

GISLEI MARIA RIGONI

“ ULTRA-ESTRUTURA E CITOQUÍMICA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) NÃO PARASITADAS E PARASITADAS POR *Cotesia flavipes* (Hymenoptera; Braconidae)”.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.
Orientador: **Prof. Dr. Hélio Conte**.

**Maringá – PR
2014**

GISLEI MARIA RIGONI

“ ULTRA-ESTRUTURA E CITOQUÍMICA DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) NÃO PARASITADAS E PARASITADAS POR *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)”.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.
Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Conte - orientador
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Maria Elisa M. Tomotake
Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof. Dra. Maria Claudia R. Takasusuki
Universidade estadual de Maringá

Prof. Dra. Ana Silvia Lapenta
Universidade estadual de Maringá

Prof. Dra. Satiko Nanya
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Gislei Maria Rigoni nasceu em Ponta Grossa em 14 de fevereiro de 1963, formou-se em Ciência Biológicas Licenciatura, pela Universidade Estadual do Centro Oeste em 1993. É docente do Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Centro Oeste desde 1998. Obteve o título de Mestre pela Universidade Estadual de Maringá no ano de 2003 no curso de Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular). Em março de 2010 iniciou o Curso de Doutorado na mesma Instituição e no mesmo programa de pós- graduação, na qual finaliza o curso com a defesa da tese no dia 27 de fevereiro de 2014.

Dedico esse trabalho à minha
mãe Anita.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Hélio Conte pela orientação durante a realização deste trabalho.

À minha família e amigos pelo apoio.

Aos colegas Rogério Pincela Mateus e Luciana Paes de Barros Machado pela amizade e auxílio.

A minha “irmã” Adriana Sinópolis Giglioli por partilhar as preocupações e pela ajuda sempre desinteressada.

Aos professores de curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

APRESENTAÇÃO

Em consonância com a resolução nº 07/2007 – CPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá, esta tese de doutorado é composta por dois artigos científicos completos, redigidos pelas normas exigidas pela revista científica em que serão publicados, assim sendo:

Gislei Maria Rigoni e Hélio Conte **Functional morphology of Malpighian tubules in *Diatraea saccharalis* larvae: a comparison between non-parasitized and parasitized by *Cotesia flavipes***. Este artigo foi submetido à apreciação do corpo editorial da revista: **Biological Control (ISSN:1049-9644)**

Gislei Maria Rigoni, Luciana P. B. Machado, Rogério Pincela Mateus e Hélio Conte. **HISTOQUÍMICA E PADRÕES ESTERÁDICOS DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794 (LAPIDOPTERA; CRAMBIDAE) NÃO PARASITADA E PARASITADA POR *Cotesia flavipes*, Cameron 1891 (HYMENOPTERA; BRACONIDAE)**. Este artigo será submetido à apreciação do corpo editorial da revista: **Acta Zoológica (ISSN: 1463-6395)**.

RESUMO GERAL

A principal praga que parasita a cana-de-açúcar é a *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) que em seu estágio larval penetra no colmo da cana, a injúria causada pela praga está relacionada com a abertura de galerias no colmo da planta que possibilita a entrada de fungos, quebra pela diminuição da resistência frente ao vento, enraizamento aéreo, morte das gemas apicais, entre outros. Também no processo de industrialização ocorrem prejuízos consideráveis como produção de açúcar invertido e problemas na fermentação.

O ataque da broca da cana-de-açúcar em 1% dos colmos pode diminuir a produção de açúcar em 35 kg. e em 30 litros de álcool por hectare. No Brasil a área estimada nos anos de 2012/2013 é de 8,5 milhões de hectares, pela importância dessa cultura, o controle dessa praga tem sido pesquisada há muito tempo, entre elas destacamos o uso de inimigos naturais como a vespa *Cotesia flavipes* (CAMERON, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), que se mostrou como um dos recursos mais eficientes no controle da broca da cana-de-açúcar.

C. flavipes é uma vespa originária da Ásia, introduzida no Brasil em 1971 como endoparasita da *Diatraea saccharalis*. A fêmea deposita seus ovos, aproximadamente 60, introduzindo seu aparelho ovopositor no corpo da lagarta da *D. saccharalis* depois da eclosão do ovo a larva da vespa se desenvolve na hemolinfa da lagarta, em aproximadamente 15 dias ocorre a empupação da *C. flavipes* formando massas e rompendo a epiderme da lagarta, promovendo assim sua morte. Por ser um parasita cenobionte preserva a vida do hospedeiro até completar o seu ciclo, apesar dos parasitas cenobiontes produzirem, nos hospedeiros, alterações na composição da hemolinfa, sistema endócrino e sistema imunológico a manutenção dos órgãos é de suma importância para o ciclo de vida do parasitóide.

O objeto de estudo desse trabalho são os túbulos de Malpighi (TM), principais órgãos de excreção dos insetos, e a ação do parasitismo de *C. flavipes* sobre essa estrutura. Em larvas de *D. saccharalis* os TM estão aderidos ao longo do tubo digestivo, desde a região mediana do mesêntero até o final do intestino posterior onde formam o arranjo criptonefridial, logo abaixo

do esfíncter da região pilórica pode-se perceber o exato local de inserção dos túbulos no intestino, essa inserção é caracterizada pela presença de uma estrutura saculiforme denominada ampola. Na maioria dos insetos os TM são formados por dois tipos de células, as células secretoras ou principais e células reabsortivas.

Como objetivo dessa pesquisa, foram desenvolvidas duas propostas, na primeira foram realizadas análises da ultramorfologia dos TM de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e com cinco e nove dias de parasitismo por *C. flavipes*, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, pode-se observar uma aumento de hemócitos e a presença de teratócitos nas nas larvas parasitadas, a presença dos hemócitos indica a resposta imune da *D. saccharalis* e os teratócitos são células derivadas do tecido embrionário da *C. flavipes* que auxiliam no desenvolvimento do parasitóide. Foram encontrados dois tipos de células formadoras dos TM, células secretoras, com citoplasma bem desenvolvido, microvilosidades apicais em contato com o lúmen, invaginações de base em forma de labirintos, vesículas eletrondensas, mitocôndrias em profusão, inclusive no interior das microvilosidades e células reabsortivas, com menor quantidade de microvilosidades e mitocôndrias, citoplasma pouco desenvolvido o que determina uma formação luminal de maior calibre. No nono dia de parasitismo observaram-se mitocôndrias vacuolizadas e corpos mielínicos.

A segunda proposta constou da determinação, através de testes citotóxicos da presença de proteínas, carboidratos neutros, lipídios e sais de cálcio, além da determinação dos padrões esterásicos dos TM de larvas não parasitadas e parasitadas. As regiões analisadas dos TM responderam positivamente à presença das moléculas estudadas, não houve diferenças significativas entre larvas não parasitadas e parasitadas, as regiões das células que reagiram mais intensamente aos corantes foram as regiões basais e microvilosidades, os sais de cálcio foram encontrados em maior concentração na região do reto dos túbulos. Os padrões esterásicos mostraram diferenças entre as os TM de larvas não parasitadas e parasitadas por *C. flavipes*.

ABSTRACT

The main pest that parasitizes sugarcane is *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), which in its larval stage penetrates the sugarcane cane, the insult caused by the pest is related to the opening of galleries on the high of the plant that allows the entrance of fungi, breakage by the decrease of the resistance against the wind, aerial rooting, death of the apical buds, among others. Also in the process of industrialization there are considerable losses as the production of inverted sugar and problems in the fermentation.

The attack of the sugarcane borer on 1% of the stalks can reduce the sugar production by 35 kg. And in 30 liters of alcohol per hectare. In Brazil, the area estimated for the years 2012/2013 is 8.5 million hectares, due to the importance of this crop, the control of this pest has been researched for a long time, among them the use of natural enemies such as the *Cotesia flavipes* CAMERON, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), which proved to be one of the most efficient resources in the control of sugarcane borer.

C. flavipes is a wasp native to Asia, introduced in Brazil in 1971 as an endoparasite of *Diatraea saccharalis*. The female deposited its eggs, approximately 60, introducing its ovopositor apparatus in the body of the *D. saccharalis* caterpillar after the hatching of the egg the larva of the wasp develops in the hemolymph of the caterpillar, in approximately 15 days occurs the crushing of *C. flavipes* forming masses And breaking the epidermis of the caterpillar, thus promoting his death. Because it is a cenobionte parasite, it preserves the life of the host until its cycle is completed, although the cenobionite parasites produce changes in the hemolymph, endocrine system and immune system changes in the hosts, which is of paramount importance for the life cycle of the host. Parasitoid.

The object of study of this work are the tubules of Malpighi (TM), the main organs of excretion of insects, and the action of *C. flavipes* parasitism on this structure. In *D. saccharalis* larvae the TMs are adhered along the digestive tract, from the median region of the mesentero to the end of the posterior intestine where they form the cryptofridial arrangement, just below

Of the sphincter of the pyloric region one can perceive the exact insertion site of the tubules in the intestine, this insertion is characterized by the presence of a saculiform structure called ampulla. In most insects the TMs are formed by two types of cells, the main or secretory cells and the resorptive cells.

As a result of this research, two proposals were developed. In the first one, the analyzes of the TM ultramorphology of non - parasitized *D. saccharalis* larvae and five and nine days of parasitism by *C. flavipes* were carried out by means of scanning electron microscopy and electron microscopy of Transmission, an increase of hemocytes and the presence of teratocytes in the parasitized larvae can be observed, the presence of hemocytes indicates the immune response of *D. saccharalis* and the teratocytes are cells derived from the embryonic tissue of *C. flavipes* that aid in the development of Parasitoid. Two types of TM-forming cells, secretory cells, with well-developed cytoplasm, apical microvilli in contact with the lumen, base invaginations in the form of labyrinths, electron-dense vesicles, profuse mitochondria, including microvilli and resorptive cells, With less amount of microvilli and mitochondria, undeveloped cytoplasm which determines a greater caliber of luminal formation. On the ninth day of parasitism, vacuolated mitochondria and myelinic bodies were observed.

The second proposal consisted of the determination of the presence of proteins, neutral carbohydrates, lipids and calcium salts, as well as the determination of the TM patterns of unparasitized and parasitized larvae by means of cytochemical tests. The analyzed regions of the TM responded positively to the presence of the molecules studied, there were no significant differences between unparasitized and parasitized larvae, the regions of the cells that reacted most intensively to the dyes were the basal regions and microvilli, the calcium salts were found in higher concentrations In the region of the rectum of the tubules. The esterases showed differences between the TM of larvae not parasitized and parasitized by *C. flavipes*.

SUMÁRIO

1. ARTIGO I.....	13
1.1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1.3. RESULTADOS.....	19
1.4. FIGURAS.....	21
1.5. DISCUSSÃO.....	24
1.6. BIBLIOGRAFIA.....	27
2. ARTIGO II.....	31
2.1. INTRODUÇÃO	32
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.3. RESULTADOS.....	36
2.4. FIGURAS.....	38
2.5. DISCUSSÃO.....	41
2.6. BIBLIOGRAFIA.....	45
3. ANEXOS.....	49

MORFOLOGIA FUNCIONAL DOS TÚBULOS DE MALPIGHI EM LARVAS DE *Diatraea saccharalis*, FABRICIUS 1794 (LEPIDOPTERA; CRAMBIDAE) NÃO PARASITADAS E PARASITADAS POR *Cotesia flavipes*, CAMERON 1891 (HYMENOPTERA; BRACONIDAE).

RESUMO

Os túbulos de Malpighi (TM) são os principais órgãos de excreção e manutenção da homeostase nos insetos. Em larvas de *Diatraea saccharalis* eles se encontram posicionados ao longo do tubo digestório, desde a região mediana do mesêntero até o final do intestino posterior onde ocorre em contato com a parede do reto uma formação criptonefridial. Nas análises realizadas em larvas não parasitadas e parasitadas por *Cotesia flavipes*, através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, foi observado que estes túbulos são constituídos por células principais ou secretoras e células reabsortivas. Estas células se caracterizaram pela presença de grande quantidade de mitocôndrias inclusas nas regiões de microvilosidades projetadas no lúmen. Nas larvas parasitadas a frequência de hemócitos e teratócitos ao redor dos túbulos são indicativos de ocorrência de mecanismos de defesa não identificados naquelas não parasitadas. No nono dia de parasitismo, as mitocôndrias se destacaram por vacuolizações internas e formações mielínicas, características estas de processos degenerativos. O transporte de fluídos da hemolinfa para o interior dos túbulos pode ser confirmado pela presença dos labirintos basais e visualização de vesículas presentes no citoplasma das células. Estes dados confirmam que os TM permanecem ativos até o parasitóide completar o seu ciclo pupal para ser liberado do organismo hospedeiro.

Palavras chave: *Diatraea saccharalis*, Túbulos de Malpighi, *Cotesia flavipes*, Morfologia.

Gislei Maria Rigoni¹ e Hélio Conte²

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro Oeste – Guarapuava – Paraná – Brasil.

² Departamento de Biotecnologia, Genética e Biológica Celular, Universidade Estadual de Maringá – Maringá – Paraná – Brasil.

INTRODUÇÃO

Nos insetos os principais órgãos excretores são os túbulos de Malpighi (Wigglesworth, 1974; Davies, 1988; Martinelli, 1998; Chapman 1998). Embora apresentem diferenças entre espécies ou entre estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie, morfologicamente são tubos longos, finos, constituídos por uma única camada de células epiteliais. Encontram-se conectados ao intestino entre a região de transição do mesêntero e proctodeo, são livres na hemocele e estão mergulhados na hemolinfa (Cruz-Landim, 2009). Além da excreção de metabólitos provenientes da degradação das proteínas e purinas, esses órgãos são responsáveis pela manutenção da homeostase no corpo do inseto, equilíbrio do pH do intestino, regulação e secreção de cálcio (Maddrell et al., 1991), defesa imunológica e depuração de substâncias tóxicas (Beyenbach et al., 2010) e durante o período de hibernação, em grilos, podem promover fornecimento de minerais para a manutenção de processos vitais, armazenados na forma de esferitos (Delakorda et al., 2009). Observou-se, também, que em formigas são eles que fornecem suprimentos que possibilitam a presença de microorganismos simbiotes existentes no íleo (Bution et al., 2007) e produção de lipídeos (Arab e Caetano, 2002) além de células que secretam seda para produção casulos (Conti et al., 2010).

Os diferentes tipos celulares que compõem os túbulos de Malpighi dos insetos, estão relacionados com a diversidade de funções do órgão, porém o funcionamento básico é o transporte de fluídos da hemolinfa para dentro do lúmen. Em lepidóptero, existe basicamente dois tipos celulares: as células reabsortivas e as células primárias ou secretoras. As células reabsortivas apresentam diferenças com relação à quantidade e forma de microvilosidades, mitocôndrias e invaginações basais (Chapman, 1998). As células principais, com função secretora, apresentam profundas invaginações basais em forma de labirintos, profusão de microvilosidades na região apical, em contato com o lúmen, e mitocôndrias tanto na região basal quanto apical e no interior dos microvilos, Martoja e Ballan-Dufrançais, (1984) mencionam que essa estrutura celular aumenta a permeabilidade passiva do tecido para solutos, também por

transporte passivo ocorre a passagem de fluídos para dentro do lúmen através de células septadas em um movimento chamado de paracelular (Maddrell e O'Donnel, 1992). Os túbulos que apresentam células com menor número de microvilosidades, membrana basal mais espessa e traqueíolas aderidas são capazes de transportar muito rapidamente os fluídos retirados da hemolinfa (Ryerse, 1979).

Observa-se também a diferença de osmolaridade ao longo dos túbulos que varia entre hiposmótico a hiperosmótico, evidenciando assim a excreção e reabsorção de água e solutos (Maddrell e O'Donnel, 1992). Em relação ao transporte foi observado a presença de aquaporinas na membrana das células dos túbulos (Spring, et al., 2009), o transporte ativo mediado por H⁺ + ATPases que bombeiam íons de sódio, potássio ou ambos, além de compostos orgânicos como ácido úrico, alcalóides e glicosídeos (O'Donnel, et al., 1983).

A fisiologia e estrutura dos TM e de outros órgãos podem ser afetadas pela presença de parasitóides que usam o organismo dos insetos como hospedeiros. Esses parasitóides podem ser vírus, bactérias, protozoários, nematóides e outros insetos. Em *Anticarsia gemmatalis*, infectada por baculovírus, os TM sofreram alterações como desorganização dos microvilos, alterações nos espaços citoplasmáticos, deformação na lâmina basal (Cordeiro, 2007). Em *Aedes taeniorhynchus* parasitado por nematóides os TM sofreram redução na quantidade de mitocôndrias apicais e alterações no interior das microvilosidades (Bradley, 1985). O protozoário *tripanossoma* quando parasita o *Triatoma infestans*, induz nos TM a diminuição das traqueíolas, edema nas células, diminuição das interdigitações, mitocôndrias e microvilos (Schuab e Schnitker, 1988).

Em *Diatraea saccharalis* parasitada por *Cotesia flavipes* (endoparasita cenobionte), não foram estudadas as células dos túbulos de Malpighi mas em células do intestino médio foram observadas vacuolização de mitocôndrias (Pinheiro e Gregório, 2010), acúmulo de esferitos (Pinheiro et al., 2008) e presença de elementos inorgânicos no corpo gorduroso (Pinheiro et al., 2010).

A broca da cana-de-açúcar é um inseto de grande importância econômica para a indústria sucroalcooleira sendo que sua ocorrência nas plantações causa prejuízos consideráveis (Roc. et al., 1981). O controle

químico da *D. saccharalis* não apresenta a mesma eficiência do controle biológico (William et al., 1969: Guagliumi 1973), daí a necessidade de conduzir estudos morfofuncionais para melhores conhecimentos a serem discutidos nos programas de controle desta praga.

MATERIAL E MÉTODOS

INSETOS

Larvas de *D. saccharalis* e adultos de *C. flavipes*, foram fornecidos pelo Laboratório de Entomologia da Usina de Santa Terezinha, do Distrito de Iguatemi, Maringá/Paraná/Brasil (Lat: 23° 25'S - Long: 51° 57'W). As larvas de *D. saccharalis*, em terceiro instar, foram expostas às fêmeas, recém fecundadas, de *C. flavipes* possibilitando a ovoposição e parasitismo. Os insetos foram mantidos tubos de vidro, em dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond (1968), em câmara climatizada na temperatura 24°C, umidade relativa de $64 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Também foram utilizadas larvas de *D. saccharalis* não parasitadas em terceiro e quinto instar, mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As larvas de *D. saccharalis* foram anestesiadas por resfriamento e dissecadas com solução salina para insetos (0.1M NaCl, 0.1M Na₂HPO₄ e 0.1M KH₂PO₄), com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram utilizadas 10 espécimes com cinco dias de parasitismo, 10 com nove dias de parasitismo e 10 não parasitadas. Os TM foram separados em porção retal e região da ampola e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 48hs, a pós fixação foi feita com tetróxido de ósmio e as peças passaram por desidratação em soluções de concentrações crescentes de acetona a partir de 30% até 100%, posteriormente foram levadas ao ponto crítico Balzers CPD/030 para complementar a desidratação. Logo após foram colocadas na posição desejada, na superfície de suporte de alumínio "Stubs" revestidos com fita adesiva dupla face. Seguiram então para o aparelho MED 010, vaporizador Balzers Union onde se procedeu a metalização, cobrindo o espécime com uma camada de 10nm de ouro. Os espécimes foram examinados e fotografados no Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 do Laboratório de Imagens do Departamento de Química da Universidade Estadual do Centro Oeste Guarapuava/Paraná/Brasil.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As larvas de *D. saccharalis* foram anestesiadas por resfriamento e dissecadas com solução salina para insetos (0.1M NaCl, 0.1M Na₂HPO₄ e 0.1M KH₂PO₄), com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram utilizadas 10 espécimes com cinco dias de parasitismo, 10 com nove dias de parasitismo e 10 não parasitadas. Os TM foram separados em porção retal e região da ampola. Para a fixação para a MET foram utilizados glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,4. Ambos os materiais fixados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% com o mesmo tampão, pelo período de uma hora e contrastado com solução aquosa de acetato de uranila a 2% em temperatura ambiente over-nigth.

A desidratação foi realizada em uma série crescente de etanol, 50% a 100%, posteriormente etanol:acetona, 1:1 e acetona P.A. ambas por 10 minutos. Procedeu-se a embebição em mistura de resina e acetona por sete horas em uma temperatura de 4° C e em resina pura durante 24 horas também a 4° C. O emblocamento foi realizado em resina Araldite®, os blocos foram cortados em ultra micrótomo utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise e captura de imagens foi realizada nos microscópios Eletrônicos de Transmissão JEOL JEM-1400 no Centro de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá/Paraná/Brasil e Leo 906 do Laboratório de Microscopia e Microanálise /Ibilce-Unesp/ São José do Rio Preto/São Paulo.

Os espécimes e dados utilizados na execução deste trabalho encontram-se depositados na Coleção Entomológica do Laboratório de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

RESULTADOS.

Os TM em larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas e parasitadas por *Cotesia flavipes* com cinco, sete e nove dias de parasitismo, analisados nas regiões da ampola e do reto, apresentaram as seguintes características:

Larvas não parasitadas.

A inserção dos TM no intestino, ocorre na região de transição entre o mesêntero e proctodeo, através de duas estruturas saculiformes denominadas ampolas, posicionadas lateral e simetricamente na musculatura do intestino . Os túbulos bifurcam a partir das ampolas e seguem em direção a região anterior do mesêntero, desprovidos de traqueíolas. As células que constituem essa estrutura se arranjam em forma de colar de contas com núcleos centralizados (Fig. 1 A).

A região da ampola apresenta células que se caracterizam pela presença da membrana basal, inúmeras invaginações de membrana plásmica formando labirintos e núcleo posicionado na região mediana. Nas regiões basal e apical encontram-se mitocôndrias eletrondensas e microvilosidades presentes na superfície apical das células em contato com o lúmen, também apresentam mitocôndrias.(Fig 2, E), na região do reto observa-se a estrutura de célula secretora com as mesmas características descritas para a célula da região da ampola (Fig. 3 A).

A região do reto apresenta TM sem a presença de hemócitos e com inúmeras traqueíolas (Fig. 2 A). As traqueíolas prendem os TM entre si, com a membrana perinéfrica e com a estrutura do reto, formando o arranjo conhecido como criptonefridial (Fig. 2 B). Nesta região encontram-se dois tipos de células formadoras dos TM, uma delas com citoplasma reduzido e mitocôndrias escassas, característica de células de reabsorção. A célula típica principal ou secretora se destaca por conter citoplasma volumoso, microvilos e profusas invaginações de base bem desenvolvidas (Fig. 3 B).

Larvas parasitadas.

Nos TM destas larvas com cinco e nove dias de parasitismo, nota-se o aumento significativo de hemócitos aderidos aos túbulos (Figs. 1 B, C e F). Em túbulo rompido encontram-se as traqueíolas, membrana basal e microvilosidades projetando-se para a luz do túbulo, além de vesículas de secreção (Fig 1 E). Com sete dias de parasitismo as larvas de *Cotesia flavipes* estão aderidas aos TM e são observados hemócitos sobre o parasitóide (Fig. 1 D).

Nas larvas parasitadas com nove dias se destacam traqueíolas aderidas à membrana basal, invaginações basais formando labirintos, vacúolos eletrólucidos, mitocôndrias polimórficas em todo o citoplasma e núcleo central (Fig. 2 F). Na região do reto, nos TM de larvas com cinco dias de parasitismo a membrana perinéfrica, e o arranjo criptonefridial formam uma estrutura de aspecto compacto (Fig. 2 C), percebe-se ainda, vesículas extrusadas para o lúmen, além de grânulos de glicogênio no citoplasma (Fig. 3 C). As células dos TM com nove dias mostram mitocôndrias vacuolizadas (Fig. 3 D). Com nove dias de parasitismo observam-se teratócitos que se alojam entre a membrana perinéfrica e os TM formando a estrutura criptonefridial (Fig. 2 D) evidencia-se também, um espaço intercelular onde percebe-se um movimento de vesículas lineares e globosas caracterizando movimento paracelular (Fig. 3 E). Na região do reto com cinco dias de parasitismo foram observados microvilos em forma de bastão com mitocôndrias e corpos mielínicos em seu interior (Fig. 3 F e G).

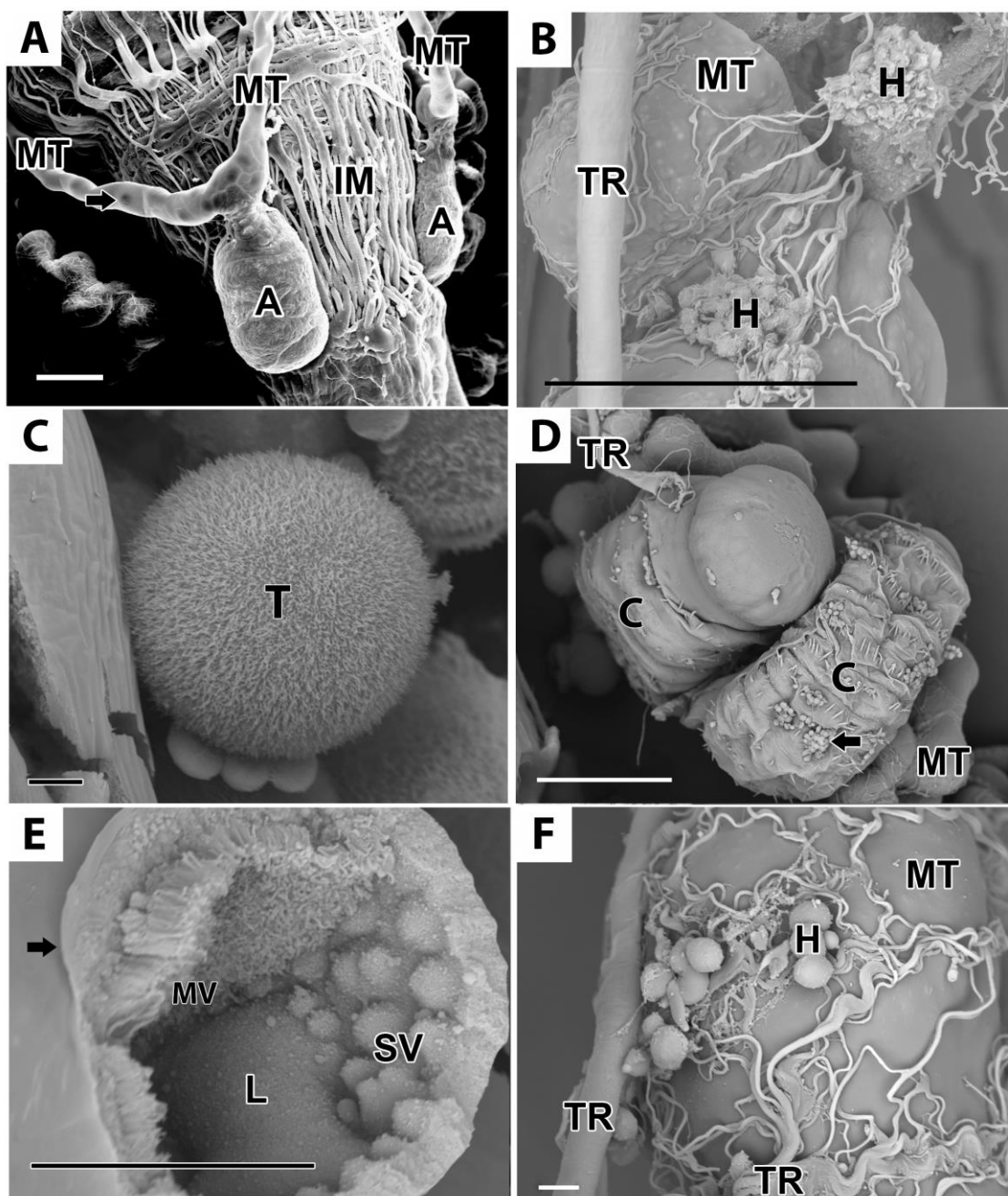


Fig 1. MEV dos TM da região da ampola de *Diatraea saccharalis*. **A.** Não parasitada. (MT) túbulos de Malpighi, (seta) núcleo, (A) ampola, (IM) músculo do intestino. Bar = 200µm. **B.** TM 5 dias de parasitismo. (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíolas, (H) hemócitos. Bar = 100µm. **C.** Região do reto com 9 dias de parasitismo. (T) detalhe de um teratócito. Bar = 5µm. **D.** Região da ampola com 7 dias de parasitismo. (C) larvas de *Cotesia flavipes*, (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíolas, (seta) hemócitos aderidos. Bar = 200µm. **E.** TM região do reto com 9 dias de parasitismo rompido. (seta) membrana basal, (MV) microvilos, (L) lúmen, (SV) vesículas de secreção. Bar = 30µm. **F.** TM região ampola com 9 dias de parasitismo. (TR) traqueíolas, (MT) túbulo de Malpighi, (H) hemócitos. Bar = 50µ.

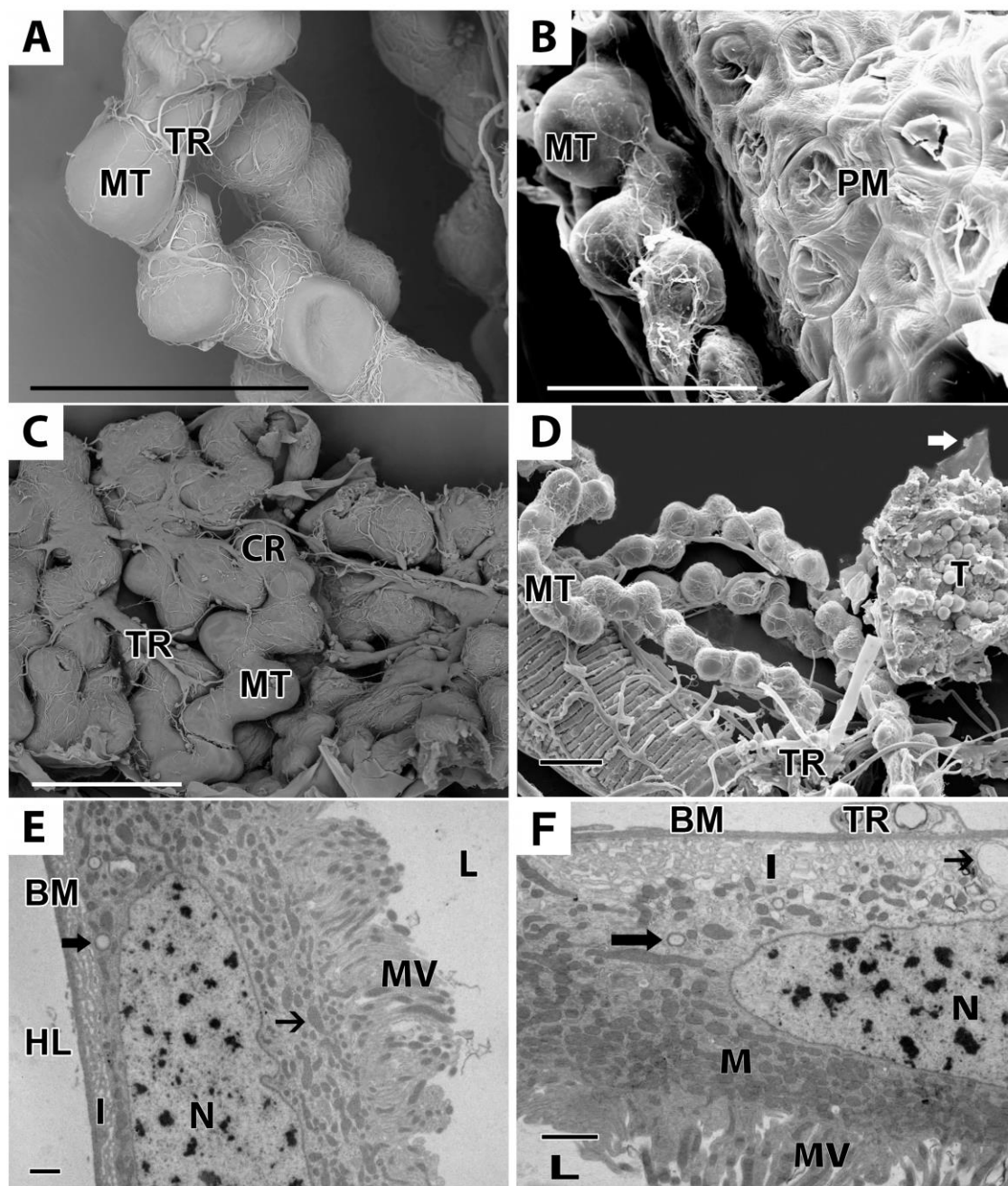


Fig. 2 MEV da região do reto de *Diatraea saccharalis*. **A.** TM região do reto não parasitado. (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíolas. Bar = 300 μ m. **B.** Região do reto não parasitado. (MT) túbulo de Malpighi, (PM) membrana perinéfrica. Bar = 200 μ m. **C.** Região do reto com 5 dias de parasitismo. (CR) arranjo criptonefridial, (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíolas. Bar = 500 μ m. **D.** Região do reto com 9 dias de parasitismo. (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíolas, (seta) membrana perinéfrica, (T) teratócitos. **E.** MET dos TM de *Diatraea saccharalis* da região da ampola não parasitada. (BM) membrana basal, (I) Invaginações de base, (seta) vesículas eletrólucidas, (N) núcleo, (HL) hemolinfa, (L) lúmen, (seta fina) mitocôndrias, (MV) microvilosidades. Bar = 1 μ m. **F.** TM região da ampola 9 dias de parasitismo. (BM) membrana basal, (I) Invaginações de base, (seta) vesículas eletrólucidas, (seta fina) vacúolo, (N) núcleo, (TR) traqueíolas, (L) lúmen, (M) mitocôndrias, (MV) microvilosidades. Bar = 1 μ m.

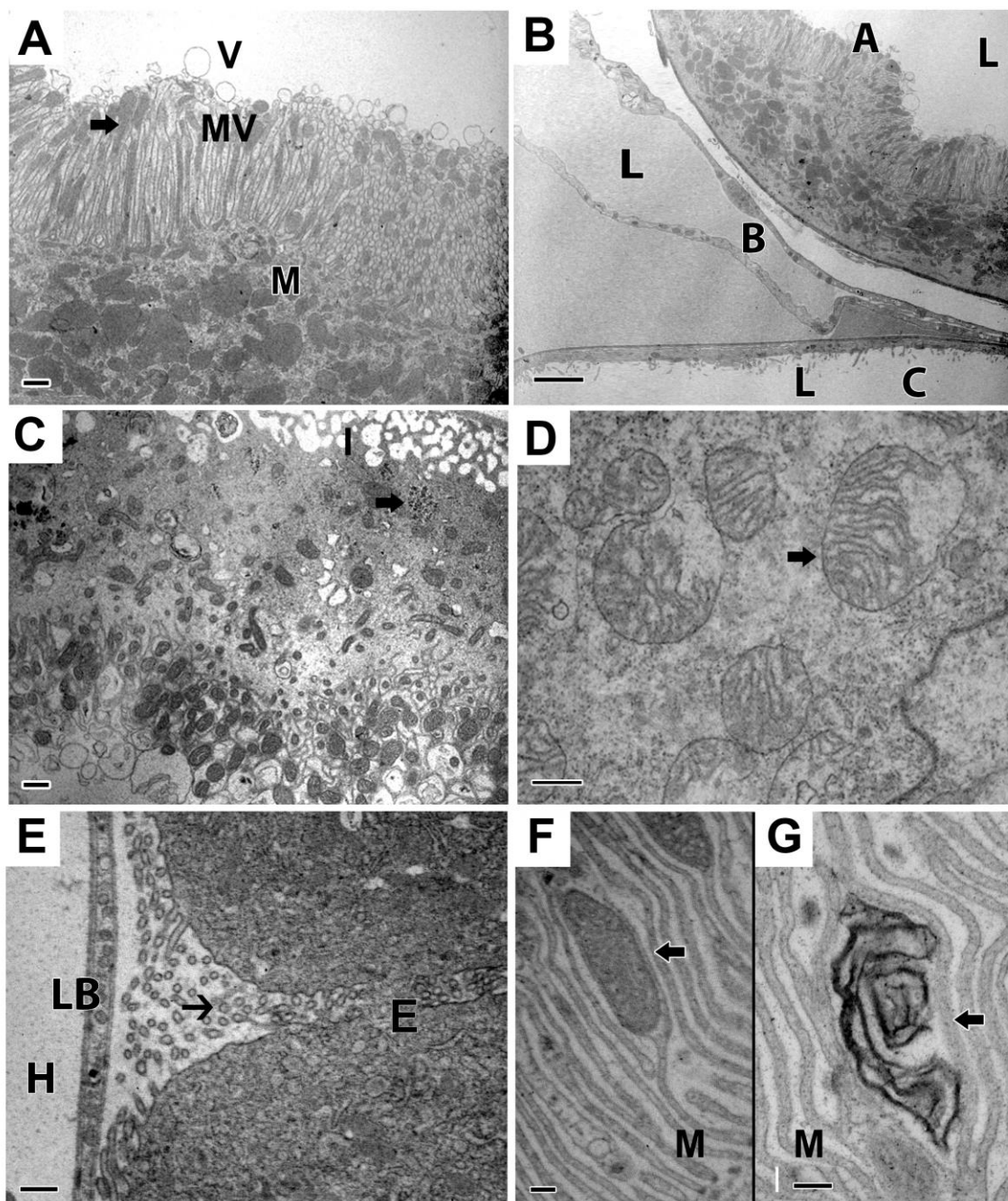


Fig 3. MET dos TM de *Diatraea saccharalis* da região da ampola e reto. **A.** TM região do reto não parasitado. (M) mitocôndrias eletrondensas, (MV) microvilos, (L) lúmen, (seta) mitocôndria no interior de microvilo, (V) vesículas eletrólúcidas liberadas no lúmen. Bar = 0,5 μ m. **B.** Reto não parasitado 2 tipos de células formadoras dos TM. (A) principal, (B) reabsortiva, (C) reabsortiva, (L) lúmen. Bar = 2 μ m. **C.** TM com 5 dias de parasitismo, (I) invaginações de base, (seta) grânulos de glicogênio, (M) mitocôndrias. Bar = 0,2 μ m. **D.** TM região do reto com 9 dias de parasitismo. (seta) mitocôndrias vacuolizadas. Bar = 0,2 μ m. **E.** TM região do reto com 9 dias de parasitismo. (BM) membrana basal em bicamada, (HL) hemolinfa, (S) espaço intercelular, (seta) vesículas globosas e lineares. Bar = 0,5 μ m. **F.** TM da região do reto com 5 dias de parasitismo. (MV) microvilos em forma de bastão, (seta) mitocôndria. Bar = 0,2 μ m. **G.** TM região do reto com 5 dias de parasitismo. (seta) corpo mielínico, (MV) microvilos em forma de bastão. Bar = 0,2 μ m.

DISCUSSÃO

Em larvas de *Diatraea saccharalis*, os TM estão posicionados ao longo do tubo digestivo, desde a região mediana do mesêntero até o final do intestino posterior, mantendo ligações com o corpo gorduroso, com o intestino e com os próprios túbulos enovelados por inúmeras traqueíolas, são em número de seis, longos e finos, banhados pela hemolinfa. A inserção dos túbulos no intestino ocorre na região de transição do mesêntero e proctodeo, por duas estruturas denominadas ampolas. Na região final do reto os túbulos são envolvidos por uma membrana perinéfrica apresentando uma formação criptonefridial, observa-se também a junção de dois túbulos com a parede do reto. Apresentam-se, portanto com descrito para a maioria de lepidóptera (Eaton, 1988; Chapman, 1998; Gullan e Craston, 2005) o arranjo criptonefridial no final do reto está presente e relaciona-se com a reabsorção de água e sais para a manutenção da homeostase (Richards e Davis, 1994; Chapman, 1998; Levy et al., 2004) porém em *D. saccharalis*, observa-se a fusão de dois túbulos na parede do reto (Rigoni et al., 2004).

Em *D. saccharalis*, no estágio larval, as células que constituem os TM podem ser classificadas em 2 tipos, células principais ou secretoras e células reabsortivas, presentes tanto na região do reto como na região da ampola. As células principais são caracterizadas por citoplasma abundante, e núcleo central, invaginações basais bem desenvolvidas formando labirintos onde são encontradas inúmeras mitocôndrias, microvilosidades na região apical, em contato com o lúmen. Apresentam morfologia semelhante a favo de mel, com mitocôndrias em seu interior. Essa característica de célula principal ou secretora é descrita em várias ordens de insetos como díptera (Bradley, et al., 1982) Himenóptera (Hazelton, et al., 2001; Cruz-Landim 2009), Hemíptera (Martine et al., 2007) e Coleoptera (Grenn, 1981).

O citoplasma das células principais, apresenta vesículas eletrondensas e eletronlúcidas, vacúolos e vesículas que são extrusadas para o lúmen carregando material oriundo da hemolinfa. Células de larvas parasitadas exibem corpos mielínicos, inclusive na região dos microvilos, resultado de eliminação de resíduos ou organelas celulares (Rivers et al., 2007), porém não foram encontradas concreções mineralizadas como relatado por vários

pesquisadores (Schuab e Schnitker, 1988; Guo-Xing et al., 2005; Pinheiro et al., 2008; Delakorda et al., 2009).

Para Maddrell, et al. (1991) a função básica dos TM é o transporte de fluídos da hemolinfa para dentro do lúmen, além do transporte passivo ocorre transporte ativo, mediado por bombas de H⁺ ATPase (O'Donnell et al., 1983), isso é corroborado pela grande quantidade de mitocôndrias e traqueíolas presentes nos túbulos. Nos TM de *D. saccharalis* são encontradas traqueíolas aderidas, no citoplasma da célula depósitos de glicogênio e inúmeras mitocôndrias que se posicionam também no interior dos microvilos. Essas organelas são polimórficas e eletrondensas nas células não parasitadas e até o 5º dia de parasitismo, no 9º dia de parasitismo, em algumas células, as mitocôndrias apresentam vacuolização e perda de matriz, indicando processo degenerativo assim como encontrado nas células de intestino médio com o mesmo tipo de parasitismo descrito por Pinheiro e Gregório (2010).

Segundo Blunn (1985), existem diferentes vias de transporte transepitelial, através de vesículas, pelo citoplasma sem a presença de vesículas e via espaço intercelular. Na região do reto em *D. saccharalis* com 9 dias de parasitismo observa-se a presença de espaço intermembranas indicando o movimento paracelular de pequenas vesículas que provavelmente são responsáveis por excreções de toxinas (Maddrell e O'Donell, 1992). O transporte do tipo paracelular é observado em diferentes espécies, porém é quase imperceptível nas células em repouso (Grenn et al., 1980; Nichols, 1984; Hernández et al., 2002).

Além do transporte de fluídos da hemolinfa para os túbulos e posteriormente para o reto, os TM são responsáveis pela reabsorção de água e sais para manutenção da homeostase, células reabsortivas desempenham essa função, exibem citoplasma menos desenvolvido, microvilos escassos e lúmen de maior calibre permitindo a passagem rápida de fluídos (Grenn, 1981; Richards e Davies, 1994; Arab e Caetano 2002). As células reabsortivas encontradas em *D. saccharalis* tanto na região da ampola como na região do reto onde formam o arranjo criptonefridial demonstram maior capacidade de reabsorção segundo Fermino et al. (2010).

No parasitismo de *D. saccharalis* por *C. flavipes* as alterações morfológicas dos TM e ampolas, não foram perceptíveis, exceto pela presença

de hemócitos e teratócitos, pois os parasitas cenobiontes produzem, nos hospedeiros, alterações na composição da hemolinfa, sistema endócrino e sistema imunológico, porém, a manutenção dos órgãos é de suma importância para o ciclo de vida do parasitóide (Quicke, 1997; Sheng et al., 2003). *C. flavipes* é um endoparasita, cenobionte, gregário e regulador, portanto manipula a fisiologia do hospedeiro em benefício próprio (Pennachio e Strand, 2006; Pinto et al., 2006; Jevis et al., 2008), a ação do parasitóide está relacionada com a diminuição do número de hemócitos, manipulação da dieta, metamorfose do hospedeiro não encapsulação e nodulação (Lavine e Strand, 2002).

A manipulação dos processos fisiológicos e bioquímicos dos hospedeiros se faz por meio de venenos, proteínas ovarianas, vírus simbiotes como o polidnavírus, injetados junto com os ovos no momento da ovoposição. Ainda como estratégia de sobrevivência no interior do hospedeiro, os parasitóides liberam células derivadas do tecido extraembrionário chamados de teratócitos (Strand e Pech 1995; Beckage e Gelman 2004; Webb e Strand, 2005) comparando *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* com larvas não parasitadas observou-se um aumento inicial de hemócitos aderidos aos TM, intestino e sobre o corpo dos parasitóides, Lopes (2009) relata que a resposta imune do hospedeiro diminui com o desenvolvimento do parasitóide, o mesmo ocorrendo com o número de hemócitos. Os teratócitos foram observados em maior quantidade na região do reto com nove dias de parasitismo, O número dos teratócitos podem variar conforme a degeneração dos mesmos e a utilização como alimento para o parasitóide (Basio e Kim, 2005), essas células auxiliam na manutenção da vida do endoparasita (Dahalman e Vinson, 1993). Não foram encontrados nos TM de *D. saccharalis* polidnavírus, provavelmente este tecido pode não ser alvo desse vírus, como foi descrito por Cordeiro (2007) em *Anticarsia gemmatalis* parasitada por baculovírus e em *Bombyx mori* infectado por nucleopoliedrovirus (Takeda, 2009).

Agradecimentos: Centro de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá/Paraná/Brasil, Laboratório de Microscopia e Microanálise /Ibilce-Unesp/ São José do Rio Preto/São Paulo e NAP/MEPA ESALQ/USP/ Piracicaba/Paraná/Brasil.

BIBLIOGRAFIA.

- Arab, A., Caetano, F.H. 2002. Segmental specializations in the Malpighian tubules of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Myrmicinae): an electron microscopical study. *Arthropod Struct Dev.* Jun:30 (4): 281-292.
- Basio, N.A., Kim, Y. 2005. A short review of teratocytes and their characters in *Cotesia plutellae* (Braconidae:Hymenoptera). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 8: 211-217.
- Beckage, N.E., Gelman, D.B.. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Beyenbach, K. W., Skaer, H. and Dow, J. A. T. 2010.. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 351-374.
- Blunn, M. S. 1985. *Fundamentals of Insect Physiology*. John Wiley & Sons. New York. USA. Pág. 112.
- Bradley, T.J., Sturat, A.M., Satir, P. 1982. The ultrastructure of the larval malpighian of a saline-water mosquito. *Scan Electron Microsc.*; (PT 1): 243-260.
- Bradley, T. J. 1985 The excretory sistem: structure and function. In: *Insect physiology, biochemistry and pharmacology.* v. 4, p. 421-465.
- Bution, M.L., Caetano, F.H., Zara, F.J. 2007. Contribuição dos túbulos de Malpighi para a manutenção de micoorganismos simbiotes em Cephalotini. *Biológico*, São Paulo, v.69, suplemento 2, p. 339-343.
- Chapman, R.F.. 1998. *The Insects: structure and function.* 4ed. Cambridge: Harvard University Press, 919 p.
- Conti, B., Berti, F., Mercati, D., Giusti, F., Dallai, R. 2010. The ultrastructure of malpighian tubules and the chemical composition of the cocoon of *Aeolothrips intermedius* Bagnall (Thysanoptera). *J. Morphol.* (2): 244-254.
- Cordeiro, B.A. 2007. Efeitos patológicos nos túbulos de Malpighi de *Anticarsia gemmatalis* causados pela infecção por recombinantes do *baculovírus Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília.
- Cruz-Landim, C. 2009. *Abelhas: Morfologia e Função dos Sistemas* – São Paulo: Editora UNESP. 408 p.
- Dahlman, D.H. and Vinson, S.B. 1993. Teratocytes: developmental and biochemical characteristics, In N.E. Beckage, S.N. Thompson & B.A. Federici (eds.). *Parasites.* p. 145-165.
- Davies, R.G. 1988. *Outlines of entomology.* 7th ed. Chapman and Hall, London, 408p.
- Delakorda, SL; Letofsky-Papst, I; Novak, T; Hofer, F; Pabst, MA. 2009 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 (Rhaphidophoridae, Saltatoria) ARTHROPOD STRUCT DEV. 38(4): 315-327.
- Eaton, J.L. 1988. Lepidopteran Anatomy. New York: John Wiley and Sons. p. 189-202.
- Fermino, F., Conte, H., Falco, J.R. 2010. Analysis of nucleus activity in malpighian tubules of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) larvae by critical electrolyte concentration. Neotrop. Entomol. Jul-Aug: 39(4): 568-571.
- Grenn, L.F., Berquist, P.R., Bullivant, S. 1980. The structure and function of the smooth septate junction in a transporting epithelium: the Malpighian tubules of the New Zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa*. Tissue Cell. 12 (1): 141-151.
- Grenn, L.F. 1981. Cryptonephric malpighian tubule system in a dipteran larva, the New Zealand glow-worm, *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae): a structural study. Chromosoma. 83 (5): 619-643.
- Guagliumi, P. 1972/1973. Pragas da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 622 pp.
- Gullan, P. J. and Cranston, P. S. 2005. The insects: an outline of entomology, 3 edition. Blackwell Publishing.
- Guo-Xing, W., Gao, X., Gong-Yin, Y., Kai, L., Cui, H., Jia-An, C. 2005. Ultrastructural Alterations in midgut and Malpighian tubules of *Boettcherisca peregrine* exposure to cadmium and copper. Tissue Cell. Jun:37 (3): 223-232.
- Hazelton, S.R., Felegenauer, B.E., Spring, J.H. 2001 Ultrastructural changes in the Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*, at the onset of diuresis: A time study. J Morphol. Jan;247(1):80-92.
- Hensley, S. D., Hammond, A. M. 1968 Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet. J. Econ. Ent. 61(6): 1742-1743.
- Hernández, C.S., Gutiérrez, A.M., Vargas-Janzen, A., Noria, F., González, E., Ruiz, V. Whittembury, G. 2002. Fluid secretion in *Rhodnius upper* malpighian tubules (UMT): water osmotic permeabilities and morphometric studies. J, Morphol. Jan 251 (1): 73-82.
- Jervis, M.A., J. Ellers, & J.A. Harvey. 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. Annu. Rev. Entomol. 52: 361-385.
- Lavine, M. D., Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 32: 1295-1309.
- Levy, S. M., Falleiros, A. F., Moscardi, F., Gregório, E. A., Toledo, L. A. 2004 Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Neotropical Entomology, Londrina, v.33, n.4, p 427-431.
- Lopes, C.S. 2009. Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia Flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação na área de Entomologia da

- Universidade de São Paulo – Escola de Agricultura Luiz de Querioz.
Piracicaba,
SP.
- Maddrell, S.H.P., Herman, W., Mooney, R.L., Overton, J.A. 1991. 5-Hydroxytryptamine:
A second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. J. exp. Biol. 156, 557-566.
- Maddrell, S.H.P., O'Donnell, M.J. 1992. Insect Malpighian tubules: V. ATPase action in ion and fluid transport. J. Exp. Biol., v. 172, p. 417-429.
- Martine, S.V., Nascimento, S. B., Morales, M.M. 2007. *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 79 (1) : 87-95.
- Martinelli, A. 1998. Histoquímica e ultra-estrutura dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação.
de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
p.100.
- Martoja, R.; Ballan-Dufrançais, C. 1984. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: King, r.c.; Akai, h. Insect Ultrastructure. New York: Plenum Press, v. 2, p. 119-261.
- Nicholls, S.P. 1984. Ultrastructural evidence for paracellular fluid flow in the Malpighian tubules of a larval mayfly. J. Cell. Dec:72: 101-109.
- O'Donnell, M.J., Maddrell, S.H.P., Gardiner, B.O.C. 1983. Transport of uric acid by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* and the other insects. J. exp. Biol. 103 169-184.
- Pinheiro, D.O., Conte, H., Gregório, E.A. 2008. Spherites in the midgut epithelial The sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. BIOCELL. 32(1): 61-67.
- Pennacchio, F, Strand, M.R. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. Annu. Rev. Entomol. 51: 233–58.
- Pinheiro, D.O., Conte, H., Gregório, E.A. 2008. Spherites in the midgut epithelial The sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. BIOCELL. 32(1): 61-67.
- Pinheiro, D.O., Gregório, E. A. 2010. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases Braz. J. Biol., vol. 70, nº 1, p. 163-169.
- Pinheiro, D.O., Zucchi, T.D., Zucchi, O.L.A.D., Nascimento Filho, V.F., Almeida E., Cônsoli, F.L. 2010. Inorganic elements in the fat bodies of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Comparative biochemistry and physiology, Part B, Biochemistry & Molecular biology. 156(4):273-278.
- Pennacchio, F, Strand, M.R. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. Annu. Rev. Entomol. 51: 233–58.
- Pinto, A.S., Garcia, J.F., Botelho, P.S.M. 2006. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In: A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (eds.), Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p
- Quicke, D.L.J. (1997) Parasitic Wasps. Chapman and Hall, London. 470 pp.
- Rigoni, G.M., Tomotake, M.E.M., Conte, H. 2004. Morphology of Malpighian tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) at final larval development. Cytologia 69 (1): 1-6, Japan.

- Ryerse, J.S. 1979. Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. *Tissue & Cell*, v. 11, n. 3, p. 533-551.
- Richards, O.W., Davis, R. G. 1994 *Imm's General Textbook of Entomology*. Vol. 2. 10^a Ed. Chapman and Hall Ltd. London.
- Rivers, D.B., Ergin, E., Uçkan, F. 2007. Cell death in the host–parasitoid relationship, p. 69–96. In A.J. Corvin (ed), *New developments in cell apoptosis research*. NY-USA , Nova Science Publishers, 287p.
- Roc, R.M., Hammond Jr., A.M., Reagan, T.E., Hensley, S.D. 1981. A Bibliography of The Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) 1887-1980. US Agricultural Research Service (Southern Region) US Department of Agriculture, New Orleans, 101 pp.
- Spring, J.H., Robichaux, R.S., Hamlin, J.A. 2009. The role of aquaporins in excretion in insects. *Journal of Experimental Biology*. 212(3): 358-362.
- Schuab, G.A., Schnitker, A. 1988. Influence of *Blastocrithidia triatome* Malpighian (Trypanosomatidae) on the reduviid bug *Triatoma infestans*: alterations in the tubules. *Parasitol. Res.* 75. 88-97.
- Sheng, L., Falabela, P., Kuriachan, I., Vinson, S.B., Borst, D.W., Malva, C., Pennacchio, P. 2003. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. *Journal of Insect Physiology*, London, v. 49, n. 11, p. 1021-1030.
- Strand, M.R. and Pech, L.L. 1995. Immunological compatibility in parasitoid–host relationships. *Annual Review of Entomology* 40: 31–56.
- Takeda, K.I. 2009. Obtenção de seqüências expressas em túbulos de Malpighi de híbridos de bicho-da-seda infectados pelo “*Bombyx mori*” nucleopoliedrovírus BmMNPV. Dissertação. PósGraduação em Genética e Melhoramento. UEM. Maringá- Paraná.
- Webb, B.A. Strand, M. R. 2005. The biology and genomics of polydnaviruses. In: Gilbert L.I., Iatrou, K, Gill S.S, Editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 6 pp. 323-360.
- Wigglesworth, V. B. 1974. *The principles of insect physiology*. New York: John Wiley and Sons, 1974. 827 p.
- William, J.R., Metcalfe, J.R., Mungomery, R.W., Mathes, R. 1969. *Pests of Sugar Cane* Elsevier Publ. Co. New York, N.Y., 586 pp.

HISTOQUÍMICA E PADRÕES ESTERÁSICOS DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE LARVAS DE *Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794 (LAPIDOPTERA; CRAMBIDAE) NÃO PARASITADA E PARASITADA POR *Cotesia flavipes*, Cameron 1891 (HYMENOPTERA; BRACONIDAE).

RESUMO

A fase larval de *Diatraea saccharalis* causa prejuízos anuais de grande monta para a indústria sucroalcooleira, o estudo dos órgãos internos é importante para a compreensão da fisiologia do inseto. Os túbulos de Malpighi (TM) são os principais órgãos excretores desse grupo. Foram retirados os TM de larvas não parasitadas e parasitadas por *Cotesia flavipes* do primeiro até o nono dia de parasitismo, submetidos a testes histoquímicos para a detecção de carboidratos neutros, proteínas, lipídios e sais de cálcio. Também foram detectados os padrões esterásicos dos túbulos. Tanto a região do reto como a região da ampola responderam positivamente aos corantes, não havendo diferenças significativas entre larvas não parasitadas e parasitadas, entretanto houve diferença na concentração de sais de cálcio que se mostrou mais abundante na região do reto que na região da ampola, as esterases mostraram diferença entre larvas não parasitadas e parasitadas.

Palavras chaves: *Diatraea saccharalis*, Histoquímica, Esterases, *Cotesia flavipes*, Túbulos de Malpighi.

Gislei Maria Rigoni¹, Luciana P. B. Machado², Rogério Pincela Mateus³ e Hélio Conte⁴.

^{1,2,3} Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Centro Oeste – Guarapuava – Paraná – Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá – Maringá – Paraná – Brasil.

INTRODUÇÃO

Entende-se por excreção a retirada de resíduos tóxicos resultado do metabolismo celular, os insetos apresentam um único compartimento onde circula a hemolinfa que banha todos os órgãos, incluindo os túbulos de Malpighi (TM) (Chapman, 1998). Os TM são os principais órgãos excretores na maioria dos insetos, são responsáveis pela filtração da hemolinfa com a retirada de metabólitos e manutenção da homeostase da água, íons e sais (Natochin, 2005; Gonçalves, 2013). O filtrado, chamado de urina primária, é lançado para o lúmen intestinal através de estruturas denominadas ampolas que se inserem entre a junção do mesêntero com o proctodeo. Ocorre transporte ativo com liberação de sódio e potássio realizado por ATPases, essas enzimas estão presentes na membrana apical da célula do túbulo (Beyenbach et al., 2010). Os filtrados penetram nos túbulos vindos da hemolinfa por transporte passivo, exceto se forem tóxicos (Pannabecker et al., 1995) a capacidade de excretar substâncias tóxicas confere ao túbulo, importante papel na resistência do inseto a pesticidas (McGettigan et al., 2005).

A excreção dos insetos é controlada por mecanismos neuroendócrinos, geralmente os fatores diuréticos atuam sobre os TM e os antidiuréticos atuam na porção final do reto propiciando a reabsorção de água e sais (Beyenbach et al., 2003; Martine et al., 2007).

Em himenóptera a porção distal do túbulo permanece livre na hemocele (Cruz-Landim 2009), em lepidóptera, na porção final do reto os TM formam um arranjo conhecido como criptonefridial (Levy et al., 2004). Esse arranjo possibilita a reabsorção de água e sais, imprescindíveis para a manutenção de níveis satisfatórios desses elementos no organismo dos insetos, e o resto é lançado para o exterior na forma de urina secundária (Richards e Davies, 1994; Gullan e Craston, 2005; Natochin, 2005). No arranjo criptonefridial de *D. saccharalis* foi observado uma maior atividade genética, evidenciando a função reabsortiva dessa região (Fermino et al., 2010).

Como na maioria dos insetos os TM de *D. saccharalis* são formados por uma única camada de células, assentadas em uma lâmina basal e com microvilosidades em contato com a luz do túbulo (Martoja e Ballan-Dufrançaís, 1984). Em lepidóptera existem dois tipos celulares constituintes dos TM, as

células secretoras que apresentam invaginações de base bem desenvolvidas, mitocôndrias e microvilosidades abundantes e as células reabsortivas que apresentam lúmen com calibre maior, menor quantidade de mitocôndrias e microvilosidades (Chapman,1998).

Diferentes métodos de estudo vêm sendo utilizados para que se possa compreender a fisiologia dos insetos, a determinação das esterases é utilizada para elucidar possíveis funções dessas enzimas no metabolismo do inseto, como controle do nível de hormônio juvenil e resistência a inseticidas (Lucena et al., 2005). Em *D. saccharalis* já foram determinadas as esterases presentes no corpo gorduroso e aparelho reprodutor (Batista, et al, 2006), ação do organofosforado Malathion (Lopes, 2009), polimorfismo em Est-3 (Ruvolo-Takasusuki, et al., 2002), expressão de esterases após o uso do inseticida Novaluron (Batista, 2010), entre outros.

A estrutura dos TM, bem como o estudo histoquímico desse órgão e os padrões esterásicos de *D. saccharalis* não parasitados e parasitados por *C. flavipes* são importantes para determinação de funções distintas dos TM ainda não relatadas, bem como as possíveis alterações causadas pelo parasitismo.

Materiais e Métodos

Material Biológico.

Larvas de *Diatraea saccharalis* e adultos de *Cotesia flavipes*, foram fornecidos pelo Laboratório de Entomologia da Usina de Santa Terezinha, do Distrito de Iguatemi, Maringá/Paraná/Brasil (Lat: 23° 25'S - Long: 51° 57'W). As larvas de *D. saccharalis*, em terceiro instar, foram expostas às fêmeas, recém fecundadas, de *C. flavipes* possibilitando a ovoposição e parasitismo. Os insetos foram mantidos tubos de vidro, em dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond (1968), em câmara climatizada na temperatura 24°C, umidade relativa de 64 ± 10% e fotofase de 14 horas. Também foram utilizadas larvas de *D. saccharalis* não parasitadas em terceiro instar, mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Testes histológicos

As larvas de *D. saccharalis* foram anestesiadas por resfriamento e dissecadas com solução salina para insetos (0.1M NaCl, 0.1M Na₂HPO₄ e 0.1M KH₂PO₄), com auxílio de microscópio estereoscópico. As larvas foram abertas pela região ventral e retirada as regiões da ampola e criptonefridial dos TM. As larvas parasitadas foram submetidas à extração dos túbulos em um intervalo de 24 horas durante nove dias seguidos. Foram utilizadas 10 espécimes, para cada dia, do primeiro até o nono dia de parasitismo, e 40 espécimes não parasitadas. Os TM retirados foram fixados na seguinte forma: para detecção de proteínas utilizou-se glutaraldeído 2,5%, para detecção de glicogênio e carboidratos, paraformaldeído 4%, para detecção de lipídios e cálcio formol 10%. Após o protocolo usual de fixação das peças, o material foi incluído em parafina utilizando-se o seguinte protocolo: desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Posteriormente foram realizados os cortes com micrótomo e montados em lâminas de microscopia. Partes das lâminas foram coradas com PAS para carboidratos neutros e polissacarídeos contendo ligações 1-2 glicol; Xilidine Ponceau, para proteínas, principalmente as básicas; Sudan Black pra lipídios e técnica von Kossa para detecção de cálcio .

Determinação de esterases.

Os TM foi retirados de larvas de *D. saccharalis* não parasitadas e com nove dias de parasitismo, conforme descrito anteriormente. Ao material foi adicionado 30 μ l de tampão Tris-HCL 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10% e a uma temperatura de 0°. O material foi macerado e centrifugado por 15 minutos a 25.000 rpm em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação 15 μ l do sobrenadante de cada amostra foi colocado no gel, os géis passaram por eletroforese por aproximadamente quatro horas, a uma voltagem constante de 200 V. Para o preenchimento dos compartimentos superiores e inferiores da cuba foi utilizado tampão Tris-glicina 0,1 M pH 8,3.

As esterases foram identificadas depois da pré-incubação dos géis em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2, esse tampão foi retirado, após 30 minutos, e foi adicionada a solução de coloração. A solução de coloração possui seguinte composição: 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 , 5 ml de n-propanol, 0,06 g de corante Fast Blue, 0,02 g de α -naftil acetato e 0,03 g de β -naftil acetato, esses dois substratos foram solubilizados em acetona (1 ml). Em temperatura ambiente e uma hora de incubação no escuro, foram visualizadas as esterases como bandas pretas indicando alfa esterases ou vermelhas indicando beta esterases.

Os espécimes e dados utilizados na execução deste trabalho encontram-se depositados na Coleção Entomológica do Laboratório de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

RESULTADOS

Os túbulos de Malpighi de larvas de *Diatraea saccharalis* não parasitadas e parasitadas por *Cotesia flavipes* com três, quatro, cinco, seis e nove dias de parasitismo, analisados na região da ampola e do reto, apresentaram as seguintes características histoquímicas:

Cortes transversais dos TM corados com Xilidine Ponceau para a determinação de proteínas, em larva não parasitada observa-se a ampola inserida na parede do intestino, entre a região o mesêntero com proctodeo, mostra a ampola formada por parede fina, tanto essa estrutura como o intestino reagiram positivamente ao corante (Fig 1, A). Os TM da região da ampola apresentam lúmen bem desenvolvido, com microvilosidades em contato com a luz do túbulo, a reação positiva ao corante é mais evidente na membrana basal e nas microvilosidades, os cortes são de larvas parasitadas com cinco e nove dias de parasitismo (Fig. 1, B e C). Na região do reto os TM de larvas com cinco dias de parasitismo ocorre a presença de microvilosidades, núcleos, traqueíola e secreção luminal. (Fig.1, D), na porção criptonefridial do reto, com 9 dias de parasitismo, observa-se os TM com microvilosidades, membrana perinéfrica e teratócitos (Fig 1. E), todas as estruturas apresentaram reação positiva ao corante.

Os cortes transversais dos TM corados com Sudan Black para detecção de lipídios, em corte transversal da região da ampola de com três dias de parasitismo apresentam a ampola e região de inserção no intestino e os TM com microvilosidades e reação positiva para o corante (Fig 1. F). Nos TM da região do reto de larva não parasitadas nota-se a presença de núcleos não corados, microvilosidades e secreção luminal, a região das microvilosidades e membrana basal se coraram mais intensamente (Fig 2, A), com quatro dias de parasitismo além do TM observa-se a presença do parasita *C. flavipes* (Fig. 2 B).

Cortes transversais dos TM corados com PAS (Periodic Acid Schiff) para detecção de polissacarídeos neutros. A região da ampola em larvas com três dias de parasitismo o TM apresenta reação positiva de intensidade mediana ao reagente, presença de microvilosidades que reagem mais intensamente ao corante (Fig. 2 C). A região do reto com nove dias de parasitismo evidencia a presença de teratócitos no arranjo criptonefridial, TM

com microvilosidades, os teratócitos e o reto com reação mais intensa ao PAS. (Fig. 2 D).

Cortes dos TM utilizando-se o método Von Kossa para detecção de sais de cálcio. A região da ampola TM com 6 dias de parasitismo, apresentou presença pouco intensa de sais de cálcio (Fig. 2, E). Na região do reto pode-se observar maior quantidade de sais de cálcio, concentrados próximo à membrana basal (Fig. 2, F).

A análise do padrão de esterases dos TM de *Diatraea saccharalis* revelou a presença de quatro locos, sendo dois preferencialmente α -esterase (EST-2 e EST-3), e dois preferencialmente β -esterase (EST-1 e EST-4). Uma observação qualitativa geral demonstrou que houve uma diminuição da atividade esterásica nos túbulos das larvas parasitadas. Um padrão observado foi que nos TM das larvas controle, sempre que o loco EST-3 apareceu com maior atividade, o mesmo ocorreu com o loco EST-2 (amostras 2, 7, 11 e 13 – Figura A). Contudo, nas duas amostras de túbulos das larvas parasitadas em que o loco EST-3 apresentou forte atividade (amostras 13 e 14 – Figura B), não houve um aumento relacionado da atividade do loco EST-2, como observado para as larvas controle. Além disso, os locos EST-1 e EST-4 apresentaram maior expressão nas larvas controle do que nas parasitadas.

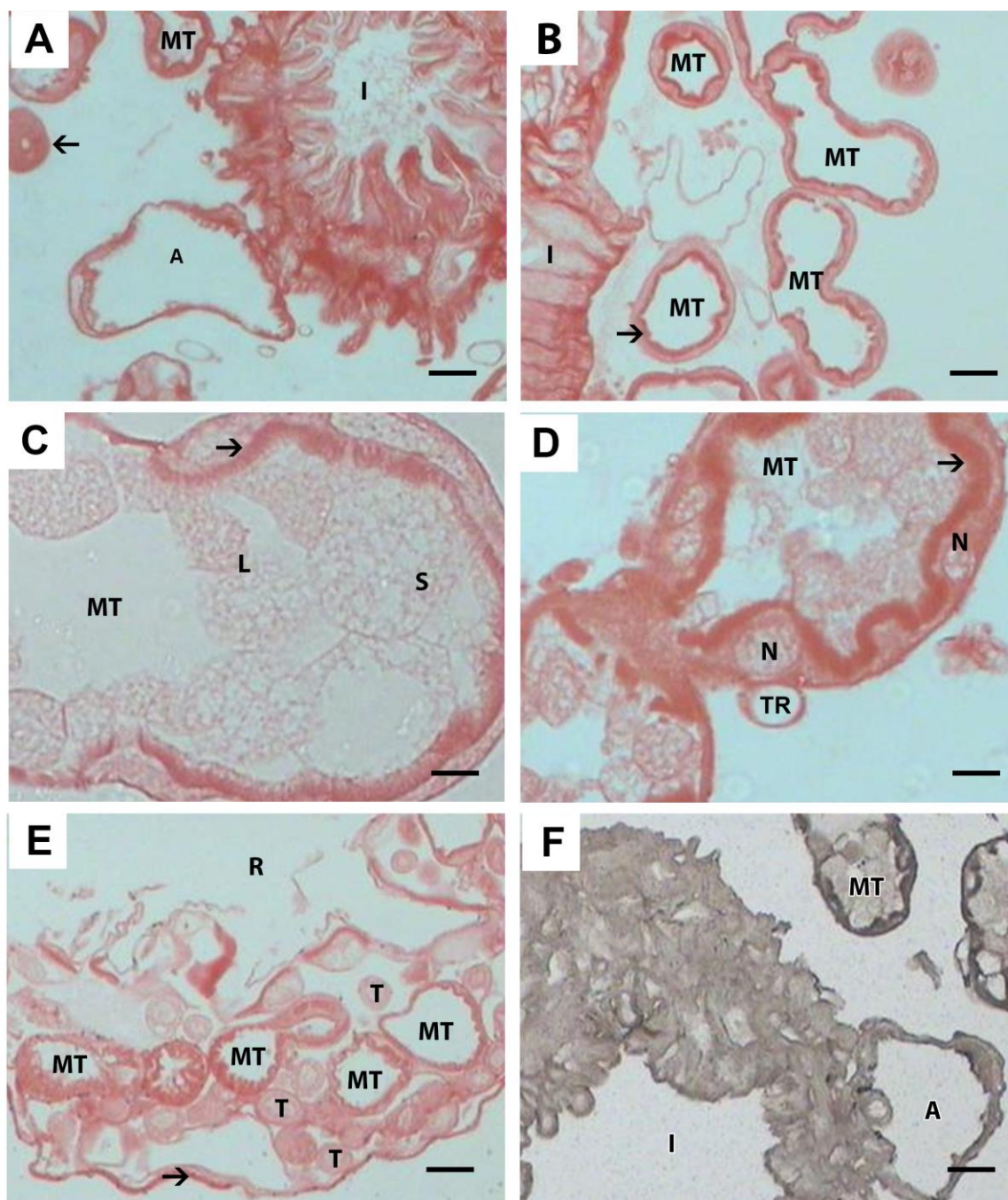


Fig.1. Túbulos de Malpighi de *D. saccharalis* corados com Xilidine Ponceau corte transversal. **(A,B,C,D e E).** A. Ampola não parasitada. (A) ampola, (I) intestino, (MT) túbulos de Malpighi, (seta) glândula mandibular. Bar = 40 μ m. **B.** TM da região da ampola com 5 dias de parasitismo por *C. flavipes*. (MT) túbulos de Malpighi, (I) intestino, (seta) microvilosidades. Bar = 40 μ m. **C.** TM da região da ampola 9 dias de parasitismo. (MT) túbulo de Malpighi, (L) lúmen, (S) secreção, (seta) microvilosidades. Bar = 10 μ m. **D.** TM da região do reto com 5 dias de parasitismo. (MT) túbulo de Malpighi, (TR) traqueíola, (N) núcleo, (seta) microvilosidades. Bar = 10 μ m. **E.** Região do reto com 9 dias de parasitismo. (R) reto, (MT) túbulos de Malpighi, (T) teratócitos, (seta) membrana perinéfrica. Bar = 40 μ m. **F.** Região da ampola com 9 dias de parasitismo corado com Sudan Black. (A) ampola, (I) intestino, (MT) túbulo de Malpighi. Bar = 40 μ m.

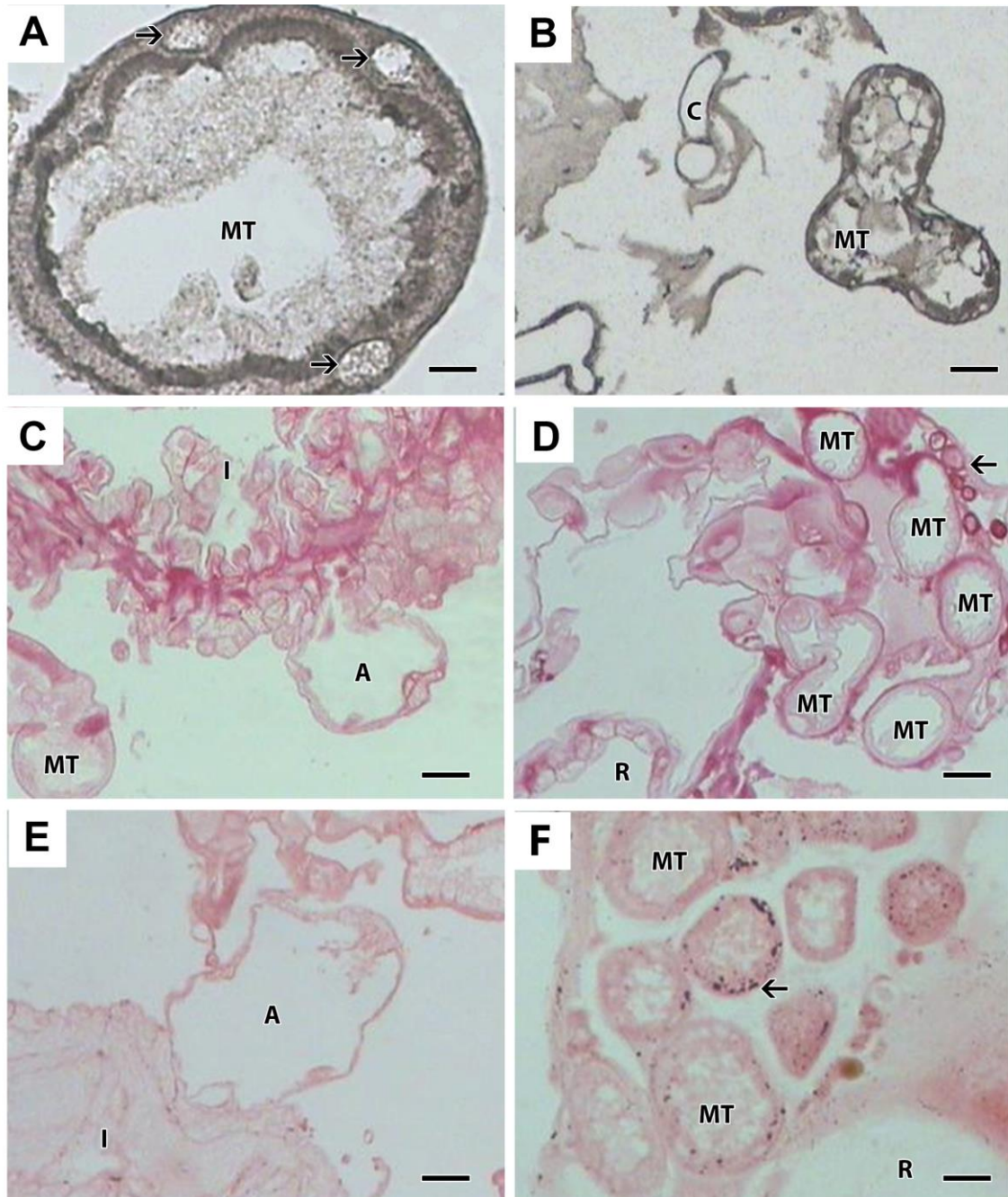


Fig. 2 **A.** Região do reto não parasitado. (MT) túbulo de Malpighi, (seta) núcleos, corado com Sudan Black. Bar = 10 μ m. **B.** Região da ampola, TM com 4 dias de parasitismo. (MT) túbulo de Malpighi, (C) larva de *C. flavipes*, corado com Sudan Black. Bar = 40 μ m. **C.** Região da ampola com 3 dias de parasitismo (MT) túbulo de Malpighi, (I) intestino, (A) ampola, corado com PAS. Bar = 40 μ m. **D.** Região do reto, com 9 dias de parasitismo. (MT) túbulos de Malpighi, (R) reto, (seta) teratócitos, corado com PAS. Bar = 40 μ m. **E.** Região da ampola com 6 dias de parasitismo. (I) intestino, (A) ampola, método Von Kossa para detecção de cálcio. Bar = 40 μ m. **F.** Região do reto com 9 dias de parasitismo. (R) reto, (MT) túbulos de Malpighi, (seta) sais de cálcio. Bar = 40 μ m.

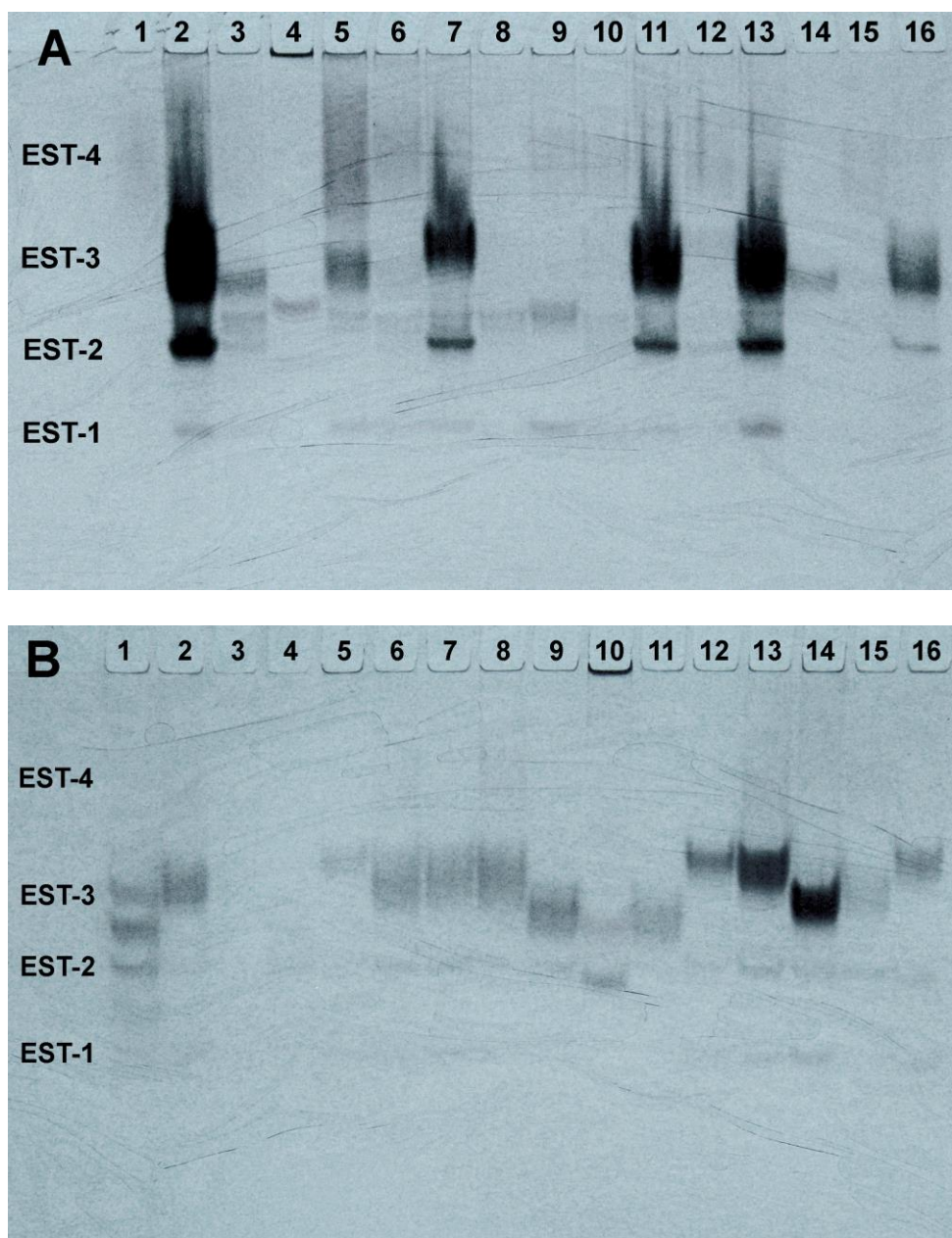


Fig.3 Perfil de esterases do túbulo de Malpighi de larvas de *Diatraea saccharalis* em PAGE 10%. **A.** Amostras 1-3 e 5-13 = túbulos de Malpighi de larvas controle (sem parasita); 14-16 = túbulos de Malpighi de larvas parasitadas; 4 = marcador – adulto de *Drosophila melanogaster*. **B.** Amostras 1-9 e 11-16 = túbulos de Malpighi de larvas parasitadas; 10 = marcador – adulto de *Drosophila melanogaster*.

Discussão

Os túbulos de Malpighi são constituídos por células que apresentam grande atividade metabólica (Chapmann, 1998). Além da excreção os TM estão envolvidos em processos de secreção de seda (Conti et al., 2010), defesa imunológica e retirada de substâncias tóxicas (Beyenbach et al., 2010), produção de lipídeos (Arab e Caetano, 2002), secreção de solutos e produtos mucosos (Cruz-Landim, 1998).

Em TM de *D. saccharalis* pode-se observar resposta positiva para a presença de proteínas tanto na região da ampola como na porção criptonefridial no reto, a região mais intensamente corada foram as microvilosidades e membrana basal, isso foi também observado em outro lepidóptera, testes foram realizados nas microvilosidades de todas as regiões das células dos TM indicam a ocorrência de mucoproteína e de transporte ativo (Cheung e Wang, 1994), Martinelli (1998) demonstrou que em formiga os TM apresentam proteínas homoganeamente distribuída mas a presença é maior na região apical da célula.

Na região criptonefridial foram observados teratócitos decorrentes do parasitismo pela *C. flavipes*, os teratócitos estão marcados fortemente para proteínas, pois, são células que auxiliam o parasitismo expressando vários genes, Alleyne et al. (2001) relatou o desenvolvimento de teratócitos pelo parasitismo *C. flavipes*.

Os lipídios foram detectados em todas as regiões dos TM e ampola, tanto nas larvas parasitadas como nas não parasitadas, observando-se uma maior marcação na região basal e apical da célula, os núcleos não se coraram, indicando que a técnica utilizada foi correta. Os lipídios foram detectados em TM de díptera (Ruchita e Krishna, 2012), Petzel et. al. (1993) destacou a presença de ácidos graxos e fosfolipídios, Arab e Caetano (2002) observaram secreção de lipídios na região distal dos TM de formiga, os lipídios são um dos constituintes das membranas celulares (Alberts et al., 2008).

Nos TM a presença de glicoconjugados e traqueíolas são uma constante, em *D. saccharalis*, a ocorrência de glicoconjugados é observada nas duas regiões estudadas, tanto na forma parasitada quanto na não parasitada, como nos outros testes histoquímicos, as regiões das células que

responderam mais intensamente foram a região basal e apical dos TM, locais de maior atividade. A região criptonefridial corou-se com mais evidência que a região da ampola, isso vem ao encontro dos resultados de Fermino (2010), onde encontrou núcleos com cromatina menos condensada nesse região, evidenciando maior atividade metabólica, Green (1981) observou em grilos o aumento de glicogênio para possibilitar a reabsorção na região criptonefridial, Rakitov (2002) descreveu a presença de mucopolissacarídeos em TM de ninfas de cigarra e Dimitriades e Pirpasopoulou (1992) acusaram PAS positivo nas microvilosidades dos TM de díptera. Em células digestivas de lepidóptera notou-se forte marcação ao PAS nas bordas estriadas (Gonçalves et al., 2012), essa mesma característica foi descrita por Pinheiro et. al. (2008) em *D. saccharalis* e por Rocha (2009) pesquisando hemiptera.

O cálcio é um sal necessário para vários processos metabólicos e os TM podem excretá-lo ou armazená-lo conforme a necessidade, Ryerse (1979) observou concreções de cálcio indicando processo anabólico em células primárias de TM em díptera, na análise feita nos TM e ampola de *D. saccharalis* observou-se que a região da ampola apresenta uma quantidade pequena de sais de cálcio, entretanto na região do reto a presença desse mineral é mais abundante, principalmente na região basal da célula, assim como foi descrito por Cruz-Landim (2000) nos TM de himenóptera.

O parasitismo promovido por *C. flavipes* sobre *D. saccharalis* tem se mostrado eficiente no controle biológico da praga da cana-de-açúcar (Pinto et al., 2006), no seu ciclo de vida a *C. flavipes*, como parasita cenobionte, altera o sistema imunológico do hospedeiro, porém não promove a morte do mesmo antes do tempo necessário para seu desenvolvimento, isso faz com que haja a preservação dos órgãos do inseto parasitado (Sheng et al., 2003), na análise histoquímica dos TM da região da ampola e reto de *D. saccharalis*, observou-se que os resultados foram positivos para detecção de proteínas, lipídeos, glicoconjugados neutros e sais de cálcio, tanto nas larvas não parasitadas como para as que sofreram parasitose, não havendo diferença significativa nas concentrações das moléculas analisadas.

Salvador e Consoli (2008) estudando corpo gorduroso de *D. saccharalis* afirmam que as alterações bioquímicas, de carboidratos, lipídeos e proteínas, ocorrem somente na hemolinfa, e não no órgão estudado, Hardwood e

Beckage (1994) estudando os mesmos insetos, perceberam que as alterações de proteínas ocorreram somente na hemolinfa e não nos órgãos do inseto parasitado.

A análise das esterases, entretanto, mostram uma diferença entre larvas parasitadas e não parasitadas, os TM de *D. saccharalis*, a análise do padrão de esterases mostrou a presença de quatro locos sendo dois de α -esterase (EST-2 e EST-3), e dois β -esterase (EST-1 e EST-4). Houve uma diminuição na atividade esterásica nos TM das larvas parasitadas. Nas larvas quando a EST-3 apresentou maior atividade, o loco EST-2 também aumentou, porém nas duas amostras de túbulos das larvas parasitadas em que o loco EST-3 mostrou grande atividade não ocorreu o mesmo com o loco EST-2, como nas larvas controle. Os EST-1 e EST-4 apresentaram menor expressão nas larvas parasitadas. O uso do inseticida Matafós na broca da cana, em determinada concentração, não causam a morte da larva, porém, alteram a expressão das esterases (Saelz e Ruvolo-Takasusuki, 2009).

Em *D. saccharalis* já foram determinadas as esterases do corpo gorduroso (EST-8 e Est- 9) e aparelho reprodutor feminino (EST- 4, EST- 5 EST- 7 EST- 8 e EST- 9) o aparelho reprodutor masculino não apresenta a EST-5, concluiu-se portanto, que é uma esterase sexo específica (Batista, 2006). A maioria dos trabalhos sobre o assunto estão relacionados ao padrão apresentado entre larvas tratadas com algum inseticida, Batista (2010) observou que o uso de Novalorum, que é um regulador de crescimento, aumenta o número de carboxilesterases para detoxificação em *D. saccharalis*, com uso de Malathion houve inibição parcial da EST- 7 e EST-8 e inibição total da EST-3 (Lopes, 2009). Em outro lepidóptera Kapin e Ahmad (1980) estudaram vários órgãos e concluíram que a maior atividade esterásica foi observada no intestino, principalmente carboxilesterase. Em *T. infestans* foram determinadas a esterases dos TM e hemolinfa, foram observadas seis bandas, quatro delas exclusivas da hemolinfa e duas exclusivas dos TM, cada uma provavelmente relacionada com a fisiologia do tecido (Tavares et al., 1998).

A inibição das esterases nas larvas parasitadas de *D. saccharalis* pode estar relacionada com os mecanismos de supressão imunológica propiciado pelo parasitismo por *C. flavipes*. A determinação das esterases dos túbulos de Malpighi não parasitadas e parasitadas, poderá auxiliar na compreensão da

ação do parasitismo sobre a larva da cana-de-açúcar e proporcionar embasamento para melhoria do controle dessa praga.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell. 5^a ed. Garland Science, New York, 1601p.
- Alleyne, M., Wiedenmann, R.N., Diaz, R.R. 2001. Quantification and development teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. *Journal of Insect Physiology*. Vol. 47 (12). Pag. 1419-1427.
- Arab, A., Caetano, F.H. 2002. Segmental specializations in the Malpighian tubules of the fire ant *Solenopsis saevissima* Forel 1904 (Myrmicinae): an electron microscopical study. *Arthropod Struct Dev*. Jun:30 (4): 281-292.
- Batista, A.O., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Conte, H. 2006. Caracterização das esterases no aparelho reprodutor e corpo gorduroso em adultos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Crambidae). *Anais da 58^a Reunião Anual da SBPC*. Florianópolis – SC.
- Batista, A.O. 2010. Toxicidade e expressão de esterases em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:Crambidae) após contaminação com o inseticida regulador do crescimento Novaluron. *Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento*. Universidade Estadual de Maringá. Maringá- PR.
- Beyenbach, K.W. 2003. Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects
J. Exp. Biol. 206, 3845-3856.
- Beyenbach, K. W., Skaer, H. and Dow, J. A. T. 2010.. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 351-374.
- Chapman, R.F.. 1998. *The Insects: structure and function*. 4ed. Cambridge: Harvard University Press, 919 p.
- Cheung, W.W.K., Wang, J.B. 1994 Functional Differentiation in the Malpighian Tubules of *Pieris canidia* (Lepidoptera: Pieridae) Larva: A Histochemical Study. *Annals of Entomological Society of America*. Vol 87(6). Pag. 901-907.
- Conti, B., Berti, F., Mercati, D., Giusti, F., Dallai, R. 2010. The ultrastructure of Malpighian tubules and the chemical composition of the cocoon of *Aeolothrips intermedius* Bagnall (Thysanoptera). *J. Morphol.* (2): 244-254.
- Cruz-Landim, C. 1998. Specializations of the Malpighian tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Acta Microsc.* 7: 26–32.
- Cruz-Landim, C. 2000. Localization of calcium and acid phosphatase in the Malpighian tubules of nurse workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Himenoptera, Apidae, Meliponini) *Biocience Journal*. Vol 16 (1). Pag. 87-99.
- Cruz-Landim, C. 2009. *Abelhas: Morfologia e Função dos Sistemas – São Paulo: Editora UNESP*. 408 p.
- Dimitriades, V.K., Pirpasopoulou, A. 1992. Complex carbohydrate presence in the gut and

- Malpighian tubules of *Drosophila auraria* larvae (Insecta: Diptera): a cytochemical study. *Cytobios.* Vol.70. Pag. 159-170.
- Fermino, F., Conte, H., Falco, J.R. 2010. Analysis of nucleus activity in malpighian tubules of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) larvae by critical electrolyte concentration. *Neotrop. Entomol.* Jul-Aug: 39(4): 568-571.
- Gonçalves, W.G. 2013 Ultraestrutura dos órgãos excretores de *Bombos morio* (Hymenoptera: Bombini): abelhas sem papilas retais. Tese de doutorado de Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG.
- Gonçalves, W.G., Fernandes, K.M., Nunes, J.C., Fialho, M.C.Q. Serrão, J. 2012. Morfometria, histologia e histoquímica do intestino médio de *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera). XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. Curitiba – PR.
- Grenn, L.F. 1981. Cryptonephric Malpighian tubule system in a dipteran larva, the New Zealand glow-worm, *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae): a structural study. *Chromosoma.* 83 (5): 619-643.
- Gullan, P.J., Craston, P.S. 2005. The Insects, 3 rd. Ed. An Outline of Entomology Blackwell Publishing, Oxford. 505 p.
- Hardwood, S.H., Beckage, N. E. 1994. Purification and characterization of an early expressed polydnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata* *Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 24 (7). Pag. 685-698.
- Hensley, S. D., Hammond, A. M. 1968 Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet. *J. Econ. Ent.* 61(6): 1742-1743.
- Kapin, M.A., Ahmad, S. 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochemistry.* Vol. 10 (3). Pag. 331-337.
- Levy, S. M., Falleiros, A. F., Moscardi, F., Gregório, E. A., Toledo, L. A. 2004 Morphological study of the hindguth in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology, Londrina,* v.33, n.4, p 427-431.
- Lopes, D.A. 2009. Marcadores moleculares aplicados à análise da contaminação com agrotóxicos e a genética de populações da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá. Maringá - PR.

- Lucena, A.L.M., Lapenta, A.S. 2005. Padrões de Esterases no desenvolvimento de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera:Curculionidae). Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia – SP.
- Martine, S.V., Nascimento, S. B., Morales, M.M. 2007. *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 79 (1) : 87-95.
- Martinelli, A. 1998.Histoquímica e ultra-estrutura dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Martoja, R.; Ballan-Dufrançaís, C.1984. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. *In*: King, r.c.; Akai, h. Insect Ultrastructure. New York: Plenum Press, v. 2, p. 119-261.
- McGettigan, J., McLennan, R.K., Broderick, K.E., Kean, L., Allan, A.K., Cabrero, P., Regulski, M.R., Pollock, V.P., Gould, G.W., Davies, S.A., Dow, J.A. 2005. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35(7). Pag. 741-754.
- Natochin, V.V. 2005. The role of sodium ions as a stimulus for the evolution of cells and multicellular animals. *Paleontological Journal.* Vol 39. Pag. 358-363.
- Pannabecker, T. 1995. Physiology of the Malpighian tubules. *Annual Review of Entomology* Vol. 40. Pag. 439-510.
- Petzel, D. H., Parrish, A.K., Ogg. C.L., Witters, N.A., Howard, R.W., Stanley-Samuelson, D.W. 1993. Arachidonic acid and prostaglandin E2 in Malpighian tubules of female yellow fever mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 23 (4). Pag. 431-437.
- Pinheiro, D.O., Conte, H., Gregório, E.A. 2008 Spherites in the midgut epithelial The sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *BIOCELL.* 32(1): 61-67.
- Pinto, A.S., Garcia, J.F., Botelho, P.S.M. 2006. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. *In*: A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (eds.), *Controle biológico de pragas: na prática.* Piracicaba, FEALQ, 287p.
- Rakitov, R.A. 2002. Structure and Function of the Malpighian Tubules, and Related Behaviors in Juvenile Cicadas: Evidence of Homology with Spittlebugs (Hemiptera: Cicadoidea & Cercopoidea). *Zoologischer Anzeiger – A Journal Comparative Zoology.* Vol 241 (2). Pag. 117-130.
- Richards, O. W., Davies, R. G., 1994, The alimentary canal, nutrition and digestion

- pp. 192-208. In: O. W. Richards & R. G. Davies (eds.), IMMS' General Textbook of Entomology, 10. ed., Chapman & Hall, London.
- Rocha, L.L.V. 2009. Morfologia Ultra-estrutura e imunohistoquímica do intestino médio de *Triatoma votticeps* (Hemiptera: Triatominae). Tese de doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG.
- Ruchita, P., Krishna, K. 2012. Ultrastructural features of the larval Malpighian tubules of the flash fly *Sarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) International Journal of Tropical Insect Science. Vol. 32 (3). Pag. 166-172.
- Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Machado, M.F.P.S. Conte, H. 2002. Esterase3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Pyralidae). Genetic and Molecular Biology. Vol.25 (1). São Paulo.
- Ryerse, J.S. 1979. Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. Tissue & Cell, v. 11, n. 3, p. 533-551.
- Saelz, C.R.N., Ruvolo Takasusuki, M.C.C. 2009. Avaliação da Alteração de Expressão Das Esterases durante o Desenvolvimento Larval de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Crambidae). Após a Contaminação com Metafós. V Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR. Maringá – PR. Salvador. G., Consoli, F.L. 2008. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera : Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera : Braconidae). Biological Control, vol.45, n.1, pag. 103-110.
- Sheng, L., Falabela, P., Kuriachan, I., Vinson, S.B., Borst, D.W., Malva,C., Pennacchio, P. 2003. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. Journal of Insects Physiology, London, v. 49, n. 11, p. 1021-1030.
- Tavares, M.G., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Ceron, C.R. 1998. Expressão tecido específica Em *Triatoma infestans* (Triatominae; Heteroptera). Genet. Mol. Biol. Vol 21 (4). SP.

ANEXOS