
Biologia Celular e Molecular

Raphael Bastão de Souza

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E
DISTRIBUIÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DO
DIPLÓPODO *Urostreptus atrobrunneus* PIEROZZI &
FONTANETTI, 2006**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Raphael Bastão de Souza

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E
DISTRIBUIÇÃO DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DO
DIPLÓPODO *Urostreptus atrobrunneus* PIEROZZI &
FONTANETTI, 2006**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

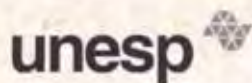
Orientadora: Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti

591.4 Souza, Raphael Bastão
S726a Aspectos morfológicos, ultra-estruturais e distribuição
dos túbulos de Malpighi do Diplópodo *Urostreptus*
atrobrunneus Pierozzi & Fontanetti, 2006 / Raphael Bastão
Souza. - Rio Claro : [s.n.], 2012
35 f. : il., figs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Anatomia comparada. 2. Milípede. 3. Histoquímica. 4.
Surto populacional. 5. Microscopia eletrônica de transmissão.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E DISTRIBUIÇÃO DOS
TÚBULOS DE MALPIGHI DO DIPLÓPODO *Urostreptus atrobrunneus* PIEROZZI &
FONTANETTI, 2006

AUTOR: RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOELLI
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. IZABELA BRAGGIÃO CALLIGARIS
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Data da realização: 29 de fevereiro de 2012.

*Dedico este trabalho e todas as conquistas
aos meus pais Carlos e Sueli.*

Agradecimentos

Sou grato:

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha orientadora Carmem S. Fontanetti Christofolletti pelo exemplo de profissionalismo, pela excelente orientação, atenção e paciência.

À Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo e à profa. Dra. Thaísa Roat pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de Histologia, Gerson Mello Souza, aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Mônica Iamonte e Antônio Yabuki e à Cristiane Miléo pelo grande auxílio.

Aos meus amigos do Departamento de Biologia, em especial aos orientados da Profa. Carmem: Larissa Nogarol, Cintya Christofolletti, Ana Cláudia (Matraca), Tamaris Gimenez, Janaína Pedro-Escher, Cristina (Mini-Mini), Vanessa, Júlia e Jorge.

À minha família: meus pais, Carlos e Sueli, e à minha irmã, Juliana.

Aos meus amigos de república, em especial ao Vlamir Bozzato.

Aos meus amigos de graduação, em especial ao Túlio Capelini.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento e na finalização deste trabalho.

***“Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas...
continuarei a escrever.”***

Clarice Lispector

Resumo

Milípedes, popularmente conhecidos no Brasil como piolho-de-cobra, emboá ou gongolô, apresentam distribuição cosmopolita e constituem uma das classes de Myriapoda. Podem se tornar importantes pragas agrícolas e causar prejuízos caso haja uma diminuição na quantidade de alimento habitual. Infestações e surtos populacionais de milípedes têm ocorrido em várias partes do mundo, sendo responsáveis por danos em plantações e transtornos em áreas urbanas. A espécie *Urostreptus atrobrunneus* vem apresentando surtos populacionais nos últimos anos no estado de São Paulo, com potencial de se tornar uma praga agrícola e urbana. O controle da mesma torna-se difícil diante da falta de informação sobre o grupo e do escasso número de estudos referentes à biologia e morfologia dos mesmos. Neste aspecto, o presente trabalho pretende contribuir com informações sobre a morfologia, ultra-estrutura e distribuição dos túbulos de Malpighi do diplópodo *U. atrobrunneus*, colaborando com subsídios para o entendimento de sua biologia e, assim, contribuir para a elaboração de ações eficazes para seu controle quando em expansão populacional. Os estudos referentes a este órgão dentro do grupo são escassos e antigos, os quais se focam, sobretudo, na fisiologia e função. Para tanto, espécimens adultos foram dissecados em solução fisiológica e os túbulos de Malpighi retirados e fixados de acordo com a técnica a ser utilizada. Segundo os resultados aqui encontrados, a espécie possui um longo par de túbulo de Malpighi, conforme o padrão observado no grupo. Sua inserção ocorre no piloro, de onde parte e percorre praticamente todo o corpo do animal, desde a região do íleo (intestino posterior) até a região anterior, onde encontra-se intimamente associado ao intestino anterior a às glândulas salivares. Ao longo de sua extensão é possível encontrar diferentes tipos de células.

Palavras-chave: milípede; surto populacional; histoquímica; microscopia eletrônica de transmissão

Abstract

Millipedes, popularly known in Brazil as millipede, emboá or gongolô, have a cosmopolitan distribution and represent a class of Myriapoda. They may become an important agricultural pest and cause damage if a decrease in the amount of usual food occurs. Millipedes' infestations and outbreaks have occurred in various parts of the world and may damage crops and disorders in urban areas. The species *Urostreptus atrobrunneus* has been showing population outbreaks in recent years in São Paulo state, with the potential to become an agricultural and urban pest. Its control is difficult due to the lack of information about the group and the small number of studies concerning its biology and morphology. In this aspect, the present work aims to contribute with information about morphology, ultrastructure and distribution of the *U. atrobrunneus* Malpighian tubule and collaborate to the understanding of its biology. Malpighian tubules studies in this group are scarce and old, which focus mainly on the physiology and function. For this purpose, adult specimens were dissected in saline solution and the Malpighian tubules were removed and fixed in accordance with the technique being used. According to the results found here, this species has a long pair of Malpighian tubule, as the pattern observed in the group. Its insertion occurs at the pylorus; the Malpighian tubules leaves this region and covers practically the whole animal body, since the region of the ileum (hindgut) up to the anterior region, which is closely associated with the foregut and the salivary glands. Throughout its length it is possible to find different types of cells.

Key-words: millipede; histochemistry; population outbreak; transmission electron microscopy

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	10
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
II.1 Classe Diplopoda.....	12
II.2 Surtos populacionais de milípedes.....	14
II.3 Diplopoda como praga.....	17
II.4. Túbulos de Malpighi.....	21
III. OBJETIVOS	24
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
IV.1 Materiais.....	25
IV.2 Métodos.....	25
IV.2.1 Histologia.....	25
IV.2.2 Histoquímica.....	25
IV.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)....	26
V. RESULTADOS.....	27
V.1 Região Anterior.....	27
V.2 Região Média.....	28
V.3 Região do Píloro: local de inserção do túbulo de Malpighi no Intestino Posterior.....	29
V.4 Região Posterior.....	30
VI. DISCUSSÃO.....	32
VII. CONCLUSÕES.....	41
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
IX. FIGURAS.....	58

I. Introdução

Nos últimos anos, tanto a migração quanto o surto populacional de milípedes têm despertado o interesse de pesquisadores com o intuito de obter informações para esclarecer tal ocorrência e, assim, permitir a adoção de métodos de controle eficientes a fim de prevenir danos causados em áreas urbanas e cultivadas (BOCCARDO et al., 2002).

Milípedes, popularmente conhecidos no Brasil como piolho-de-cobra, emboá ou gongolô, constituem uma classe de Myriapoda, os Diplopoda, e possuem uma distribuição cosmopolita, sendo abundantes, principalmente, nos trópicos. Cerca de 12.000 espécies foram descritas no mundo todo, mas estima-se que exista em torno de 80.000, compondo a terceira maior classe de Arthropoda, depois de Insecta e Arachnida. Entre as 20 famílias de diplópodos brasileiros, as mais comumente estudadas são Leptodesmidae, Spirostreptidae e Rhinocricidae (GOLOVATCH, 1997). A principal característica da classe é a presença de dois pares de pernas por segmento, característica responsável por separá-la das outras classes de Myriapoda (Chilopoda, Symphyla e Pauropoda), as quais possuem apenas um par de pernas por segmento (HOPKIN; READ, 1992).

Os diplópodos possuem um importante papel na dinâmica dos solos, onde ocupam o nível trófico de decompositores, por promover sua aeração e seu enriquecimento. Sua alimentação é composta por detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo (HOPKIN; READ, 1992). Ecologicamente, são reconhecidos como invertebrados saprófagos e detritívoros.

Muitos organismos detritívoros, como os milípedes, podem se tornar pragas importantes caso haja uma diminuição na quantidade de alimento habitual (BRÉVAULT et al., 2005). Sendo assim, eles também podem se alimentar de partes vivas de plantas, principalmente das partes mais macias e de fácil digestão, como sementes em germinação, mudas e raízes finas (EBREGT et al., 2005). Além de atacarem plantações, eles também podem ocorrer em grande número, infestando principalmente casas (HOPKIN; READ, 1992).

Apesar de não apresentarem população numerosa, as explosões populacionais podem ocorrer devido a desequilíbrios no meio ambiente, mudanças climáticas, utilização de pesticidas (os quais podem eliminar possíveis competidores) e presença de depósitos de lixo oriundos da poda de árvores e mato.

O fenômeno de explosão populacional tem ocorrido com o milípede objeto de estudo neste trabalho, *Urostreptus atrobrunneus*. Esta espécie já foi notificada como infestante em terreno baldio na cidade de Paulínia, há alguns anos (BOCCARDO, 1998) e, mais recentemente, foi responsável por uma infestação no Parque das Universidades, cidade de

Campinas, São Paulo, Brasil. Devido à falta de informação a respeito da espécie, foi proposta a limpeza do local para que diminuíssem os lugares de abrigo e alimento, em uma tentativa de redução da população no local (FONTANETTI et al., 2010).

Países que também possuem problemas relacionados à expansão populacional de milípedes têm dificuldades em estabelecer métodos de controle devido à falta de conhecimento sobre a morfologia, fisiologia e comportamento dos mesmos. Sendo assim, para o estabelecimento de métodos de controle que, além de eficientes, não interfiram negativamente no ambiente, são necessários estudos de todos os aspectos da biologia do organismo. *Urostreptus atrobrunneus* foi descrita por Pierozzi e Fontanetti em 2006, sendo então pouco conhecida e, portanto, apresenta maiores dificuldades para seu controle. Levando-se em consideração que tal espécie possui grande potencial de se tornar uma praga agrícola e urbana, estudos acerca da mesma tornam-se de suma importância para que prejuízos futuros sejam evitados.

De acordo com Seifert (1979), os artrópodos terrestres possuem cerca de dez órgãos relacionados com a função de excreção, dentre eles o epitélio do intestino médio, hemócitos, corpo gorduroso e o túbulo de Malpighi. A evolução deste grupo só foi possível, provavelmente, após um órgão excretor específico, o túbulo de Malpighi, ser desenvolvido juntamente com àqueles já existentes.

Todos os milípedes possuem um par de túbulos de Malpighi, que apresenta um fundo cego com uma abertura conectada ao intestino posterior no ponto de junção deste com o intestino médio (piloro) (MILEY, 1930; HOPKIN; READ, 1992).

Os estudos referentes aos túbulos de Malpighi dos milípedes relacionam-se, em sua maioria, a aspectos funcionais e fisiológicos, sendo escassos e antigos os estudos com uma abordagem morfológica. Além disso, apenas as espécies *Glomeris marginata*, *Polyxenus lagurus* e *Euryurus erythropygus* possuem algum estudo relacionado a este órgão, amostragem muito pequena comparada ao número de espécies descritas para o grupo, cerca de 12.000.

Diante dos conhecimentos anteriormente expostos e devido à existência de poucos e antigos estudos sobre os túbulos de Malpighi em Diplopoda, principalmente em relação à morfologia, este projeto visou contribuir com novas informações sobre este órgão na espécie *U. atrobrunneus*. A espécie carece de informações sobre sua biologia e morfologia, o que pode se tornar um problema no futuro próximo, já que a espécie vem apresentando surtos populacionais, com tendências a se tornar uma praga.

II. Revisão de Literatura

II.1. Classe Diplopoda

Atualmente, há 16 ordens de milípedes viventes, com 146 famílias, e 8 ordens extintas (SHELLEY, 2003). O elevado número de espécies não descritas (estima-se uma diversidade de 80.000 espécies) indica o quão pouco a classe é estudada (SNYDER et al., 2006). Muitas espécies são conhecidas pela sua primeira descrição e nunca foram alvo de estudos com uma abordagem sistemática (SIERWALD; BOND, 2007).

Estudos moleculares recentes, desenvolvidos por Bond e Sierwald (2003) no Caribe, apontam um alto potencial de ocorrência de espécies crípticas na classe, o que, segundo Blower (1985), dificulta o conhecimento do número real de espécies.

Cientificamente, a classe Diplopoda é subdivida em três subclasses: Pselaphognata, Pentazonia e Helmintomorpha. Na primeira, os machos são desprovidos de aparatos especializados para a cópula, os gonopódios. Já os Pentazonia apresentam estas estruturas localizadas na região posterior do corpo. Na última subclasse citada, os machos apresentam um ou ambos os pares de pernas do sétimo segmento modificados em gonopódios (HOFFMAN, 1980).

Os milípedes possuem corpo alongado, cilíndrico ou levemente achatado. O tamanho do adulto pode variar entre 2 mm a 30 cm (HOFFMAN et al., 2002); a coloração é bastante variada, existindo tons de vermelho, marrom e amarelo; estas cores vivas são raras ou constituem pequenos detalhes; vivem de um a dez ou mais anos, dependendo da espécie (RUPPERT et al., 2005).

O corpo de um diplópodo consiste de três regiões principais: a cabeça, o tronco e o télson. A cabeça comporta a boca e várias estruturas sensoriais e é extremamente calcificada para facilitar a escavação do solo ou de madeira em decomposição. O corpo geralmente é longo e cilíndrico e em alguns grupos há projeções laterais. Os gonópodos, estrutura responsável por transferir os espermatozóides para as fêmeas, são espécie-específicos e frequentemente é o único caracter confiável para a identificação das espécies. O télson consiste de um segmento pré-anal contendo um par de placas anais, as quais formam uma válvula que se abre durante a defecação, e uma placa sub-anal (HOPKIN; READ, 1992).

Um único par de antenas está localizado na cabeça. Ocelos laterais, encontrados na maioria das espécies, são considerados olhos compostos. Órgãos de Tömösvary, também presente em muitas espécies, são encontrados na base da antena (SIEWARD; BOND, 2007). A função deste órgão ainda é desconhecida e o último estudo morfológico a respeito de sua estrutura foi realizado por Hennings em 1906.

Seus hábitos são predominantemente noturnos, evitando a exposição ao sol e ao calor, exceto em condições de alagamento do solo devido às chuvas ou quando migram para lugares alternativos de sobrevivência. São típicos de habitats úmidos e com grande disponibilidade de material orgânico, sendo geralmente encontrados nos lugares sombrios das matas, vivendo sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Muitos habitam galerias deixadas por outros animais, como minhocas. Algumas espécies são cavernícolas e ainda existem aqueles que podem ser considerados sinantrópicos (SCHUBART, 1947). Os diplópodos com caráter sinantrópico são os que vivem na dependência direta do homem, vivendo em hortas, quintais, estufas, pomares, e até mesmo nas próprias casas, alimentando-se de detritos do lixo doméstico.

Dangerfield e Telford (1989) afirmam que os diplópodos são grandes consumidores de matéria orgânica e podem ser, ainda, considerados importantes para a fertilidade do solo. O animal assimila a maior parte da matéria orgânica e devolve ao solo excretas nitrogenadas. O solo é humificado no trato digestório do animal, que contém uma grande quantidade de fungos e bactérias. Dessa forma, os excrementos dos diplópodos acabam ficando com mais húmus do que a terra ingerida (BANO et al., 1976).

A grande maioria dos representantes possui um exoesqueleto forte e resistente, devido à impregnação do tegumento por sais de cálcio. A necessidade de acumularem cálcio os tornam importantes na reciclagem deste elemento nos ecossistemas terrestres (SEASTEDT; TATE, 1981) e os tornam vulneráveis para o acúmulo de substâncias análogas, como estrôncio (GIST; CROSSLEY, 1975) e fluoreto (BUSE, 1986). A cutícula da maioria das espécies é permeável à água, o que restringe seus habitats à áreas onde a umidade é alta (EDNEY, 1977). Porém, algumas espécies reduzem a permeabilidade da cutícula com uma camada de hidrocarbonetos (OUDEJANS, 1972).

Diplópodos se desenvolvem por anamorfose. Eles eclodem do ovo como uma larva sem pernas e, logo em seguida, sofrem uma muda, dando início ao estágio I, onde poucos segmentos e apenas três pares de pernas estão presentes. Muitas outras mudas se sucedem, adicionando mais segmentos ao corpo do animal. Juntamente com os segmentos são adicionados pernas, glândulas de defesa e ocelos (HOPKIN; READ, 1992).

Os estádios dos diplópodos são análogos aos ínstaes de insetos. Através das alterações sofridas no corpo, é possível determinar em qual estágio os indivíduos se encontram. Na prática, porém, a determinação pelos estádios nem sempre é confiável (HOPKIN; READ, 1992).

A presença de poro repugnatório em determinados segmentos é característica da grande maioria das ordens, havendo raras exceções. Esse poro corresponde à abertura da glândula repugnatória, produtora de secreção que contém basicamente cianeto e iodo, com cheiro forte e desagradável, repelindo predadores (SCHUBART, 1942). De acordo com Nakamura et al. (2005), o conteúdo e a quantidade desta secreção são diretamente influenciados pelo tipo de vegetação e, conseqüentemente, podem estar relacionados a impactos causados no solo. Além da eliminação de substâncias com o odor forte e do tegumento resistente, outra forma de defesa dos diplópodos é o enrolamento do corpo em espiral plana.

Acidentes com seres humanos são raros, acontecendo em sua maioria com crianças e podem se manifestar por eritema, vesículas, bolhas e exulcerações, além de hiperpigmentação local (HADDAD JUNIOR et al., 2000). Uma vez em contato com a pele humana, os líquidos e vapores expelidos podem provocar sensação de ardência, lembrando uma queimadura leve (RADFORD, 1975). Contatos prolongados com o animal (preso nas roupas, por exemplo) podem levar à lesões mais severas, com formação de vesículas, bolhas e exulcerações (HADDAD JUNIOR et al., 2000).

II.2. Surtos populacionais de milípedes

Populações de organismos nunca são verdadeiramente estáveis, podendo aumentar o número de indivíduos a partir de uma baixa densidade e, depois, retornar ao seu nível original. Espécies de animais e plantas possuem vários pontos de equilíbrio, os quais não são temporalmente nem espacialmente estáveis, sendo que um estresse populacional pode ocasionar alterações nos números de indivíduos (WALLNER, 1985).

Relatos sobre migração, infestação em áreas urbanas e danos causados em plantações por milípedes têm ocorrido em várias partes do mundo (BOCCARDO et al., 1997; 2002; MASAMICHI et al., 2001; NIIJIMA, 2001; ENGHOFF; KEBAPI, 2008).

A intensificação da ação do homem nos ecossistemas tem causado a destruição de grandes áreas florestais, as quais são gradualmente repostas por plantações em escala industrial ou por lavouras. Esta transformação ambiental pode alterar a composição das populações de diplópodos, como demonstrou um estudo feito por Bourdanne (1997), realizado na Costa do Marfim. Nele, o autor conclui que a fauna de diplópodos em ambientes modificados pela ação humana sofreu alterações, onde algumas espécies apresentaram explosão demográfica e outras desapareceram.

No Brasil, a partir da década de 1990, foi observada uma expansão populacional do milípede *Plusioporus setiger* em plantações de café da região do Alto Paranaíba, MG. O fenômeno foi atribuído ao uso de fertilizantes orgânicos, à irrigação das plantações e ao uso de pesticidas químicos, os quais podem ter eliminado possíveis predadores. Estas práticas geraram um ambiente extremamente favorável a esses organismos, já que são adaptados a locais com grande quantidade de matéria orgânica e alta umidade relativa. Não há dados que demonstrem se a espécie é nativa ou se foi introduzida. No entanto, ela é conhecida por migrar e se adaptar às condições criadas pelo homem. Migração é uma característica de várias espécies de milípedes em situações como essa e, apesar de não ter causado prejuízo para as plantações, os indivíduos da espécie se acumulavam nas fontes de água, invadiam casas e danificavam pequenas plantações e jardins (BOCCARDO, 2002).

No Japão, milípedes do gênero *Parafontaria* (*P. laminata laminata*, *P. laminata armigera*, *P. kuhlgtzi* e *P. echizenensis*) são reconhecidos por pararem os trens durante seus surtos populacionais, os quais ocorrem durante o outono, em intervalos de sete ou oito anos. Os surtos consistem, predominantemente, de indivíduos adultos, podendo ocorrer indivíduos de sétimo estágio. Os indivíduos adultos põem seus ovos no início do verão e, logo em seguida, morrem. Os ovos incubados e as larvas de primeiro estágio hibernam durante o inverno sem ocorrer muda. As larvas vivem no solo, sofrem muda uma vez por ano e tornam-se adultas a partir da sétima muda. Os adultos e alguns indivíduos de sétimo estágio dirigem-se à superfície do solo no outono, ocasionando o surto populacional (NIIJIMA; SHINOHARA, 1988).

Acredita-se que longos ciclos de vida sincronizados à emergência periódica permitam a esses milípedes escapar do controle natural promovido pelos predadores. Nos anos de emergência, o número de indivíduos é tão alto que os predadores podem capturá-los à vontade, sem haver uma redução no número da população (KAMATA, 2003).

Outra espécie notificada por surtos populacionais no Japão é a espécie *Chamberlinius hualienensis*, natural da ilha de Taiwan. O primeiro relato de migração para o Japão ocorreu em 1983 e, desde então, surtos populacionais têm sido registrados em várias regiões do país, indicando um avanço da espécie para a região norte. Quando o surto ocorre, os indivíduos invadem as casas e, quando perturbados, secretam um cheiro desagradável, responsável por causar dores de cabeça e mal-estar (TAIRA; ARAKAKI, 2002).

Inyang e Ndon (2003) relataram a ocorrência de vários surtos no sudeste da Nigéria entre os anos de 1990 e 2001, com um terço da área do país sendo afetada. Todas as plantações da região sofreram danos, principalmente as plantações de mandioca. Quatro

espécies foram responsáveis pelo surto: *Tibiomus sp*, espécie de pequeno tamanho, *Spirostreptus assiniensis*, *Peridontopyge sp* e uma espécie não identificada.

Bennett e Kerr (1973) observaram que, na Flórida, EUA, muitas espécies de milípedes ocorrem em grandes quantidades em gramados e construções na época de reprodução e, logo em seguida, se dispersam a curtas distâncias. Os autores também relataram uma grande população da espécie *Dicellarius okefenokensis* e *Narceus americanus*. A primeira se desenvolveu em uma pilha de folhas em decomposição na varanda de uma casa, assustando seus moradores; a segunda foi responsável pela invasão de estacionamentos de estabelecimentos comerciais.

Ainda nos EUA, no estado de Tennessee, Vail (2007) relatou a presença de um grande número de diplópodos após dias seguidos de chuvas. Segundo a autora, após a ocorrência de chuvas ou antes da estação fria, um grande número de indivíduos pode migrar para as casas entrando por qualquer orifício. Nesta região, eles são mais comuns em áreas arborizadas ou recém habitadas, onde a vegetação em decomposição fornece alimento e condições de reprodução. Para prevenir a entrada desses invasores, a autora sugere reduzir a umidade e os esconderijos ao redor das construções, bem como aplicar pesticidas no perímetro da residência e nos possíveis locais de entrada. Caso a invasão já tenha ocorrido, a autora sugere retirá-los com aspirador de pó ou vassouras.

Cloudsely-Thompson (1949) descreveu um incidente em West Virginia, EUA, envolvendo a espécie *Fontaria virginiensis*, responsável por infestar grande área de uma fazenda. A quantidade de indivíduos era tão grande (cerca de 65 milhões) que impediu a pastagem do gado. O odor exalado gerou náuseas entre os trabalhadores e alguns poços chegaram a ter 15-20 cm de indivíduos mortos. A atividade dos animais era maior durante a noite e dias nublados.

Segundo Baker (1978), a espécie *Ommatoiulus moreletii* causou transtornos na Austrália devido à grande quantidade de indivíduos. Tal espécie é natural do sul europeu e foi introduzida no país, onde houve um significativo aumento em sua distribuição. A ação humana pode ter sido um fator importante na ocorrência dos surtos. A abundância da espécie no país em comparação com sua aparente raridade no sul da Europa não pôde ser explicada pelo clima, uma vez que a variedade de habitat colonizados na Austrália foi ampla. Ainda, segundo o autor, não havia dúvidas de que a espécie continuaria a se espalhar.

Porém, outro estudo conduzido pelo mesmo autor em 1985 (apud McKILLUP et al., 1988) estimou uma queda no número de indivíduos, os quais passaram de 22.6 indivíduos/m² em 1975 para 5.2 indivíduos/m², em média, no ano do estudo. Picos de até 60 indivíduos/m²

foram encontrados em algumas regiões, sendo que nos anos posteriores sofreram um declínio para 10 indivíduos/m². Para o autor, o declínio na abundância da população poderia estar relacionado com uma adaptação dos parasitas, patógenos e predadores com a espécie ou, ainda, poderia estar relacionado com a diminuição de recursos, como comida. Em 1988, McKillup et al. conduziram estudos de campo e de laboratório onde verificaram que um nematóide nativo foi responsável pelo declínio da densidade da espécie.

Estudos sobre a composição populacional dos surtos de milípedes já foram realizados e resultados diferentes foram encontrados pelos autores. Lawrence (1952), em estudo de um surto da espécie *Gymnostreptus pyrocephalus*, encontrou principalmente indivíduos adultos em uma razão de um macho para duas fêmeas. Ramsey (1966), em surto de *Pseudopolydesmus serratus*, encontrou predominância de indivíduos imaturos (um adulto para sete imaturos) e Morse (1903) registrou uma razão de um jovem para um adulto em surtos de *Fontaria virginiensis*.

Além de acarretar problemas em áreas urbanas e cultivadas, a explosão demográfica de milípedes também pode trazer efeitos negativos no habitat de microartrópodos e fungos, os quais podem ser prejudicados pela alimentação e movimentação dos indivíduos (KANEKO, 2003).

Para tentar conter os surtos populacionais, pesquisadores têm utilizado o controle químico e biológico. O primeiro não vem oferecendo resultados positivos, uma vez que vários inseticidas têm mostrado baixa toxicidade aos animais devido à presença do exoesqueleto rígido e calcificado que atua como uma barreira contra a penetração dos agentes químicos. Testes em laboratório mostraram que o controle biológico apresenta bons resultados com a utilização de alguns parasitas, como os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium flavoviridae*, os nematóides *Rhabditis necromena* (BOCCARDO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2002) e *Gordius* sp (Nematomorpha: Gordiidae) e o díptero *Eginia* sp (Diptera: Eginidae) (BAKER, 1985).

II.3. Diplopoda como praga

O termo praga é uma classificação que não possui validade ecológica. Alguns organismos podem ser considerados pragas em certo momento e benéficos em outros. Geralmente, um organismo é considerado uma praga quando compete com humanos por recursos e quando possui uma população numerosa (METCALF; LUCKMANN, 1994).

Relatos de milípedes atuando como pragas vêm ocorrendo em vários países do mundo, com danos econômicos para a agricultura e incômodo para moradores de áreas urbanas.

Uma grande variedade de artrópodos podem habitar regiões urbanas sem causar transtornos à população, mas, em determinados momentos, podem se tornar um grande incômodo. Estes invertebrados, quando invadem as casas, podem ser classificados em pragas crônicas, como cupins, ou pragas periódicas, como algumas espécies de milípedes e vespas sociais (SHETLAR, 2002).

Na Flórida, EUA, por muitos anos milípedes têm constado como pragas ocasionais em gramados ao redor de construções, sendo duas espécies mais preocupantes (*Oxidus gracilis* e *Orthomorpha coarctata*) e outras de ocorrência mais esporádica. Indivíduos da espécie *O. coarctata* são comumente encontrados em pátios, acumulados nos cantos de paredes externas e em valas presentes no solo (BENNETT; KERR, 1973). A espécie *O. gracilis* já foi notificada como sendo um sério problema em casas de vegetação ao se alimentarem de mudas (McDANIEL, 1931).

Em relação à agricultura, a Classe Diplopoda merece uma atenção especial. Em épocas de estiagem prolongada, populações inteiras de diplópodos chegam a atacar tubérculos, frutos e raízes em busca de alimento (SCHUBART, 1942).

Na África, a espécie *Odontopyge attemsi* atacou mudas de mandioca na ilha Kwale, fazendo com que os habitantes fossem obrigados a deslocar suas plantações para terras na região continental (SCHUBART, 1942). Boock e Lordello (1952) comentaram sobre os danos que a espécie *Pseudonannolene paulista* causou aos tubérculos de batatinha no estado de São Paulo, levando a perdas de 30% na produção. Garcia e Campos (2001) alertam que os piolhos-de-cobra podem danificar sementes em germinação, causando falhas no plantio e obrigando o replantio.

A espécie *Spinotarsus caboverdus*, presente em Cabo Verde, África, há 30 anos, é reconhecida por danificar muitas culturas importantes para a alimentação dos habitantes. Todas as medidas de controle químico e biológico já foram testadas, porém sem sucesso. A espécie rapidamente se adaptou às condições ambientais da região e, assim, conseguiu se dispersar e manter uma alta densidade populacional. Estudos realizados em laboratório revelaram que os indivíduos da espécie produzem apenas uma geração por ano, sugerindo que o número incontrolável de *S. caboverdus* presente no país é devido à falta de predadores naturais e ao ambiente dos canais de irrigação, favorecendo o seu desenvolvimento. A espécie é responsável por infestar inúmeras culturas, como batata, batata doce, abóbora, tomate, mandioca, melão, feijão e milho. Frutas como mamão, manga, banana e abacaxi também são danificadas (NASCIMENTO et al., 2001; 2002).

Estudos em Uganda, África, demonstraram que milípedes são uma importante praga em lavouras de batata-doce do país, especialmente durante o estabelecimento da cultura. Lavouras de milho também são afetadas quando plantadas próximas aos refúgios dos indivíduos e danos em plantações de amendoim são bastante graves se o plantio ocorrer no início da primeira temporada de chuvas (EBREGT et al., 2005).

Para estabelecer a relação dos milípedes com os danos causados nas plantações de batata-doce, Ebregt et al. (2004) entrevistaram 148 fazendeiros de Uganda. Segundo os relatos de 126 produtores, estes organismos foram responsáveis por danos significativos nas plantações da região. As entrevistas também mostraram um desconhecimento dos fazendeiros em relação aos milípedes, uma vez que os danos causados por estes, muitas vezes, foram confundidos como sendo causados por outras pragas, como besouros.

Ainda na África, na Nigéria, houve relatos de plantações de amendoim atacadas por duas pragas principais, milípedes e cupins, e pragas menos representativas, como larvas e nemátodes. Dentre as espécies de milípedes presentes, a mais prejudicial é a *Peridontopyge spinosissima* (MISARI, 1975) e a perda estimada de produção varia de acordo com o local e o ano (JOHSON, 1978).

Em Senegal, segundo Gautreau e De Pins (1980), infestações de insetos e miriápodos nas plantações são transitórias, apesar da ocorrência, em alguns anos, de sérios danos causados por milípedes. No Sudão, milípedes da ordem Julidae aparecem em grande número no começo da estação chuvosa, atacando as partes moles das plantas durante a noite. Durante o dia, eles se escondem sob a sombra das árvores, cascas e em fendas no solo (ISHAG et al., 1980).

Relatos de pesquisadores e reclamações de fazendeiros do oeste africano sugerem um aumento na importância econômica de milípedes, principalmente do gênero *Peridontopyge*, de cupins e de larvas na produção de amendoim. Destacam também a necessidade de fornecer intervenções focadas neste grupo de pragas (UMEH et al., 2001). Em Burkina Faso, milípedes são potenciais pragas econômicas por danificar plantações de amendoim, atacando as plântulas e as vagens. Eles são responsáveis por uma perda de 10% a 35% da produção. Das 13 espécies responsáveis por atacar as plantações, a maioria pertence ao gênero *Peridontopyge* (LYNCH et al., 1988).

No Reino Unido, mudas de beterraba são danificadas por uma variedade de artrópodos, como colêmbolos, sínfilos, besouros e milípedes, estes últimos principalmente das espécies *Blaniulus guttulatus* e *Brachydesmus superus*. O ataque destas pragas às plantações ocorre ao mesmo tempo, onde se alimentam de raízes e, consequentemente, causam lesões

que não só atingem diretamente a planta como também propiciam a entrada de patógenos secundários (WINDER et al., 1993).

Recentemente, Filotas e Allen (2008a, b) relataram que milípedes da espécie *Cylindroiulus caeruleocinctus* têm se tornado um problema crescente em Ontário, Canadá. Os indivíduos da espécie são capazes de agir como pragas primárias e secundárias em plantações de milho, ginseng, batata doce e cenoura, atacando suas raízes. Os autores não os consideram como sendo uma nova praga, uma vez que é provável que eles tenham causado danos no passado, os quais podem ter sido confundidos como sendo causados por vermes e larvas. Diferentemente do esperado, mesmo em uma estação seca, a população desta espécie pode se desenvolver, uma vez que as culturas agem como fonte de umidade. Como não há nenhum pesticida ou CIP (Controle Integrado de Pragas) em andamento para o controle de milípedes em Ontário, os pesquisadores sugerem uma melhor compreensão sobre a biologia da espécie.

Brunke et al. (2009), em um estudo sobre predadores de milípedes, encontraram uma alternativa para o controle da espécie na região, uma vez que *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) é um predador natural de *C. caeruleocinctus*, podendo agir como um regulador da população.

No estado da Pensilvania, EUA, plântulas de carvalho americano (*Quercus rubra*) sempre foram afetadas por insetos, sendo os indivíduos mais representativos os besouros (*Stelidota octomaculata*), as mariposas (*Valentinia glandulella*) e os carunchos (*Conotrachelus posticus*). Porém, um novo tipo de dano às plântulas foi verificado, provavelmente causado por milípedes da espécie *Ptyoiulus impressus*, uma vez que larvas de insetos não foram encontradas junto à planta (GALFORD et al., 1992).

Além de serem pragas por si só, diplópodos também são reconhecidos por agravar os danos causados por outras pragas (HOPKIN; READ, 1992; LAWRENCE, 1984)

Técnicas para o controle de milípedes nas plantações estão sendo desenvolvidas a fim de diminuir os danos causados por estes organismos. Epidi e Njoku (2010) conduziram estudo de campo para avaliar o potencial biocida de extratos de plantas contra a espécie *Spirostreptus assiniensis*, responsável por infestar culturas de mandioca. Foram utilizados extratos de neem (*Azadirachata indica*), pimenta de São Tomé (*Piper guineense*) e *Dracenea arborea* com sucesso no controle da infestação, uma vez que os milípedes apresentaram alta mortalidade quando comparado ao controle.

O controle das infestações nas casas envolve, primeiramente, o tratamento da área externa. Pode-se aplicar pesticidas a fim de formar uma barreira de 1,5 m a 3 m ao redor da casa, bem como remover a serapilheira, placas, pedras e entulhos, lugares usados como

esconderijos. Os pesticidas mais comumente utilizados são à base de carbamato, como o carbaril, propoxur e o bendiocarbe. Pesticidas que contêm piretróides sintéticos, como a bifentrina, ciflutrina, cipermetrina e deltametrina são mais novos e também podem ser utilizados (SLODERBECK, 2002).

Porém, Boccardo e Fernandes (2000) avaliaram a toxicidade do carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger* e concluíram que estes inseticidas não apresentaram eficiência para os indivíduos.

Dentro das casas, caso seja uma infestação de pequeno porte, o problema pode ser solucionado com um aspirador de pó ou coletando os indivíduos com a própria mão. Caso seja de maior amplitude, pode-se aplicar pesticidas aerossóis diretamente nos indivíduos, em rodapés, rachaduras, fissuras e outros esconderijos. Iscas também podem ser utilizadas (KEITH; BAXENDALE, 1996).

Apesar de serem potenciais pragas, já foram relatados casos de milípedes sendo utilizados com êxito no controle biológico, como o diplópodo *Rhinocricus arboreus*, o qual atacou a cochonilha *Lepidosaphes beckii* (praga da laranja) em Porto Rico (SCHUBART, 1942).

II.4. Túbulos de Malpighi

Nos diplópodos, a excreção está relacionada, sobretudo, a bioacumulação. O corpo gorduroso armazena ácido úrico como urato de potássio; as células hepáticas, o ovário e os túbulos de Malpighi podem acumular sais minerais em diferentes graus, de acordo com a fase do ciclo de muda (HUBERT, 1979).

Neste grupo, os túbulos de Malpighi têm como principal função a excreção de nitrogênio, embora muitas outras moléculas também possam ser eliminadas por esta via (HOPKIN; READ, 1992). Uma grande quantidade de grânulos contendo ácido úrico e metais pode acumular-se dentro das células e, então, ser eliminada para o lúmen do órgão para posterior excreção junto às fezes (HUBERT, 1979).

Além da excreção, os túbulos de Malpighi também podem apresentar especializações para a reabsorção de água em alguns segmentos, como no diplópodo *Polyxenus lagurus*, habitante de climas secos (HOPKIN; READ, 1992). Os túbulos de Malpighi desta espécie estão intimamente associados ao intestino posterior, sendo revestido por um epitélio de células achatadas. Segundo Schlütler e Seifert (1985), este complexo assemelha-se ao sistema criptonefridial de insetos e é responsável por gerar um gradiente osmótico que promove a reabsorção de água do reto. Mais recentemente, Wright e Westh (2006) observaram que a

espécie também é capaz de absorver água em forma de vapor, provavelmente através deste mesmo complexo. Aparentemente, as outras classes de milípedes não possuem esta especialização para a reabsorção de água através dos túbulos de Malpighi (SEIFERT, 1979; HOPKIN; READ, 1992).

Ainda em relação aos túbulos de Malpighi da espécie *P. lagurus*, quatro segmentos podem ser visualizados: (1) um segmento distal, unido por uma pequena zona de transição a (2) um segmento delgado no interior de um segmento perinefridial. Este conduz para (3) um segmento espesso que não possui microvilosidades, o qual une-se a (4) ao segmento proximal, desembocando no intestino posterior (HOPKIN; READ, 1992).

Miley (1930) conduziu um estudo sobre a morfologia interna do diplópodo *Euryurus erythropygus*, no qual realizou análises histológicas dos túbulos de Malpighi. Observou que o epitélio é constituído de células com núcleos fortemente corados e constatou a presença de uma membrana basal e a ausência de camadas musculares.

Os estudos sobre a estrutura e função dos túbulos de Malpighi na Classe Diplopoda são mais frequentes na espécie *Glomeris marginata*, encontrada no Hemisfério Norte (HOPKIN; READ, 1992).

Farquaharson (1974 a, b, c) realizou estudos acerca da fisiologia de túbulos de Malpighi da espécie *G. marginata*, revelando que os hormônios diuréticos não estão envolvidos na excreção, a qual é dependente da disponibilidade de sódio, podendo ser inibida pelo 2,4-dinitrofenol, pelo cianeto, pela azida e por altas concentrações de potássio. Constatou-se, também, que a taxa de secreção varia inversamente com a pressão osmótica e que não há diferença de potencial elétrico através da parede dos túbulos. Em relação à permeabilidade, os estudos revelaram que os túbulos de Malpighi atuam como um filtro molecular, onde as moléculas se movem através da parede em uma relação inversa ao seu tamanho.

Análises ultra-estruturais realizadas por Johnson e Riegel (1977a) em *G. marginata* revelaram diferenças morfológicas significativas entre o segmento superior, secretor de fluídos, e o segmento inferior, que possui função desconhecida. Diferenças consideráveis entre o fluído secretado pelo segmento superior e pelo segmento inferior também podem ser encontradas. O epitélio contém espaços intercelulares, aparentemente, para permitir uma rota extracelular de baixa resistência entre a hemolinfa e o lúmen do túbulo. Estudos histoquímicos realizados para a localização de enzimas revelaram vesículas intracelulares com atividade de fosfatase ácida. O labirinto basal da porção inferior apresentou considerável atividade da fosfatase alcalina no mesmo local de enzimas reveladas por duas técnicas

diferentes de localização de ATPase. Estudo complementar realizado pelos mesmos autores (1977b) para investigar a permeabilidade das porções inferior e superior demonstrou que moléculas, como a proteína ferritina, podem cruzar a lâmina basal e alcançar o lúmen da porção superior.

III. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral descrever a morfologia dos túbulos de Malpighi de *U. atrobrunneus*, uma vez que a espécie vem apresentando, ocasionalmente, infestações e expansões populacionais no estado de São Paulo, podendo se tornar uma praga urbana.

Para tanto, o projeto visou:

1. Descrever a distribuição dos túbulos de Malpighi na cavidade corpórea do animal
2. Descrever a histologia dos túbulos de Malpighi;
3. Analisar histoquimicamente a presença de proteínas, polissacarídeos, cálcio nos tecidos que compõem os túbulos de Malpighi e, assim, esclarecer e compreender sua fisiologia;
4. Descrever a ultra-estrutura das células que compõem os túbulos de Malpighi

IV. Materiais e Métodos

IV.1. Materiais

Espécimens adultos de *U. atrobrunneus* foram coletados manualmente na área urbana da cidade de Rio Claro, SP, durante os meses de dezembro a março, época chuvosa do ano, na qual o número de indivíduos é maior. Posteriormente, foram levados ao laboratório (temperatura 23°C; fotoperíodo 12:12) onde foram mantidos em terrários .

IV.2. Métodos

Os espécimens adultos, tanto machos quanto fêmeas, foram anestesiados com éter e dissecados em solução fisiológica, para a retirada dos túbulos de Malpighi, os quais foram fixados em paraformaldeído 4%, solução Bouin ou glutaraldeído 2.5%, dependendo da técnica a ser empregada.

IV.2.1. Histologia

Após fixação, o material foi desidratado em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95%, durante 10 a 15 minutos cada banho e, então, transferido para uma solução de resina (Leica), durante 24 horas em geladeira.

Após este processo, o material foi colocado em moldes previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo Leica RM2245. Os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, conforme rotina histológica, para posterior observação e documentação fotográfica.

IV.2.2. Histoquímica

Os testes histoquímicos utilizados foram os seguintes:

a. Técnica do Azul de Bromofenol, segundo Pearse (1985).

Fixação do material em solução Bouin ou paraformaldeído 4% por 24 horas; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por 2 horas; lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético por 5 minutos.

b. Técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff), segundo Junqueira e Junqueira (1983).

Fixação em solução Bouin; oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%; exposição ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; passagem em água sulfurosa por 9 minutos; lavagem por 30 minutos em água corrente.

c. Método de von Kossa, segundo Junqueira e Junqueira (1983).

Fixação em solução Bouin por aproximadamente 24 horas; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para hidroquinona; imersão em fixador F-5 por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com hematoxilina.

IV.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os indivíduos foram dissecados diretamente em fixador glutaraldeído a 0.5% e as estruturas fixadas em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato 0.2M durante 2 horas, a 4° C. Foram, então, realizadas duas lavagens do material em tampão cacodilato de 15 minutos cada e a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora, também a 4° C, seguido de dois banhos do mesmo tampão com duração de 15 minutos cada. Para contrastação, o material foi passado em acetato de uranila dissolvido em acetona durante 8 horas, desidratado e, posteriormente, embebido em resina Epon diluída em acetona 1:1, onde permaneceu durante 24 horas em agitador a 4° C. O material foi então incluído em Resina Epon pura e levado para estufa por 72 horas a 60° C, para polimerização. Os cortes semi e ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo. Os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%). Os cortes ultrafinos foram colocados em telas, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As telas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips.

V. Resultados

Os indivíduos da espécie *U. atrobrunneus* apresentam dois túbulos de Malpighi alongados que percorrem praticamente toda a cavidade do corpo do animal, desde a região anterior até a região do íleo/cólon (intestino posterior); inserem-se no piloro (fig. 1A), a primeira porção do intestino posterior, e estão dispostos ao redor do trato digestório e por entre as células que compõem o corpo gorduroso.

A fim de investigar se os túbulos apresentam diferenças estruturais ao longo de seu comprimento e para melhor compreensão dos resultados, a descrição dos túbulos será apresentada de acordo com sua localização no corpo do animal.

V.1 Região anterior

Na região anterior da espécie *U. atrobrunneus* é possível observar o intestino anterior ladeado por glândulas salivares. As glândulas são compostas por uma porção secretora, localizada mais externamente, e por ductos secretores, localizados entre a porção secretora e o intestino anterior (fig. 2A).

Entre o intestino e a porção secretora das glândulas salivares localizam-se os túbulos de Malpighi (fig. 2A). Nesta região ele é formado por uma camada de células cúbicas apoiada em uma fina membrana basal (fig. 2B). As células apresentam núcleo arredondado, localizados na região apical (fig. 2B).

Algumas regiões do túbulo apresentaram células com a região apical menos corada (fig. 2B), enquanto que em outras regiões foi possível observar células com a região basal menos corada (fig. 2C). Bordo em escova foi observado na região apical do epitélio (cabeça de seta na fig. 2D). O lúmen possui muitas vesículas de secreção, as quais puderam ser observadas sendo liberadas pelas células (fig. 2B); em algumas regiões do lúmen foi possível visualizar a presença de núcleos, provavelmente liberados via secreção holócrina (fig. 2E).

A técnica para detecção de proteínas totais revelou forte presença deste elemento nas células de algumas regiões do túbulo (fig. 3A), enquanto que em outras a reação foi menos intensa (fig. 3B). No lúmen, algumas vesículas de secreção apresentaram conteúdo moderadamente positivo à técnica (fig. 3A), enquanto que em algumas regiões do túbulo as vesículas se mostraram negativas (fig. 3B).

Presença de polissacarídeos neutros foi observada na membrana basal (fig. 3C). As células apresentaram-se negativas à técnica, porém com o bordo em escova fracamente

positivo (fig 3C). A grande maioria das vesículas de secreção apresentou-se negativa, com algumas vesículas fracamente positivas (Fig 3C).

Cálcio não foi observado nos constituintes do túbulo de Malpighi (fig. 3D).

A ultra-estrutura das células do túbulo de Malpighi desta região revelou que a lâmina basal é formada por uma camada de fibras com eletrodensidade homogênea (fig. 4A). A membrana plasmática basal é invaginada a fim de formar um complexo labirinto de canais que se estendem até a região apical (figs. 4A-D). Na região onde o labirinto basal encontra a lâmina basal é possível observar estruturas escuras que correspondem aos hemidesmossomos (cabeças de seta no detalhe da fig. 4B). Nos compartimentos citoplasmáticos do labirinto é possível observar mitocôndrias grandes (fig. 4A). Na região apical foi observada a presença de vacúolos (figs 4A-D) e de microvilosidades longas e espaçadas entre si (figs 4A-D). No citoplasma, pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso foi encontrada (cabeça de seta no detalhe da figura 4C). Entre duas células vizinhas é possível observar as interdigitações da membrana lateral (fig. 4D) e junções septadas que seguem até o labirinto basal.

A morfologia proposta para as células que compõem esta região dos túbulos encontra-se na fig. 1B.

V.2 Região Média

Os túbulos de Malpighi que percorrem a região do intestino médio são formados por um epitélio colunar simples apoiado em uma fina membrana basal (fig. 5A-D). O citoplasma das células possui variação na coloração, sendo possível observar que a região basal, logo em contato com a membrana basal, apresenta-se menos corada em relação à região apical (fig. 5A).

Os núcleos podem ser encontrados na região apical (fig. 5A) ou basal (fig. 5C) e é possível distinguir duas morfologias distintas: núcleo arredondado (fig. 5A) e núcleo com contorno irregular (fig. 5B). Os núcleos esféricos apresentam cromatina condensada principalmente próxima ao envoltório nuclear, enquanto que os núcleos com morfologia irregular são compactos.

Em algumas regiões do túbulo de Malpighi observa-se um bordo em escova bem desenvolvido, podendo chegar até a mesma altura da célula (cabeças de seta na fig. 5B). Algumas regiões do lúmen continham secreções libradas por via holócrina, uma vez que núcleos foram observados no lúmen (fig. 5D).

Algumas regiões do túbulo apresentaram células com todo o citoplasma fortemente positivo para o teste de detecção de proteínas, enquanto que outras regiões apresentaram células com a região basal fracamente positiva e região apical fortemente positiva; no lúmen, as secreções apresentaram-se moderadamente coradas (fig. 6A).

Presença de polissacarídeos neutros foi evidenciada apenas na membrana basal. Algumas regiões do túbulo apresentaram células cujo citoplasma apresentava pequenas quantidades deste elemento (fig. 6B).

A análise para detecção de cálcio revelou que tanto as células quanto as secreções são negativas à técnica (fig. 6C).

Pela análise da ultra-estrutura das células desta região foi possível observar que a lâmina basal é composta por uma camada fibrosa (fig. 7A, B) e que as invaginações da membrana plasmática basal formam um labirinto basal extremamente desenvolvido (fig. 7A, B); hemidesmossomos podem ser observados no contato do labirinto basal com a lâmina basal (cabeças de setas na fig. 7B). Os compartimentos citoplasmáticos formados pelas invaginações da membrana concentram uma grande quantidade de mitocôndrias ligeiramente menores quando comparadas às encontradas nas células da região anterior (fig. 7B). Na região apical da célula é possível observar microvilosidades longas pouco espaçadas entre si (fig. 7C) e o núcleo com cromatina condensada, principalmente próxima ao envoltório (fig. 7D). O citoplasma apresenta pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta no detalhe da fig. 7D), porém grande quantidade de ribossomos livres (cabeças de seta na fig. 8A); retículo endoplasmático liso e Golgi não foram visualizados. Entre duas células vizinhas são encontradas interdigitações da membrana lateral e junções septadas, as quais partem da região apical até chegarem nas invaginações da membrana basal (fig. 8A). No lúmen do túbulo está presente secreção com material semelhante ao citoplasma da célula (fig. 8B).

A morfologia proposta para as células que compõem esta região dos túbulos encontra-se nas figs. 1C e 1D.

V.3 Região do piloro: local de inserção dos túbulos de Malpighi no intestino posterior

Os túbulos de Malpighi na região do piloro possuem uma camada de células cúbicas apoiadas em uma membrana basal muito desenvolvida (fig. 9A).

Os núcleos apresentaram morfologia arredondada, com cromatina condensada principalmente próxima ao envoltório nuclear. A localização dos núcleos apresentou-se

variável, sendo que na região do túbulo antes da inserção eles foram encontrados na região apical das células (fig. 9A) e na região do túbulo que se insere no piloro eles foram encontrados na região basal (fig. 9B).

Não foi observado bordo em escova nesta região; o citoplasma das células não apresentou variação na coloração; foram observadas vesículas de secreção sendo liberadas em direção ao lúmen, algumas contendo núcleos das células (fig. 9C).

A técnica para detecção de polissacarídeos neutros revelou reação fortemente positiva na membrana basal dos túbulos. Presença deste elemento também foi observada no citoplasma das células em algumas regiões. As secreções apresentaram-se negativas à técnica (fig 10A).

Proteínas totais foram encontradas em grande quantidade na região apical das células; a região basal e as secreções apresentaram-se fracamente positivas à técnica (fig 10B).

O teste de von Kossa não indicou presença de cálcio nas células e nas secreções desta região do túbulo (fig. 10C).

A morfologia proposta para as células que compõem esta região dos túbulos encontra-se nas figs. 1E e 1F.

V.4 Região Posterior

Os túbulos de Malpighi na região posterior seguem até a região do íleo. Nesta região eles também são formados por uma camada de células cúbicas apoiada em uma fina membrana basal (fig. 11A-C). As células possuem citoplasma homogêneo, ou seja, não apresentam coloração menos intensa na região basal como observado nas células do túbulo das outras regiões. Na região apical das células não foi observado bordo em escova. Os núcleos possuem morfologia esférica e são encontrados na região apical ou mediana das células. Os núcleos apresentam cromatina bem condensada, vários com aspectos de início de divisão. No lúmen foram observados núcleos, evidenciando a secreção holócrina (fig. 11B); secreção aprócrina também foi observada (fig 11C).

O citoplasma das células apresentou-se moderadamente positivo à técnica de azul de bromofenol; as secreções presentes no lúmen apresentaram-se fracamente positivas (fig. 12A).

Polissacarídeos neutros foram encontrados na membrana basal e no citoplasma das células, principalmente na região apical; este elemento não foi observado nas secreções (fig. 12B).

Cálcio não foi detectado nas células desta região (fig. 12C).

A morfologia proposta para as células que compõem esta região dos túbulos encontra-se na fig. 1G.

VI. Discussão

O número de túbulos de Malpighi encontrado nos artrópodos varia de acordo com a espécie. Pode-se encontrar desde dois até cerca de 250, como no gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria*. Em alguns grupos de insetos, como colêmbolos e afídeos, eles não são encontrados (RUPPERT et al. 2005). De modo geral, em milípedes, é encontrado um par de túbulos (HOPKIN; READ, 1992).

Como descrito para o grupo, em *U. atrobrunneus* foi encontrado um par de túbulos, o qual percorre praticamente toda a extensão do corpo do animal, sendo que uma das extremidades insere-se no piloro, região que marca o início do intestino posterior. A partir da inserção no piloro, os túbulos seguem para a região anterior, percorrendo todo o intestino médio. Na região anterior eles dobram-se sobre si e dão várias voltas até seguir novamente para a região posterior até a altura do íleo.

Estudos envolvendo túbulos de Malpighi de insetos classificam este órgão em quatro tipos de acordo com suas características: ele pode apresentar-se associado ao intestino médio, formando uma estrutura denominada câmara-filtro (MARSHALL; CHEUNG, 1974; HUBERT et al., 1989); possuir a região distal inserida no reto, originando uma estrutura chamada de criptonefrídio (SAINI, 1964; GREEN, 1980; DALLAI et al., 1991; LEVY et al. 2004); podem ser fundidos entre si na base, formando uma estrutura que se assemelha a um ureter (GILLOT, 1995); ou possuir a extremidade distal livre na hemocoele, sendo o tipo mais encontrado em insetos.

Na espécie *U. atrobrunneus* nenhum dos tipos presentes nos insetos foram encontrados. Porém, uma estrutura morfológicamente semelhante ao sistema criptonefridial e à câmara-filtro foi observada na região anterior.

O sistema criptonefridial é encontrado em larvas e adultos de muitos Coleoptera, algumas larvas de Hymenoptera e Neuroptera, praticamente em todas as larvas de Lepidoptera (GILLOT, 1995) e em um único Diptera (GREEN, 1980). Neste arranjo, a porção distal do túbulo de Malpighi é intimamente associada ao reto e envolta por uma membrana perinéfrica. Este sistema é bem desenvolvido em insetos de clima seco e, neles, têm como principal função otimizar a reabsorção de água presente no reto (GILLOT, 1995).

Em diplópodos, o sistema criptonefridial já foi relatado na espécie *Polyxenus lagurus*, habitante de desertos (SCHLÜTLER; SEIFERT, 1985 apud HOPKIN; READ, 1992). Mais recentemente, Wright e Westh (2006) desenvolveram estudos com esta espécie e descreveram o primeiro exemplo de absorção de vapor d'água em miriápodos, o qual ocorre através do sistema criptonefridial.

Em hemípteros, a câmara-filtro é uma junção entre as extremidades anterior e posterior do intestino médio com os túbulos de Malpighi (MARSHALL; CHEUNG, 1974). É delimitada por uma membrana e funciona como um dispositivo para a filtragem de água dos solutos ingeridos (MARSHALL, 1973; CHAPMAN, 1998). Estes insetos se alimentam de floema ou xilema e, como esses fluídos possuem baixa concentração de nutrientes, um grande volume deve ser ingerido. Então, a câmara-filtro é responsável por eliminar rapidamente o excesso de água ingerido ao permitir que ela passe diretamente do intestino ao túbulo de Malpighi. Assim, o alimento é concentrado e a diluição da hemolinfa é evitada (CHAPMAN, 1998).

Assim como encontrado na câmara-filtro e no sistema criptonefridial, os túbulos de Malpighi da espécie aqui estudada também se associam intimamente ao trato digestório, porém na região anterior e não na região do intestino médio ou do intestino posterior como ocorre nos insetos. Nos resultados aqui encontrados é possível observar o intestino anterior, os ductos da glândula salivar e os túbulos de Malpighi envoltos por uma membrana, chamada de membrana externa do intestino anterior; externamente a essa membrana localiza-se a porção secretora da glândula salivar.

Provavelmente, a função do complexo encontrado em *U. atrobrunneus* esteja mais relacionada com a função da câmara-filtro dos hemípteros do que com a função do complexo criptonefridial. Os indivíduos da espécie *U. atrobrunneus* são encontrados apenas na época chuvosa do ano (dezembro a março), principalmente após longos períodos de chuvas e/ou umidade. A escassez de água não representa um problema para a espécie e, portanto, não é necessário reabsorvê-la do trato digestório. Porém, a abundância de água no habitat onde vivem pode ser um problema, uma vez que estes animais reviram o substrato. Como este substrato contém uma alta concentração de água, seria necessário eliminá-la, assim como fazem os hemípteros.

Outra hipótese refere-se à alta atividade metabólica das glândulas salivares presentes na região anterior. Em milípedes, elas têm como função auxiliar na lubrificação do alimento e na produção de enzimas (NUNEZ; CRAWFORD, 1977), sendo que a digestão só se inicia quando o alimento entra em contato com as secreções liberadas pelos ductos dessas glândulas (NUNEZ; CRAWFORD, 1976). Como essa região do corpo do animal apresenta alta atividade metabólica devido à produção de enzimas, uma grande quantidade de resíduos é produzida, fazendo com que seja necessária a presença dos túbulos de Malpighi para garantir que o ambiente dentro das células e desta região do animal esteja o mais próximo da condição ótima e, assim, garantir a homeostase do organismo.

As outras regiões do túbulo entram em contato com os órgãos presentes na cavidade do animal. Foram encontrados túbulos intimamente associados a todos os órgãos com grande atividade metabólica, como corpo gorduroso e gônadas. Deste modo, o túbulo é capaz de suprir as necessidades de excreção de todo o organismo.

A análise da morfologia dos túbulos de Malpighi das diferentes regiões do corpo do animal (região anterior, região média, região de inserção no piloro e região posterior) revelou que há algumas diferenças entre elas. Foi observado que toda a extensão dos túbulos é composta por uma única camada de células epiteliais. Este foi o padrão encontrado por Miley (1930) ao estudar a espécie *E. erythropygus* e é o padrão encontrado nos túbulos dos insetos (CHAPMAN, 1998).

Os túbulos de *U. atrobrunneus* podem ser considerados como formado por um epitélio cúbico simples. Em todas as regiões, as células estão apoiadas sobre uma membrana basal, a qual se apresenta mais desenvolvida na região de inserção com o piloro.

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008), a membrana basal é geralmente formada pela fusão de duas lâminas basais ou de uma lâmina basal e uma lâmina reticular. Lâminas basais são típicas de tecido epitelial e, sendo assim, também são encontradas nos túbulos de Malpighi de outras espécies de milípedes, como em *G. marginata* (FARQUASON, 1974c) e *E. erythropygus* (MILEY, 1930) e em outros grupos de artrópodos, como insetos (WIGGLESWORTH; SALPETER, 1962; MARSHALL; CHEUNG, 1974; MADDRELL, 1969).

Em *U. atrobrunneus* a lâmina basal é composta por apenas uma camada, como no himenóptero *Formica polyctena* (GARAYOA et al., 1992), no díptero *Calliphora erythrocephala* (BERRIDGE; OSCHMAN, 1969) e no hemíptero *Rhodnius prolixus* (WIGGLESWORTH; SALPETER, 1962), diferentemente do encontrado em outros insetos, onde é formada por duas camadas, como no himenóptero *Melipona quadrifasciata* (CRUZ-LANDIM, 1998), no coleóptero *Onymacris plana plana* (HANRAHAN; NICOLSON, 1987) e no ortóptero *S. gregaria* (GARRET et al., 1988).

A membrana basal tem como principal função dar suporte e estabilidade à célula, podendo agir também como um filtro para moléculas grandes (CIOFFI, 1984). Na região do piloro, onde foi observada uma membrana basal bem desenvolvida, a sua principal função deve estar relacionada com um papel estrutural. É nesta região que ocorre a inserção dos túbulos de Malpighi com o intestino e, assim, a membrana basal pode agir como um reforço para que a inserção ocorra de modo eficiente. Nas regiões do intestino anterior, médio e posterior a função da membrana basal deve estar relacionada com a seleção de substâncias

para entrada nas células dos túbulos, uma vez que ela está em contato direto com a hemolinfa e, dela, deve retirar as substâncias a serem excretadas.

Algumas regiões do túbulo apresentaram a região basal das células com coloração menos intensa em relação à região apical, devido à presença de invaginações da membrana plasmática na região basal conforme observado na análise ultra-estrutural, o que fez com que esta se corasse menos.

Sjöstrand e Rhodin (1953), em estudos ultra-estruturais, foram os primeiros a descobrir que a superfície basal das células dos túbulos proximais do rim é profundamente invaginada em direção ao citoplasma. Segundo Pease (1956) este sistema de invaginações é um artifício para aumentar a área na região basal da célula, uma vez que a presença da membrana basal impediria o desenvolvimento de microvilosidades.

Berkaloff (1960), Wessing (1965) e Taylor (1971a) relataram que, respectivamente, em *Gryllus domesticus*, *Drosophila sp* e *Carausius morosus* as invaginações da membrana basal das células dos túbulos de Malpighi também estão relacionadas com o processo de pinocitose. Porém, Peacock e Anstee (1977), ao estudar o túbulo de Malpighi do ortóptero *Jamaicana flava* não observaram atividade de pinocitose nessa região. A explicação para isso reside no fato de que as células dos túbulos de *G. domesticus*, *Drosophila sp* e *C. morosus* absorvem moléculas muito grandes, enquanto que as células de *J. flava* não. Berridge e Oschman (1969) sugeriram que as invaginações são responsáveis por criar um gradiente osmótico na região basal da célula e, assim, permitir a entrada da água por transporte passivo para dentro da célula.

Algumas regiões dos túbulos de Malpighi presentes na região média do animal apresentaram núcleos com formato irregular. A forma do núcleo é variável e característica de cada tipo celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), sendo que mudanças na sua arquitetura podem ocorrer durante os processos de desenvolvimento e de diferenciação (DIAS CORREIA; DIAS CORREIA, 2011). Segundo Ohshima (2008), morfologia nuclear anômala, como núcleo com formato irregular ou fragmentado, é frequentemente observado em células senescentes.

Em algumas regiões do túbulo de Malpighi de *U. atrobrunneus* foi possível observar núcleos com indício de divisão. Esta característica, juntamente com a presença de secreção holócrina, sugerem que o túbulo da espécie é muito dinâmico e está em renovação constante.

Grande quantidade de mitocôndrias foi observada no labirinto basal das células dos túbulos de Malpighi em *U. atrobrunneus*. Nas células dos túbulos presentes na região anterior

elas eram ligeiramente maiores e em menor quantidade em relação às células dos túbulos presentes na região média.

Segundo Kukel e Komnick (1989) e Cruz-Landim (1998) o fluxo de substâncias através da membrana plasmática da região basal é mediado por transporte ativo, tornando necessária a grande quantidade de mitocôndria nesta porção a fim de suprir a energia necessária aos transportadores de íons.

As junções laterais entre células adjacentes dos túbulos de Malpighi podem ser realizadas por junções gap (WALL et al, 1975; DALLAI et al, 1991), desmossomos O'DONNELL et al., 1985) e junções septadas (GREEN et al., 1980; SKAER et al., 1987; BEYENBACH et al., 2010).

Em *U. atrobrunneus* apenas junções septadas foram encontradas entre as células vizinhas. Este tipo de junção é encontrada apenas em artrópodos. Diferentemente das zonas de adesão, que formam uma faixa apenas na região apical, as junções septadas formam uma contínua área de adesão, podendo ser encontradas tanto na região apical quanto na basal. A necessidade de tal área de adesão no epitélio dos artrópodos deve-se a falta ou ao reduzido suporte de camadas musculares que ocorrem nos invertebrados (CIOFFI, 1984). Bradley (1985) afirma que as junções septadas evitam a passagem de moléculas grandes. Porém, Skaer et al. (1987) relataram que moléculas relativamente pequenas e mesmo moléculas grandes podem penetrar vagarosamente no lúmen do túbulo de Malpighi do inseto *R. prolixus*.

Alberts et al. (2010) afirmam que as células epiteliais são presas à lâmina basal através dos hemidesmossomos. De acordo com Berridge e Oschman (1969), as estruturas mais densas presentes no contato das invaginações com a lâmina basal nos túbulos de Malpighi de *C. erythrocephala* são hemidesmossomos, como as encontradas em *U. atrobrunneus*.

O citoplasma das células dos túbulos de Malpighi de *U. atrobrunneus* não é rico em organelas. Retículo endoplasmático rugoso foi raramente encontrado. Abundância de retículo endoplasmático liso é comum nas células produtoras de lipídio, função não desempenhada pelas células dos túbulos de Malpighi da espécie como sugere o observado na análise ultra-estrutural. Embora o lúmen dos túbulos de Malpighi evidencie que as células deste órgão sejam secretoras não foi encontrado grande quantidade de Golgi, como é o esperado para células com esta função (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na região posterior não foi observado diferença de coloração no citoplasma das células. Provavelmente, nessa região, a absorção de moléculas é menor e, por isso, a membrana plasmática não necessita das invaginações para aumentar sua superfície. Estudos ultra-estruturais realizados por Johnson e Riegel (1977a) nos túbulos do milípede *G.*

marginata não conseguiram determinar a função da região posterior, porém revelaram que a região anterior apresenta uma alta permeabilidade para compostos de alto peso molecular.

Na região do intestino anterior algumas regiões apresentaram células com a região apical menos corada. Analisando-se o lúmen dos túbulos é possível observar que ele é preenchido por uma grande quantidade de vesículas de secreção, evidenciando a função secretora dessa região, como o encontrado por Johnson e Riegel (1977a) no milípede *G. marginata*. É possível, então, que a região apical da célula apresente uma grande quantidade de vacúolos, os quais serão posteriormente secretados para o lúmen, fazendo com que ela se core menos.

Em praticamente toda a extensão do túbulo foi encontrado bordo em escova, sendo que em algumas regiões ele era mais desenvolvido que em outras. Segundo Junqueira e Carneiro (2004) o bordo em escova é formado por microvilosidades e pelo glicocálice. Cioffi (1984) relata a existência de dois tipos de microvilosidades, denominadas de tipo I e tipo II. Segundo o autor, o tipo I é típico do intestino dos vertebrados, onde todas as microvilosidades possuem o mesmo tamanho, e o tipo II é aquele que não possui um padrão de organização regular, podendo variar de tamanho. Em *U. atrobrunneus*, a análise ultra-estrutural revelou a presença de microvilosidades do tipo II, assim como o encontrado nos túbulos de Malpighi de insetos (BERREDGE; OSCHMAN, 1969; BRADLEY; SATIR, 1981).

Nos túbulos de Malpighi, a presença das microvilosidades está relacionada, sobretudo, com o transporte de íons para o lúmen (BRADLEY, 1983), embora haja estudos que relatam uma possível reabsorção de fluído na região posterior (MADDRELL, 1969).

Em algumas espécies de insetos as microvilosidades podem apresentar algumas organelas. Olavarrieta (2000) descreveu a presença de cisternas do retículo endoplasmático liso nas microvilosidades dos túbulos de Malpighi da formiga *Solenopsis saevissima* e Hanrahan e Nicolson (1987) relatou sua presença nas células dos túbulos do coleóptero *O. plana plana*; mitocôndrias associadas às microvilosidades foram encontradas nos túbulos do díptero *Arachocampa luminosa* (GREEN, 1979), do hemíptero *R. prolixus* (BRADLEY, 1983), do coleóptero *O. plana plana* (HANRAHAN; NICOLSON, 1987), do odonata *Aeshna cyanea* (KUKEL; KOMNICK, 1989) e do ortóptero *J. flava* (PEACOCK; ANSTEE, 1977). Na espécie aqui estudada não foi encontrada nenhuma organela associada a elas, assim como ocorre no milípede *Glomeris marginata* (JOHNSON; RIEGEL, 1977b).

Em algumas espécies de insetos os túbulos de Malpighi podem ser formados por até quatro tipos de células. *C. erythrocephala* (BERRIDGE; OSCHMAN, 1969), *Carausius morosus* (TAYLOR, 1971b), *J. flava* (PEACOCK; ANSTEE, 1977) e *Aedes taeniorhynchus*

(SATMARY; BRADLEY, 1984) possuem túbulos com dois tipos de células, as primárias e as estreladas, também denominadas tipo I e tipo II, respectivamente.

As células primárias possuem membrana basal com muitas invaginações, membrana apical com microvilosidades e são as mais comuns; as células estreladas são caracterizadas pela presença de canais extracelulares na membrana basal e ausência de mitocôndrias nas microvilosidades e têm função incerta, apesar de que Martoja (1959) e Taylor (1971b) sugeriram que ela é responsável por secretar mucopolissacarídeos e Berridge e Oschman (1969) sugeriram que podem reabsorver sódio do lúmen do túbulo.

A mosca *Musca domestica* (SOHAL et al., 1976) e o díptero *Arachnocampa luminosa* (GREEN, 1979) possuem, além dos tipos I e II, outros dois tipos de células, III e IV. O tipo III possui retículo endoplasmático bem desenvolvido e citoplasma com inúmeros corpos eletrodensos; o tipo IV assemelha-se ao tipo I, exceto pela ausência de mitocôndrias nas microvilosidades (SOHAL, 1974).

As células encontradas em *U. atrobrunneus* se assemelham ao tipo IV, uma vez que possuem muitas invaginações na região basal e ausência de mitocôndrias nas microvilosidades. Na análise ultra-estrutural foi possível observar que as células presentes nos túbulos de Malpighi da região anterior possuem menos microvilosidades em relação às células dos túbulos da região média. Outra diferença entre elas refere-se às invaginações da membrana basal, uma vez que as células dos túbulos da região anterior possuem menos invaginações, mas com compartimentos citoplasmáticos maiores e as células dos túbulos da região média possuem um maior número de invaginações com compartimentos citoplasmáticos menores.

Hopkin (1989) e Hopkin e Read (1992) relataram a existência de grânulos de composição desconhecida nas células dos túbulos de Malpighi de diplópodos. Muitos pesquisadores já relataram a existência desses grânulos nos túbulos de insetos (BERKALOFF, 1960; WIGGLESWORTH; SALPETER, 1962; MELLO; BOZZO, 1969; CRUZ-LANDIM, 2000; DELAKORDA et al., 2009; FERREIRA, 2010). Esses grânulos são esféricos, possuem laminação concêntrica e conteúdo mineral (TURBECK, 1974); estão relacionados com a excreção de metais pesados e materiais orgânicos e inorgânicos (HAZELTON et al., 2001). Hazelton et al. (1988) e Spring e Felgenhauer (1996) observaram a liberação destes grânulos no lúmen do túbulo de insetos, comprovando a sua função excretora.

A análise ultra-estrutural dos túbulos de *U. atrobrunneus* não revelou a presença destes grânulos nas células. Provavelmente, nesta espécie, os túbulos de Malpighi não estão envolvidos no armazenamento de substâncias tóxicas a serem excretadas. Estes grânulos

podem ser encontrados em outros órgãos do animal, como no intestino médio (SOUSA, 2011) e no corpo gorduroso (BOZZATTO, com. pes.). Portanto, o túbulo de Malpighi de *U. atrobrunneus* não está relacionado com a excreção de metais.

De acordo com Ruppert et al. (1996), o conteúdo dos túbulos deriva mais da secreção do que da filtração, onde a água entra passivamente como consequência do transporte ativo de íons. O ácido úrico, formado nos tecidos e eliminado na hemolinfa, é então coletado pelas células dos túbulos juntamente com aminoácidos e sais. Essas substâncias juntas são secretadas no interior do lúmen.

De acordo com Junqueira e Carneiro (2004) há três tipos de secreção: merócrina, holócrina e apócrina. Na secreção merócrina a célula secreta via exocitose, sem perda de material celular; na secreção holócrina o produto de secreção é eliminado juntamente com toda a célula, processo que envolve a destruição da mesma; a secreção apócrina é um tipo intermediário, onde o produto de secreção é descarregado junto com porções do citoplasma.

Analisando o conteúdo do lúmen dos túbulos, pode-se observar que, em *U. atrobrunneus*, ocorre tanto secreção holócrina quanto apócrina. Secreção apócrina já foi descrita no lúmen dos túbulos do inseto *Epilachna varivestis* por Schlüter et al. (1982) e, em diplópodos, já foi relatada no intestino médio por Fontanetti et al. (2001) para espécie *P. setiger*, por Fantazzini et al. (2002) para *R. padbergi* e por Sousa (2011) para *U. atrobrunneus*; secreção holócrina já foi descrita por Hefner (1929) em alguns diplópodos. Em *U. atrobrunneus*, a secreção holócrina é evidenciada pela presença de núcleos e material semelhante ao citoplasma em algumas regiões dos túbulos e a secreção apócrina é evidenciada pelas vesículas de secreção com parte do citoplasma sendo liberado.

Segundo Chapman (1998), o sistema excretor é o responsável por manter a homeostase do organismo. Este processo envolve a manutenção do nível constante de sais, água e pressão osmótica na hemolinfa, a eliminação de substâncias nitrogenadas e de outros compostos tóxicos absorvidos. Sendo assim, é possível que algumas células estoquem grande quantidade de material a ser excretado, material tóxico tanto para o organismo como um todo quanto para a célula. Em certo momento, o estoque dessas substâncias pode atingir um limite máximo, no qual as funções da célula sejam afetadas, fazendo com que elas sejam inteiramente eliminadas em direção ao lúmen dos túbulos via secreção holócrina.

De acordo com a técnica de azul de bromofenol, pôde-se constatar reação positiva ao longo de todo o túbulo, porém com variação na intensidade da coloração nas diferentes regiões dos túbulos e dentro das células. Martinelli (1998) constatou que a reação para a técnica de proteínas totais foi positiva ao longo dos túbulos de operárias de *Atta sexdens*,

apresentando uma pequena variação de coloração entre a região distal e proximal do túbulo devido à presença de grânulos mineralizados refringentes na região distal.

No lúmen, secreções moderadamente positivas e negativas foram encontradas. Nas regiões onde a reação foi moderadamente positiva, observa-se que o citoplasma das células também se corou muito, evidenciando a grande quantidade de material protéico a ser excretado. Nas regiões onde o lúmen apresentou secreções sem conteúdo protéico, a coloração do citoplasma das células foi menos intensa.

A variação de coloração dentro das células pode ser explicada, na região basal, pela presença das invaginações da membrana e, na região mediana/apical, pela presença de vesículas de secreção que não possuem conteúdo proteico.

A técnica de PAS revelou presença de polissacarídeos neutros principalmente na membrana basal, devido à presença de glicoproteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Diferentemente do encontrado por Martinelli (1998) em *A. sexdens* e Dimitriadis e Pirpasopoulou (1992) em *Drosophila auraria*, onde todo o túbulo apresentou grande concentração de polissacarídeos neutros, em *U. atrobrunneus* presença deste elemento foi encontrada apenas em algumas regiões dos túbulos e em poucas secreções. Provavelmente, o citoplasma das células destas regiões armazena este elemento para posterior excreção no lúmen. Porém, segundo Hopkin e Read (1992) os túbulos de Malpighi de milípedes têm como principal produto de excreção nitrogênio.

Os resultados para a detecção de cálcio revelou que os túbulos de Malpighi da espécie não possuem este elemento. Em diplópodos, cálcio é um elemento muito importante e encontrado em grande quantidade no corpo gorduroso (FONTANETTI et al., 2004), nos ovários (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004) e no tegumento (HOPKIN; READ, 1992).

As células dos túbulos de Malpighi já foram descritas como sendo armazenadoras de cálcio em espécies de insetos, como em larvas de lepidópteros (CHEUNG; WANG, 1994) e durante a fase de formação da pupa em dípteros (GRODOWITZ; BROCE, 1983).

VII. Conclusões

A partir da análise morfológica, histoquímica e ultra-estrutural dos túbulos de Malpighi da espécie *U. atrobrunneus*, bem como de sua distribuição no corpo do animal pudemos observar que:

- O número de túbulos de Malpighi encontrado é dois, padrão para os milípedes
- Os túbulos inserem-se no piloro e, a partir dele, dirigem-se à região anterior do animal, retornando à região posterior até a altura do íleo.
- Na região do intestino anterior ele está intimamente associado ao intestino e envolto por uma membrana, formando um arranjo que se assemelha ao complexo câmara-filtro e ao sistema criptonefridial encontrado em alguns insetos.
- Devido aos hábitos da espécie, o complexo encontrado na região anterior desempenha uma função semelhante ao complexo câmara-filtro.
- Os túbulos de Malpighi são compostos, em toda sua extensão, por um epitélio simples cúbico apoiado em uma membrana basal.
- Na região do piloro, a membrana basal é mais desenvolvida, auxiliando na inserção do mesmo com o piloro.
- As células possuem labirinto basal extremamente desenvolvido associado a muitas mitocôndrias.
- Tanto secreção holócrina quanto apócrina estão presentes.
- Proteínas totais estão presentes ao longo de todo o túbulo e em algumas secreções.
- Polissacarídeos neutros estão presentes na membrana basal, em algumas regiões do túbulo e em algumas secreções.
- Cálcio não foi detectado nos constituintes dos túbulos de Malpighi.

VIII. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.C.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; RENARD, G.; CHIES, J.M.; **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1268p.

BAKER, G.H. The distribution and dispersal of the introduced millipede, *Ommatoiulus moreletii* (Diplopoda: Iulidae), in Australia. **Journal of Zoology**. v. 185, n.1, p.1-11, 1978.

BAKER, G.H. Parasites of the millipede *Ommatoiulus moreletii* (Lucas) (Diplopoda: Iulidae) in Portugal, and their potential as biological control agents in Australia. **Australian Journal of Zoology**. v. 33, n. 1, p. 23-32, 1985.

BANO, K.; BAGYARA, D.J.; KRISHNAMOORTHY, R.V. Feeding activity of the millipede *Jonespeltis splendidus* Verhoeff and soil humification. **Plant Sciences**. v. 83, n. 1, p. 1-11, 1976.

BENNET, D.R.; KERR, S.H. Millipedes in and around structures in Florida. **The Florida Entomologist**. v. 56, n. 1, p. 43-48, 1973.

BERKALOFF, A. Contribution a l'étude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les insectes. **Annals. Sci. Nat.** v. 12, n. 2, p. 869-947, 1960.

BERRIDGE, M.J.; OSCHMAN, J.L. A structural basis for fluid secretion by malpighian tubules. **Tissue and Cell**. v. 1, p. 247-272, 1969.

BEYENBACH, K.W.; SKAER, H.; DOW, J.A.T. The developmental, molecular and transport biology of Malpighian tubules. **Annual Review of Entomology**. v. 55, p. 351-374, 2010.

BLOWER, J.G. 1985. Millipedes. In Kermack, D.M. **Synopsis of the British Fauna**. London: Linn. Soc., 1985, p. 242.

BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia – SP. In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, Recife, PE, 1998, p. 36.

BOCCARDO, L.; FERNANDES, M.N. Toxicidade do carbamato methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.

BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C.H.S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.20-223, 2002.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocinio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool**, v.18, p.62-63, 1997.

BOND, J.; SIERWALD, P. Molecular taxonomy of the *Anadenobolus excisus* (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae) species-group on the Caribbean island of Jamaica. **Invertebrate Systematics**. v. 17, p. 515-528, 2003.

BOOCK, O.J.; LORDELLO, L.G.E. Diplopoda depredador de tubérculos de batatinha. **Bragantia**, v. 12, p. 343-347, 1952.

BOURDANNE, D.K. Influence of human activities on the diplopod populations in the region of Abidjan, Ivory Coast. **Entomological Scandinavica**. v. 51, p. 245-249, 1997.

BRADLEY, T.J. Functional design of microvilli in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. **J. Cell. Sci**. v. 60, p. 117-135, 1983.

BRADLEY, T.J.; SATIR, P. 5-hydroxytryptamine-stimulated mitochondrial movement and microvillar growth in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. **J. Cell. Sci**. v. 49, p.139-161, 1981.

BRADLEY, T.J. The excretory system: structure and physiology. In: kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon, 1985, p. 421-465.

BRÉVAULT, T.; NAUDIN, K.; HERVÉ, G. Factors affecting cotton seedling in mulch-based cropping systems in North Cameroon, 2005. Disponível em <http://agroecologie.cirad.fr>. Acesso em 19 de agosto de 2009.

BRUNKE, A.J.; BAH LAI, C.A.; SEARS, M.K.; HALLET, R.H. Generalist predators (Coleoptera: Carabidae, Staphylinidae) associated with millipede populations in sweet potato and carrot fields and implications for millipede management. **Entomological Society of America**. v. 38, n. 4, p. 1106-1116, 2009.

BUSE, A. Fluoride accumulation in invertebrates near an aluminium reduction plant in Wales. **Environmental Pollution**. v. 41, p. 199-217, 1986.

CHAPMAN, R.F. **The Insects**. 4^a edição. Cambridge. USA. 1998. 788 pp.

CHEUNG, W.W.K.; WANG, J.B. Functional differentiation in the Malpighian tubules of *Pieris canidia* (Lepidoptera: Pieridae) larva: a histochemical study. *Annals of the Entomological Society of America*. v. 87, n. 6, 2004.

CIOFFI, M. Comparative ultrastructure of Arthropod transporting epithelia. **Amer. Zool.** v. 24, p. 139-156, 1984.

CLOUDSELY-THOMPSON, J.L. Significance of migration in myriapods. **Ann. Magaz. Natur. Hyst**, v. 2, p.947-62, 1949.

CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighian tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Microscopica**. v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. Localization of calcium and acis phosphatase in the Malpighian tubules of nurse workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Biosci. J.** v. 16, p. 87-99, 2000.

DALLAI, R.; DEL BENE, G.; MARCHINI, D. The ultrastructure of Malpighian tubules and hindgut of *Frankliniella occidentalis* (Pergrande) (Thysanoptera: Thripidae). **International Journal of Insect Morphology and Embriology**. v. 20, p. 223-233, 1991.

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

DELAKORDA, S.L.; LETOFSKY-PAPST, I.; NOVAK, T.; HOFER, F.; PABST, M.A. Structure of the Malpighian tubule cells and annual changes in the structure and chemical composition of their spherites in the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss, 1878 (Raphidophoridae, Saltatoria). **Arthropod Structure & Development**. v. 38, p. 315-327, 2009.

DIAS CORREIA, J.H.R.; DIAS CORREIA, A.A. Introdução à morfologia e função celular. **Revista electrónica de Veterinária**. v. 12, n. 8, 2011.

DIMITRIADIS, V.K.; PIRPASOPOULOU, A. Complex carbohydrate presence in the gut and Malpighian tubules of *Drosophila auraria* larvae (Insecta, Diptera): a cytochemical study. **Cytobios**. v. 70, p. 159-170, 1992.

EBREGT, E.; STRUIK, B.; ODONGO, B.; ABIDIN, P.E. Pest damage in sweet potato, groundnut and maize in north-eastern Uganda with special reference to damage by millipedes (Diplopoda). **NJAS**. v. 53, n. 1, p. 49-69, 2005.

EBREGT, E.; STRUIK, P.C.; ABIDIN, P.E.; ODONGO, B. Farmer's information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda. I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. **NJAS**. v. 52, n. 1, 2004.

EDNEY, E.B. **Water balance in land arthropods**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1977.

ENGHOFF, H.; KEBAPACI, Ü. *Calyptophyllum longiventre* (Verhoeff, 1941) invading houses in Turkey, with the first description of the male (Diplopoda: Julida: Julidae). **Journal of Natural History**. v. 42, n. 31, p. 2143-2150, 2008.

EPIDI, T.; NJOKU, G.; A field bioassay of the biocidal potential of some plant extracts against a millipede species (*Spirostreptus assiniensis*) infesting cassava (*Mnihat esculenta* Cantz). **Scinetific Research and Assay**. v. 5, n. 9, p. 1005-1008, 2010.

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

FARQUAHARSON, P. A. A study of the Malpighian tubules of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers). I. The isolation of the tubules in a Ringer solution. **J. Exp. Biol.** v. 60, p. 13-38, 1974a.

FARQUAHARSON, P. A. A study of the Malpighian tubules of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers). II. The effect of variations in osmotic pressure and sodium and potassium concentrations on fluid production. . **J. Exp. Biol.** v. 60, p. 29-39, 1974b.

FARQUAHARSON, P. A. A study of the Malpighian tubules of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers). III. The permeability characteristics of the tubule. **J. Exp. Biol.** v. 60, p. 41-51, 1974c.

FERREIRA, R.A.C. Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico. 2010. 36 folhas. Dissertação. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

FILOTAS, M.; ALLEN, J. Millipedes attacking sweet potatoes and carrots in Ontario – the latest info. Part 1: Tracking millipede populations in the field. 2008a. Disponível em <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2008/02hrt08a1.htm>. Acesso em 03/10/2011.

FILOTAS, M.; ALLEN, J. Millipedes attacking sweet potatoes and carrots in Ontario – the latest info. Part 2: Identifying pest millipedes and the damage they do. 2008b. Disponível em <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2008/03hrt08a1.htm>. Acesso em 03/10/2011.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.S.M. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spiroboloda). **Iheringia**. v. 94, n. 4, 2004.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spiroboloida, Rhinocricidae). **Acta Hystochemica et Cytochemica**. v. 37, n. 5, p. 301-306, 2004.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Apocrine secretion in the midgut of *Plusioporus setiger* (Brolemann, 1901) (Diplopoda, Spirostreptidae), **Naturalia**, v.26, p.35-42, 2001.

FONTANETTI, C.S.; CALLIGARIS, I.B.; SOUZA, T.S. A millipede infestation of a urban area of the city of Campinas, Brazil, and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arq. Inst. Biol.** v. 77, n. 1, p. 165-166, 2010.

GALFORD, J.R.; AUCHMOODY, L.R.; WALTERS, R.S.; SMITH, H.C. Millipede damage to germinating acorns of northern red oak. **Res. Departament of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station**, Pap. NE-667, 4 p., 1992.

GARAYOA, M.; VILLARO, A.C.; MONTUEGA, L.; SESMA, P. Malpighian tubules of *Formica polycтена* (Hymenoptera): light and electron microscopic study. **J. Morph.** v. 214, p. 159-171, 1992.

GARCIA, R.F.M.; CAMPOS, J.V. Biologia e controle de artrópodes de importância fitossanitária (Diplopoda, Symphyla, Isopoda), pouco conhecidos no Brasil. **Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 7-13, 2001.

GARRET, M.A.; BRADLEY, T.J.; MEREDITH, J.E.; PHILLIPS, J.E. Ultrastructure of the Malpighian tubules of *Schistocerca gregaria*. **J. Morph.** v. 195, p. 313-325, 1988.

GAUTREAU, J.; De PINS, O. Groundnut production and research in Senegal. International Workshop on Groundnuts. Patancheru, India, p. 274-281, 1980.

GILLOT, C. **Entomology**. Plenum Publishers: Dordrecht, Holanda. 2° ed., 1995, pp. 750.

GIST, C.S.; CROSSLEY, D.A. Feeding rates of some cryptozoa as determined by isotopic half-life studies. **Environmental Entomology**. v. 4, p. 625-631, 1975.

GOLOVATCH, S. I. On the identify of some millipede described by C. O. Von Porat in 1988 (Diplopoda: Spirobolida). **Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg. Sci. Entomol.**, Bruxelles, v. 7, p. 95-106, 1997.

GREEN, L.F.B. Regional specialization in the Malpighian tubules of the New Zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). The structure and function of type I and II cells. **Tissue & Cell**. v. 11, n. 4, p. 673-702, 1979.

GREEN, L.F.B. Cryptonephric Malpighian tubule system in a dipteran larva, the new Zealand glow-worm, *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae): a structural study. **Tissue & Cell**. v. 12, n. 1, p. 141-151, 1980.

GRODOWITZ, M.J.; BROCE, A.B. Calcium storage in face fly (Diptera: Muscidae) larvae for puparium formation. v. 76, n. 3, p. 418-424, 1983.

HADDAD JUNIOR, V.; CARDOSO, J.L.C.; ROTTA, O.; ETEROVIC, A. Acidentes provocados por Millipede com manifestações dermatológicas: relatos de dois casos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, n. 4, p. 471-474, 2000.

HANRAHAN, S.H.; NICOLSON, S.W. Ultrastructure of the Malpighian tubules of *Onymacris plana plana* Periguy (Coleoptera: Tenebrionidae). **Int. J. Insect. Morphol. & Embryol**. v. 16, n. 2, p. 99-119, 1987.

HAZELTON, S.R.; FELGENHAUER, B.E.; SPRING, J.H. Ultrastructure changes in the Malpighian tubules of the cricket, *Acheta domesticus*, at the onset of diuresis: a time study. **Journal of Morphology**. v. 247, p. 80-92, 2001.

HAZELTON, S.R.; PARKER, S.W.; SPRING, J.F. Excretion in the house cricket (*Acheta domesticus*): fine structure of the Malpighian tubules. **Tissue & Cell**. v. 20, n. 3, p. 443-460, 1988.

- HEFNER, R. A. Studies of parajulid diplopods. The micro-anatomy of the alimentary canal of *Parajulus impressus* Say. **Trans. Amer. Microsc. Soc.** V. 48, n.2, p. 321-339, 1929.
- HENNINGS C. Das Tömösvaryische Organ der Myriopoden. **Zeit. Wissen. Zool.**, 1906.
- HOFFMAN, R.L. Classification of the Diplopoda. **Genève: Mus. Hist. Nat.**, p. 237, 1980.
- HOFFMAN, R.L.; GOLOVATCH, S.I.; ADIS, J.; DE MORAIS, J.W. Diplopoda. In ADIS, J. **Myriapoda**. Sofia-Moscow: Pensoft, 2002, p. 505-533.
- HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford: Oxford University Press, 1992. 233p.
- HOPKIN, S.P. **Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates**. New York: Elsevier. 1989.
- HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres; Academic Press, 1979, p. 127-134.
- HUBERT, J.F.; THOMAS, D.; CAVALIER, A.; GOURANTON, J. Structural and biochemical observations on specialized membranes of the “filter chamber”, a water-shuting complex in a sap-sucking homopteran insects. **Biology og the Cell**. v. 66, p. 155-163, 1989.
- INYANG, U.E.; NDON, B.A. Millipede outbreaks in Akwa Ibom State, Southeastern Nigeria. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**. v. 9, n. 4, p. 435-444, 2003.
- ISHAG, H.M.; ALI, M.A.; AHMADI, A.B. Groundnut production and research problems in the Sudan. India: Patancheru, p. 282-284, 1980.
- JOHNSON, I.T.; RIEGEL, J.A. Ultrastructural tracer studies on the permeability of the Malpighian tubule of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers). **Cell and Tissue Research**. v. 182, p. 549-556, 1977a.

JOHNSON, I.T.; RIEGEL, J.A. Ultrastructural studies on the Malpighian tubule of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers) (Myriapoda, Diplopoda). General morphology and localization of phosphatase enzymes. **Cell and Tissue Research**. v. 180, p. 357-366, 1977b.

JOHNSON, R.A. 1978. Soil pests of groundnuts in Nigeria. National Seminar on Groundnuts Production. Nigeria: Kano, p. 7, 1978.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.123p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. 2008. 524 pp.

KAMATA, N. Nitrogen cycling and and arthropod population outbreaks in forest ecosystems. **Internacional Symposium of the KanazawaUniversity**. v. 1, p. 428-433, 2003.

KANEKO, N. Linking species to Ecosystem: The periodical millipede determines nutrient cycling in a larch forest. **Internacional Symposium of the KanazawaUniversity**. v. 1, 2003.

KEITH, D.L.; BAXENDALE, F.P. Millipedes and Centipedes. **Cooperative Extension, University of Nebraska**, 1996.

KUKEL, S.; KOMNICK, H. Development, cytology, lipid storage and motility of the Malpighian tubules of the nymphal dragonfly, *Aeshna cyanea* (Müller) (Odonata: Aeshnidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* v. 18, n. 2/3, p. 119-134, 1989.

LAWRENCE, R.F. Variation in the leg numbers of a South African millipede *Gymnostreptus pyrocephalus* C. Koch. **Annals and Magazine of Natural History**. v. 5, p. 1044-1051, 1952.

LAWRENCE, R.F. **The centipedes and millipedes of Southern Africa**; A guide. Balkema, Cidade do Cabo, 233 p., 1984.

LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E.A.; TOLEDO, L.A. Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepdoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 4, 2004.

LYNCH, R.E.; OUEDRAOGO, A.P.; SOME, S.A. Effect of harvest date and termite-resistant varieties on termite and millipede damage to groundnut in Burkina Faso. 1st Regional Groundnut Meeting for West Africa, Patancheru, India, p. 87-89, 1988.

MADDREL, S.H.P. Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. **J. Cell. Sci.** v. 51, p. 71-97, 1969.

MARSHALL, A. T. Protein synthesis and secretion by the Malpighian tubules of cercopoid larvae (Homoptera). **J. Insect Physiol.** v. 19, p. 2317-2326, 1973.

MARSHALL, A.T.; CHEUNG, W.W.K. Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopoid Malpighian tubules and filter chamb. **Tissue & Cell** v. 6, n. 1, p. 153-171, 1974.

MARTINELLI, A. Histoquímica e ultra-estrutura dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubipilosa* Forel, (1908) (Hymenoptera: Formicidae). 1998. 100 folhas. Tese. Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MARTOJA, R. Données cytologiques et histochemique sur le tubules de Malpighi et leurs secretions musqueuses chez *Locusta migratoria*. **Acta Histoch. Jena**, v. 6, p. 187-217, 1959.

MASAMICHI, I.; JUN'ICHI, M.; TOSHIO, Y.; MINORI, H.; AYU, T.; NOBUHIRO, K.; DAISUKE, T.; KOJI, U. Distribution of Yatsugatake-Kirigamine population of a train millipede (*Parafontaria laminata armigera* VERHOEFF, 1936) in the outbreak year 2000. **Edaphologia**. v. 68, p. 39-42, 2001.

McDANIEL, E.L. Insects and allied pests of plants grown under glass. **Mich. State Coll. Agr. Exp. Sta. Spec. Bull.** v. 214, p. 1-117, 1931.

McKILLUP, S.C.; ALLEN, P.G.; SKEWES, M.A. The natural decline of an introduced species following its initial increase in abundance: an explanation for *Ommatoiulus moreletti* in Australia. **Oecologia**. v. 1988, p. 339-342, 1988.

MELLO, M.L.S.; BOZZO, L. Histochemistry, refractometry and fine structure of excretory globules in larval Malpighian tubes of *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apoidea). **Protoplasma**, v. 68, p. 241-251.

METCALF, R.L.; LUCKMANN, W.H. Introduction to insect pests management. 3^o ed, Wiley-Interscience, EUA, 1994.

MILEY, H.H. Internal anatomy of *Euryurus erytropygus* (Brandt, Diplopoda). **Ohio J. Sci.**, v.40, p. 229-254, 1930.

MISARI, S. M. Insects and other arthropod pests of groundnuts in Northern Nigeria. **Agricultural Newsletter**. v. 17, n. 1, p. 4-9, 1975.

MORSE, M. Unusual abundance of a myriapod, *Parajulus pennsylvanicus* (Brandt). **Science**, v. 18, p. 59-60, 1903.

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

NASCIMENTO, B.; SERMANN, H. Economic importance of millipedes on Santo Antao (Cape Verde) using the example of *Spinotarsus caboverdus* PIERRARD. Conference on International Agricultural Research for Development. Bonn, Holanda, 2001.

NASCIMENTO, B.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. Biology and natural control of pest millipedes *Spinotarsus caboverdus* Pierrard (1987) from Cape Verde. In: Deutscher Tropentag – Challenges to Organic Farming and Sustainable Land Use in the Tropics and Subtropics, 2002, Witzenhausen, Alemanha.

NIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Jour. Ecol.** v. 38, p.257-268, 1988.

NIJIMA, K.; The outbreaks of a millipede (*Oxidus gracilis* KOCH) stopped trains. **Edaphologia.** v. 68, p. 43-46, 2001.

NUNEZ, F. S.; CRAWFORD, C. S. Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Diplopoda: Spirostrepidae), **J. Morphol.**, v.151, p. 121-130, 1977.

NUNEZ, F. S.; CRAWFORD, C. S. Digestive enzymes of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae), **J. Morphol.** V. 151, p. 121-130, 1976.

OLAVARRIETA, A.J.A. Estudo ultramorfológico e ultra-estrutural dos túbulos de Malpighi de operárias de *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera: Formicidae). 2000. 39 folhas. Dissertação. Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

OUDEJANS, R.C.H.M. Composition of the saturated hydrocarbons from males, females and eggs of the millipede *Graphidostreptus tumuliporus*. **Journal of Insect Physiology.** v. 18, p. 857-863, 1972.

OHSHIMA, S. Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H₂O₂ induced premature senescence. **Cytometry.** v. 73, n. 9, p. 808-815, 2008.

PEACOCK, A.J.; ANSTEE, J.H. Malpighian tubules of *Jamaicana flava* (Caudell). Structure of the primary cells. **Micron.** v. 8. P. 19-27, 1977.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied.** 4th ed., London: J&A. Churchill, v. 2, 1985, 998p.

PEASE, D.C. Infolded basal plasma membranes in epithelia noted for their water transport. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.** v. 2, n. 4, p. 203-208, 1956.

- PIEROZZI, P. H.; FONTANETTI, C.S. A new species of *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptidae): description and chromosome number. **Iheringia, série Zoologia**, v. 96, n.2, p.209-212, 2006.
- RADFORD, A.J.; Giant millipede Burns in Papua New Guinea. Papua New Guinea **Med. J.**, v. 18, p. 138-141, 1975.
- RAMSEY, J.M. Vast migrating armies of the millipede *Pseudopolydesmus serratus* (Say) in the Dayton region. **Ohio Journal of Science**. v. 66, p. 339, 1966.
- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª edição. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.
- RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Roca, 2005, 1145 p.
- SAINI, R.S. Histology and physiology of the cryptonephridial system of insects. **Ecological Entomology**. v. 116, n. 14, p. 347-392, 1964.
- SATMARY, W.M.; BRADLEY, T.J. The distribution of cell types in the Malpighian tubules of *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann) (Diptera: Culicidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. v. 13, n. 3, p. 209-214, 1984.
- SCHLÜTER U.; HOLST, H.; RONNAU, K.C. Ultrastructural changes in the gut and Malpighian tubules of *Epilachna varivestis* after application of the new antibiotic Nikkomycin involve an osmoregulatory defect. **Journal of Invertebrate pathology**. v. 39, p. 362-372, 1982.
- SCHLÜTER U.; SEIFERT, G. Functional morphology of the hindgut-malpighian tubule complex in *Polyxenus lagurus* (Diplopoda; Penicillata). **Bijdragen tot de Dierkunde**. v. 55, p. 209-218, 1985.
- SCHUBART, O. Os Myriápodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.

SCHUBART, O. O elemento “Synanthropo” e estrangeiro entre os Diplopoda do Brasil. **Arthropoda**, v.1, n.1, p.23-40, 1947.

SEASTEDT, T.R.; TATE, C.M. Decomposition rates and nutrient contents of arthropod remains in forest litter. **Ecology**. v. 62, p. 13-19, 1981.

SEIFERT, G. Considerations about the evolution of excretory organs in terrestrial arthropods. In: CAMATINI, M. **Myriapod Biology**. Londres; Academic Press, 1979, p. 353-372.

SHELLEY, R.M. A revised, annotated, family-level classification of the Diplopoda. **Arthropoda Sel.** v.11, n. 3, p. 187–207, 2003.

SHETLAR, D.J. Relationships between urban landscapes and household pests. 4th International Conference on Urban Pests. p. 19-26, 2002.

SIERWALD, P.; BOND, J.E. Current status of the Myriapod class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic diversity and phylogeny. **Annu. Rev. Entomol.** v. 52, p. 401-420, 2007.

SJÖSTRAND, F.S.; RHODIN, J. The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. **Experimental Cell Research**. v. 4, n. 2, p. 426-456, 1953.

SKAER, H.B.; MADDRELL, S.H.P.; HARRISON, J.B. The permeability properties of septate junctions in Malpighian tubules of *Rhodnius*. **Journal of Cell Science**. v. 88, p. 251-265, 1987.

SLODERBECK, P.E. Millipedes and Centipedes. **Entomology 317, Kansas State University**, 2002.

SNYDER, B.; DRANEY, M.L.; SIERWALD, P. Development of an optimal sampling protocol for millipedes (Diplopoda). **J. Insect Conserv.** v.10, n.3, p. 277–88, 2006.

SOHAL, R.S.; PETERS, P.D.; HALL, T.A. Fine structure and x-ray microanalysis of mineralized concretions in the Malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. **Tissue & Cell**. v. 8, n. 3, p. 447-458, 1976.

SOUSA, C.M. Tubo digestório de *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda): estrutura e função. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2011.

SPRING, J.H.; FELGENHAUER, B.E. Excretion in the house cricket, *Acheta domesticus*: effects of diuretics on the structure of the mid-tubule. **Journal of Morphology**. v. 230, p. 43-53, 1996.

TAIRA, J.; ARARAKI, K. Secretions of *Chamberlinius hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae) during the reproductive migration stage. **Appl. Entomol. Zool.** v. 37, n. 4, p. 621-624, 2002.

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

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

TURBECK, B.O. A study of the concentrically laminated concretions, "spherites", in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae. **Tissue & Cell**. v. 6, n. 4, p. 627-640, 1974.

UMEH, V.C.; WALIYAR, F.; TRAORÉ, S.; CHAIBOU, I.M.; OMAR, B.; DETOGNON, J. Farmer's opinions and influence of cultural practices on soil pest damage to groundnut in west Africa. **Insect Sci. Applic.** v. 21, n. 3, p. 257-265, 2001.

VAIL. K.M. Rain causes moisture-associated pests to invade homes. **Entomology & Plant Pathology**. n. 60, 2007.

WALL, B.J.; OSCHMAN, L.; SCHIMIDT, B.A. Morphology and function of malpighians tubules and associated structures in the cockroach *Periplaneta Americana*. **J. Morph.** v. 146, p. 265-306, 1975.

WALLNER, W.E. Factors affecting insect population dynamics: differences between outbreak and non-outbreak species. **Ann. Rev. Entomol.** v. 32, p. 317-340, 1985.

WENNING, A.; GREISINGER, U.; PROUX, J.P. Insect-like characteristics of the Malpighian tubules of a non-insect: fluid secretion in the centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda: Chilopoda). **J. Exp. Biol.** v. 158, p. 165-180, 1991.

WESSING, A. Die function der Malpighischen Gefäße. In: Funktionelle und morphologische organization der Zelle. **Sekretion und Excretion**. Berlim: Springer , p. 228-268, 1965.

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

WINDER, G.H.; DEWAR, A.M.; DUNNING, R.A. Comparisons of granular pesticides for the control of soil-inhabiting arthropod pests of sugar beet. **Crop Protection.** v. 12, p. 148-154, 1993.

WRIGHT, J.C.; WESTH, P. Water vapour absorption in the penicillate millipede *Polyxenus lagurus* (Diplopoda: Penicillata: Polyxenida): microcalorimetric analysis of uptake kinetics. **The Journal of Experimental Biology.** v. 209, p. 2486-2494, 2006.

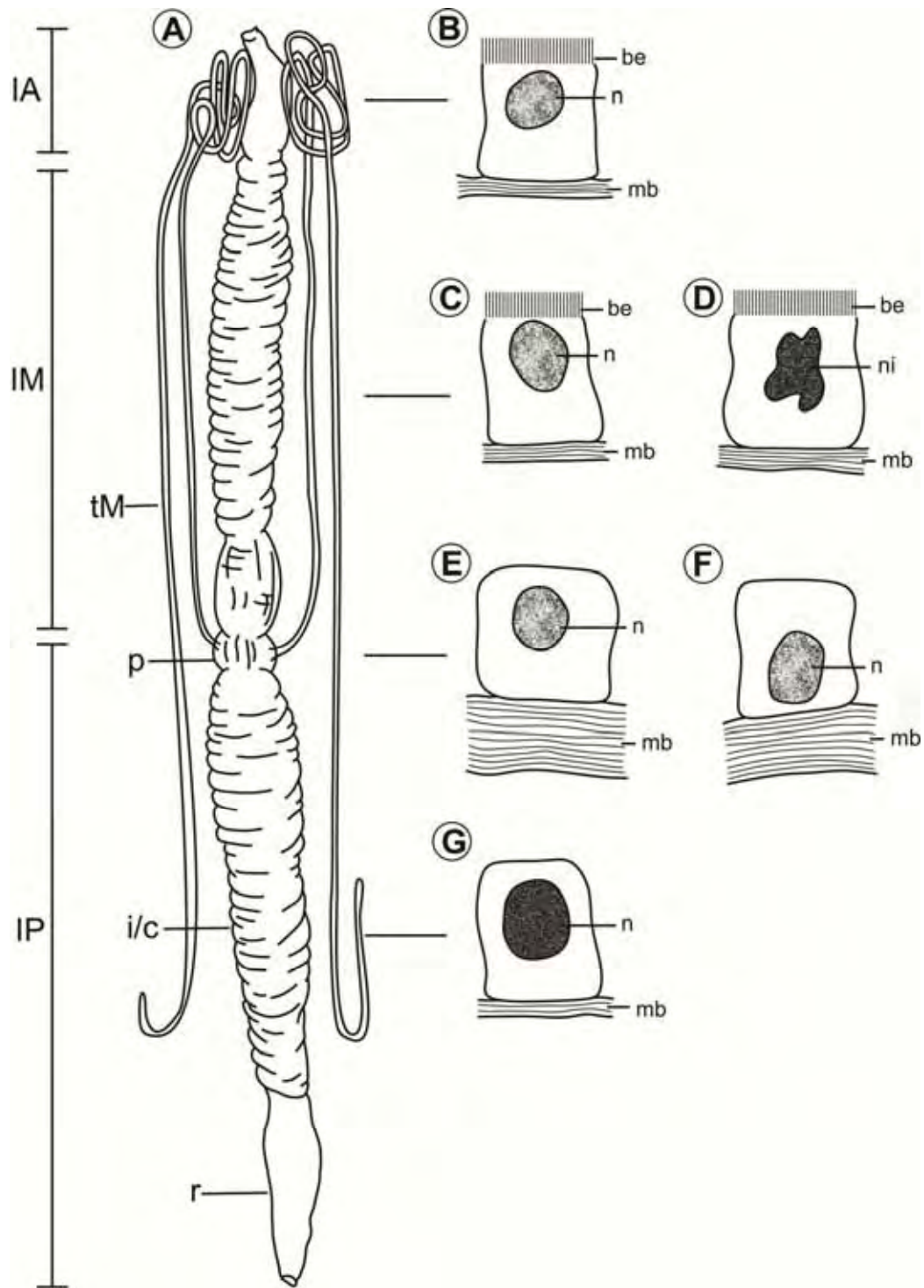


Figura 1A-G. Distribuição do túbulo de Malpighi no corpo do diplópodo *U. atrobrunneus* (A) com os diferentes tipos celulares presentes na região anterior (B), na região média (C e D), região de inserção com o piloro (E e F) e região posterior (G).

be = bordo em escova; i/c = íleo/cólon; IA = Intestino Anterior; IM = Intestino Médio; IP = Intestino Posterior; mb = membrana basal; n = núcleo; p = piloro; r = reto; tM = túbulo de Malpighi

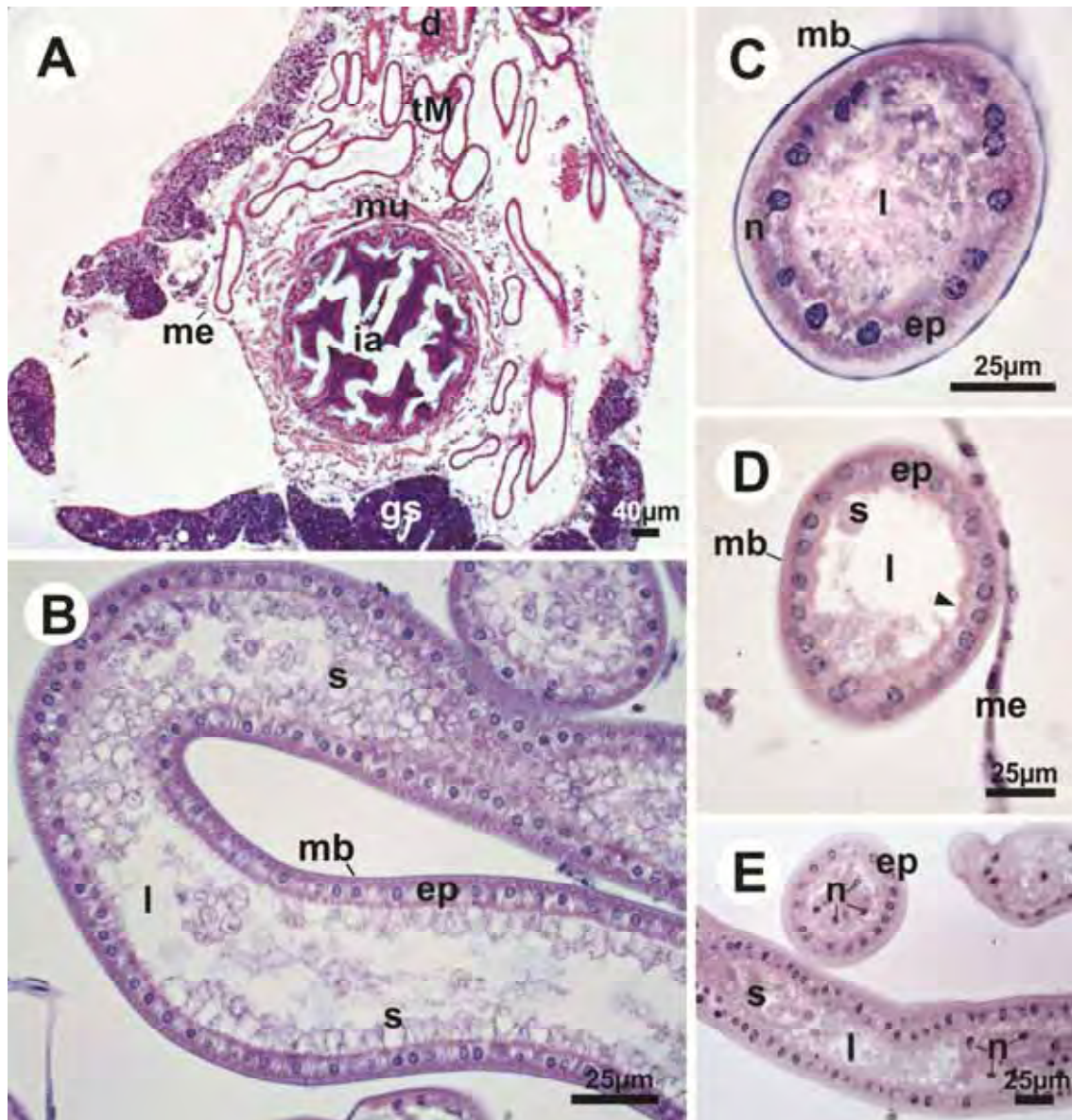


Figura 2. Secções histológicas do túbulo de Malpighi presente na região anterior de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C, D, E).

d = ducto das glândulas salivares; ep = epitélio; gs = glândula salivar; ia = intestino anterior; l = lúmen; mb = membrana basal; me = membrana externa do intestino anterior; mu = musculatura do intestino anterior; n = núcleo; s = secreção; tM = túbulo de Malpighi; cabeça de seta = bordo em escova.

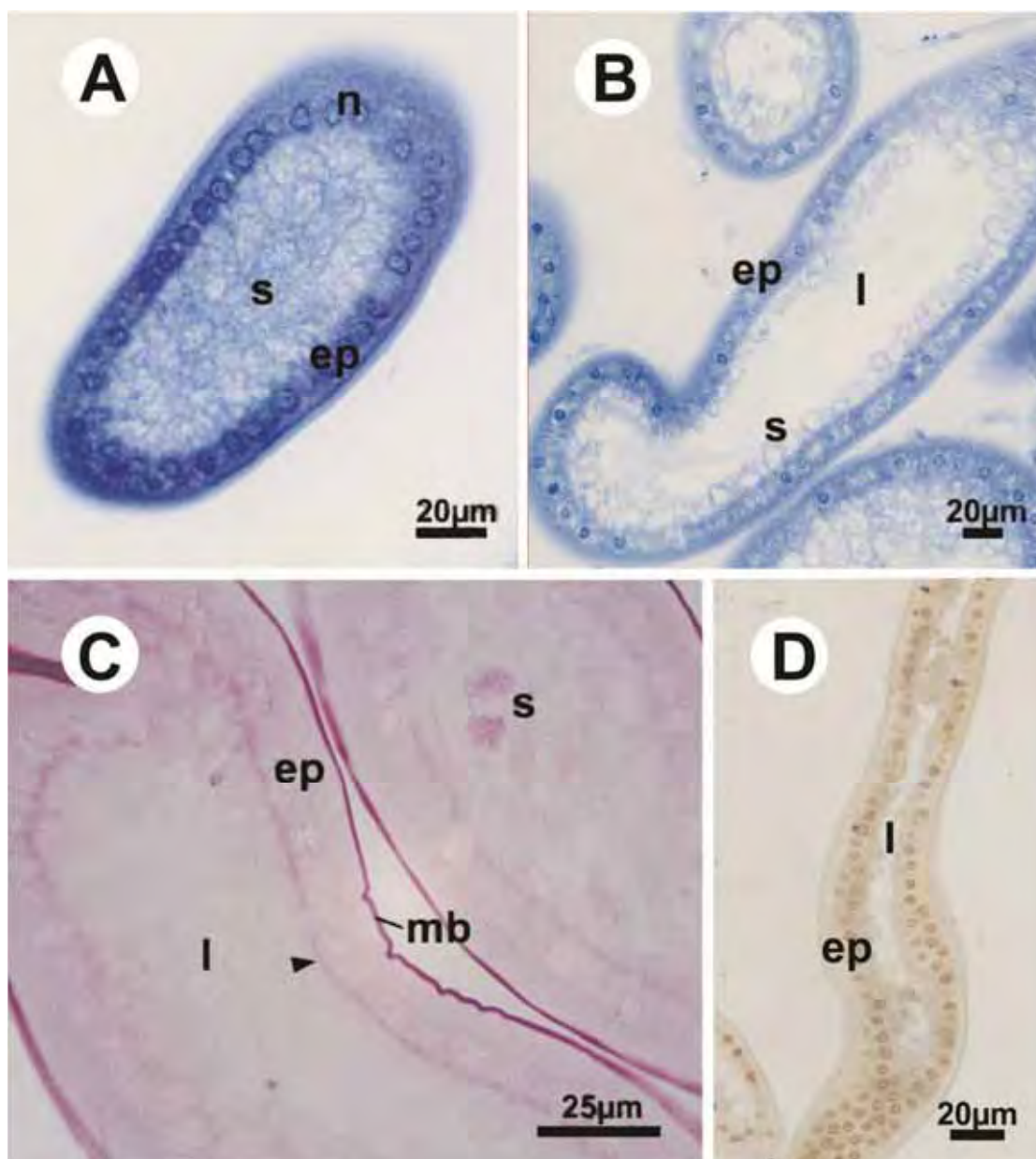


Figura 3. Secções histológicas do túbulo de Malpighi presente na região anterior de *U. atrobrunneus* submetidas à técnicas de azul de bromofenol (A e B), PAS (C) e von Kossa (D). ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; n = núcleo; s = secreção; cabeça de seta = bordo em escova.

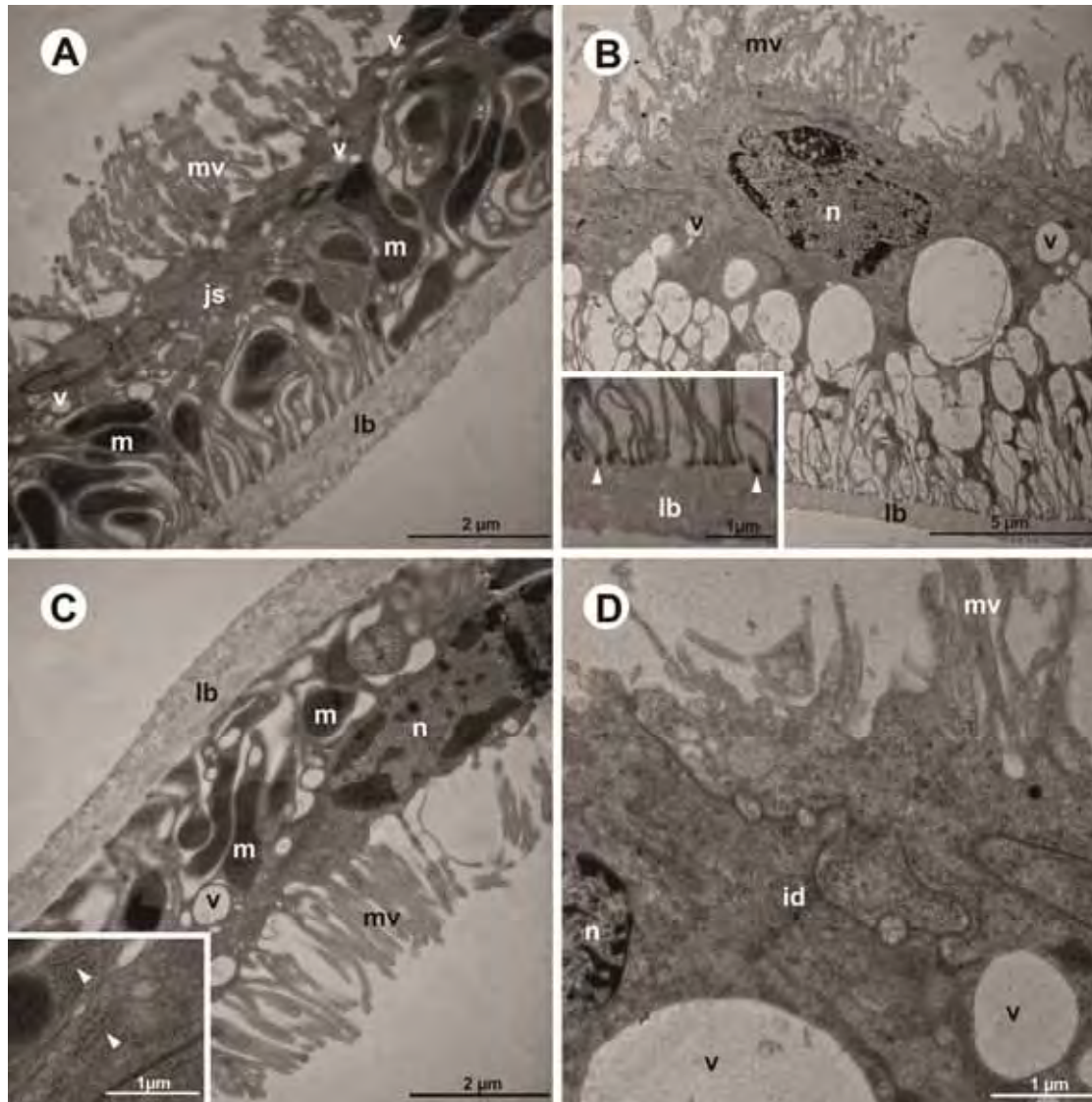


Figura 4. Micrografias eletrônicas do túbulo de Malpighi presente na região anterior de *U. atrobrunneus*.

id = interdigitações da membrana lateral; lb = lâmina basal; m = mitocôndria; mv = microvilosidades; n = núcleo; v = vacúolos; cabeça de seta no detalhe da fig. B = hemidesmosomos; cabeça de seta no detalhe da figura C = retículo endoplasmático rugoso.

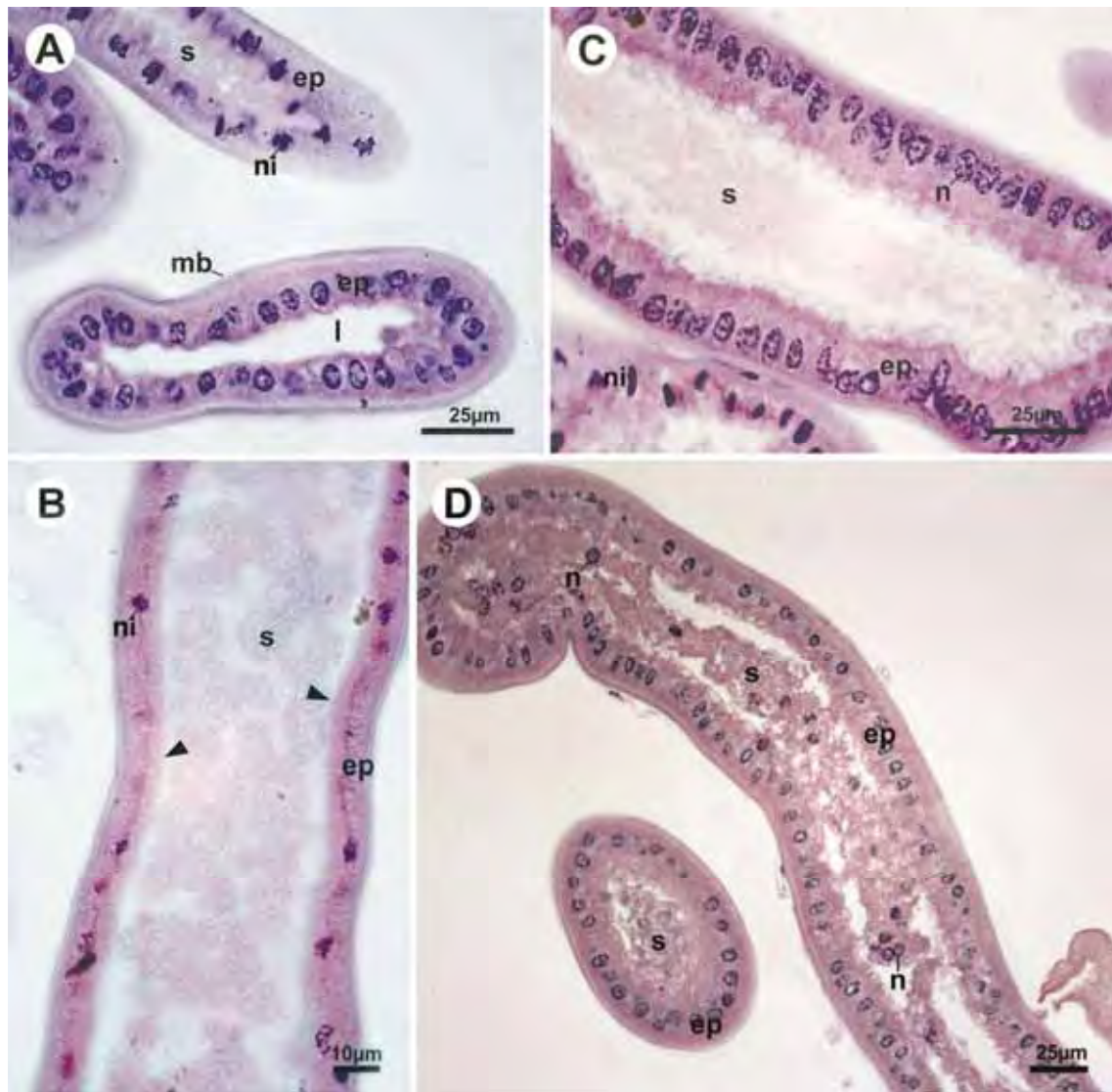


Figura 5. Secções histológicas do túbulo de Malpighi presente na região média de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C, D).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; n = núcleo; ni = núcleo com morfologia irregular; s = secreção; cabeça de seta = bordo em escova.

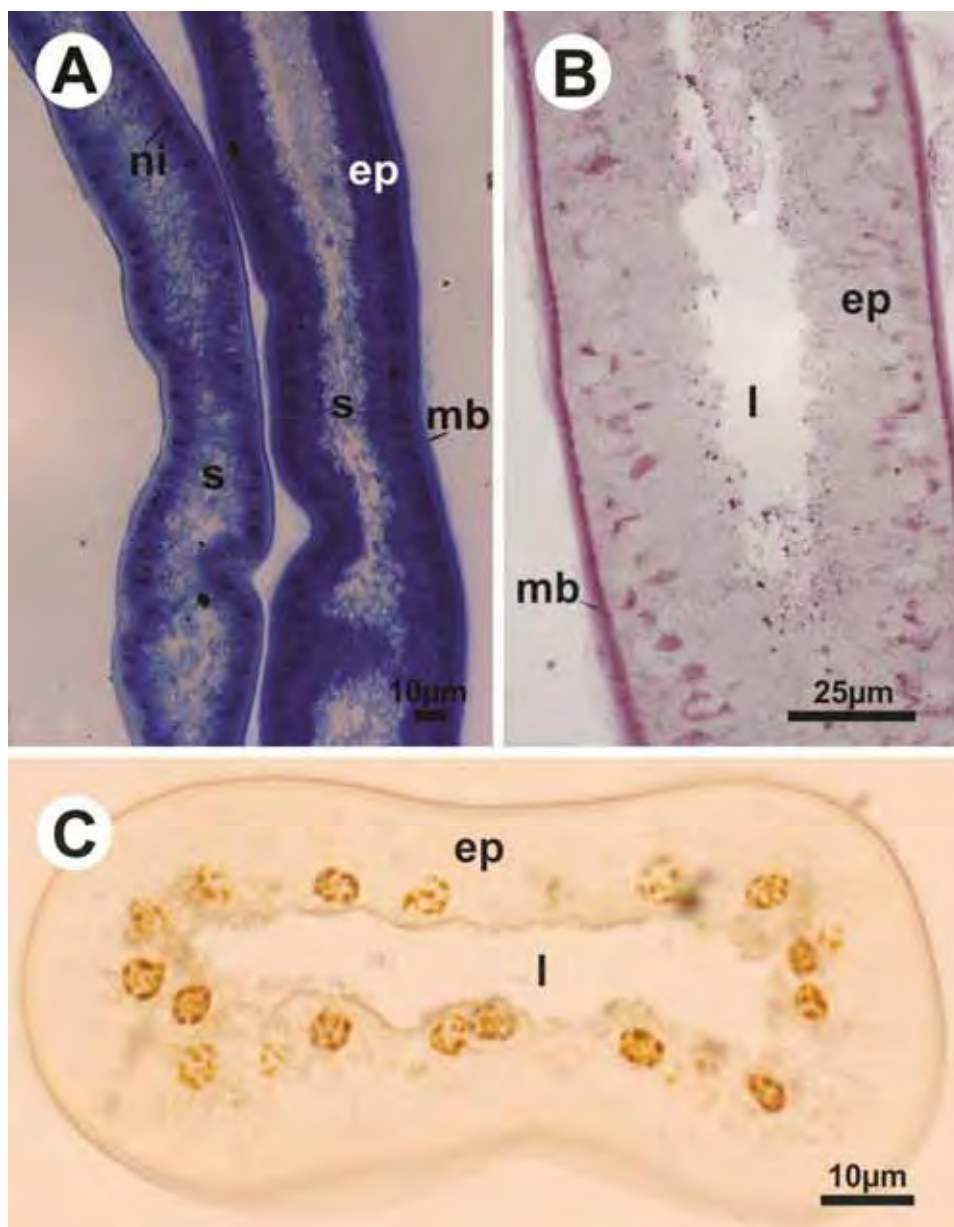


Figura 6. Secções histológicas do túbulo de Malpighi da região média da espécie *U. atrobrunneus* submetidas às técnicas de azul de bromofenol (A), PAS (B) e von Kossa (C).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; ni = núcleo com morfologia irregular; s = secreção

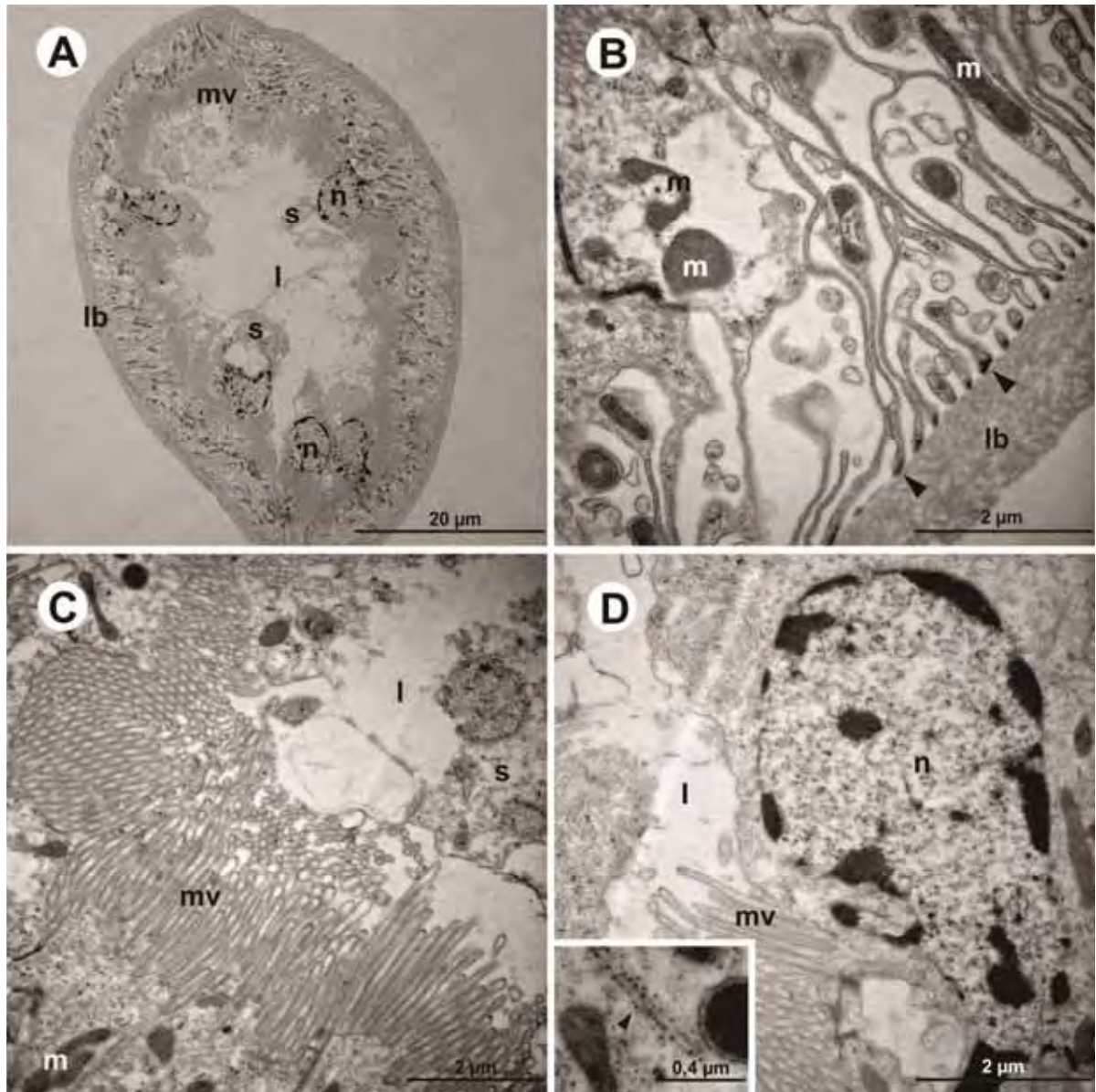


Figura 7. Micrografias eletrônicas do túbulo de Malpighi presente na região média da espécie *U. atrobrunneus*.

l = lúmen; lb = lâmina basal; m = mitocôndria; mv = microvilosidades; n = núcleo; s = secreção; cabeças de seta em B = hemidesmossomo; cabeça de seta no detalhe da figura D = retículo endoplasmático rugoso.

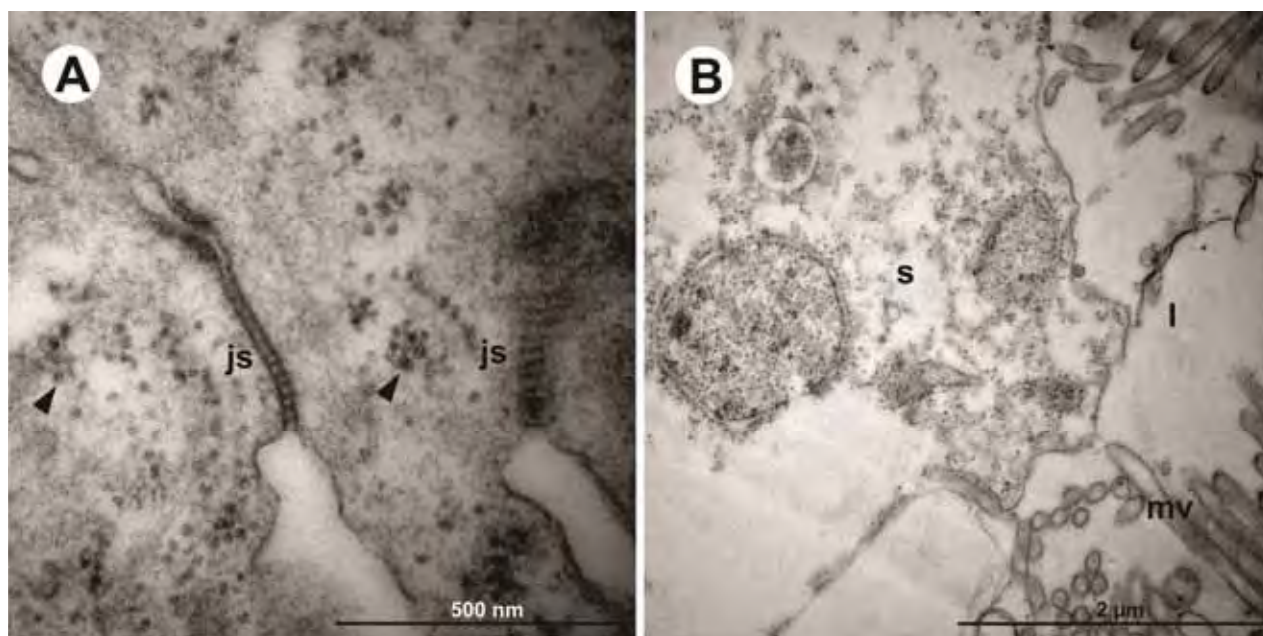


Figura 8. . Micrografias eletrônicas do túbulo de Malpighi presente na região média da espécie *U. atrobrunneus*.

l = lúmen; js = junção septada; mv = microvilosidades; s = secreção; cabeças de seta em A = ribossomos livres.

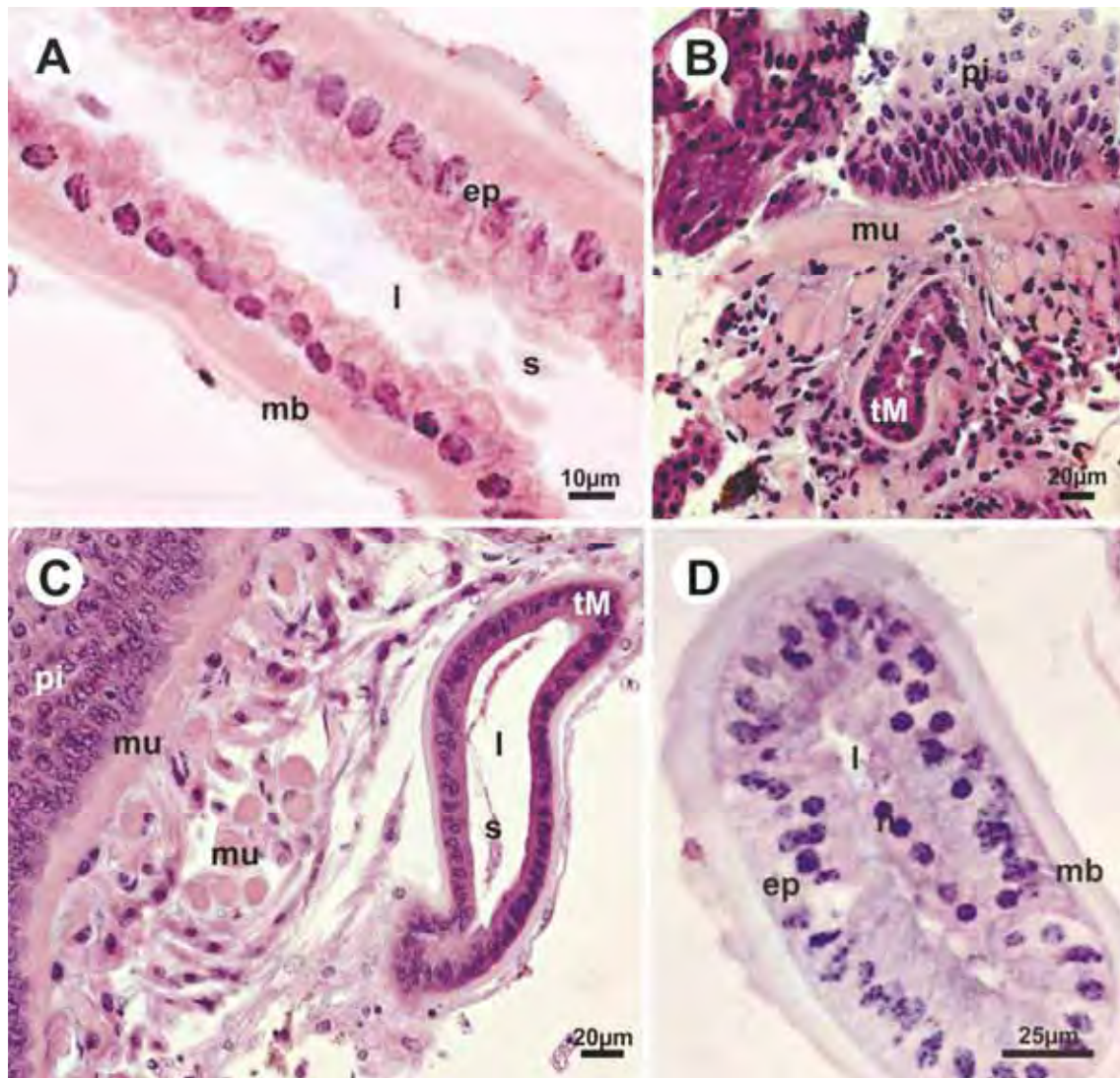


Figura 9. Secções histológicas do túbulo de Malpighi no local de sua inserção com o intestino posterior (região do piloro) de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C, D).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; mu = musculatura do piloro; n = núcleo; pi = piloro; s = secreção; tM = túbulo de Malpighi

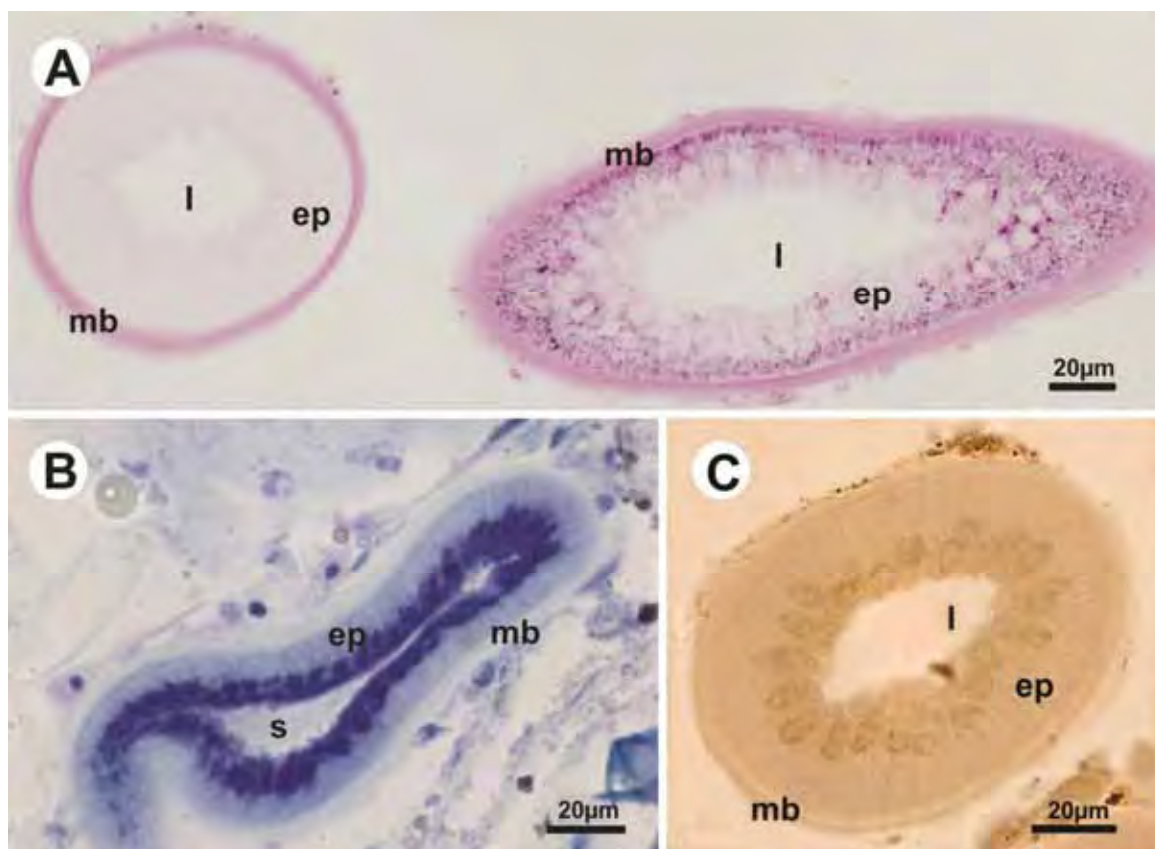


Figura 10. Secções histológicas do túbulo de Malpighi no local de sua inserção com o intestino posterior (região do piloro) de *U. atrobrunneus* submetidas à técnica de PAS (A), azul de bromofenol (B) e von Kossa (C).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; s = secreção;

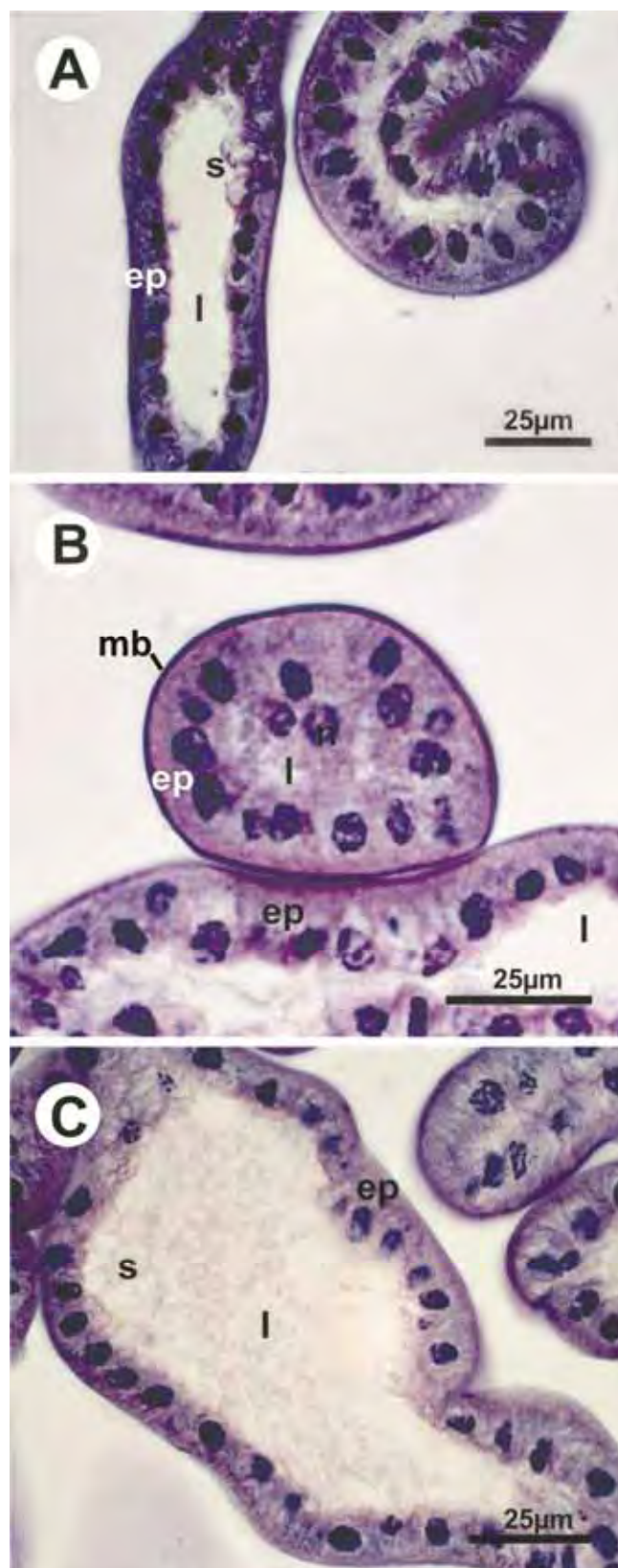


Figura 11. Secções histológicas do túbulo de Malpighi presente na região posterior de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina (A, B, C).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; s = secreção.

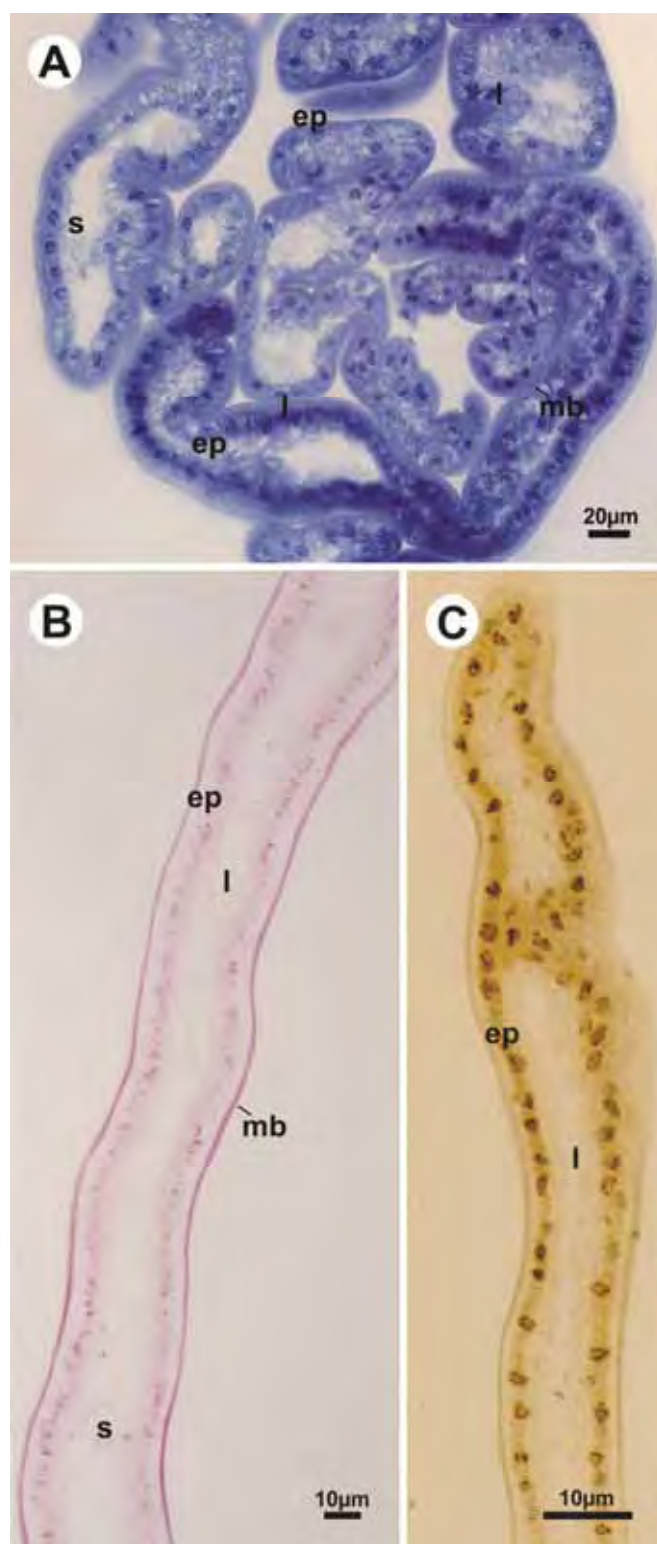


Figura 12. Secções histológicas do túbulo de Malpighi na região posterior de *U. atrobrunneus* submetidas à técnica de azul de bromofenol (A), PAS (B) e von Kossa (C).

ep = epitélio; l = lúmen; mb = membrana basal; s = secreção