

HELEN CRISTINA PINTO SANTOS

**A DIETA INFLUENCIA? ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS
DIGESTIVAS DO INTESTINO MÉDIO DE HEMÍPTEROS (INSECTA:
HEMIPTERA) COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237d
2017 Santos, Helen Cristina Pinto, 1988-
A dieta influencia? Ultraestrutura das células digestivas do
intestino médio de hemípteros (Insecta: Hemiptera) com
diferentes hábitos alimentares / Helen Cristina Pinto Santos. –
Viçosa, MG, 2017.
vi, 44f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Hemiptera*. 2. Insetos hematófagos. 3. Animais -
Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 595.75

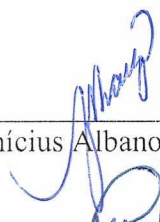
HELEN CRISTINA PINTO SANTOS

**A DIETA INFLUENCIA? ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS
DIGESTIVAS DO INTESTINO MÉDIO DE HEMÍPTEROS (INSECTA:
HEMIPTERA) COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

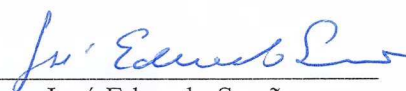
APROVADA: 10 de março de 2017.


Luanda Medeiros Santana


Vinícius Albano Araújo


Luis Carlos Martinez Castrillon


Lucio Antonio de Oliveira Campos


José Eduardo Serrão
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus professores, com todo carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, respeitável senhora de noventa anos, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de doutoramento. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Agradeço ao Departamento de Biologia Geral, ao Núcleo de Microscopia e Microanálise e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo apoio e por propiciarem a infraestrutura necessária ao desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

Agradeço à Elizabeth Pena (Bethinha), nossa secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, por toda gentileza, eficiência e carinho ao nos atender.

Agradeço à banca avaliadora desta tese pelo aceite de participação e pelas contribuições. Meu muito obrigada, também, à banca de qualificação que forneceu valiosas sugestões para a continuidade do projeto de doutorado.

Agradeço ao querido professor José Eduardo Serrão pela confiança ao tornar-se meu orientador. Não poderia mensurar como fui influenciada pelo seu bom exemplo e como sua forma de lidar com nossa educação motivaram-me. Aprendi muito! Objetivo, sábio, inteligente, humano, trabalhador, tranquilo e acima de tudo um professor/orientador que sabe o seu papel no mundo: inspirar, respeitar e estimular os outros.

Agradeço a todos os meus professores, em especial ao professor José Lino Neto e ao professor Lúcio Campos, pela significativa influência em minha educação. A professora Uyrá Zama por ter me apresentado à pesquisa na área da biologia celular. E ao amigo André pelos ensinamentos e discussões sobre ciência.

Agradeço à minha família. Espero conseguir retribuir tudo o que vocês fizeram para que eu pudesse alcançar meus sonhos com saúde. Obrigada papai (*in memoriam*) foi maravilhoso ter vivido ao seu lado, o senhor para sempre será meu amor maior. Obrigada mamãe a senhora é a pessoa mais forte que já conheci, seus esforços e exemplos guiaram-me. O seu incentivo me fez desabrochar e acreditar que em meio a tantas peculiaridades desfavoráveis era possível vencer, por isso as vitórias não são minhas e sim, sempre, nossas.

Agradeço aos meus queridos amigos: o apoio, a serenidade ao olhar a vida e suas veredas inusitadas, os conselhos, as risadas, os sonhos compartilhados. Meu tesouro é vocês!

Agradeço ao Gustavo por ser a personificação da palavra companheirismo. Sereno, educado, discreto, leal, equilibrado e divertido. A jornada foi mais leve ao seu lado e a isso sou muitíssimo grata.

Agradeço as minhas companheiras de moradia da República Aconchego e aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo incrível suporte e apoio nesta jornada. Experimentamos com sucesso o *carpe diem* da vida de pós-graduandas. Vocês são exemplos de perseverança, dedicação, foco e organização.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução Geral.....	1
1.1 Referências Bibliográficas.....	3
2. Capítulo I.....	4
3. Capítulo II.....	16
4. Conclusão Geral.....	44

RESUMO

SANTOS, Helen Cristina Pinto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017
A dieta influencia? Ultraestrutura das células digestivas do intestino médio de hemípteros (Insecta: Hemiptera) com diferentes hábitos alimentares. Orientador: José Eduardo Serrão.

Os Hemiptera são insetos hemimetábolos distribuídos dentre quatro subordens monofiléticas, cujas relações filogenéticas são estudadas: Coleorrhyncha, Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera. Estes insetos apresentam diversificados hábitos alimentares que variam dentre a fitofagia, zoofagia, dentritivoria, hematofagia e onivoria. Devido a esta variedade de hábitos e o conhecimento da filogenia dos táxons superiores do grupo, os hemípteros tornam-se interessantes modelos de estudos comparativos do intestino. Analisando-se a compartimentalização da digestão e a produção de enzimas no intestino médio de insetos foi levantada a hipótese de que características deste órgão eram semelhantes entre espécies relacionadas filogeneticamente mesmo que estas apresentassem diferentes hábitos alimentares. Estudos comparativos visando investigar esta questão sob o viés morfológico ainda eram ausentes na literatura. Devido a isso, com o objetivo de testar, sob o ponto morfológico, a hipótese de que a evolução do intestino médio em insetos é mais relacionada à proximidade filogenética das espécies que ao hábito alimentar, analisamos a ultraestrutura das células digestivas do intestino médio em Hemiptera levando-se em conta seus diferentes hábitos alimentares e filogenia. Esta análise evidenciou que em Hemiptera as células digestivas do intestino médio são polifuncionais responsáveis pela produção e secreção de enzimas, absorção de nutrientes, reserva de nutrientes, neutralização de compostos tóxicos e osmorregulação. Além disso, as células digestivas são similares, apresentando em todas as espécies, membrana perimicrovilar, microvilosidades, núcleo bem desenvolvido e estruturas de reserva, apesar dos diferentes hábitos alimentares apresentados por estas. Portanto, a ultraestrutura das células digestivas em Hemiptera é mais relacionada à proximidade filogenética das espécies.

ABSTRACT

SANTOS, Helen Cristina Pinto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Does the diet influence? Ultrastructure of hemipteran (Insecta: Hemiptera) midgut digestive cells with different feeding habits.** Adviser: José Eduardo Serrão.

Hemiptera are hemimetabolus insects distributed among four monophyletic suborders whose phylogenetic relationships are studied: Coleorrhyncha, Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha and Heteroptera. These insects present diverse feeding habits that vary of the phytophagia, zoophagy, detritivore, hematophagy and omnivorism. Due to this variety of diets and the high level phylogeny of the group, Hemiptera become interesting models of midgut comparative studies. Analyzing the compartmentalization of digestion and enzymes production in the insects midgut, was raised the hypothesis that these characteristics were similar among phylogenetically related species even if these presented different eating habits. Comparative studies aiming to investigate this question under the morphological point still were absent in the literature. In order to test the morphological hypothesis that the evolution of the midgut in insects is more related to the phylogenetic proximity of the species than to the diet, we analyzed the ultrastructure of the Hemiptera midgut digestive cells taking into account their different eating habits and phylogenetic relationships. This analysis evidenced that in Hemiptera midgut digestive cell were polyfunctional been responsible for the production and secretion of enzymes, nutrient absorption, nutrient reserve, neutralization of toxic compounds and osmoregulation. In addition, the digestive cells are similar, presenting in all species, perimicrovilar membrane, microvilli, well developed nucleus and reserve structures, in spite of the different alimentary habits presented by these. Therefore, the ultrastructure of the digestive cells in Hemiptera is more related to the phylogenetic proximity of the species.

1. Introdução Geral

Os Hemiptera são insetos hemimetábolos que apresentam um aparelho bucal modificado com um lábio articulado e demais peças bucais sugadoras adaptadas ao hábito picador-sugador (Henry 2009; Grazia et al. 2012; Chapman 2013). A filogenia de táxons superiores está estabelecida para esta ordem (Cryan & Urban 2012), sendo os hemípteros divididos em quatro subordens monofiléticas: Coleorrhyncha, Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera (Cryan & Urban 2012; Grazia et al. 2012). O sucesso adaptativo destes insetos está também relacionado a capacidade em explorar uma ampla variedade de recursos alimentares, apresentando hábitos alimentares variados, podendo ser fitófagos, zoófagos, hematófagos, detritívoros e onívoros (Grazia et al. 2012). Segundo Schuh & Slater (1996) ao longo da história evolutiva dos hemípteros a fitofagia e a hematofagia foram adquiridas independentemente da zoofagia, sendo que a zoofagia surgiu secundariamente a partir de um ancestral fitófago. Devido a esta variedade de hábitos alimentares e o conhecimento da filogenia dos táxons superiores do grupo, os hemípteros tornam-se interessantes modelos para estudos comparativos do intestino.

O intestino médio dos Hemiptera é o local onde os processos de digestão e absorção de nutrientes ocorrem. Este é constituído por um epitélio simples com três tipos celulares: a célula regenerativa que garante a renovação epitelial e corresponde funcionalmente à célula tronco dos vertebrados; a célula endócrina que garante o controle hormonal do órgão e a célula digestiva responsável pelas funções de absorção de nutrientes, produção de enzimas digestivas, osmorregulação e proteção (Lehane & Billingsley 1996). A célula digestiva é o tipo celular mais abundante do epitélio do intestino médio desempenhando as principais funções relacionadas a este órgão (Lehane & Billingsley 1996) sendo, por isso, alvo de nossas investigações morfológicas comparativas. O intestino médio dos Hemiptera e Thysanoptera (Condylognatha) (Silva et al. 2004) é recoberto pela membrana perimicrovilar, uma estrutura lipoproteica, que auxilia na proteção do epitélio, absorção de nutrientes, compartimentalização da digestão e retenção no lúmen de enzimas digestivas (Terra 1990; Terra & Ferreira 1994; Silva et al. 1995).

Em um estudo sobre o intestino médio de insetos Terra (1988) sugeriu que as características deste órgão deveriam ser analisadas levando-se em consideração a posição filogenética das espécies e não apenas o respectivo hábito alimentar. Isto

porque, o armazenamento de alimento para digestão e a compartimentalização da mesma são similares em insetos relacionados filogeneticamente, mesmo que o hábito alimentar seja discrepante. Como exemplo citado por Terra (1988), o Hemiptera hematófago *Rhodnius prolixus* apresenta membrana perimicrovilar revestindo o intestino médio, armazenando o sangue na porção anterior do intestino médio e o digerindo na porção posterior deste órgão enquanto a fêmea hematófaga de *Aedes aegypti*, Diptera, apresenta membrana peritrófica, armazenando e digerindo o sangue na porção posterior do intestino médio. Este autor relata que essas diferenças são atribuídas a distintos ancestrais apesar do hábito alimentar ser o mesmo. E também ressalta que a discussão dos dados obtidos com a investigação do intestino médio de insetos era realizada basicamente em relação a seus tipos de hábitos alimentares provavelmente por uma influência da ecologia, entretanto, segundo suas observações, características similares do intestino médio só existiam em insetos relacionados filogeneticamente.

Trabalhos comparativos utilizando o intestino médio de espécies relacionadas filogeneticamente portadoras de diferentes hábitos alimentares, são escassos, devido a isso tivemos como objetivo do projeto de doutorado investigar de forma comparativa a ultraestrutura celular do intestino médio de Hemiptera em relação ao hábito alimentar das espécies. Visamos testar se a ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio de insetos relacionados filogeneticamente que apresentavam diferentes hábitos alimentares era mais influenciada pelo hábito alimentar ou pela posição filogenética.

No capítulo I (*Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits*) investigamos a ultraestrutura da célula digestiva da porção medial do intestino médio de seis espécies de Heteroptera, três fitófagas e três zoófagas, pertencentes a cinco famílias filogeneticamente próximas. No capítulo II (*Ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio em Hemiptera: uma perspectiva evolutiva*) fizemos uma revisão comparativa das características ultraestruturais da célula digestiva do intestino médio de 29 espécies de Hemiptera (Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera) onívoro, hematófagos, zoófagos e fitófagos. Nossas conclusões suportam a hipótese de Terra (1988) sendo a ultraestrutura das células digestivas mais relacionada à posição filogenética nos Hemiptera. Portanto, a morfologia celular é semelhante nestes insetos independentemente do hábito alimentar.

2. Referências Bibliográficas

Billingsley, P. F., & Lehane, M. J. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Billingsley, P.F.; Lehane, M.J. *Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall. 3-30.

Chapman, R.F. (2013). *The insects: structure and function*. 5. ed. New York: Cambridge University Press.

Cryan, J. R., & Urban, J. M. (2012). Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology*, 37, 7-21.

Grazia, J., Cavichioli, R. R., Wolff, V. R. S., Fernandes, J. A. M., & Takyia, D. M. (2012). Hemiptera Linnaeus, 1758. In: Rafael, J. A., Ed. *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos, 347- 406.

Henry, T. J. (2009). Biodiversity of Heteroptera. In: Foottit, R.G., Adler, P.H. (eds) *Insect biodiversity: science and society*. Blackwell Publishing, Oxford

Schuh, R. T., & Slater, J. A. (1996). Habitats and feeding type. In: *True bugs of the world (Hemiptera :Heteroptera): classification and natural history*. New York: Cornell University Press, 20-22.

Silva, C. P., Silva J. R., Vasconcelos, F. F., Petretski, M. D. A., DaMatta, R. A., Ribeiro, A. F., & Terra, W. R. (2004). Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Structure & Development*, 33 (2),139-48.

Silva, C.P.R., Ribeiro, A. F., Gulbenkian, S., & Terra W. R. (1995). Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*, 41, 1093– 1103.

Terra, W. R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21, 675-734.

Terra, W. R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*,35, 181–200.

Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 109, 1-62.

Capítulo I: *Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits*

Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits

Helen Pinto Santos¹ · Magdalena Rost-Roszkowska² · Jitka Vilimova³ · José Eduardo Serrão¹

Received: 8 September 2016 / Accepted: 22 November 2016
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract Heteroptera have diverse feeding habits with phytophagous, zoophagous, and haematophagous species. This dietary diversity associated with the monophyly of Heteroptera makes these insects a good object for comparative studies of the digestive tract. This work compares the ultrastructure of the middle midgut region in the phytophagous *Coptosoma scutellatum* (Plataspidae), *Graphosoma lineatum* (Pentatomidae), *Kleidocerys resedae* (Lygaeidae), and zoophagous *Rhynocoris iracundus* (Reduviidae), *Nabis rugosus* (Nabidae), and *Himacerus apterus* (Nabidae), to verify if diet affects midgut cells in phylogenetically related insects. The middle region of the midgut was used for comparison because it is the main site for digestion and absorption of the midgut. The digestive cell ultrastructure was similar in the six species, with features of secretory, absorptive, transport, storage, and excretory cells, suggesting a stronger correlation of middle digestive cell ultrastructure with the phylogeny of these species than with the different heteropteran feeding habits.

Keywords Comparative morphology · Phytophagy · Zoophagy · Digestive cells · Regenerative cells · Spherocrystals · Basal labyrinth

Handling Editor: Margit Pavelka

✉ José Eduardo Serrão
jeserrao@ufv.br

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

² Department of Animal Histology and Embryology, University of Silesia, Katowice, Poland

³ Faculty of Science, Department of Zoology, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czechia

Introduction

Heteroptera are a monophyletic group of insects with diverse feeding habitats that include phytophagy, carnivory (zoophagy), and hematophagy (Schuh and Slater 1995; Capinera 2008; Henry 2009; Grazia et al. 2012). Therefore, these insects could be treated as a good model for comparative studies of the digestive tract. However, to date, the ultrastructure of the Hemiptera digestive tract has only been described in a limited number of species (e.g., Billingsley 1988; Silva et al. 1995; Cristofolletti et al. 2003; Guedes et al. 2007; Cunha et al., 2012; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009; Rocha et al. 2010; Rost-Roszkowska et al. 2016).

In this study, phytophagous and zoophagous Heteroptera species, which are phylogenetically closely related, were used. The phytophagous *Coptosoma scutellatum* is common in the whole Palaearctic region. All stages suck on stems, flowers, and seeds of different species of Fabaceae (Viciaceae), (Davidová-Vilimová and Štys 1982). The phytophagous *Graphosoma lineatum* is more common during recent years throughout the whole Palaearctic region, due to warmer conditions. A wide spectrum of species from Daucaceae (Apiaceae) are host plants for all stages. Nymphs and adults suck on flowers and particularly on seeds (Péricart 2010). The whole life cycle of phytophagous *Kleidocerys resedae* goes on different species of birch, genus *Betula*. All stages suck on leaves and particularly on seeds (Péricart 1998). With the zoophagous *Rhynocoris iracundus* xerophilous species, all stages are predacious, living on plant vegetation, often waiting for prey near to flowers, and even hunting Hymenoptera, other Heteroptera, and small Coleoptera (Putshkov and Moulet 2009). The zoophagous *Nabis rugosus* is polyphagous, and all stages live on plant

vegetation in different types of meadows. It was distributed throughout almost the whole of Europe (Péricart 1987). The zoophagous *Himacerus apterus* is polyphagous with all stages living on bushes and low trees, including conifers along forest borders, as well as in parks and gardens. The eggs are deposited on stems of plants under bushes (Péricart 1987).

The heteropteran midgut is a long tube with morphological and functional differentiation along its length, in which the middle region is the main one where the release of numerous digestive enzymes, digestion, and absorption takes place (Billingsley and Lehane 1996; Fialho et al. 2009; Chapman 2013). The midgut epithelium of the Heteroptera is similar to that found in other insects with digestive cells responsible for enzyme secretion and absorption of nutrients (Billingsley and Lehane 1996; Fialho et al. 2009; Chapman 2013), limited endocrine cells that release peptide hormones (Chapman 2013; Rocha et al., 2014), and some regenerative cells which are able to proliferate and differentiate, as well as replace other cells (Billingsley and Lehane 1996; Hakim et al. 2001; Martins et al. 2006; Rost 2006; Rost-Roszkowska 2008; Chapman 2013; Teixeira et al. 2013; Sosinka et al. 2014).

In insects, the digestion pattern was described as directly related to phylogenetic relationships. It means that phylogenetically diverse insects with the same diet have morphological and enzymatic differences in the digestive tract, suggesting that the digestive tract pattern inherited from a common ancestor is more significant than diet in determining physiological features in the digestive tract (Terra 1988, 1990; Ribeiro et al. 1990). However, these studies compared insects of different orders such as Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, and Hemiptera (for review see Terra 1990; Serrão and Cruz-Landim 1995, 1996), while we intend on comparing insects that belong to Hemiptera. In this scenario, it is important to assess whether the phylogeny or feeding habits affect the digestive tract ultrastructure.

This study reports for the first time on the ultrastructural comparison of the middle midgut region in phytophagous and zoophagous Heteroptera species that are closely related phylogenetically, to verify the hypothesis that evolutionary history is more important than diet in the morphology of the insect digestive tract.

Materials and methods

Insects

The species analyzed were the phytophagous *C. scutellatum* (Geoffroy, 1785) (Plataspidae), *G. lineatum* (O.F. Müller,

Fig. 1 Schematic drawing of the digestive cells in analyzed Heteroptera species. Note the presence of adjacent digestive cells containing several microvilli (*Mv*), perimicrovillar membrane (*arrow*), nucleus (*N*), cisterns of the rough endoplasmic reticulum (*RER*), Golgi complexes (*G*), lipid droplets (*Li*), mitochondria (*Mi*), basal labyrinth (*Bl*), portosome (*hatched circle*), as well as the presence of spherocrystals (*S*) and autophagosomes (*Au*). Schemes were not made to scale

1766) (Pentatomidae), and *K. resedae resedae* (Panzer, 1797) (Lygaeidae), and the zoophagous *R. iracundus* (Linnaeus, 1758) (Reduviidae), *N. rugosus* (Linnaeus, 1758) (Nabidae), and *H. (Himacerus) apterus* (Fabricius, 1798) (Nabidae), which belong to phylogenetically related families (Cryan and Urban, 2012).

C. scutellatum, and *H. apterus* adults were collected in the central Bohemian region, Czechia, during June and July. *C. scutellatum* was collected from various Fabaceae and *H. apterus* from bushes. Adults of *G. lineatum*, *K. resedae*, *R. iracundus*, and *N. rugosus* were collected in Vlkov nr. Veselí and Lužnici, in the Bohemia south region, Czechia, during May, June, and August. *R. iracundus* and *N. rugosus* were collected from plant vegetation; *G. lineatum* from flowers of various Daucaceae and *K. resedae* from seeds of *Betula* sp.

Transmission electronic microscopy

Five insects of each species were dissected in 0.1 M sodium cacodylate buffer, and the midguts transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 with 3% sucrose and 0.2% picric acid for 24 h at 4 °C. The pieces were washed with the same buffer for 2 h and postfixed in 1% osmium tetroxide for 2 h at room temperature. Then, the midguts were dehydrated in a graded ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 15 min each) and acetone (15 min), and embedded in epoxy resin.

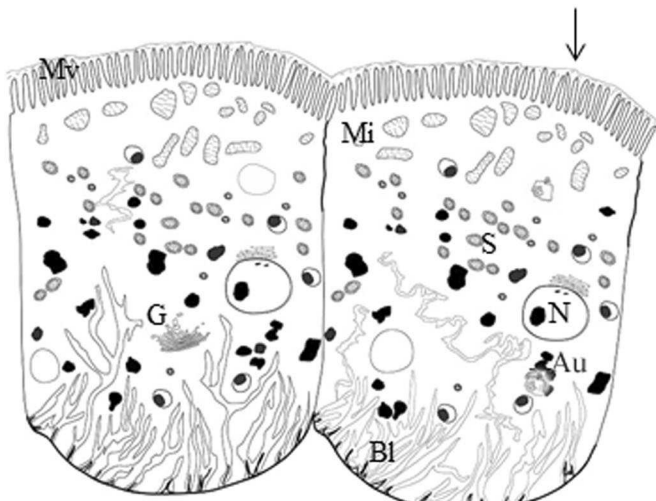
Ultrathin sections (60 nm) of the middle midgut region were stained with 1% aqueous uranyl acetate and 0.2% lead citrate, and analyzed in a Zeiss 109 transmission electron microscope.

Results

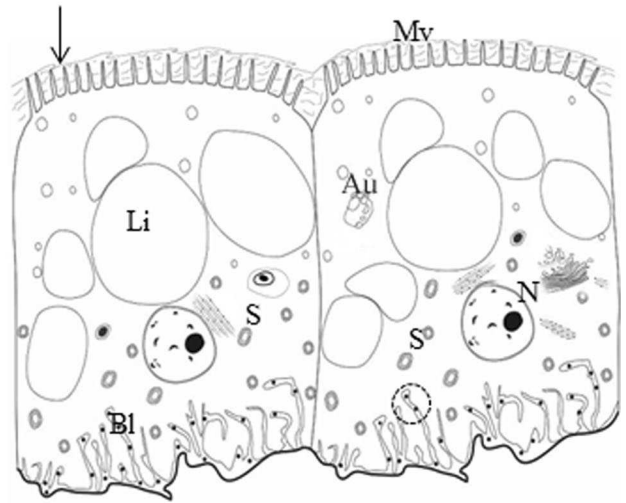
The epithelium of the middle midgut region of the six species analyzed showed digestive cells (Figs. 1 and 2) and regenerative ones (Fig. 2), which may be isolated or in nests scattered at the basal region of the epithelium (Fig. 2) that lies on a basal lamina followed by the adjacent visceral muscle layers (Fig. 2).

PHYTOPHAGOUS

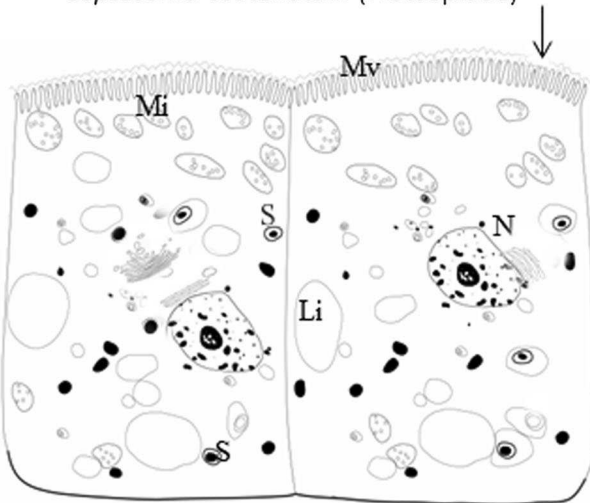
ZOOPHAGOUS



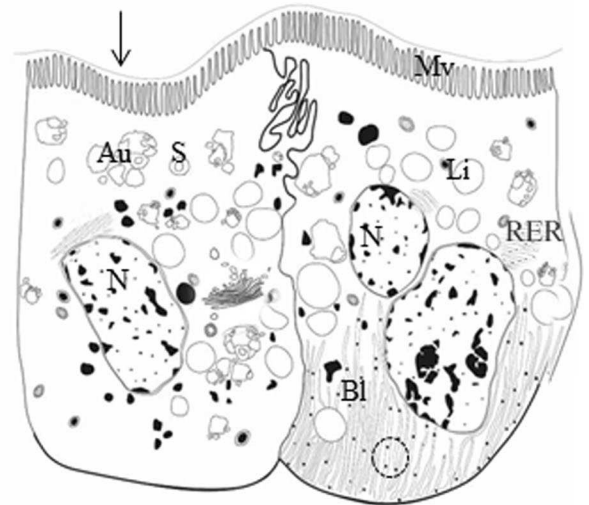
Coptosoma scutellatum (Plataspidae)



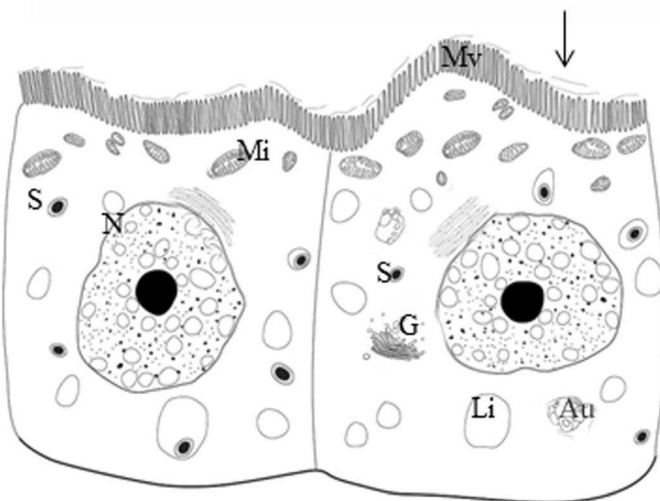
Rhynocoris iracundus (Reduviidae)



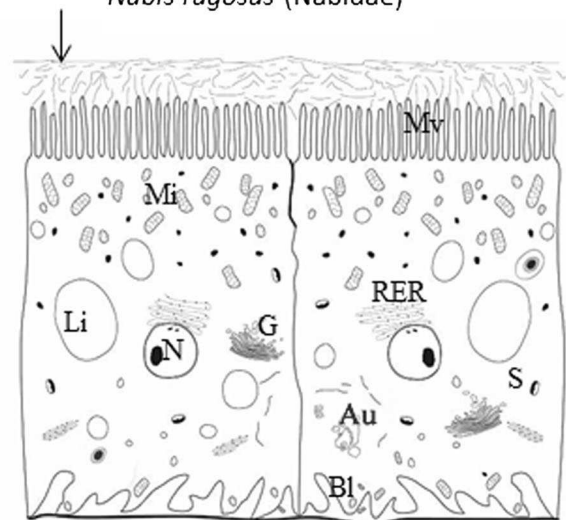
Graphosoma lineatum (Pentatomidae)



Nabis rugosus (Nabidae)



Kleidocerys resedae (Lygaeidae)



Himacerus apterus (Nabidae)

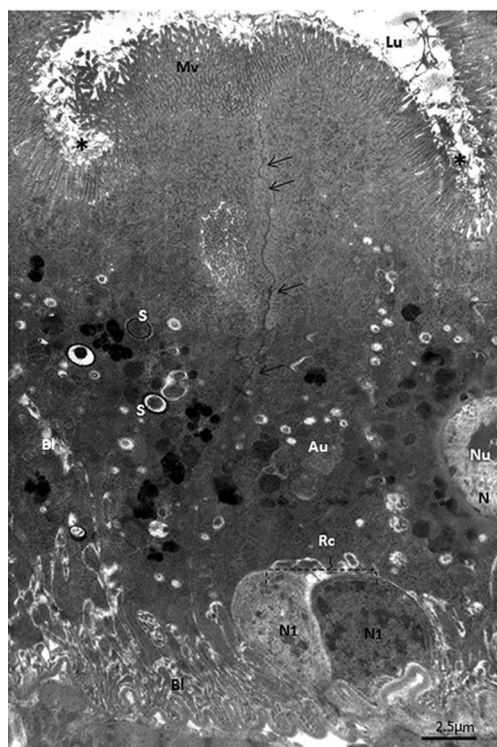


Fig. 2 TEM image from midgut digestive and regenerative cells (*Rc*) of the phytophagous *C. scutellatum* showing an overview of the heteropteran epithelia investigated here. Note the presence of two adjacent digestive cells containing numerous microvilli (*Mv*), perimicrovillar membrane (*asterisk*) facing the lumen (*Lu*), cell membrane (*arrows*), nucleus (*N*) with a prominent nucleolus (*Nu*), basal labyrinth (*Bl*), as well as the presence of spherocrystals (*S*) and autophagosomes (*Au*). Note the presence of two regenerative cells (*Rc*) with their nuclei (*N1*) and the cytoplasm poor in organelles

Digestive cells

The ultrastructure of the digestive cells from the middle midgut region was nearly uniform across the six species studied. The description of the ultrastructure, therefore, concerns all the species examined here. The main ultrastructural features of the heteropteran digestive cells examined were summarized in Table 1 and the differences between the digestive cells of the analyzed species are highlighted below.

Digestive cells of the middle midgut region of all six species were columnar (Fig. 1) with the cytoplasm showing three distinct regions: basal (Fig. 3), perinuclear (Fig. 4) and apical (Fig. 5).

The basal region of digestive cells had cell membrane infoldings, forming a basal labyrinth, which were enlarged in the phytophagous *C. scutellatum* (Fig. 3a). In the zoophagous *N. rugosus*, the basal cell membrane infoldings were long, parallel, and equidistant in the vertical cell axis, with a narrow extracellular space (Fig. 3e), whereas in zoophages *R. iracundus* and *H. apterus*, they were short and associated with mitochondria (Figs. 3d, f). The basal

cell membrane infoldings of the zoophages *R. iracundus* and *N. rugosus* had electron-dense granule portosome-like structures (Figs. 3d, e). In the phytophages *G. lineatum* and *K. resedae*, the basal cell region is rich in lipid droplets without cell membrane infoldings (Figs. 3b, c).

The median region of the digestive cells was characterized by a well-developed oval nucleus with decondensed chromatin and evident nucleolus (Fig. 2). In the phytophagous *K. resedae*, the nucleus had some electron-dense bodies (heterochromatin-like) scattered throughout the nucleoplasm (Fig. 4c). In the perinuclear cytoplasm, many spherocrystals, lysosomes (or autophagic structures), cisterns of the rough endoplasmic reticulum, and Golgi complexes were found (Fig. 4). Additionally, lipid droplets of different sizes occur in the zoophagous *R. iracundus* (Fig. 4d).

The apical region of the digestive cells had microvilli with perimicrovillar membranes arising in the tips (Fig. 5), which were well developed in the zoophagous *H. apterus*. The apical cytoplasm showed a net of cytoskeleton filaments, mitochondria, lipid droplets, and lysosomes or autophagic structures (Fig. 5b).

Regenerative cells

The regenerative cells were found scattered among the digestive cells in the entire midgut length in *G. lineatum*, *C. scutellatum*, and *H. apterus* (Fig. 6). These cells never reached the midgut lumen. The apical and basal cell membrane had no microvilli nor infoldings, respectively (Fig. 6). The large nucleus with nucleolus (Fig. 6) was surrounded with the cytoplasm poor in organelles, which were limited to a few mitochondria and cisterns of the rough endoplasmic reticulum (Fig. 6b, c).

Discussion

The basic ultrastructure of digestive cells is similar in all species studied, regardless of type of diet, either phytophagous or zoophagous. The most conspicuous differences could be seen in basal regions of the cells formed by plasma membrane infoldings with associated structures.

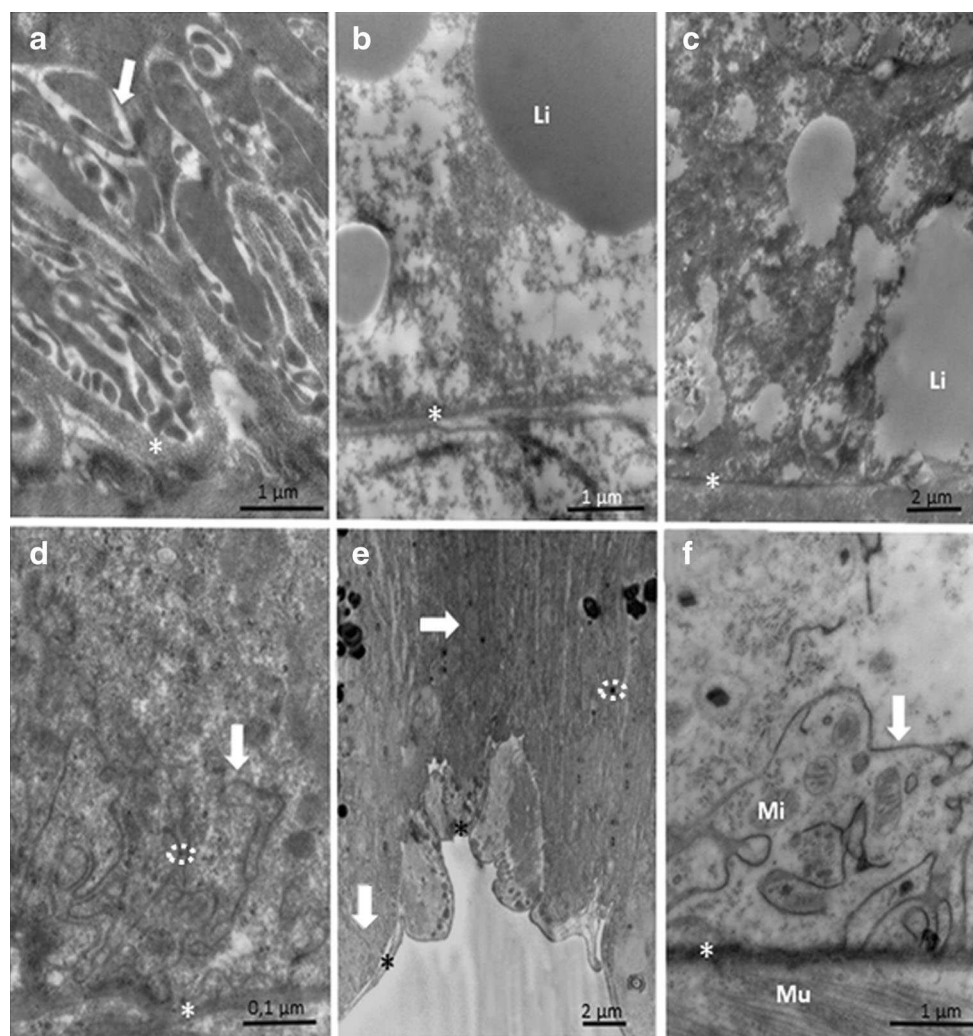
An enlarged basal labyrinth formed by basal cell membrane infoldings in the digestive cells of the phytophagous *C. scutellatum* suggest a possible role in fluid transport, whereas infoldings associated with mitochondria in the zoophages *R. iracundus* and *H. apterus* may play a role in ion transport across the membrane as reported in other insects (Terra 1988, 1990; Ribeiro et al. 1990; Billingsley and Lehane 1996; Rost-Roszkowska et al. 2016). In *N. rugosus*, the long basal

Table 1 The main ultrastructural features of the digestive cells in the middle midgut of heteropterans examined

Diet Species (Family)	Character										
	A Basal labyrinth (BL)	B Height of BL	C Width of BL	D Portosome- like structures	E Mitochondria in BL	F Lipid in basal region	G Lipid in cytoplasm	H Nucleolus	I Electron-dense bodies in nucleus	J Spherocrystals	K Perimicrovillar membrane
Phytophagous <i>Coptosoma scutellatum</i> (Plataspidae)	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
Phytophagous <i>Graphosoma lineatum</i> (Pentatomidae)	0	–	–	–	–	1	1	1	0	1	0
Phytophagous <i>Kleidocerys resedae</i> (Lygaeidae)	0	–	–	–	–	1	1	1	1	1	0
Zoophagous <i>Rhynocoris iracundus</i> (Reduviidae)	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
Zoophagous <i>Nabis rugosus</i> (Nabidae)	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1
Zoophagous <i>Himacerus apterus</i> (Nabidae)	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2

A: 0 = absent, 1 = present, B: 0 = short, 1 = long; C: 0 = narrow; 1 = broad, D: 0 = absent; 1 = present, E: 0 = absent; 1 = present, F: 0 = absent; 1 = present, G: 0 = absent; 1 = present, H: 0 = absent; 1 = present, I: 0 = absent; 1 = present, J: 0 = absent; 1 = present, K: 0 = short; 1 = medium; 2 = long

Fig. 3 TEM images of the basal region in digestive cells of the Heteroptera phytophagous *C. scutellatum*, *G. lineatum*, and *K. resedae* and zoophagous *R. iracundus*, *N. rugosus*, and *H. apterus*. **a** The basal lamina (asterisk) and invaginations of the basal labyrinth (arrow) in the basal cytoplasm of the *C. scutellatum* digestive cell. **b** *G. lineatum* digestive cell. Basal lamina (asterisk) and lipid droplets (Li). **c** *K. resedae* digestive cell showing the basal lamina (asterisk) and lipid droplets (Li). **d** *R. iracundus* digestive cell showing the basal lamina (asterisk) and discrete folds of the basal membrane (arrow) with the presence of portosome (dotted circle). **e** *N. rugosus* digestive cell showing the basal lamina (asterisk), long and vertically parallel infoldings of the basal membrane (arrows) with portosome (dotted circle). **f** *H. apterus* digestive cell showing the basal lamina (asterisk) and discrete infoldings of the basal membrane (arrow) near mitochondria (Mi). Visceral muscles (Mu)

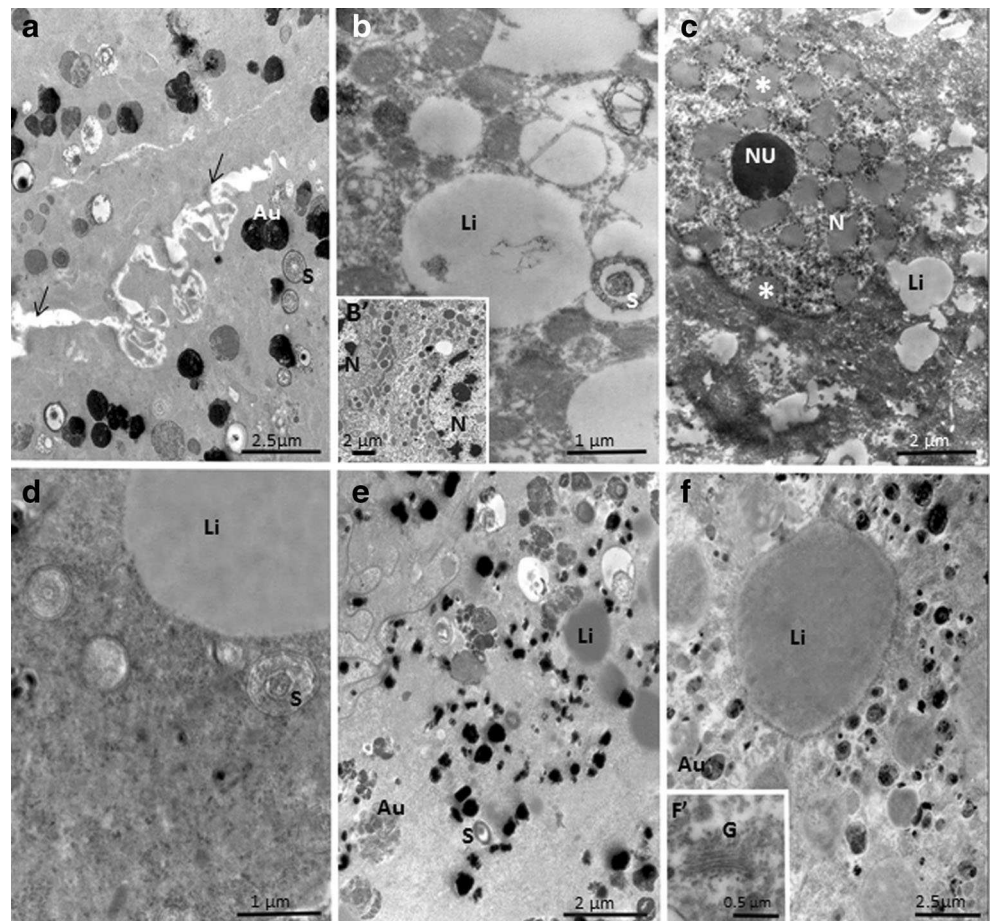


membrane infoldings that are vertically parallel with narrow extracellular spaces and with portosome as well as the short infoldings in *R. iracundus*, which also have portosomes, possibly function in ion transport as reported in the freshwater mosquito *Aedes aegypti* and the blowfly *Calliphora vicina* (Zhuang et al. 1999; Zimmermann et al. 2003). These basal cell membrane infoldings of the digestive cells have membrane transporters for cytoplasm-hemolymph exchange, which have been reported as isoforms of the mammalian membrane carriers (Shanbhag and Tripathi 2009). The cell membrane infoldings of *N. rugosus* digestive cells are similar to those reported in the midgut of the hematophagous *Rhodnius prolixus* before blood meal (Billingsley and Downe 1989). The basal cell membrane, which folds slightly with some cisterns of the rough endoplasmic reticulum and mitochondria has been described in

hematophagous *Cimex lectularius* and *C. pipistrelli* (Rost-Roszkowska et al. 2016).

The digestive cells of the heteropterans studied here have a well-developed nucleus with decondensed chromatin and nucleolus, that are the common features of these cells in insects (Billingsley and Lehane 1996) that occur in cells with high metabolic activity (Alberts et al. 2014). The main difference among the nuclei of digestive cells occurs in *K. resedae* with some electron-dense patches, which may be due to chromatin organization levels in association with the basic nuclear histone proteins. The occurrence of intranuclear crystals and an electron-lucent halo in the periphery has been reported in the nucleus of digestive cells of the insects (Richards and Richards 1969; Ellis et al. 1981). However, the nature and function of these atypical regions in the nucleoplasm requires further study.

Fig. 4 TEM images from the perinuclear region of the Heteroptera digestive cells. The phytophagous *C. scutellatum*, *G. lineatum*, and *K. resedae* and zoophagous *R. iracundus*, *N. rugosus*, and *H. apterus*. **a** *C. scutellatum* digestive cells showing basal labyrinth (arrows), spherocrystals (*S*) and autophagosomes (*Au*). **b** *G. lineatum* digestive cell showing spherocrystals (*S*) and lipid droplets (*Li*); note in (*B'*) the nucleus (*N*). **c** *K. resedae* digestive cell showing lipid droplets (*Li*) and the nucleus (*N*) with prominent nucleolus (*Nu*) with distinct patches of heterochromatin (asterisk). **d** *R. iracundus* digestive cell showing spherocrystals (*S*) and lipid droplets (*Li*). **e** *N. rugosus* digestive cell showing lipid droplets (*Li*), spherocrystals (*S*), and autophagosomes (*Au*). **f** *H. apterus* digestive cell showing autophagosomes (*Au*) and lipid droplets (*Li*). Note in (*F'*) the Golgi complexes (*G*)



Spherocrystals occur in the cytoplasm of the digestive cells of all six species studied. These structures store calcium phosphate, magnesium, and potassium; uric acid; iron, cadmium; proteins and polysaccharides (Cruz-Landim 1971; Cruz-Landim and Serrão 1997; Gomes et al. 2012). Thus, the presence of spherocrystals in the midgut digestive cells suggests a possible role in the release of cytosolic ions and homeostasis (Pinheiro et al. 2008; Lipovsek et al. 2012), a source of inorganic compounds for cuticle formation and hardening (Lipovsek et al. 2002), as well as prevention against metal intoxication (Cruz-Landim 1971; Cruz-Landim and Serrão 1997; Pigino et al. 2005; Bution and Caetano 2010; Lipovsek et al. 2012). Spherocrystals in addition to phytophagous and zoophagous Heteroptera studied here have been reported in the blood-sucking *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae) (Azevedo et al. 2009), *C. lectularius*, and *C. pipistrelli* (Rost-Roszkowska et al. 2016).

Lipid droplets are common in the cytoplasm of the digestive cells of studied species and are associated with

energy storage as suggested for the predatory Heteroptera *Brontocoris tabidus* and *Podisus nigrispinus* (Fialho et al. 2009, 2013) and the haematophagous *C. hemipterus* (Azevedo et al. 2009), *C. pipistrelli*, and *C. lectularius* (Rost-Roszkowska et al. 2016). Lipids and spherocrystals of heteropteran digestive cells play important roles in insect homeostasis, other than merely reserving storage in the zoophagous species, that may have long starvation periods (Pradhan 1940), since these structures are also present in phytophagous that have continuous food sources.

The perimicrovillar membrane found in all species studied here, probably arose from a hemipteran ancestor, a Condylgnatha sap sucker that gained an increase in nutrient absorption from a dilute diet with this membrane (Goodchild 1966; Silva et al. 2004). The perimicrovillar membrane of Hemiptera results in the compartmentalization of digestion (Terra 1990), contributing to absorption for example, of amino acids, present in low concentrations in the sap, and the immobilization of digestive enzymes preventing their dilution and

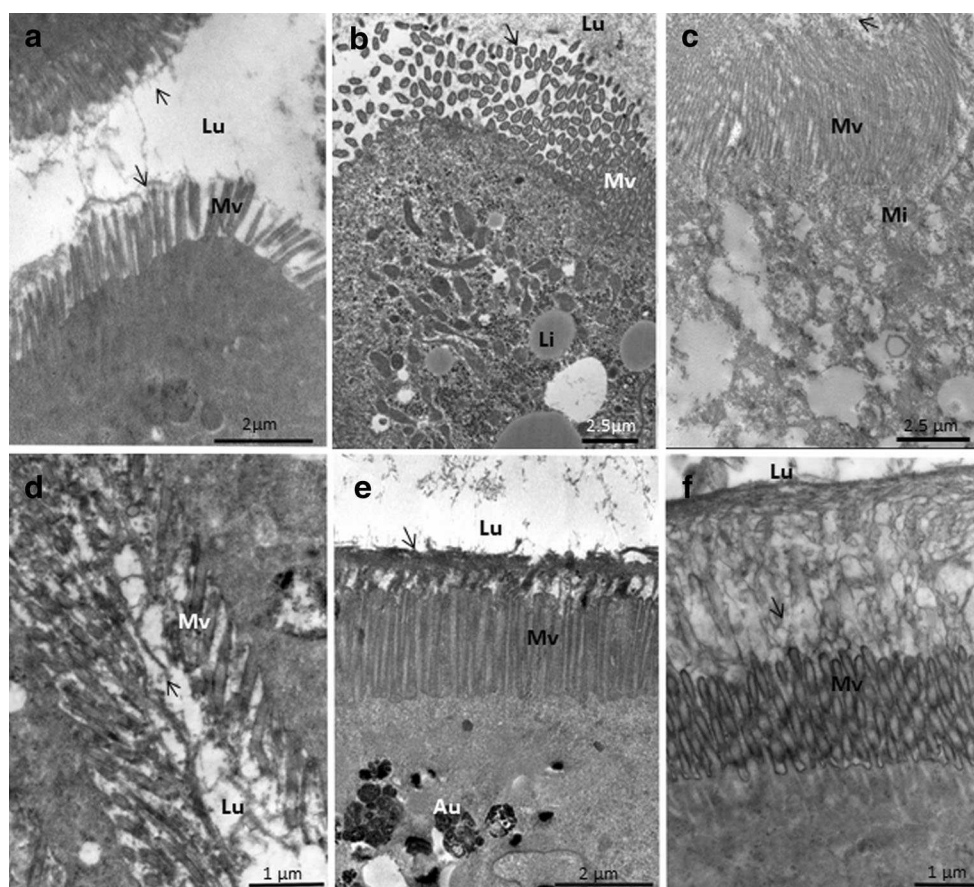


Fig. 5 TEM images from the apical region of the Heteroptera digestive cells of the phytophagous *C. scutellatum*, *G. lineatum*, and *K. resedae* and zoophagous *R. iracundus*, *N. rugosus*, and *H. apterus*. **a** *C. scutellatum* digestive cells showing microvilli (*Mv*) and perimicrovillar membrane (arrows) facing the lumen (*Lu*). **b** *G. lineatum* digestive cell showing microvilli (*Mv*), the perimicrovillar membrane (arrow) facing the lumen (*Lu*) and lipid inclusions (*Li*). **c** *K. resedae* digestive cell showing

microvilli (*Mv*), the perimicrovillar membrane (arrow) and some mitochondria (*Mi*). **d** *R. iracundus* digestive cells showing microvilli (*Mv*) and perimicrovillar membrane (arrow) facing the lumen (*Lu*). **e** *N. rugosus* digestive cell showing microvilli (*Mv*), the perimicrovillar membrane (arrow) facing the lumen (*Lu*) and autophagosomes (*Au*). **f** *H. apterus* digestive cells showing microvilli (*Mv*) and perimicrovillar membrane (arrow) facing the lumen (*Lu*)

excretion (Terra and Ferreira 1994; Cristofolletti et al. 2003).

In addition, the digestive cells in heteropteran midgut epithelium have the regenerative cells, which are similar to stem cells, replacing digestive cells that undergo apoptosis, necrosis, or autophagy as has been described not only for insects but also for many other arthropods (Nardi et al. 2010; Rost-Roszkowska et al. 2010a, b; Teixeira et al. 2013; Fernandes et al. 2014; Sosinka et al. 2014).

Despite the different feeding habitats of Heteroptera studied here, we found similar digestive and regenerative cells ultrastructures in phytophagous and zoophagous species. Thus, diet was not a strong selective pressure to determine different ultrastructural characteristics in the midgut digestive cells of the Heteroptera, suggesting that these features are closely related to the Hemiptera ancestor as was similarly reported for the monophyletic bees with discrepant feeding

habits (Serrão and Cruz-Landim 1995, 1998, 2000). The set of common digestive cell features described for these heteropteran are also common to the other Hemiptera, for example, the presence of perimicrovillar membrane (Silva et al. 2004). Moreover, the perimicrovillar membrane in zoophytophagous (Fialho et al. 2009, 2013), hematophagous (Billingsley 1990; Azevedo et al. 2009, Rost-Roszkowska et al. 2016), and phytophagous and zoophagous Hemiptera studied here seems to show that this membrane arises from a common ancestor.

Our findings show that middle midgut digestive cells are multifunctional in absorption, secretion, transport, storage, and excretion. Furthermore, midgut cells of Heteroptera have a well-conserved ultrastructure supporting the hypothesis that digestion and midgut adaptive features in insects are more closely related to common ancestry and the phylogenetic history of the order than to diet.

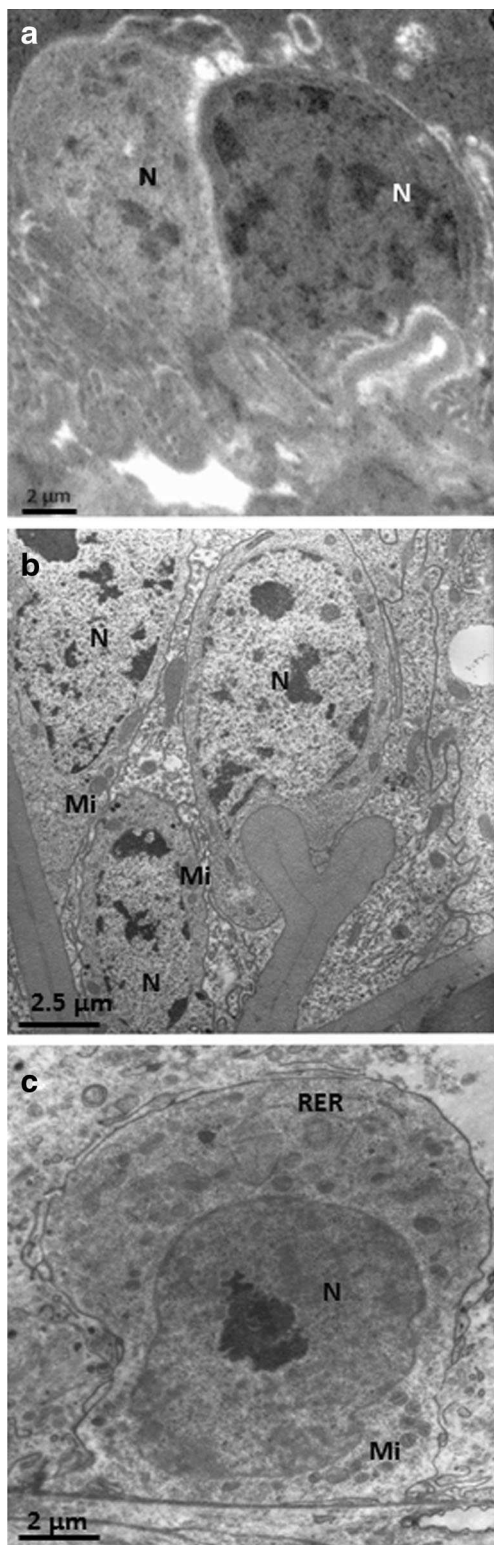


Fig. 6 TEM images from Heteroptera midgut regenerative cells of the phytophagous *C. scutellatum* and *G. lineatum* and zoophagous *H. apterus*. **a** *C. scutellatum* regenerative cells with large nuclei (N) that occupy most of the cytoplasm. **b** *G. lineatum* regenerative cells with large nucleus (N). **c** *H. apterus* regenerative cell with large nucleus (N). Note that the cytoplasm is poor in organelles: some cisterns of the rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (Mi)

Acknowledgments The authors would like to thank the Brazilian funding agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Financiadora de Estudos e Projetos FINEP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). We would like to also thank the Microscopy and Microanalysis Center of UFV by the use of equipment and technical assistance and Karen Salazar Niño for the production of digestive cells illustrations. We are grateful to Magdalena Rosińska (University of Silesia, Poland) for her technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical statement This article does not contain any studies with animals and human participants performed by any of the authors.

References

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) Molecular biology of the cell, 6 edn. Garland Science, New York ISBN: 9780815344322
- Azevedo DO, Neves CA, Santos-Mallet JR, Goncalves TCM, Serrão JE (2009) Notes on midgut ultrastructure of the tropical bed bug *Cimex hemipterus* Fabricius (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 46: 435–441
- Billingsley PF (1988) Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) midgut cells during blood digestion. *Tissue Cell* 20:291–301
- Billingsley PF (1990) The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol* 35:219–248
- Billingsley PF, Downe AER (1989) Changes in the anterior midgut cells of the adult female *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) after feeding. *J Med Entomol* 26:104–108
- Billingsley PF, Lehane MJ (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Billingsley PF, Lehane MJ (eds) *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London, pp 3–30
- Bution ML, Caetano FH (2010) The midgut of *Cephalotes* ants (Formicidae: Myrmicinae): ultrastructure of the epithelium and symbiotic bacteria. *Micron* 41:448–445
- Capinera JL (2008) Bugs (Hemiptera). In: Capinera JL (ed) *Encyclopedia of entomology*, 2 edn. Springer, Berlin, pp 591–611
- Chapman RF (2013) *The insects: structure and function*, 5. Edn. Cambridge University Press, New York
- Cristofolletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y, Terra WR (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 49:11–24
- Cruz-Landim C (1971) Note on granules with concentric lamination present in the larval midgut of *Trigona* (*Scaptotrigona*) *portico* Latr. (Hymenoptera: Apidae). *Rev Bras Pesqui Med Biol* 4:13–16
- Cruz-Landim C, Serrão JE (1997) Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Neth J Zool* 47:21–29
- Cryan JR, Urban JM (2012) Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Syst Entomol* 37:7–21

- Cunha FM, Caetano FH, Wanderley-Teixeira V, Torresa JB, Teixeira AAC, Alves LC (2012) Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on bt-cotton. *Micron* 43:245–250
- Davidová-Vilimová J, Štys P (1982) Bionomics of European Coptosoma species (Heteroptera, Plataspidae). *Acta Univ Carol Biol* 1980:463–484
- Ellis DS, Young C, Stamford S, Lehane MJ (1981) Notes on midgut cell nuclear coats in various tsetse species. *J Med Hyg* 84:209–214
- Fernandes KM, Neves CA, Serrão JE, Martins GF (2014) *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol Int* 63:506–512
- Fialho MCQ, Terra WR, Moreira NR, Zanuncio JC, Serrão JE (2013) Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera Pentatomidae). *Arthropod Struct Dev* 42:277–285
- Fialho MCQ, Zanuncio JC, Neves CA, Ramalho FS, Serrão JE (2009) Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann Entomol Soc Am* 102: 119–127
- Gomes FM, Carvalho DB, Peron AC, Saito K, Miranda K, Machado EA (2012) Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification. *J Insect Physiol* 58:211–219
- Goodchild AJP (1966) Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol Rev* 41:97–140
- Grazia J, Cavichioli RR, Wolff VRS, Fernandes JAM, Takyia DM (2012) Hemiptera Linnaeus, 1758. In: Rafael JA (ed) *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Holos, Ribeirão Preto, pp 347–406
- Guedes BAM, Zanuncio JC, Ramalho FS, Serrão JE (2007) Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Heteroptera: Pentatomidae). *Pan-Pacific Ent* 83(1):66–74
- Hakim RS, Baldwin KM, Loeb M (2001) The role of stem cells in midgut growth and regeneration. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 37:338–342
- Henry TJ (2009) Biodiversity of Heteroptera. In: R Footitt, P Adler (eds) *Insect biodiversity: Science and Society*. Wiley-Blackwell, pp 223–263
- Lipovsek S, Letofsky-Pabst I, Hofer F, Pabst MA (2002) Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulus* (Opiliones). *Micron* 33:647–654
- Lipovsek S, Letofsky-Papst I, Hofer F, Pabst MA, Devetak D (2012) Application of analytical electron microscopic methods to investigate the function of spherites in the midgut of the larval antlion *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeolontidae). *Microsc Res Tech* 75:397–407
- Martins GF, Neves CA, Campos LAO, Serrão JE (2006) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bess. *Micron* 37: 161–168
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA (2010) Stem cells of the beetle midgut epithelium. *J Insect Physiol* 56:296–303
- Péricart J. (1987) Hémiptères Nabidae d'Europe occidentale et du Maghreb, Faune de France 71 edn. FFSSN, Paris, pp 185
- Péricart J (1998) Hémiptères Lygaeidae Euro-Méditerranéens. In: Généralités. Systématique: Première partie vol 1, Faune de France 84A end. FFSSN, Paris, pp 468
- Péricart J (2010) Hémiptères Pentatomoidea Euro-Méditerranéens. In: Systématique Troisième partie. Sous-families Podopinae et Asopinae vol 3, Faune de France 93 end. FFSSN, Paris, pp 291
- Pigino G, Migliorini M, Paccagnini E, Bernini F, Leonzio C (2005) Fine structure of the midgut and Malpighian papillae in *Campodea* (*Monocampa*) *quilisi* Silvestri, 1932 (Hexapoda, Diplura) with special reference to the metal composition and physiological significance of midgut intracellular electron-dense granules. *Tissue Cell* 37:223–232
- Pinheiro DO, Conte H, Gregório EA (2008) Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. *Biocell* 32:61–67
- Pradhan S (1940) The alimentary canal and pro-epithelial regeneration in *Coccinella septempunctata* with a comparison of carnivorous and phytophagous. *Q J Microsc Sci* 81:451–478
- Putshkov PV, Moulet P (2009) Hémiptères Reduviidae d'Europe occidentale, Faune de France 92 end. FFSSN, Paris, pp 668
- Ribeiro AF, Ferreira C, Terra WR (1990) Morphological basis of insect digestion. In: Mellinger J (ed) *Animal Nutrition and Transport Processes*. Karger, Basel, pp 96–105
- Richards PA, Richards AG (1969) Intranuclear crystals in the midgut epithelium of a flea. *Ann Entomol Soc Am* 62:249–250
- Rocha LLV, Neves CA, Zanuncio JC, Serrão JE (2010) Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *C R Biologies* 333:405–415
- Rocha LLV, Neves CA, Zanuncio JC, Serrão JE (2014) Endocrine and regenerative cells in the midgut of Chagas' disease vector *Triatoma vitticeps* during different starvation periods. *Folia Biol (Krakow)* 62: 259–267
- Rost MM (2006) Comparative studies on regeneration of the midgut epithelium in *Lepismasa saccharina* L. and *Thermobia domestica* Packard (Insecta, Zygentoma). *Ann Entomol Soc Am* 99:910–916
- Rost-Roszkowska MM (2008) Degeneration of the midgut epithelium in *Allacmafusca* L. (Insecta, Collembola, Symphyleona): apoptosis and necrosis. *Zool Sci* 25:753–759
- Rost-Roszkowska M, Jansta P, Vilimova J (2010b) Fine structure of the midgut epithelium in two Archaeognatha, *Lepismachilis notata* and *Machilis hrabei* (Insecta) in relation to its degeneration and regeneration. *Protoplasm* 247:91–101
- Rost-Roszkowska M, Vilimova J, Chajec Ł (2010a) Fine structure of the midgut epithelium and midgut stem cells differentiation in *Ateula formicaria* (Insecta, Zygentoma, Ateuluridae). *Zool Stud* 49:10–18
- Rost-Roszkowska MM, Vilimova J, Włodarczyk A, Sonakowska L, Kamińska K, Kaszuba F, Marchewka A, Sadilek D (2016) Investigation of the midgut structure and ultrastructure in *Cimex lectularius* and *Cimex pipistrelli* (Hemiptera, Cimicidae). *Neotropical Entomology* (in press)
- Schuh RT, Slater JA (1995) True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history. Cornell University Press, New York, pp. 20–22
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1995) Gut structures in adult workers of necrophorous neotropical stingless bees (hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Entomol Gen* 19:261–265
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1996) A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *J Adv Zool* 17:1–6
- Serrão JE, Cruz-Landim C (1998) Electrophoretic analysis of the protein in the midgut of stingless bees (Apidae, Meliponinae) with a comparison of necrophagous and feeding pollen workers. *J Adv Zool* 19(1):33–36
- Serrão JE, Cruz-Landim C (2000) Ultrastructure of the midgut epithelium of *Meliponinae* larvae with different developmental stages and diets (Hymenoptera, Apidae). *J Apic Res* 39:9–17
- Shanbhag S, Tripathi S (2009) Review: epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *J Exp Biol* 212:1731–1744
- Silva CP, Silva JR, Vasconcelos FF, Petretski MDA, DaMatta RA, Ribeiro AF, Terra WR (2004) Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Struct Dev* 33(2): 139–148
- Silva CPR, Ribeiro AF, Gulbenkian S, Terra WR (1995) Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J Insect Physiol* 41:1093–1103

- Sosinka A, Rost-Roszkowska MM, Vilimova J, Tajovský K, Kszuk-Jendryś M, Chajec Ł, Sonakowska L, Kamińska K, Hyra M, Poprawa I (2014) The ultrastructure of the midgut epithelium in millipedes (Myriapoda, Diplopoda). *Arthropod Struct Dev* 43: 477–492
- Teixeira AD, Fialho MCQ, Zanuncio JC, Ramalho FS, Serrão JE (2013) Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. *Arthropod Struct Dev* 42(3):237–246
- Terra WR (1988) Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz J Med Biol Res* 21:675–734
- Terra WR (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annu Rev Entomol* 35:181–200
- Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Phys B* 109:1–62
- Zhuang Z, Linser PJ, Harvey WR (1999) Antibody to H(+) V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti*). *J Exp Biol* 202:2449–2460
- Zimmermann B, Dames P, Walz B, Baumann O (2003) Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J Exp Biol* 206:1867–1876. doi:10.1242/jeb.00376

Capítulo II: *Ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio em Hemiptera: uma perspectiva evolutiva*

ULTRAESTRUTURA DA CÉLULA DIGESTIVA DO INTESTINO MÉDIO DE HEMIPTERA: UMA VISÃO GERAL

Helen Pinto Santos e José Eduardo Serrão

Resumo:

As características ultraestruturais fundamentais da célula digestiva do intestino médio dos Hemiptera com diversificados hábitos alimentares são relatadas e discutidas nesta revisão. As principais características ultraestruturais avaliadas em uma típica célula digestiva do intestino médio de hemípteros foram: o sistema de membrana perimicrovilar, as microvilosidades, o núcleo, os esferocristais, as inclusões lipídicas, os grânulos elétron-densos e vesículas elétron-lúcidas de tamanhos diversificados e o labirinto basal. As inferências fisiológicas que a presença destas características ultraestruturais podem trazer para o funcionamento da célula digestiva do intestino médio são discutidas. Como conclusão principal, as células digestivas do intestino médio dos Hemiptera são polifuncionais e apresentam uma ultraestrutura similar que é preservada em espécies basais e derivadas desta ordem.

Introdução:

Os Hemiptera são um grupo diversificado de insetos, no qual alguns podem ser vetores de patógenos causadores de doenças aos seres humanos, plantas e animais, bem como, pragas de diversas culturas agrícolas e de reflorestamento, enquanto outras espécies são amplamente utilizadas no controle biológico de pragas (Chapman 2013; Rush et al. 2016). Estes são insetos hemimetábolos cujo ancestral comum foi possivelmente um sugador de seiva (Terra 1988). Os representantes de Hemiptera são divididos em quatro subordens monofiléticas, cujas relações filogenéticas estão estabelecidas: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha (apenas uma família existente) e Heteroptera (Cryan & Urban 2012). Os Hemiptera possuem um aparelho bucal especializado em sugar, como adaptação do ancestral a capacidade de se alimentar de seiva dos vegetais (Goodchild 1966). Estes apresentam diversificados hábitos alimentares, podendo ser fitófagos, zoófagos, hematófagos e onívoros (Chapman 2013). Devido a esta variedade de dietas e o estudo da filogenia dos táxons superiores estes insetos são organismos de interesse para o estudo comparado da ultraestrutura do intestino médio (Santos et al. 2017).

O intestino médio dos Hemiptera pode ser dividido em quatro ou três regiões distintas, sendo mais comum a divisão em três porções, o segmento anterior, o segmento médio e o segmento posterior. As regiões distintas deste órgão realizam funções diferentes que estão relacionadas, principalmente, com as células digestivas presentes em cada segmento e suas variações ultraestruturais (Billingsley & Lehane 1996; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009). No geral, a porção anterior do intestino médio está relacionada à absorção de água, podendo apresentar funções de reserva de nutrientes e digestão de proteínas (Billingsley 1990; Rost-Roszkowska et al. 2017); a porção média do intestino médio é o local de liberação de enzimas digestivas e alta taxa de absorção de nutrientes, enquanto a porção posterior do intestino médio pode estar relacionada ao metabolismo e acúmulo de lipídios, osmorregulação, detoxificação e também com a absorção e transporte ativo de nutrientes (Billingsley & Lehane 1996; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009).

A célula predominante no epitélio do intestino médio dos insetos é a célula digestiva que tem sido reportada como polifuncional, estando envolvida com a absorção de nutrientes; produção e secreção de enzimas; produção e manutenção do sistema de membranas perimicrovilar (Hemiptera e Thysanoptera); reserva de nutrientes; detoxificação e neutralização de compostos tóxicos da dieta; bem como, balanço hídrico-osmótico e proteção (Billingsley & Lehane 1996; Riberio et al. 1990; Silva et al. 1995; Lipovsek et al. 2002; Silva et al. 2004; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009; Gomes et al. 2012; Rost-Roszkowska et al. 2017; Santos et al. 2017). Devido a estas características as células digestivas foram selecionadas para análises ultraestruturais comparativas dentre os intestinos médios de hemípteros com diferentes hábitos alimentares.

A ultraestrutura do intestino médio possibilita inferências sobre seu funcionamento e fisiologia. A célula digestiva apresenta três regiões distintas fisiológica e ultraestruturalmente: basal, perinuclear e apical (Billingsley & Lehane 1996). A região basal pode apresentar invaginações da membrana plasmática que formam o labirinto basal, estas invaginações podem conter portassomos e mitocôndrias associadas, bem como, inclusões lipídicas próximas. Enquanto a região perinuclear ou mediana apresenta normalmente um único núcleo oval com nucléolo, um desenvolvido retículo endoplasmático rugoso, inclusões lipídicas, esferocristais, lisossomos, grânulos e vesículas com diferentes elétrons-densidades. Por fim, a região apical pode apresentar

uma faixa de mitocôndrias, a trama terminal do citoesqueleto contínua com os filamentos proteicos que sustentam as microvilosidades, várias microvilosidades que podem apresentar portassomos e que apresentam na porção voltada para o lúmen o glicocálice, além do sistema de membranas perimicrovilar (Billingsley & Lehane 1996; Silva et al. 2004; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009; Gomes et al. 2012; Rost-Roszkowska et al. 2017).

Este estudo investigou de forma comparada as características ultraestruturais da célula digestiva do intestino médio de espécies basais e derivadas dentro dos Hemiptera, levando-se em consideração seus hábitos alimentares, discutindo as implicações fisiológicas da morfologia celular. Estas análises permitiram concluir que em Hemiptera as células digestivas do intestino médio são polifuncionais e que estas células apresentam independentemente do hábito alimentar da espécie um conjunto de características ultraestruturais semelhantes, como: membrana perimicrovilar, microvilosidades, núcleo desenvolvido com grande parte da cromatina descompactada e estruturas relacionadas à reserva de compostos.

Visão geral das características ultraestruturais das células digestivas do intestino médio de Hemiptera.

As 29 espécies de Hemiptera investigadas neste trabalho (Tabela I), foram agrupadas segundo a filogenia da ordem (Fig. 1, 2 e 3) da mais próxima do nó basal para a mais derivada, e as características ultraestruturais das células digestivas do intestino médio comparadas (Tabela II).

Tabela I. Espécies de Hemiptera investigadas nesta revisão e seus respectivos hábitos alimentares*

Espécie	Classificação	Hábito alimentar	Referências Bibliográficas
<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (1889)	Sternorrhyncha - Aleyrodidae	Fitófago	Cicero et al. (1995) e Ghanim et al. (2001)
<i>Psammotettix striatus</i> Linnaeus (1758)	Auchenorrhyncha - Cicadellidae	Fitófago	Zhang et al. (2012)
<i>Cicadella viridis</i> Linnaeus (1758)	Auchenorrhyncha - Cicadellidae	Fitófago	Zhong et al. (2015)
<i>Euscelidius variegatus</i> Kirschbaum (1858)	Auchenorrhyncha - Cicadellidae	Fitófago	Cheung & Purcel (1993)
<i>Platyleura kaempferi</i> Fabricius (1794)	Auchenorrhyncha - Cicadidae	Fitófago	Zhong et al. (2015)
<i>Lepyronia coleopterata</i> Melichar (1896)	Auchenorrhyncha - Cercopidae	Fitófago	Zhong et al. (2013)
<i>Gerris najas</i> De Geer (1773)	Heteroptera - Gerridae	Zoófago	Wener et al. (1991)
<i>Mezira granulata</i> Say (1832)	Heteroptera - Aradidae	Micetófago	Nardi et al. (2009)
<i>Spilostethus pandurus</i> Scopoli (1763)	Heteroptera - Lygaeidae	Fitófago	Megiud et al. (2013)
<i>Kleidocerys resedae</i> Panzer (1797)	Heteroptera - Lygaeidae	Fitófago	Santos et al. (2017)
<i>Lygus hesperus</i> Knight (1917)	Heteroptera - Miridae	Fitófago	Habibi et al. (2008)
<i>Eurygaster integriceps</i> Puton (1881)	Heteroptera - Scutelleridae	Fitófago	Mehrabadi et al. (2012)
<i>Coptosoma scutellatum</i> Geoffroy (1785)	Heteroptera - Plataspidae	Fitófago	Santos et al. (2017)
<i>Cimex hemipterus</i> Fabricius (1803)	Heteroptera - Cimicidae	Hematófago	Rost-Roszkowska et al. (2017)
<i>Cimex lectularius</i> Linnaeus (1758)	Heteroptera - Cimicidae	Hematófago	Rost-Roszkowska et al. (2017)
<i>Cimex pipistrelli</i> Jenyns (1839)	Heteroptera - Cimicidae	Hematófago	Azevedo et al. (2009)
<i>Nabis rugosus</i> Linnaeus (1758)	Heteroptera - Nabidae	Zoófago	Santos et al. (2017)
<i>Himacerus apterus</i> Fabricius (1798)	Heteroptera - Nabidae	Zoófago	Santos et al. (2017)
<i>Rhynocoris iracundus</i> Poda (1761)	Heteroptera - Reduviidae	Zoófago	Santos et al. (2017)
<i>Triatoma vitticeps</i> Stal (1859)	Heteroptera - Reduviidae	Hematófago	Rocha et al. (2010)
<i>Triatoma infestans</i> Klug (1834)	Heteroptera - Reduviidae	Hematófago	Burgos & Gutiérrez (1976)
<i>Rhodnius prolixus</i> Stål (1859)	Heteroptera - Reduviidae	Hematófago	Billingsley (1990)
<i>Graphosoma lineatum</i> Linnaeus (1758)	Heteroptera - Pentatomidae	Fitófago	Santos et al. (2017)
<i>Brontocoris tabidus</i> Signoret (1963)	Heteroptera - Pentatomidae	Zoófago	Fialho et al. (2009)
<i>Podisus nigrispinus</i> Dallas (1851)	Heteroptera - Pentatomidae	Zoófago	Fialho et al. (2013)
<i>Cenocorixa bifida</i> Hungerford (1926)	Heteroptera - Corixidae	Onívoro	Jarial (2005)
<i>Notonecta viridis</i> Decourt (1909)	Heteroptera - Notonectidae	Zoófago	Suicmez & Ozmen (2014)
<i>Notonecta maculata</i> Fabricius (1794)	Heteroptera - Notonectidae	Zoófago	Suicmez & Ozmen (2014)
<i>Dysdercus peruvianus</i> Guérin-Méneville (1831)	Heteroptera - Pyrrhocoridae	Fitófago	Silva et al. (1995)

*As espécies foram organizadas de acordo com a filogenia de Cryan & Urban (2012) e Li et al (2016) da mais próxima do nó basal para a mais derivada.

Como características principais as células digestivas do intestino médio da espécie mais basal investigada, o Sternorrhyncha fitófago *B. tabaci*, apresenta: labirinto basal com mitocôndrias associadas, presença de núcleo desenvolvido com cromatina descompactada, inclusões lipídicas, vesículas grandes eletrón-lúcidas, grânulos e pequenas vesículas eletrón-densas na região perinuclear, bem como, microvilosidades e um sistema de membranas perimicrovilar (Cicero et al. 1995; Ghanim et al. 2001). Em seguida, têm-se as células digestivas do intestino médio dos Auchenorrhyncha fitófagos *P. striatus*, *C. viridis*, *E. variegatus*, *P. kaempferi* e *L. coleopterata* (Cheung & Purcel 1993; Zhang et al. 2012; Zhong et al. 2013 e 2015) que apresentam, no geral: labirinto basal normalmente associado a mitocôndrias, núcleo desenvolvido com cromatina descompactada, vesículas grandes eletrón-lúcidas, grânulos e pequenas vesículas eletrón-densas na região perinuclear, bem como, microvilosidades e um sistema de membranas perimicrovilar. Por fim, os 23 Heteroptera investigados apresentaram variação de hábitos alimentares entre fitófagos, zoófagos, hematófagos, micetófago e onívoro. A ultraestrutura das células digestivas do intestino médio das espécies de Heteroptera mostra que a maioria apresenta: labirinto basal, que pode conter portassomos e mitocôndrias associadas, núcleo com cromatina descompactada, inclusões lipídicas, vesículas grandes eletrón-lúcidas, grânulos e pequenas vesículas eletrón-densas na região perinuclear, bem como, microvilosidades e um sistema de membranas perimicrovilar. Apenas os Heteroptera apresentaram esferocristais no citoplasma de suas células digestivas do intestino médio (Silva et al. 1995; Jarial 2005; Azevedo et al. 2009; Nardi et al. 2009; Fialho et al. 2009 e 2013; Suicmez & Ozmen 2014; Santos et al. 2017; Rost-Roszkowska et al. 2017).

Existem estruturas celulares relacionadas ao hábito alimentar em Hemiptera como a presença de grânulos de ferritina em hematófagos (Rocha et al. 2010) e fitófagos sugares de xilema (Zhong et al. 2013) que ingerem significativas quantidades do íon ferro e também aumento da quantidade de estruturas como esferocristais, inclusões lipídicas e grânulos e vesículas eletrón-densas em hematófagos após a ingestão de alimento (Rocha et al. 2010). Entretanto, a presença destas estruturas não cria um padrão ultraestrutural relacionado ao hábito alimentar, visto que, Hemiptera hematófagos como, por exemplo, *T. infestans* (Burgos & Gutiérrez 1976), *C. hemipterus* e *C. lectularius* (Rost-Roszkowska et al. 2017) não apresentam grânulos de ferritina nos citoplasmas de suas células digestivas do intestino médio. O único padrão

observado foi à presença de membrana perimicrovilar, núcleo desenvolvido com cromatina descompactada e estruturas de reservas para todas as células digestivas do intestino médio de Hemiptera. No geral, apesar da ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio em Hemiptera poder apresentar especificações ultraestruturais relacionadas ao hábito alimentar, a região do intestino médio na qual a célula está presente e ao momento fisiológico, período de jejum ou período pós-alimento, a ultraestrutura das células digestivas dentro das subordens de Hemiptera investigadas é similar. Sendo que a célula digestiva da espécie mais basal analisada *B. tabaci* (Cicero et al. 1995; Ghanim et al. 2001) e da mais derivada *D. peruvianus* (Silva et al. 1995) apresentam em comum a presença de: labirinto basal associado a mitocôndrias, grânulos e pequenas vesículas eletron-densas, núcleo desenvolvido e membrana perimicrovilar.

Por apresentarem semelhanças ultraestruturais as principais características morfológicas da região basal, perinuclear e apical das células digestivas em Hemiptera foram descritas e discutidas no geral. Sendo as diferenças ultraestruturais destacadas ao longo do texto. Visamos fazer uma revisão das estruturas e suas possíveis funções nas células digestivas do intestino médio em Hemiptera.

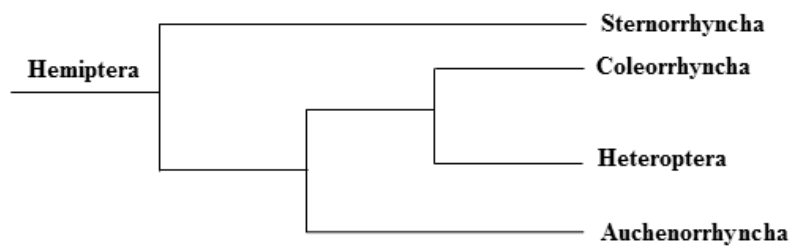


Figura 1. Filogenia da ordem Hemiptera. Retirado de Cryan & Urban (2012).

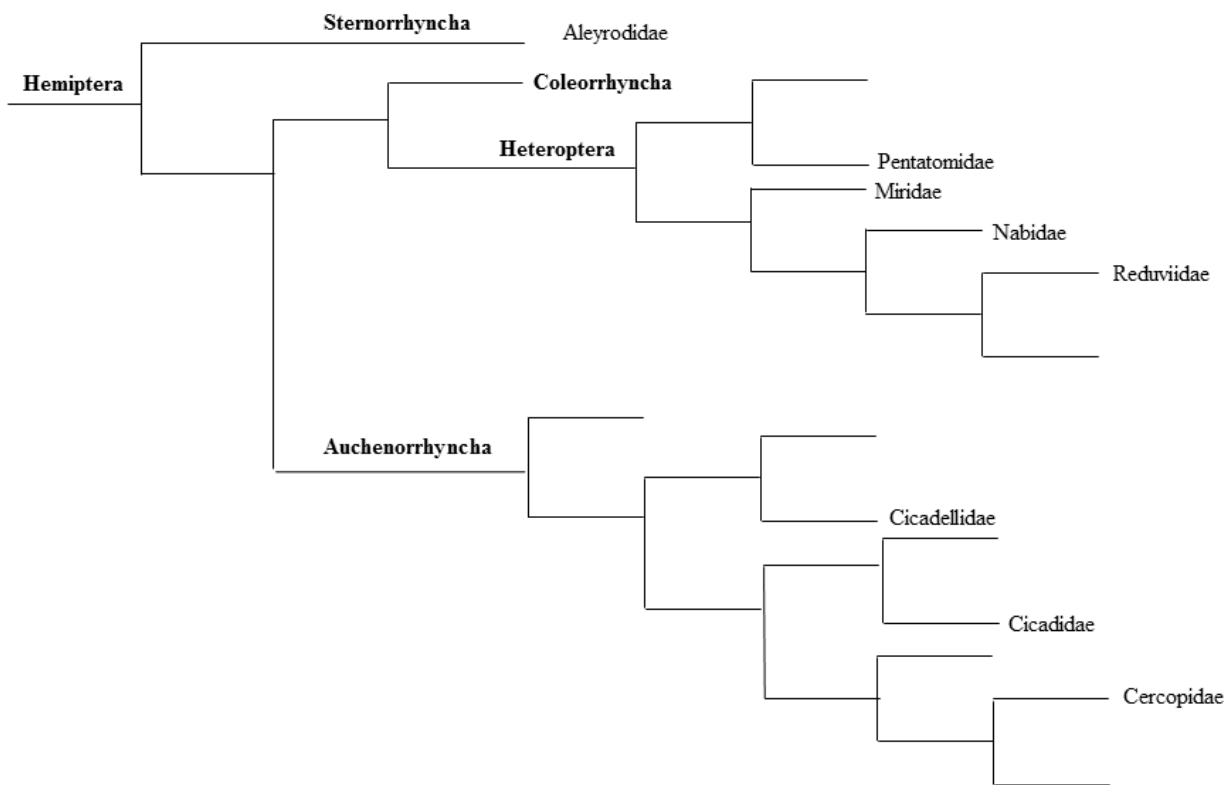


Figura 2. Relações filogenéticas em Hemiptera, baseado em Cryan & Urban (2012). Os espaços entre os táxons não correspondem a representações do tempo evolutivo.

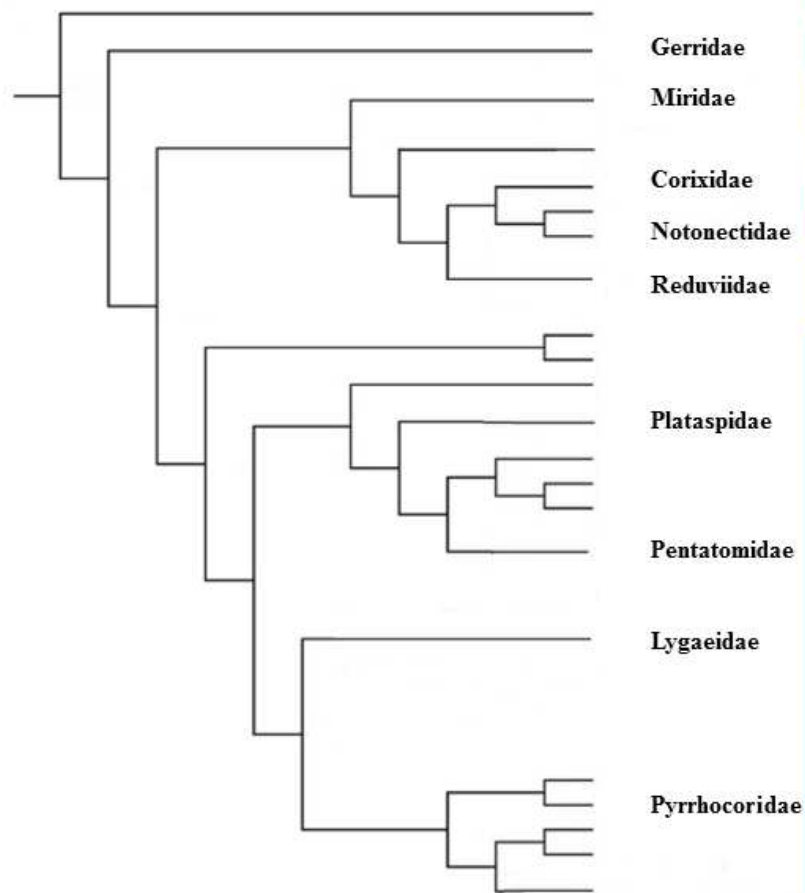


Figura 3. Relações filogenéticas em Heteroptera. Modificado de Li et al. 2016.

Tabela II. Características ultraestruturais da célula digestiva em Hemiptera*

Espécie - Referência Bibliográfica	Hábito Alimentar	Características													
		A Labi- rinto basal (BL)	B Altura BL	C Largura BL	D Portasso- mos no BL	E Mitocon- dria no BL	F Lipídio na região basal	G Lipídio no citoplasm a	H Núcleo	I Estruturas atípicas no núcleo	J Esfero- cristais	K Tamanho da PMM	L Grânulo tipo ferritina	M Grânulos e pequenas vesículas	N Vesícu- -las Gran- des
<i>Bemisia tabaci</i> Cicero et al. (1995) e Ghanim et al. (2001)	Fitófago	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Psammotettix striatus</i> Zhang et al. (2012)	Fitófago	¹ As:0 Ps: 0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:1 Ps:0	As:1 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:1 Ps:0
<i>Cicadella viridis</i> Zhong et al. (2015)	Fitófago	¹ As:0 Ps:1	As:0 Ps:1	As:- Ps:0	As:0 Ps:0	As:0 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:1 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:0	As:1 Ps:2	As:0 Ps:0	As:0 Ps:1	As:1 Ps:0
<i>Euscelidius variegatus</i> Cheung & Purcel (1993)	Fitófago	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>Platypleura kaempferi</i> Zhong et al. (2015)	Fitófago	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lepyronia coleopterata</i> Zhong et al. (2013)	Fitófago: xilema	1	1	1	0	1	-	-	1	0	0	2	1	1	1
<i>Gerris najas</i> Wener et al. (1991)	Zoófago	-	-	-	-	-	-	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Mezira granulata</i> Nardi et al. (2009)	Micetófago	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1	1	0	-	-
<i>Spilostethus pandurus</i> Megiud et al. (2013)	Fitófago	1	0	0	0	0	-	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>Kleidocerys resedae</i> Santos et al. (2017)	Fitófago	0	-	-	-	-	1	1	1	1 Estruturas arredonda- -das na nucleopla- -sma	1	0	0	0	0

Espécie - Referência Bibliográfica	Hábito Alimentar	Características													
		A Labi- rinto basal (BL)	B Altura BL	C Largu- ra BL	D Portasso- mos no BL	E Mitocon- dria no BL	F Lipídio na região basal	G Lipídio no citoplasm a	H Núcleo	I Estruturas atípicas no núcleo	J Esfero- cristais	K Tamanho da PMM	L Grânulo tipo ferritina	M Grânulos e pequenas vesículas	N Vesícula s Grandes
<i>Lygus hesperus</i> Habibi et al. (2008)	Fitófago	-	-	-	0	-	-	1	1	0	0	0	-	1	1
<i>Eurygaster integriceps</i> Mehrabadi et al. (2012)	Fitófago	1	0	0	0	1	-	1	1	1	-	2	0	-	-
<i>Coptosoma scutellatum</i> Santos et al. (2017)	Fitófago	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
<i>Cimex hemipterus</i> Rost-Roszkowska et al. (2017)	Hematófago ²	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Cimex lectularius</i> Rost-Roszkowska et al. (2017)	Hematófago ²	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
<i>Cimex pipistrelli</i> Azevedo et al. (2009)	Hematófago ²	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
<i>Nabis rugosus</i> Santos et al. (2017)	Zoófago	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
<i>Himacerus apterus</i> Santos et al. (2017)	Zoófago	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0	1	0
<i>Rhynocoris iracundus</i> Santos et al. (2017)	Zoófago	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Triatoma vitticeps</i> Rocha et al. (2010)	Hematófago ²	1	-	-	-	-	0	1	1	0	0	0	1	1	0

Espécie - Referência Bibliográfica	Hábito Alimentar	Características													
		A Labirinto basal (BL)	B Altura BL	C Largura BL	D Portassomos no BL	E Mitocôndria no BL	F Lipídio na região basal	G Lipídio no citoplasma	H Núcleo	I Estruturas atípicas no núcleo	J Esferocristais	K Tamanho da PMM	L Grânulo tipo ferritina	M Grânulos e pequenas vesículas	N Vesículas Grandes
<i>Triatoma infestans</i> Burgos & Gutiérrez (1976)	Hematófago ²	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	1
<i>Rhodnius prolixus</i> Billingsley (1990)	Hematófago ²	¹ As:1 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:1	As:0 Ps:0	As:0 Ps:1	As:0 Ps:0	As:1 Ps:1	As:1 Ps:1	As:0 Ps:0	As:1 Ps:1	As:1 Ps:1	As:0 Ps:0	As:1 Ps:1	As:0 Ps:1
<i>Graphosoma lineatum</i> Santos et al. (2017)	Fitófago	0	-	-	-	-	1	1	1	0	1	0	0	1	0
<i>Brontocoris tabidus</i> Fialho et al. (2009)	Zoófago	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	2	0	1	0
<i>Podisus nigrispinus</i> Fialho et al. (2013)	Zoófago	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1
<i>Cenocorixa bifida</i> Jarial (2005)	Onívoro	¹ As: 1	As: 0	As: 0	As: 0	As: 1	As: 0	As: 1	As: 1	As: 0	As: 1	As: 0	As: 0	As: 1	As: 0
<i>Notonecta viridis</i> Suicmez & Ozmen (2014)	Zoófago	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	1	1
<i>Notonecta maculata</i> Suicmez & Ozmen (2014)	Zoófago	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	1	1
<i>Dysdercus peruvianus</i> Silva et al. (1995)	Fitófago	1	1	0	0	1	0	-	1	0	-	2	0	1	0

Table I As principais características das células digestivas do intestino médio dos Hemiptera observados foram: **A.** Invaginações da membrana basal (Labirinto basal): 0 = ausente, 1 = presente, **B.** Altura das invaginações do labirinto basal 0 = curta, 1 = longa; **C.** Largura dos canais do labirinto basal: 0 = estreito; 1 = amplo, **D.**

Portassomos na membrana basal invaginada: 0 = ausente; 1 = presente, **E.** Mitocôndria associada ao labirinto basal: 0 = ausente; 1 = presente, **F.** Inclusões lipídicas na região basal: 0 = ausente; 1 = presente, **G.** Inclusões lipídicas no citoplasma: 0 = ausente; 1 = presente, **H.** Núcleo com cromatina descondensada e proeminente nucleolo: 0 = ausente; 1 = presente, **I.** Estruturas atípicas no núcleo: 0 = ausente; 1 = presente, **J.** Esferocristais: 0 = ausente; 1 = presente, **K.** Tamanho do sistema de membrana perimicrovilar : 0 = curto; 1 = médio; 2 = longo **L.** Grânulos tipo ferritina: 0 = ausente; 1 = presente, **M.** Grânulo e pequenas vesículas eletrondensas no citoplasma: 0 = ausente; 1 = presente, **N.** Grandes vesículas elétron-lúcidas no citoplasma: 0 = ausente; 1 = presente.

* Focamos na tabela à região média do intestino médio quando esta foi identificada pelo autor, caso contrário, analisamos o intestino médio no geral excluindo regiões de transição com o intestino anterior, intestino posterior e câmara de filtração. Algumas características apesar de ausentes na descrição celular feita pelos autores são observáveis nas micrografias dos trabalhos e, por isso, foram adicionadas a esta tabela. O símbolo (-) sinaliza que a estrutura não foi descrita pelo autor e nem possível de ser observada nas micrografias, entretanto não podemos assegurar sua ausência na célula.

¹ Autor dividiu o intestino médio em segmento anterior e segmento posterior.

² Algumas características ultraestruturais da célula digestiva dos Hemiptera hematófagos podem sofrer modificações após alimentação, como produção e aumento do sistema de membrana perimicrovilar, alargamento do espaço extracelular do labirinto basal e aumento da quantidade de esferocristais e inclusões lipídicas.

Porção basal da célula digestiva do intestino médio de Hemiptera

Das 29 espécies analisadas 23 apresentaram invaginações da membrana plasmática basal nas células digestivas. Essas invaginações aumentam a superfície de contato da célula digestiva com o espaço extracelular, criado pela presença das invaginações, que ocupa a região entre a membrana plasmática basal da célula digestiva e a lamina basal do epitélio. Este espaço pode ser amplo, formando canais, estreito ou inexistente, pois acompanha a área disponível entre as membranas invaginadas. Assim denomina-se labirinto basal tanto os canais formados pelo espaço extracelular juntamente com a porção da membrana plasmática basal invaginada ou, quando estas invaginações forem muito estreitas, apenas as invaginações. O labirinto basal pode apresentar contato restrito com a hemolinfa com poucas aberturas dos canais do labirinto para a mesma (Ribeiro et al. 1990), pode apresentar mitocôndrias associadas à membrana plasmática do lado citosólico e estruturas integrantes da membrana como os portassomos (Santos et al. 2017). No fitófago *C. scutellatum* a lamina basal adentrou sutilmente as invaginações da membrana (Santos et al. 2017), embora a lamina basal normalmente se apresente reta logo abaixo do labirinto.

O labirinto basal pode ocupar apenas a porção basal da célula digestiva ou ser longo o suficiente para alcançar ou ultrapassar a porção perinuclear da mesma, o que foi evidenciado em fitófagos e zoófagos (Tabela II). A presença de um labirinto desenvolvido pode variar segundo a região do intestino médio, por exemplo, no fitófago *P. nigrispinus* (Fialho et al. 2013) encontra-se longo e com várias aberturas para hemocele apenas nas células digestivas da porção posterior do intestino médio. E também variar segundo o momento fisiológico da célula aumentando sua área após a ingestão de alimento no caso de hematófagos (Azevedo et al. 2009). Não havendo relação para a presença ou tamanho desta estrutura com o hábito alimentar e posição filogenética.

A presença do labirinto basal na célula digestiva do intestino médio está associada ao transporte de água do lúmen para o interior da mesma, pois o transporte de solutos do citoplasma celular para o espaço extracelular do labirinto gera um gradiente osmótico entre este espaço e o interior da célula, propiciando, por consequência, a absorção de água a partir lúmen do órgão (Ribeiro et al. 1990; Silva et al. 1995; Terra et al. 2006). A presença de mitocôndria associada ou próxima a membrana indica que o

transporte entre o citoplasma, o espaço extracelular do labirinto e a hemolinfa ocorre via gasto de ATP, justificando a presença de mitocôndrias associada ao labirinto basal em 16 das 23 espécies analisadas (Tabela II); enquanto a ausência das mesmas pode indicar transporte acoplado (Alberts et al. 2014). A presença de portassomos indica também transporte acoplado de um maior volume de solutos (Forgac 1999). Os portassomos associados ao labirinto basal, ultraestruturalmente são pontos elétron-densos dispostos na membrana plasmática basal, que também podem ser encontrados na membrana das microvilosidades das células digestivas (Terra et al. 2006) e nas membranas de células de mamífero (Izumi et al. 2003; Wienisch & Klingauf 2006). Estes pontos eletrondensos correspondem ao domínio citoplasmático de uma H⁺V-ATPase (Forgac 1999; Rizzo et al. 2003; Wiczorek et al. 2003). A presença desta bomba de prótons, como indicado acima, sinaliza para o transporte acoplado de íons entre o citoplasma da célula digestiva e o compartimento externo do labirinto basal (Terra et al. 2006).

A ausência de um labirinto basal na célula não indica ausência de transporte entre a membrana basal e a hemolinfa, a membrana sem invaginações indica apenas que há transporte em uma menor proporção sem a absorção de um grande volume de água. Assim, quanto maior a altura e a largura dos canais do labirinto e quanto mais quantidade de aberturas estes canais apresentarem para a hemolinfa maior o transporte de solutos entre célula e hemolinfa e maior será a absorção de água (Fig. 4).

Porção perinuclear da célula digestiva do intestino médio de Hemiptera

O núcleo das células digestivas do intestino médio dos insetos no geral é grande com a maior parte da cromatina descondensada e nucléolo proeminente. Estas características nucleares típicas de células metabolicamente ativas evidenciam uma intensa atividade gênica e produção de moléculas de RNAm (Alberts et al. 2014). O nucléolo é uma estrutura nuclear responsável pela produção da subunidade menor e maior dos ribossomos, sua proeminente área de ocupação e facilidade de distinção no nucleoplasma e a presença de vários ribossomos livres ou acoplados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) são características que demonstram alta síntese proteica (Alberts et al. 2014).

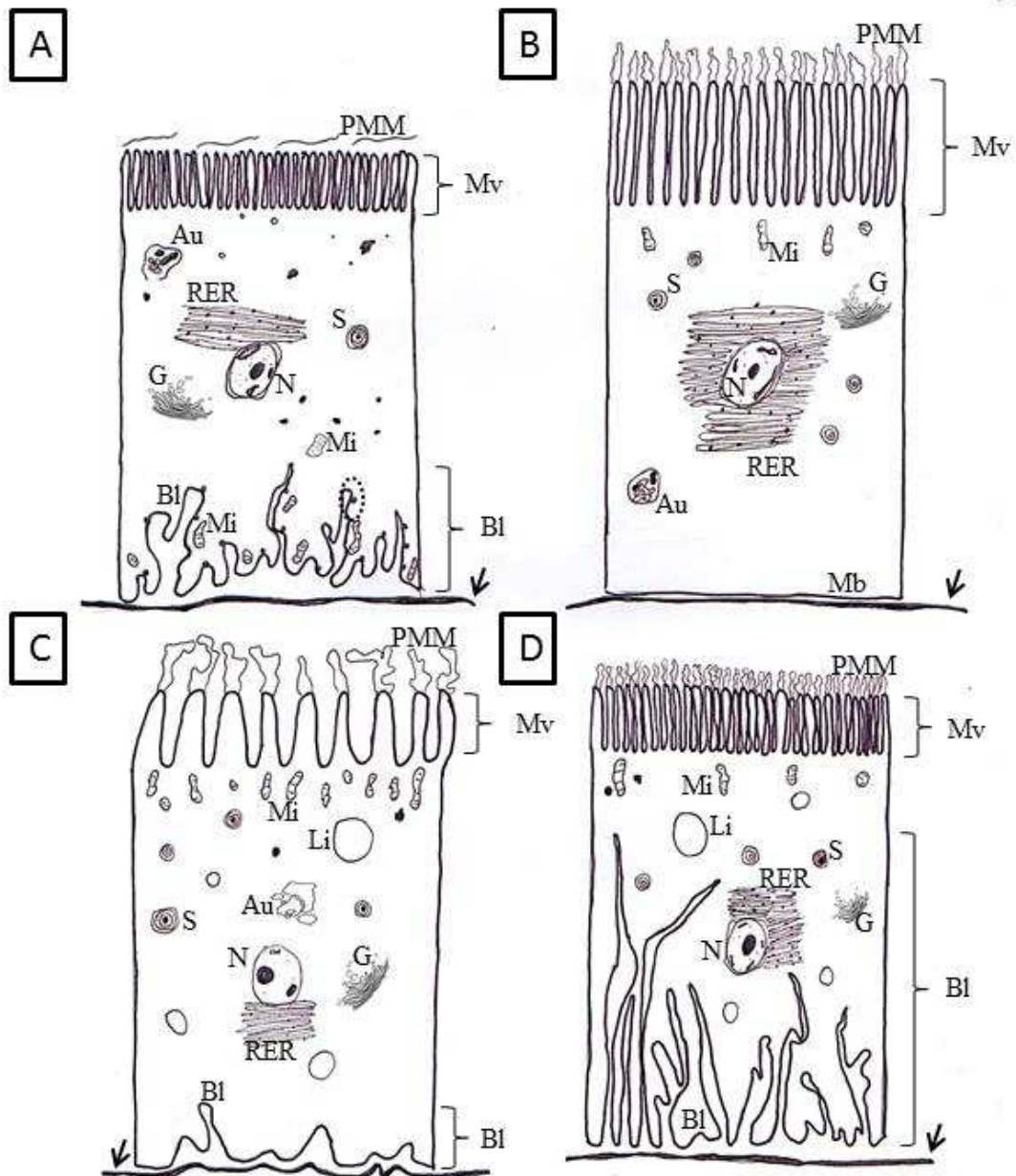


Figura 4. Esquemas de células digestivas do intestino médio de Hemiptera. Esquemas celulares mostrando diferentes alturas de microvilosidades (A, B, C e D) e diferentes alturas de labirintos basais (A, C e D), bem como, a membrana basal sem invaginações (B). Todas as membranas apicais e basais dos esquemas demonstram superfícies de troca de substâncias entre a célula digestiva e o meio. **PMM** sistema de membranas perimicrovilar; **Mv** microvilosidades; **Mi** mitocôndria; **S** esferocristais, **N** núcleo; **G** complexo de Golgi; **Au** autofagossoma; **Li** inclusão lipídica; **Círculo pontilhado** portassomos; **RER** Retículo endoplasmático rugoso; **Bl** labirinto basal; **Mb** membrana basal; **seta** lamina basal.

Por vezes, estruturas atípicas são identificadas no núcleo das células digestivas de alguns Hemiptera. No núcleo das células digestivas do hematófago *Triatoma infestans* (Burgos & Gutiérrez 1976) ocorre a presença de grânulos semelhantes aos de glicogênio e no núcleo do fitófago *Kleidocerys resedae* (Santos et al. 2017) a presença

de estruturas arredondadas com elétron-densidade discrepante daquela da heterocromatina que poderiam ser, segundo os autores, uma nova forma de compactação da mesma. Estas estruturas atípicas provavelmente não comprometem à atividade gênica e síntese proteica, uma vez que, outras estruturas celulares que dependem destes processos para a sua origem, como o RER e a membrana perimicrovilar, estão preservadas. Suposições do papel desses elementos nucleares atípicos para a dinâmica nuclear e celular precisam ser mais investigadas.

Os lisossomos e autofagossomos são organelas que ocorrem, principalmente, na região perinuclear. Os lisossomos são organelas que indicam digestão intracelular de compostos (Alberts et al. 2014) e parecem também estar relacionados, no intestino médio de insetos, ao aproveitamento de substâncias de reserva presentes nos esferocristais (Cruz-Landim & Serrão 1996). Os autofagossomos, que ultraestruturalmente aparecem como lisossomos com porções de membrana em seu interior, estão relacionados ao mecanismo de autofagia celular (Alberts et al. 2014; Rost-Roszkowska et al. 2017) (Fig. 4).

A presença de esferocristais, inclusões lipídicas e pequenas vesículas e grânulos elétron-densos na região perinuclear é evidenciada em células digestivas de Hemiptera fitófagos, zoófagos, hematófagos e onívoros. Estas estruturas indicam funções de reserva de energia e de nutrientes, secreção e proteção contra substâncias tóxicas (Lipovsek et al. 2002; Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009; Rocha et al. 2010; Gomes et al. 2012). A presença destas estruturas varia de acordo com a região do intestino médio; no hematófago *C. hemipterus* (Azevedo et al. 2009) apenas as células digestivas da porção anterior apresentam grânulos tipo glicogênio e grandes quantidade de inclusões lipídicas e esferocristais, sendo que estes últimos surgiram na célula digestiva da porção posterior somente após cinco dias da ingestão de sangue. Alguns autores discutem que a presença destas estruturas estão relacionadas a mecanismos de reserva que a célula digestiva possui para resguardar o inseto para períodos de ausência de disponibilidade de alimento, no caso de insetos hematófagos (Azevedo et al. 2009; Rocha et al. 2010) e predadores (Fialho et al. 2009). Entretanto, estas estruturas ocorrem também em células digestivas de fitófagos (Santos et al. 2017), que possuem maior disponibilidade de alimento que hematófagos e zoófagos (Tabela II). Assim, independentemente da dieta, as células digestivas de Hemiptera apresentam inclusões lipídicas, grânulos e vesícula eletrón-densas, e em Heteroptera esferocristais,

provavelmente para garantirem a sua homeostase (Santos et al. 2017) e proteção contra agentes tóxicos ingeridos (Gomes et al. 2012). A presença e quantidade destas estruturas serão confirmadas como reservas para períodos de privação alimentar quando, em estudos comparativos da célula digestiva em períodos de privação alimentar e horas após o período alimentar, estas surgirem ou aumentarem de quantidade na ultraestrutura celular, como o relatado para o hematófago *Triatoma vitticeps* (Rocha et al. 2010).

Os esferocristais são inclusões citoplasmáticas em forma de camadas concêntricas de membrana que intercalam materiais de diferentes elétrons-densidades. A célula digestiva utiliza estas estruturas para a bioacumulação de diversos compostos e imobilização de nutrientes (Cruz-landim & Serrão 1996) e metais, utilizando estas inclusões concêntricas também para a tolerância e detoxificação de metais pesados (Gomes et al. 2012). Estas estruturas portanto desempenham diferentes funções celulares e forma reportadas apenas no citoplasma de células digestivas de Heteroptera.

Pequenas vesículas e grânulos elétrons-densos são estruturas celulares relacionadas à função de secreção da célula digestiva, acredita-se que estes podem armazenar enzimas digestivas que serão mobilizadas para o lúmen do intestino médio mediante ingestão de alimentos pelo inseto (Billingsley & Lehane 1996). As vesículas elétrons-lucidas e maiores que podem estar na porção apical e perinuclear da célula digestiva estão provavelmente relacionadas a absorção de compostos do lúmen via endocitose (Billingsley & Lehane 1996; Lehane 1997).

Grânulos tipo ferritina são elétrons-densos, com aproximadamente 7 nm de diâmetro, que podem ser encontrados no citoplasma da célula digestiva sob a forma livre ou associados a organelas membranosas. A ferritina associa-se a proteínas da membrana plasmática de organelas das células digestivas de insetos, como o RER, o complexo de Golgi, corpos multivesiculares (na porção basal da célula) e ao envelope nuclear (Nichol & Locke 1990; Locke & Nichol 1992; Geiser et al. 2007).

A ferritina é uma proteína hidrossolúvel que imobiliza moléculas de ferro em sua estrutura, sendo produzida no citoplasma da célula digestiva pelos poliribossomos (Nichol & Locke 1990; Geiser et al. 2007). Estes grânulos são encontrados nas células digestivas de Hemiptera, principalmente nos sugares de xilema e sangue (Tabela II).

A imobilização de ferro é mais comum nas famílias Aphididae, Cercopidae e Reduviidae (Nichol & Locke 1990). A possível função fisiológica da ferritina na célula digestiva do intestino médio seja servir como tampão iônico intracelular de ferro, podendo também ser uma forma de eliminação do excesso deste íon que será secretado via exocitose no lúmen e eliminado do organismo (Nichol & Locke 1990). Além disso, a ferritina pode estar relacionada ao sistema de defesa contra o estresse oxidativo de hematófagos, pois moléculas de ferro, ou o grupamento heme, da dieta podem catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (Saeaeu et al. 2011).

Ainda em relação ao metabolismo do ferro, células digestivas do intestino médio de hematófagos podem apresentar em seus citoplasmas os hemoxissomos. Estes foram estudados no intestino médio de *R. prolixus* (Reduviidae) (Silva et al. 2006) aparecendo nas células digestivas da porção posterior deste órgão como proeminentes estruturas elétron-densas envoltas por membranas e circundados por retículo endoplasmático rugoso, podendo atingir 700 nm de diâmetro (Fig. 5). A principal função dos hemoxissomos pode ser a neutralização do grupamento heme da hemoglobina, provindo da dieta de sangue, que não foi preso ao agregado de hemozoína no lúmen do intestino médio do hematófago, e atravessou a membrana apical da célula digestiva. Além disso, os hemoxissomos armazenam ferro, provindo da degradação do grupo heme no interior da organela (Silva et al. 2006). Sugerimos, com base na observação ultraestrutural, que hemoxissomos podem ser esferocristais modificados para o armazenamento do íon ferro, suposição que ainda precisa ser investigada.

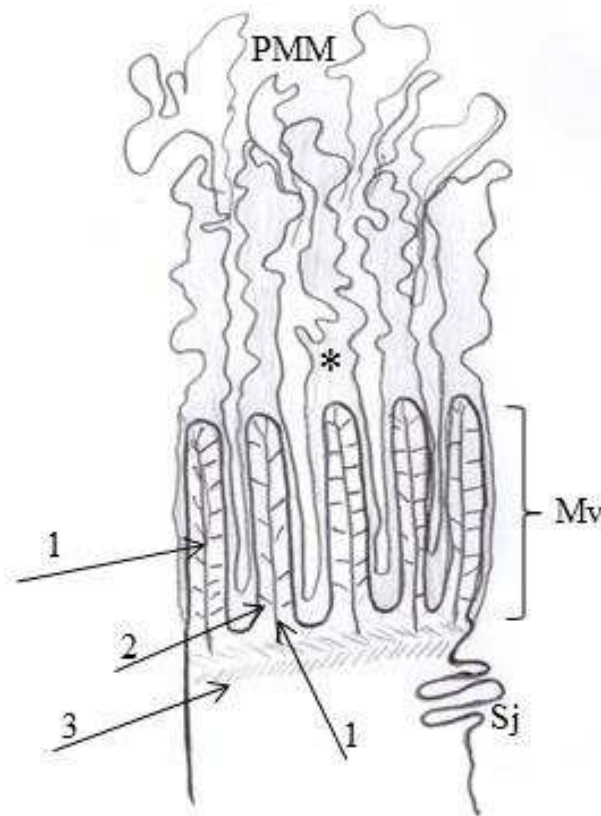
Porção apical da célula digestiva do intestino médio de Hemiptera

A porção apical das células digestivas do intestino médio de insetos é recoberta por especializações da membrana plasmática, as microvilosidades. As microvilosidades de insetos são homólogas as de vertebrados apresentando estrutura semelhante de proteínas estabilizadoras internas (Bonfanti et al. 1992; Bement & Mooseker 1996). Estas estruturas, em insetos, também são relacionadas ao aumento da superfície de contato da porção apical da membrana plasmática celular para absorção de substâncias luminiais (Cruz-Landim et al. 1997). As microvilosidades são revestidas por uma camada de polissacarídeos ligados aos lipídeos e proteínas da monocamada externa da membrana plasmática, formando o glicocálice (Terra et al. 2006; Alberts et al. 2014). Associado a porção citoplasmática da monocamada interna da microvilosidades pode

ocorrer a presença de portassomos (ver *Porção basal da célula digestiva do intestino médio de Hemiptera*). Em insetos, o feixe central que sustenta as microvilosidades é composto pela basicamente pela isoforma II da actina não muscular que são ligadas umas as outras pelas proteínas vilina e fibrina. Este feixe central é ancorado a porção da membrana plasmática que as reveste pela miosina do tipo I e a calmodulina, formando assim a estrutura interna das microvilosidades (Morgan et al. 1995; Bonfanti et al. 1992). Este citoesqueleto interno das microvilosidades é contínuo com a porção do citoesqueleto celular que forma a trama terminal na região apical da célula digestiva (Terra et al. 2006) (Fig. 6). Abaixo da trama terminal do citoesqueleto na porção apical da célula digestiva do intestino médio de insetos normalmente existe uma faixa de mitocôndrias responsável pelo fornecimento de ATP para o transporte e absorção de compostos como exemplo os aminoácidos (Silvia & Terra 1994; Billingsley & Lehane 1996; Fialho et al. 2009; Rost-Roszkowska et al. 2017; Santos et al. 2017). As microvilosidades das células digestivas podem variar de quantidade e tamanho entre as regiões do intestino médio de Hemiptera. No hematófago *C. hemipterus* (Azevedo et al. 2009) elas são maiores na porção posterior do intestino médio e no fitófago *B. tabidus* (Fialho et al. 2009) maiores na porção medial deste órgão, sendo que quanto maior a quantidade e a altura das microvilosidades maior será a absorção de nutrientes (Terra et al. 2006) (Fig. 4).

O sistema de membranas perimicrovilar que envolve externamente as microvilosidades do intestino médio de Thysanoptera e Hemiptera é compartilhado apenas por estas ordens (Silva et al. 2004) não havendo a membrana peritrófica quitinosa no lúmen deste órgão. Possivelmente, o sistema de membranas perimicrovilar foi fixado a partir de um ancestral fitófago que lidou com a digestão e absorção de uma dieta pobre em nutrientes provinda da seiva de vegetais (Terra 1988). A membrana perimicrovilar apresenta constituição lipoproteica semelhante a da membrana plasmática da célula digestiva, sem a presença de quitina, tendo como marcador molecular a enzima α -glucosidase (Terra 1988; Silva et al. 2004). Por recobrir as microvilosidades, mantendo uma constante distância das mesmas, é responsável pela proteção do epitélio do intestino médio. O sistema de membranas perimicrovilar estende-se da base das microvilosidades até o lúmen formando um compartimento separado, o espaço perimicrovilar, utilizado para a absorção de aminoácidos e imobilização de enzimas digestivas (Terra & Ferreira, 2005) (Fig. 6). Tem sido sugerido que a formação,

crescimento e manutenção desta membrana ocorra via fusão de vesículas com membrana dupla que brotam do complexo de Golgi, sendo a membrana externa da vesícula fusionada com a membrana da microvilosidade enquanto que a membrana



interna desta vesícula forma a membrana perimicrovilar (Silva et al. 1995).

Figura 6. Representação da porção apical da célula digestiva de Hemiptera. **PMM** sistema de membranas perimicrovilar; **Mv** microvilosidades; **seta 1** filamentos de actina sustentando as microvilosidades; **seta 2** proteínas que ancoram o feixe de actina à membrana plasmática apical; **seta 3** proteínas do citoesqueleto do córtex celular em contato com os feixes de actina do centro das microvilosidades; **asterisco** espaço endoperimicrovilar; **Sj** junções septadas.

Provavelmente, todos os Hemiptera produzem desta mesma forma a membrana perimicrovilar (Gutiérrez-Cabrera et al. 2016), podendo esta aumentar sua altura em direção ao lúmen conforme estímulo alimentar (Billingsley & Downe 1985; Azevedo et al. 2009; Rocha et al. 2010; Mehrabadi et al. 2011) chegando ao seu desenvolvimento máximo, por exemplo, no fitófago *D. peruvianus* (Damasceno-Sá et al. 2007) 30 h após a ingestão alimentar, estando durante o jejum presente sutilmente apenas na base das microvilosidades. Evidencia-se que mudanças estruturais podem ocorrer depois de

decorrido horas da ingestão alimentar, sendo necessário que as análises da ultraestrutura celular, comparado a célula antes e depois da ingestão de alimento, levem em consideração que as mudanças pós alimento não ocorrem imediatamente após a chegada do mesmo no lúmen do intestino médio.

A membrana perimicrovilar de hemípteros hematófagos também está relacionada à detoxificação do grupamento heme liberado no lúmen do intestino médio pela digestão da hemoglobina, pois este grupamento tóxico catalizador de espécimes reativas de oxigênio é imobilizado e polimerizado em um agregado de hemozoína por moléculas da membrana perimicrovilar (Oliveira et al. 2000). Cristofolletti et al. (2003) mostraram que a membrana perimicrovilar das células do intestino anterior do fitófago *Acyrtosiphon pisum* apresenta trabéculas membranosas que reforçam e ligam as lamelas deste sistema de membranas perimicrovilar modificado, originárias de vesículas multimembranas.

Ultraestrutura versus Filogenia

Terra (1988) mostrou que o estudo da digestão e características do intestino de insetos deveria ser agrupado para análise e discussão segundo a posição filogenética dos mesmos e não agrupados segundo seus hábitos alimentares. Isso porque insetos de diferentes ordens que compartilhavam o mesmo hábito alimentar como, por exemplo, os hematófagos *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) e a fêmea de *Aedes aegypti* (Diptera), apresentavam diferentes estruturas no intestino médio, como membrana perimicrovilar e matriz peritrófica, respectivamente, e diferentes formas de compartimentalização da digestão. Estas discrepâncias, segundo este autor, eram atribuídas a diferentes ancestrais e não eram correlacionadas ao hábito alimentar.

Estudos incluindo diferentes ordens de insetos como Hymenoptera (Serrão & Cruz-Landim 2000), Diptera (Godoy et al. 2015), Hemiptera (Azevedo et al. 2009; Fialho et al. 2009; Rocha et al. 2010; Rost-Roszkowska et al. 2017; Santos et al. 2017) chegaram a conclusão que a morfologia das células digestivas eram similares entre insetos filogeneticamente relacionados apesar destes apresentarem hábitos alimentares distintos. Esta revisão corrobora com as conclusões acima, pois em relação à ultraestrutura das células digestivas do intestino médio do onívoro, do micetófago e dos fitófagos, hematófagos e zoófagos analisados, não foram observadas diferenças

marcantes que seriam capazes de agrupar todos os Hemiptera que apresentassem o mesmo hábito alimentar.

Neste contexto, é importante a realização de mais estudos comparativos, sejam morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e ou moleculares para um maior entendimento do processo evolutivo do intestino médio e de suas estruturas celulares nos insetos.

Considerações finais

Nesta revisão foram reportadas semelhanças existentes entre os enterócitos de mamíferos e as células digestivas do intestino médio de insetos, como a estrutura interna das microvilosidades e a presença de portassomos na membrana plasmática. O estudo comparativo, com uma abordagem fisiológica molecular, para se estabelecer a função de certas características ultraestruturais presentes na célula digestiva deve continuar ser o objetivo de pesquisas na área da biologia do intestino médio dos insetos. Têm-se questões a serem desvendadas como, por exemplo, o papel de estruturas atípicas na região nuclear em proximidade com mecanismos complexos da atividade gênica celular, bem como, o completo mecanismo de funcionamento dos esferocristais como reservatórios de íons e neutralizadores de componentes tóxicos celulares. Ressaltamos também a importância para o estudo ultraestrutural e o entendimento das funções da célula digestiva do intestino médio dos insetos estudos comparados de todas as três regiões do intestino médio, bem como, de todas as regiões da célula digestiva: apical, perinuclear e basal; sem a exclusão de nenhuma parte tanto do intestino quanto da célula digestiva para futuros trabalhos morfológicos desse órgão.

Nesta revisão, a ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio mostra que os Hemiptera independentemente do hábito alimentar conservaram o refinado aparato de membrana perimicrovilar, núcleo desenvolvido com cromatina descompactada e também estruturas de reserva de compostos, que garantem a homeostase celular, em suas células digestivas do intestino médio.

Portanto, as características ultraestruturais das células digestivas do intestino médio em Hemiptera mostram que estas são polifuncionais, participando da digestão e absorção do alimento, osmorregulação, proteção, detoxificação e reserva de compostos. E que características morfológicas como a membrana perimicrovilar, foram preservadas ao longo da evolução da ordem sendo semelhantes entre espécies com diferentes hábitos

alimentares, mantendo-se nestas células de hemípteros basais e derivados especialidades ultraestruturais das células digestivas do intestino médio do ancestral da ordem.

Referências Bibliográficas:

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) *Molecular Biology of the Cell*. 6 ed. New York: Garland Science.

Azevedo DO, Neves CA, Santos-Mallet JR, Gonçalves TCM, Zanuncio JC, et al. (2009) Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* 46: 435-441.

Billingsley PF (1990) The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology* 35: 219–248.

Billingsley PF, Lehane MJ (1996) Structure and ultrastructure of the insects midgut, in: Lehane MJ, Billingsley PF (Eds.), *Biology of the insects midgut*, Chapman & Hall, London, pp. 3–25.

Billingsley PF, Downe AER (1989) Changes in the anterior midgut cells of the adult female *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) after feeding. *Journal of Medical Entomology* 26: 104-108.

Bement WM, Mooseker MS (1996) The cytoskeleton of the intestinal epithelium: components, assembly, and dynamic rearrangements. In: Hesketh JE and Pryme JF (Eds.), *The cytoskeleton: a multi-volume treatise*. Greenwich: JAI Press 3: 359– 404

Bonfanti P, Colombo A, Heintzelman MB, Mooseker MS, Camatini M (1992) The molecular architecture of an insect midgut brushborder cytoskeleton. *European Journal of Cell Biology* 57: 298– 307.

Burgos MHG, Gutiérrez LS (1976) The intestine of *Triatoma infestans* I. cytology of the midgut. *Journal of Ultrastructure Research* 57: 01-09.

Chapman RF (2013) *The Insects: structure and function*. Cambridge: Cambridge University Press.

Cheung WWK, Purcell AH (1993) Ultrastructure of the digestive system of the leafhopper *Euscelidius Variegatus* Kirshbaum (Homoptera Cicadellidae), with and Without Congenital Bacterial Infections. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 22: 49-61.

Cristofolletti PTR, Deraison C, Rahbé Y, Terra WR (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* 49: 11-24.

Cruz-Landim C, Serrão JE (1996) Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology* 47: 21-29.

Cruz-Landim C, Serrão JE, Silva-de-Moraes RLM (1997) On the ultrastructure of the striated border of midgut digestive cells of *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera Apidae). *Iheringia* 82: 127-131.

Cryan JR, Urban JM (2012). Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology* 37: 7-21.

Damasceno-Sá JC, Carneiro CNB, DaMatta RA, Samuels RI, Terra WR, Silva CP (2007) Biphasic perimicrovillar membrane production following feeding by previously starved *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Journal of Insect Physiology* 53: 592–600

Fialho MCQ, Terra WR, Moreira NR, Zancunio JC, Serrão JE (2013) Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Arthropod Structure & Development* 42: 277-285.

Fialho MCQ, Zanuncio JC, Neves CA, Ramalho FS, Serrão JE (2009) Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Annals of the Entomological Society of America* 102: 119-127.

Forgac M (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12951– 12954.

Geiser DL, Mayo JJ, Winzerling JJ (2007) The unique regulation of *Aedes aegypti* larval cell ferritin by iron. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(5): 418-429.

Ghanim M, Rossel RC, Campbel LR, Czosnek H, Brown JK, Ullman DE (2001) Digestive, salivary and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. *Journal of Morphology* 248: 22-40.

Godoy RSM, Fernandes KM, Martins GF (2015) Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Scientific Reports* 5: 15836.

Gomes FM, Carvalho DB, Peron AC, Saito K, Miranda K, Machado EA (2012) Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification. *Journal of Insect Physiology* 58: 211-219.

Goodchild JP (1966) Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biological Reviews* 41: 97–140.

Gutiérrez-Cabrera AE, Córdoba-Aguilar A, Zenteno E, Lowenberger C, Espinoza B (2016) Origin, evolution and function of the hemipteran perimicrovillar membrane with emphasis on Reduviidae that transmit Chagas disease. *Bulletin of Entomological Research* 106: 279–291

- Habibi J, Coudron TA, Backus EA, Brandt SL, Wagner RM, Wright MK, Huesing JE (2008) Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). *American Entomological Society of America* 101: 159-171.
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. 541–9.
- Jarial MS (2005) Electron microscopic study of the anterior midgut in *Cenocorixa bifida* Hung. (Hemiptera: Corixidae) with reference to its secretory function. *Zoological Science* 22: 783-790.
- Lehane MJ (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525-550.
- Lipovsek S, Letofsky-Pabst I, Hofer F, Pabst MA (2002) Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulus* (Opiliones). *Micron* 33: 647-654.
- Li T, Yang J, Li Y, Cui Y, Xie Q, Bu W, Hillis DM (2016) A Mitochondrial Genome of Rhyparochromidae (Hemiptera:Heteroptera) and a Comparative Analysis of Related Mitochondrial Genomes. *Scientific Reports* 6:35175.
- Locke M, Nichol H (1992) Iron economy in insects transport, metabolism and storage. *Annual Review of Entomology* 37: 195-215.
- Megiud AA, Awad HH, Omar AH, Elelimy AS (2013) Ultrastructural study on the midgut regions of the Milkweed bug, *Spilostethus pandurus* Scop. (Hemiptera: Lygaeidae). *Asian Journal of Biological Sciences* 6: 54–66.
- Mehrabadi M, Bandani AR, Allahyari M, Serrão JE (2012) The Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) digestive tract: histology, ultrastructure and its physiological significance. *Micro* 43(5):631-7.
- Morgan NS, Heintzelman Mb, Mooseker MS (1995) Characterization of myosin-IA and myosin-IB, two unconventional myosins associated with the *Drosophila* brush border cytoskeleton. *Developmental Biology* 172: 51– 71.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA, Taylor SJ (2009) Distinctive features of the alimentary canal of a fungus-feeding hemipteran, *Mezira granulata* (Hymenoptera: Aradidae). *Arthropod Structure and Development* 38: 206-215.
- Nava-Gervasio SM, Ortíz-Ordoñez E, Uría-Galicia EA (2007) Estudio anatómico-histológico del sistema digestivo de *Stenomacra marginella* (Herrich-Schaeffer, 1850) (Hemiptera: Heteroptera: Largidae). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 23:49–57.
- Nichol H, Locke M (1990) The localization of ferritin in insects tissue and cell. *Tissue Cell* 22 (6): 767-777.

- Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, Wanderley de Souza, Braga CMS, Masuda H, Oliveira PL (2000) Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. FEBS Letters 477: 95-98.
- Ribeiro AF, Ferreira C, Terra WR (1990) Morphological Basis of insect digestion. In: Mellinger J, editor. Animal Nutrition and transport Process I Nutrition in wild and Domestic animals Basel: Karger. pp. 96-105.
- Rizzo VF, Coskun U, Radermacher M, Ruiz T, Armbruster A, Gruber G (2003) Resolution of the V1 ATPase from *Manduca sexta* into subcomplexes and visualization of an ATPase-active A3 B3EG complex by electron microscopy. Journal of Biological Chemistry 278: 270– 275.
- Rocha LLV, Neves CA, Zanuncio JC, Serrão JE (2010) Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. Comptes Rendus Biologies 333: 405-415.
- Rost-Roszkowska MM, Vilimova J, Włodarczyk A, Sonakowska L, Kamińska K, Kaszuba F, Marchewka A, Sadílek D (2017) Investigation of the midgut structure and ultrastructure in *Cimex lectularius* and *Cimex pipistrelli* (Hemiptera: Cimicidae). Neotropical Entomology. 46(1): 45-57.
- Rusch A, Chaplin-Kramer R, Gardiner MM, Hawro V, Holland J, Landis D, Thies C, Tschardt T, Weisser WW, Winqvist C, Woltz M, Bommarco R (2016) Agricultural landscape simplification reduces natural pestcontrol: A quantitative synthesis. Agriculture Ecosystems and Environment 221: 198-204.
- Saeae L, Morales NP, Komalamisra N, Vargas REM (2011) Antioxidative systems defense against oxidative stress induced by blood meal in *Aedes aegypti*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 42 (3): 542-549.
- Serrão JE, Cruz-Landim C (2000) Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. Journal of Apicultural Research 39: 9-17.
- Santos HP, Rost-Roszkowska M, Vilimova J, Serrão JE (2017) Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits. Protoplasma doi:10.1007/s00709-016-1051-2 (in press)
- Silva C, Silva JR, Vasconcelos FF, Petretski MDA, DaMatta RA, Ribeiro AF, Terra WR (2004) Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. Arthropod Structure and Development 33: 139-148.
- Silva CP, Terra WR (1994) Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 24 493-505.
- Silva CP, Ribeiro AF, Gulbenkian S, Terra WR (1995) Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) Membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. Journal of Insect Physiology 41: 1093-1103.

- Silva JRGS; Lins UC, Nogueira NFS, Dansa-Petretski M (2006) The haemoxisome: A haem-iron containing structure in the *Rhodnius prolixus* midgut cells. *Journal of Insect Physiology* 52: 542-550.
- Suicmez M, Ozmen R (2014) Investigation of midgut's ultrastructure of *Notonecta viridis* Decourt, 1909 and *Notonecta maculata* Fab., 1794 (Hemiptera: Notonectidae). *Hittite Journal of Science & Engineering* 1:7–11
- Terra WR (1988) Physiology and biochemistry of insect digestion. An evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21: 675-734.
- Terra WR, Ferreira, C. (2006) Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78: 255-269.
- Terra WR, Santos CD, Ribeiro AF (1990) Ultrastructural and biochemical basis of the digestion of nectar and other nutrients by the moth *Erinngis ello*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56: 277-286.
- Werner K, Moutairou K, Werner K (1991) Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider, *Gerris najas* deg. (Heteroptera : Gerridae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 20: 69-77.
- Wieczorek H, Huss M, Merzendorfer H, Reineke S, Vitauska O, Zeiske W (2003) The insect plasma membrane H⁺/V-ATPase: intra-, interand supramolecular aspects. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 35: 359– 366.
- Wienisch M, Klingauf J (2006). Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. 1019–27. doi:10.1038/nm1739
- Xie Y, Liu W, Zhang Y, Xiong Q, Xue J, Zhang X (2011) Morphological and ultrastructural characterization of the alimentary canal in Japanese wax scale (*Ceroplastes japonicus* Green). *Micron* 42: 898-904.
- Zhang F, Zhang C, Dai W, Zhang Y (2012) Morphology and histology of the digestive system of the vector leafhopper *Psammotettix striatus* (L.) (Hemiptera: Cicadellidae). *Micron* 43: 725–738.
- Zhong H, Zhang Y, Wei C (2013) Anatomy and fine structure of the alimentary canal of the spittlebug *Lepyronia coleopterata* (L.) (Hemiptera: Cercopidae). *Arthropod Structure & Development* 42: 521-530.
- Zhong H, Zhang Y, Wei C (2015) Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of the cicada *Platypleura kaempferi* (Hemiptera: Cicadidae). *Entomological Science* 18: 340–352.

4. Conclusão Geral

Os resultados desta tese sobre a ultraestrutura da célula digestiva do intestino médio de Hemiptera indicam que esta é polifuncional, sendo responsável pelos processos de osmorregulação; proteção do órgão; digestão, absorção e reserva de nutrientes. Independentemente do hábito alimentar dos Hemiptera, a morfologia das células digestivas do intestino médio é similar, evidenciando que a ultraestrutura celular está mais associada a posição filogenética das espécies desta ordem.