

APARECIDA DAS DORES TEIXEIRA

**DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO CELULAR NO INTESTINO MÉDIO DO
PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T266d
2012
Teixeira, Aparecida das Dores, 1980-
Degeneração e regeneração celular no intestino médio do
predador de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)
durante o desenvolvimento pós-embrionário/Aparecida das
Dores Teixeira.-Viçosa, MG, 2012.
vii, 35f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa
Referências bibliográficas: f. 32-48.

1. *Podisus nigrispinus*. 2. Percevejo (Inseto). 3. Intestinos
- Morfologia. 4. Regeneração (Biologia). 5. Degeneração.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

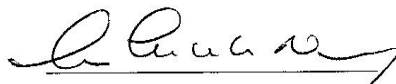
CDD 22.ed. 595.754

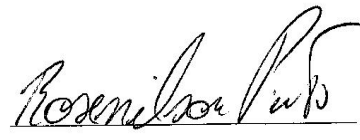
APARECIDA DAS DORES TEIXEIRA

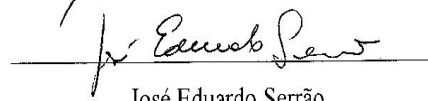
DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO CELULAR NO INTESTINO MÉDIO DO
PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012


Clóvis Andrade Neves


Rosenilson Pinto


José Eduardo Serrão
(Orientador)

A Deus, pela presença constante em minha vida.

A meus pais Geraldo (in memoriam) e Geralda, por sempre me ensinarem o que é amor e respeito.

Aos meus irmãos e irmãs, José Maria, Luis, Paulinho, Arlindo, Helena, Fátima, Maria José e Rose, pelo e apoio incondicional.

Aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas, pelo carinho.

Ao meu namorado Giovani, pelo carinho de sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização deste trabalho. Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, pelas condições oferecidas para a realização do meu mestrado, em especial ao Gilmar, Patrícia e Karla.

Ao professor José Eduardo Serrão, pela excelente orientação e acolhida, e por sempre estar pronto a ajudar.

A Dra Maria do Carmo Queiroz Fialho, por ter me auxiliado pacientemente e prontamente em todas as técnicas necessárias para a realização deste trabalho.

A secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela presteza de sempre.

Aos novos amigos do Laboratório Ultra-estrutura Celular e adjacências, Alípio, Débora, Dhiego, Douglas, Kenner, Luísa, Milton, Polyana, Waléria e Wagner.

Aos meus amigos da UFV, Andreia, Ciro, Eduardo, Igor, João Paulo, Juliana, Luiza, Raquel, Rodrigo e Rúdo.

Aos amigos de longa data, Elenice, Juninho, Maria do Carmo, Mônica e Vanessa.

Ao técnico José Luís Monteiro.

BIOGRAFIA

Aparecida das Dores Teixeira, filha de Geraldo Bertoldo Teixeira (*in memoriam*) e de Geralda Pantaleão Teixeira, nasceu no dia 09 de abril de 1980, na cidade de Guaraciaba, Minas Gerais, Brasil.

Iniciou a graduação em Bacharelado em Bioquímica em 2005 na Universidade Federal de Viçosa, onde veio a concluí-la em janeiro de 2010, quando obteve o título de Bacharel em Bioquímica.

Em março de 2010 iniciou o mestrado em Biologia Celular e Estrutural no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 06 |
| 3. RESULTADOS..... | 10 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 20 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 24 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |

RESUMO

TEIXEIRA, Aparecida das Dores, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Degeneração e regeneração celular no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) durante o desenvolvimento pós-embriônico.** Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadora: Maria do Carmo Queiroz Fialho.

Os processos de morte, proliferação e diferenciação celular, em determinados estágios do desenvolvimento, têm sido estudados no intestino médio de insetos ametábolos, que exibem crescimento contínuo e holometábolos, que sofrem metamorfose completa. No entanto, em insetos hemimetábolos, que evolutivamente se encontram em posição intermediária em relação aos ametábolos e holometábolos, pouco é conhecido sobre os processos descritos acima no que se refere ao intestino médio. Considerando o exposto, o presente trabalho acompanhou o desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio de um inseto hemimetábolo, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) para testar a hipótese que estes insetos apresentam os processos de morte celular programada e proliferação seguida de diferenciação de células regenerativas durante o desenvolvimento do intestino médio da fase de ninfa até adulto. Os intestinos médios foram medidos e submetidos a análises histológicas, ultra-estruturais e imunohistoquímicas para detecção de apoptose e proliferação celular. Os dados morfométricos mostraram um crescimento de seis vezes no comprimento do intestino médio da ninfa de primeiro estágio até o adulto, o que não foi acompanhado pelo aumento no tamanho das células do intestino médio, sugerindo que o crescimento do intestino médio deve ocorrer por aumento no número de células. Morte celular foi raramente observada nos intestinos médios, enquanto que proliferação de células regenerativas ocorreram com bastante frequência. O crescimento do intestino médio de *P. nigrispinus* parece ser resultado da proliferação de células regenerativas presentes neste epitélio e não no aumento da área das células digestivas, sendo que diferentemente dos insetos ametábolos e holometábolos, o intestino médio de *P. nigrispinus* não apresenta extensa remodelação, caracterizada pela baixa frequência de células digestivas em processo de morte celular.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Aparecida das Dores, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during the post-embryonic development.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-adviser: Maria do Carmo Queiroz Fialho.

The features of cell death, proliferation and differentiation in some developmental stages, have been studied in the midgut of ametabolous, which continuous growth, and holometabolous insects, which have complete metamorphosis. However, in hemimetabolous insects that are evolutionarily intermediate between ametabolous and holometabolous, the midgut reorganization during the post-embryonic developments is poorly studied. This study evaluated the post-embryonic development of the midgut of an insect hemimetabolous insect, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) to test the hypothesis that these insects have programmed cell death and proliferation followed by differentiation of regenerative cells during midgut development from nymphs to adult. The midguts were measured and submitted to histological, ultrastructural and immunohistochemical procedures. The morphometric data showed an increase of six-folds in midgut length from first instar nymph to adult, which was no associated by an increase in the size of the midgut cells, suggesting that the growth of the midgut occurs by increase in number of cells. Cell death was rarely found in midguts, whereas proliferation of regenerative cells occurred quite frequently. The growth of the midgut of *P. nigrispinus* seems to result of the proliferation of regenerative cells present in the epithelium and not from increasing the area of digestive cells, and unlike ametabolous and holometabolous insects, the midgut of *P. nigrispinus* has not extensive remodeling, characterized by low frequency of cell death in the digestive cells.

1. INTRODUÇÃO

O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões com origens embriológicas particulares: intestino anterior e intestino posterior, ambos de origem ectodérmica e intestino médio, originado a partir da endoderme (Snodgrass, 1935). De uma maneira geral, a organização estrutural do trato digestivo está correlacionada com as relações filogenéticas dos insetos, embora o tipo de alimentação possa ter alguma influência (Billingsley, 1990; Terra, 1990; Billingsley & Lehane, 1996).

No intestino anterior ocorre o armazenamento do alimento e algumas vezes a sua fragmentação antes que este alcance o intestino médio. No intestino médio, ocorre digestão química e absorção dos produtos da digestão, sendo, portanto, o sítio primário de produção de enzimas digestivas dos insetos, enquanto no intestino posterior o alimento não digerido é conduzido para o exterior havendo a participação desta região no equilíbrio osmótico do organismo (Chapman, 1998).

Em alguns insetos, o intestino médio é estrutural e funcionalmente diferenciado ao longo do seu comprimento (Billingsley & Lehane, 1996). Pelo menos três regiões anatômicas com diferentes funções digestivas são observadas no intestino médio do percevejo *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae): região anterior, região mediana e região posterior. A região anterior pode estar envolvida nos processos de absorção de água, regulação iônica, digestão e estocagem de açúcares e lipídeos. A região mediana parece atuar ativamente nos processos digestivos. A região posterior parece exercer funções na digestão e absorção de água e íons (Azevedo *et al.*, 2009). Mesmo em locais sem diferenciações anatômicas visíveis, podem ocorrer diferenças histológicas e citológicas (Chapman, 1985).

Em Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera), o intestino médio também apresenta três regiões anatômicas distintas, sendo a anterior em forma de saco dilatado, a mediana um tubo alongado que se abre na região posterior, também dilatada, porém menor que a região anterior (Guedes *et al.*, 2007; Fialho *et al.*, 2009). Outra característica dos Hemipteras é a ausência de membrana peritrófica, uma estrutura contendo quitina e proteínas específicas que envolve o bolo alimentar na maioria dos insetos e que tem importância fisiológica como evitar a ação de patógenos, danos mecânicos, compartimentalizar a digestão e evitar a excreção de enzimas digestivas (Terra, 2001; Terra & Ferreira, 2005; Hegedus *et al.*, 2009). Em contrapartida, as células intestinais destes insetos são envolvidas por uma membrana

lipoprotéica externa, chamada de membrana perimicrovilar, que se estende da base da microvilosidade celular até o lúmen e delimita um compartimento fechado, o espaço perimicrovilar (Terra, 1988; Silva *et al.*, 1995, 1996, 2004). Este espaço está entre a membrana plasmática das microvilosidades (membrana microvilar) e a membrana perimicrovilar, e tem função semelhante àquela da membrana peritrófica, tal como compartimentalização do processo digestivo, otimização da absorção de aminoácidos da dieta, imobilização de algumas enzimas e proteção do epitélio intestinal (Terra & Ferreira, 2005).

O epitélio do intestino médio dos insetos, de uma maneira geral, é constituído por três tipos celulares, que estão envolvidos nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares, digestivas ou principais), função endócrina (células endócrinas) e renovação do epitélio (células regenerativas) (Klag *et al.*, 1981, 2002; Dimitriadis & Kastritsis, 1984; Chapman, 1985; Billingsley, 1990; Andrade-Coelho *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2003; Silva-Olivares *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2005; Rost, 2006a,b; Terra *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2008).

As células digestivas possuem tempo limitado de vida e são, regularmente, substituídas pelas células regenerativas (Chapman, 1985, 1998; Cruz-landim, 1985). A ultra-estrutura das células digestivas depende da espécie, fase do ciclo alimentar e, particularmente, das múltiplas funções durante o ciclo de vida como, por exemplo, a secreção de enzimas, absorção e estoque de compostos orgânicos e inorgânicos (Billingsley & Lehane, 1996; Serrão & Cruz-Landim, 1996a,b, 2000; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999; Martins *et al.*, 2006; Serrão *et al.*, 2008; Fialho *et al.*, 2009).

As células regenerativas do epitélio do intestino médio dos insetos desempenham o papel de células-tronco. Elas podem proliferar intensamente e se diferenciar em tipos celulares distintos como as digestivas, endócrinas ou células caliciformes, se presentes no epitélio do intestino médio (Hecker *et al.*, 1971; Nishiitsutsuji-Uwo & Yasuhisa, 1981; Billingsley, 1990; Billingsley & Lehane, 1996; Sadrud-Din *et al.*, 1996; Hakim *et al.* 2001; Tettamanti *et al.*, 2007; Rost-Roszkowska *et al.*, 2010b). A participação de células tronco na remodelagem e regeneração de tecidos após degeneração tem sido um dos principais tópicos debatidos na literatura (Hakim *et al.*, 2001; Li & Xie, 2005; Park & Takeda, 2008; Parthasarathy & Palli, 2008; Park *et al.*, 2009, Hakim *et al.*, 2010).

O intestino médio dos insetos pode sofrer degeneração por pelo menos três processos distintos: apoptose, necrose e autofagia.

Apoptose é um tipo de morte celular programada, na qual um “suicídio” programado é ativado dentro da célula animal, levando a uma rápida morte celular mediada por enzimas proteolíticas chamadas de caspases (Alberts *et al.*, 2010). Este tipo de morte celular procede através de uma combinação de eventos tais como fragmentação nuclear, encolhimento celular e condensação da cromatina (Liu *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1998). A ativação de enzimas caspases é central para que esse processo ocorra (Hakim *et al.*, 2010). Em *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), a apoptose é o principal processo responsável pela morte celular no intestino médio em resposta a estresses mecânicos e químicos decorrentes de uma excessiva ingestão de sangue a cada refeição, sendo o epitélio danificado reparado por mecanismos envolvendo a diferenciação de células regenerativas pré-existentes (Okuda *et al.*, 2007).

Necrose é um processo que leva a morte acidental das células animais em resposta a uma injúria aguda, como um trauma ou a falta de suprimento de sangue (Alberts *et al.*, 2010). Este processo é comumente observado no epitélio do intestino médio dos insetos e é requerido para o próprio funcionamento do mesmo. No ametábolo *Atelura formicaria*, (Zygentoma: Ateluridae), as células epiteliais do intestino médio sofrem necrose e o processo se intensifica quando o lúmen é preenchido com alimento (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a).

Autofagia é um processo no qual a célula envolve e digere parte do próprio citosol e organelas dentro de vesículas que se fusionam com lisossomos (Hakim *et al.*, 2010). Este processo está relacionado a eventos importantes como resposta celular ao jejum e estresse e desempenha papel crítico no desenvolvimento, morte celular, envelhecimento, imunidade e câncer. Em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), a autofagia é induzida em tecidos como intestino médio larval e glândulas salivares durante a metamorfose em resposta ao aumento do nível do hormônio ecdisona (Lee & Baehrecke, 2001; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

Os insetos são classificados quanto ao tipo de desenvolvimento em três categorias: ametábolos, hemimetábolos e holometábolos. Os insetos ametábolos representam o modo de desenvolvimento no qual não sofrem metamorfose e os estádios juvenis e adultos são marcados apenas por diferenças no tamanho e

maturidade sexual. Nos insetos hemimetábolos, a transformação metamórfica entre formas jovens e adultas envolve primariamente a diferenciação da genitália e das asas funcionais. Nos holometábolos, as estruturas juvenis são extensivamente remodeladas durante a metamorfose, resultando em fenótipos adultos e larvais distintos (Yang, 2001).

Em holometábolos, a metamorfose é uma inovação chave no desenvolvimento do inseto, que envolve a destruição estágio-específica de um número de tecidos no final do estágio larval e a formação de novas estruturas adultas. Neste contexto, mecanismos altamente regulados para controlar a morte celular induzida no decorrer do desenvolvimento tem sido associados à metamorfose (Yin & Thummel, 2005). Em contrapartida, os hemimetábolos eclodem do ovo como ninfas que se assemelham aos adultos. Nestes insetos, crescimento e maturação ocorrem simultaneamente pelos estádios ninfais sequenciais até a muda imaginal. Entretanto, a ausência de um estágio intermediário pupal, como dos holometábolos, não implica em ausência de morte celular estágio-específico em diferentes tecidos (Mané-Padrós *et al.*, 2010).

Como descrito acima, estudos sobre os eventos de remodelação do intestino médio, envolvendo processos de morte, proliferação e diferenciação celular têm sido realizados em insetos ametábolos (Rost *et al.*, 2005; Rost 2006a,b; Rost-Roszkowska *et al.*, 2007; Rost-Roszkowska & Undrul, 2008; Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a,b,c,e) e holometábolos (Wu *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2007; Parthasarathy & Palli, 2007; Vilaplana *et al.*, 2007; Shahidi-Noghabi *et al.*, 2010). Entretanto, dados sobre estes processos no intestino médio de insetos hemimetábolos ainda não estão disponíveis.

Pentatomídeos predadores, incluindo *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), pertencem ao grupo dos insetos hemimetábolos. Estes predadores são comumente utilizados como importantes agentes de controle biológico de pragas em sistemas agrícolas (Lemos *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2008; Zanuncio *et al.*, 2008) e florestais (Grosman *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2006; Holtz *et al.*, 2007) predando ovos, larvas e adultos de insetos-praga, especialmente Lepidoptera e Coleoptera (Lemos *et al.*, 2005; Zanuncio *et al.*, 2005). Os pentatomídeos predadores estão amplamente distribuídos pelas Américas Central e do Sul (Thomas, 1992; Oliveira *et al.*, 2005) em culturas como algodão, café,

eucalipto, milho, soja, trigo e pinus (Zanuncio *et al.*, 2000, 2004; Oliveira *et al.*, 2005) e predam aproximadamente 30 espécies de larvas de insetos de importância econômica (Torres *et al.*, 2006).

Considerando o exposto, o presente trabalho acompanhou o desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio no inseto hemimetábolo, *P. nigrispinus* para testar a hipótese que estes insetos apresentam os processos de morte celular programada e proliferação seguida de diferenciação de células regenerativas durante o desenvolvimento do intestino médio da fase de ninfa até adulto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção do material

As análises foram realizadas com indivíduos em todos os cinco estádios do desenvolvimento ninfal de *P. nigrispinus* e nos adultos recém-emergidos. Ovos de *P. nigrispinus* foram obtidos do Insetário da Universidade Federal de Viçosa e acondicionadas sobre algodão em placas de Petri, até a eclosão, em temperatura ambiente. Desde a fase ovo até a fase adulta, a umidade no interior das placas de Petri foi mantida com a presença de um fragmento de algodão embebido em água destilada. A partir do 2º estágio as ninfas receberam como alimento pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*, pois ninfas de primeiro estágio não são predadoras. O desenvolvimento das ninfas foi acompanhado diariamente e as mesmas foram coletadas no máximo 24 h após a emergência ou mudança de estágio e no mínimo 24 h antes da mudança de estágio.

2.2. Morfometria

Dados morfométricos foram obtidos medindo-se o comprimento do intestino médio nos diferentes estádios do desenvolvimento e a área das células digestivas.

Para obtenção do comprimento do intestino médio, cinco ninfas de cada estágio e cinco adultos, todos com menos que 24 h após a muda, foram dissecados e medidos com auxílio de ocular micrométrica. A partir das secções histológicas, a área de 10 células colunares em cinco secções aleatórias de cinco indivíduos de cada estágio do desenvolvimento foi obtida com auxílio do programa de computador Image-ProPlus versão Windows 4.2 (Media Cybernetics).

2.3- Histologia

Para a realização de análises histológicas, três ninfas de cada estágio e três adultos, tanto com menos de 24 h para muda quanto até 24 h após a muda, foram dissecados e os respectivos intestinos médio transferidos para solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967). Todo o material previamente fixado foi submetido à desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 90, 95, 100%) e inclusão em historesina JB-4. Após a polimerização, secções de 3 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina. O material foi então observado em um microscópio de luz e fotografado.

2.3- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análises ultra-estruturais, o intestino médio de três ninfas de cada estágio e três adultos, tanto com menos de 24 h para muda quanto até 24 h após a muda, foram dissecados e transferidos para solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M por duas horas, seguindo-se lavagem no mesmo tampão e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. O material foi submetido novamente à lavagem em tampão cacodilato de sódio, desidratado em série crescente de etanol (70, 80, 90%) e em seguida, embebido em resina LR White. As amostras foram seccionadas em ultra-micrótomo e contrastadas com acetato de uranila a 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). O material foi então observado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.4- Apoptose

O intestino médio de três ninfas de cada estágio e três adultos, tanto com menos de 24 h para muda quanto até 24 h após a muda, foram dissecados e incubados em uma solução Apo-Trace™ (Apoptotic Cell Staining Kit, Sigma-Aldrich) de acordo com o fabricante. Brevemente, os intestinos foram incubados em solução Apo-Trace diluída (75 µg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (PBS) por uma hora, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente os intestinos médios foram transferidos para solução fixadora de Zamboni por uma hora, seguindo-se lavagem em PBS e incubação em solução de iodeto de propídeo 5 µg/mL por 15 minutos, e montagem em sacarose. Por fim, os intestinos médios foram observados em microscópio confocal a laser no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

O controle positivo foi realizado com ninfas de 4º estágio submetidas a tratamento com radiação UV por três horas antes da incubação com a solução Apo-Trace.

2.5- Proliferação celular

2.5.1-Imunofluorescência

O intestino médio de três ninfas de cada estágio e três adultos, tanto com menos de 24 h para muda quanto até 24 h após a muda, foram dissecados e

transferidos para solução fixadora de Zamboni por 30 minutos, seguindo-se a lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 1% de Triton X-100 (PBST) por cinco minutos a temperatura ambiente e incubação com BSA 1,5% em PBST por 10 minutos. As amostras foram lavadas com PBST nas mesmas condições acima citadas, incubadas em soro normal de coelho por cinco minutos, lavadas com PBST por três vezes e incubadas com o anticorpo anti-histona H3 fosforilada 1:100 em PBST por duas horas. Seguiu-se nova lavagem com PBST e incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC 1:500 em PBST por duas horas na ausência de luz, lavagem com PBST e montagem em sacarose. Por fim o material foi observado em microscópio confocal a laser no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.5.2-Imunohistoquímica

O intestino médio de três ninfas de cada estágio e três adultos, tanto com menos de 24 h para muda quanto até 24 h após a muda, foram dissecados e transferidos para solução de Zamboni por 30 minutos. As amostras foram incubadas em fenilhidrazina a 1% por 45 min, seguindo-se lavagem em PBST por cinco minutos a temperatura ambiente e incubação com BSA 1,5% em PBST por 10 minutos. O material foi lavado com PBST nas mesmas condições acima citadas, incubado em soro normal de coelho 2% em PBST por cinco minutos, lavado com PBST por três vezes e incubado com o anticorpo primário anti-histona H3 fosforilada diluído 1:100 em PBST por aproximadamente seis horas. Seguiu-se nova lavagem com PBST por três vezes, incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase 1:50 em PBST por 12 horas a 4°C e lavagem com PBST. O material foi então revelado com solução de diaminobenzidina (DAB) no escuro por 10 minutos, seguido do bloqueio da reação com água destilada por aproximadamente cinco minutos e lavagem com PBS. O material foi submetido à desidratação em série crescente de etanol e inclusão em historesina JB-4. Após a polimerização, secções de 2 µm de espessura foram contra-coradas com eosina. O material foi então observado em um microscópio de luz e fotografado.

2.6. Estatística

Os dados de morfometria do intestino médio foram comparados entre os diferentes estádios do desenvolvimento sendo submetidos ao teste estatístico de Tukey a 5% de significância. Para verificar a correlação entre o crescimento do intestino médio e os diferentes estádios do desenvolvimento, os dados morfométricos do intestino médio foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e de regressão quadrática a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados com o programa SAEG 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. Morfometria

O intestino médio de *P. nigrispinus* é dividido anatomicamente em três regiões principais: anterior, mediana e posterior. A região anterior e posterior são dilatadas, assumindo uma estrutura em forma de saco, sendo que a primeira geralmente se destaca pelo tamanho aumentado, principalmente após alimentação. A região mediana apresenta-se sob forma tubular relativamente longa (Figura 1).

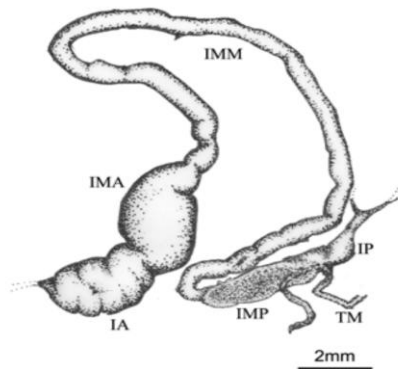


Figura 1: Desenho esquemático do trato digestivo de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) evidenciando suas divisões. IA: intestino anterior; IMA: intestino médio anterior; IMM: intestino médio mediano; IMP: intestino médio posterior; IP: intestino posterior; TM: túbulos de Malpighi. (Cortesia de M.C.Q. Fialho, 2010).

Análises do comprimento do intestino médio de *P. nigrispinus*, do 1° ao 5° estádios e adultos, revelaram um aumento de aproximadamente seis vezes no comprimento do intestino médio de ninfas do 1° estádio (2,33 mm) até o adulto (14,13 mm), sendo que em ninfas de 2° e 3° estádios o comprimento do intestino médio não foi diferente (Tabela 1) sendo possível caracterizar um crescimento do intestino médio conforme o inseto se desenvolve (Figura 2).

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão do comprimento (mm) do intestino médio e da área das células digestivas (μm^2) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).

| Estádio | Comprimento | Área celular |
|---------|---------------|-------------------|
| I | 2,33 ± 0,22e | 422,96 ± 291,72c |
| II | 4,90 ± 0,30d | 1003,90 ± 183,79b |
| III | 5,59 ± 0,21d | 1121,58 ± 622,04b |
| IV | 7,74 ± 0,34c | 1184,22 ± 379,75b |
| V | 12,86 ± 0,85b | 1863,09 ± 481,29a |
| Adulto | 14,13 ± 0,63a | 1735,50 ± 278,65a |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (p = 0,05).

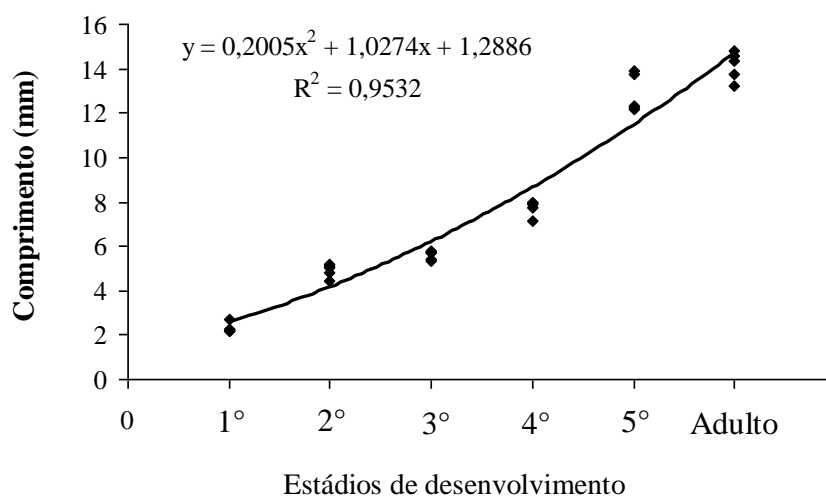


Figura 2: Teste de regressão do comprimento do intestino médio (mm) nos diferentes estádios do desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).

A área das células digestivas do intestino médio das ninfas e adultos de *P. nigrispinus*, com até 24 h após a muda, foi menor nas ninfas do 1° estágio (422,96 μm^2) e maior no 5° estágio e no adulto (Tabela 1). Nas ninfas do 2°, 3° e 4° estádios áreas das células digestivas do intestino médio não variaram entre si (Tabela 1).

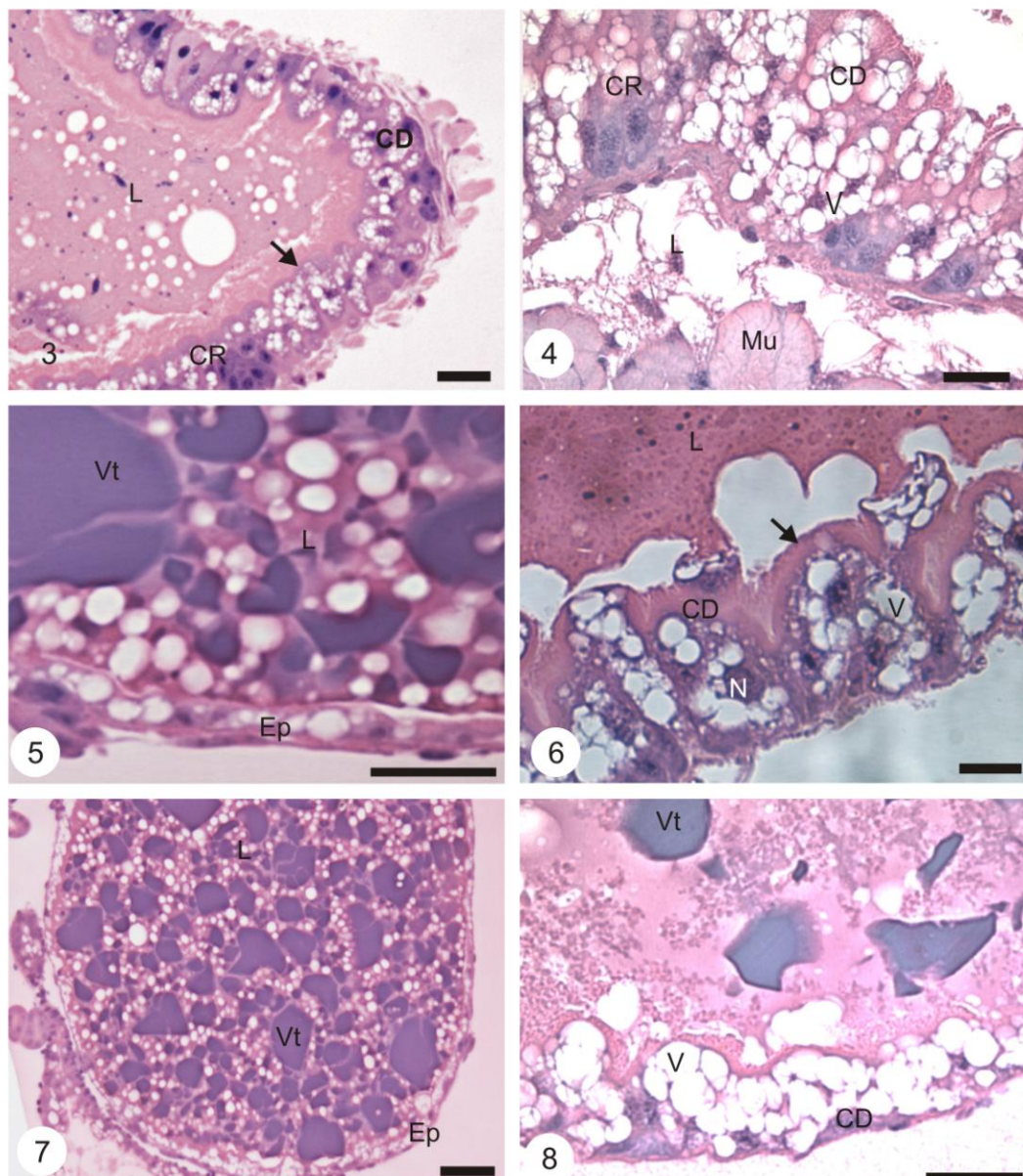
3.2- Histologia

A parede do intestino médio das regiões anterior, mediana e posterior é formada por uma camada única de células que se encontra apoiada sobre uma espessa membrana basal. Externamente há musculatura organizada em uma túnica circular interna e outra longitudinal externa (Figuras 3 e 4).

Os principais tipos celulares observados no epitélio do intestino médio foram as células digestivas e as regenerativas (Figura 4). As células digestivas são colunares, com um bordo estriado apical bem desenvolvido, núcleo localizado na porção mediana com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente (Figura 6). O citoplasma destas células, tanto nas ninfas imediatamente antes quanto após a muda é caracterizado pelo acúmulo de vacúolos bem desenvolvidos na porção mediano-apical (Figura 4).

Variações no padrão celular descrito acima foram encontradas nas ninfas de 1º estágio, com células digestivas achatadas nas ninfas recém-emergidas (Figura 5). Com o desenvolvimento do 1º estágio, as células digestivas tornam-se cúbicas e são caracterizadas pelo acúmulo de substâncias de aspecto transparente no citoplasma, que em algumas células ocupam a quase totalidade do mesmo (Figura 6). Embora as ninfas de 1º estágio não sejam predadoras, o lúmen do intestino médio está preenchido por um conteúdo similar ao vitelo presente no ovo destes insetos (Figura 7). Imediatamente antes da muda para o 2º estágio, as células digestivas ainda mostram-se cúbicas, porém há um aumento do material transparente armazenado no citoplasma, havendo ainda conteúdo no lúmen do intestino médio (Figura 8).

As células regenerativas encontram-se dispostas em ninhos por entre a base das células digestivas e são caracterizadas por citoplasma pouco abundante e núcleo bem desenvolvido (Figuras 3 e 4). Estas células foram observadas em todos os estádios estudados.



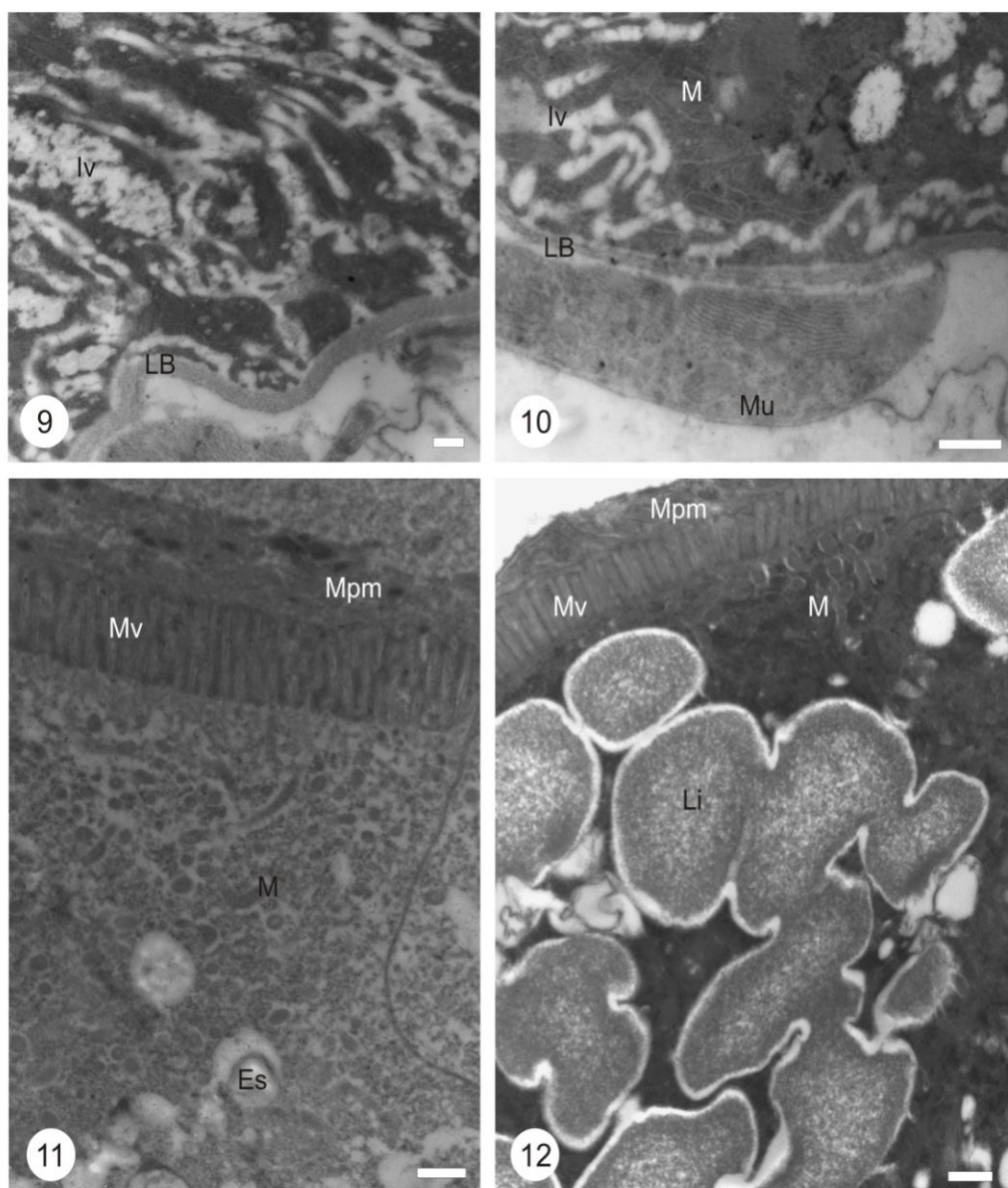
Figuras 3-8. Secções histológicas do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **3.** Epitélio da região anterior de ninfa no final do 4^o estágio. **4.** Epitélio de ninfa no final do 1^o estágio. **5.** Epitélio de ninfa no início do 1^o estágio. **6.** Epitélio de ninfa no final do 1^o estágio. **7.** Epitélio de ninfa no início do 1^o estágio. **8.** Epitélio de ninfa no final do 1^o estágio. Bordo estriado (seta), Célula digestiva (CD), Célula Regenerativa (CR), Epitélio (Ep), Lúmen (L), Músculo (Mu), Núcleo (N), Vacúolo (V), Vitelo (Vt). Barras = 10 µm.

3.3-Ultra-estrutura

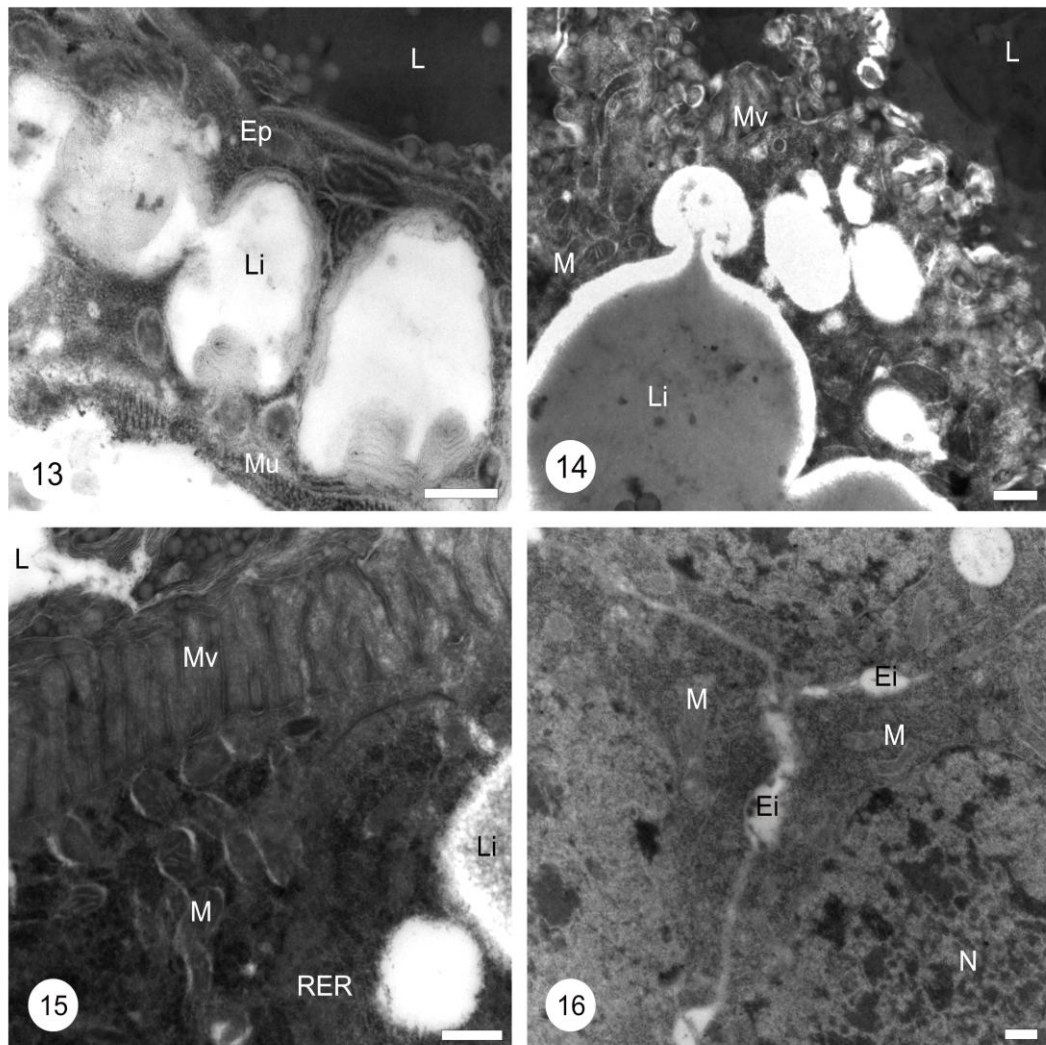
As células digestivas são caracterizadas por apresentarem na porção basal invaginações da membrana plasmática, constituindo um labirinto de canais associados a mitocôndrias, que nas células digestivas das porções anterior e mediana do intestino médio, podem atingir a região mediana da célula, enquanto nas células da porção posterior estas invaginações são mais curtas (Figuras 9 e 10). Na superfície apical das células digestivas das três porções do intestino médio é possível observar a presença de membranas perimicrovilares associadas às microvilosidades em todos os estádios do desenvolvimento. Nesta região, as microvilosidades são bem desenvolvidas e o citoplasma apical é caracterizado pela presença de algumas mitocôndrias e esferocristais (Figura 11). As células digestivas são altamente vacuolizadas ao longo de toda a extensão do intestino médio e em todos os estádios do desenvolvimento analisados, sendo que estes vacúolos apresentam-se com aspecto similar a gotas lipídicas (Figura 12).

A descrição ultra-estrutural apresentada acima ocorre desde ninfas de 2º estágio até os indivíduos adultos. Diferenças no padrão ultra-estrutural descrito acima foram encontradas nas ninfas do 1º estágio, tanto em suas fases iniciais e finais. Nestes indivíduos, as invaginações da membrana plasmática basal são pouco numerosas e curtas (Figura 13). Na porção apical das células digestivas das ninfas de 1º estágio microvilosidades são pouco desenvolvidas e não ocorrem ao longo de toda a superfície celular, o que aumenta no final deste estágio (Figura 14). Desde as fases iniciais das ninfas de 1º estágio há ocorrência de membrana perimicrovilar. O citoplasma das células digestivas nestas ninfas contém algumas mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático rugoso, sendo caracterizadas pelo acúmulo de grandes inclusões citoplasmáticas de diferentes elétrons-densidades, similares a lipídeos (Figura 15).

As células regenerativas são caracterizadas pela presença de um núcleo bem desenvolvido com predomínio de cromatina descondensada, sendo o citoplasma pobre em organelas, com algumas mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático rugoso. A porção basal das células regenerativas não apresenta invaginações da membrana plasmática (Figura 16).



Figuras 9-12. Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **9.** Porção basal de célula digestiva da região mediana de ninfa no início do 4º estágio, mostrando longas invaginações da membrana plasmática basal (Iv) e a lâmina basal (LB), sobre a qual a célula digestiva está apoiada. Barra= 1µm. **10.** Porção basal da célula digestiva da região posterior de ninfa no início do 4º estágio, mostrando invaginações curtas da membrana plasmática basal (Iv) associadas a mitocôndrias (M), lâmina basal (LB) e célula muscular (Mu). Barra = 2µm. **11.** Porção apical de célula digestiva da região anterior de ninfa no início 4º estágio, mostrando a membrana perimicrovilar (Mpm) associada às microvilosidades (Mv), mitocôndrias (M) e esferocristais (Es). Barra = 2µm. **12.** Porção apical de célula digestiva da região anterior de ninfa no final do 1º estágio, mostrando vacúolos (V) com aspecto similar a gotas lipídicas, membrana perimicrovilar (Mpm) associada às microvilosidades (Mv) e mitocôndrias (M). Barra = 2µm.

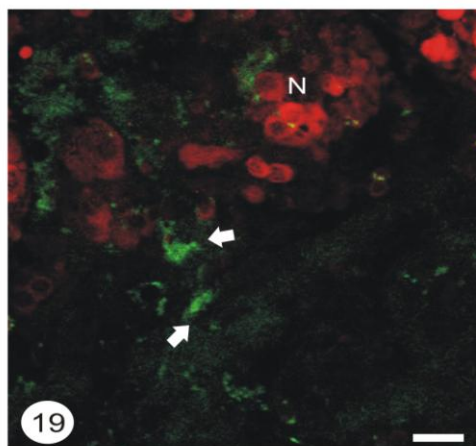
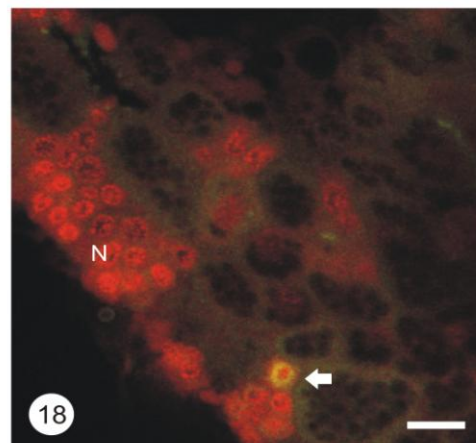
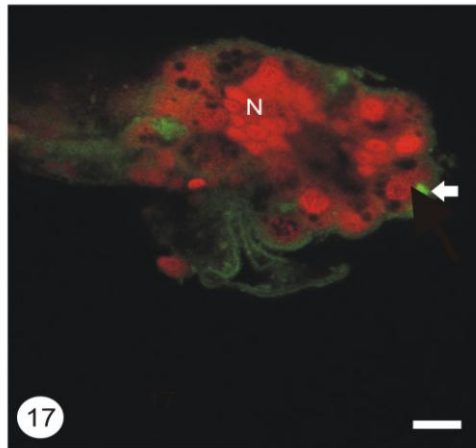


Figuras 13-16. Micrografias eletrônicas de transmissão do epitélio do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **13.** Célula digestiva de ninfa no início do 1º estágio mostrando micovilosidades pouco desenvolvidas e vacúolos começando o acúmulo de substâncias similares a lipídeos (Li), que ocupam quase a totalidade da célula. Lúmen (L), epitélio (Ep), músculo (Mu). **14.** Porção apical de célula digestiva de ninfa no início do 1º estágio mostrando microvilosidades (Mv) pouco desenvolvidas, gotas lipídicas (Li), lúmen (L) e mitocôndrias (M). **15.** Citoplasma apical de célula digestiva da região anterior de ninfa no final do 1º estágio mostrando algumas mitocôndrias (M) e perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER). Lúmen (L), microvilosidades (Mv) e gotas lipídicas (Li). **16.** Células regenerativas na região anterior de ninfa no início do 4º estágio formando ninho. Note espaço intercelular dilatado (Ei), núcleo (N) e algumas mitocôndrias (M). Barras= 1µm.

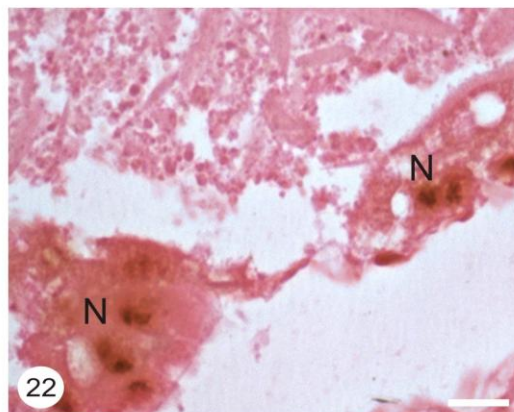
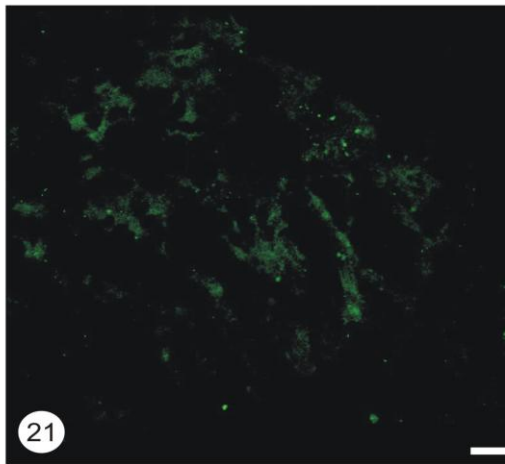
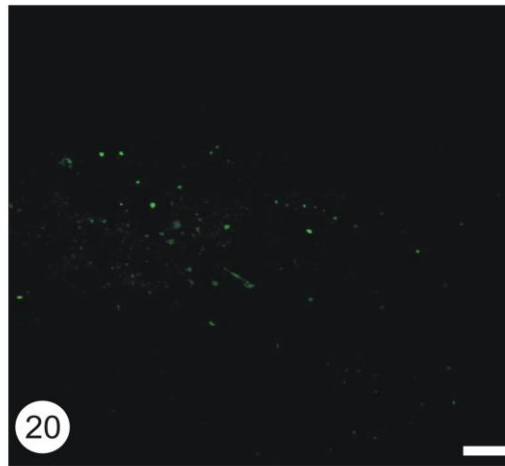
3.4-Apoptose e Proliferação celular

A presença de células positivas para Apo-Trace, indicativo de células em apoptose, foi raramente observada ao longo de toda a extensão do epitélio do intestino médio de *P. nigrispinus* a partir do 3º estágio do desenvolvimento (Figuras 17 e 18), sendo que grande quantidade de células apoptóticas foram observadas nos insetos expostos à luz UV (controle positivo) (Figura 19). Não foram observadas diferenças na ocorrência de células em apoptose entre o início e o final do mesmo instar.

Em relação à proliferação celular, foi encontrada uma variação na quantidade de células positivas para anti-histona H3 fosforilada. Nas ninfas do início do 1º estágio, células em proliferação foram raras, enquanto nas ninfas do início do 3º estágio, células anti-histona H3 fosforilada positivas foram mais comumente encontradas na região anterior do intestino médio. Nos demais estágios e no adulto houve a ocorrência de poucas células em divisão em todas as regiões do intestino médio de *P. nigrispinus* (Figuras 20, 21 e 22).



Figuras 17-19. Micrografia confocal a laser do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) mostrando células apoptóticas **17**. Células digestivas da região posterior de ninfa no final do 3^o estágio positivas para Apo-Trace (seta). Núcleos (N). **18**. Células digestivas da região mediana de ninfa no final do 4^o estágio positivas para Apo-Trace (seta). Núcleos (N). **19**. Células digestivas da região mediana de uma ninfa no final do 4^o estágio expostas à luz UV positivas para Apo-Trace (setas) (controle positivo). Núcleos (N). Barras= 20 μ m.



Figuras 20-22. Imunofluorescência e imunohistoquímica para detecção de células em proliferação no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **20 e 21.** Células regenerativas da região anterior de ninfas no final do 3º estágio positivas para anti-histona H3 fosforilada (verde). Barras = 20µm). **22.** Células regenerativas da região anterior de ninfas no final do 3º estágio positivas para anti-histona H3 fosforilada (marrom). Núcleos (N). Barra = 10µm.

4. DISCUSSÃO

Os resultados de morfometria mostram que o intestino médio de *P. nigrispinus* aumenta em comprimento cerca de seis vezes ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, o que era esperado considerando o aumento de tamanho apresentado por este inseto que varia de 1,39 mm na ninfa de 1º estágio para 7,39 mm na ninfa de 5º estágio (Grazia *et al.*, 1985). Este aumento no comprimento do intestino médio de *P. nigrispinus* parece ser devido ao aumento no número de células e não no tamanho das células digestivas que formam o epitélio do intestino médio, pois a área das células digestivas aumentou cerca de quatro vezes da ninfa de 1º estágio para o indivíduo adulto. No holometábolo *Manduca sexta*, o número de células no epitélio do intestino médio aumenta aproximadamente duzentas vezes entre a eclosão do ovo e a pupação, que abrange um período aproximado de duas semanas. Este aumento no número de células é acompanhado pela rápida divisão das células regenerativas do intestino médio e baixas taxas de morte das células intestinais pré-existentes (Baldwin & Hakim, 1991).

O epitélio do intestino médio das ninfas do predador *P. nigrispinus*, foi formado por células digestivas e regenerativas, similarmente ao reportado para os adultos do predador *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) (Fialho *et al.*, 2009).

As características histológicas e ultra-estruturais das células digestivas de ninfas de *P. nigrispinus* sugerem uma função tanto na absorção de substâncias, pela presença de microvilosidades, mitocôndrias no citoplasma apical, invaginações da membrana plasmática basal e inclusões lipídicas, como na produção de enzimas digestivas, pela presença de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e vesículas de secreção, bem como de excreção, pela presença de esferocristais, evidenciando um papel multifuncional destas células, como reportado para outros insetos (Cruz-Landim & Serrão, 1997; Serrão & Cruz-Landim, 2000; Azevedo *et al.*, 2009; Fialho *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2010).

Diferenças nos aspectos histológicos e ultra-estruturais das células digestivas descritos acima foram encontradas ao longo do desenvolvimento das ninfas de 1º estágio, ou seja, presença de um epitélio achatado com as células digestivas sem microvilosidades, poucas dobras da membrana plasmática basal e organelas citoplasmáticas no intestino médio no início deste estágio ninfal, estando o lúmen

repleto de material granular com diferentes elétrons-densidades. A organização estrutural das células digestivas das ninfas de primeiro estágio concorda com o fato de ninfas de *P. nigrispinus* neste estágio não se alimentarem (Lemos *et al.*, 2003) e a sua sobrevivência por este período, que tem duração aproximada de três dias (Zanuncio *et al.*, 1996), é possível devido a presença de alimento, com aspecto semelhante ao vitelo do ovo, no lúmen do intestino médio, o qual é absorvido pelas células digestivas, como demonstrado pelo aumento dos vacúolos e estoques de alimento nas células ao longo do desenvolvimento do primeiro estágio.

As células regenerativas do intestino médio de *P. nigrispinus* formam ninhos assim como em outros hemimetábolos estudados (Rost-Roszkowska, 2008; Azevedo *et al.*, 2009; Fialho *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2010). Esta organização das células regenerativas também é descrita para insetos ametábolos (Rost *et al.*, 2005; Rost 2006b, Rost-Roszkowska *et al.*, 2007; Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a) e holometábolos (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010d). O arranjo das células regenerativas em ninhos parece ser uma novidade evolutiva para os insetos e surgiu ainda nos ametábolos, já que estudos com indivíduos das ordens Collembola e Protura, não mais consideradas como insetos e sim como grupo-irmãos dos insetos (Brusca & Brusca, 1990), apresentam células regenerativas distribuídas individualmente (Rost, 2006a; Rost-Roszkowska *et al.*, 2010b) ou até mesmo ausentes no epitélio do intestino médio (Rost-Roszkowska & Undrul, 2008).

As células regenerativas do intestino médio de *P. nigrispinus* encontram-se em processo de divisão ao longo de todo o desenvolvimento pós-embrionário, sugerindo que esta proliferação contribui basicamente para o crescimento do intestino médio, como demonstrado pelos dados morfométricos e não somente para processos regenerativos. A habilidade de proliferação das células regenerativas do intestino médio tem sido reportada para praticamente todos os insetos como importante para o processo de renovação do epitélio do intestino médio, em decorrência do desgaste sofrido pelas células digestivas (Cruz-Landim *et al.*, 1996; Hakim *et al.*, 2001; Loeb *et al.*, 2003; Smagghe *et al.*, 2005; França *et al.*, 2006; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006; Loeb *et al.*, 2003; Loeb *et al.*, 2004; Loeb *et al.*, 2002,).

O papel das células regenerativas na remodelagem do intestino médio é amplamente conhecido em insetos holometábolos (Cruz-Landim & Mello, 1970;

Serrão & Cruz-Landim, 2000; Cruz-Landim & Cavalcante, 2003; Martins *et al.*, 2006; Parthasarathy & Palli, 2008), e mais recentemente nos insetos ametábolos (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a,c,d,e). Entretanto, para os insetos hemimetábolos, que não apresentam metamorfose completa como os holometábolos e nem um crescimento contínuo como os ametábolos, este é o primeiro estudo que reporta o papel presumido das células regenerativas no crescimento do intestino médio durante o desenvolvimento pós-embrionário destes insetos.

Embora a proliferação das células regenerativas pareça ter uma função importante no crescimento do intestino médio de ninfas de *P. nigrispinus*, isto não ocorre ao longo de todo o período ninfal, pois células regenerativas em divisão raramente foram encontradas em ninfas de 1º estágio, sugerindo que o aumento no comprimento do intestino médio do 1º para o 2º estágio deva ocorrer por aumento no tamanho das células, pois embora o comprimento do intestino médio dobre entre estes dois estágios, a área das células digestivas quase triplica. Em *Allacma fusca* (Collembola: Symphypleona) não há ocorrência de células regenerativas no intestino médio, sugerindo então que o crescimento do epitélio é determinado pelo aumento nas dimensões das células digestivas e não pelo aumento no número celular (Rost-Roszkowska & Undrul, 2008).

A partir do 3º estágio ninfal de *P. nigrispinus*, as células regenerativas em divisão foram mais comumente encontradas, sendo que a partir deste estágio há um aumento contínuo no comprimento do intestino médio, que não é acompanhado pelo aumento na área das células digestivas, que só volta a ocorrer no 5º estágio, porém em proporção inferior ao aumento do comprimento do intestino médio. No holometábolo *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), assim como em todos os outros holometábolos, o intestino médio larval sofre um completo processo de renovação, com proliferação massiva e diferenciação das células regenerativas no final do 5º instar larval, dando origem a um epitélio funcional que será mantido por todo o estágio pupal subsequente (Martins *et al.*, 2006; Tettamanti *et al.*, 2007).

A proliferação das células regenerativas no intestino médio de *P. nigrispinus* não parece ter correlação direta com possíveis processos degenerativos, como apoptose, já que esta foi raramente observada neste estudo. No entanto, esta correlação pode ser estabelecida no ametábolo *A. formicaria* (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a) e no hemimetábolo *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) (Rost-

Roszkowska, 2008). Em ambas espécies, a proliferação e diferenciação de células regenerativas é decorrente dos processos de degeneração (principalmente apoptose e necrose) que ocorrem intensivamente no epitélio do intestino médio. Durante o processo de diferenciação, as células regenerativas de *A. formicaria* gradualmente assumem características típicas de células digestivas enquanto alongam em direção ao lúmen do intestino médio (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a). Em *A. domesticus* há um predomínio dos processos degenerativos citados acima na região posterior do intestino médio (Rost-Roszkowska, 2008).

A presença de células positivas para Apo-Trace, indicativo de células em apoptose, foi observada raramente ao longo de toda a extensão do epitélio do intestino médio de *P. nigrispinus* a partir do 3º estágio do desenvolvimento provavelmente como resultado de danos naturais ou envelhecimento celular. Estudos relatam que a apoptose das células digestivas do intestino médio garantem a remoção de metais e substâncias tóxicas ingeridas pelos insetos (Rost-Roszkowska *et al.*, 2008), além de eliminar células infectadas por patógenos (Han *et al.*, 2000; Baton & Ranford-Cartwright, 2004; Vaidyanathan & Scott, 2006). Apoptose foi observada em *A. formicaria* (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010a), *Nicoletia phytophila* (Zygentoma: Nicoletiidae) (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010e), *Lepismachilis notata* (Archaeognatha: Machilidae) e *Machilis hrabei* (Archaeognatha: Machilidae) (Rost-Roszkowska *et al.*, 2010c).

5. CONCLUSÃO

O epitélio do intestino médio das ninfas e adultos do hemimetábolo predador *P. nigrispinus* é formado por células digestivas e regenerativas.

Processos degenerativos como apoptose foram raramente observados nas células digestivas do intestino médio de *P. nigrispinus*.

Proliferação seguida de diferenciação de células regenerativas ocorreram durante o desenvolvimento do intestino médio da fase de ninfa até adulto, sugerindo que o crescimento do intestino médio de *P. nigrispinus* parece ser resultado da proliferação de células regenerativas presentes neste epitélio e não no aumento da área das células digestivas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2010. *Biologia molecular da célula*. Artmed, 5ª edição, 1396p.
- Andrade-Coelho, C.A., Santos-Mallet, J., Souza, N.A., Lins, U., Meirelles, M.N.L., Rangel, E.F., 2001. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1141-1151.
- Azevedo, D. O., Neves, C.A., Santos-Mallet, J.R., Gonçalves, T.C.M., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2009. Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* 46, 435-441.
- Baldwin, K.M., Hakim, R.S., 1991. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molting in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue & Cell* 23, 411-422.
- Baton, LA, Ranford-Cartwright, L.C., 2004. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the time bomb model. *Parasitology* 129, 663–676
- Billingsley, P.F., 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology* 35, 219-248.
- Billingsley, P.F., Lehane, M.J., 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane MJ, Billingsley PF (eds) *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall (London) 3–30.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. *Invertebrates* (Sinauer, Sunderland, MA).
- Cavalcante, V.M., Cruz-Landim, C., 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24, 19-40.
- Chapman, R.F., 1998. *The insects: structure and function*. 4th ed. Cambridge Univ, Cambridge.
- Chapman, R.F., 1985. Structure of digestive system. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford 4, 70-211.
- Cruz-Landim, C. 1985. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Anais da Academia de Ciências do Estado de São Paulo* 44, 28-41.

- Cruz-Landim, C., Cavalcante, V.M., 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Science* 20, 1099–1107.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J.E. 1997. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). *Netherlands Journal of Zoology* 47, 21-29.
- Cruz-Landim, C., Mello, M.L.S., 1970. Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. IV. Development of the digestive tract. *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha* 27, 229-263.
- Cruz-Landim, C., Silva de Moraes, R.L.M., Serrão, J.E. 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Comparative Biology* 1, 29-40.
- Dimitriadis, V.K., Kastritsis, C.D., 1984. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae. *Canadian Journal of Zoology* 62, 659-669.
- Ferreira, J.A.M., Zanuncio, J.C., Torres, J.B., Molina-Rugama, A.J., 2008. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology* 18, 711–719.
- Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., 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.
- Fialho, M.C.Q., 2010. Caracterização e imunolocalização das principais enzimas digestivas do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Viçosa, UFV, 68 p. (Tese de doutorado).
- França, A. A. P., Neves, C.A., Cruz, L.C., Vianna, P.W.S., Serrão, J.E. 2006. Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A comparative study of workers and queens. *Brazilian Journal Morphological Science* 23, 129-136.
- Grazia, J., Del Vecchio, M.C., Hildebrand, R., 1985. Estudo das ninfas de heterópteros predadores: I - *Podisus connexivus bergroth*, 1841 (Pentatomidae, Asopinae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 14, 303-313.

- Grosman, A.H., van Breemen, M., Holtz, A.M., Pallini, A., Molina-Rugama, A.J., Pengel, H., Venzom, M. Zanuncio, J.C., Sabelis, M.W., 2005. Searching behaviour of an omnivorous predator for novel and native host plants of its herbivores: a study on arthropod colonization of eucalyptus in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 116, 135–142.
- Guedes, B.A.M., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., 2007. Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1963) (Heteroptera: Pentatomidae). *The Pan-Pacific Entomologist* 83, 229-235.
- Hakim, R.S., Baldwin, K., Smaghe, G., 2010. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology* 55, 593-608.
- Hakim, R.S., Baldwin, K.M., Loeb, M., 2001. The role of stem cells in midgut growth and regeneration. *In Vitro Cell. Developmental Biology Animal* 37, 338-342.
- Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2000. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO Journal* 19, 6030–6040.
- Hecker, H., Freyvogel, T.A., Briegel, H., Steiger, R., 1971. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. *Acta Tropica* 28, 80-104.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U., 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54, 285–302.
- Holtz, A.M., Zanuncio, J.C., Oliveira, C.L., Pratisoli, D., Marinho, J.S., Vianna, U.R., 2007. Potencial reprodutivo e de sobrevivência de *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) sobre *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) e *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Floresta*, 37, 63–70.
- Klag, J., Mesjasz-Przybylowicz, J., Nakonieczny, M., Augustyniak, M., 2002. Ultrastructure of the midgut of the chrysomelid beetle *Chrysolina pardalina*. *Proceedings in 15th International Symposium of Electron Microscopy*, Durban.

- Klag, J., Książkiewicz, M., Rościszewska, E., 1981. The ultrastructure of the midgut in *Xenylla grisea* (Collembola). *Acta Biologica Cracoviensia* 23, 47-52.
- Lee C.Y., Clough, E.A., Yellon, P., Teslovich, T.M., Stephan, D.A., Baehrecke, E.H., 2003. Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Current Biology* 13, 350–357.
- Lee, C.Y., Cooksey, B.A.K., Baehrecke, E.H., 2002. Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Developmental Biology* 250, 101–111.
- Lee C.Y., Baehrecke, E.H., 2001. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 128, 1443–1455.
- Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae), a predator of the cotton leafworm. *Journal of Applied Entomology* 127, 389-395.
- Lemos, W.P., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2005. Attack behavior of *Podisus rostralis* (Heteroptera: Pentatomidae) adults on caterpillars of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 975–981.
- Levy, S.M., Falleiros, A.M.F., Gregório, E.A., Arrebola, N.R., Toledo, L.A., 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology* 64, 633–638.
- Li, L., Xie, T., 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 21, 605-631.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175–184.
- Loeb, M.J., Jaffe, H., 2002. Peptides that elicit midgut stem cell differentiation isolated from chymotryptic digests of hemolymph from *Lymantria dispar* pupae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50B, 85–96.
- Loeb, M.J., Coronel, N., Natsukawa, D., Takeda, M., 2004. Implications for the functions of the four known midgut differentiation factors: an immunohistologic study of *Heliothis virescens* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 56B, 7–20.

- Loeb, M.J., Clark, E.A., Blackburn, M., Hakim, R.S., Elsen, K., Smagghe, G., 2003. Stem cells from midguts of lepidopteran larvae: clues to the regulation of stem cell fate. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 53B, 186–98.
- Mané-Padrós, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Nieva, C., Ureña, E., Xavier, B., Martín, D., 2010. The hormonal pathway controlling cell death during metamorphosis in a hemimetabolous insect. *Developmental Biology* 346, 150–160.
- Martins, G. F., Neves, C.A., Campos, L.A.O., Serrão, J.E., 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37, 161-168.
- Micchelli CA, Perrimon N., 2006. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439, 475–9.
- Nardi, J.B., Bee, C.M., Miller, L.A., Mathur, D., Ohlstein, B., 2011. Cell renewal in adjoining intestinal and tracheal epithelia of *Manduca*. *Journal of Insect Physiology* 57, 487-493.
- Neves, C.A., Gitirana, L.B., Serrão, J.E., 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology* 41, 443-459.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J., Yasuhisa, E., 1981. Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the endocrine cells in the cockroach midgut. *Biomedical Research* 2, 30-39.
- Ohlstein B, Spradling A., 2006. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439, 470–4.
- Oliveira, I., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Zanuncio, T.V., Pinon, T.B.M., Fialho, M.C.Q., 2005. Effect of the female weight on reproductive potential of the predator *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1858) (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 295-301.
- Okuda, K., Almeida, F., Mortarab, R.A., Kriegera, H., Marinottic, O., Bijovskya, A. T., 2007. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology* 53, 1307–1315.
- Park, M.S., Takeda, M., 2008. Starvation suppresses cell proliferation that rebounds after refeeding in the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*. 54, 386-392.

- Park, M.S., Park, P., Takeda, M., 2009. Starvation induces apoptosis in the midgut nidi of *Periplaneta americana*: a histochemical and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research* 335, 631-638.
- Parthasarathy, R., Palli, S.R., 2008. Proliferation and differentiation of intestinal stem cells during metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Development Dynamics* 237, 893-908.
- Parthasarathy, R., Palli, S.R., 2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mechanisms of Development* 124, 23-34.
- Pereira, A.I.A., Ramalho, F.S., Malaquia, J.B., Bandeira, C.M., Silva, J.P.S., Zanuncio, J.C., 2008. Density of *Alabama argillacea* larvae affects food extraction by females of *Podisus nigrispinus*. *Phytoparasitica* 36, 84-94.
- Pinheiro, D.O., Quagio-Grassiotto, I., Gregório, E.A., 2008. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Neotropical Entomology* 37, 413-419.
- Pires, E.M., Pinto, R., Lacerda, M.C., Zanuncio, J.C., Fialho, M.C.Q., 2006. Potencial reprodutivo horário do predador de lagartas desfolhadoras de eucalipto *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Revista Árvore* 31, 1039-1044.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain I electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Rocha, L. L. V., Neves, C.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2010. Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *Comptes Rendus Biologies* 333, 405-415.
- Rost, M.M., 2006a. Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatic* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Structure and Development* 35, 69-76.
- Rost, M.M., 2006b. Comparative studies on the regeneration of the midgut epithelium in *Lepisma saccharina* L. and *Thermobia domestica* Packard (Insecta, Zygentoma). *Annals of Entomological Society of America* 99, 910-916.
- Rost, M.M., Kuczera, M., Malinowska, J., Polak, M., Sidor, B., 2005. Midgut epithelium formation in *Thermobia domestica* (Packard) (Insecta, Zygentoma). *Tissue and Cell* 37, 135-143.

- Rost-Roszkowska, M.M., 2008. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) during degeneration and regeneration. *Annals of Entomological Society of America* 101, 151-158.
- Rost-Roszkowska, M.M., Undrul, A., 2008. Fine Structure and Differentiation of the Midgut Epithelium of *Allacma fusca* (Insecta: Collembola: Symphypleona) *Zoological Studies* 47, 200-206.
- Rost-Roszkowska, M.M., Vilimova, J., Chajec, L., 2010a. Fine structure of the midgut epithelium in *Atelura formicaria* (Hexapoda, Zygentoma, Ateluridae), with special reference to its regeneration and degeneration. *Zoological Studies* 49, 10-18.
- Rost-Roszkowska, M.M., Machida, R., Fukui, M., 2010b. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue and Cell* 42, 24-31.
- Rost-Roszkowska, M.M., Jansta, P., Vilimova, J., 2010c. Fine structure of the midgut epithelium in two Archaeognatha, *Lepismachilis notata* and *Machilis hrabei* (Insecta), in relation to its degeneration and regeneration. *Protoplasma* 247, 91-101
- Rost-Roszkowska, M.M., Poprawa, I., Klag, J., Migula, P., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W., 2010d. Differentiation of regenerative cells in the midgut epithelium of *Epilachna cf. nylanderi* (Mulsant 1850) (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). *Folia Biologica* (Kraków) 58, 209-216.
- Rost-Roszkowska, M.M., Vilimova, J., Chajec, L., 2010e. Fine structure of the midgut epithelium of *Nicoletia phytophila* Gervais, 1844 (Zygentoma: Nicoletiidae: Nicoletiinae) with special emphasis on its degeneration. *Folia Biologica* (Kraków) 58, 217-227.
- Rost-Roszkowska, M.M., Piłka, M., Szynska, R., Klag, J., 2007. Ultrastructural studies of midgut epithelium formation in *Lepisma saccharina* L. (Insecta, Zygentoma). *Journal of Morphology* 268, 224-231.
- Sadrud-Din, S., Loeb, M., Hakim, R., 1996. *In vitro* differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *Journal of Experimental Biology* 199, 319-325.

- Serrão, J.E., 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.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., 1996a. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology* 17, 01-06.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., 1996b. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 88, 161-171.
- Serrão, J.E., Ronnau, M., Neves, C.A., Campos, L.A., Zanuncio, J.C., 2008. Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of Entomological Society of America* 101, 915-921.
- Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E.J.M., Iga, M., Smagghe, G., 2010. Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. *Journal of Insect Physiology* 56, 1101-1107.
- Silva-Olivares, A., Diaz, E., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Cisneros, R., Zuniga, G., 2003. Ultrastructural study of the midgut and hindgut in eight species of the genus *Dendroctonus Erichson* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of Entomological Society of America* 96, 883-900.
- Silva, C.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1996. Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 1011-1018.
- Silva, C.P., Ribeiro, F.A., 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.
- 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 and Development* 33, 139-148

- Smagghe G, Vanhassel W, Moeremans C, De Wilde D, Goto S, Loeb MJ, et al. 2005. Stimulation of midgut stem cell proliferation and differentiation by insect hormones and peptides. *Annals of New York Academy of Science* 1040, 472–475.
- Snodgrass, R.E., 1935. Principles of Insect Morphology, first ed. McGraw-Hill, NY, USA, 667p.
- Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L., 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173-174.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47A, 47–61.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35, 181–200.
- 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., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Elsevier, Oxford, pp. 171–224.
- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C. 2006. Plasmic membranes from insect midgut cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78, 255-269.
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambro-Setti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M.L., Pennacchio, F., De Eguileor, M., 2007. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell and Tissue Research* 330, 345-359.
- Thomas, D., 1992. *Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere*. Entomological Society of America, Lanham.
- Torres, J.B., Zanuncio, J.C., Moura, M.A., 2006. The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in Eucalyptus in Brazil. *Biocontrol News and Information* 27, 1–18.
- Vaidyanathan, R., Scott, T.W., 2006. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. *Apoptosis* 11, 1643–1651.

- Vilaplana, L., Pascual, N., Perera, N., Bellés, X., 2007. Molecular characterization of an inhibitor of apoptosis in the Egyptian armyworm, *Spodoptera littoralis*, and midgut cell death during metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37B, 1241–1248.
- Wigglesworth, V.B., 1965. The principles of insect physiology. 6th ed. London: Butler and Tanner Ltd.
- Wigglesworth, V.B., 1954. Growth and regeneration in the tracheal system of an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of the Microscopical Society* 95, 115–137
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Ka'gi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, K., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., Mak, T.W., 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & Development* 12, 806–819.
- Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., Palli, S.R., 2006. Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development* 123, 530–547
- Yang, A.S., 2001. Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemi and holometabolous insects. *Evolution and Development* 3, 59–72.
- Yin, V.P., Thummel, C.S., 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, 237–243.
- Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Guedes, R.N.C., Ramalho, F.S., 2000. Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 10, 443–450.
- Zanuncio, J.C., Silva, C.A.D., Rodrigues, E., Pereira, F.F., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., 2008. Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51, 125–129.
- Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., Zanuncio, J.S., Zanuncio, T.V., Da Silva, A.M.C., Espindula, M.C., 2004. Fertility table and rate of population growth of the

- predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) on one plant of *Eucalyptus cloeziana* in the Field. *Annals of Applied Biology*, 144, 357-361.
- Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C., Saavedra, J.L.D., Lopes, E.D., 1996. Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) com *Zophobas confusa* Gebien (Coleoptera, Tenebrionidae) comparado à duas outras presas alternativas. *Revista Brasileira de Zoologia* 13, 159–164.
- Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Medeiros, R.S., Pinon, T.B.M., Sedyama, C.A.Z., 2005. Fertility and life expectancy of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) exposed to sublethal doses of permethrin. *Biological Research*, 38, 31-39.