CHI, C., DREW, W.A., YOUNG, J.H., CURD, M.R. Comparative morphology and histology of the larval digestive system of two genera of Noctuidae (Lepidoptera): *Heliothis* and *Spodoptera*. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.68, p.371-80, 1975.
- CIOFFI, M. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. **Tissue Cell**, v.11, p.467-79, 1979.
- COAST, G.M., KAY, I. The effects of *Acheta* diuretic peptide on isolated Malpighian tubules from the house cricket, *Acheta domesticus*. **J. Exp. Biol.**, v.187, p.225-43, 1994.
- COLWELL, D.D. Larval morphology. In: COWELL, D.D., HALL, M.J.R., SCHOLL, P.J. (Eds). **The oestrid flies. Biology, host-parasite relationships, impact and management**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006, p.98-123.
- CONTE, H. **Morfologia do tubo digestivo de *Diatraea saccharalis* (FABR.: 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) durante o desenvolvimento larval**: estudo anatômico e histológico. Rio Claro, 1985. 94p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- CRISTOFOLETTI, P.T., RIBEIRO, A.F., TERRA, W.T. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **J. Insect Physiol.**, v.47, p.143-155, 2001.
- CRUZ-LANDIM, C., SILVA-DE-MORAES, R.L.M., SERRÃO, J.E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **J. Comp. Biol.**, v.1, p.29-40, 1996.
- DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. **J. Ultrastruct. Res.**, v.36, p.783-805, 1971.
- DEL-BENE, G., DALLAI, R., MARCHINI, D. Ultrastructure of the midgut and the adhering tubular salivary glands of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). **Int. J. Insect Morphol. Embriol.**, v.20, p.15-24, 1991.
- DOW, J.A.T. Insect midgut function. **Adv. Insect Physiol.**, v.19, p.187-238, 1986.
- EATON, J.L. **Lepidopteran Anatomy**. New York: Wiley-Interscience Publication, 1988. 257p.

- EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Trowbridge: The Cromwell Press, 2001. 314p.
- ENDO, Y., NISHITSUTSUJI-UWO, J. Fine structure of development endocrine cells and columnar cells in the cockroach midgut. **Biomed. Res.**, v.3, p.637-44, 1982.
- ENDO, Y., NISHITSUTSUJI-UWO, J., TOSHIHIKO, I., FUJITA, S. Ultrastructural and immunohistochemical identification of pancreatic polypeptide-immunoreactive endocrine cells in the cockroach midgut. **Biomed. Res.**, v.3, p.454-6, 1982.
- ENDO, Y., SUGIHARA, H., FUJITA, S., NISHITSUTSUJI-UWO, J. Kinetics of columnar and endocrine cells in the cockroach midgut. **Biomed. Res.**, v.4, p.51-60, 1983.
- FALLEIROS, A.M.F., GREGÓRIO, E.A. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.12: p.751-8, 1995.
- FALLEIROS, A.M.F., BOMBONATO, M.T.S., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.46, p.287-94, 2003.
- FERREIRA, C., PARRA, J.R., TERRA, R.W. The effect of dietary plant glycosides on larval midgut b-glicosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.27, p.55-9, 1997.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B. **Manual de Entomologia**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1978. 551p.
- GILLOTT C. **Entomology**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995, 798p.
- GRAÇA, L.R. Estimativa econômica dos prejuízos causados pelo complexo broca-podridões na cana-de-açúcar. **Bras. Açúcar.**, v.88, p.12-34, 1976.
- GÜL, N., SAYAR, H., OZSOY, N., AYVALI, C. A study on endocrine cells in the midgut of *Agrotis segetum* (Denn and Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Turk. J. Zool.**, v.25, p.193-7, 2001.
- HARPER, M.S., GRANADOS, R.R. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue Cell**, v.31, p.202-11, 1999.
- HARPER, M.S., HOPKINS, T.L. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). **Tissue Cell**, v.29, p.463-75, 1997.

- HARPER, M.S., HOPKINS, T.L., CZAPLA, T.H. Effects of Wheat Germ Agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in european corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. **Tissue Cell**, v.30, p.166-76, 1998.
- HOPKINS, T.L., HARPER, M.S. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary Wheat Germ Agglutinin on their formation and structure. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, p.100-9, 2001.
- HUNG, C.N., LIN, T.L., LEE, W.Y. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2): The structure of the midgut. **Zool. Stud.**, v.39, p.387-94, 2000.
- ILLA-BOCHACA, I., MONTUENGA, L.M. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. **J. Exp. Biol.**, v.209, p.2215-2223, 2006.
- IWANAGA, T., FUJITA, T., NISHITSUTSUJI-UWO, J., ENDO, Y. Immunohistochemical demonstration of PP-, somatostatin-enteroglucagon and VIP-like immunoreactivities in the cock-roach midgut. **Biomed. Res.**, v.2, p.202-7, 1981.
- JORDÃO, B.P., CAPELLA, A.N., TERRA, W.R., RIBEIRO, A.F., FERREIRA, C. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **J. Insect Physiol.**, v.45, p.29-37, 1999.
- JUDY, K.J., GILBERT, L.I. Morphology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.62, p.1438-46, 1969.
- KLEIN, U., LÖFFELMANN, G., WIECZOREC, H. The midgut as a model system for insect K⁺ transporting epithelia: immunocytochemical localization of a vacuolar-type H⁺ pump. **J. Exp. Biol.**, v.161, p.61-75, 1991.
- LANGE, C.L., SCOTT, K.D., GRAHAM, G.C., SALLAM, M.N., ALLSOPP, P.G. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. **Bull. Entomol. Res.**, v.94, p.457-64, 2004.
- LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.
- LELLO, E., HANTON, W.K., BISHOFF, S.T., MISCH, D.W. Histopathological effects of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): Low doses compared with fasting. **J. Invertebr. Pathol.**, v.43, p.169-81, 1984.

- LEVY, S.M., FALLEIROS, A.M.F., GREGÓRIO, E.A., ARREBOLA, N.R., TOLEDO, L.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Braz. J. Biol.**, v.64, p.1-8, 2004.
- LELLO, E., VIEIRA, A.M. Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae). **Rev. Bras. Zool.**, v.18, p.91-8, 2001.
- LEVY, S.M. **Morfologia do tubo digestivo de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) durante o desenvolvimento larval**. Botucatu, 2000. 93p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LEVY, S.M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. Botucatu, 2005. 172p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LEVY, S.M., FALLEIROS, A.M.F., GREGÓRIO, E.A., ARREBOLA, N.R., TOLEDO, L.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Braz. J. Biol.**, v.64, p.1-8, 2004.
- LONG, W.H., HENSLEY, S.D. Insect pests of sugarcane. **Annu. Rev. Entomol.**, v.17, p.149-76, 1972.
- MARANA, S.R., RIBEIRO, A.F., TERRA, W.T., FERREIRA, C. Ultrastructure and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acridae) midguts. **J. Insect Physiol.**, v.43, p.456-73, 1997.
- MARANHÃO, Z.C. **Morfologia geral dos insetos**. São Paulo: Livraria Nobel S/A. 1978. 396p.
- MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R.C., AKAI, H. (Eds). **Insect ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. v.2, p.119-261.
- MOFFETT, D.F., KOCH, A., WOODS, R. Electrophysiology of K⁺ transport by epithelium of lepidopteran insect larvae. III. Goblet valve patency. **J. Exp. Biol.**, v.198, p.2103-13, 1995.
- MONTUENGA, L.M., BARRENECHEA, M.A., SESMA, P., LÓPEZ, J., VASQUES,

- J.J. Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Cell Tissue Res.**, v.258, p.577-83, 1989.
- MOTA, A.C., MATTA, R.A., LIMA-FILHO, M., SILVA, C.P., XAVIER-FILHO, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bond to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **J. Insect Physiol.**, v.49, p.873-80, 2003.
- NÄSSEL, D.R., KIM, M-Y., LUNDQUIST, C.T. Several forms of callitachykinins are distributed in the central nervous system and intestine of the blowfly *Calliphora vomitoria*. **J. Exp. Biol.**, v.198, p.2527-36, 1995.
- NEVES, C.A., SERRÃO, J.E., GITIRANA, L.B. Ultrastructure of midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Braz. J. Biol.**, v.63, p.683-90, 2003a.
- NEVES, C.A., SERRÃO, J.E., GITIRANA, L.B. FMRFamide-like immunoreactive midgut endocrine cells in different castes of the bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.20, p.156-61, 2003b.
- NOPANITAYA, W., MISCH, D.W. Developmental cytology of the midgut in the Flesh-fly, *Sarcophaga bullata* (Parker). **Tissue Cell**, v.6, p.487-502, 1974.
- PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M. **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. 609p.
- PATEL, N., HAYES, T.K., COAST, G.M. Evidence for the hormonal function of a CRF-related diuretic peptide (*Locusta*-DP) in *Locusta migratoria*. **J. Exp. Biol.**, v.198, p.793-804, 1995.
- PRATT, G.E., FARNSWORTH, D.E., SIGEL, N.R., FOX, K.F., FEYEREISEN, R. Identification of allatostatin from adult *Diploptera punctata*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.163, p.1243-47, 1989.
- RANG, C., BERGVINGSON, D., BOHOROVA, N., HOISINGTON, D., FRUTOS, R. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborer. **Curr. Microbiol.**, v.49, p.22-7, 2004.
- RICHARDS, O.W., DAVIES, R.G. **Imms' General Textbook of Entomology**. 10.ed. Londres: Chapman & Hall, v.1, 1994. 418p.
- RICHARDS, A.G., RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insect. **Rev. Entomol.**, v.22, p.431-7, 1977.
- RIGONI, G.M., TOMOTAKE, M.E.M., CONTE, H. Morphology of malpighian tubules

- of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at final larval development. **Cytologia**, v.69, p.1-6, 2004.
- ROSSI, M.N., FOWLER, H.G. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Crambidae) and its parasitoids: a synchrony approach to special and temporal dynamics. **J. Appl. Entomol.**, v.127, p.200-8, 2003.
- SANTOS, D.C., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructure of the ovariole sheath in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biocell**, v.26, p. 229-35, 2002.
- SANTOS, D.C., GREGÓRIO, E.A. Morphological aspects of cluster formation in the germarium of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotrop. Entomol.**, 2006. No prelo.
- SANTOS, C.D., RIBEIRO, A.F., FERREIRA, C., TERRA, W.R. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell Tissue Res.**, v.237, p.565-74, 1984.
- SCOOF, L., VAN DEN BROECK, J., DE LOOF, A. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.23, p.859-81, 1993.
- SEHNAL, F., ZITMAN, D. Midgut endocrine cells. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 55-78.
- SERRÃO, J.E., CRUZ-LANDIM, C. A Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v.88, p.161-71, 1996.
- SMITH, D.S., COMPHER, K., JANNERS, M., LIPTON, C., WITTLE, L.W. Cellular organization and ferritin uptake in the mid-gut epithelium of a moth, *Ephestia kuehniella*. **J. Morphol.**, v.127, p.41-72, 1969.
- SNODGRASS, R.E. **Principles of insect morphology**. New York: Mcgraw Hill Book Company, 1935. p.347-388.
- TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 86-114.
- TELLAM, R.L., EISEMANN, C. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.30, p.1189-201, 2000.
- TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect**

- Biochem. Mol. Biol.**, v.29, p.87-101, 1999.
- TERÁN, F.O. Estudos sobre amostragens populacionais de formas imaturas de *Diatraea saccharalis*. **Bol. Téc. Copersucar**, v.41, p.31-6, 1988.
- TERRA, W. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.21, p.675-734, 1988.
- TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insect. **Annu. Rev. Entomol.**, v.35, p.181-200, 1990.
- TERRA, W.R. Evolution and function of insect peritrophic membrane. **J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**, v.48, p.317-24, 1996.
- TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, p.47-61, 2001.
- TERRA, W.R., ESPINOZA-FUENTES, F.P., RIBEIRO, A.F., FERREIRA, C. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. **J. Insect Physiol.**, v.34, p.463-72, 1988.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.109B, p.1-62, 1994.
- TURBECK, B. A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. **Tissue Cell**, v.6, p.627-40, 1974.
- VICTORIANO, E., GREGÓRIO, E. Ultrastructure of the excretory duct in the silk gland of sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Arthropod. Struct. Dev.**, v.31, p. 15-21, 2002.
- VICTORIANO, E., MORENO, M.H., GREGÓRIO, E. Ultrastructural modification along the glandular region of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) silk gland, at the end of the larval stage. **Acta Microscópica**, v.12, p. 31-6, 2003.
- WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insect physiology**. 7. ed. London: Chapman & Hall, 1972. 827p.
- WOODHEAD, A.T., STAY, B., SEIDEL, S.L., KHAN, M.A., TOBE, S.S. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.5997-6001, 1989.

CAPÍTULO 2

“Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes*”

- Artigo 4:** “Morfometria do epitélio do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera)”;
- Artigo 5:** “Esferitos nas células epiteliais do intestino médio da broca da cana parasitada pela *Cotesia flavipes*”;
- Artigo 6:** Morte celular de células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera)”;
- Artigo 7:** “Mitocôndrias das células epiteliais do intestino médio de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera)”;
- Artigo 8:** “Células colunares do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera)”;
- Artigo 9:** “Óxido nítrico no intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera)”.

INTRODUÇÃO GERAL

O esforço para controlar os insetos na natureza tem sido uma tarefa secular do homem, e várias estratégias têm sido empregadas neste sentido (Gillott, 1995). O controle biológico é um dos métodos alternativos mais eficazes no combate aos insetos praga, tendo sido amplamente comprovado sua eficiência, ao mesmo tempo em que minimiza a ocorrência de danos ao meio ambiente e à saúde pública (Bellows & Fisher, 1999; Parra *et al.*, 2002; Venzon *et al.*, 2006).

Os organismos vivos que atuam como agentes de controle biológico geralmente fazem parte do grupo dos inimigos naturais, formado pelos parasitóides, predadores e patógenos, sendo os dois primeiros denominados agentes entomófagos e, o último, entomopatogênico. Os insetos parasitóides estão entre os agentes naturais mais utilizados em programas de controle biológico aplicado em todo o mundo. Dentro da entomologia, considera-se parasitóide o inseto que parasita um hospedeiro, completando seu ciclo larval em um único hospedeiro e, geralmente, matando esse hospedeiro; as suas larvas exibem o hábito parasítico, enquanto os adultos são de vida livre (Bueno, 2006).

A eficiência dos parasitóides está relacionada aos mecanismos de localização e exploração do seu hospedeiro, desenvolvida por esses insetos ao longo do processo evolucionário. Várias das interações hospedeiro-parasitóide tornaram-se extremamente específicas, enquanto outras mantiveram certa inespecificidade. Independentemente da história evolutiva dessas interações, ambas as estratégias de vida levaram ao desenvolvimento de mecanismos que permitem a regulação da fisiologia do hospedeiro, possibilitando que o parasitóide assuma controle sobre o desenvolvimento e crescimento do hospedeiro, para o seu benefício próprio (Beckage, 1997; Strand, 2000).

Os mecanismos de regulação hospedeira, desenvolvidos por insetos parasitóides podem ser bastante variáveis, estando relacionados com as secreções provenientes do aparelho reprodutor feminino, de glândulas de veneno ou mesmo de partículas simbióticas do parasitóide. De um modo geral, o uso desse arsenal de manipulação do hospedeiro visa garantir o desenvolvimento do endoparasitóide. Assim, vários sistemas do hospedeiro devem ser afetados para garantir o início do desenvolvimento larval do inimigo natural; também deve ser garantido um suprimento de nutrientes suficiente ao longo do seu crescimento, propiciando um desenvolvimento adequado. Sabe-se que este arsenal atua nos tecidos envolvidos com o sistema de defesa do hospedeiro para facilitar a sua invasão, bem como nos tecidos envolvidos com a manipulação, absorção e distribuição de nutrientes, alterando, portanto, o metabolismo geral do organismo

hospedeiro. Os parasitóides manipulam, ainda, o sistema endócrino do hospedeiro, controlando seu crescimento e desenvolvimento (para revisão ver Edwards & Weaver, 2001).

A eficiência dos processos de regulação empregados para assegurar o parasitismo desperta o interesse de cientistas a décadas, que buscam identificar estes mecanismos de regulação, como alternativas para o aprimoramento de medidas de controle de insetos (Stoltz, 1986; Beckage & Gelman, 2004). Nesse sentido, vários são os estudos que concentram esforços para a elucidação de vias metabólicas e celulares ligadas à inibição do sistema imunológico do hospedeiro, principalmente pela ação dos vírus simbiossiontes associados a alguns grupos de parasitóides (Wyder *et al.*, 2003; Kroemer & Webb, 2004). Em contraposição, poucos são os trabalhos destinados a verificar o efeito do parasitismo em estruturas ligadas ao metabolismo geral do hospedeiro, principalmente aqueles visando o estudo do aparelho digestivo, apesar do efeito nocivo do parasitismo na atividade desse órgão, em alguns insetos (para revisão ver Vinson *et al.*, 2001).

Parasitóides afetam o crescimento e desenvolvimento do inseto hospedeiro não apenas pelo seu desenvolvimento na hemocela do hospedeiro, mas também pela injeção, no momento da oviposição, de substâncias derivadas da fêmea. Estas inoculam no hospedeiro, juntamente com seus ovos, secreções protéicas do ovário e veneno (Beckage & Gelman, 2004).

O veneno injetado durante a oviposição é produzido em glândula acessória do trato reprodutor; é um fluido complexo com propriedades tóxicas e, recentemente, muitos de seus componentes foram caracterizados; sugere-se que, além da toxicidade, o veneno esteja envolvido na supressão da resposta imune do hospedeiro, e também deve intensificar a ação das outras substâncias inoculadas (para revisão ver Weaver *et al.*, 2001; Moreau & Guillot, 2005). O veneno de muitos insetos parasitóides causa paralisia no inseto hospedeiro, podendo essa paralisia ser parcial ou completa, transitória ou permanente, dependendo da espécie (Piek, 1985).

Muitas fêmeas Hymenoptera parasíticas inoculam também no inseto hospedeiro, polidnavírus (PDV) juntamente com as proteínas do fluido contidas no cálice do aparelho reprodutor. O PDV está relacionado com a função de alterar o desenvolvimento do inseto hospedeiro, retardando a metamorfose (Tanaka & Vinson, 1991; Beckage *et al.*, 1994). Em ovos de *Cotesia rubecula* que parasitam *Pieris rapae* (Asgari & Schmidt, 1994) foi identificada uma proteína do fluido do cálice que

apresenta a função de proteger o ovo do endoparasitóide contra a reação de defesa do tipo encapsulação hemocítica. Em algumas espécies de Braconidae, o veneno pode agir em conjunto com PDV (Tanaka, 1987); neste caso, acredita-se que o veneno deve estar facilitando a entrada do PDV nas células do hospedeiro (Stoltz *et al.*, 1988).

Os teratócitos são células pequenas, que aumentam consideravelmente de volume através da captação de nutrientes da hemolinfa, onde circulam livremente junto com os hemócitos do hospedeiro. São células derivadas da serosa do ovo do parasitóide sendo fontes de produtos que auxiliam na manipulação da fisiologia do hospedeiro e levam à regulação de seu crescimento e desenvolvimento. Postula-se que estas células teriam a função trófica e secretora (Dahlman & Vinson, 1993; Bell *et al.*, 2004), e também poderiam estar envolvidas no prolongamento da fase larval do hospedeiro (Wani *et al.*, 1990; Dahlman *et al.*, 2003).

Alterações bioquímicas induzidas pela ação de todos estes produtos inoculados no hospedeiro são acompanhadas de modificações celulares e morfológicas dos tecidos ou órgãos-alvo (Edwards & Weaver, 2001).

Além disso, durante o parasitismo, o parasitóide pode também liberar hormônios específicos que afetam o desenvolvimento normal da larva hospedeira (Cole *et al.*, 2002); sabe-se também que o endoparasitismo altera os níveis de hormônios do inseto hospedeiro (Edwards & Weaver, 2001). O hormônio juvenil (HJ), em conjunto com os ecdisteróides e outros componentes endócrinos, representa o principal regulador do desenvolvimento, reprodução, comportamento, ecdise e metamorfose de insetos hospedeiros (para revisão ver Edwards & Weaver, 2001). Os parasitóides devem completar o seu desenvolvimento em sincronia com as transformações endócrinas do hospedeiro, ou mesmo devem manipular as transformações do hospedeiro, para proteger sua própria sobrevivência (Vinson & Iwantsch, 1980; Vinson *et al.*, 2001).

A capacidade de escapar das reações imunes do hospedeiro faz com que os parasitóides sejam utilizados como poderosa arma no controle biológico de insetos que causam problemas nas produções agrícola, florestal e animal. Essa alta eficiência dos parasitóides, associada à tecnologia de criação e produção permite que os mesmos sejam produzidos em larga escala e utilizados em áreas extensas de cultivo, levando a um rápido declínio da população praga (Bellows & Fisher, 1999; Parra *et al.*, 2002). O sucesso do controle biológico é primariamente dependente da qualidade dos inimigos naturais que são produzidos por meio dessa criação massal por companhias comerciais (biofábricas) e vendidos aos agricultores (Parra *et al.*, 2002; Venzon *et al.*, 2006). Desde

muito tempo, tem-se tirado proveito desta capacidade dos parasitóides utilizando-os no controle biológico de pragas de cultura, como é o caso da *Diatraea saccharalis*, popularmente chamada de broca da cana (Wiedenmann *et al.*, 1995).

Apesar de inúmeras tentativas de controle da broca da cana, não existe inseticida que controle este inseto de maneira eficiente.

Na década de 70, o programa de controle biológico da broca da cana-de-açúcar, conduzido pela Copersucar e IAA/planalsucar, testaram, no Estado de São Paulo, diferentes formas de controle biológico baseado na produção massal de endoparasitóides e liberação na lavoura, não obtendo resultados positivos. Tentou-se o controle biológico com um parasitóide importado de Cuba, *Lixophaga diatrae* (Townsend), também com dípteros taquinídeos nativos, *Lydella minense* (Townsend) e *Paratheresia claripalpis* (Wulp.) e *Metagonistylum minense* (Townsend), ao mesmo tempo em que o controle químico era também investigado (Degaspari *et al.*, 1983). Em todas as opções testadas, os resultados eram poucos encorajadores (para revisão ver Botelho & Macedo, 2002).

Para o controle biológico desse inseto na cultura canavieira utiliza-se com sucesso o parasitóide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), o qual é produzido em larga escala e liberado em áreas extensas em vários estados do Brasil (Gallo *et al.*, 1978; Botelho & Macedo, 2002; Bueno, 2006); é um endoparasitóide larval gregário de vários gêneros de Crambidae e brocas de colmos de gramíneas (Botelho & Macedo, 2002).

O comportamento de localização do hospedeiro é mediado por uma substância hidrossolúvel, presente nas fezes das lagartas de *D. saccharalis*, e o contato com estas induzem à procura, caracterizada pela redução do ritmo de locomoção do parasita e tateamento das fezes com as antenas (Van Leerdam *et al.*, 1986).

O endoparasitóide *C. flavipes* apresenta desenvolvimento holometabólico com ciclo de vida ao redor de 20 dias, dependendo da temperatura e idade do hospedeiro (Pádua *et al.*, 1994; Campos-Farinha, 1996). A luz forte exerce importante influência na emergência e na cópula, que ocorre logo após o nascimento (Mohyuddin, 1971 apud Botelho & Macedo, 2002). Depositados pela fêmea na hemocela, os ovos flutuam livremente na hemolinfa da lagarta hospedeira. O número de ovos depositados pela fêmea varia de acordo com a idade do hospedeiro, podendo chegar a algumas dezenas, sendo maior nas lagartas mais desenvolvidas (Brewer & King, 1981). Após 3 a 4 dias, emerge a larva do parasitóide, que passa por 3 instares em um período de 4 a 12 dias,

medindo no final desse estágio aproximadamente 3mm de comprimento. A pupa é protegida por um casulo construído pela larva com fios de seda, sendo que os indivíduos provenientes de um mesmo hospedeiro geralmente se dispõem agrupadamente, formando uma massa também denominada de massas de parasitóides (Riscado, 1982; Lima Filho, 1989). Os insetos permanecem nessa fase por um período variável, dependendo da temperatura, em média de 5 dias (Campos-Farinha, 1996).

Cerca de 23,6 milhões de massas de *C. flavipes* foram liberados em área de cerca de 200.000ha de cana-de-açúcar, em 1996 (Macedo, 2000) e relatos da Copersucar indicam que, ainda hoje, são liberados milhões de insetos por ano em áreas de plantio de cana-de-açúcar, e que *C. flavipes*, é, atualmente, o inimigo natural mais comercializado no país (Bueno, 2006).

Para avaliar o desempenho do parasitóide no campo, faz-se a coleta de material biológico e, depois da amostragem da área, com os dados tabulados, avalia-se o desempenho do parasitóide. Resultados de vários anos demonstram que o controle biológico de *D. saccharalis*, por meio de liberações sistemáticas (inundativas) de *C. flavipes*, foi e continua sendo sucesso, com real contribuição na redução da intensidade de infestação da praga sem causar prejuízos (Botelho & Macedo, 2002; Bueno, 2006).

Poucos são os trabalhos que enfocam o efeito deste parasitismo em órgãos/tecidos da larva hospedeira, em *D. saccharalis*. Sabe-se que este endoparasitismo provoca modificações em vários órgãos do inseto hospedeiro. Conte, 1994 analisou a ultra-estrutura e a histoquímica do corpo gorduroso de larvas de *D. saccharalis* endoparasitadas por *C. flavipes*, observando que o parasitismo inibe a formação de depósitos de proteínas, lipídeo, glicogênio e ácido úrico nesta célula. Bombonato (1994) analisando os hemócitos do mesmo inseto hospedeiro endoparasitado por *C. flavipes*, observou que existe reação de defesa da broca da cana frente aos agentes invasores (parasitóide e material inerte) devido a queda no número total de hemócitos circulantes e encapsulação do agente invasor. Já Nunes & Gregório (2005) mostraram que *C. flavipes* induz modificações ultra-estruturais em um tipo de hemócito de *D. saccharalis*, o oenocitóide, que poderia estar afetando o mecanismo de defesa relacionado com a produção/ativação do sistema de profenoloxidase. Já Borges (2001) observou que o endoparasitismo retarda as modificações morfológicas degenerativas decorrentes da metamorfose na glândula mandibular do inseto hospedeiro, ao invés de causar direta ou indiretamente danos celulares no tecido glandular.

Embora o parasitismo possa provocar mudanças na fisiologia do inseto hospedeiro, postula-se que além de conseguir nutrientes para sua sobrevivência, ainda tem que propiciar alimento e espaço para o desenvolvimento das larvas do parasitóide (Slanky, 1986), ou seja, o hospedeiro deve consumir nutrientes para o crescimento do endoparasita, bem como para garantir sua própria sobrevivência durante o processo do endoparasitismo (Thompson & Redak, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

O endoparasitismo acarreta modificações marcantes no metabolismo do hospedeiro, inclusive provocando supressão na sua resposta imune (Beckage, 1998; Beckage & Gelman, 2004), o que deve afetar a função do tubo digestivo como barreira efetiva contra a entrada de patógenos pela alimentação (Dow, 1986; Lehane & Billingsley, 1996; Chapman, 1998).

Não existem trabalhos sobre o efeito do endoparasitóide *C. flavipes* na morfologia e funcionamento do trato digestivo do inseto hospedeiro, especialmente no intestino médio da *D. saccharalis*. Assim, nosso interesse se concentrou em analisar o intestino médio da broca da cana, na vigência do parasitismo pela *C. flavipes*, para verificar as possíveis repercussões morfo-funcionais do endoparasitismo neste órgão do inseto hospedeiro, em especial nas suas diferentes células epiteliais.

OBJETIVOS GERAIS

O presente capítulo deste trabalho tem como objetivos gerais:

- 1- Determinar o efeito do parasitismo pela *Cotesia flavipes* nas células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* no último instar;
- 2- Verificar a existência de variações regionais de alterações celulares decorrentes do endoparasitismo, ao longo do intestino médio;
- 3- Caracterizar o eventual processo de morte celular, ao longo do intestino médio da broca da cana, e o efeito do endoparasitismo pela *C. flavipes* neste processo.

ARTIGO 4

“Morfometria do epitélio do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera)”

Publicado como: Pinheiro, D.O.; Silva, R.J.; Gregório, E.A. Morphometry of the midgut epithelium of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). Journal of Invertebrate Pathology, 2006, in press.

Resumo

O estudo morfométrico do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera) mostrou que existe um aumento significativo nos valores referentes às células colunares, caliciformes e regenerativas, bem como nos seus núcleos; o diâmetro do lúmen do intestino médio e a altura do epitélio também aumentaram em larvas parasitadas. A análise multivariada mostrou que o parasitismo afetou somente as células colunares da região posterior do intestino médio, e as células caliciformes ao longo do comprimento do intestino médio (regiões anterior e posterior).

Palavras-chave: Morfometria, broca da cana, intestino médio, Lepidoptera, Hymenoptera, parasitismo.

Abstract

This work aims to study morphometrically the midgut and its epithelium of the *Diatraea saccharalis* larvae parasitized by the *Cotesia flavipes*. Our results showed that the development of the wasp endoparasite into the hemocoel of the sugarcane borer induced morphometric variability in the midgut epithelium and lumen of the insect host. The columnar (posterior region) and goblet (anterior and posterior regions) cells were the affected by the parasitism.

Keywords: Morphometry, sugarcane borer, midgut, Lepidoptera, Hymenoptera, parasitism

Introdução

O epitélio do intestino médio em Lepidoptera é constituído, principalmente, por células colunares (CO), caliciformes (GO), regenerativas (RE) e endócrinas (Lehane e Billingsley, 1996). Muitos trabalhos sugerem que a distribuição e a morfologia destas células podem ser variáveis ao longo do comprimento do intestino médio (Cioffi, 1979; Santos *et al.*, 1984; Jordão *et al.*, 1999). Estudo preliminar mostrou que as CO de larvas de *Diatraea saccharalis* apresentam diferenças na organização ultra-estrutural que podem ser relacionadas com sua localização no intestino médio (Pinheiro e Gregório, 2003). Além disso, existe o estudo morfométrico de todas as células epiteliais que permitiu a caracterização de duas regiões distintas (anterior e posterior) ao longo do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* (Pinheiro *et al.*, 2003). O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do parasitismo pela *Cotesia flavipes* na morfometria do epitélio do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*.

Material e Métodos

Os insetos foram mantidos em dieta artificial com umidade e temperatura controladas. Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas manualmente para ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis* no último instar; as larvas de *D. saccharalis* parasitadas foram dissecadas após 6 dias de parasitismo. O intestino médio de 50 larvas parasitadas e não parasitadas foi fragmentado em região anterior e posterior, fixado em solução de glutaraldeído 2% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24h e incluído em Historesina; os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina. Cortes transversais foram morfometricamente analisados em sistema computadorizado para análise de imagens (QWin Lite 3.1 - Leica).

As medidas realizadas foram: 1- Eixo maior e menor, e a área do a) lúmen; b) de cada tipo celular e de seu respectivo núcleo; c) intestino médio (epitélio + lúmen); 2) a altura do epitélio, expresso como a média de 20 medidas obtidas ao longo do perímetro do intestino médio. Todas as medidas foram realizadas na região central das células e do lúmen. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney, usando o software Sigma-Stat 2.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Empregamos também o teste de análise multivariada, realizada pelo software MVSP 3.2, para compararmos os valores do lúmen e dos diferentes tipos celulares (CO, GO e RE) nas duas regiões do intestino médio.

Resultados

Os dados morfométricos das células epiteliais da região anterior e posterior do intestino médio mostraram que o parasitismo afetou principalmente as CO da região posterior do intestino médio, que apresentou um aumento significativo em todas as variáveis analisadas, exceto para o eixo menor do núcleo; estas células, na região anterior do intestino médio, mostraram aumento significativo somente no seu eixo maior, na vigência do parasitismo (Tabela 1). As GO de larvas parasitadas mostraram um aumento no eixo maior e área celular da região anterior, bem como no eixo menor e área do núcleo; na região posterior foram observados um aumento no eixo maior e área da célula, bem como no eixo menor e área do núcleo (Tabela 1). Houve um aumento significativo no eixo menor e área do núcleo das RE de larvas parasitadas na região anterior do intestino médio; também foi observado um aumento da área da célula, bem como do eixo menor e área do núcleo na região posterior do intestino médio durante o parasitismo (Tabela 1). A análise multivariada das células epiteliais da broca da cana em larvas não-parasitadas e parasitadas mostrou que o endoparasitismo afeta somente os dados morfométricos das CO na região posterior, e das GO nas regiões anterior e posterior do intestino médio.

O desenvolvimento do parasitóide *C. flavipes* dentro da hemocèle do inseto hospedeiro, *D. saccharalis*, induz um aumento significativo na altura do epitélio das regiões anterior e posterior do intestino médio (Tabela 2). A região anterior do intestino médio de larvas parasitadas mostrou um aumento significativo no eixo menor do lúmen e do epitélio + lúmen, bem como na área total do epitélio + lúmen (Tabela 2). A análise multivariada dos dados morfométricos do lúmen e do epitélio, obtidos nas regiões anterior e posterior do intestino médio, permitiram uma distinção entre larvas parasitadas e não-parasitadas.

Discussão

Sabendo que como larvas de Lepidoptera parasitadas consomem menos nutrientes que as não-parasitadas, o aumento observado no lúmen e no epitélio do intestino médio pode ser um ajuste fisiológico para melhorar a assimilação nutricional e digestão do alimento ingerido; o hospedeiro deve consumir nutrientes para o crescimento do endoparasita, bem como para garantir sua própria sobrevivência durante o processo do endoparasitismo (Thompson e Redak, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

Nossos resultados mostraram que as CO eram diferentes somente na região posterior de larvas parasitadas. Sabe-se que as CO são responsáveis pelo processamento da dieta e pela secreção de enzimas digestivas, além de atuarem na absorção dos produtos da digestão (Santos *et al.*, 1984; Jordão *et al.*, 1999). Este trabalho sugere que suas funções devem ser mais expressivas na região posterior do intestino médio, reforçando a idéia de que este tipo celular executa funções diferenciadas ao longo do intestino médio, como indicado pelas análises morfométricas e ultra-estruturais em larvas não-parasitadas (Pinheiro e Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003), e ultra-estruturalmente descrita para muitos outros Lepidoptera (Cioffi, 1979; Santos *et al.*, 1984; Jordão *et al.*, 1999).

A análise multivariada da GO mostrou que este tipo celular foi afetado pelo parasitismo, de maneira semelhante nas regiões anterior e posterior do intestino médio; assim sendo, as funções desempenhadas por estas células, incluindo homeostasia iônica e transporte de metabólitos (Dow, 1986; Klein *et al.*, 1991; Lehane e Billingsley, 1996), devem ter sido prejudicadas ao longo do intestino médio.

A análise multivariada da RE mostrou que o endoparasitismo não afetou as populações destas células nas regiões anterior e posterior do intestino médio. Entretanto, este tipo celular apresenta uma maior variabilidade morfométrica ao longo do intestino médio, como previamente mostrado em larvas não-parasitadas (Pinheiro *et al.*, 2003). A variabilidade morfométrica das RE deve estar relacionada com a função desempenhada por estas células ao longo do intestino médio (Lehane e Billingsley, 1996); sabe-se que estas células podem se diferenciar nos outros tipos de células epiteliais, apresentando um alto índice de divisão celular e variabilidade morfológica (Spies e Spences, 1985), o que devem ter refletido na morfometria da célula.

Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Rinaldo José Ortiz pela assistência técnica. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP.

Referências Bibliográficas

Cioffi, M., 1979. The morphology, fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell*. 11, 467-479.

- Dow, J.A.T., 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-238.
- Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45, 29-37.
- Klein, U., Löffelmann, G., Wiecezorec, H., 1991. The midgut as a model system for insect K⁺ transporting epithelia: immunocytochemical localization of a vacuolar-type H⁺ pump. *J. Exp. Biol.* 161, 61-75.
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F., 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London.
- Pinheiro, D.O., Gregório, E.A., 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microscopica.* 12, 27-30.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Quagio-Grassiotto, I., Gregório, E.A., 2003. Morphometric study of the midgut epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Neotropical Entomol.* 32, 453-459.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.* 237, 565-574.
- Spies, A.G., Spence, K.D., 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. *Tissue Cell.* 17, 379-394.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., 2005. Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. *J. Comp. Physiol. A.* 191, 909-923.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., Wang, L.-W., 2005. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. *J. Exp. Biol.* 208, 611-623.

Tabela 1 - Dados morfométricos das células colunares, caliciformes e regenerativas nas regiões proximal e distal do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *Cotesia flavipes*

Tipos Celulares/ Região	Grupo do inseto	Célula			Núcleo		
		SAx (μm)	LAx (μm)	A (μm^2)	SAx (μm)	LAx (μm)	A (μm^2)
Células Colunares							
Proximal	N (n = 51)	8.0 (2.0)	68.4 (5.3)*	557.3 (127.7)	4.9 (0.9)	11.3 (0.8)	44.6 (9.1)
	P (n = 51)	7.9 (2.6)	76.9 (8.8)	597.3 (168.3)	4.9 (1.4)	10.3 (2.0)	46.1 (18.7)
Distal	N (n = 57)	9.1 (1.9)*	60.4 (3.1)*	565.5 (105.7)*	4.0 (0.6)	10.8 (0.9)*	38.5 (7.6)*
	P (n = 51)	7.7 (1.0)	103.5 (8.8)	793.2 (154.0)	4.3 (0.6)	13.4 (1.0)	53.2 (8.8)
Células Caliciformes							
Proximal	N (n = 54)	7.2 (0.9)	63.2 (4.4)*	408.3 (42.7)	3.4 (0.4)*	5.4 (0.7)	17.1 (3.0)*
	P (n = 54)	7.1 (1.0)	75.3 (11.9)	441.8 (108.2)	4.7 (0.8)	5.1 (1.2)	24.8 (5.3)
Distal	N (n = 50)	7.6 (1.6)	56.1 (6.8)*	418.5 (83.7)*	3.0 (0.6)*	7.2 (1.2)	17.8 (3.0)*
	P (n = 51)	7.7 (1.2)	89.0 (8.6)	621.4 (101.0)	3.4 (1.4)	7.1 (2.5)	27.6 (7.4)
Células Regenerativas							
Proximal	N (n = 51)	5.8 (1.3)*	14.1 (5.0)	69.1 (18.3)	4.0 (1.2)	6.0 (1.6)	20.3 (5.0)*
	P (n = 55)	7.2 (1.4)	14.1 (2.6)	74.2 (17.7)	4.6 (0.5)	6.3 (1.0)	25.1 (5.1)
Distal	N (n = 54)	5.4 (0.9)	13.9 (3.8)	58.5 (19.7)*	3.4 (0.5)*	6.0 (1.2)	17.3 (5.4)*
	P (n = 50)	5.4 (1.1)	16.7 (4.1)	67.4 (20.3)	3.8 (0.7)	6.3 (1.2)	21.0 (4.0)

Nota: Todos os valores representam a mediana e a amplitude semi-interquartilica. N= larvas não-parasitada, P= larvas parasitada, n= número de cortes histológicos analisados, LAx = eixo maior, SAx = eixo menor, A = área. * representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2. Dados morfométricos do lúmen e do epitélio das regiões proximal e distal do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *Cotesia flavipes*

Regiões	Grupo do Inseto	Epitélio			Lúmen			Epitélio + Lúmen		
		H (µm)	H _{Max} (µm)	H _{Min} (µm)	SAx (mm)	LAx (mm)	A (mm ²)	SAx (mm)	LAx (mm)	A (mm ²)
Proximal	N	93.0	124.3	70.8	0.4	1.5	0.5	0.5	1.6	0.8
	(n=32)	(4.7)*	(12.6)*	(6.0)*	(0.1)*	(0.2)	(0.2)	(0.1)*	(0.2)	(0.3)*
	P	146.9	184.9	113.2	0.6	1.5	1.1	0.9	1.9	1.8
	(n=31)	(12.5)	(17.0)	(11.8)	(0.2)	(0.7)	(0.5)	(0.1)	(0.7)	(0.7)
Distal	N	97.1	130.7	61.7	0.7	1.0	0.6	0.8	1.2	0.8
	(n=47)	(25.1)*	(31.2)*	(13.6)*	(0.3)	(0.5)	(0.5)	(0.3)	(0.5)	(0.6)
	P	149.0	188.9	114.1	0.5	0.7	0.3	0.7	1.1	0.7
	(n=35)	(17.0)	(18.0)	(12.7)	(0.2)	(0.5)	(0.3)	(0.2)	(0.4)	(0.5)

Nota: Todos os valores representam a mediana e a amplitude semi-interquartilica. N= larvas não-parasitada, P= larvas parasitada, n= número de cortes histológicos analisados, H=altura, H_{Ma}=altura máxima do epitélio, H_{Min}=altura mínima do epitélio, LAx=eixo maior, SAx=eixo menor, A=área. * representa diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Apêndice do Trabalho

Neste item, apresentaremos as figuras que foram excluídas do trabalho, por sugestão dos revisores da revista “Journal of Invertebrate Pathology”, mas que comprovam nossos resultados e podem contribuir para o entendimento mais detalhado da análise multivariada dos dados morfométricos.

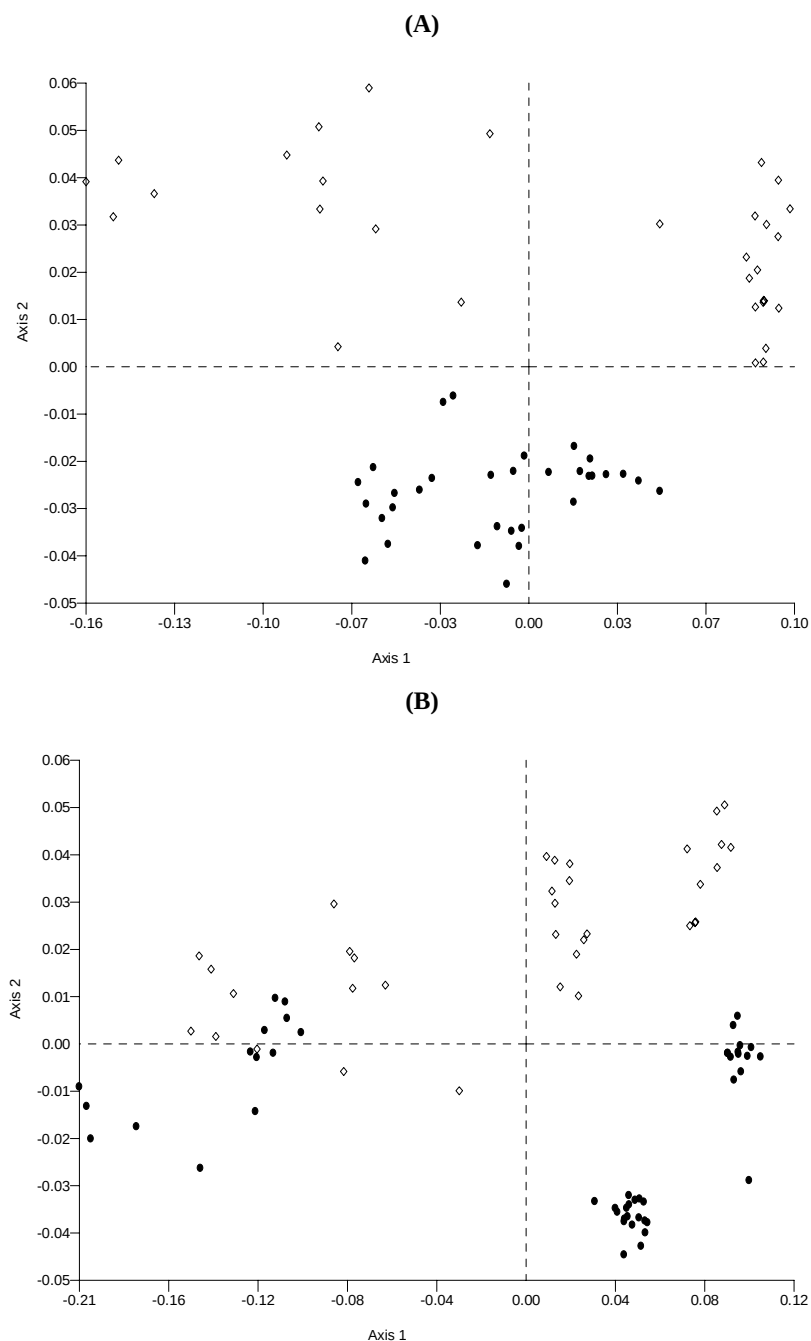


Figure 1. Análise multivariada dos dados morfométricos do lúmen e do epitélio na região anterior **(A)** e posterior **(B)** do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas (●) e parasitadas (◇) pela *Cotesia flavipes*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

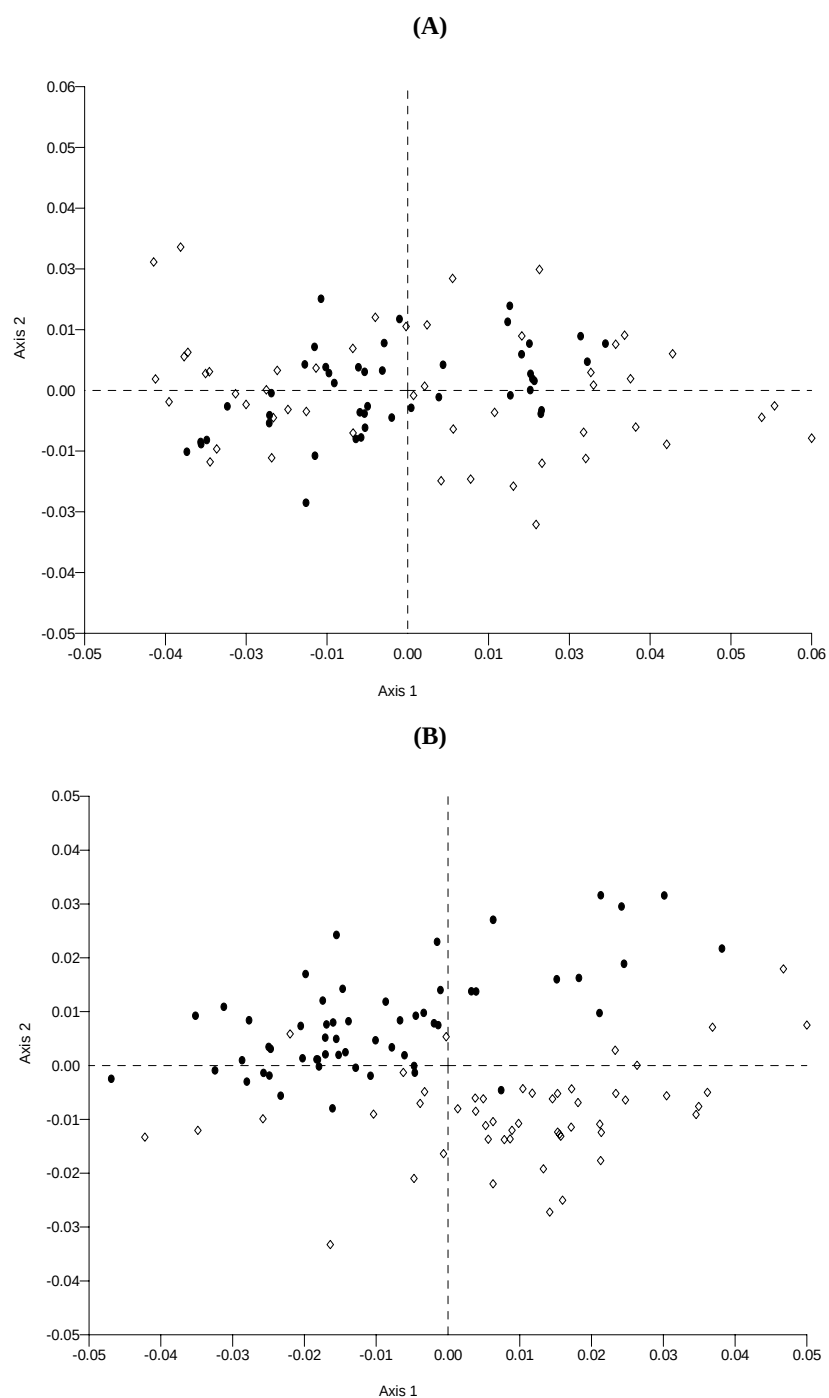


Figure 2. Análise multivariada dos dados morfométricos das células colunares na região anterior **(A)** e posterior **(B)** do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas (●) e parasitadas (◊) pela *Cotesia flavipes*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

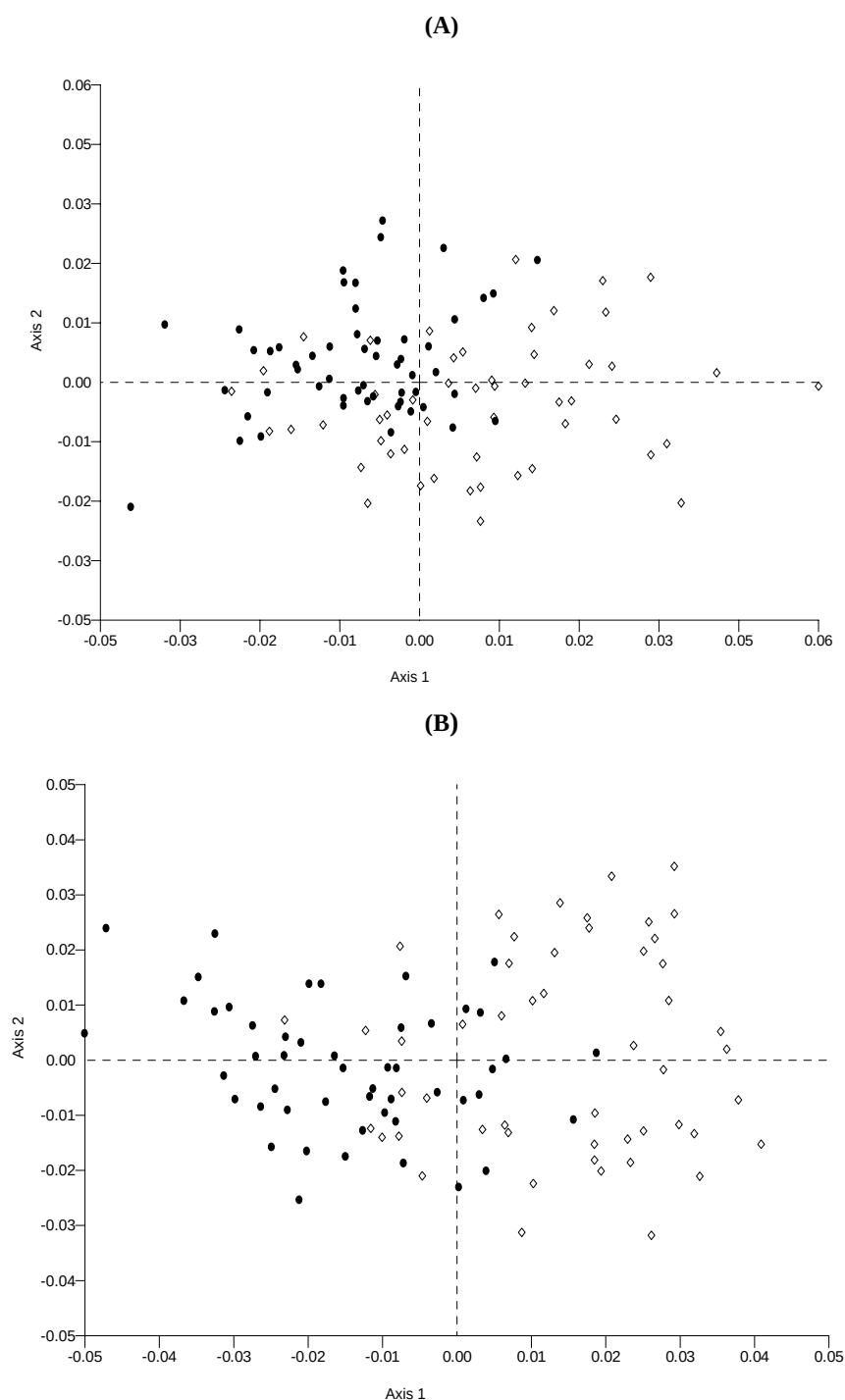


Figure 3. Análise multivariada dos dados morfométricos das células caliciformes na região anterior **(A)** e posterior **(B)** do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas (•) e parasitadas (◊) pela *Cotesia flavipes*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

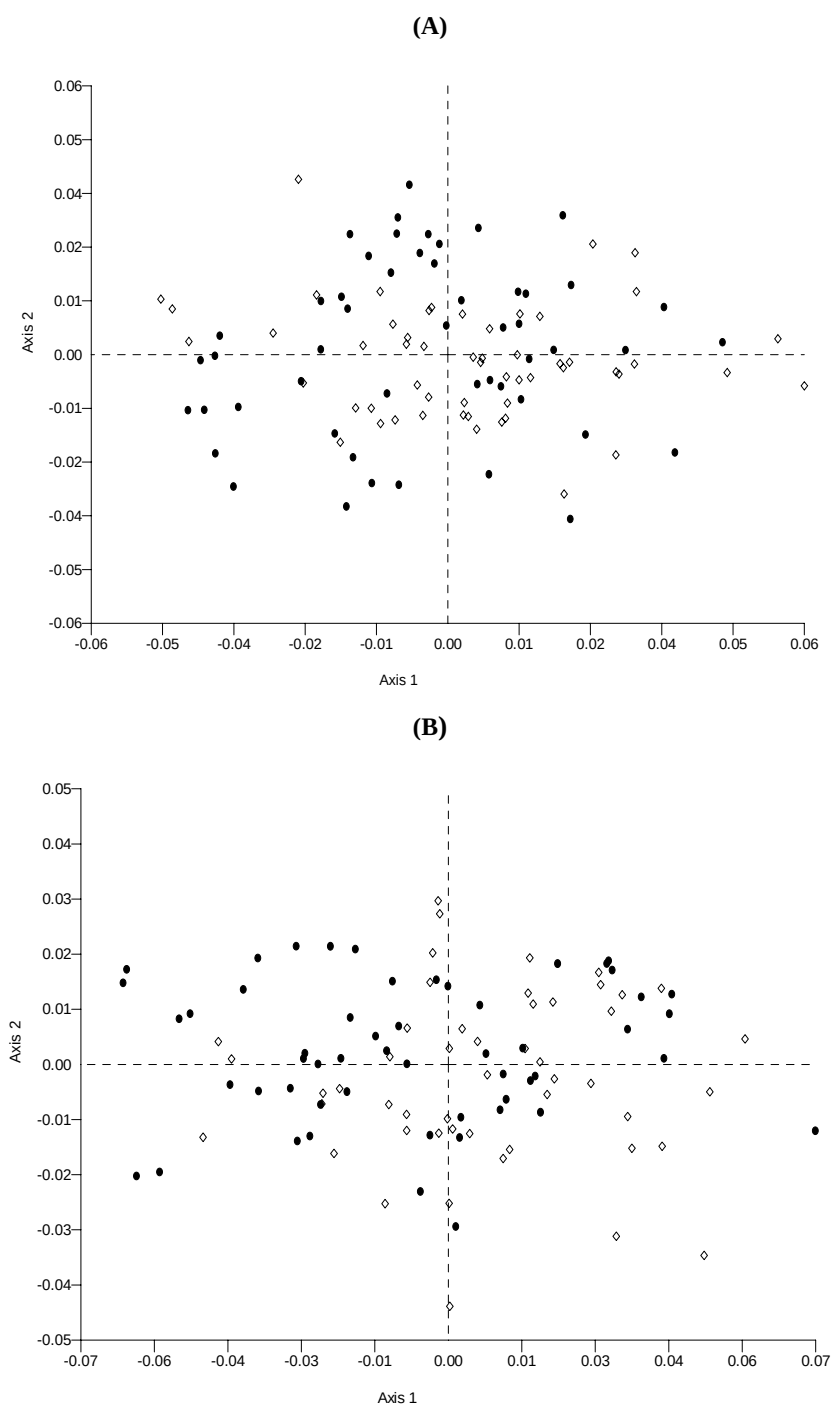


Figure 4. Análise multivariada dos dados morfométricos das células regenerativas na região anterior **(A)** e posterior **(B)** do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas (●) e parasitadas (◇) pela *Cotesia flavipes*. Os valores apresentados nos eixos da ordenada e abscissa representam a maior variação dos dados.

ARTIGO 5

“Esferitos nas células epiteliais do intestino médio da broca da cana parasitadas pela *Cotesia flavipes*”

A ser enviado para a revista Biocell como: Pinheiro, D.O.; Conte, H.; Gregório, E.A. Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*

Resumo

Diatraea saccharalis, importante praga da lavoura canavieira, tem sido controlada pelo endoparasitóide *Cotesia flavipes*. Pouco se sabe sobre o efeito do parasitismo em órgãos do inseto hospedeiro, especialmente no intestino médio (IM). O epitélio do IM é composto por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas. Esferitos têm sido descritos no citoplasma das células colunares e regenerativas de várias espécies de Lepidoptera, e suas funções são pouco esclarecidas. Este trabalho objetiva identificar esferitos nas células epiteliais no IM de larvas de *D. saccharalis*, bem como o efeito do parasitismo pela *C. flavipes* na morfologia e distribuição desta estrutura. Fragmentos das regiões anterior e posterior do IM de larvas não-parasitadas e parasitadas foram fixados e processados convencionalmente para microscopia eletrônica de transmissão. Todas as células epiteliais mostraram esferitos, sem localização preferencial dentro das células. O aumento na quantidade de esferitos observado em larvas endoparasitadas, especialmente nas células colunares, pode ser correlacionado com desequilíbrio iônico do inseto hospedeiro; a predominância de esferitos nas células colunares da região anterior sugere que esta região deve estar envolvida no transporte de íons, por via intra e/ou paracelular. A variabilidade morfológica dos esferitos de larvas endoparasitadas foi associada com grau de maturação desta estrutura.

Palavras-chave: Esferito, célula epitelial, ultra-estrutura, Lepidoptera, parasitismo

Abstract

Diatraea saccharalis, main pest for the sugarcane crop, has been controlled by *Cotesia flavipes*. Very little is known about the effect of the endoparasitism in the host organs, including the midgut. The Lepidoptera midgut epithelium is composed by columnar, goblet, regenerative and endocrine cells. Spherite have been described into columnar and regenerative cells of several Lepidoptera species, and presented controversial functional meaning. This work identifies spherites in the midgut epithelial cells of non-parasitized *D. saccharalis* larvae, as well as the effect of endoparasitism in the spherite morphology and distribution along of the midgut. Midgut fragments of both non-parasitized and parasitized larvae were processed for transmission electron microscopy. All the midgut epithelial cells showed spherites, without preferential localization into the cells. There is an increase in the amount of spherites in the parasitized larvae, mainly in the columnar cell. This observation was related with ionic unbalance of the insect host. Spherites were more abundant in the anterior midgut region, suggesting that this region is involved in ion transport by intra and/or paracellular pathways. The morphological variability of the spherites in the cells of parasitized larvae was related with the developmental stage of this structure.

Keywords: Spherite, epithelial cell, ultrastructure, Lepidoptera, parasitism

Introdução

Os esferitos são grânulos citoplasmáticos esféricos, cujo conteúdo mineral assume a forma de laminação concêntrica. Estas estruturas têm sido descritas em células de diferentes órgãos de invertebrados. Além de sua descrição em intestino médio (IM) de insetos (Wright & Newel, 1964; Cruz-Landim, 1971, 2000; Nopanitaya & Misch, 1974; Turbeck, 1974; Waku & Sumimoto, 1974; Sohal *et al.*, 1977; Humbert, 1978; Serrão & Cruz-Landim, 1996, 2000; Cruz-Landim & Serrão, 1997), os esferitos também estão presentes nos túbulos de Malpighi de insetos (Teigler & Arnott, 1972; Ryerse, 1979; Krüger *et al.*, 1987; Hazelton *et al.*, 1988; Spring & Felgenhauer, 1996; Cruz-Landim, 2000; Hazelton *et al.*, 2001), nas glândulas do IM de invertebrados (Ludwig & Alberti, 1988; Lipovsek *et al.*, 2002, 2004; Pigino *et al.*, 2006) e tecido de revestimento de bivalves (Vesk & Byrne, 1999).

A composição química dessas estruturas é variada nos invertebrados. Turbeck (1974) constatou que os esferitos representam uma reserva de cálcio para Lepidoptera, possuindo também magnésio na sua estrutura. Lipovsek *et al.* (2002) demonstraram que esferitos jovens de bivalves são compostos por cálcio, fósforo e silício, sendo que o cálcio e fósforo estão localizados nas camadas elétron-densas, enquanto que o silício está presente nas camadas elétron-lucidas. Os autores mostram, ainda, que as camadas dos esferitos contêm material orgânico, como glicoproteína e proteoglicanas, associado aos compostos inorgânicos citados.

Pouco se sabe sobre a origem destas estruturas em células de insetos. Em Hymenoptera, foi proposto que o material orgânico, precursor dos esferitos, seja produzido dentro do retículo endoplasmático rugoso e inorgânico seja seqüestrado também por esta organela, que perderia os ribossomos, originando a membrana envolvente do cristalóide (Cruz-Landim, 2000).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius, é considerada a principal praga da cana de açúcar, afetando também outras culturas como o sorgo, milho e arroz. Este inseto praga tem sido controlado, pela liberação na natureza, do endoparasitóide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). O epitélio do IM em Lepidoptera é constituído, principalmente, por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Lehane & Billingsley, 1996). Muitos trabalhos sugerem que a distribuição, a morfologia e a morfometria destas células podem ser variáveis ao longo do comprimento do IM (Santos *et al.*, 1984; Pinheiro & Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003). Este trabalho descreve ultra - estruturalmente os esferitos em células epiteliais do IM de larvas de *D.*

saccharalis não-parasitadas e na vigência do parasitismo pela *C. flavipes*, correlacionando estes achados com a distribuição espacial das células ao longo do IM.

Material e Métodos

Larvas de *D. saccharalis* foram mantidas em dieta artificial, em condições controladas de temperatura (27°C) e umidade (70 ± 10%). Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas manualmente para ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis* no último instar. Os IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e após 6 dias de parasitismo foram dissecadas. De cada peça foram retiradas e divididas as regiões anterior e posterior. Os materiais foram imediatamente fixados em glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24h, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h, desidratados com sequência crescente de soluções de acetona e incluídos em Araldite; os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

Resultados

Em larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas observamos escassos esferitos no citoplasma de todos os tipos celulares do epitélio, tanto na região proximal como na distal do IM (Figs. 1-6). Os esferitos não apresentam localização preferencial dentro das células, tendo forma, tamanho e estrutura variáveis. Pode apresentar-se com lamelas elétron-densas, localizado excentricamente à membrana vacuolar envolvente ou preenchendo o vacúolo, com várias lamelas, de espessuras variáveis e disposição concêntrica (Figs. 1-6).

Em larvas parasitadas, os esferitos são abundantes, de tamanhos e formas variadas; estão presentes no citoplasma de todos os tipos celulares do epitélio, sendo mais frequentes nas células colunares, especialmente aquelas da região anterior do IM (Figs. 7-11). Os esferitos são volumosos, e geralmente apresentam lamelas menos espessas do que as observadas em larvas não-parasitadas (Figs. 7-13). A morfologia interna também é variável. Alguns não apresentam lamelas estruturadas, contendo material finamente floculado e pouco elétron-denso, às vezes concentrados próximos à membrana vacuolar (Figs. 7, 9-10). Outros exibem apenas uma fina lamela ou inúmeras lamelas concêntricas (Figs. 7-9, 11-13). Os esferitos agrupados, ou isolados, não apresentam localização preferencial dentro das células epiteliais (Figs. 7-13). Foi

freqüente a observação da fusão de membranas de esferitos (Figs. 8-11). Raros foram os esferitos observados na região distal do IM, sendo os mesmos pouco volumosos e seu conteúdo constituído por poucas lamelas (Figs. 12-13). Não observamos a liberação de esferitos para o lúmen intestinal, em qualquer célula epitelial das duas regiões do IM.

Discussão

A visualização de cristais em esferas ou esferitos no citoplasma dos quatro tipos celulares presentes no epitélio do IM de *D. saccharalis*, tanto não-parasitadas como nas parasitadas pela *C. flavipes*, foi um achado interessante neste trabalho, uma vez os esferitos têm sido descritos apenas em células colunares e regenerativas de IM de insetos (Turbeck1974; Cruz-Landim, 1971).

Independente do tipo e da localização das células epiteliais no IM de *D. saccharalis*, os esferitos aparecem com morfologia variada tanto em relação à ultra-estrutura da inclusão cristalóide como no tamanho e forma do vacúolo envolvente. Os esferitos têm sido descritos, em microscopia eletrônica de transmissão, como vesícula membranosa contendo camadas de material elétron-denso, intercaladas com outras elétron-lucentes, formando lamelas concêntricas (Cruz-Landim, 1971, 2000; Nopanitaya & Misch, 1974; Turbeck, 1974; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Corrêa *et al.*, 2002, 2003; Lipovsek *et al.*, 2002, 2004). No trabalho de Wright & Newell (1964) células colunares de *Anystis sp* não mostra com precisão a membrana vacuolar do esferito. Provavelmente isso se deve a problemas técnicos, pois trabalhos posteriores, após a melhoria das técnicas de fixação, mostram claramente que os esferitos são delimitados por membrana (Nopanitaya & Misch, 1974; Turbeck, 1974; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Cruz-Landim, 2000; Corrêa *et al.*, 2003).

A localização de esferitos nas células epiteliais de insetos tem sido descrita como variada. Turbeck (1974) mostrou, em sete espécies de Lepidoptera, que os esferitos localizam-se preferencialmente no citoplasma apical, tanto nas células colunares e regenerativas. O mesmo foi descrito por Cruz-Landim (1971) em células colunares do IM de *Trigona postica*. Entretanto, Serrão & Cruz-Landim (2000) estudando IM de larvas de Meliponinae, observaram esferitos localizados na porção mediana das células colunares. Em *D. saccharalis* tanto no IM de larvas não-parasitadas como em parasitadas, os esferitos não apresentam localização preferencial dentro das células.

Em *D. saccharalis* endoparasitadas observamos um aumento no número de esferitos nas células epiteliais, especialmente nas células colunares da região anterior do IM. A abundância de esferitos na região anterior do IM de Diptera, em situação normal de desenvolvimento do inseto, foi relatada por Nopanitaya & Mish (1974). Cruz-Landim (1971), estudando as células colunares do IM de *T. postica*, relata que o acúmulo de esferitos no final do desenvolvimento larval causa hipertrofia celular. Estudo morfométrico das células epiteliais de *D. saccharalis* endoparasitadas por *C. flavipes* mostrou que o endoparasitismo induz aumento celular somente nas células colunares da região posterior do IM independente do aumento na abundância dos esferitos (Pinheiro *et al.*, 2006); sendo assim, acreditamos que a abundância de esferitos, por nós observados, principalmente nas células colunares da região anterior, não pode estar relacionada com a hipertrofia celular.

A função dos esferitos nas células epiteliais do IM ou outros órgãos de insetos, ainda não está totalmente esclarecida. Uma das funções postuladas seria relacionada com a degeneração celular, pois Turbeck (1974) observou que os esferitos em células epiteliais do IM aparecem em larvas antes da ecdise e desaparecem durante a diferenciação celular. Sua presença próxima ao complexo de Golgi em células secretoras do IM de *Anystis* sp levou Waku & Sumimoto (1974) a proporem sua participação no processo de secreção. Outros autores relacionaram essa estrutura com excreção celular de íons e desintoxicação (Wright & Newel, 1964; Cruz-Landim, 1971, 2000; Ludwig & Alberti, 1988; Serrão & Cruz-Landim, 1996; Lipovsek *et al.*, 2002, 2004). Ainda segundo Sohal *et al.* (1977), a presença de esferitos poderia estar associada com a alimentação ou idade do inseto; quanto mais rica em metais a alimentação ou mais idosa a larva, maior seria a quantidade de esferitos observados no citoplasma das colunares. Como os esferitos contendo cálcio desaparecem depois da pupação, alguns autores os correlacionam com a mineralização da cutícula (Ludwig & Alberti, 1988; Lipovsek *et al.*, 2002). Não podemos confirmar nem descartar essa correlação, uma vez que nossas observações em *D. saccharalis*, se restringem ao início do 5º instar. Como as larvas parasitadas e não-parasitadas tiveram acesso à mesma dieta, descartamos a possibilidade desse aumento no número dos esferitos nas endoparasitadas estar relacionada à variação na dieta do inseto, sendo correlacionada com excreção de íons.

Observaram liberação de esferitos para o lúmen intestinal (Wright & Newell, 1964; Gouraton 1968 apud Serrão & Cruz-Landim, 1996; Cruz-Landim, 1971). O

mesmo fenômeno foi observado em túbulos de Malpighi de alguns insetos (Hazelton *et al.*, 1988; Spring & Felgenhauer, 1996). Sabe-se que os túbulos de Malpighi são responsáveis pela manutenção do equilíbrio hídrico e iônico do inseto (Chapman, 1998). Os esferitos são relacionados com o rápido processo de transporte de fluidos e com a excreção de metais pesados, materiais orgânicos e inorgânicos, armazenados pelos esferitos (Hazelton *et al.*, 2001). Sabe-se também que as células colunares do IM auxiliam as caliciformes na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos por vias intracelulares (Lehane & Billingsley, 1996; Terra *et al.*, 2006). Recentemente, Fiandra *et al.* (2006) observaram que também nas células colunares do IM de Lepidoptera ocorre transporte de eletrólitos por vias paracelulares, inclusive de íons cálcio, equivalente ao proposto para túbulos de Malpighi (Beyenbach *et al.*, 2000), possuindo mecanismos intracelulares de modulação deste processo no IM.

Acreditamos que o endoparasitismo da *D. saccharalis* pela *C. flavipes* possa estar provocando um desequilíbrio iônico, induzindo o aumento no número de esferitos nas células colunares; além disso, a presença de inúmeros esferitos nas células colunares da região anterior do IM apontam para um papel das mesmas, nesta região do IM, de maior envolvimento nesse transporte de íons por via intra e/ou paracelular, o que precisa ser melhor investigado. Corroborando nossos achados, recentemente constatou-se que os esferitos do IM devem representar uma barreira iônica regulando a quantidade de íons metais que entram no organismo de invertebrados, através do trato alimentar (Pagini *et al.*, 2006).

Em células do túbulo de Malpighi de *Acheta domesticus*, observou-se interação direta entre esferitos e mitocôndria (Hazelton *et al.*, 2001); os autores postulam que deve estar havendo passagem de fosfato inorgânico e íons cálcio, entre a membrana externa das mitocôndrias e a membrana envolvente dos esferitos sendo, portanto, favorável essa íntima associação para ambas as organelas. Em *D. saccharalis* não observamos associação entre esferitos e mitocôndrias, sugerindo que a movimentação iônica deve estar acontecendo por outros mecanismos.

O significado funcional da freqüente observação da fusão entre as membranas dos esferitos, observada nas células colunares do IM em insetos parasitados, é uma incógnita. Existe relato de fusão entre esferitos e vacúolos autofágicos nas células colunares de abelhas, que seriam eliminados em conjunto para o lúmen intestinal (Serrão & Cruz-Landim, 1996; Lipovsek *et al.*, 2002).

Em larvas parasitadas, os numerosos esferitos observados mostram uma grande variabilidade na morfologia de seu conteúdo. A maioria dos esferitos apresenta-se pouco denso, contendo material floculado esparso, concentrado na periferia da membrana vacuolar, formando discreta camada elétron-densa ou poucas lamelas concêntricas. Já nas larvas não-parasitadas, os poucos esferitos observados contêm lamelas espessas e contrastadas. Acreditamos que os esferitos menos estruturados podem representar esferitos mais jovens, que foram formados em decorrência das alterações metabólicas do inseto hospedeiro no período de seis dias de endoparasitismo, especialmente de alterações no seu equilíbrio iônico. A variabilidade morfológica destes esferitos, especialmente em larvas parasitadas, poderia ser também atribuída à manifestação da instabilidade do conteúdo destas estruturas, em decorrência das alterações relacionadas ao metabolismo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista, SP/Brasil pelo fornecimento dos insetos e Sra. M. H. Moreno, C. S. Tardivo, Srs. N. A. Basso e V. A. Salvador pelo excelente auxílio técnico. Agradecemos Dra. Edy de Lello Montenegro e Dr. Luis Antônio Toledo pela contribuição científica. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP.

Referências Bibliográficas

- Beyenbach KW, Pannabecker TL, Nagel W (2000). Central role of the apical membrane H^+ -ATPase in electrogenesis and epithelial transport in Malpighian tubules. *J Exp Biol.* 203: 1459-1468.
- Chapman RF (1998). *The Insects: structure and function*. 4^aed. Harvard University Press, Cambridge, 770p.
- Corrêa Jr, J.D., Allodi, S., Farina, M. (2003). Enzymatic, analytical and structural aspects of electron-dense granules in cells of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) hepatopancreas. *Cell Tissue Res.* 311: 107-116.
- Corrêa Jr, J.D., Silva, M.R., Silva, A.C.B., Lima, S.M.A., Malm, O., Allodi, S. (2005). Tissue distribution, subcellular localization and endocrine disruption patterns induced by Cr and Mn in the crab *Ucides cordatus*. *Aquatic Toxicol.* 73: 139-154.

- Corrêa Jr, J.D., Farina, M., Allodi, S. (2002). Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. *Tissue Cell*. 34: 315-325.
- Cruz-Landim C (2000). Localization of calcium and acid phosphatase in the malpighian tubules of nurse workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Biosci J*. 16: 87-99.
- Cruz-Landim C (1971). Note on granules with concentric lamination present in the larval midgut of *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latr. (Hym. Apidae). *Rev Bras Pesqui Méd Biol*. 4: 13-16.
- Cruz-Landim C, Serrão JE (1997). Ultrastructural biochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Neth J Zool*. 47: 21-29.
- Fiandra L, Casartelli M, Giordana B (2006). The paracellular pathway in the lepidopteran larval midgut: Modulation by intracellular mediators. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol*. 144: 464-473.
- Hazelton SR, Felgenhauer BE, Spring JH (2001). Ultrastructural changes in the Malpighian tubules of house cricket, *Acheta domesticus*, at the onset of diuresis: a time study. *J Morphol*. 247: 80-92.
- Hazelton SR, Parker SW, Spring JH (1988). Excretion in the house cricket, (*Acheta domesticus*) fine structure of the Malpighian tubules. *Tissue Cell*. 20: 443-460.
- Humbert W. (1978). Cytochemistry and x-ray microprobe analysis of the midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta, Collembola) with special reference to physiological significance of the mineral concretions. *Cell Tissue Res*. 187: 397-416.
- Krüger RA, Broce AB, Hopkins TL (1987). Dissolution of granules in the Malpighian tubules of *Musca autumnalis* Degeer, during mineralization of puparium. *J Insect Physiol*. 33: 255-263.
- Lehane MJ, Billingsley PF (1996). *Biology of the insect midgut*. Chapman and Hall, London, 486p.
- Lipovsek S, Letofsy-Papst I, Hofer F, Pabst MA (2002). Seasonal and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gysa annulatus* (Opiliones). *Micron*. 33: 647-654.
- Lipovsek S, Novak T, Janzekovic F, Sencic L, Pabst MA (2004). A contribution to the functional morphology of midgut gland in phalangiid harvestmen *Gysa annulatus* and *Gysa titanus* during their life cycle. *Tissue Cell*. 36: 275-282.

- Ludwig M, Alberti G (1988). Mineral congregations, spherites in the midgut gland of *Coelotes terrestris* (Aranae): structure, composition and function. *Protoplasma*. 143: 43-50.
- Nopanitaya W, Misch DW (1974). Developmental cytology of the midgut in the Flesh-fly, *Sarcophaga bullata* (Parker). *Tissue Cell*. 6: 487-502.
- Pigino G, Migliorini M, Paccagnini E, Bernini F (2006). Localization of heavy metals in the midgut epithelial cells of *Xenillus tegeocranus* (Hermann, 1804) (Acari: Oribatida). *Ecotoxic Environ Safety*. 64: 257-263.
- Pinheiro DO, Silva RJ, Gregório EA (2006). Morphometry of the *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) midgut epithelium parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). *J Invertebr Pathol*. In press.
- Pinheiro DO, Silva RJ, Quagio-Grassiotto I, Gregório EA (2003). Morphometric study of the midgut epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Neotrop Entomol*. 32: 453-459.
- Pinheiro DO, Gregório EA (2003). Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microsc*. 12: 27-30.
- Ryerse JS (1979). Developmental changes in Malpighian tubules cell structure. *Tissue Cell*. 11: 533-551.
- Santos CD, Ribeiro AF, Ferreira C, Terra WR (1984). The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res*. 237: 565-574.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1996). Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios*. 88: 161-171.
- Sohal RS, Peters PD, Hall TA (1977). Origin, ultrastructure, composition and age dependence of mineralized dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly, *Musca domestica*. *Tissue Cell*. 9: 87-102.
- Spring JH, Felgenhauer BE (1996). Excretion in the house cricket, *Acheta domesticus*: effect of diuretics on the structure of the mid-tubule. *J Morphol*. 230: 43-53.
- Terra WR, Costa RH, Ferreira C (2006). Plasmic membranes from insect midgut cells. *Ann Braz Acad Sci*. 78: 255-269.
- Teigler DJ, Arnott HJ (1972). Crystal development in the Malpighian tubules of *Bombyx mori* (L.). *Tissue Cell*. 4: 173-185.

Turbeck B (1974). A study of the concentrically laminated concretions spherites in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue Cell*. 6: 627-640.

Vesk PA, Byrne M (1999). Metal levels in tissue granules of the freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Unionida) for biomonitoring: the importance of cryopreparation. *Sci Total Environ*. 225: 219-229.

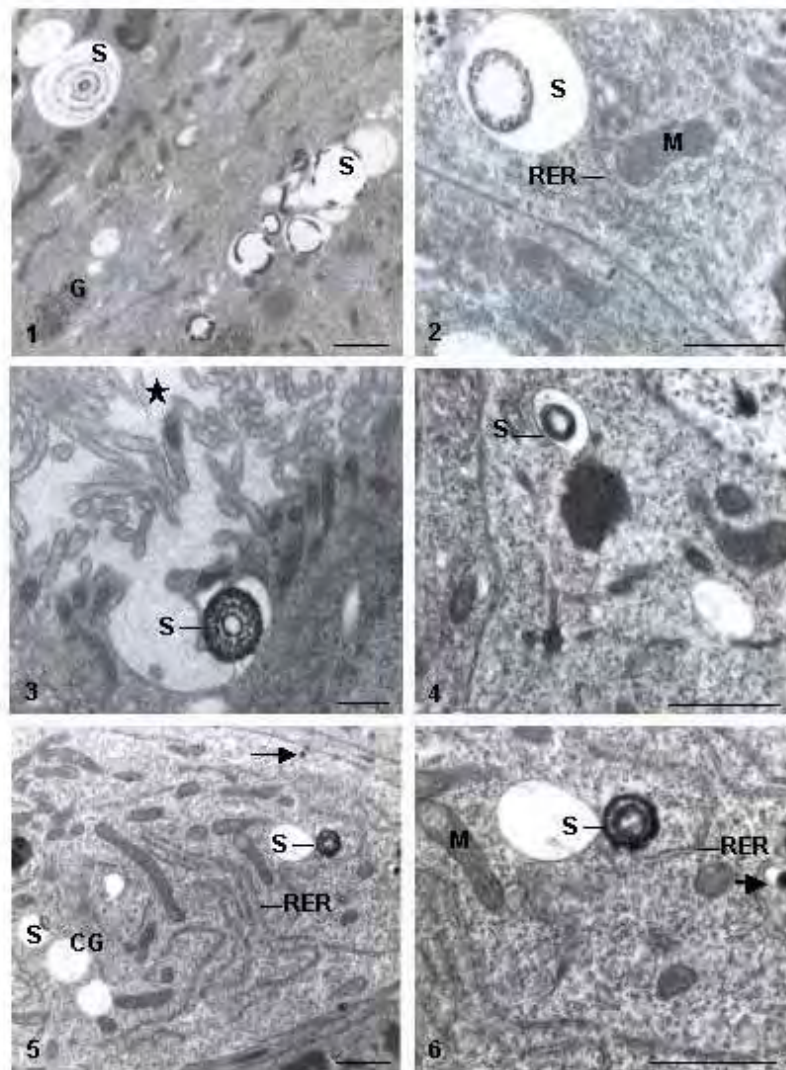
Waku Y, Sumimoto KI (1974). Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. II. Electron microscopy. *Tissue Cell*. 6: 127-136.

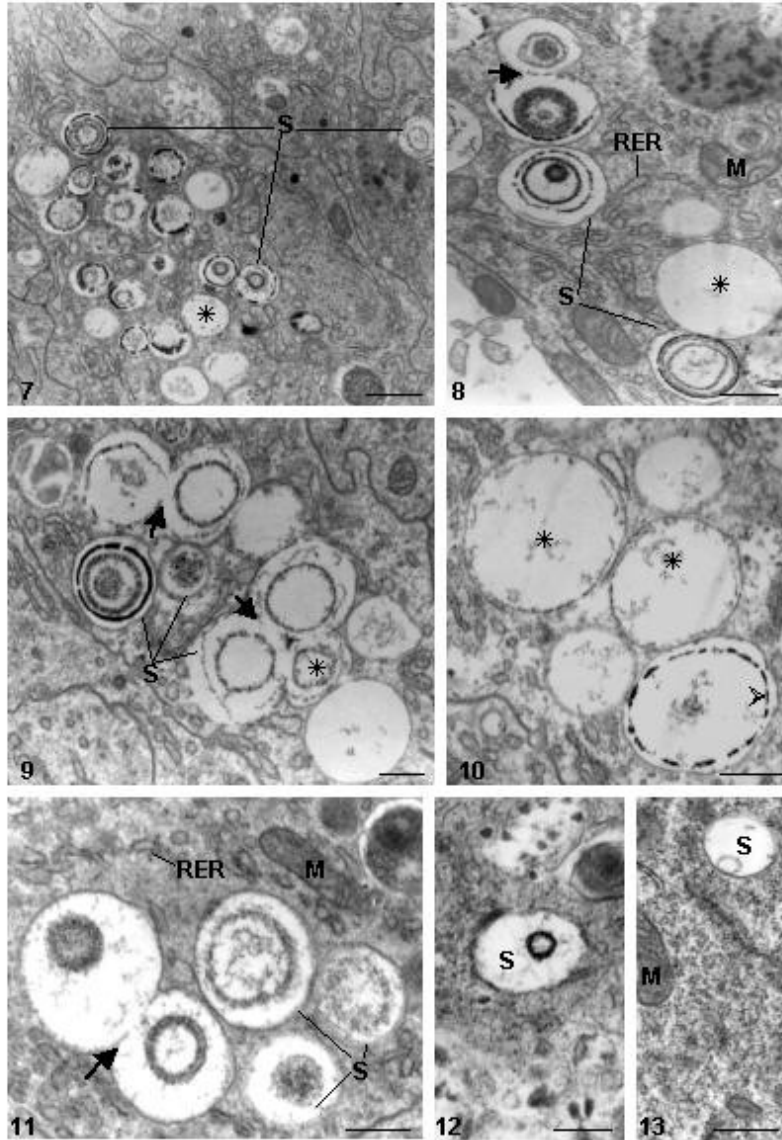
Wright KA, Newel IM (1964). Some observation on fine structure of the midgut of the mite *Anystis* sp. *Ann Entomol Soc Am*. 57: 684-693.

Legenda das figuras

Figs. 1-6 - Células epiteliais do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas: esferitos (S); glicogênio (G); retículo endoplasmático rugoso (RER); cavidade da célula caliciforme (★); grânulos (seta); mitocôndria (M); complexo de Golgi (CG). **Fig. 1** - Célula colunar. Barra = 1µm. **Fig. 2** - Célula colunar. Barra = 0,5µm. **Fig. 3** - Célula caliciforme. Barra = 1µm. **Fig. 4** - Célula regenerativa. Barra = 1µm. **Fig. 5** - Célula endócrina. Barra = 1µm. **Fig. 6** - Célula endócrina. Barra = 1µm.

Figs. 7-13 - Células colunares da região anterior (Figs. 7-11) e posterior (Figs. 12-13) do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* endoparasitadas pela *Cotesia flavipes*: esferito (S); retículo endoplasmático rugoso (RER); mitocôndria (M); fusão de membranas de esferitos (seta); material floculado (*). **Fig. 7** – Esferitos de morfologia heterogênea. Barra = 1µm. **Fig. 8** - Esferitos de morfologia heterogênea. Barra = 0,5µm. **Fig. 9** - Inúmeros esferitos com lamelas elétron-lucentes entre material floculado, poucos esferitos com lamelas elétron-densas. Barra = 0,5µm. **Fig. 10** - Esferitos com morfologia variada; concentração de material elétron-denso (cabeça de seta) próximo à membrana vacuolar do esferito. Barra = 0,5µm. **Fig. 11** - Esferitos com lamelas estruturadas espessas, pouco elétron-densas. Barra = 0,5µm. **Fig. 12** - Esferito com lamela elétron-densa. Barra = 0,25µm. **Fig. 13** - Esferito com lamela elétron-lucente. Barra = 0,5µm.





ARTIGO 6

“Morte celular de células epiteliais do intestino
médio de larvas de *Diatraea saccharalis*
(Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes*
(Hymenoptera)”

A ser enviado para a revista Micron como: Pinheiro, D.O.; Santos, D.C.; Gregório, E.A. Cell death in the midgut epithelium of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera).

Resumo

A broca da cana, *Diatraea saccharalis*, pode ser endoparasitada pela *Cotesia flavipes*; entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do parasitismo nos órgãos do hospedeiro, inclusive no intestino médio (IM). A morte celular no epitélio do IM de larvas de insetos tem sido investigada, mas o efeito do endoparasitismo neste processo não está esclarecido. Este trabalho tem por objetivo identificar e caracterizar o processo de morte celular no epitélio do IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e endoparasitadas. Fragmentos de IM foram fixados e processados para observação em microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz (método convencional e técnica do TUNEL). O epitélio do IM de *D. saccharalis* não-parasitadas e endoparasitadas mostrou aspectos morfológicos de morte celular programada do tipo “apoptosis-like” em células colunares e regenerativas, nas regiões anterior e posterior do IM. O núcleo destas células mostrou formato irregular e massas coalescentes e bem delimitadas de cromatina na periferia do núcleo; o envelope nuclear apresentou ruptura pontual de suas membranas. As mitocôndrias apresentaram rarefação da matriz, e algumas delas se mostraram rompidas. O retículo endoplasmático rugoso e o envelope nuclear mostraram alargamento de suas cisternas. Nossos resultados mostram que ocorre morte celular programada do tipo “apoptosis-like” no epitélio do IM de *D. saccharalis*, especialmente em células colunares; o endoparasitismo pela *C. flavipes* não afeta a indução da morte celular nas células epiteliais. Não existem diferenças regionais no processo de morte celular ao longo do IM do inseto hospedeiro.

Palavras-chave: inseto, intestino médio, morte celular programada, *Diatraea saccharalis*, TUNEL, *Cotesia flavipes*, parasitismo, ultra-estrutura

Abstract

The *Diatraea saccharalis* may be endoparasitized by *Cotesia flavipes*; however, very little is known about the effect of the parasitism in the host organs, including the midgut. The programmed cell death in the midgut epithelium of insect larvae has been investigated but the effect of the parasitoid development in this process is not clarified. This work aims to identify and characterized the death process in the *D. saccharalis* larvae non-parasitized and parasitized by *C. flavipes*. Fragments of the midgut were fixed and processed for light microscopy (conventional and TUNEL labeling) and transmission electron microscopy observations. The *D. saccharalis* midgut epithelium of both non-parasitized and parasitized larvae showed morphological features of apoptosis-like programmed cell death in columnar and regenerative cells in the anterior and posterior midgut regions. The nucleus of these cells showed irregular shape and coalescence of chromatin into sharply delineated masses at the nuclear periphery; the nuclear envelope presented punctual disruption of their membranes. The mitochondria presented matrix rarefaction; some mitochondria presented disrupted membranes. The rough endoplasmic reticulum and the nuclear envelope showed enlarged cistern. Our results suggest that apoptosis-like programmed cell death occurs in the sugarcane borer midgut epithelium, mainly in the columnar cell; the endoparasitism by *C. flavipes* does not affect the apoptosis-like induction in the epithelial midgut cells. There are no regional differences in the death cell process along the host midgut length.

Keywords: insect, midgut, programmed cell death, *Diatraea saccharalis*, TUNEL, *Cotesia flavipes*, parasitism, ultrastructure

Introdução

A morte celular programada é definida como uma importante função celular, essencial para a morfogênese, desenvolvimento, diferenciação, e manutenção da homeostase dos tecidos e órgãos em organismos multicelulares (Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Hockenbery, 1995; Hacker, 2000; Guimarães & Linden, 2004; Roach *et al.*, 2004).

A apoptose clássica é um processo geneticamente regulado e com expressão morfológica específica, no qual células que já desempenharam suas funções têm a habilidade de se auto destruírem, por ativação de um programa suicida celular. Uma vez que o processo de apoptose é desencadeado, as células sofrem uma série de mudanças moleculares e morfológicas. Estas mudanças incluem condensação da cromatina, quebra inter-nucleossomal do DNA, fragmentação nuclear, encolhimento celular, reorganização do citoesqueleto, alterações da membrana mitocondrial, formação de múltiplos brotamentos de membrana e, finalmente, a ruptura da célula em corpos apoptóticos contendo organelas e pedaços de núcleo degradado, que são fagocitados por células adjacentes (Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Hockenbery, 1995; Hacker, 2000; Guimarães & Linden, 2004; Lockshin & Zakeri, 2004).

Além da apoptose clássica, as células podem sofrer diferentes tipos de morte celular programada, já descritos na literatura, especialmente necrose e autofagia. Enquanto a apoptose clássica representa a morte celular individual sob estímulos fisiológicos e patológicos (Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Guimarães & Linden, 2004), a necrose envolve a morte de grupos de células em decorrência de agressões ao tecido (Majno & Joris, 1995); já a morte celular autofágica, além de ocorrer por agressão tecidual, pode ser também uma resposta adaptativa à privação de nutrientes (Baehrecke, 2003). Ainda com referência à morte celular programada, células podem sofrer processos distintos, exibindo características morfológicas “mescladas” entre aquelas dos tipos citados acima, processos estes que receberam inúmeras terminologias como “apoptosis-like”, necrapoptose, parapoptose, condroptose, “partitioning apoptosis” entre outras (Schwartz *et al.*, 1993; Chandrashekhar & Narula, 2003; Roach *et al.*, 2004; Zang *et al.*, 2005).

A morte celular programada tem sido estudada em diferentes órgãos de insetos (Lockshin & Beaulaton, 1974; Gregorc & Bowen, 1999; Hartfelder & Steimbruck, 1997; Boleli *et al.*, 1999; Silva de Moraes & Bowen, 2000; Nezis *et al.*, 2003).

Entretanto, existem poucos estudos considerando a morte celular programada em intestino médio (IM) de larvas de insetos (Gregorc & Bowen, 1997), sendo a maioria deles feitos em cultura de células (Palli *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2001; Loeb *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2003; Gregorc & Bowen, 2004). A apoptose de célula epitelial do IM em insetos pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo inibidores de síntese de RNA e proteína (Palli *et al.*, 1996), infecções viral (Garcia *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2003) e bacteriana (Gregorc & Bowen, 1999; Daborn *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius 1794 (Lepidoptera), é considerada uma das mais sérias pragas da cultura da cana de açúcar e muitas outras plantações (Long & Hensley, 1972; Rossi & Fowler, 2003). Para minimizar os efeitos da *D. saccharalis* na cultura da cana de açúcar, o controle biológico com endoparasitas tem sido amplamente utilizado, incluindo a *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). Este trabalho visa identificar a morte celular no epitélio do IM de larvas de *D. saccharalis*, e o efeito do endoparasitismo pela *C. flavipes* neste processo.

Material e Métodos

Os insetos foram mantidos em dieta artificial com umidade e temperatura controladas. Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas manualmente para ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis* no último instar; as larvas de *D. saccharalis* parasitadas foram dissecadas após 6 dias de parasitismo.

Para microscopia de luz convencional, o material foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24h e incluído em Histo-resina; os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina.

Para a técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), o material foi fixado em solução de formalina tamponada 10% (24h) para posterior inclusão em parafina. O material foi submetido ao protocolo do Kit (FRAG-EL da Oncogene), como descrito por Gavrieli *et al.* (1992). Os alvos dessa marcação foram os novos finais 3'-OH gerados pela fragmentação inter-nucleossomal do DNA. Os cortes foram desparafinizados, permeabilizados com proteinase K e incubados em solução de H₂O₂ e tampão TBS (20mM tampão TRIS pH 7.6 em 140mM NaCl) para inativação da peroxidase endógena. Em seguida foram incubados em solução contendo a enzima TdT e posteriormente a revelação da reação foi realizada

com solução de DAB (diaminobenzidina). As lâminas foram montadas em glicerol e analisadas em microscópio de luz.

Para microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos das regiões anterior e posterior do IM foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3 por até 24h, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h, desidratados em sequência crescente de soluções de acetona e incluídos em Araldite®. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão CM100 da Philips.

Resultados

Células colunares e regenerativas do epitélio do IM em larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes* mostram aspectos morfológicos de morte celular com características do tipo “apoptosis-like”. Essas características foram semelhantes nas regiões anterior e posterior do IM e puderam ser observadas em microscopia de luz convencional (Figs. 1-3) e em microscopia eletrônica de transmissão (Figs. 8-12), sendo confirmada a fragmentação do DNA pela reação de TUNEL (Figs. 4-7).

Em microscopia de luz observa-se condensação da cromatina na periferia do núcleo dos dois tipos celulares (Figs. 1-2). É possível detectar fragmentos celulares arredondados na região apical do epitélio, formado por citoplasma escasso e porção nuclear densa (Fig. 3), que também apresenta reação positiva para o TUNEL (Fig. 5).

A análise ultra-estrutural mostra o núcleo destas células epiteliais com formato irregular e cromatina coalescente em massas bem delimitadas adjacentes ao redor de todo o envelope nuclear (Figs. 8-12), que pode apresentar pontos de ruptura (Figs. 11-12). No citoplasma as alterações morfológicas mais evidentes são observadas nas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER). As mitocôndrias exibem rarefação da matriz e desestruturação das cristas, podendo ainda ser detectadas algumas mitocôndrias com as membranas interna e externa rompidas (Figs. 9-10). O RER exhibe dilatação evidente de suas cisternas, assim como o envelope nuclear (Figs. 9-10). Vacúolos autofágicos foram ocasionalmente identificados.

Discussão

No IM de larvas de *D. saccharalis* existem evidências morfológicas de que as células epiteliais podem sofrer morte celular programada, tanto em larvas não-parasitadas como parasitadas pela *C. flavipes*; esta morte celular ocorre de maneira semelhante na região anterior como na posterior do IM. Neste processo de morte celular acontece marginalização de massas compactas de cromatina (TUNEL-positivas) no núcleo das células colunares e regenerativas, além de alteração morfológica nas mitocôndrias, RER e envelope nuclear. Tais alterações morfológicas, associadas com a presença de vacúolo autofágico e identificação de fragmentos celulares envolvidos por membrana, levaram-nos a enquadrar o processo de morte celular programada no IM da broca da cana no tipo “apoptosis-like”.

De acordo com a literatura recente, diferentes tipos de morte celular programada podem ser identificados baseados em características morfológicas (Majno & Joris, 1995). Dentre estes tipos, a “apoptosis-like” tem sido amplamente investigada (Chao & Nagoshi, 1999; Leist & Jäätelä, 2001; Lockshin & Zakeri, 2002; Guimarães & Linden, 2004; Roach *et al.*, 2004; Lapointe *et al.*, 2005). Uma das características morfológicas diagnósticas mais pertinentes da “apoptosis-like” é a intensa condensação da cromatina, que aparece em pequenos grumos de formatos irregulares com concentração por toda a periferia do núcleo (Roach *et al.*, 2004), ao contrário da apoptose clássica, cuja marginalização da cromatina condensada ocorre em um dos pólos do núcleo, em forma de meia lua (Leist & Jäätelä, 2001). Embora exista esta morfologia nuclear diferente nos dois tipos de morte celular, tanto as células em “apoptosis-like” como em apoptose clássica expõem moléculas de reconhecimento na sua superfície, sendo fagocitadas antes de eventual lise da membrana plasmática (Leist & Jäätelä, 2001).

Alterações morfológicas ultra-estruturais nas mitocôndrias, tais como rarefação da matriz e desestruturação das cristas, foram observadas especialmente nas células colunares de *D. saccharalis*, que também exibem RER e envelope nuclear com cisternas bastante dilatadas. Estas alterações morfológicas mitocondriais e de RER foram descritas em outros tipos celulares em processo de morte celular “apoptosis-like” (Leist & Jäätelä, 2001). Trabalhos recentes enfatizam o papel das organelas citoplasmáticas na ativação das vias de indução e/ou vias de execução da morte celular em diversos tecidos. Alguns autores mostram que a alteração mitocondrial, incluindo permeabilização da membrana externa da mitocôndria juntamente com alterações bioquímicas, está estritamente envolvida na manifestação da morte celular (Bras *et al.*,

2005). Na morte celular programada é possível observar remodelação das mitocôndrias, que podem causar liberação de proteínas apoptogênicas, diminuição no potencial transmembrana, descontinuidade da cadeia transportadora de elétrons e diminuição na síntese de ATP (para revisão ver Bras *et al.*, 2005). Outros autores mostram que existem efeitos combinados entre alteração mitocondrial e alterações em outras organelas, como por exemplo, o stress no retículo endoplasmático, que seriam responsáveis por essas vias de manifestação da morte celular (Pinton *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2004). Além disso, existem trabalhos que mostram apenas a participação do retículo endoplasmático na ativação da morte celular (Ferri & Kroemer, 2001; Nakagawa *et al.*, 2001;). Acreditamos que as mitocôndrias, em conjunto com o RER e envelope nuclear, podem estar participando nas vias de indução e/ou execução da “apoptosis-like” em *D. saccharalis*. O rompimento das membranas externa e interna de algumas mitocôndrias, além do eventual rompimento do envelope nuclear por nós observados, foram achados inesperados, cujo significado funcional deverá ser melhor investigado. Alteração ultra-estrutural nas mitocôndrias de células em apoptose foi observada em diferentes linhagens de células em cultura, sendo caracterizada pelo rompimento apenas da membrana mitocondrial externa, formando o que Sessa *et al.* (1999) denominou de vesícula mitocondrial com membrana única; os autores correlacionaram este rompimento com a liberação de citocromo C, fator promotor conhecido no processo de apoptose.

Fragmentos celulares envolvidos por membrana, com morfologia semelhante ao de corpos apoptóticos, foram observados ao longo do epitélio do IM da broca da cana, em larvas parasitadas e não parasitadas. O termo corpo apoptótico é frequentemente adotado durante o processo de morte por apoptose clássica, para definir porções celulares envolvidas por membrana contendo resíduos nucleares e citoplasmáticos resultantes da fragmentação da célula em apoptose (Kerr *et al.*, 1972). As estruturas por nós observadas, tanto em microscopia de luz como eletrônica de transmissão, continham também DNA fragmentado comprovado pela técnica do TUNEL, confirmando serem resultantes do processo de morte celular das células epiteliais do IM de *D. saccharalis*.

Nossos resultados mostram que a morte celular ocorre principalmente nas células colunares nas regiões anterior e posterior do IM da broca da cana, e que o desenvolvimento do endoparasita *C. flavipes* na hemocele de larvas de *D. saccharalis* não induz um aumento da morte celular programada nas células epiteliais do IM do inseto hospedeiro. Sabe-se que as células colunares são as mais abundantes do epitélio

do IM de insetos, as quais são responsáveis pelo processamento da dieta, secreção de enzimas digestivas e pela tomada dos produtos finais da digestão (Lehane & Billingsley, 1996). Já as células regenerativas, espalhadas na base do epitélio, são responsáveis pela renovação celular (Lehane & Billingsley, 1996); admite-se que estas células sejam precursoras dos outros tipos celulares, inclusive das células colunares (Lehane & Billingsley, 1996; Illa-Bochaca & Montuenga, 2006). A prevalência de apoptose em células colunares também foi observada por Gregorc & Bowen (2004) estudando o IM de larvas de *Apis mellifera* tratadas com ácidos oxálico e fórmico, e por Loeb *et al.* (2000) em cultura de células do IM de larvas de *Heliothis virescens*.

Sabe-se que a distribuição, morfologia e morfometria das células epiteliais é variável ao longo do IM em larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (Pinheiro & Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003) e parasitadas pela *C. flavipes* (Pinheiro *et al.*, 2006); entretanto, não foi detectada diferenças na morte celular programada ao longo da extensão do IM, confirmando a idéia de que a “apoptosis-like”, da mesma maneira que para a apoptose clássica, é um processo fisiológico normal e essencial para a manutenção da integridade celular, não afetando diretamente a função celular ao longo da extensão do IM (Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Hockenbery, 1995; Hacker, 2000; Guimarães & Linden, 2004; Roach *et al.*, 2004).

Na estratégia de desenvolvimento do parasitóide na hemocèle do inseto hospedeiro, é necessário que as células epiteliais do IM continuem a desempenhar suas funções, garantindo o crescimento e o desenvolvimento do endoparasita, bem como a sobrevivência do inseto hospedeiro durante o parasitismo (Thompson *et al.*, 2005), o que vem de encontro com nossos achados de que o parasitismo não deve induzir aumento de morte celular destas células no IM.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Entomologia da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista-SP, Brasil, pelo fornecimento dos insetos e as Sra. M. H. Moreno e C. S. Tardivo pelo apoio técnico. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP (Proc. 03/05690-3) e FUNDUNESP.

Referências Bibliográficas

- Baehrecke, E.H., 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 10, 940--945.
- Brás, M., Queenan, B., Susin, S.A., 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)* 70, 284--293.
- Chandrasekhar, Y., Narula, J., 2003. Death hath a thousand door to let out life. *Circulation Research* 92, 715--724.
- Chao, S., Nagoshi, R.N., 1999. Induction of the apoptosis in the germline and follicle layer of *Drosophila* egg chambers. *Mechanisms of Development* 88, 159--172.
- Daborn, P.J., Waterfield, N., Silva, C.P., Au, C.P.Y., Sharma, S., French-Constant, R.H., 2002. A single *Photorehabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proceedings Natl. Academic of Sciences. USA* 99, 10742--10747.
- Ferri, K.F., Kroemer, G., 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 3, 255--263.
- Garcia, J.J., Li, G., Wang, P., Zhong, J., Granados, R.R., 2001. Primary and continuous midgut cell cultures from *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). In *Vitro Cell Development Biology – Animal* 37, 353--359.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119, 493--501.
- Gregorc, A., Bowen, I.D., 1999. *In situ* localization of the heat-shock and histone proteins in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus* larvae. *Cell Biology International* 23, 211--218.
- Gregorc, S., Bowen, I.D., 1997. Programmed cell death in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biology International* 21, 151--158.
- Gregorc, S., Bowen, I.D., 2004. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35, 453--460.
- Guimarães, C.A., Linden, R., 2004. Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* 271, 1638--1650.
- Hacker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301, 5--17.
- Hartfelder, K., Steinbrück, G., 1997. Germ cell formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invertebrate Reproduction Development* 31, 237--250.

- Hockenbery, D., 1995. Defining Apoptosis. *American Journal of Pathology*, 146, 16--19.
- Illa-Bochaca, I., Montuenga, L.M., 2006. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *Journal of Experimental Biology* 209, 2215--2223.
- Ishikawa, H., Ikeda, M., Yanagimoto, K., Alves, C.A.F., Katou, Y., Laviña-Caolli, B.A., Kobayashi, M., 2003. Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. *Journal of Genetic Virology* 84, 705--714.
- Jin, Q.G., Zhao, B., Zhang, X.J., 2004. Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 1816--1825.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brazilian Journal of Cancer* 26, 239--257.
- Lapointe, R., Wilson, R., Vilaplana, L., O'Reilly, D.R., Falabella, P., Douris, V., Bernier-Cardou, M., Pennachio, F., Iatrou, K., Malva, C., Olszewski, J.A., 2005. Expression of a *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus-encoded protein causes apoptosis-like programmed cell death in lepidopteran insect cells. *Journal of General Virology* 86, 963--971.
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F., 1996. *Biology of the insect midgut*, Chapman and Hall, London.
- Leist, M., Jäätelä, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* 2, 589--598.
- Lockshin, R.A., Beaulaton, J., 1974. Programmed cell death. Cytochemical evidence for lysosomes during the normal breakdown of the intersegmental muscles. *Journal of Ultrastructural Research* 46, 43--62.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36: 2405--2419.
- Loeb, M.J., Hakim, R.S., Martin, P.A.W., Narang, N., Goto, S., Takeda, M., 2000. Apoptosis in culture midgut cells from *Heliothis virescens* larvae exposed to various conditions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 45, 12--23.
- Loeb, M.J., Martin, P.A.W., Narang, N., Hakim, R.S., Goto, S., Takeda, M., 2001. Control of life, death, and differentiation in cultured midgut cells of Lepidopteran,

- Heliothis virescens*. In Vitro Cell Development Biology Animal, 37, 348--352.
- Long, W.H., Hensley, S.D., 1972. Insect pests of sugarcane. Annual Review Entomology 17, 149--176.
- Majno, G., Joris, I., 1995. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. American Journal of Pathology 146, 3--15.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2001. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . Nature 403, 98--103.
- Nezis, I.P., Modes, V., Mpakou, V., Stravopodis, D.J., Papassideri, I. S., Mammali, I., Margaritis, L.H., 2003. Modes of programmed cell death during *Ceratitis capitata* oogenesis. Tissue and Cell 35, 113--119.
- Palli, S.R., Sohi, S.S., Cook, B.J., Brownwright, A.J., Caputo, G.F., Retnakaran, A., 1996. RNA- and protein-synthesis inhibitors induced apoptosis in a midgut cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Journal of Insect Physiology 42, 1061--1069.
- Pinheiro D.O., Gregório E.A., 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Acta Microscopica 12, 27--30.
- Pinheiro D.O., Silva R.J., Gregório E.A., 2006. Morphometry of the *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) midgut epithelium parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). Journal Invertebrate Pathology (in press).
- Pinheiro D.O., Silva R.J., Quagio-Grassiotto I., Gregório E.A., 2003. Morphometric study of the midgut epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Neotropical Entomology 32, 453--459.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., Rizzuto, R. The Ca^{2+} concentration reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. The European Molecular Biology Organization Journal 20, 2690--2701.
- Roach, H.I., Aigner, T., Kouri, J.B., 2004. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? Apoptosis 9, 265--277.
- Rossi, M.N., Fowler, H.G., 2003. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Crambidae) and its parasitoids: a synchrony approach to spatial and temporal dynamics. Journal of Applied Entomology 127, 200--208.

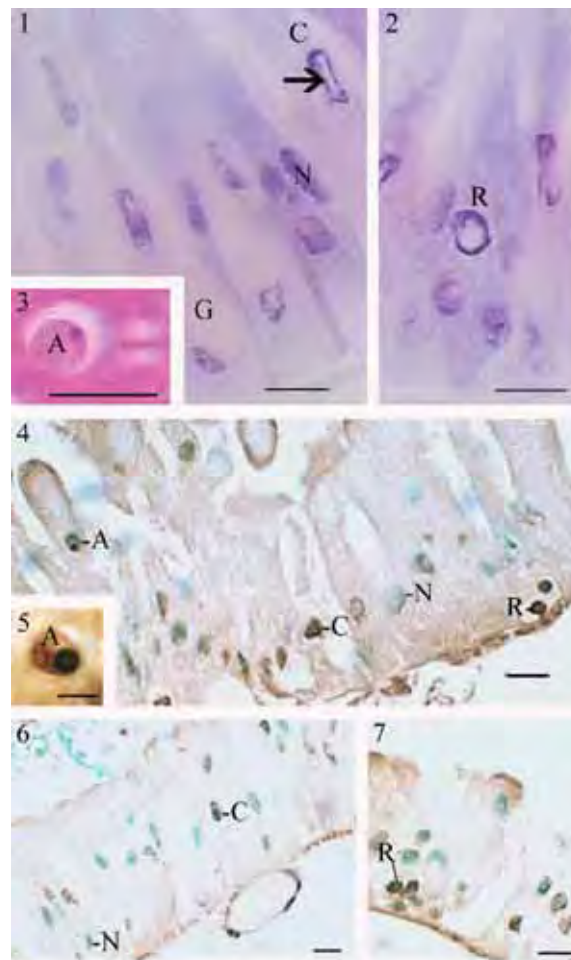
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell and Tissue Research* 237, 565--574.
- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E.E., Osborne, B.A., 1993. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proceeding Natl. Academic of Sciences USA* 90, 980--984.
- Sesso, A., Schumacher, A.I., Monteiro, M.M.T., Fujiwara, D.T., Santos, A.B.G., Ferreira, M.A., Jaeger, M., Colquhoun, A., Belisario, J., 1998. Presence of unimembranous mitochondrial derived vesicular profiles in apoptotic cells and in cells in non explicit apoptosis from various lineages. *Acta Microscopica* 8, Supplement B, 69--70.
- Silva de Moraes, R.L.M., Bowen, I.D., 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cellular Biology International* 24, 737--743.
- Silva, C.P., Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dean, P., Chilver, T., Au, C.P.Y., Sharma, S., Potter, U., Reynolds, S.E., Ffrench-Constant, R.H., 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photographus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology* 4, 329--339.
- Takeda, M., Sakai, T., Fujisawa, Y., Narita, M., Iwabuchi, K., Loeb, M.J., 2001. Cockroach midgut peptides that regulated cell proliferation, differentiation, and death *in vitro*. *In Vitro Cell Development Biology – Animal* 37, 343--347.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., Wang, L.-W., 2005. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. *Journal of Experimental Biology* 208, 611--623.
- Zhang, B., Arany, Z., Mann, D., Rhee, J.G., Fenton, R.G., 2005. Partitioning apoptosis: a novel form of the execution phase of apoptosis. *Apoptosis* 10, 219--231.

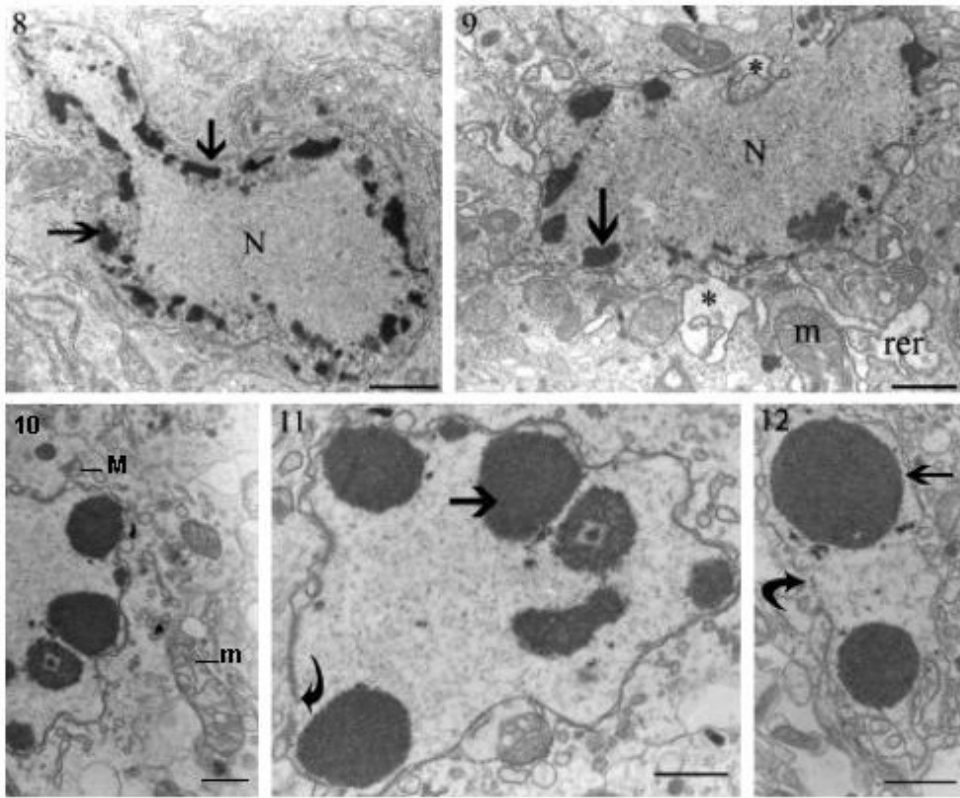
Legenda das Figuras

Figuras 1- 3: Intestino médio de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes*-HE. **1)** Região Anterior. Núcleo de célula colunar com distribuição normal de cromatina (N) e marginalização da cromatina condensada (seta). Célula caliciforme (G). Barra = 10µm. **2)** Região Posterior. Célula regenerativa (R) mostrando cromatina condensada na periferia do núcleo. Barra = 10µm. **3)** Região Posterior. Detalhe de fragmento celular semelhante a corpo apoptótico (A). Barra = 5µm.

Figures 4-7: Intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (Figs. 4-5) e parasitadas (Figs. 6-7) pela *C. flavipes* - TUNEL. Núcleo de célula colunar (C) e célula regenerativa (R) TUNEL-positivo; núcleo (N) de célula caliciforme TUNEL-negativo; fragmento celular semelhante a corpo apoptótico (A). **4)** Região anterior. Barra = 10µm. **5)** Região anterior. Barra = 5µm. **6)** Região posterior. Barra = 10µm. **7)** Região posterior. Barra = 10µm.

Figuras 8- 12: Intestino médio de larvas de *D. saccharalis* parasitadas pela *C. flavipes* - MET. Cromatina condensada em grumos (seta reta) na periferia do núcleo; pontos de ruptura do envelope nuclear (seta curva); retículo endoplasmático rugoso (RER); cisterna do envelope nuclear dilatado (*). **8)** Região Anterior. Núcleo (N) de célula colunar com formato irregular. Barra = 1µm. **9)** Região Anterior. Mitocôndrias (m). Barra = 1µm. **10)** Região Posterior. Mitocôndrias (m), algumas mitocôndrias rompidas (M). Barra = 1µm. **11-12)** Região posterior. Barras = 1µm.





ARTIGO 7

“Mitocôndrias das células epiteliais do intestino
médio de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)
parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera)”

A ser enviado para a revista Tissue & Cell como: Pinheiro, D.O.; Silva, M.D.; Gregório, E.A. Mitochondria in the midgut epithelial cells of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera).

Resumo

Larvas de *Diatraea saccharalis* afetam a cultura da cana de açúcar e têm sido combatidas pelo endoparasitóide *Cotesia flavipes*; pouco se sabe sobre o efeito do parasitismo no intestino médio (IM) do inseto hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi verificar as alterações mitocondriais das diferentes células epiteliais do IM de larvas de *Diatraea saccharalis* parasitadas pela *Cotesia flavipes*. Fragmentos das regiões anterior e posterior do IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas parasitadas foram processados segundo técnica convencional para microscopia eletrônica de transmissão. Para análise do metabolismo oxidativo o IM foi congelado e os crio-cortes submetidos a protocolo para detecção de atividade de nicotinamina adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-TR) e succinato desidrogenase (SDH). As mitocôndrias das células epiteliais do IM de larvas parasitadas exibem alterações mitocôndrias, especialmente rarefação e vacuolização da matriz, que foram mais pronunciadas nas células epiteliais da região anterior do IM; existe também um aumento no metabolismo oxidativo do IM, na vigência do parasitismo, em especial nas células colunares.

Palavras-chave: intestino médio, *Diatraea saccharalis*, mitocôndria, *Cotesia flavipes*, célula epitelial.

Abstract

The *Diatraea saccharalis*, sugarcane borer, has been widely controlled by *Cotesia flavipes*; however, very little is known about the effect of the parasitism in the host organs, including the midgut. This work aims to verify mitochondrial alteration in the different midgut epithelial cells of *D. saccharalis* parasitized by *C. flavipes*. Midgut fragments (anterior and posterior region) of both non-parasitized and parasitized larvae were processed for transmission electron microscopy. For oxidative metabolism analysis, the midgut was frozen and the cryo sections processed to the activity of detect nicotinamina adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-TR) and succinato desidrogenase (SDH). The mitochondria of midgut epithelial cell in the parasitized larvae exhibit morphological alteration, represented by matrix rarefaction and vacuolization. These mitochondrial alterations are more pronounced in the anterior midgut region; there is an increase of oxidative metabolism in the epithelial cells during the parasitism process, mainly in the columnar cell.

Keywords: midgut, *Diatraea saccharalis*, mitochondria, *Cotesia flavipes*, epithelial cell

Introdução

Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae), uma das mais sérias pragas da cultura canavieira, tem sido controlada pelo endoparasitóide larval *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) (Long e Hensley, 1972; Rossi e Fowler, 2003).

O intestino médio (IM) de larvas de Lepidoptera é morfologicamente diferenciado ao longo do seu comprimento (Santos *et al.*, 1984; Jordão *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2004), inclusive o de *D. saccharalis* (Pinheiro e Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003); seu epitélio é composto por 4 tipos de células: colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (Lehane e Billingsley, 1996).

Muitos são os trabalhos que citam a importância e a distribuição das mitocôndrias nas células epiteliais do IM de insetos (Mandel *et al.*, 1980; Baker *et al.*, 1983; Hung *et al.*, 2000; Serrão e Cruz-Landim, 2000; Clark *et al.*, 2005). Sabe-se que as mitocôndrias da porção apical das células colunares estão envolvidas com a absorção e metabolismo de nutrientes, enquanto que, na porção basal das células colunares, essa organela está relacionada com o transporte de nutrientes e íons da célula para a hemolinfa (Lehane e Billingsley, 1996; Hung *et al.*, 2000). Já as mitocôndrias das projeções filiformes da cavidade das células caliciformes estariam relacionadas aos mecanismos de transporte ativo de íons K^+ , realizado por estas células (Anderson e Harvey, 1966; Harvey *et al.*, 1983; Dow, 1986; Moffett *et al.*, 1995).

A maioria dos estudos do efeito do endoparasitismo em larvas de Lepidoptera aborda alterações no desenvolvimento, reprodução, comportamento e níveis hormonais de insetos hospedeiros (para revisão ver Edwards e Weaver, 2001), sendo pouco enfatizadas as modificações morfológicas, incluindo as ultra-estruturais, nos diferentes órgãos do inseto hospedeiro.

Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito do endoparasitismo pela *C. flavipes* nas mitocôndrias das células epiteliais do IM em larvas de *D. saccharalis*, e se as eventuais alterações nas mitocôndrias e metabolismo oxidativo podem ser relacionadas com a localização da célula epitelial ao longo do IM.

Material e Métodos

Os insetos foram mantidos em dieta artificial com umidade e temperatura controladas. Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas manualmente para

ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis* no último instar, que foram utilizadas após 6 dias de parasitismo.

Para análise ultra-estrutural, os fragmentos de IM (região anterior e posterior) foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.3) por 24h, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 2h, desidratados com sequência crescente de soluções de acetona e incluído em resina Araldite®. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados em microscópio eletrônico de transmissão CM100-Philips.

Para detecção de atividade enzimática, o IM de larvas não-parasitadas e parasitadas foi congelado em nitrogênio líquido. Os cortes de 7µm, obtidos em criostato (JUNG CM 1800), seguiram os protocolos de determinação de atividade enzimática para Nicotinamina adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-TR) e Succinato desidrogenase (SDH) (Louglin, 1993).

Resultados

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL. As características e modificações das mitocôndrias das células epiteliais do IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes*, ao longo do IM estão representadas nas TABELA 1.

Células colunares: em larvas não-parasitadas, as mitocôndrias são geralmente bastante elétron-densas, com matriz contrastada e muitas cristas (Figs. 1A-E), sendo abundantes na base das células colunares da região anterior (Fig. 1B); já na região posterior, concentram-se no ápice da célula (Fig. 1C). Em larvas endoparasitadas, as mitocôndrias aumentam em quantidade nas duas regiões do IM, a maioria delas apresentando poucas cristas e menor elétron-densidade (Figs. 1F-K) do que em larvas não-parasitadas. Estas mitocôndrias mostram-se mais alteradas nas células da região anterior do IM, onde apresentam rarefação (Figs. 1F,H) e vacuolização (Figs. 1G,I) da matriz mitocondrial, na vigência do parasitismo.

Células caliciformes: em larvas não-parasitadas, as mitocôndrias concentram-se no interior das projeções filiformes do tipo microvilosidades, presentes na região baso-lateral da cavidade da câmara, onde são geralmente bastante elétron-densas, com matriz contrastada e muitas cristas, tanto nas células da região anterior como na posterior do IM (Figs. 2A-B). As larvas parasitadas apresentam mitocôndrias com alteração na porção baso-lateral destas células nas duas regiões do IM, representadas por rarefação (Figs. 2C-E) e vacuolização (Figs. 2F-G) da

matriz mitocondrial, alterações estas que afetam um maior número de mitocôndrias na região anterior do IM (Figs. 2C-F). **Células regenerativas:** em larvas não-parasitadas, a distribuição, número e morfologia das suas escassas mitocôndrias não apresentam variação nas células das regiões anterior e posterior (Fig. 3A). Em larvas endoparasitadas, são mais abundantes (Fig. 3B) e apresentam discreta rarefação da matriz (Figs. 3C), apresentam também diminuição na quantidade de cristas e vacuolização mitocondrial naquelas da região anterior (Fig. 3C), não mostrando alteração naquelas da região posterior (Fig. 3D). **Células endócrinas:** em larvas não-parasitadas, a distribuição, número e morfologia das suas mitocôndrias não apresentam variação nas regiões anterior e posterior do IM (Fig. 3E). As células endócrinas mostram variabilidade na quantidade de cristas e elétron-densidade da matriz na região anterior do IM (Figs. 3F-H). Em larvas endoparasitadas observamos rarefação da matriz apenas nas células da região anterior (Figs. 3F-G).

DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE NADH-TR E SDH. Em larvas não-parasitadas, o citoplasma das células colunares apresenta reação positiva para ambas as enzimas NADH-TR e SDH, na forma de estruturas puntiformes que se espalham por todo o citoplasma, concentrando-se na região basal (Figs. 4A-D). Existe aumento na intensidade para ambas as reações enzimáticas da região anterior (Figs. 4A-B) para a posterior (Figs. 4C-D) do IM. Nas células caliciformes, existe reação positiva preferencialmente no citoplasma basal, formando faixa fina ao redor da câmara, mais intensa no seu terço inferior (Figs. 4A-C). As células regenerativas não evidenciaram claramente a reação para ambas enzimas. Larvas endoparasitadas apresentam aumento de intensidade de reação nas células colunares para as duas enzimas, tanto na região anterior (Figs. 4E-F) quanto para a posterior (Figs. 4G-H); não observamos diferenças de reação para as células caliciformes e regenerativas. Não identificamos as células endócrinas em nossos crio-cortes.

Discussão

As células epiteliais apresentam alterações no metabolismo oxidativo e na morfologia ultra-estrutural das mitocôndrias das células epiteliais ao longo do IM de larvas de *D. saccharalis* decorrentes do parasitismo pela *C. flavipes*. As alterações, evidenciadas principalmente pela rarefação da matriz mitocondrial levando até à vacuolização das mitocôndrias e diminuição do número de cristas, variam em intensidade ao longo da extensão do IM, sendo as células epiteliais afetadas pelo

endoparasitismo de maneira diferente, dependente da região do IM.

Nossos achados ultra-estruturais para as células colunares de larvas endoparasitadas de *D. saccharalis* mostram que suas mitocôndrias são mais abundantes ao longo do IM, tanto na porção apical quanto na porção basal da célula; entretanto, preferencialmente aquelas da região anterior mostram modificações ultra-estruturais evidentes, representadas por rarefação e até vacuolização da matriz mitocondrial. O aumento de intensidade de reação para as enzimas NADH-TR e SDH no citoplasma das células colunares da região anterior para a posterior do IM corrobora o achado ultra-estrutural de maior quantidade de mitocôndrias, mostrando que existe aumento no metabolismo oxidativo em decorrência do parasitismo. Sendo assim, as mitocôndrias das células colunares da região anterior do IM são as mais afetadas pelo endoparasitismo.

As células colunares, especialmente as da região anterior do IM, são consideradas responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e da membrana peritrófica, além de atuarem na absorção dos produtos da digestão (Santos *et al.*, 1984; Lehane e Billingsley, 1996; Jordão *et al.*, 1999). Vários estudos mostram que a digestão ao longo do IM é dependente de várias enzimas digestivas, cuja produção pelas células colunares é variável ao longo do IM. Em *Tenebrio molitor*, a maioria das enzimas é produzida pelas células colunares da região anterior do IM, onde aparece em maior quantidade e apresenta maior atividade (Ferreira *et al.*, 1990); uma maior secreção de amilase e tripsina pelas células colunares da região anterior do IM foi observado em *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.* 1999) e *Erinnys ello* (Santos *et al.*, 1984). As enzimas digestivas seriam secretadas para o lúmen na região anterior e direcionadas à região posterior do IM; o alimento parcialmente digerido e as enzimas digestivas atravessariam a membrana peritrófica e, no espaço ectoperitrófico, seguiriam o fluxo contracorrente de água, sendo direcionados novamente para a região anterior do IM, onde ocorreria a digestão final e absorção de alimentos na superfície das células colunares (Ferreira *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 1984). Vários trabalhos sobre a secreção de MP em larva de Lepidoptera sugerem que seus constituintes são produzidos pelas células colunares, preferencialmente na região anterior do IM de insetos (Santos *et al.*, 1984; Terra, 1996).

Trabalho anterior em *D. saccharalis* endoparasitadas mostrou que existe aumento na quantidade de esferitos das células colunares da região anterior, o que foi correlacionado com desequilíbrio iônico do inseto hospedeiro e mostrando que a região anterior deve estar extremamente envolvida no transporte de íons (Pinheiro *et al.*, em

elaboração- Artigo 5). As células colunares apresentam aumento citoplasmático e nuclear na região posterior do IM de larvas de *D. saccharalis*, em decorrência do endoparasitismo, aferidos por meio de análise morfométrica (Pinheiro *et al.*, 2006). Assim. Os achados de maior alteração nas mitocôndrias e nos esferitos das células colunares da região anterior do IM indicam que essa região do IM é a mais afetada pelo parasitismo, enquanto que o aumento do volume celular na região posterior, concomitante com o menor comprometimento mitocondrial, sugerem que a região posterior deve ser menos comprometida pelo endoparasitismo, e possa estar compensando o funcionamento do IM, para o crescimento e desenvolvimento do inseto hospedeiro juntamente com seus parasitóides.

As mitocôndrias das células caliciformes de larvas de *D. saccharalis* endoparasitadas exibem alterações nas duas regiões do IM, afetando um maior número de mitocôndrias e com intensidade maior nas células da região anterior. A rarefação e vacuolização da matriz mitocondrial é bastante evidente nas mitocôndrias das projeções filiformes da câmara das células caliciformes. Estas projeções filiformes são relacionadas com os mecanismos de transporte ativo de íons K^+ da hemolinfa para o lúmen intestinal, em cooperação com as células colunares adjacentes (Anderson e Harvey, 1966; Harvey *et al.* 1983; Dow, 1986; Moffett *et al.*, 1995; Lehane e Billingsley, 1996; Zeiske, 2002). A maior intensidade das lesões mitocondriais na região anterior, em decorrência do parasitismo, não se reflete na morfometria das células caliciformes (Pinheiro *et al.*, 2006), uma vez que existe aumento citoplasmático e nuclear nas duas regiões do IM de *D. saccharalis* endoparasitadas.

O endoparasitismo de larvas de *D. saccharalis* afeta as mitocôndrias das células regenerativas, que aumentam em quantidade nestas células das regiões anterior e posterior do IM; além disso, aquelas da região anterior parecem ser mais afetadas, com as alterações ultra-estruturais evidentes. Trabalhos morfométricos prévios mostram que estas células não sofrem alteração nos volumes citoplasmático e nuclear na vigência do endoparasitismo, em ambas as regiões do IM (Pinheiro *et al.*, 2006), que foi atribuído à grande variabilidade na morfologia destas células, existente mesmo em larvas não parasitadas (Pinheiro *et al.*, 2003). Essa variabilidade das células regenerativas deve estar relacionada com a sua função ao longo do IM; sabe-se que estas células podem se diferenciar nos outros tipos de células epiteliais, apresentando um alto índice de divisão celular e variabilidade morfológica (Lehane e Billingsley, 1996; Illa-Bochaca e Montuenga, 2006). Entretanto, como o endoparasitismo em *D. saccharalis* não acarreta

aumento de morte celular de células epiteliais no IM do inseto hospedeiro (Pinheiro *et al.*, em elaboração- Artigo 6), a reposição celular em decorrência da apoptose não deve estar sendo alterada pelo parasitismo.

Já as células endócrinas não apresentam alteração morfológica ultra-estrutural evidente nas suas mitocôndrias em decorrência do endoparasitismo, exceto pela discreta rarefação da matriz nas células da região anterior do IM, embora haja uma variabilidade de morfologia mitocondrial nestas células, mesmo em larvas não parasitadas. Existem poucos dados na literatura sobre a morfologia das células endócrinas, há indicações da existência de diferentes tipos de célula endócrina no IM de insetos, considerando a sua forma, localização e morfologia, além da elétron-densidade dos grânulos. Desta maneira, foram descritos dez tipos em *Aeshna cyanea* (Andries, 1976), seis tipos em *Periplaneta americana* (Nishiitsutsuji-Uwo e Endo, 1981), quatro tipos em *Nauphoeta cinerea* (Cassier e Fain-Maurel, 1977) e dois tipos em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Neves *et al.*, 2003). A variabilidade das mitocôndrias observadas nas células visualizadas ao longo do IM de *D. saccharalis* pode estar relacionada à presença de diferentes tipos de célula endócrina no IM, que não puderam ser identificados devido ao número reduzido destas células no epitélio do IM, como já foi descrito em muitas outras espécies de insetos (Andries e Beauvillain 1988; Montuenga *et al.* 1989).

De uma maneira geral, em larvas de *D. saccharalis* endoparasitadas, observamos um aumento do metabolismo oxidativo para as células epiteliais, evidenciado pelo aumento da intensidade de reação para as enzimas NADH e SDH nessas células, bem como na quantidade de mitocôndrias, que pode ser relacionado ao melhor aproveitamento da dieta ingerida. Sabe-se que larvas de Lepidoptera parasitadas consomem menos nutrientes que as não-parasitadas (Thompson e Redak, 2005; Thompson *et al.*, 2005); sendo assim, as modificações mitocondriais detectadas podem refletir um ajuste fisiológico para assimilação nutricional e digestão do alimento ingerido, já que o hospedeiro necessita de nutrientes para garantir sua própria sobrevivência e para o crescimento do endoparasita durante o processo do endoparasitismo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista-SP, Brasil, pelo fornecimento dos insetos. Agradecemos também a Sueli Cruz

Michelin, Jarbas do Amaral, Maria Helena Moreno e Claudete dos Santos Tardivo pelo processamento técnico. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP.

Referências Bibliográficas

- Anderson, E., Harvey, W.R., 1966. Active transport by the *Cecropia* midgut: ii. fine structure of the midgut epithelium. *J. Cell Biol.* 31, 107-134.
- Andries, J.C. 1976. Presence de deux types cellulaires endocrines et d'un type exocrine au sein du mesenteron de la larve d'*Aeshna cyanea* Müller (Odonata: Aeshnidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 5, 393-407.
- Andries, J.C., Beauvillain, J.C., 1988. Ultrastructural study of cholecystokinlike immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. *Biol. Cell.* 46, 195-202.
- Baker, J.E., Woo, S.M., Byrd, R.V., 1984. Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. *Can. J. Zool.* 62, 1251-1259.
- Cassier, P., Fain-Maurel, M.A., 1977. Sur la presence d'un systeme endocrine diffus dans le mesenteron de quelques insectes. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 118, 197-209.
- Clark, T.M., Hutchinson, M.J., Huegel, K.L., Moffett, S.B., Moffett, D.F., 2005. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue Cell* 37, 457-468.
- Dow, J.A.T., 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-238.
- Edwards, J.P., Weaver, R.J., 2001. Endocrine interactions of insect parasites and pathogens. The Cromwell Press, Trowbridge, 314 p.
- Ferreira, C., Bellinello, G.L., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1990. Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 20, 839-847.
- Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1981. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *J. Insect Physiol.* 27, 559-70.
- Harvey, W.R., Cioffi, M., Dow, J.A.T., Wolfersberger, M.G., 1983. Potassium ion transport ATPase in insect epithelia. *J. Exp. Biol.* 106, 91-117.
- Hung, C.N., Lin, T.L., Lee, W.Y., 2000. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2): The structure of the midgut. *Zool. Stud.* 39, 387-394.

- Illa-Bochaca, I., Montuenga, L.M., 2006. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J. Exp. Biol.* 209, 2215-2223.
- Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45, 29-37.
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F., 1996. *Biology of the insect midgut*. Chapman and Hall, London, 486p.
- Levy, S.M., Falleiros, A.M.F., Gregório, E.A., Arrebola, N.R., Toledo, L.A., 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64, 1-8.
- Long, W.H., Hensley, S.D., 1972. Insect pests of sugarcane. *Annu. Rev. Entomol.* 17, 149-176.
- Louglin, M., 1993. Evaluation of stained and histochemical preparations. In: *Muscle Biopsy*. University Press, Great Britain, 112-194.
- Mandel, L.J., Moffett, D.F., Riddle, T.G., Grafton, M.M., 1980. Coupling between oxidative metabolism and active transport in the midgut of tobacco hornworm. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 238, 1-9.
- Moffett, D.F., Koch, A., Woods, R., 1995. Electrophysiology of K⁺ transport by epithelium of lepidopteran insect larvae. III. Goblet valve patency. *J. Exp. Biol.* 198, 2103-2113.
- Montuenga, L.M., Barrenechea, M.A., Sesma, P., López, J., Vasques, J.J., 1989. Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 258, 577-583.
- Neves, C.A., Serrão, J.E., Gitirana, L.B., 2003. Ultrastructure of midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Braz. J. Biol.* 63, 683-690.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J., Endo, Y., 1981. Gut endocrine cells in insects: The ultrastructure of the endocrine cells in the cockroach midgut. *Biomed. Res.* 2, 30-44.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Gregório, E.A., 2006. Morphometry of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) midgut epithelium parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). *J. Invertebr. Pathol.* In press.

- Pinheiro, D.O., Gregório, E.A., 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microsc.* 12, 27-30.
- Rossi, M.N., Fowler, H.G., 2003. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Crambidae) and its parasitoids: a synchrony approach to special and temporal dynamics. *J. Appl. Entomol.* 127, 200-208.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.* 237, 565-574.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., 2000. Ultrastructure of the midgut epithelium of *Meliponinae* larvae with different developmental stages and diets. *J. Apicult. Res.* 39, 9-17.
- Terra, W.R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 48, 317-324.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., 2005. Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. *J. Comp. Physiol. A.* 191, 909-923.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., Wang, L.-W., 2005. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. *J. Exp. Biol.* 208, 611-623.
- Zeiske, W., Meyer, H., Wiczoreck, H., 2002. Insect midgut K⁺ secretion: concerted run-down of apical/basolateral transporters with extra-/intracellular acidity. *J. Exp. Biol.* 205, 463-474.

Legenda das Figuras de Ultra-estrutura

Fig. 1- Célula colunar em larvas de *D. saccharalis* não parasitadas (**A-C**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**D-K**). Mitocôndria (M); lúmen intestinal (L); lâmina basal (b); **A)**- Citoplasma apical - região anterior. Barra=0,5µm. **B)**- Citoplasma basal - região anterior. Barra=1µm. **C)**- Citoplasma apical - região posterior. Câmara de célula caliciforme (★). Barra=1µm. **D)**- Citoplasma apical - região posterior. Barra=0,5 µm. **E)**- Citoplasma basal - região posterior. Barra=1µm. **F)** Citoplasma apical – região anterior. Rarefação da matriz (seta). Barra= 1µm. **G)**- Citoplasma basal- região anterior. Vacuolização da matriz mitocondrial (➤). Barra= 1µm. **H)** Detalhe de rarefação da matriz (seta). Barra= 1µm. **I)** Detalhe de vacuolização (➤) da matriz. Barra= 1µm. **J)** Citoplasma apical - região posterior. Barra= 0,5µm. **K)** Citoplasma basal - região posterior. Barra=1µm.

Fig. 2- Célula caliciforme em larvas de *D. saccharalis* não parasitadas (**A-C**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**D-G**). Mitocôndria (M); câmara de célula caliciforme (★); **A)**- Região anterior. Barra= 0,5µm. **B)**- Região posterior. Barra= 0,5µm. **C)**- Região anterior. Rarefação da matriz (seta). Barra= 1µm. **D)**- Região anterior. Dilatação mitocondrial com discreta rarefação da matriz (seta). Barra= 0,5µm. **E)**- Região anterior. Rarefação da matriz (seta). Barra= 0,5µm. **F)**- Região anterior. Vacuolização da matriz (➤). Barra= 0,25µm. **G)**- Região posterior. Vacuolização da matriz (➤). Barra= 1µm.

Fig. 3- Células regenerativa e endócrina em larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes*. Mitocôndria (M); Núcleo (N); grânulos (G). Rarefação da matriz mitocondrial (seta). **A)**- Célula regenerativa, região anterior - larva não-parasitada. Barra= 0,5µm. **B)**- Célula regenerativa, região anterior - larva parasitada. Barra= 1µm. **C)**- Célula regenerativa, região anterior - larva parasitada.. Barra= 1µm. **D)**- Célula regenerativa, região posterior - larva parasitada. Barra= 1µm. **E)**- Célula endócrina, região anterior - larva não-parasitada. Barra= 1µm. **F)**- Célula endócrina, região anterior - larva parasitada. Barra= 1µm. **G)**- Célula endócrina, região anterior - larva parasitada. Barra= 0,5 µm. **H)**- Célula endócrina, região posterior - larva parasitada. Barra= 0,25µm.

TABELA1: Características ultra-estruturais das mitocôndrias das diferentes células epiteliais do intestino médio, em larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *Cotesia flavipes*

Região citoplasmática	Característica	Tipo de larvas/Região do intestino médio			
		Não-Parasitadas		Parasitadas	
		Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
CÉLULAS COLONARES					
Apical	Ocorrência	+	++	+++	+++
	Quantidade cristas	+++	+++	+	++
	Elétron densidade	+++	+++	+	++
	Rarefação da matriz	-	-	+	-
	Vacuolização	-	-	+	-
Baso-lateral	Ocorrência	++	+	+++	+++
	Quantidade cristas	+++	+++	++	++
	Elétron densidade	+++	+++	++	++
	Rarefação da matriz	-	-	+	-
	Vacuolização	-	-	+	-
CÉLULAS CALICIFORMES					
Apical	Ocorrência	+	+	+	+
	Quantidade cristas	++	++	+	+
	Elétron densidade	++	++	+	+
	Rarefação da matriz	-	-	-	-
	Vacuolização	-	-	-	-
Baso-lateral	Ocorrência	++	++	++	++
	Quantidade cristas	++	++	+	+
	Elétron densidade	++	++	+	+
	Rarefação da matriz	-	-	++	+
	Vacuolização	-	-	++	+
CÉLULAS REGENERATIVAS					
	Ocorrência	+	+	++	++
	Quantidade cristas	++	++	+	++
	Elétron densidade	++	++	+	++
	Rarefação da matriz	-	-	+	-
	Vacuolização	-	-	+	-
CÉLULAS ENDÓCRINAS					
	Ocorrência	++	++	++	++
	Quantidade cristas	variável	++	variável	++
	Densidade matriz	variável	++	variável	++
	Rarefação da matriz	-	-	+	-
	Vacuolização	-	-	-	-

*Representação da intensidade gradativa da presença (+) ou ausência (-) da característica ultra-estrutural analisada para as mitocôndrias.

Figura 01

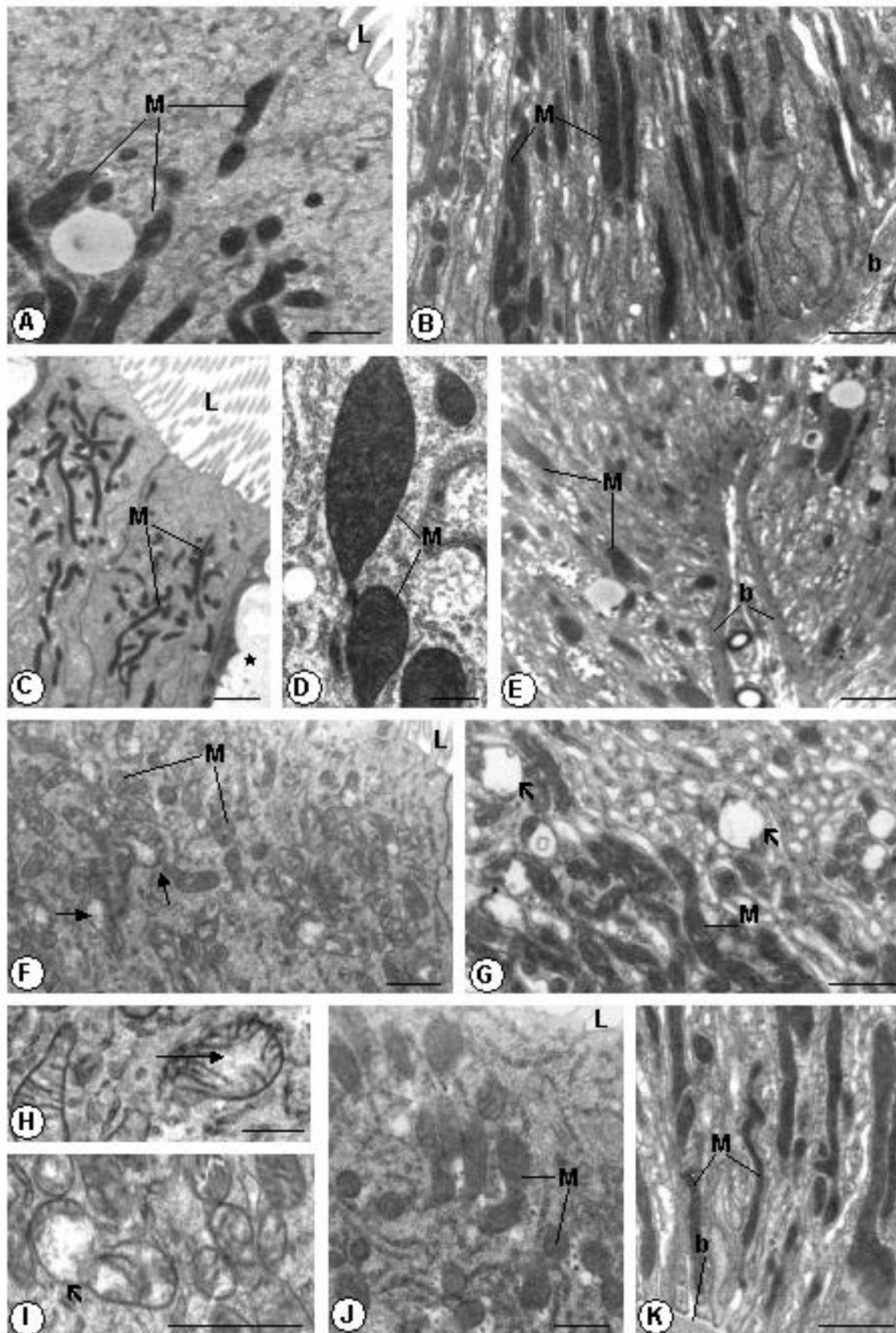


Figura 02

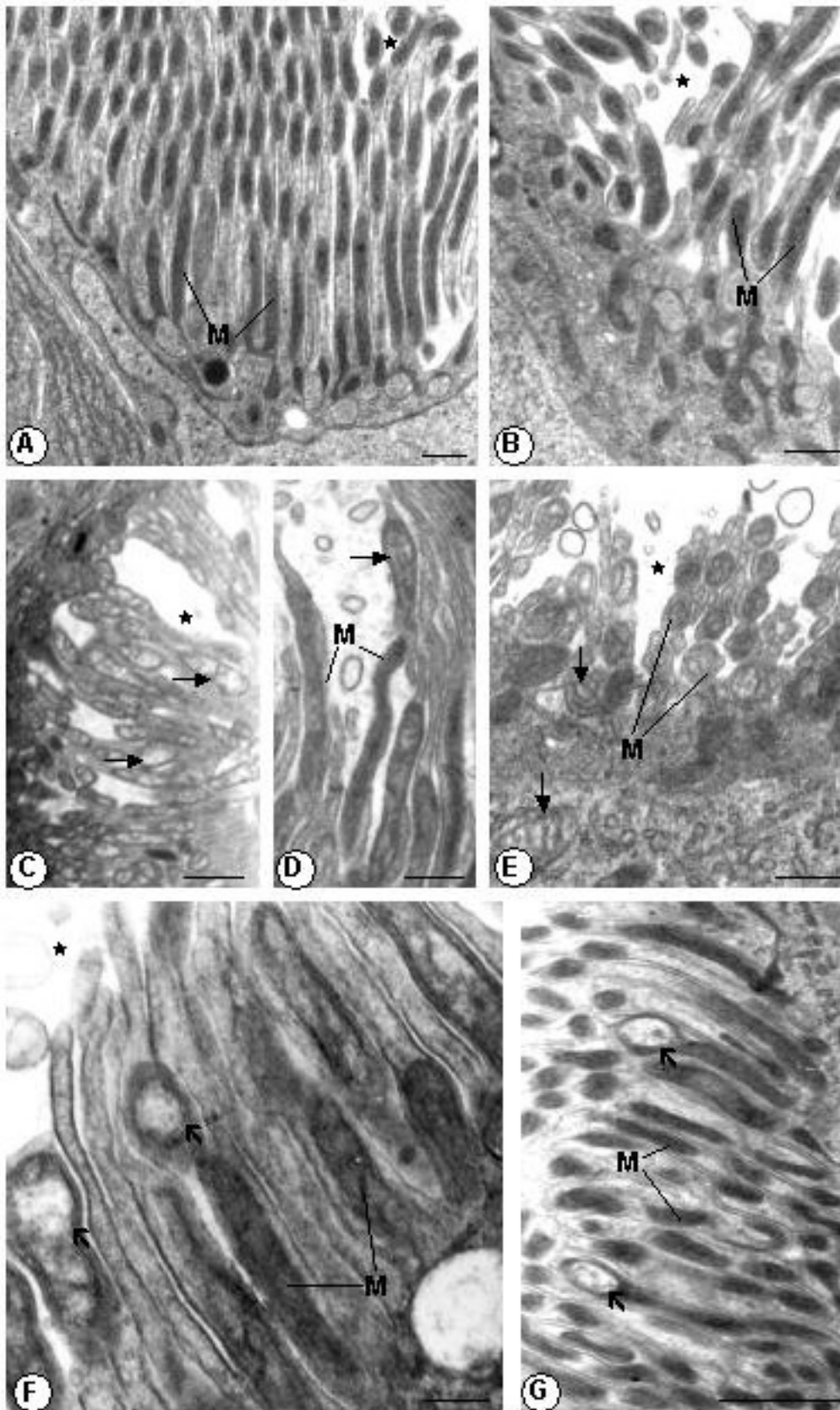


Figura 03

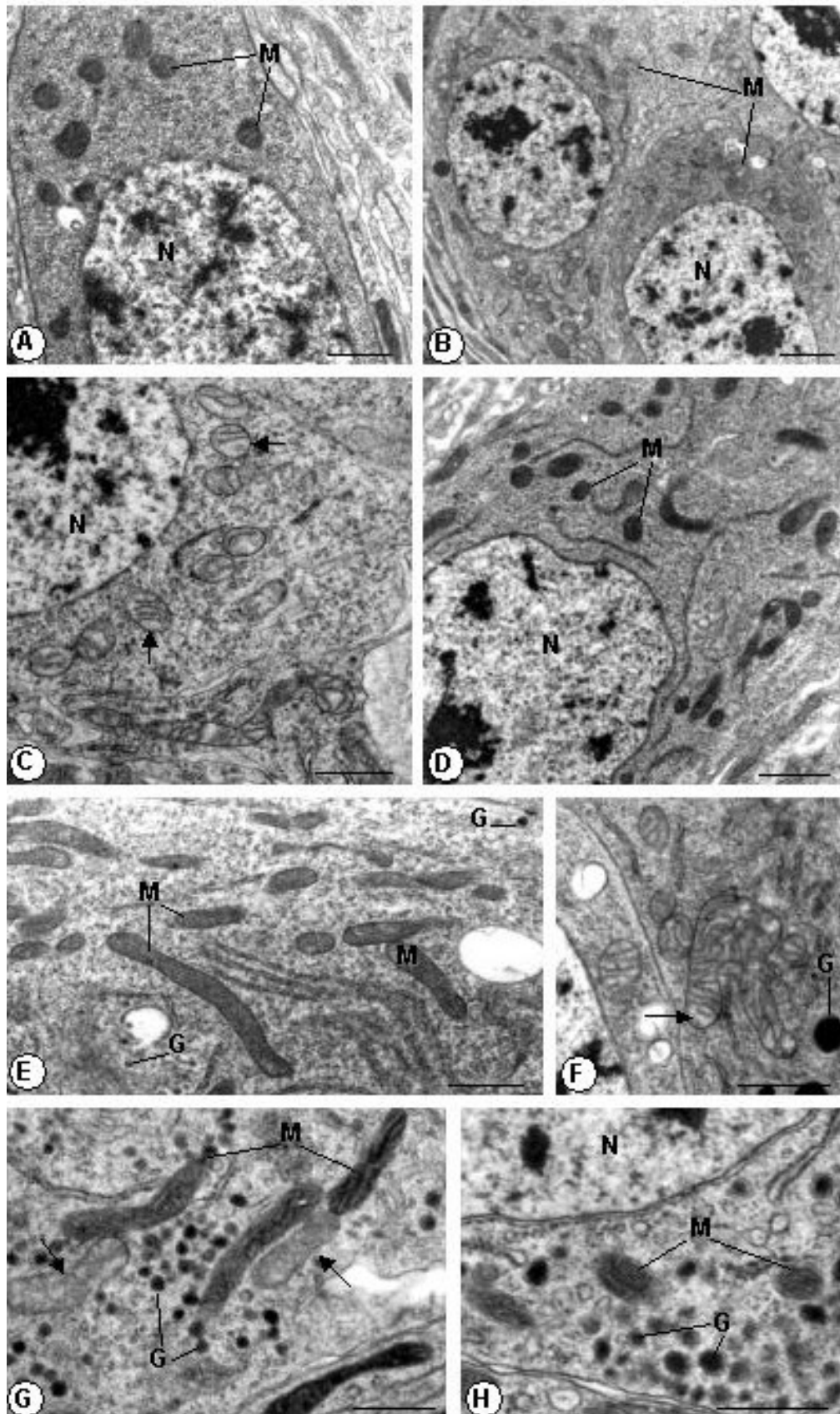


Figura 04

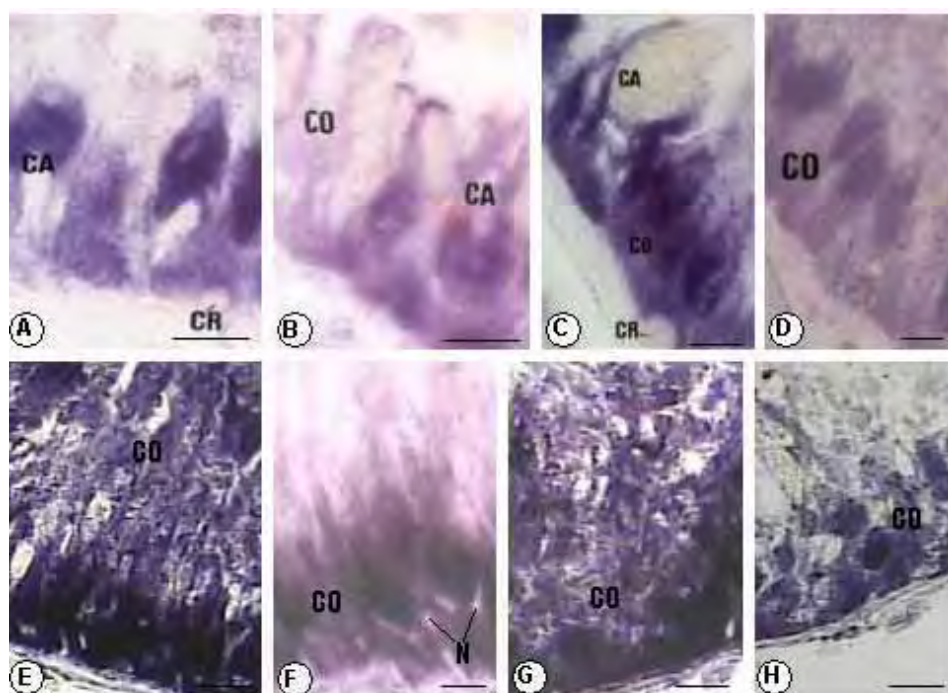


Fig.4- Detecção de atividade enzimática de NADH-TR e SDH no intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas (**A-D**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**E-H**). Célula colunar (CO); célula regenerativa (CR); célula caliciforme (CA); núcleo (N). **A)-** Região anterior. NADH-TR. Barra= 20µm. **B)-** Região anterior. SDH. Barra= 20µm. **C)-** Região posterior. NADH-TR. Barra= 20µm. **D)-** Região posterior. SDH. Barra= 10µm. **E)-** Região anterior. NADH-TR. Barra= 10µm. **F)-** Região anterior. SDH. Barra= 10 µm. **G)** Região posterior. NADH-TR. Barra= 10µm. **H)-** Região posterior. SDH. Barra= 10µm.

ARTIGO 8

“Células colunares do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera)”

A ser enviado para a revista *Journal of Invertebrate Pathology* como:
Pinheiro, D.O.; Ribeiro, A.F.; Terra, W.T.; Novelli, E.L.B.; Faine, L.A.; Galhardi, C.M.; Gregório, E.A. Midgut columnar cells of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera).

Resumo

Diatraea saccharalis, praga da cana-de-açúcar, tem sido controlada pela *Cotesia flavipes*; pouco se sabe sobre o efeito do parasitismo no intestino médio (IM) do hospedeiro. A célula colunar (CC) é responsável pelo processamento da dieta, secreção de enzimas digestivas e matriz peritrófica (MP), e pela absorção dos produtos finais da digestão. Este trabalho enfoca o efeito do endoparasitismo nas CC do IM de larvas de *D. saccharalis*. Fragmentos das regiões anterior e posterior do IM de larvas não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes* foram processados para análise em microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A quitina da MP foi visualizada em microscópio de fluorescência após marcação com aglutinina de germe de trigo-isocianato de fluoresceína (WGA-FITC). A atividade específica de amilase foi determinada em extratos das regiões do IM. Existe um aumento no número de vacúolos digestivos e peroxissomas na região anterior do IM de larvas parasitadas. O conteúdo de quitina da MP é maior na região posterior do IM, tanto em larvas de *D. saccharalis* parasitadas como não-parasitadas, sugerindo diferenças regionais na MP ao longo do IM; entretanto, a marcação com WGA-FITC está diminuída em larvas parasitadas. Não existe diferença significativa na atividade específica de amilase entre os extratos das regiões anterior e posterior do IM em larvas não-parasitadas; entretanto, em larvas parasitadas esta atividade está diminuída na região posterior do IM. Nossos resultados mostraram que endoparasitismo da broca da cana afeta a morfologia e atividade das CC relacionadas com as secreções da MP e amilase.

Palavras-chave: intestino médio, matriz peritrófica, parasitismo, amilase, ultra-estrutura, *Diatraea saccharalis*, *Cotesia flavipes*, WGA, célula colunar.

Abstract

Diatraea saccharalis, pest for the sugarcane crop, has been widely controlled by *Cotesia flavipes*; very little is known about the effect of the parasitism in the host midgut. The columnar cell (CC) is responsible for processing the diet, secretion of the digestive enzymes and the peritrophic matrix (PM), and for the uptake of the final digested product. This work study the effect of endoparasitism in the CC of the *D. saccharalis* larvae midgut. Fragments of the anterior and posterior midgut regions from parasitized and non-parasitized larvae were processed for transmission and scanning electron microscope analysis. The chitin of the PM was visualized under fluorescence microscope, after the labeling with fluorescein isothiocyanate-wheat germ agglutinin-(WGA-FITC). The specific amylase activity was determined in the midgut regions extracts. There is an increase in the number of digestive vacuoles and peroxisomes in the anterior midgut region of parasitized larvae. The chitin content of the PM is higher at the posterior region in both non-parasitized and parasitized *D. saccharalis* larvae, suggesting regional differences in the PM along the midgut; however, the WGA-FITC labeling is diminished in the parasitized larvae. There is no significant difference in the specific amylase activity between the anterior and posterior midgut extracts of non-parasitized larvae; however in the parasitized larvae this activity is diminished in the posterior midgut region. Our results showed that the endoparasitism of the sugarcane borer affect the morphology and activity of the CC related with the PM and amylase secretions.

Keywords: midgut, peritrophic matrix, parasitism, amylase, ultrastructure, *Diatraea saccharalis*, *Cotesia flavipes*, WGA, columnar cell

Introdução

O epitélio do intestino médio (IM) é composto principalmente por células colunares (CC). As CC são consideradas responsáveis pela secreção de enzimas digestivas, especialmente a amilase, além de atuarem na absorção dos produtos da digestão (Chapman, 1998; Lehane & Billingsley, 1996). Este tipo celular está presente ao longo de toda a extensão do IM de larva de Lepidoptera; entretanto, vários trabalhos sugerem que a distribuição, morfologia, morfometria e a função deste tipo celular sejam variáveis ao longo deste órgão, em diferentes espécies de Lepidoptera (Cioffi, 1979; Santos *et al.*, 1984; Pinheiro & Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2004). Santos *et al.* (1984), estudando *Erinnys ello*, evidenciam que a amilase e a tripsina são secretadas pela região anterior do IM para o espaço endoperitrófico, durante a passagem do bolo alimentar. Em *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999) a secreção de amilase apresenta rota de secreção semelhante à da tripsina na região anterior do IM, que pode ser correlacionada ao pH dessa região.

O epitélio do IM é recoberto internamente, na maioria dos insetos, por membrana acelular denominada de membrana ou matriz peritrófica (MP) (Chapman, 1998; Dow, 1986; Lehane & Billingsley, 1996). A MP é composta principalmente por quitina, um biopolímero linear de N-acetyl-D-glucosamina (Terra, 1996; Tellam *et al.*, 1999; Tellam & Eisemann, 2000; Hogenkamp *et al.*, 2005; Zimoch *et al.*, 2005), glicosaminoglicanas e proteínas (Tellam *et al.*, 1999; Terra, 2001; Wang & Granados, 2001). Embora impeça o contato direto do alimento com a bordadura estriada das CC, ela permite a passagem das enzimas digestivas em direção à luz intestinal e a absorção dos produtos resultantes da digestão, sendo posteriormente eliminada com as fezes (Tellam, 1996); também previne injúrias mecânicas às células do IM e parece dificultar ou impedir a entrada de microrganismos na hemocèle (Terra, 1988).

A composição e estrutura da MP têm sido extensivamente analisadas por estudos bioquímicos, moleculares e morfológicos, sendo enfatizados, principalmente, aspectos de sua formação e função nos diferentes insetos (Terra, 1990, 1996; Peters, 1992; Tellam, 1996; Terra & Ferreira, 1981; Santos *et al.*, 1984; Terra 2001, entre muitos outros). Em alguns destes estudos, a MP tem sido evidenciada pela afinidade da quitina, um dos seus principais componentes (Richards & Richards, 1977; Tellam & Eisemman, 2000; Wang & Granados, 2000), com lectina específica (WGA- wheat germ agglutinin) acoplada a fluorocromo (Peters & Latka, 1986). Em larvas de Lepidoptera a MP tem sido classificada como do Tipo I, isto é, seria secretada ao longo do IM (Richards &

Richards, 1977). Trabalhos recentes mostram que apenas as CC apresentam expressão do gene quitina-sintase que é responsável pela síntese de quitina da MP (Hogenkamp *et al.*, 2005; Zimoch *et al.*, 2005).

Diatraea saccharalis, praga da cultura canavieira, tem sido controlada pelo parasitóide larval *Cotesia flavipes*. Pouco se conhece sobre a morfologia do IM deste inseto, em larvas normais ou endoparasitadas. Sabe-se que existem diferenças ultra-estruturais das CC ao longo do IM de larvas *Diatraea saccharalis* (Pinheiro & Gregório, 2003); além disso, estudo morfométrico das células epiteliais de *D. saccharalis* endoparasitadas por *C. flavipes* mostrou que o endoparasitismo induz aumento citoplasmático e nuclear significativo nas CC da região posterior do IM (Pinheiro *et al.*, 2006). Assim, seria interessante verificar as possíveis repercussões morfo-funcionais do endoparasitismo nas CC do IM do inseto hospedeiro.

Material e Métodos

Obtenção dos insetos: Larvas de *D. saccharalis* no último instar foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da Usina da Barra Grande, Lençóis Paulista-SP e mantidas em dieta artificial. Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas para ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis*. As larvas não-parasitadas e após 6 dias de parasitismo foram dissecadas para retirada do IM.

Processamento em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): O IM não foi retirado do inseto, sendo apenas realizada incisão longitudinal para expor a superfície luminal; o material foi imediatamente fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3 (24h) e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% (2h) no mesmo tampão. A desidratação foi realizada com seqüência crescente de soluções de álcool etílico, sendo a secagem realizada por meio do ponto crítico em CPD 020 (Balzer Union), com CO₂ líquido. Os espécimes foram colados em suporte adequado e recobertos com camada de 20nm ouro em aparelho MED 010 (Balzer Union). A análise foi realizada em MEV-SEM 515 da Philips.

Processamento em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): Fragmentos do IM (regiões anterior e posterior) foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7.3 (24h), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (2h), desidratados com seqüência crescente de soluções de acetona e incluídos em Araldite. Os cortes ultrafinos foram contrastados e examinados em MET-CM100 da Philips.

Processamento em Microscopia Confocal (MC): Os IM foram fixados em solução de formalina tamponada 10% (24h), desidratados em sequência crescente de álcool etílico, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes de 5 µm foram desparafinizados e lavados em PBS (tampão fosfato salina) por 5 min. Para a visualização da membrana peritrófica, foi utilizado WGA- (aglutinina do gérmen de trigo), acoplado a fluorocromo (isocianato de fluoresceína-FITC). Para tornar a reação específica para quitina, usamos o WGA-FITC junto com a N-acetilglicosamina livre na incubação do material em câmara úmida escura (4°C), por cerca de 16h. Em seguida o material passou por lavagem em PBS sendo, posteriormente, montado em lâminas histológicas com Vecta-shield. Os materiais foram analisados em MC-LSM410 da Zeiss, com laser de 488 nm.

Determinação de Atividade Específica de Amilase: Fragmentos do IM (regiões anterior e posterior) foram pesados e colocados frascos contendo 1,25ml de tampão fosfato 0,1M pH 7.4, até totalizarem aproximadamente 0,05g; para isto, foram utilizados, no mínimo, 10 larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e 14 larvas endoparasitadas. Este procedimento foi realizado com cinco repetições, em cada grupo de insetos. A atividade específica de amilase foi expressa em Unidade Amilolítica-UA/mg de proteínas totais, para as diferentes regiões do IM em larvas não-parasitadas e parasitadas. Para determinação quantitativa da atividade da amilase, utilizou-se o método amiloclástico iodométrico (kit da Celm), com a leitura de absorbância em comprimento de onda de 640nm. Para a quantificação da concentração total de proteínas foi empregado o método do ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, da Pierce), com leitura de em comprimento de onda de 562nm. Os valores de atividade específica de amilase obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se análise de variância ANOVA e o teste de Tukey-Kramer, com nível de significância estipulado em 5%.

Resultados

Análise ultra-estrutural: Na *região anterior* do IM de larvas parasitadas, a superfície das CC, em MEV, apresenta projeções citoplasmáticas sendo liberadas para o lúmen intestinal (Figs. 1B-D), maiores que as projeções observadas nas larvas não-parasitadas (Fig. 1A); essas estruturas arredondadas apresentam morfologia variada, lisa ou com micro-projeções, algumas com interrupções da membrana também foram detectadas (Fig. 1B). “Crateras” na superfície intestinal também foram detectadas, algumas contendo projeção citoplasmática (Fig. 1D). As CC de larvas parasitadas, em MET (Figs. 2E-G) apresentam abundância de vacúolos digestivos com conteúdo heterogêneo

e algumas figuras do tipo mielina, e de peroxissomos de tamanhos variados e com cristalóide evidente, principalmente no citoplasma apical, onde o retículo endoplasmático liso é evidente, os complexos de Golgi são exuberantes e o retículo endoplasmático rugoso é desenvolvido (Figs. 2F-G); aspectos semelhantes são observados em larvas não-parasitadas (Figs. 2C, D), exceto a presença de peroxissomos. A liberação de pequenas vesículas pelas microvilosidades, interpretadas como secreção microapócrina, bem como a observação de estruturas membranosas vesiculares, de formas e tamanhos variados e com conteúdo elétron-lucente foi semelhante em larvas não-parasitadas (Figs. 2A, B) e parasitadas (Fig. 2E). Na *região posterior* do IM de larvas parasitadas, a superfície das CC, em MEV, exhibe projeções citoplasmáticas de tamanho e morfologia variada (Figs. 1F-H), na maioria das vezes mais volumosas do que as observadas em larvas não-parasitadas (Fig. E); as projeções em larvas parasitadas exibem superfície lisa ou com microvilosidades (Figs. 1F-H), algumas com interrupções da membrana plasmática (Fig. 1F). As CC de larvas parasitadas (Fig. 3C), em MET, apresentam citoplasma apical com morfologia geral semelhante ao de larvas não-parasitadas (Fig. 3A). O labirinto basal e as organelas presentes no citoplasma basal também não apresentam variações ultra-estruturais em larvas não-parasitadas e parasitadas, tanto na região anterior como na posterior (Figs. 3B,D) do IM.

Análise ao Microscópio Confocal: A MP de larvas não-parasitadas exhibe marcação pelo WGA com intensidade crescente da região anterior (Fig. 4A) para a posterior (Fig. 4B) do IM. Em larvas endoparasitadas, existe uma diminuição na intensidade da marcação por WGA, mais evidente na região posterior do IM (Figs. 4C,D). Na bordadura estriada das CC houve marcação positiva para WGA em toda a extensão do IM, tanto em larvas não-parasitadas (Figs. 4A,B), como na vigência do endoparasitismo (Figs. 4C,D).

Atividade específica de amilase: A atividade específica de amilase no IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes* está representada na Figura 5. Em larvas não-parasitadas não existe diferença significativa nesta atividade enzimática nas regiões anterior e posterior do IM; já em larvas parasitadas, a atividade específica da amilase na região posterior mostrou-se significativamente diminuída em relação à região anterior. Comparando-se a atividade específica da amilase dentro da mesma região, em larvas não-parasitadas e parasitadas, observamos diminuição significativa nas endoparasitadas somente na região posterior.

Discussão

O desenvolvimento do parasitóide *C. flavipes* dentro da hemocele da broca da cana provoca alteração nas CC do IM, que podem ser detectadas por análise ultra-estrutural. Quando analisamos a superfície epitelial das CC em MEV, observamos que o parasitismo induz modificações na morfologia das projeções citoplasmáticas que se desprendem das CC em direção ao lúmen intestinal. Estas projeções são estruturas comumente observadas no epitélio do IM de larvas de insetos (Lello *et al.* 1984; Ryerse *et al.* 1992; Cristofolletti *et al.* 2001; Levy *et al.* 2004; Levy, 2005) e já haviam sido descritas em *D. saccharalis*, onde também foi mostrado aumento no seu número ao longo do IM (Pinheiro & Gregório, 2003). Embora as projeções das CC tenham sido consideradas manifestações morfológicas decorrentes de secreção apócrina (Anderson & Harvey, 1966), outros trabalhos correlacionam as projeções com o processo de degeneração celular, que ocorreria tanto entre as mudas sofridas pelos insetos quanto na metamorfose (Terra & Ferreira, 1994; Cruz-Landim *et al.*, 1996). Em larvas de *D. saccharalis* endoparasitadas, a superfície das CC apresentam projeções muitas vezes aumentadas em tamanho, dando a impressão de que pedaços consideráveis do citoplasma apical das CC estão sendo liberados, cujo significado funcional ainda não foi esclarecido, uma vez que as larvas examinadas não estavam em metamorfose ou próximas a muda. Outra observação interessante foi a detecção de “crateras” na superfície da CC e também interrupções da membrana plasmática das projeções citoplasmáticas. Poucos trabalhos mostram modificações das CC, alguns em decorrência da adesão de endoparasitas no epitélio do trato digestivo de insetos (Romeiro *et al.*, 2003), que não é nosso caso, e outros mostrando aspectos de lesão nas CC em decorrência da infecção viral no IM de insetos (Matos *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2002; Levy, 2005). Os trabalhos de Matos *et al.* (1999) e de Brooks *et al.* (2002) não abordam aspectos ultra-estruturais de modificações na superfície celular, restringindo-se a avaliar o desenvolvimento viral dentro da CC; já Levy (2005) mostra aspectos semelhantes aos nossos achados de modificações na superfície das projeções citoplasmáticas, além de aumento no número destas projeções em decorrência da infecção viral, que foram associadas com a liberação de porções celulares para eliminação de carga viral.

Não observamos modificações na organização sub-celular do citoplasma das CC do IM em larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes*, exceto para presença de inúmeros peroxissomos e vacúolos digestivos nas larvas parasitadas;

essas estruturas foram mais freqüentes no citoplasma apical da região anterior do IM, corroborando a idéia de funcionalidade distinta dependente da região do trato digestivo de *D. saccharalis* (Pinheiro & Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003) como observado também em outros Lepidoptera (Cioffi, 1979; Santos *et al.*, 1984; Jordão *et al.*, 1999). Estudos anteriores do IM de *D. saccharalis* endoparasitadas mostraram que existe ainda aumento na quantidade de esferitos e maior intensidade de lesões mitocondriais nas CC da região anterior do IM (Pinheiro *et al.*, em elaboração- Artigo 5 e 7), corroborando a idéia de que a região anterior deve ser a mais afetada pelo parasitismo. A descrição de aumento de peroxissomos e de vacúolos digestivos em CC de Lepidoptera foi relacionada com infecção das larvas por baculovírus (Granados & Lawler, 1981; Levy, 2005), sem que os autores discutissem o significado funcional do aumento de peroxissomos, mas relacionaram os vacúolos digestivos com a degradação do patógeno.

Não observamos diferenças na morfologia de vesículas secretoras no citoplasma apical das CC, quer entre a região anterior e posterior de larvas não-parasitadas, quer em decorrência do parasitismo. Estas vesículas têm sido relacionadas com o processo de secreção de enzimas digestivas (Terra & Ferreira, 1994; Jordão *et al.*, 1999; Cristofolletti *et al.*, 2001). O processo de secreção de enzimas digestivas no IM de insetos é bastante variado, dependendo do inseto e do tipo de enzima. Santos *et al.* (1984), trabalhando com larvas de *E. ello* (Lepidoptera), sugeriram que vesículas contendo tripsina e amilase seriam liberadas pela mesma rota, através das membranas das microvilosidades, quer por brotamento lateral ou na extremidade, quer com desprendimento de fragmentos das próprias microvilosidades contendo as vesículas. Espinoza-Fuentes *et al.* (1987) observaram, em *Musca domestica* (Diptera), que estas microvesículas liberadas pelas CC do IM seriam responsáveis pela secreção de tripsina. Cristofolletti *et al.* (2001), estudando larvas de *Tenebrio molitor* notaram liberação de amilase por secreção apócrina, enquanto a tripsina seria liberada por exocitose. Entretanto, alguns trabalhos contestam o papel destas projeções na secreção de enzimas, mostrando que a atividade das enzimas digestivas no IM era reduzida mesmo com aumento na quantidade de projeções apicais ao longo do IM, em *Blatella germanica* (Day & Powning, 1949 apud Jimenez & Gilliam, 1990). Em nosso material, embora haja aumento no número de projeções na região posterior em larvas não-parasitadas, essa região não mostra diferença significativa na atividade enzimática de amilase, excluindo a participação destas estruturas na secreção desta enzima.

Já em larvas de *D. saccharalis* endoparasitadas, observamos diminuição

significativa de atividade específica de amilase ao longo do IM, sendo que a região posterior é a mais afetada pelo endoparasitismo. O endoparasitismo acarreta um processo semelhante à anorexia do hospedeiro, diminuindo o aporte de nutrientes, que serão utilizados para a manutenção do hospedeiro e crescimento dos endoparasitas (Thompson *et al.*, 2005; Thompson & Redak, 2005). Hill & Orchard (2005), estudando adultos de *Locusta migratoria*, observaram que existe diminuição da atividade da amilase no IM em situações de restrição alimentar, comparando-se com os insetos alimentados. A diminuição de atividade de amilase também foi observada na vigência de infecção viral, em larvas de *Bombyx mori* (Mahesha *et al.*, 2002) e de *Helicoperva armigera* (Kumar & Murugan, 1999). Uma vez que na oviposição da *C. flavipes* ocorre inoculação de partículas virais (Edwards & Weaver, 2001), não podemos descartar a possibilidade desta infecção viral estar acarretando a diminuição desta atividade enzimática.

Não podemos excluir que a diminuição da atividade específica de amilase, observada na região posterior em larvas parasitadas, possa ser decorrente da alteração hormonal no inseto hospedeiro, especialmente de neuropeptídeos, induzida pelo parasitóide. Em situação de endoparasitismo, existe alteração dos níveis de neuropeptídeos no hospedeiro, necessários para completar o desenvolvimento do endoparasitóide (Edwards & Weaver, 2001). Sabe-se que incubação *in vitro* de neuropeptídeos no IM de larvas de Lepidoptera afeta a secreção de amilase pelo IM, aumentando ou diminuindo dependendo do hormônio (Harshini *et al.*, 2002a, b).

Embora houvesse uma queda pronunciada da atividade específica de amilase na região posterior do IM de larvas parasitadas em relação a esta região de larvas não-parasitadas, bem como em relação à região anterior de larvas parasitadas, não conseguimos identificar diferenças na quantidade e/ou morfologia das vesículas secretoras, entre estes insetos; também não conseguimos observar uma variação na secreção microapócrina nestas larvas. Sendo assim, outras abordagens metodológicas deverão ser utilizadas, visando identificar se a alteração seria de síntese/secreção ou ativação da amilase.

Outra função importante atribuída às CC do IM de larva de Lepidoptera é a produção e secreção dos constituintes da MP, especialmente da quitina (Tellam, 1996; Terra, 1996; Zimoch *et al.*, 2005; Hogenkamp *et al.*, 2005). Assim sendo, também abordamos o efeito do endoparasitismo na MP ao longo do IM de larvas de *D. saccharalis*, através de sua marcação da quitina com WGA-FITC. A MP em larvas não-

parasitadas mostra variabilidade de intensidade de reação ao WGA-FITC, ao longo do IM; a MP é delicada na região anterior, aumentando em espessura para a região posterior, como já descrito em outros insetos (Harper & Hopkins, 1997; Harper & Granados, 1999; Hopkins & Harper, 2001). Como a secreção dos constituintes da MP em larva de Lepidoptera acontece ao longo do IM dos insetos (Santos *et al.*, 1984; Terra, 1996), o acúmulo destes materiais ao redor do bolo alimentar, para eliminação com as fezes, poderia explicar o seu espessamento na região posterior do IM. Entretanto, como também detectamos uma maior intensidade de reação positiva na borda estriada, da região anterior para a posterior, poderia também estar havendo maior secreção de quitina pelas células desta última região. Precusores de quitina concentram-se por entre microvilosidades apicais, para posterior polimerização (Harper & Hopkins, 1997; Harper & Granados, 1999; Hopkins & Harper, 2001; Terra, 2001), o que explica a marcação por WGA na bordadura estriada das CC de *D. saccharalis*.

O endoparasitismo da broca da cana parece afetar a produção/polimerização de quitina da MP, uma vez que detectamos diminuição de marcação pelo WGA nas larvas parasitadas, em ambas as regiões do IM. Material membranoso vesicular, liberados a partir da membrana plasmática das microvilosidades, seria solubilizado no espaço ectoperitrófico e incorporado à MP, auxiliando assim a sua formação, como descrito por Jordão *et al.* (1999) em larvas de *S. frugiperda*. Em *D. saccharalis*, o acúmulo destes materiais por entre as microvilosidades ocorre em toda a extensão do IM, sem diferenças ultra-estruturais perceptíveis em larvas parasitadas e não-parasitadas. Uma vez que a MP delimita compartimentos que são importantes para a fisiologia da digestão em larvas de Lepidoptera, é compreensível que o endoparasitismo não provoque grandes modificação nesta estrutura, como estratégia de sobrevivência do parasitóide e de seu hospedeiro.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Entomológico da Usina Barra Grande, Lençóis Paulista-SP, Brasil, pelo fornecimento dos insetos. Agradecemos também aos técnicos **Maria Helena Moreno, Claudete dos Santos Tardivo, Márcio Valentim Cruz e Waldir Caldeira** pelo auxílio no processamento técnico. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP.

Referências Bibliográficas

- Anderson, E., Harvey, W.R., 1966. Active transport by the *Cecropia* midgut: ii. fine structure of the midgut epithelium. *J. Cell Biol.*, 31, 107-134.
- Brooks, E.M., Gordon, K.H.J., Dorrian, S.J., Hines, E.R., Hanzlik, T.N., 2002. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). *J. Invertebr. Pathol.*, 80, 97-111.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. Harvard University Press, Cambridge.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: structure and function*. Harvard University Press, Cambridge.
- Cioffi, M., 1979. The morphology, fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell*. 11, 467-479.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.T., 2001. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.*, 47, 143-115.
- Cruz-Landim, C, Silva-de-Moraes, R.L.M., Serrão, J.E., 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J. Comp. Biol.*, 1, 29-40.
- Dow, J.A.T., 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-238.
- Edwards, J.P., Weaver, R.J., 2001. *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. The Cromwell Press, Trowbridge.
- Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1987. Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.*, 17, 819-827.
- Granados, R.R., Lawler, K.A., 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108, .297-308.
- Harper, M.S., Granados, R.R., 1999. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with na investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue Cell*, 31, 202-211.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L., 1997. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell*, 29, 463-475.
- Harshini, S., Nachman, R.J., Sreekumar, S., 2002a. Inhibition of digestive enzyme release by neuropeptides in larvae of *Opisina arenosella* (Lepidoptera: Cryptophasidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 132, 353-358.

- Harshini, S., Nachman, R.J., Sreekumar, S., 2002b. In vitro release of digestive enzymes by FMRF amide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect *Opisina arenosella* (Walk.). *Peptides*, 23, 1759-1763.
- Hill, S.R., Orchard, I., 2005. *In vitro* analysis of the digestive enzymes amylase and α -glucosidase in the midguts of *Locusta migratoria* L. in response to myosuppressin, SchistoFLRFamide. *J. Insect Physiol.*, 51, 1-9.
- Hogenkamp, D.G., Arakane, Y., Zimoch, L., Merzendorfer, H., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Kanost, M.R., Specht, C.A., Muthukrishnan, S., 2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 35, 529-540.
- Hopkins, T.L., Harper, M.S., 2001. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary Wheat Germ Agglutinin on their formation and structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47, 100-109.
- Jimenez, D.R., Gilliam, M., 1990. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell Tissue Res.*, 261, 431-443.
- Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45, 29-37.
- Kumar, N.S., Murugan, K., 1999. Impact of nuclear polyedrosis virus and azadirachtin on the digestive enzyme activity and biochemical composition of the gut of *Helicoverpa armigera* Hubner (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Tropical Agricul. Res.*, 11, 393-407.
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F., 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London.
- Lello, E., Hanton, W.K., Bishoff, S.T., Misch, D.W., 1984. Histopathological effects of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): Low doses compared with fasting. *J. Invertebr. Pathol.*, 43, 169-181.
- Levy, S.M., 2005. Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovirus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio. Botucatu/SP. Tese - Instituto de Biociências, UNESP. 172p.
- Levy, S.M., Falleiros, A.M.F., Gregório, E.A., Arrebola, N.R., Toledo, L.A., 2004. The

- larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.*, 64, 1-8.
- Mahesha, H.B., Thejaswini, P.H., Honnaiah, S., 2002. Effect of cytoplasmic polyedrosis on amylase and succinate dehydrogenase activity levels in silkworm *Bombyx mori* L. *Entomol.*, 27, 269-79.
- Matos, T.G.T., Giuliano, L.G., Ribeiro, B.M., Bão, S.N., 1999. Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus. *Int. J. Insect Morph. Embriol.*, 28, 195-201.
- Peters, W., 1992. Peritrophic membranes. *Zoophysiol. Series*, 30, 1-258.
- Peters, W., Latka, I., 1986. Electron microscopic localization of chitin using colloidal gold labelled with wheat germ agglutinin. *Histochemistry*, 84, 155-160.
- Pinheiro, D.O., Gregório, E.A., 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microsc.* 12, 27-30.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Gregório, E.A., 2006. Morphometry of the *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) midgut epithelium parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). *J. Invertebr. Pathol.* In press.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Quagio-Grassiotto, I., Gregório, E.A., 2003. Morphometric Study of the Midgut Epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Neotrop. Entomol.* 32, 453-459.
- Richards, A.G., Richards, P.A., 1977. The peritrophic membranes of insect. *Rev. Entomol.*, 22, 431-437.
- Romeiro, A., Leal, L.H.M., Souza, W.D.E., Attias, M., 2003. Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygacidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 82, 41-49.
- Ryerse, J.S., Pursell, J.P., Sammon R.D., Lavrix, P.B., 1992. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue Cell*, 24, 751-771.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.* 237, 565-574.
- Tellam, R.L., 1996. The peritrophic matrix. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, pp. 86-114.
- Tellam, R.L., Eisemann, C., 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic

- matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. Insect Biochem. Mol. Biol., 30, 1189-1201.
- Tellam, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P., 1999. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochem. Mol. Biol., 29, 87-101.
- Terra, W.R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. Braz. J. Med. Biol. Res., 21, 675-734.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insect. An. Rev. Entomol., 35, 181-200.
- Terra, W.R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. J. Braz. Ass. Adv. Sci., 48, 317-324.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch. Insect Biochem. Physiol., 47, 47-61.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1981. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved *Rhynchosciara*. J. Insect Physiol., 27, 325-331.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol., 109, 1-62.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., 2005. Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. J. Comp. Physiol. A. 191, 909-923.
- Thompson, S.N., Redak, R.A., Wang, L.-W., 2005. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. J. Exp. Biol. 208, 611-623.
- Wang, P., Granados, R.R., 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. Insect Biochem. Mol. Biol., 30, 135-143.
- Wang, P., Granados, R.R., 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. Arch. Insect Biochem. Physiol., 47, 110-118.
- Zimoch, L., Hogenkamp, D.G., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., 2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Molec. Biol., 35, 515-527.

Legenda das Figuras

Figura 1- Ultra-estrutura da superfície das células colunares do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (**A, E**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**B-D, F-H**). Região anterior (**A-D**); região posterior (**E-H**). Projeções citoplasmáticas (P), microvilosidades (m), “cratera” (C), interrupção de membrana (seta), membrana peritrófica (MP), transição para o intestino posterior (IP). Barras = 25µm.

Figura 2- Ultra-estrutura da célula colunar da região anterior do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (**A-D**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**E-G**). Mitocôndria (M), lúmen intestinal (L), material membranoso (seta), vesículas (v) sendo liberadas pelas microvilosidades, complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL) e rugoso (RER), gota lipídica (Li), peroxissomo (P), vacúolo digestivo (vd). Barras=1µm.

Figura 3- Ultra-estrutura da célula colunar da região posterior do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (**A-B**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**C-D**). Labirinto basal (b), mitocôndria (M), lúmen intestinal (L), complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL) e rugoso (RER), corpo multivesicular (*), vacúolo digestivo (vd), glicogêneo (G). Barra = 0,5µm.

Figura 4- Corte histológico do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas (**A-B**) e parasitadas pela *C. flavipes* (**C-D**) submetido a incubação em WGA-FITC. Região anterior (**A,C**) e posterior (**B,D**) do intestino médio. Membrana peritrófica (MP), espaço ecto-peritrófico (EC), espaço endo-peritrófico (EN), reação WGA⁺ na bordadura estriada (seta), epitélio intestinal (E). **A-B** Barras=25µm. **C-D** Barras=50µm.

FIGURA 01

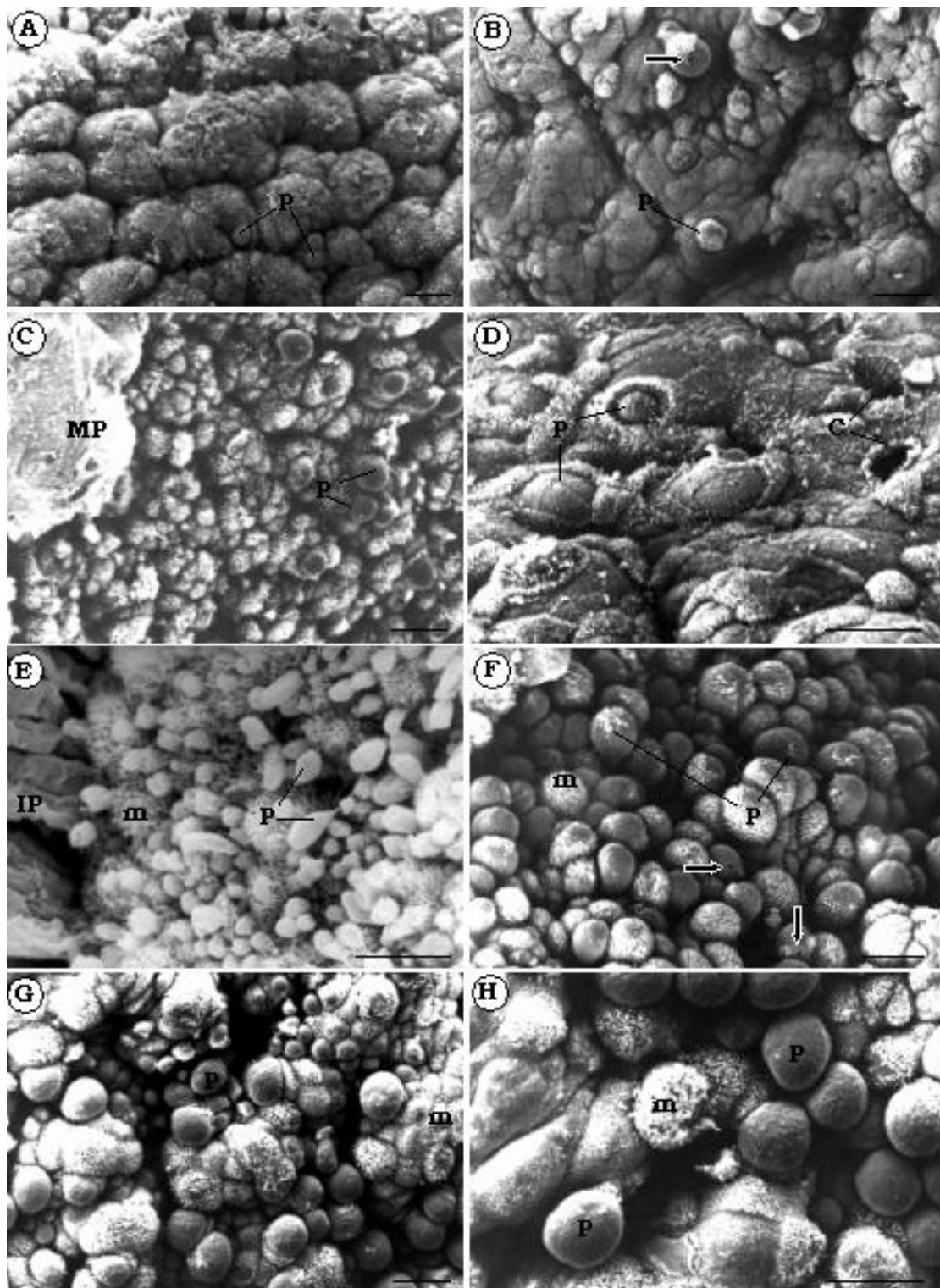


FIGURA 02

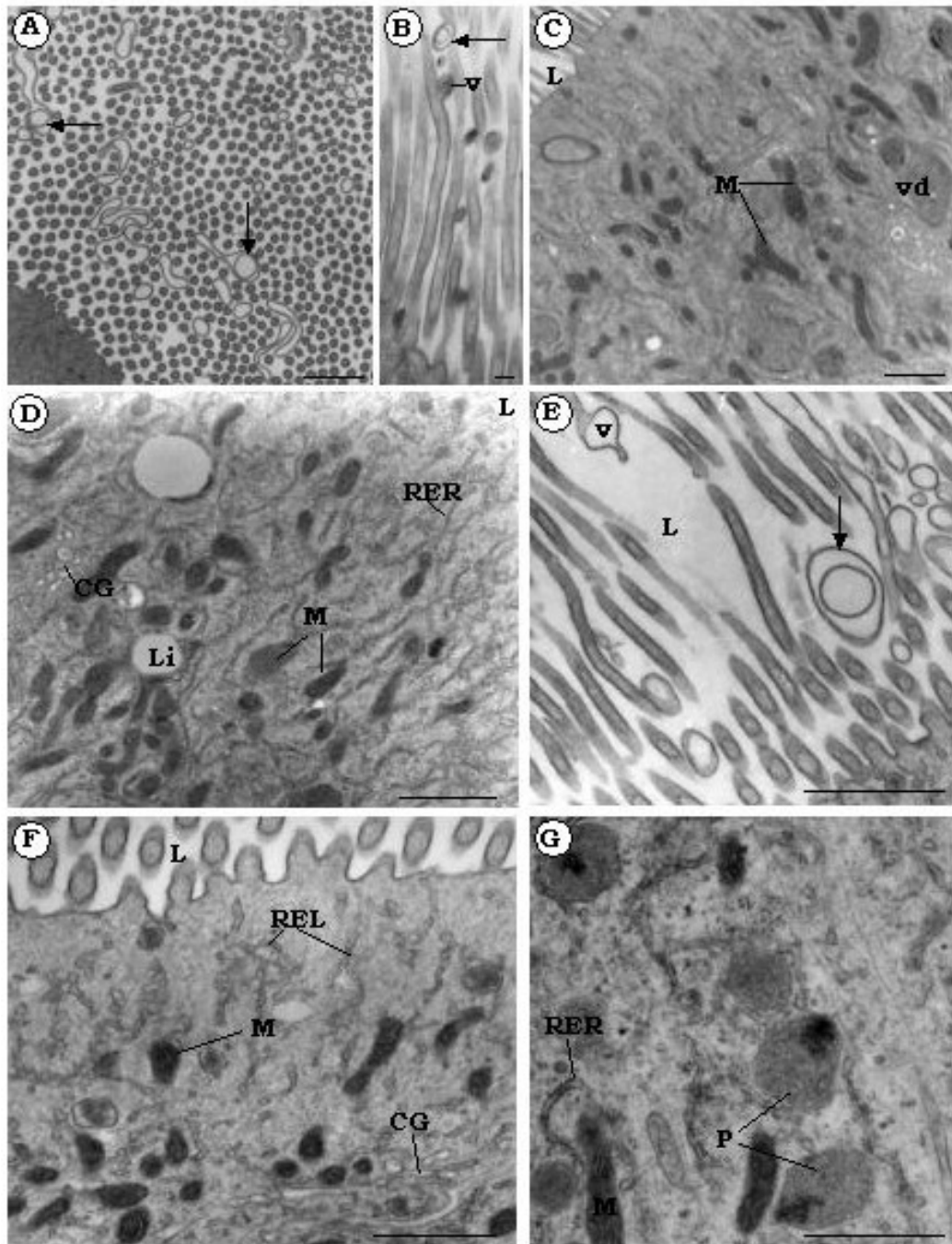


FIGURA 03

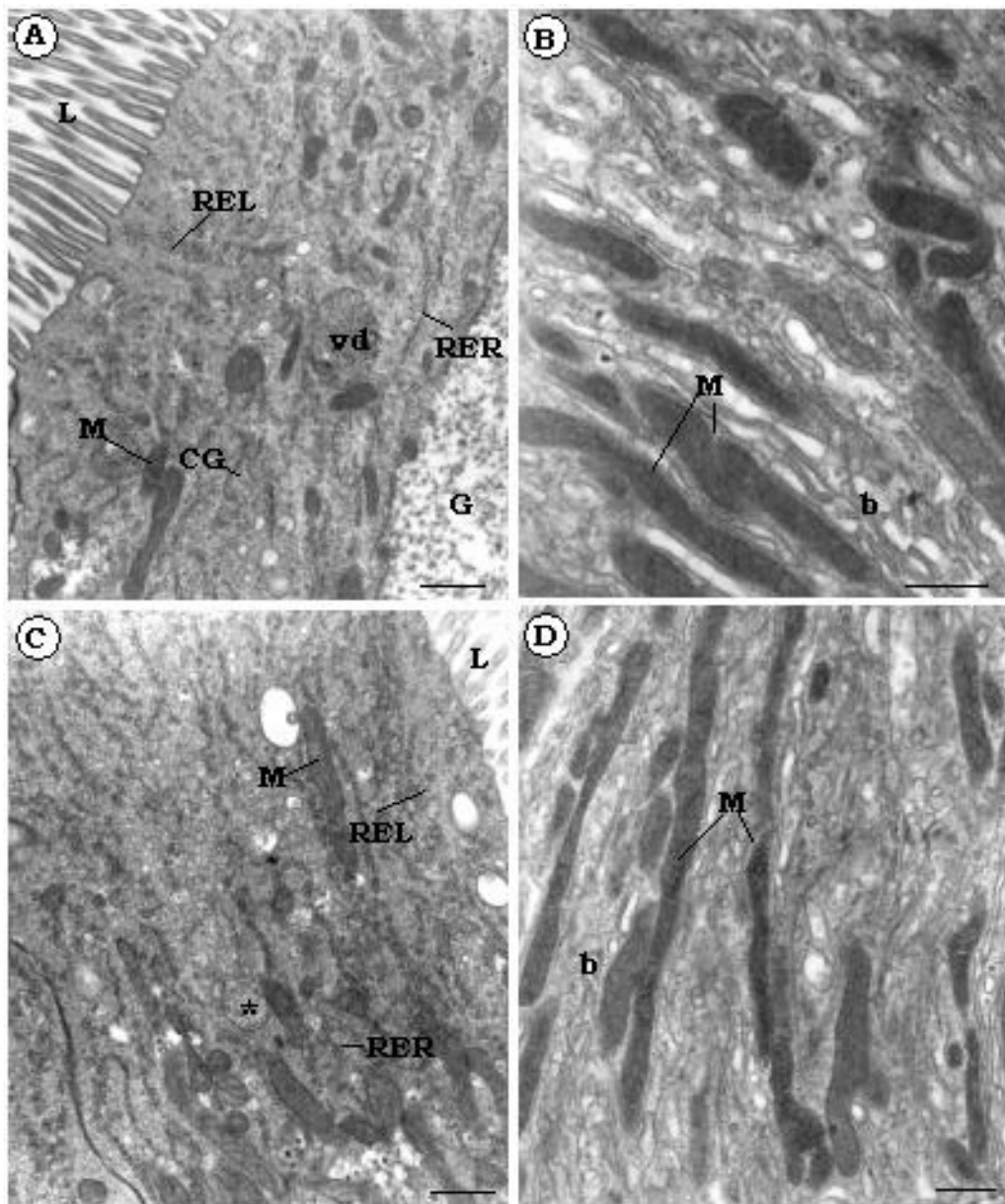
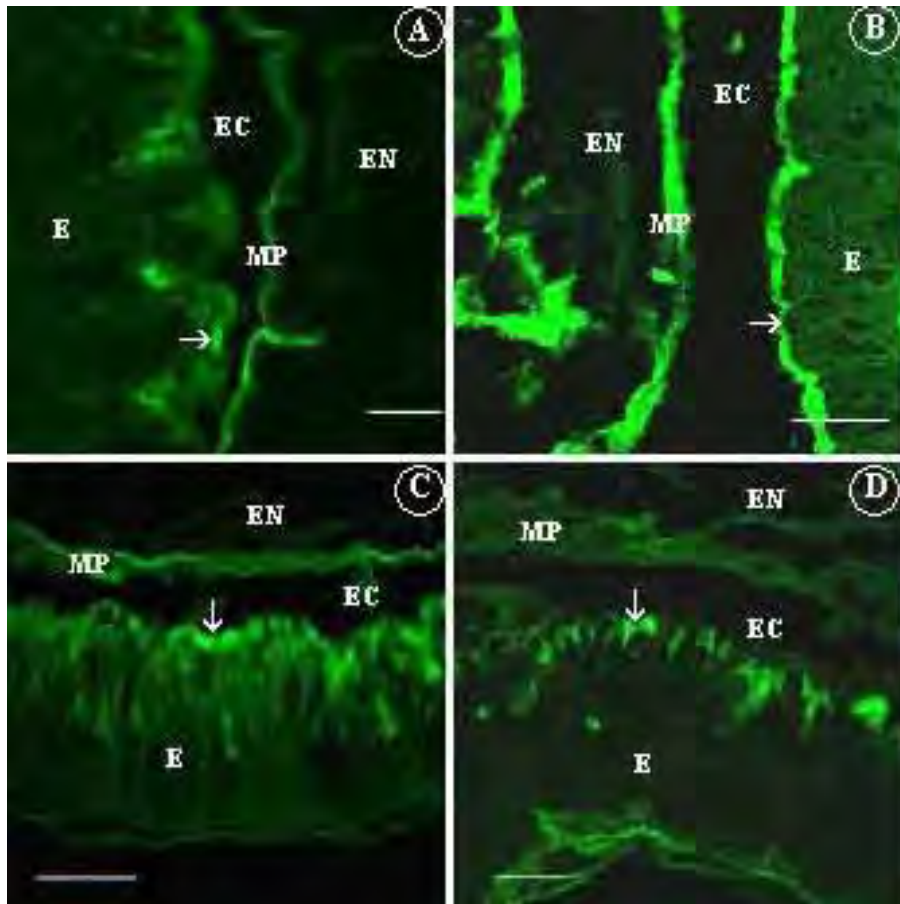


FIGURA 04



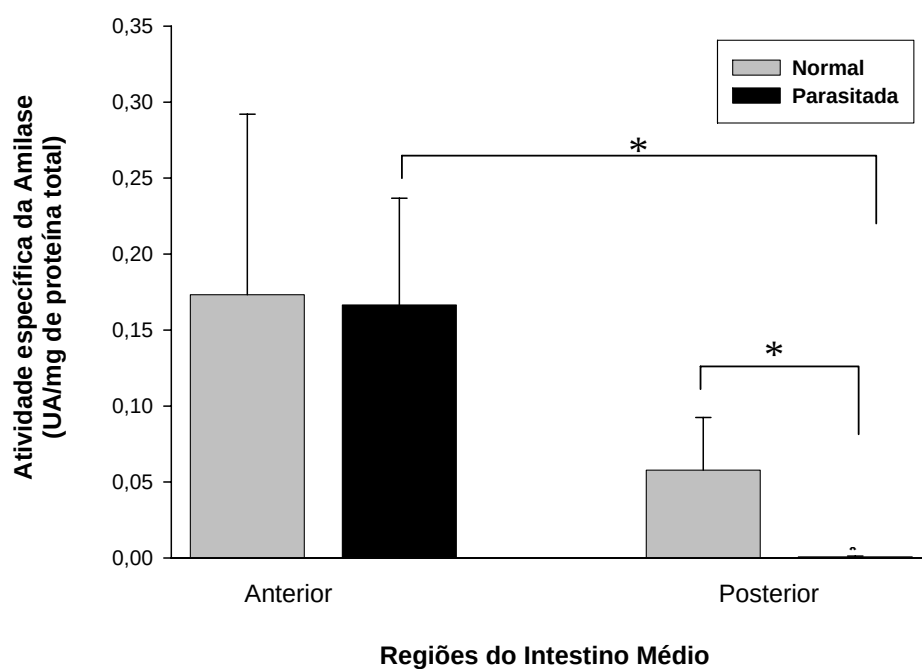


Figura 5- Atividade específica da amilase nas regiões anterior e posterior do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas (* $p < 0,05$).

Artigo 9

“Óxido nítrico no intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitadas pela *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera)”

Observação: este trabalho será ainda complementado antes de ser enviado para publicação com a localização da enzima óxido nítrico sintase no intestino médio dos insetos estudados (material já processado).

“Pinheiro, D.O.; Faraldo, A.C.; Guimarães, S.; Gregório, E.A. Nitric oxide in the midgut of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). Journal of Invertebrate Pathology”.

Resumo

A broca da cana, *Diatraea saccharalis*, afeta a cultura da cana de açúcar. Esta praga tem sido combatida pelo endoparasitóide *Cotesia flavipes*; pouco se sabe sobre o efeito do parasitismo no intestino médio (IM) do inseto hospedeiro. O óxido nítrico (NO) tem sido apontado como molécula citotóxica e sinalizadora em diversos processos fisiológicos. O objetivo desse trabalho foi quantificar os níveis de NO em extrato de IM em larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *C. flavipes*. Fragmentos das regiões anterior e posterior do IM foram processados para determinação dos níveis de NO com base no reagente de Griess e avaliada pela concentração do íon nitrito. Existe produção basal de NO em larvas não-parasitadas que não difere entre as duas regiões examinadas. O mesmo padrão foi observado em larvas parasitadas. Em larvas parasitadas existe aumento significativo na produção de NO, semelhante nas regiões anterior e posterior do IM. Nossos resultados sugerem que embora o endoparasita *C. flavipes* esteja crescendo na hemocela do inseto hospedeiro, o mesmo não afeta o IM de maneira direta; o desenvolvimento do endoparasita no inseto hospedeiro deve afetar a função do IM, que age como uma barreira efetiva contra a entrada de patógenos pela alimentação.

Palavras-Chave: Endoparasitismo, broca da cana, óxido nítrico, intestino médio, Lepidoptera, Hymenoptera

Abstract

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, affects the culture and industrial use of the sugarcane. Although the sugarcane borer has been widely controlled by the endoparasitoid *Cotesia flavipes*, very little is known about the effect of the parasitism on the host organs, including the midgut. The nitric oxide (NO) has been considered cytotoxic substance and act as a signaling molecule in several physiologic process. This work aims to determine NO levels produced in the midgut of *D. saccharalis* non-parasitized and parasitized by *C. flavipes*. The midgut fragments (anterior and posterior region) of both non-parasitized and parasitized larvae were processed to determine NO production, using Griess's reagent by measuring the nitrite ion concentration. NO basal production in non-parasitized larvae showed no significant difference between anterior and posterior midgut region, as well as observed in the parasitized larvae. Our results suggest that the endoparasite development in the host hemocoel may provide modifications in the host midgut, witch act as an effective barrier protecting the insects against the pathogen invasion during the alimentation.

Keywords: Endoparasitism, sugarcane borer, nitric oxide, midgut, Lepidoptera, Hymenoptera

Introdução

Os insetos protegem-se contra agentes patogênicos produzindo moléculas ou reações celulares que combatem invasores, porém com estratégias diferentes das observadas em vertebrados (Gupta, 1991). O arsenal defensivo dos insetos é composto por barreiras estruturais passivas e por mecanismos de defesas ativos, mediados por células e moléculas. Dentre as barreiras físicas temos o exoesqueleto, as barreiras do trato digestivo e respiratório; já o sistema de defesa ativo compreende cascata de resposta, principalmente da hemolinfa (Dunn, 1986). Essas respostas imunes inatas dos insetos, que inclui respostas humorais com a ativação de cascata proteolítica, dão início a muitos eventos, incluindo a produção de óxido nítrico (NO).

O NO têm sido apontado como sendo molécula citotóxica, capaz de destruir células tumorais e patógenos, e molécula sinalizadora em diversos processos fisiológicos (Colasanti e Venturini, 1998; Nappi *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Foley e O'Farrel, 2003; Faraldo *et al.*, 2004, 2005). A síntese da molécula de NO pela NO sintase (NOS) ocorre a partir da L-arginina. Em invertebrados, muitos estudos têm sido feitos relacionando a produção de NO com os efeitos citotóxicos contra patógenos (Nappi *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Foley e O'Farrel, 2003). Poucos são os estudos sobre a produção dessa molécula em órgãos de insetos, incluindo sua produção em neurônios (Haase *et al.*, 2003) e especialmente em hemolinfa (Weiske e Wiesner, 1999; Nappi *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, 2001; Foley e O'Farrel, 2003; Faraldo *et al.*, 2004, 2005). O aumento da produção de NO em hemócitos de insetos tem sido correlacionado com a resposta contra agentes estranhos (Weiske e Wiesner, 1999; Whitten *et al.*, 2001; Faraldo *et al.*, 2005), tendo sido detectado o aumento da produção de NO em hemócitos de duas espécies de *Drosophila* durante o endoparasitismo da vespa *Leptonina bouleari* (Nappi *et al.*, 2000).

Os trabalhos que descrevem a produção de NO no trato alimentar, além de escassos, enfocam principalmente insetos hematófagos (Dimopoulos *et al.*, 1998; Luckhart *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 2003; Herrera-Ortiz, *et al.*, 2004; Vodovotz *et al.*, 2004; Azambuja *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005).

Vários são os estudos, em diferentes Ordens de insetos, mostrando a importância do intestino médio (IM) na absorção de alimentos, troca de íons e entrada de inseticidas, patógenos e toxinas (Santos *et al.*, 1984; Lehane e Billingsley, 1996).

Diatraea saccharalis é uma das mais sérias pragas da cultura canavieira, afetando direta e indiretamente o processo de produção de açúcar e álcool. Para o controle desse inseto na cultura canavieira utiliza-se, com sucesso, o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Rossi e Fowler, 2003). Trabalhos preliminares mostraram que o IM de *D. saccharalis* é constituído por duas regiões morfo-funcionais distintas, anterior e posterior (Pinheiro e Gregório, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003); mais ainda, este endoparasitismo afeta, de maneira diferente, as células epiteliais dependendo da sua localização ao longo do IM (Pinheiro *et al.*, 2006).

Este trabalho tem por objetivo verificar o teor de NO em extratos das regiões anterior e posterior do IM de *D. saccharalis*, bem como o efeito do endoparasitismo pela *C. flavipes* na produção de NO.

Material e Métodos

Os insetos foram mantidos em dieta artificial com umidade e temperatura controladas. Fêmeas fertilizadas da *C. flavipes* foram colocadas manualmente para ovipositar na superfície dorsal de larvas de *D. saccharalis* no último instar; as larvas de *D. saccharalis* parasitadas foram dissecadas após 6 dias de parasitismo.

Fragmentos das regiões anterior e posterior do IM de 10 larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e 14 parasitadas foram agrupados e pesados, totalizando cerca de 0,05g de tecido/grupo experimental; os materiais foram imediatamente colocados em 1,25ml de tampão fosfato 0,1M pH 7.4, homogeneizados no mesmo tampão e, em seguida, os extratos foram congelados e acondicionados em freezer a -80°C , para uso posterior. O procedimento de coleta foi realizado com 5 repetições.

A produção de NO foi determinada com base no reagente de Griess (Green *et al.*, 1981), sendo avaliada pela concentração do íon nitrito (NO^2). Para isso, foram adicionados 50 μl de cada amostra em poços de microplaca contendo 50 μl de solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5% + 100 μl de solução de NEED 0,1% (dihidroclorito de naftiletilenoamina) (Faraldo *et al.*, 2005). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica (D.O.) foi obtida em leitor de microplacas com filtro de 540nm (Labsystem, modelo Multiskan EX). A curva padrão foi realizada com soluções de concentrações crescentes de nitrito de sódio. A comparação entre os níveis de NO produzidos no IM de larvas não parasitadas e parasitadas foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste *t*, com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Os níveis de NO presente no IM de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e parasitadas por 6 dias pela *C. flavipes* estão apresentados na **Tabela 1**. Os níveis de NO produzidos no IM de larvas não parasitadas e com 6 dias de parasitismo não apresentaram diferença significativa entre suas regiões, anterior e posterior. Entretanto, existe um aumento significativo no teor de NO nas duas regiões do IM, na vigência do endoparasitismo.

TABELA 1- Níveis de NO (em $\mu\text{M/l}$) produzidos ao longo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* não-parasitadas e parasitadas pela *Cotesia flavipes*

Grupo de Insetos	Regiões do IM	
	Proximal	Distal
Não-Parasitado (n=10)	$6,6 \pm 2,0$ aA	$6,8 \pm 0,9$ aA
Parasitado (n=14)	$13,1 \pm 1,8$ aB	$10,7 \pm 1,8$ aB

Resultados expressos como média das 5 repetições $\pm$ desvio padrão.

Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significantes dentro das regiões de cada tipo de larva, com $p < 0,05$. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças significantes entre mesma região nos diferentes tipos de larva, com $p < 0,05$. n= número de insetos utilizados/repetição

Larvas de *D. saccharalis* não parasitadas não apresentam variação no teor de NO nas regiões anterior e posterior, indicando que deve haver uma produção basal desta molécula ao longo do IM. Sabe-se que existe produção basal ou constitutiva de NO em diversos tecidos em animais, uma vez que essa molécula atua em diversas funções fisiológicas (Moncada *et al.*, 1991; Roitt e Rabson, 2003).

Já o endoparasitismo da *D. saccharalis* pela *C. flavipes* induz um aumento significativo no teor de NO em ambas regiões do IM do inseto hospedeiro. Patógenos tem sido descritos como capazes de aumentar a produção de NO em diferentes tecidos de insetos, incluindo o IM, como acontece com várias espécies de *Anopheles* e *Aedes* na vigência do parasitismo por *Plasmodium sp*; sabe-se que em *Anopheles* e *Aedes* diferentes fases de vida do *Plasmodium* ocorrem no IM, hemolinfa e nas glândulas salivares, onde o aumento de NO foi atribuído a presença do parasita nesses órgãos (Dimopoulos *et al.*, 1998; Luckhart *et al.*, 1998; Vodovotz *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005).

No endoparasitismo de *D. saccharalis* não existe uma ação direta do endoparasita no IM, já que suas larvas crescem na hemocele do hospedeiro. Entretanto, o endoparasitismo acarreta modificações marcantes no metabolismo do hospedeiro, inclusive provocando uma alteração na sua resposta imune (para revisão ver Beckage e Gelman, 2004), o que deve estar afetando a função do IM como uma barreira efetiva contra a entrada de patógenos pela alimentação (Lehane e Billingsley, 1996; Chapman, 1998). É sabido que durante a oviposição o endoparasita *C. flavipes* inocula vírus e veneno e outras secreções protéicas (Beckage e Gelman, 2004). Assim, o aumento de NO por nós observados pode ter duas explicações possíveis: 1º, o IM está produzindo essa molécula na tentativa de combater a entrada de eventuais patógenos presentes no trato digestivo, ou mesmo os vírus inoculados; 2º, como o NO é uma molécula gasosa que se difunde nas membranas celulares, o IM pode estar produzindo essa molécula para que alcance a hemolinfa, onde contribuiria na defesa do hospedeiro. Temos que lembrar que o inseto hospedeiro deve estar, de alguma maneira, com seu sistema imune alterado para permitir o desenvolvimento dos parasitóides na sua hemocele, mas ao mesmo tempo deve ser capaz de se defender da entrada e desenvolvimento dos inúmeros outros patógenos presentes no meio ambiente (como vírus, bactérias, fungos, protozoários, etc). De todas as maneiras, acreditamos que as larvas hospedeiras estão reagindo à presença do endoparasita através da produção de NO, uma parte essencial do arsenal citotóxico de inseto, mas ainda não sabemos o mecanismo certo em que o IM está envolvido neste processo.

Uma complementação imprescindível para o encerramento deste trabalho, antes de seu envio para publicação, é a localização da oxido nítrico sintase (NOS) no IM da *D. saccharalis* em insetos controle e na vigência do endoparasitismo.

As enzimas NOS, capazes de sintetizar o NO, são dependentes de O₂, NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade (Marletta, 1993). Foram isoladas e clonadas três isoenzimas da NOS, sendo duas constitutivas (c-NOS) e uma induzível (i-NOS) (Marletta, 1993; Moncada *et al.*, 1991). As NOS também podem ser classificadas, segundo Nathan e Xie (1994), como cálcio-dependentes (isoformas I e III) e cálcio-independentes (isoforma II).

Com relação à função das NOS em insetos, alguns estudos foram realizados no sistema nervoso, permitindo elucidar o papel do NO no aprendizado, memória, locomoção e olfato. A percepção quimio-sensorial em insetos ocorre via antenas, com

processamento e integração de sinais ocorrendo no lóbulo antenal; em *Manduca sexta* a NOS é altamente expressa na antena (Nighorn *et al.*, 1998) sugerindo que a comunicação entre receptores olfativos e centros processadores são modulados por NO.

Trabalho com *Drosophila* mostrou que o NO é uma importante molécula para mediar o balanço entre a proliferação e a diferenciação celular, tendo sido demonstrado a expressão de NOS em todo o disco imaginal da larva de terceiro instar (Kuzin *et al.*, 1996).

Poucos são os trabalhos que localizam a NOS no intestino de insetos; a maioria deles foi realizada em insetos hematófagos e correlacionam o aumento da NOS com a invasão de microorganismos, que têm fase do seu ciclo de vida no intestino (Dimoupolus *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005). Em *Anopheles stephensi* após a infecção por *Plasmodium*, existe aumento de atividade de NOS nas células intestinais, que foi correlacionado com a capacidade de limitar o desenvolvimento do parasita (Luckhart *et al.*, 1998). Em diversos tecidos de larvas de *Chrysomya megacephala* como hemócitos, músculo, intestino, tecido gorduroso, túbulos de Malpighi e gânglios nervosos, Faraldo *et al.* (2004) detectaram atividade de NOS em situações experimentais de não-injeção, injeção de solução salina e injeção de leveduras; os autores acreditam que a forte reação positiva para NOS no intestino desse inseto, em todas as situações experimentais, indica que a produção de NO está relacionada a mecanismo de controle da proliferação dos microorganismos, que estão presentes no alimento normalmente ingerido pelas larvas.

Nossos resultados mostram aumento nos níveis de NO no IM de *D. saccharalis* endoparasitadas por *C. flavipes*, além de indicar também que existe produção basal de NO no IM do hospedeiro. Sabendo que o NO é uma molécula gasosa, que poderia estar sendo produzida também em outros órgãos e se difundindo para o IM, torna-se imprescindível a localização da enzima NOS. Esta localização contribuiria para entendermos se as células epiteliais do IM estão diretamente envolvidas na resposta frente ao endoparasitismo, ou se o NO observado foi sintetizado em órgãos vizinhos, alcançando o IM por difusão. A tentativa de localização da enzima NOS em hemócitos de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes* não foi bem sucedida (informações pessoais de Nunes). Sendo assim, a localização da enzima NOS em diferentes órgãos, especialmente no IM, contribuiria para melhor entendimento da resposta imune do hospedeiro frente ao endoparasita.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba-SP, Brasil, pelo fornecimento dos insetos. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FAPESP.

Referências Bibliográficas

- Azambuja, P., Ratcliffe, N.A., Garcia, E.S., 2005. Towards and understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. An. Acad. Bras. Cienc. 77, 397-404.
- Beckage, N.E., Gelman, D.B., 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. Annu. Rev. Entomol., 49, 299-330.
- Chapman, R.F., 1998. The Insects: structure and function. Harvard University Press, Cambridge.
- Colasanti, M., Venturini, G., 1998. Nitric oxide in invertebrates. Mol. Neurobiol. 17, 157-174.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos, F.C., 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. Embo. J. 17, 6115-6123.
- Dunn, P.E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. Annu. Rev. Entomol. 31, 321-339.
- Faraldo, A.C., Sá-Nunes, A., Delbel, E.A., Faccioli, L.H., Lello, E., 2005. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. Nitric Oxide Biol. Chem. 13, 240-246.
- Faraldo, A.C., Sá-Nunes, A., Faccioli, L.H., Del Bei, E.A., Lello, E., 2004. Nitric oxide synthase activity in blowfly tissues. Proc. Nitric Oxide, Cytokines Inflammation-Internat. Symp. 140.
- Foley, E., O'farrel, P.H., 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. Genes Dev. 17, 115-125.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Nitric Oxide Biol. Chem. 5, 1-6.
- Green, L.C., Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7764-7768.

- Gupta, A.P., 1991. Cellular immunity. In: Gupta, A.P. (Ed.), Immunology of Insects and Other Arthropods. CRC Press Series, New York, pp. 61-69.
- Haase, A., Bicker, G., 2003. Nitric oxide cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development (Cambridge)*. 130, 3977-3987.
- Hao, Z., Kasumba, I., Aksoy, S., 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1155-1164.
- Herrera-Ortíz, A., Lanz-Mendonza, H., Martínez-Barnette, J., Hernández-Martínez, S., Villarreal-Treviño, C., Aguilar-Marcelino, L., Rodríguez, M.H., 2004. *Plasmodium berguei* ookinetes induced nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 893-901.
- Kumar, S., Gupta, L., Han, Y.S., Barillas-Mury, C., 2004. Inducible peroxidase mediate nitration of *Anopheles* midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *J. Biol. Chem.* 279, 53475-53482.
- Kuzin, B., Roberts, I., Peenova, N., Enikolopov, G., 1996. Nitric oxide regulates proliferation during *Drosophila* development. *Cell*. 87, 639-649.
- Lehane, M.J., Billingsley, P.F., 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London.
- Lim, J., Gowda, C.D., Krishnegowda, G., Luckhart, S., 2005. Induction of nitric oxide synthase in *Anopheles stephensi* by *Plasmodium falciparum*: Mechanism of signaling and the role of parasite glycosylphosphatidylinositols. *Infect. Immun.*, 73, 2778-2789.
- Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., Rosenberg, R., 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 5700-5705.
- Marletta, M.A., 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 4, 423-430.
- Nathan, C., Xie, Q.W., 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78, 915-918.
- Nighorn, A., Gibson, N.J., Rivers, D.M., Hildebrand, J.G., Morton, D.B., 1998. The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and

- prejection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. J. Neurosci. 18, 7244-7255.
- Pinheiro, D.O., Gregório, E.A., 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Acta Microsc. 12, 27-30.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Gregório, E.A., 2006. Morphometry of the *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera) midgut epithelium parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). J. Invertebr. Pathol. In press.
- Pinheiro, D.O., Silva, R.J., Quagio-Grassiotto, I., Gregório, E.A., 2003. Morphometric Study of the Midgut Epithelium in the *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. Neotrop. Entomol. 32, 453-459.
- Roitt, I., Rabson, A., 2003. Imunologia básica. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro.
- Rossi, M.N., Fowler, H.G., 2003. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep., Crambidae) and its parasitoids: a synchrony approach to special and temporal dynamics. J. Appl. Entomol. 127, 200-208.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. Cell Tissue Res. 237, 565-574.
- Vodovotz, Y., Zamora, R., Lieber, M.J., Luckhart, S., 2004. Cross-talk between nitric oxide and transforming growth Factor- β 1 in malaria. Curr. Mol. Med. 4, 787-797.
- Weiske, J., Wiesner, A. 1999. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. Nitric Oxide Biol. Chem. 3, 123-131.
- Whitten, M.M.A., Mello, C.B., Gomes, S.A.O., Nigam, Y., Azambuja, E.S., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. Exp. Parasitol. 98, 44-57.

CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas utilizadas e os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1)- O endoparasitismo de larvas de *D. saccharalis* por *C. flavipes* altera a morfo-fisiologia das células epiteliais do hospedeiro, ao longo do intestino médio, sem que se pudesse definir região ou célula preferencial.
- 2)- As celulares colunares e regenerativas sofrem processo de morte celular programada do tipo “apoptosis-like” ao longo do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*, que não é afetado pelo endoparasitismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
BIOSIS. Serial source for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

- ASGARI, S., SCHMIDT, O. Passive protection of eggs from the parasitoid *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. **J. Insect Physiol.**, v.40, p.789-95, 1994.
- BECKAGE, N.E. New insights: how parasites and pathogens alter the endocrine physiology and development of insect hosts. In: BECKAGE, N.E. (Ed). **Parasites and pathogens: effects on host hormones and behavior**. New York: Chapman & Hall, 1997. p.3-36.
- BECKAGE, N.E. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. **Parasitology**, v.116, p.57-64, 1998.
- BECKAGE, N.E., GELMAN, D.B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Ann. Rev. Entomol.**, v.49, p.299-330, 2004.
- BECKAGE, N.E., TAN, F.F., SCHLEIFER, K.W., LANE, R.D., CHERUBIN, L.L. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the Tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.26, p.165-95, 1994.
- BELL, H.A., KIRKBRIDE-SMITH, A.E., MARRIS, G.C., EDWARDS, J.P. Teratocytes of solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. **Physiol. Entomol.**, v.29, p.335-43, 2004.
- BELLOWS, T.S., FISHER, T.W. **Handbook on biological control: principles and application of biological control**. London: Academic Press, 1999. 1046p.
- BOMBONATO, M.T.S. **Análise morfológica e quantitativa dos hemócitos de larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) frente ao parasitóide *Metagonistylum minense* (Diptera: Tachinidae)**. Botucatu, 1994. 90p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BORGES, A.R. **Morfologia ultra-estrutural da glândula mandibular de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em larvas normais e parasitadas pela *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Botucatu, 2001. 105p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- BOTELHO, P.S., MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M. (Eds). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. p.409-21.

- BREWER, F.D., KING, E.G. Food consumption and utilization by sugarcane borers parasitized by *Apanteles flavipes*. **J. Georgia Entomol. Soc.**, v.16, p.181-5, 1981.
- BUENO, V.H.P. Controle biológico aumentativo com agentes entomófagos. In: VENZON, M., PAULA JR., T.J., PALLINI, A. (Eds). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/Ctzm-UFV, 2006. p.23-42.
- CAMPOS-FARINHA, A.E.C. **Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, 1996. 97p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998. 770p.
- COLE, T.J., BECKAGE, N.E., TAN, F.F., SRINAVASAN, A., RAMASWAMY, S.B. Parasitoid-host endocrine relations: self-reliance or co-optation? **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.32, p.1673-9, 2002.
- CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larva de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, 1994. 160p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- DAHLMAN, D.L., RANA, R.L., SCHEPERS, E.J., SCHEPERS, T. DILUNA, F.A., WEBB, B.A. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. **Insect Mol. Biol.**, v.12, p.527-34, 2003.
- DAHLMAN, D.L., VINSON, S.B. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A. (Eds). **Parasites and pathogens of insect**. New York: Academic Press, 1993. v.1. p.145-65.
- DEGASPARI, N., BOTELHO, P.S.M., ALMEIDA, L.C., MACEDO, N., ARAÚJO, J.R. A queima da cana-de-açúcar, os efeitos sobre a população da broca, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794), seus predadores e parasitos. **Stab**, v.1, p.35-40, 1983.
- DOW, J.A.T. Insect midgut function. **Adv. Insect Physiol.**, v.19, p.187-328, 1986.
- EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Trowbridge: The Cromwell Press, 2001. 314p.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B. **Manual de entomologia**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1978. 551p.

- GILLOTT, C. **Entomology**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1995. 798p.
- KROEMER, J.A., WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. **Annu. Rev. Entomol.**, v.49, p.431-56, 2004.
- LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.
- LIMA FILHO, M. **Quantificação de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1891) em cana-de-açúcar para controle de *Diatraea* spp.** Piracicaba, 1989. 107p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior Agrícola Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.
- MACEDO, N. Método de criação do parasitóide *Cotesia flavipes*. In: BUENO, V.H.P. (Ed). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: Editora UFLA, 2000. p.161-74.
- MOREAU, S.J.M., GUILLOT, S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v.35, p.1209-23, 2005.
- NUNES, C.C.C., GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and cytochemical characterization of the oenocytoid in larvae of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized by the wasp *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Naturalia**, v.30, p.28-33, 2005.
- PÁDUA, L.E.M., PARRA, J.R.P., HADDAD, M.L. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na biologia de *Cotesia flavipes* (Cameron). **An. Soc. Entomol. Brasil**. v.23, p.105-14, 1994.
- PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S., BENTO, J.M. **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. 609p.
- PIEK, T. Insect venoms and toxins. In: KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. (Eds). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.11. p. 595-633.
- RISCADO, G.M. **Eficiência comparada de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1891) no controle de *Diatraea* ssp no Rio de Janeiro**. Piracicaba, 1982. 77p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior Agrícola Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.
- SLANKY Jr., F. Nutritional ecology of endoparasitic insects and their host: an overview. **J. Insect Physiol.**, v.32, p.255-61, 1986.

- STOLTZ, D.B. Interaction between parasitoid-derived products and host insects: an overview. **J. Insect Physiol.**, v.32, p.347-50, 1986.
- STOLTZ, D.B., GUZO, BELLAND, E.R., LUCAROTTI, C.J., MACKINNON, E.A. Venom promotes uncoating *in vitro* and persistence *in vivo* of DNA from a Braconidae polydnavirus. **J. Gen. Virol.**, v.69, p.903-7, 1988.
- STRAND, M.R. Developmental traits and life-history evolution in parasitoids. In: HOCHBERG, M.E., IVES, A.R. (Eds). **Parasitoid population biology**. Princeton: Princeton University Press, 2000. p. 139-62.
- TANAKA, T. Calyx and venom fluids of *Apanteles kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) as factors that prolong larval period of the host, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.80, p.530-3, 1987.
- TANAKA, T., VINSON, S.B. Interaction of venoms with the calyx fluids of three parasitoid, *Cardiophiles nigriceps*, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in effecting a delay in the pupation of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.84, p.87-92, 1991.
- THOMPSON, S.N., REDAK, R.A. Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. **J. Comp. Physiol. A.**, v.191, p.909-23, 2005.
- THOMPSON, S.N., REDAK, R.A., WANG, L.-W. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. **J. Exp. Biol.**, v.208, p.611-23, 2005.
- VAN LEERDAM, M.B., SMITH, J.W., FUCHS, T.W. Frass-mediated, host-finding behavior of *Cotesia flavipes*, a Braconidae parasite of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.78, p.647-50, 1986.
- VENZON, M., PAULA JR., T.J., PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/Ctzm-UFV, 2006. 360p.
- VINSON, S.B., IWANTSCH, G.F. Host regulation by insect parasitoids. **Q. Rev. Biol.**, v.55, p.143-65, 1980.
- VINSON, S.B., PENNACHIO, F., CONSOLI, F.L. The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. In: EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. (Eds). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Trowbridge:

- The Cromwell Press, 2001. p. 187-205.
- WANI, M., YAGI, S., TANAKA, T. Synergistic effect of venom, calyx and teratocytes of *Apanteles kariyai* on the inhibition of larval pupal ecdysis of the host, *Pseudaletia separate*. **Entomol. Exp. Appl.**, v.57, p.101-4, 1990.
- WEAVER, R.J., MARRIS, G.C., BELL, H.A., EDWARDS, J.P. Identity and mode of action of the host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. In: EDWARDS, J.P., WEAVER, R.J. (Eds). **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Trowbridge: The Cromwell Press, 2001. p.33-58.
- WIEDENMANN, R.N., SMITH JR, J.W., DARNELL, P.O. Laboratory rearing and biology of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) using *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) as a host. **Environ. Entomol.**, v.21, p.1160-7, 1995.
- WYDER, S., BLANK, F., LANZREIN, B. Fate of polydnavirus DNA of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* in the host *Spodoptera littoralis*. **J. Insect Physiol.**, v.49, p.491-500, 2003.

RESUMO

PINHEIRO, D.O. Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de *Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae), em larvas não-parasitadas e na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Botucatu, 2006. 177p. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Resumo

A *Diatraea saccharalis* (broca da cana) afeta a cultura da cana-de-açúcar e tem sido controlada pelo endoparasitóide *Cotesia flavipes*; pouco se sabe sobre a morfologia do intestino médio-IM da broca da cana, bem como sobre o efeito do endoparasitismo nesse órgão. O objetivo deste trabalho é, primeiramente, caracterizar morfológica e morfometricamente as células epiteliais ao longo do IM de *D. saccharalis*, além de verificar o efeito do endoparasitismo pelos mesmos parâmetros. Objetivamos, ainda, estudar a matriz peritrófica, a atividade específica de amilase, o processo de morte celular e o teor de óxido nítrico ao longo do IM, visando determinar o efeito do endoparasitismo nas diferentes regiões do IM. Fragmentos do IM de larvas de *D. saccharalis* não-parasitadas e parasitadas, subdividido em regiões, foram processados segundo técnica específica para cada tipo das seguintes análises: ao nível de microscopia de luz (histoquímica, morfometria, determinação de atividade enzimática de SDH e NADH-TR e técnica do TUNEL), de microscopia de fluorescência, de microscopia eletrônica (transmissão e varredura), além de determinação bioquímica de atividade específica de amilase e de teor de óxido nítrico em extratos do IM. Nossos resultados mostraram que a morfologia geral das células epiteliais ao longo do IM de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas é semelhante à de outras larvas de Lepidoptera e que existem diferenças morfológicas e morfométricas nas células epiteliais apontando a existência de duas regiões morfo-funcionais distintas no IM, anterior e posterior, com área de transição. O desenvolvimento do endoparasita dentro da hemocele da broca da cana altera as células epiteliais do inseto hospedeiro. O estudo morfométrico mostrou que houve aumento citoplasmático e nuclear das células colunares da região posterior, e das células caliciformes ao longo do IM. As inúmeras mitocôndrias das células epiteliais apresentaram rarefação e vacuolização da matriz, principalmente na região anterior do IM, concomitante com o aumento no metabolismo oxidativo, em especial nas células colunares. A produção basal de óxido nítrico não difere nas duas regiões examinadas em larvas não-parasitadas, sendo que o parasitismo induz aumento na produção de óxido nítrico, de maneira semelhante nas regiões anterior e posterior do IM. Todas as células epiteliais, em larvas não-parasitadas, mostraram esferitos, sem localização preferencial dentro das células; existe aumento expressivo no número e variabilidade na morfologia dos esferitos nos insetos parasitados, especialmente nas células colunares. Existe morte celular programada em células colunares e regenerativas, por processo do tipo “apoptosis-like”, que não se altera na vigência do parasitismo ou nas regiões do IM. O endoparasitismo afeta a morfologia das células colunares e atividade de secreção de matriz peritrófica e amilase. Nossos resultados sugerem que o endoparasitismo de larva de *D. saccharalis* pela *C. flavipes* afeta o epitélio do IM, sem que se pudesse definir região ou célula preferencialmente alterada.

Palavras-chave: Morfometria, morfologia, broca da cana, inseto, ultra-estrutura, parasitismo, intestino médio, morte celular, célula epitelial.

ABSTRACT

PINHEIRO, D.O. Regional differences in the midgut epithelial cell of the non-parasitized *Diatraea saccharalis* larvae, Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae) and parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Botucatu, 2006. 177p. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

The *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer) affect the sugarcane crop and has been widely controlled by the endoparasitoid *Cotesia flavipes*; however, very little is known about the midgut morphology of the sugarcane borer, as well as the effect of the endoparasitism in this organ. This work aims to characterize morphological and morphometrically the epithelial cells along the midgut of *D. saccharalis*, and verify the effect of the endoparasitism by the same parameters. Besides, we intend to study the peritrophic matrix, the specific amylase activity, the cell death process and the nitric oxide level along the midgut, to determine the effect of the endoparasitism in the different midgut regions. Fragments of the *D. saccharalis* midgut regions from non-parasitized and parasitized larvae were processed according by specific techniques for each analysis: light microscopy (histochemistry, morphometry, enzymatic activity of SDH and NADH-TR and TUNEL technique), fluorescence microscopy, electron microscopy (transmission and scanning), as well as the biochemical analyses of specific amylase activity and nitric oxide level in midgut extracts. Our results showed that the general morphology of the epithelial cells along the midgut of non-parasitized larvae is similar to the others Lepidoptera larvae, and that there are morphological and morphometric differences in the epithelial cells suggesting the existence of two distinct morpho-functional regions in the midgut, anterior and posterior, with transitional region. The endoparasite development into the sugarcane borer hemocoel affect the epithelial cells of the insect host. The morphometric study showed the cytoplasmic and nuclear increase in both the columnar cells at the posterior midgut region and goblet cells along the midgut length. The numerous mitochondria of the epithelial cells showed matrix rarefaction and vacuolization, mainly in the anterior midgut region, concomitant with an increase in the oxidative metabolism, especially in the columnar cells. The basal production of nitric oxide did not differ in the two midgut regions in non-parasitized larvae, and the parasitism induce a similar increase in the nitric oxide production in the anterior and posterior midgut regions. All the epithelial cell types in non-parasitized larvae showed spherites without preferential localization into the cells; there is an expressive increase in the number and variability in the spherites morphology in the parasitized insects, mainly in the columnar cells. There is apoptosis-like programmed cell death process in the columnar and regenerative cells, that is not affect by the parasitism along the midgut length. The endoparasitism affects the columnar cell morphology and the secretory activities of the amylase and peritrophic matrix. Our results suggested that the endoparasitism of the *D. saccharalis* larvae by the *C. flavipes* affect the midgut epithelium, but it was impossible to determine either the epithelial cell or the midgut region preferentially affected.

Keywords: Morphometry, morphology, sugarcane borer, insect, ultrastructure, parasitism, midgut, cell death, epithelial cell