

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE  
OPERÁRIOS DE *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira)

RESUMO

Cerca de 10% das espécies de cupins têm sido apontadas como agente de algum tipo de dano às plantas. Devido ao hábito alimentar variado desses insetos, as características do tubo digestivo dos operários e pseudo-operários são normalmente utilizadas em sistemática e filogenia. Uma alternativa para o controle desses insetos é a utilização de fungos entomopatogênicos. No entanto, os aspectos ligados às reações imunológicas dos insetos promovidas pelas interações com esses patógenos, permanecem ainda bastante escassos, principalmente ao que tange as reações imunes deflagrada pelos hemócitos. Assim a presente pesquisa teve os seguintes objetivos: 1. identificar e caracterizar a morfologia e ultra-estrutura dos hemócitos de operários do cupim *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren); 2. ampliar as informações sobre as reações imunológicas dos hemócitos quando desafiados imunologicamente por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. e 3. descrever a histologia do canal alimentar, visando contribuir com informações que possam ser utilizadas na sistemática desse inseto. A análise em microscopia de luz e eletrônica dos hemócitos revelou os seguintes tipos celulares: Plasmatócitos (PL), Granulócitos (GR), Esferulócitos (ES), Prohemócitos (PR), Adipohemócitos (AD) e Oenocitóides (OE). Entre as concentrações de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^7$  conídios/mL de *M. anisopliae*, a concentração mais elevada de  $1 \times 10^7$  conídios/mL foi a mais eficiente com  $TL_{50}$  de 1,62 dias. Verificou-se que as células mais freqüentes na hemolinfa foram os

Plasmatócitos e os Granulócitos para os tratamentos nos diferentes intervalos de tempo. Analisando a dinâmica hemocitária nos intervalos de 24h, 48h, e 72h, notou-se que os Plasmatócitos reduziram significativamente, enquanto que os Granulócitos aumentaram, após 72h da inoculação. Os Prohemócitos não diferiram estatisticamente nos intervalos de tempos, bem como entre os tratamentos. Durante a contagem diferencial não foram evidenciadas alterações na morfologia dessas células. Assim, a utilização do método de inoculação por pulverização na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL, em laboratório, mostrou-se eficiente contra os mecanismos de defesa de *N. coxipoensis*. As características histológicas do canal alimentar dos operários, de modo geral, foram semelhantes as observadas em várias espécies de cupins, porém foram evidenciadas diferenças na morfologia das células epiteliais e tipos de dobras na região do estomodeu, na disposição e número dos ninhos, bem como a presença da membrana peritrófica na região do mesêntero. Assim essas características podem ser utilizadas como critérios para a diferenciação entre as espécies de cupins do gênero *Nasutitermes*.

PALAVRAS-CHAVE: Dinâmica hemocitária, canal alimentar, histologia, *Metarhizium anisopliae*, sistemática, *Nasutitermes coxipoensis*

IMMUNOLOGIC ASPECTS AND MORFOLOGY OF TERMITES' ALIMENTARY CANAL  
OF *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

by

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

(Under The Direction of Valéria Wanderley Teixeira)

About 10% of the termites' species have been pointed as agent of some type of damage to the plants. Due to the diversity of food utilization of termites, the characteristics of the digestive tract of the workers and pseudo-workers can be used in systematics and filogenia of these insectes. A control methods of termites is the use of entomopathogenic fungi. Aspects regarding the immunologic response of termites triggered by pathogens invasions, however, remain scarce especially related to the immune reactions deflagrated by the hemocytes. Thus this research focused the following objectives: 1. to identify and to characterize the hemocytes morphology of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) worker's cast; 2. to generate information about the immunologic reactions of hemocytes when challenged by *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in *N. coxipoensis* workers and, 3. to describe the histology of workers digestive tract aiming to contribute with support information for systematics of termites. Analysis in light and electronics microscopy of the hemocytes typified the presence of the following cells: Plamatocytes (PL), Granulocytes (GR), Spherulocytes (ES), Prohemocytes (PR), Adipohemocytes (AD) and, Eonocytoids (OE). Among the concentrations from  $1 \times 10^2$  to  $1 \times 10^7$  conidia/mL of *M. anisopliae*, the highest concentration  $10^7$  conidia/mL was the most efficient with  $LT_{50}$  of 1.62 days. Under this concentration verified greatest frequency of Plamatocytes and Granulocytes in the hemolymph collected during the intervals of from 24 to 72h after application. The hemocitary

dynamics during the intervals of 24h, 48h, and 72h after application exhibited significant reduction in Plamatocytes and increasing in Granulocytes. Despite of variation on cell counting was not notified any morphological alterations in the cells. The use of termites spraying as treatment method with  $1 \times 10^7$  conidia/mL, in laboratory, triggered the defense mechanisms of *N. coxipoensis*. The histology of the digestive tract of the workers, in general, exhibited similar characteristics to those observed in other species of termites. Exceptions, however, were identified in the morphology of the epithelial cells regarding the types, number and displaying of these cells in the region of stomodeum as well as the existence of the peritrophic membrane in the region of midgut. Thus these characteristics can be used as criteria for the differentiation among the species of termites of the genus *Nasutitermes*.

Key words: Hemocytary dynamic, digestive tract, histology, *Metarhizium anisopliae*, termites systematic, *Nasutitermes coxipoensis*.

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE  
OPERÁRIOS DE *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2007

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE  
OPERÁRIOS DE *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

Orientadora: \_\_\_\_\_  
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Co-orientador: \_\_\_\_\_  
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Luiz Carlos Alves – CPqAM-FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
Jorge Braz Torres – UFRPE

A minha orientadora Valéria Wanderley Teixeira,  
que através dos anos de convívio, sempre me incentivou  
a crescer profissionalmente e pessoalmente, como uma  
verdadeira grande amiga.

DEDICO.

Aos meus pais José Luiz da Cunha (*in memoriam*)  
e Aurora Magliano da Cunha, minha irmã Bianca Simonetti,  
meu sobrinho Eduardo Jorge e minha amada namorada Lídia Alencar.

OFEREÇO.

## AGRADECIMENTOS

A inteligência suprema causa primária de todas as coisas, Deus, pela inspiração e força na realização de mais uma etapa em minha jornada de vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação de Entomologia Agrícola pela realização deste curso.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ e Laboratório de Pesquisa Keizo Asami (LIKA/UFPE), por abrirem suas portas para o desenvolvimento de parte da minha pesquisa.

Aos meus pais José Luiz da Cunha (*in memoriam*) e Aurora Magliano da Cunha por todos os esforços que sempre empregaram em suas existências para proporcionar-me uma vida com amor, dignidade, carinho e respeito.

A minha irmã Bianca Simonetti Magliano pelo carinho e auxílio dispensados a mim.

A Lídia Alencar, namorada que tanto amo, por partilhar comigo todos os momentos vivenciados nesses últimos tempos, o meu muito obrigado.

Aos meus parentes por todo o carinho e incentivo.

Aos meus orientadores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, Valéria Wanderley Teixeira e Auristela Correia de Albuquerque por todo respeito, carinho, amizade e profissionalismo compartilhados comigo durante os nossos seis anos de convivência.

Aos amigos Marco Aurélio Paes e Laurici Pires pela sincera amizade e constante disposição em colaborar comigo.



A todos os amigos do Laboratório de Histologia que sempre demonstraram um espírito de colaboração e fraternidade, mantendo um ambiente salutar e alegre para a realização dos nossos trabalhos.

Meus agradecimentos especiais aos estagiários Paulo Estevão (Sr. Burns), Andresa Cristina, Lílian Maria e Ana Janaína, pela grandiosa ajuda na realização desde trabalho.

Aos pesquisadores Fábio Brayner e Luiz Carlos Alves por toda atenção, respeito e principalmente amizade, construídas ao longo do desenvolvimento da pesquisa. As mestrandas Helena Rocha e Marília Gabriela, aos estagiários Fernando Caldeira, Fabiana Lira, Gabriela Brito, Sílvia Cabral aos técnicos Rafael Padilha, Sérgio Santos, Raimundo Pimentel, Fábria Melo e Rodrigo Martins, pela colaboração no preparo das amostras para a microscopia eletrônica, bem como todo conhecimento compartilhado, além da amizade desenvolvida.

Ao professor Jorge Braz Torres pela consultoria estatística e amizade desenvolvida.

Ao professor Antônio F. de Souza Leão Veiga pela ajuda na coleta e manutenção dos insetos.

A todos os colegas de turma e professores do programa de pós-graduação o meu muitíssimo obrigado por toda a experiência profissional e de vida adquirida ao longo do curso.

## SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS.....	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO.....	01
LITERATURA CITADA.....	05
2 CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE OPERÁRIOS DE <i>Nasutitermes     coxipoensis</i> (HOLMGREN) E AVALIAÇÃO HEMOCITÁRIA APÓS PARASITISMO POR <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROKIN .....	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
AGRADECIMENTOS.....	20
LITERATURA CITADA.....	20
3 HISTOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE OPERÁRIOS DE <i>Nasutitermes     coxipoensis</i> (HOLMGREN) (ISOPTERA:TERMITIDAE).....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

AGRADECIMENTOS.....39

LITERATURA CITADA.....39

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

Os cupins são insetos que apresentam uma ampla distribuição geográfica com grande diversidade e abundância de indivíduos, que os tornam importantes para os ecossistemas, pois devido ao seu hábito alimentar, participam ativamente, junto às formigas, na decomposição da matéria orgânica vegetal e como consumidores primários (Donovan *et al.* 2000).

Na América do Sul foram registradas cerca de 400 espécies de cupins, as quais estão distribuídas nas seguintes famílias: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Termopsidae e Termitidae. Os Termitidae perfazem cerca de 54% e são dominantes em abundância e diversidade (Constantino 1999).

Devido ao hábito alimentar variado dos cupins, as características do tubo digestivo dos operários e pseudo-operários são normalmente utilizadas em sistemática e filogenia, e podem ser detectáveis em nível de microscopia óptica de luz e eletrônica (Oliveira *et al.* 1988, Godoy 2004). Segundo Gonçalves (1979) e Noirot (1995), a anatomia do tubo digestivo dos cupins da família Termitidae apresenta-se bastante variada quando comparada aos chamados cupins inferiores.

O forte impacto causado pelas constantes expansões das fronteiras agrícolas e a facilidade de transporte de produtos entre muitas áreas tem favorecido o aumento do número de espécies de cupins que passam ao status de pragas, tanto urbanas quanto agrícolas (Fontes 1995, Vasconcellos *et al.* 2002). Assim, cerca de 10% das espécies de cupins tem sido apontada como agente de algum tipo de dano às plantas (Edwards & Mill 1986, Constantino 2002).

Segundo Novaretti & Fontes (1998), as culturas da cana de açúcar, arroz e eucalipto são as mais atingidas pelos cupins na América do Sul. Esses autores registram ainda que plantios de

café, milho, algodão e fruteiras podem ser atacadas por esses insetos. No Brasil, os cupins têm sido responsáveis pela redução da produção canavieira, algo em torno de 10 t/ha ao ano. Deste modo, os cupins representam uma das mais sérias pragas da cana-de-açúcar no país (Constantino 2002).

Como conseqüências diretas da ação dos cupins à cana-de-açúcar, podemos relacionar danos aos novos toletes utilizados no plantio, no tecido parenquimatoso e nas gemas (Pizano 1995). Nesta cultura, Miranda *et al.* (2004) identificaram a ocorrência das espécies *Arminitermes nordestinus* Melo & Fontes, *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren, *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) e *Syntermes nanus* Constantino.

A espécie *N. coxipoensis* pertence à Família Termitidae. O gênero *Nasutitermes* caracteriza-se por apresentar soldados com cápsula cefálica arredondada com coloração marrom-escuro e tubo frontal (nasu) cônico, largo na base e mandíbulas atrofiadas. O tórax apresenta seu primeiro segmento com uma protuberância em forma de cela. O abdome compõe-se de 10 segmentos. Outras duas castas são encontradas na composição dos ninhos dessa espécie: os reprodutores de primeira ordem, representada pelo rei e rainha, os reprodutores de segunda ordem ou neotênicos, os quais serão responsáveis pela formação de novas colônias, e os operários. Esses últimos desempenhando papel na ampliação e manutenção do cupinzeiro, além de exercer cuidados com as ninfas, promovendo a alimentação das demais castas e os processos de assepsia (Fontes 1995, Constantino 1999).

O uso de inseticidas químicos como fipronil (Regent<sup>®</sup>) e imidacloprid (Confidor 700 GrDA), por exemplo, apresentam-se como um recurso eficiente no controle dos cupins, no entanto, essas moléculas ainda deixam resíduos no solo (Campos *et al.* 1998). Esse fato induz uma busca constante e de forma global, por agentes de controle ou técnicas de manejo alternativo,

com efeitos mais específicos e menos nocivos ao ambiente para o uso nos agrossistemas (Martius 1998).

A utilização de agentes entomopatogênicos como os fungos são de grande viabilidade, pois seu alto potencial de controle em diversas ordens de insetos é mundialmente conhecido e mesmo utilizado em altas concentrações, ainda assim, evitam desequilíbrios biológicos de importância nos sistemas ecológicos, mantendo as populações de parasitóides, predadores e polinizadores nesses ambientes, colocando-os deste modo como importante estratégia de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Pereira *et al.* 1998, Alves 1992, Neves *et al.* 2001).

Em Isoptera, o primeiro registro de parasitismo por fungos foi feito por Tate (1928) que observou e descreveu os gêneros dos fungos *Ectomyces* e *Termitaria* e segundo Alves & Pereira (1998) os fungos entomopatogênicos causam distúrbios fisiológicos, que refletem alterações no tegumento, sistema circulatório, sistema reprodutor, sistema respiratório, sistema digestivo e sistema nervoso. Dentre os fungos utilizados no controle biológico de insetos podemos destacar *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorokin que pertence ao grupo dos Anamorfo, e que segundo Kendrik (1992) é de onde derivam à maioria dos entomopatógenos.

No que se refere à patogenicidade nos cupins, Albuquerque *et al.* (2005) demonstraram que a ação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* sobre *N. coxipoensis* em laboratório é eficiente, com mortalidade de 95,7% ( $0,5 \times 10^6$  conídios/mL) e 88,8% ( $1,8 \times 10^6$  conídios/mL), respectivamente, demonstrando que *M. anisopliae* var. *anisopliae* possui maior potencial para controle deste cupim. Sun *et al.* (2002), analisando a esporulação de *M. anisopliae* sobre *Coptotermes formosanus* Shiraki em laboratório, concluíram que este fungo apresentou uma rápida esporulação, o que é vantajoso devido ao comportamento social destes insetos, que segundo Neves & Alves (1999) promovem um eficiente processo asséptico dos indivíduos.

A constante competição dos insetos com uma grande variedade de patógenos, favoreceu o desenvolvimento de um complexo e eficiente sistema imunológico inato, o qual difere aparentemente do sistema imunológico adaptativo dos vertebrados por não haver evidência para mecanismos de memória imunológica (Hoffmann *et al.* 1996, Medzhitov & Janeway Jr 1997). Sabe-se que a primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e o mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos microrganismos. Ocorrendo a quebra dessas barreiras, reações imunológicas começam a ser desencadeadas (Søndergaard 1993, Gallo *et al.* 2002).

A literatura cita ainda que em alguns casos a baixa velocidade de mortalidade promovida por alguns isolados ou pela baixa concentração do fungo, torna-se um inconveniente para uso no controle biológico, pois nas relações entre patógeno/hospedeiro os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa disparam reações de defesa dos hemócitos, na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar seu desenvolvimento. Estudos sobre esses mecanismos podem sugerir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle de pragas (Gunnarsson & Lackie 1985, Alves & Pereira 1998).

Os aspectos ligados às reações imunológicas dos insetos promovidos pelas interações com fungos entomopatogênicos, permanecem ainda bastantes escassos, principalmente ao que tange as reações imunes deflagradas pelos hemócitos, células que circulam livremente pela hemolinfa dos insetos, responsáveis pelos processos de fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento, coagulação e citotoxicidade (Vey & Götz 1986). Deste modo, o conhecimento dos mecanismos imunes apresenta uma importância muito grande, pois os distúrbios causados nesses podem ser sugeridos para o controle biológico de insetos vetores e pragas (Brunham *et al.* 1993).

Assim, a presente pesquisa visou: 1. identificar e caracterizar a morfologia e ultra-estrutura dos hemócitos de operários do cupim *N. coxiopensis*; 2. ampliar as informações sobre as reações

imunológicas dos hemócitos quando desafiados imunologicamente por *M. anisopliae* e 3. descrever a histologia do canal alimentar, visando contribuir com informações que possam ser utilizadas na sistemática desse inseto.

### Literatura Citada

- Alves, S.B. 1992.** Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 77-86
- Alves, S.B & R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p39-52. In: S.B. Alves (ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- Albuquerque, A.C., K.C.A. Pereira, F.M. Cunha, A.F.S.L. Veiga, A.C.R. Athayde & E.A.L.A. Lima. 2005.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren)(Isoptera:Termitidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 585-592.
- Brunham, R.C., F.A. Plummer & R.S. Stephens. 1993.** Bacterial antigenic variation, host immune response and pathogen-host coevolution. *Infect. Immun.* 61: 2273–2276.
- Campos, M.B.S., S.B. Alves & N. Macedo. 1998.** Seleção de iscas celulósicas para o cupim *Heterotermes tenuis* (Isoptera:Rhinotermitidae) em cultura de cana-de-açúcar. *Sci. Agric.* 55: 480-484.
- Constantino, R. 1999.** Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta:Isoptera) que ocorrem no Brasil. *Pap. Avulsos Zool.* 40:387-448.
- Constantino, R. 2002.** The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *J. Appl. Ent.* 126: 355-365.
- Donovan, S.E., D.T. Jones, W.A. Sands & P. Eggleton. 2000.** Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 467-513.



- Edwards, R & A. Mill. 1986.** Termite in buildings – their biology and control, East Grinstead, Rentokil Ltd., 263p.
- Fontes, L.R. 1995.** Cupins em áreas urbanas, p11-17. In: E. Berti Filho (ed.), Alguns aspectos atuais da Biologia e Controle de Cupins. Piracicaba, FEALQ. 512p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Batista. E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.D. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia Agrícola. Piracicaba, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 920p.
- Godoy, M.C. 2004.** Gut structure of two species of the Neotropical genus *Tauritermes* Krishna (Isoptera: Kalotermitidae). Neotrop. Entomol. 33:163-167.
- Gonçalves, S. de I. 1979.** Anatomia do tubo digestivo de *Rugitermes niger* Oliveira, 1979 (Isoptera:Kalotermitidae). Rev. Bras. Entom. 23:229-243.
- Gunnarsson, S.G.S. & A.M. Lackie. 1985.** Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. J. Invert. Pathol. 46: 312-319.
- Hoffmann, J.A., J.M. Reichhart & C. Hetru. 1996.** Innate immunity in higher insects. C. Curr. Opin. Immunol. 8:8-13.
- Kendrick, W.B. 1992.** The systematics of hyphomycetes. In: G.T.Cole & W.B.Kendrick. Biology of conidial fungi. New York: Academic Press, v 1, 406p.
- Martius, C. 1998.** Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). Rev. Bras. entomol. 41:179-194.
- Medzhitov, R. & C.A. Janeway Jr. 1997.** Innate Immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 91: 295-298.

- Miranda, C.S., A.Vasconcellos & A.G.Bandeira. 2004.** Termites in sugar cane in Northeast Brazil: ecology aspects and pest status. *Neotrop. Entomol.* 33: 237-241.
- Neves, P.J. & S.B. Alves. 1999.** Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar,1832) (Isoptera:Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beuveria bassiana* e Imidacloprid. *Sci Agric.* 56: 305-311.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungo with neonicotinoid inseticides. *Neotrop. Entomol.* 30:263-268.
- Noirot, C. 1995.** The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. I Lower termites. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 31: 197-226.
- Novaretti, W.R.T. & L.R. Fontes. 1998.** Cupins:Uma grande ameaça à cana-de-açúcar no nordeste do Brasil, p.163-171. In. L.R.Fontes, E, Berti Filho, Cupins: O desafio do conhecimento. Piracicaba FEALQ/USP. 512 p.
- Oliveira, G. M. F.; C. da Cruz-Landrim, C. & A.M. Costa-Leonardo. 1988.** Ultra-estrutura comparada do mesêntero em três espécies de térmitas. *Rev. Brasil. Biol.* 48: 289-298.
- Pereira, R.M., S.B. Alves, D.R. Sosa-Gómez & N. Macedo. 1998.** Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas, p.1097-1118. In: S.B. Alves (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- Pizano, M.A. 1995.** Controle de cupins de cana-de-açúcar, p.115-120. In: E. Berti Filho. Alguns aspectos atuais da Biologia e Controle de Cupins. Piracicaba, FEALQ.183 p.
- Søndergaard, L. 1993.** Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.* 9:193.
- Sun, J., J.R. Fuxa & G. Henderson. 2002.** Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beuveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *J. Invert. Pathol.* 81:78-85.

**Tate, P. 1928.** Notes on the genera *Ectomyces* and *Termitaria*, fungi parasitic on termites. *Parasitology* 20: 77-78.

**Vasconcellos, A., A.G. Bandeira, C.S. Miranda & M.P. Silva. 2002.** Termites (Isoptera) pests in buildings in João Pessoa, Brazil. *Sociobiology* 40: 639-644.

**Vey, A & P. Götz. 1986.** Antifungal cellular defense mechanisms in insects, p. 89-115. In, A.P. Gupta (Ed.) *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*. John Wiley & Sons, Inc, 550p.

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE OPERÁRIOS DE *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) E AVALIAÇÃO HEMOCITÁRIA APÓS PARASITISMO POR *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

FRANKLIN M. CUNHA<sup>1</sup>, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA<sup>1</sup>, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA<sup>2</sup>,  
AURISTELA C. ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, LUIZ C. ALVES<sup>3</sup> E ELZA A. LUNA-ALVES LIMA<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

<sup>3</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, Av. Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, PE.

<sup>4</sup> Laboratório de Controle Biológico, Departamento de Micologia/CCB, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves Cidade Universitária, s/n, 50670-420, Recife, PE.

---

Cunha, F. M.; V. Wanderley-Teixeira, A. A. C. Teixeira, A. C. Albuquerque, L. C. Alves & E. A. Luna-Alves Lima. Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Micron.

RESUMO – Os insetos estão constantemente competindo com diferentes patógenos, o que favoreceu o desenvolvimento de um complexo e eficiente sistema imunológico inato. Esses mecanismos apresentam grande importância, pois os distúrbios causados podem ser utilizados para o controle biológico de insetos. Esta pesquisa teve como objetivos identificar e caracterizar a morfologia e ultra-estrutura dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (i); determinar os tempos letais de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre *N. coxipoensis* nas concentrações de  $10^3$  a  $10^7$  conídios/mL (ii) e; analisar a dinâmica hemocitária quando imunologicamente desafiados pelo fungo em condições de laboratório, nos intervalos de 24h, 48h e 72h (iii). A análise em microscopia de luz e eletrônica revelou a presença dos seguintes tipos celulares: Plasmatócitos (PL), Granulócitos (GR), Esferulócitos (ES), Prohemócitos (PR), Adipohemócitos (AD) e Oenocitóides (OE). A concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL causou mortalidade mais rápida dos cupins com  $TL_{50}$  de 1,62 dias. As células mais frequentes foram os Plasmatócitos e os Granulócitos para os tratamentos nos diferentes intervalos de tempo. Em relação à dinâmica hemocitária notou-se redução significativa dos Plasmatócitos e aumento dos Granulócitos após 72h do tratamento. Durante a contagem diferencial não foram evidenciadas alterações na morfologia dessas células. Assim, a utilização do método de aplicação por pulverização na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL, em laboratório, mostrou-se eficiente contra os mecanismos de defesa de *N. coxipoensis*.

PALAVRAS-CHAVE: Isoptera, *Nasutitermes coxipoensis*, dinâmica hemocitária, ultra-estrutura, *Metarhizium anisopliae*

CHARACTERIZATION OF HEMOCYTES IN *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren)  
WORKERS AND HEMOCYTARY DYNAMICS AFTER PARASITISM BY *Metarhizium*  
*anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

ABSTRACT - The insects are constantly competing with a great variety of pathogens, what favored the development of a complex and efficient innate immunologic system. These mechanisms are of great importance to the insects; therefore any disorder caused can be explored into biological control purpose. Thus, this research had three major objective: to identify and to characterize the morphology and ultrastructure of hemocytes of *Nasutitermes nasutitermes* (Holmgren) workers (i); to determine the lethal times of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on *N. coxipoensis* using concentrations from  $10^3$  to  $10^7$  conidia/mL (ii) and; to analyze the hemocytary dynamics when imunological challenged by fungus in conditions of laboratory during the intervals of 24h, 48h and 72h (iii). Analysis using light and electronics microscopy typified the existence of the following cells: Plamatocytes (PL), Granulocytes (GR.), Spherulocytes (ES), Prohemocytes (PR), Adipohemocytes (AD) and Eonocytoids (OE). The concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL caused the fastest mortality with 1.6 dyas for  $LT_{50}$ . The cells Plasmatocytes and Granulocytes were most frequent during the evaluation intervals from 24 to 72h. The hemocytary dynamics showed significant reduction of Plasmatocytes and increase of Granulocytes at 72h after application. During cells counting no alterations in the morphology of these cells were evidenced. The use of spraying as the method of application of *M. anisopliae* in the concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL, in laboratory, triggered the defense's mechanisms of *N. coxipoensis*.

KEY WORDS: Isoptera, *Nasutitermes coxipoensis*, hemocytary dynamic, ultrastructure, *Metarhizium anisopliae*

## Introdução

Os insetos estão constantemente competindo com uma grande variedade de patógenos. Este contato favoreceu o desenvolvimento de um complexo e eficiente sistema imunológico inato, o qual difere aparentemente do sistema imunológico adaptativo dos vertebrados por não haver evidência para mecanismos de memória imunológica (Hoffmann *et al.* 1996, Medzhitov & Janeway Jr 1997). De acordo Søndergaard (1993) e Gallo *et al.* (2002), a primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e o mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos microrganismos. Ocorrendo a quebra dessas barreiras, reações imunológicas começam a ser desencadeadas.

O sistema imunológico dos insetos caracteriza-se por mediar dois tipos de reações contra agentes estranhos. A primeira é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos, ocorrendo sem a participação direta dos hemócitos, células que circulam livremente na hemolinfa dos insetos, sendo denominada de reação humoral (Vilmos & Kurucz 1998). O segundo meio de defesa são as reações mediadas pelos hemócitos, sendo conhecidas como reação celular (Silva 2002). Essas células apresentam morfologia e função variada, desempenhando ações como fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Barracco & Menezes 1984, Lavine & Strand 2002).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de pesquisas sobre o funcionamento das respostas imunes tem sido focado com maior ênfase nos aspectos humorais, deixando àquelas mediadas pelos hemócitos com uma lacuna muito ampla dificultando um melhor entendimento dos mecanismos de defesa nos insetos (Lavine & Strand 2002). Como reflexo, as dificuldades de padronização na nomenclatura e identificação dos tipos de hemócitos ainda são visíveis, pois ferramentas como marcadores moleculares e microscopia eletrônica não eram empregados com frequência nesses processos (Gupta 1985, Willot *et al.* 1994).

O cupim *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera:Termitidae), é de distribuição generalizada, ocorrendo em cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil (Melo Filho 1996 e Miranda *et al.* 2004). Esta cultura é de grande importância para a economia do Estado de Pernambuco e do país. Os danos causados por esses insetos podem ser observados nos toletes utilizados para o replantio do canavial, no tecido parenquimatoso ou sistema radicular das plantas adultas, causando desta forma perdas quantitativa e qualitativa nessa cultura. Constantino (2002) relata ainda que esses insetos podem causar danos a outras culturas tais como arroz, café, milho, algodão e fruteiras.

*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é um dos fungos mais utilizados em programas de manejo integrado de pragas (MIP) como uma alternativa ao uso de inseticidas químicos, e tem demonstrado grande eficiência para a Ordem Isoptera (Alves 1998, Pereira *et al.* 1998, Neves & Alves 1999, Sun *et al.* 2002, Albuquerque *et al.* 2005). Entretanto, em alguns casos a baixa velocidade de mortalidade promovida por alguns isolados ou pela baixa concentração do fungo, torna-se um inconveniente para seu uso, pois nas relações entre patógeno/hospedeiro os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa disparam reações de defesa dos hemócitos, na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar seu desenvolvimento. Estudos sobre esses mecanismos podem sugerir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle de pragas (Gunnarsson & Lackie 1985, Alves & Pereira 1998).

O presente trabalho objetivou: 1. identificar e caracterizar a morfologia e ultra-estrutura dos hemócitos de operários de *N. coxipoensis*; 2. determinar os tempos letais de *M. anisopliae* sobre esses operários nas concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  conídios/mL e 3. analisar a dinâmica hemocitária quando imunologicamente desafiados pelo fungo em condições de laboratório, nos intervalos de 24h, 48h e 72h.



## Material e Métodos

**Obtenção dos Insetos.** Os cupinzeiros foram coletados em canavial no município de Itambé, PE e transportados para o Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram mantidos em sementeiras contendo plantios de cana-de-açúcar.

**Obtenção do Isolado.** O fungo *M. anisopliae* PL<sub>43</sub>, isolado de *Mahanarva posticata* (Stal), com número de acesso URM-3185 foi obtido da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

**Teste de Patogenicidade.** O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia da UFPE. Para a obtenção das suspensões, fungos com 12 dias de crescimento em placa de Petri foram acrescidos com 15 mL de água destilada esterilizada mais Tween 80 a 0,01%, posteriormente filtrada em gaze esterilizada e as concentrações ajustadas em 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup>, utilizando-se câmara de Neubauer. No tratamento controle, foi aplicado água destilada esterilizada mais Tween 80. Para cada tratamento foram utilizados 120 insetos, acondicionados em número de 20 indivíduos por parcela, em uma proporção de 16 operários e quatro soldados de acordo com confinamento feito por Vasconcellos (1999) em placa de Petri de 10 cm de diâmetro e forrada com papel filtro umedecido com água destilada para a manutenção da umidade. Seis repetições foram utilizadas por tratamento. A aplicação das suspensões fúngicas foi realizada através de pulverização. Diariamente a mortalidade foi avaliada e os insetos mortos transferidos para câmara incubadora BOD a 26 ± 1°C e 12h de fotofase para confirmação da morte dos insetos pelo fungo. Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos à análise de Probit e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

**Coleta da Hemolinfa para Identificação dos Hemócitos em Microscopia de Luz.** Foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

Para essa metodologia utilizou-se a técnica de perfusão descrita por Brayner *et al.* (2005). Esta consiste na utilização de um pequeno capilar de vidro contendo solução anticoagulante II (Mead *et al.* 1986) para insetos. Esse capilar foi introduzido na região abdominal de 100 operários e em seguida a hemolinfa aspirada foi depositada diretamente em lâminas de vidro, deixadas para secar em temperatura ambiente por 20 minutos, sendo a fixação das células realizada em metanol durante cinco minutos e coradas com Giemsa por quatro minutos. Posteriormente, realizou-se uma lavagem rápida das lâminas com água destilada para a retirada do excesso de corante, deixando-as secar em temperatura ambiente para posterior montagem com Entellan. A análise morfológica foi realizada utilizando-se microscópio OLYMPUS BX-49, e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

**Contagem Diferencial dos Hemócitos.** Utilizou-se a metodologia de Falleiros *et al.* (2003) modificada. 300 operários foram pulverizados com *M. anisopliae* na concentração de  $10^7$  conídios/mL, por ter apresentado menor  $TL_{50}$ . A hemolinfa foi coletada nos intervalos de 24h, 48h e 72h, também foram coletadas nos mesmo intervalos de tempo hemolinfa de 300 operários pulverizados com água esterilizada mais Tween 80 (testemunha). Os insetos estavam confinados em número de 20 por placa de Petri com dimensões de 10 cm de diâmetro forrada com papel filtro. Para cada tratamento foi realizada a avaliação de 10 lâminas, as quais continham a hemolinfa de 10 indivíduos distribuídas em pequenos poços, onde cada lâmina representou uma repetição. Em cada repetição foram contadas 300 células. A percentagem dos tipos celulares obtidos em cada repetição de todos os tratamentos foi submetido à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o ASSIST (Versão 7.3).

**Descrição Ultra-estrutural dos Hemócitos.** No Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), a hemolinfa de 300 insetos não pulverizados foi coletada por perfusão na região

abdominal, para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Assim, a hemolinfa coletada foi fixada em solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2), posteriormente o material coletado foi depositado em “ependorffs” contendo fixador durante 2h. O material foi submetido a três lavagens de 10 minutos cada com o mesmo tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 1h. Em seguida, foram efetuadas três lavagens de 10 minutos com o mesmo tampão e submetido à centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto, no final de cada lavagem. A desidratação com acetona ocorreu em banhos crescentes de 10 minutos. Após o processo de desidratação as células foram embebidas em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (UR Reichert Ultracut), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e analisado em microscópio Zeiss EM109.

## Resultados

A eficiência de *M. anisopliae* sobre os operários de *N. coxipoensis* pelo método de pulverização foi mais evidente na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL, o que pode ser verificada através dos tempos letais onde estes apresentaram uma redução em seus valores à medida que as concentrações aumentaram (Tabela 1).

A análise em microscopia de luz e eletrônica dos hemócitos de operários de *N. coxipoensis* revelou a presença dos seguintes tipos de hemócitos: Plasmatócitos (PL), Granulócitos (GR), Esferulócitos (ES), Prohemócitos (PR), Adipohemócitos (AD) e Oenocitóides (OE).

Os Plasmatócitos exibiram um polimorfismo que se caracteriza pelas formas esférica, oval ou alongada, sendo esta última à forma predominante. O núcleo apresentou-se volumoso com poucas áreas heterocromáticas e o citoplasma contendo numerosas vesículas. Foi possível visualizar nessas células prolongamentos citoplasmáticos (Figs. 1A e 2A).

Os Granulócitos apresentaram forma esférica ou oval. No seu citoplasma foram visualizados grânulos pequenos, basófilos e geralmente esféricos, os quais encobriram o núcleo tornando difícil a sua visualização. Analisando ultra-estruturalmente verificou-se que os grânulos são bastante elétron-densos e núcleo apresenta morfologia irregular (Figs. 1B e 2B).

Os Esferulócitos exibiram morfologia esférica com núcleo central, e se caracterizaram por apresentarem no seu citoplasma várias vesículas claras uniformemente distribuídas. A ultra-estrutura revelou que essas vesículas são pouco elétron-densas e que o núcleo apresenta grande área de eucromatina (Figs. 1C e 2C).

Os Prohemócitos foram bem caracterizadas por exibirem núcleos bastante volumosos, ocupando quase todo o citoplasma. No núcleo foram evidenciadas regiões com grande quantidade de heterocromatina. A morfologia dessa célula variou de esférica a oval (Figs. 1D e 2D).

Os Adipohemócitos chamaram a atenção por apresentarem numerosas gotículas lipídicas de tamanho e forma variadas ocupando quase todo o citoplasma, além de algumas mitocôndrias. O núcleo é excêntrico, com nucléolo evidente (Figs. 1E e 2E).

Os Oenocitóides foram são células de fácil identificação por serem os maiores hemócitos, apresentando morfologia esférica bastante uniforme, núcleo central e pequeno em relação ao tamanho da célula. No citoplasma os ribossomos livres foram os mais abundantes, sendo observado ainda várias vesículas e alguns grânulos (Figs. 1F e 2F).

## **Discussão**

Os seis tipos de hemócitos encontrados em *N. coxiensis*, são reportados na literatura como as células mais freqüentes na hemolinfa dos insetos, podendo ser encontradas em diferentes

ordens tais como: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattodea, Coleoptera, Hymenoptera e Hemiptera (Fenoglio *et al.* 1993, Hernandez *et al.* 1999, De Silva *et al.* 2000, Silva *et al.* 2000, Hillyer & Christensen 2002, Silva *et al.* 2002). As características morfológicas e ultra-estruturais dos hemócitos de *N. coxipoensis* são similares às descritas em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Falleiros *et al.* 2003), adultos de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (Brayner *et al.* 2005) e em *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Ling *et al.* 2003). Esses achados contribuem para uniformização dos tipos de hemócitos entre as ordens de insetos, pois segundo Hillyer & Christensen (2002) estudos morfológicos dos hemócitos são tentativas para achar um sistema de classificação que seja aplicado a todos os organismos do Filo Arthropoda ou da Classe Insecta.

Os resultados da contagem diferencial dos hemócitos de operários de *N. coxipoensis* constam na Tabela 2. Verificou-se que as células mais freqüentes na hemolinfa foram os Plasmatócitos e os Granulócitos para os tratamentos nos diferentes intervalos de tempo. Analisando a dinâmica hemocitária nos intervalos de tempo notou-se que os Plasmatócitos reduziram significativamente, enquanto que os Granulócitos aumentaram, após 72h da pulverização. Os Prohemócitos não diferiram estatisticamente nos intervalos de tempos, bem como entre os tratamentos. Já com relação aos Esferulócitos, Adipohemócitos e Oenocitóides apresentaram uma redução significativa entre os tratamentos para todos os intervalos de tempo. Devemos ressaltar ainda que na testemunha, os Plasmatócitos, Prohemócitos, Adipohemócitos e oenocitóides mostraram uma redução significativa apenas no intervalo de 48h em relação ao de 24h. Durante a contagem diferencial não foram evidenciadas alterações na morfologia dessas células.

O fato dos Plasmatócitos e Granulócitos terem sido os tipos celulares mais freqüentes, confirmam as pesquisas realizadas por Lackie (1988), Ratcliffe (1993), Strand & Pech (1995), Lavine & Strand (2002), os quais relataram que nos insetos normalmente as células Granulares e

os Plasmatócitos compreendem mais de 50% dos hemócitos circulantes, tendo a capacidade de adesão na superfície de corpos estranhos. Segundo Chain & Anderson (1983), Gunnarsson (1988), Pech & Strand (1996) e Fuguet & Vey (2004) a redução dos plasmatócitos pode está relacionada ao envolvimento dessas células no processo inicial de nodulação, enquanto que os granulócitos só participam dos estágios finais desse processo, o que justificaria o seu aumento. Esses mesmos autores sugerem ainda que o declínio dos plasmatócitos, em infecções com fungos, pode estar relacionado à sua suscetibilidade aos metabólicos secundários tóxicos produzidos por estes.

*M. anisopliae* mostrou-se bastante eficaz na diminuição dos Esferulócitos, Adipohemócitos e Oenocitóides, este fato pode ser justificado visto que essas células não têm função específica na defesa celular (Sass *et al.* 1994, Jiang *et al.* 1997, Lanot *et al.* 2001, Lavine & Strand 2002).

Moino Jr. *et al.* (2002) e Neves & Alves (2004), também, mostraram eficiência desse fungo em laboratório sobre cupins, porém utilizando concentrações de  $1 \times 10^9$  conídios/mL e  $1 \times 10^8$  conídios/mL, respectivamente. A ação desse fungo sobre operários e soldados de *N. coxipoensis* foi verificada por Albuquerque *et al.* (2005) utilizando *M. anisopliae* var. *anisopliae* isolado PL<sub>43</sub> na concentração de  $0,5 \times 10^6$  conídios/mL e *M. anisopliae* var. *acridum* isolado CG291 na concentração de  $1,8 \times 10^6$  conídios/mL, porém esses autores utilizaram o método de aplicação por contato direto dos cupins em placas contendo as culturas fúngicas. Assim sendo, os resultados mostraram que a pulverização do isolado utilizado na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL é um método eficiente em laboratório para o cupim estudado.

Assim, a utilização do método de pulverização na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL, em laboratório, mostrou-se eficiente contra os mecanismos de defesa celular de *N. coxipoensis*.

## Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e a Jorge Braz Torres (UFRPE) pela ajuda nas análises estatísticas e apreciação do artigo.

## Literatura Citada

- Alves, S.B. 1998.** Microrganismos associados a insetos, p 75-96, In S.B. Alves (Ed), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B & R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p39-52. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Albuquerque, A.C., K.C.A. Pereira, F.M. Cunha, A.F.S.L. Veiga, A.C.R. Athayde & E.A.L.A. Lima. 2005.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren)(Isoptera:Termitidae). Neotrop. Entomol. 34: 585-592.
- Barracco, M.A. & H. Menezes. 1984.** Mecanismos celulares de defesa em insetos. Cienc. Cult. 37: 237-250.
- Brayner, F.A., H.R.C. Araújo, M.G.S. Cavalcanti, L.C. Alves & C.A. Peixoto. 2005.** Ultrastructural characterization of the hemocytes os *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). Micron 36:359-367.
- Brunham, R.C., F.A. Plummer & R.S. Stephens. 1993.** Bacterial antigenic variation, host immune response and pathogen-host coevolution. Infect. Immun. 61: 2273–2276.
- Chain, B.M. & R.S. Anderson. 1983.** Inflammation in insects: the release of a plasmatocyte depletion factor following interaction between bacteria and haemocytes. J. Insect Physiol. 29: 1-4.

- Constantino, R. 2002.** The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *J. Appl. Ent.* 126: 355-365.
- De Silva, C., G.B. Dunphy & M.E. Rau. 2000.** Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Compar. Immunol.* 24:367-379.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:287-294.
- Fenoglio, C., P. Bernardini & M.V. Gervaso. 1993.** Cytochemical characterization of the hemocytes of *Leucophaea maderae* (Dictyoptera: Blaberoidea). *J. Morphol.* 218:115-126.
- Fuguet, R. & A. Vey. 2004.** Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 152-167.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Batista. E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.D. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 920p.
- Gunnarsson, S.G.S. 1988.** Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the intergument studied by scanning electron and light microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 312-319.
- Gunnarsson, S.G.S. & A.M. Lackie. 1985.** Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invert. Pathol.* 46: 312-319.



- Gupta, A.P. 1985.** Cellular elements in hemolymph, 401-451, In: G.A. Kerkut & L.I. Gilbert (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Oxyford, 849p.
- Hernandez, S., H. Lanz, M.H. Rodriguez, J.A. Torres, A. Martinez-Palomo & V. Tsutsumi. 1999.** Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimamus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* 36: 426-434.
- Hillyer, J.F. & B.M. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 117:431-440.
- Hoffmann, J.A., J.M. Reichhart & C. Hetru. 1996.** Innate immunity in higher insects. *C. Curr. Opin. Immunol.* 8:8-13.
- Jiang, H., Y. Wang, C. Ma & M.R. Kanost. 1997.** Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit PPO-pl. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 835-850.
- Lackie, A.M. 1988.** Haemocyte behaviour. *Adv. Insect Physiol.* 21: 85-178
- Lanot, R., D. Zachary, F. Holder & M. Meister. 2001.** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230:243-257.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295-1309.
- Ling, E., K. Shirai, R. Kanekatsu & K. Kiguchi. 2003.** Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining *Histochem. Cell Biol.* 120:505-511
- Mead, G.P., N.A. Ratcliffe & L.R. Renwranz. 1986.** The separation of insect hemocyte types on percoll gradients: methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32:167-177.
- Medzhitov, R. & C.A. Janeway Jr. 1997.** Innate Immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91: 295-298.

- Melo Filho, R. M. 1996.** Controle químico do cupim *Nasutitermes* (Dudley, 1890) (Isoptera:Termitidae), em cana-de-açúcar, nos Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFRPE, Recife, 100p.
- Miranda, C.S., A.Vasconcellos & A.G. Bandeira. 2004.** Termites in sugar cane in Northeast Brazil: ecology aspects and pest status. *Neotrop. Entomol.* 33: 237-241.
- Moino Jr., A., S.B. Alves, R.B. Lopes, P.M.O.J. Neves, R.M. Pereira & S.A. Vieira. 2002.** External development of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. *Sci. Agric.* 59:267-273.
- Neves, P.J. & S.B. Alves. 1999.** Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar,1832) (Isoptera:Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beuveria bassiana* e Imidacloprid. *Sci. Agric.* 56: 305-311.
- Neves, P.J. & S.B. Alves. 2004.** External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop. Entomol.* 33:51-56.
- Pech. L.L. & M.R. Strand. 1996.** Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.* 109: 2053-2060.
- Pereira, R.M., S.B. Alves, D.R. Sosa-Gómez & N. Macedo. 1998.** Utilização de entomopatógenos no Manejo Integrado de Pragas, p1097-1118. In: S.B. Alves (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- Ratcliffe, N.A. 1993.** Cellular defense responses of insects: unresolved problems. 267-303 In N.E. Beckage, S.N. Thompson & B.A. Federici. (Eds.). *Parasites and Pathogens of Insects*, vol. 1. Academic Press, San Diego. 515p.
- SAS Institute.1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

- Sass, M., A. Kiss & M. Locke. 1994.** Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.* 40: 407-421.
- Silva, C De., G.B. Dunphy & M.E. Rau. 2000.** Interaction of hemocytes and propheneloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Compar. Immunol.* 24: 367-379.
- Silva, C.C.A. da. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotechnol. Ciênc. Desenv.* 24: 68-72.
- Silva, J.E.B., I.C. Boleli & Z.L.P. Simões. 2002.** Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.* 62:689-699.
- Søndergaard, L. 1993.** Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.* 9:193.
- Strand, M.R. & L.L. Pech. 1995.** Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 31-56.
- Sun, J., J.R. Fuxa & G. Henderson. 2002.** Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beuveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *J. Invert. Pathol.* 81:78-85.
- Vasconcellos, A. 1999.** Estrutura e dinâmica de ninhos policíclicos de uma espécie de *Nasutitermes* (Isoptera:Termitidae) em Mata Atlântica e no meio urbano de João Pessoa, Paraíba. Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 84p.
- Vilmos, P. & E. Kurucz. 1998.** Insect immunity: evolucionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 62: 59-66.

**Willott, E., L.W. Thrower & M.R. Kanost. 1994.** Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eu. J. Cell. Biol.* 65:417-423.

Tabela 1. Avaliação da patogenicidade de *M. Anisopliae* sobre operários de *N. coxipoensis*, em laboratório a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h.

Fungo/ Concentração	<sup>1</sup> CL <sub>50</sub>	<sup>2</sup> TL <sub>50</sub> (Dias)	<sup>3</sup> I.C. a 95%	Equação	Gl	$\chi^2$	P
<i>M. anisopliae</i> PL <sub>43</sub>	2x10 <sup>4</sup>		(1,3x10 <sup>4</sup> ; 3x10 <sup>4</sup> ) <sup>4</sup>	Y=-3,454+0,801Log <sub>dose</sub>	3	2,30	0,5120
1 x 10 <sup>3</sup>		36,29	(22,47; 94,66) <sup>5</sup>	Y=-2,427+1,556 Log <sub>tempo</sub>	8	2,12	0,9770
1 x 10 <sup>4</sup>		12,79	(10,95; 16,03) <sup>5</sup>	Y=-2,581+2,331 Log <sub>tempo</sub>	8	1,19	0,9967
1 x 10 <sup>5</sup>		5,90	(5,41; 6,47) <sup>5</sup>	Y=-1,759+2,280 Log <sub>tempo</sub>	8	1,31	0,9953
1 x 10 <sup>6</sup>		3,48	(3,18; 3,77) <sup>5</sup>	Y=-1,429+2,638 Log <sub>tempo</sub>	8	2,50	0,9613
1 x 10 <sup>7</sup>		1,62	(1,50; 1,75) <sup>5</sup>	Y=-1,146+5,413 Log <sub>tempo</sub>	8	2,85	0,9430

<sup>1</sup>Concentração Letal; <sup>2</sup>Tempo Letal; <sup>3</sup>Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade; <sup>4</sup>Valores expressos em concentrações de conídios/mL; <sup>5</sup>Valores em dias para TL<sub>50</sub>.

Tabela 2. Médias ( $\pm$  desvio padrão) da contagem diferencial dos hemócitos de operários de *N. coxipoensis*, desafiados imunologicamente por *M. anisopliae* a  $10^7$  conídios/mL.

Tratamento	Tempo após tratamento (horas)			Estatística <sup>1</sup> <i>F<sup>P</sup></i>
	24h	48h	72h	
	<b>Plasmatócitos</b>			
Testemunha	71,46 $\pm$ 4,28 a A	55,40 $\pm$ 2,72 b A	64,43 $\pm$ 4,06 ab A	4,59 <sup>0,0192</sup>
<i>M. anisopliae</i>	75,27 $\pm$ 1,37 a A	77,20 $\pm$ 3,18 a B	64,26 $\pm$ 3,50 b A	6,02 <sup>0,0069</sup>
<i>F<sup>P</sup></i>	-	27,07 <sup>0,0005</sup>	-	
	<b>Granulócitos</b>			
Testemunha	14,00 $\pm$ 2,32 a A	20,80 $\pm$ 1,53 a A	17,40 $\pm$ 2,28 a A	- <sup>2</sup>
<i>M. anisopliae</i>	13,47 $\pm$ 1,77 a A	11,73 $\pm$ 2,56 a B	24,66 $\pm$ 3,72 b A	6,25 <sup>0,0059</sup>
<i>F<sup>P</sup></i>	-	9,20 <sup>0,0072</sup>	-	
	<b>Prohemócitos</b>			
Testemunha	8,13 $\pm$ 1,34 a A	12,33 $\pm$ 0,79 b A	9,76 $\pm$ 1,01 ab A	3,87 <sup>0,0334</sup>
<i>M. anisopliae</i>	10,60 $\pm$ 1,08 a A	11,00 $\pm$ 1,86 a A	11,23 $\pm$ 1,46 a A	-
<i>F<sup>P</sup></i>	-	-	-	
	<b>Esferulócitos</b>			
Testemunha	3,86 $\pm$ 1,22 a A	5,50 $\pm$ 0,93 a A	4,00 $\pm$ 0,66 a A	-
<i>M. anisopliae</i>	0,20 $\pm$ 0,20 a B	0,00 a B	0,00 a B	-
<i>F<sup>P</sup></i>	8,73 <sup>0,0085</sup>	34,84 <sup>0,0001</sup>	36,17 <sup>0,0001</sup>	
	<b>Adipohemócitos</b>			
Testemunha	1,83 $\pm$ 0,45 a A	3,90 $\pm$ 0,36 b A	3,10 $\pm$ 0,61 ab A	4,56 <sup>0,0197</sup>
<i>M. anisopliae</i>	0,03 $\pm$ 0,03 a B	0,00 a B	0,00 a B	-
<i>F; P</i>	15,62 <sup>0,0009</sup>	114,15 <sup>3,1958</sup>	25,57 <sup>0,0008</sup>	
	<b>Oenocitóides</b>			
Testemunha	0,70 $\pm$ 0,17 a A	2,16 $\pm$ 0,37 b A	1,56 $\pm$ 0,34 ab A	5,73 <sup>0,0084</sup>
<i>M. anisopliae</i>	0,03 $\pm$ 0,33 a B	0,00 a B	0,00 a B	-
<i>F<sup>P</sup></i>	15,04 <sup>0,0011</sup>	33,79 <sup>0,0001</sup>	20,62 <sup>0,0003</sup>	

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

<sup>2</sup>Resultados não significativos pela ANOVA.

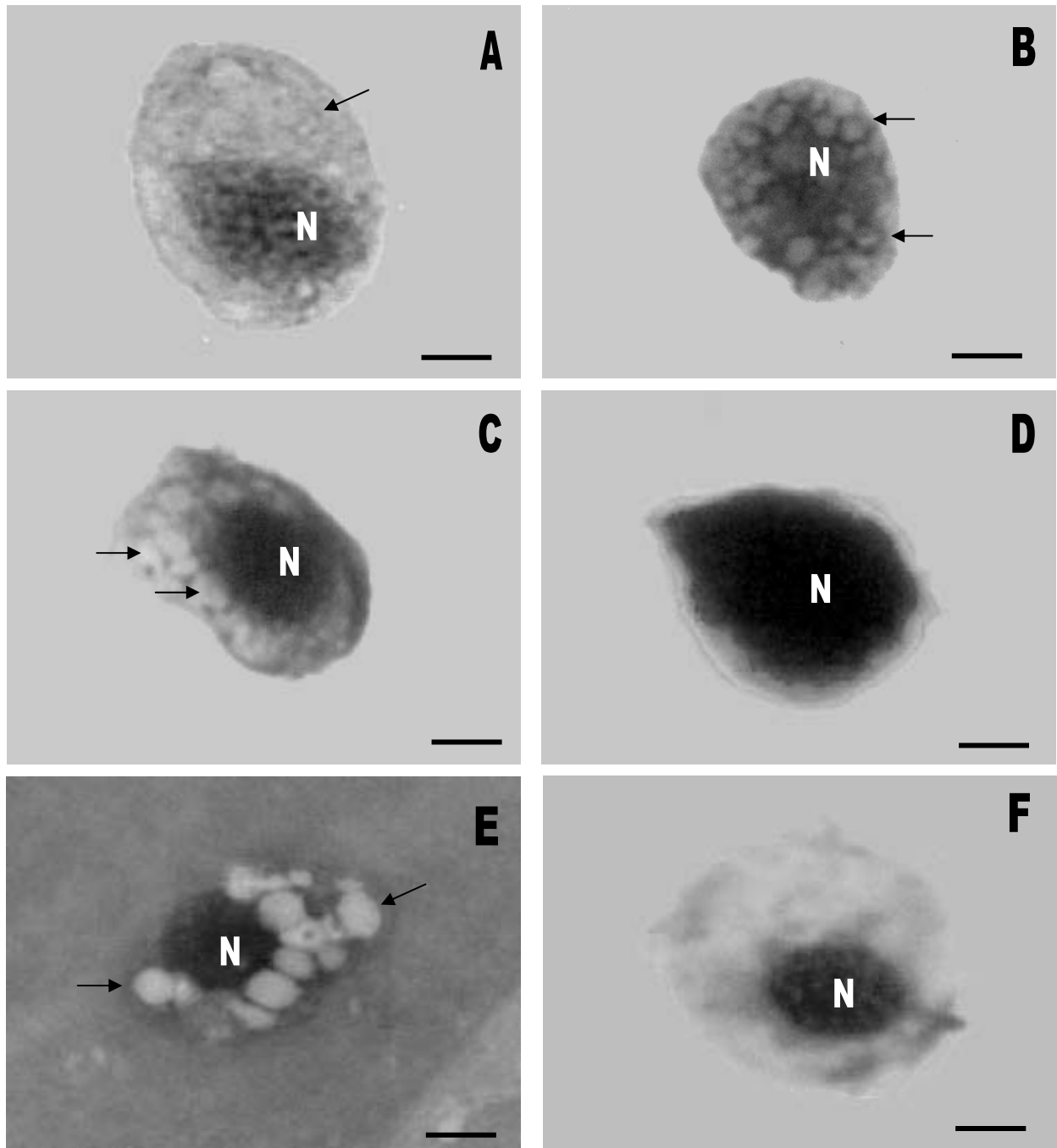


Fig. 1. Hemócitos de *N. coxipoensis*. Plasmatócito (A) exibindo um citoplasma hialino (seta) com núcleo (N) grande e pouco heterocromático. Granulócito (B) grande quantidade de grânulos irregulares no citoplasma (setas) chegando a encobrir quase todo o núcleo (N). Esferulócito (C) com várias vesículas (setas) dispostas em torno do núcleo (N). Prohemócito (D) apresentando núcleo volumoso (N) e escasso citoplasma. Adipohemócito (E) exibindo várias gotículas de lipídios dispostas irregularmente no citoplasma (setas) próximas ao núcleo (N). Oenocitóide (F) caracterizado pelo seu tamanho volumoso e forma esférica com núcleo pequeno e excêntrico (N). Barras =10 $\mu$ m.

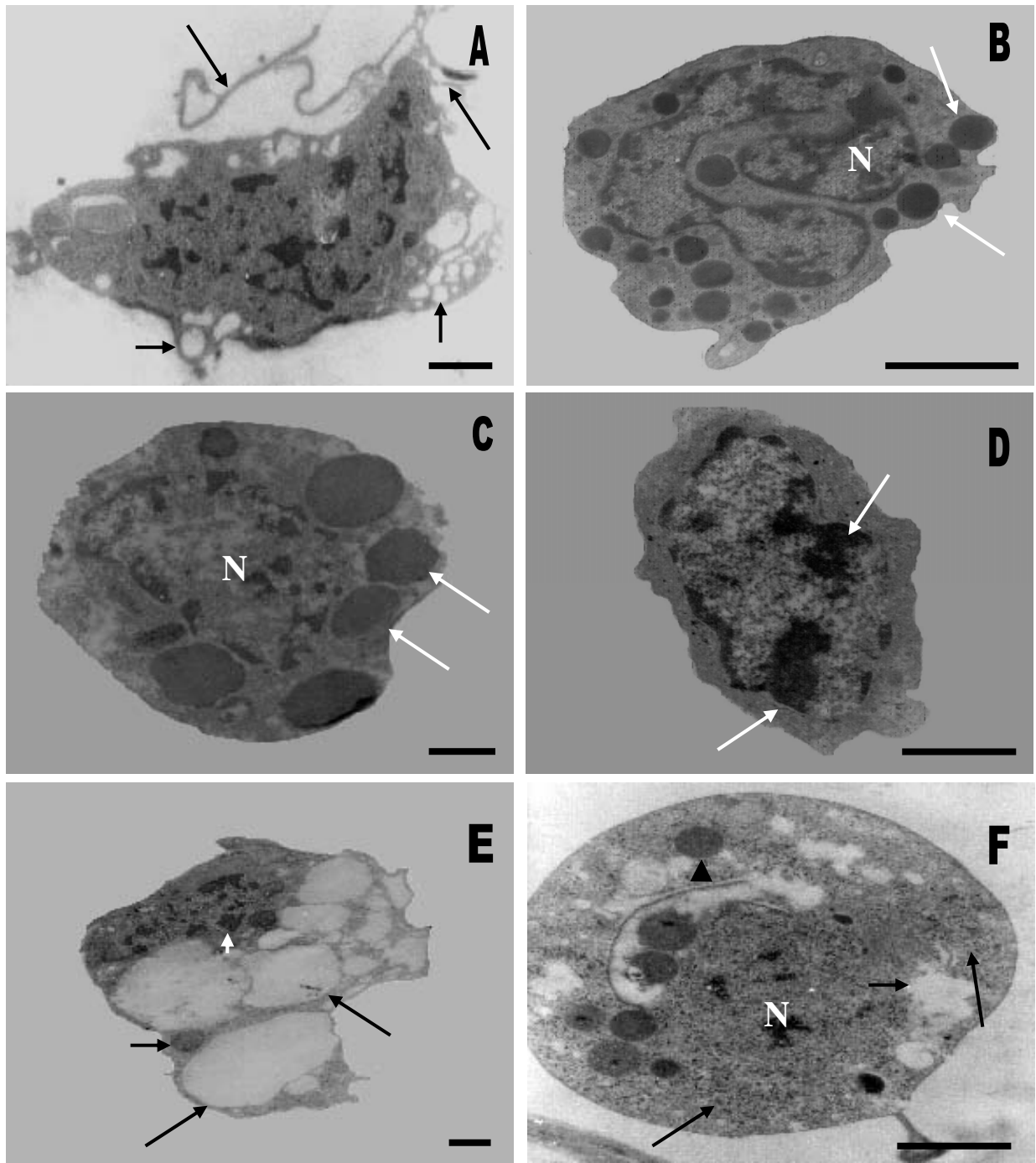


Fig. 2. Ultra-estrutura dos hemócitos de *N. coxipoensis*. Plasmatócito (A) célula com prologamentos citoplasmáticos (setas longas) e numerosas vesículas (setas curtas). Granulócito (B) grânulos elétron-densos (setas) e núcleo de morfologia irregular (N). Esferulócito (C) vesículas pouco elétron-densas (setas) e núcleo eucromático (N). Prohemócito (D) núcleo apresentando regiões com grande quantidade de heterocromatina (setas). Adipohemócito (E) gotículas lipídicas no citoplasma (setas longas), mitocôndrias (seta curta) e núcleo com nucléolo evidente (ponta de seta). Oenocitóide (F) citoplasma com numerosos ribossomos livres (setas longas), várias vesículas (setas curtas), alguns grânulos pouco-elétron-densos (ponta de setas) e núcleo pequeno (N). Barras =1µm.



### CAPÍTULO 3

#### HISTOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE OPERÁRIOS DE *Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

FRANKLIN M. CUNHA<sup>1</sup>, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA<sup>1</sup>, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA<sup>2</sup>,  
AURISTELA C. ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, LUIZ C. ALVES<sup>3</sup> E FÁBIO A. BRAYNER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, UFRPE, Av. Dom Manoel de  
Medeiros s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros  
s/n, Dois Irmãos , 52171-900, Recife, PE.

<sup>3</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, Av. Moraes Rego s/n, 50670-  
420, Recife, PE.

---

Cunha, F. M.; V. Wanderley-Teixeira, A. A. C. Teixeira, A. C. Albuquerque, L. C. Alves & F. A. B. Santos. Histologia do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). Arquivos do Instituto Biológico.

RESUMO – Em Isoptera as características do tubo digestivo dos operários e pseudo-operários são normalmente utilizadas em sistemática e filogenia. Pesquisas têm confirmado o valor do modelo espiral e morfologia do tubo digestivo dos operários para a sistemática em cupins superiores, principalmente na família Termitidae. Assim, a presente pesquisa teve o objetivo de realizar a descrição histológica do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) por meio da microscopia de luz, visando obter informações que contribuam para sistemática desse gênero. Operários de *N. coxipoensis* foram imobilizados a baixa temperatura (-4°C) para a retirada do canal alimentar, o qual foi fixado em Boüin aquoso por 24h, incluído em “paraplast”, e os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina (H-E) e Tricrômico de Mallory. Os resultados mostraram que as características histológicas do canal alimentar de operários de *N. coxipoensis*, de modo geral, foram semelhantes as observadas em várias espécies de cupins, porém foram evidenciadas diferenças na morfologia das células epiteliais e tipos de dobras na região do estomodeu, na disposição e número dos ninhos, bem como a presença da membrana peritrófica na região do mesêntero. Assim essas características podem ser utilizadas como critérios para a diferenciação entre as espécies de cupins do gênero *Nasutitermes*.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemática, cupins, morfologia, operários

## HISTOLOGY OF THE WORKERS DIGESTIVE TRACT IN *Nasutitermes coxipoensis*

(HOLMGREN) (ISOPTERA: TERMITIDAE)

ABSTRACT – Histological characteristics of the termites workers and pseudo-workers digestive tract are used for systematic and phylogeny studies. Research has confirmed the value of the workers spiral digestive tract model and its morphology for systematic in higher termite, mainly in Termitidae. Thus, this research was carried out describing *Nasutitermes coxipoensis* workers digestive tract through light microscopy. Workers of *N. coxipoensis* were immobilized at low temperature (-4°C) to the extraction the food channel, which was fixed in liquid Bouin for 24h, embedding in “ paraplant”, and the cuts were staining by Hematoxylin – Eosin (H-E) and trichrome of Mallory. Overall, the histological characteristics found for *N. coxipoensis* digestive tract were consistent with those described in several species of termites endorsing the method applied. However, this study found differences on morphology of epithelial cells and on the types of epithelium folds in the region of stomodeum regarding the displaying and the numbers of nests, as well as the presence of peritrophic membrane in the mesenterum region. Therefore, these characteristics may be used as characters to differentiate species among termites of the genus *Nasutitermes*.

KEY WORDS: Systematic, termites, morphology, workers

## Introdução

A maioria dos cupins apresenta hábito alimentar herbívoro, em especial de material vegetal em vários estágios de decomposição (Fontes 1987, Oliveira *et al.* 1988). Porém, cerca de 10% das espécies de cupins tem sido apontada como agente de algum tipo de dano às plantas (Edwards & Mill 1986, Constantino 2002). Segundo Pizano (1995), Martius (1998), Culliney & Grace (2000), Su & Scheffrahn (2000) aproximadamente das 2.500 espécies são conhecidas no mundo e em torno de 300 são notoriamente pragas de lavouras e estruturas de madeira. Dentre estas, já foram identificados mais de 12 espécies que atacam a cana-de-açúcar, sendo para o Nordeste os gêneros *Amintermes*, *Cylindrotermes* e *Nasutitermes* os mais importantes.

No Brasil, os cupins têm sido responsáveis pela redução da produção canavieira, algo em torno de 10t/ha ao ano, assim, isso os coloca como uma das piores pragas da cana-de-açúcar , principalmente no Nordeste (Albuquerque *et al.* 2005). Nesta cultura, Miranda *et al.* (2004) identificaram a ocorrência das espécies *Amintermes nordestinus* Melo & Fontes, *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren, *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) e *Syntermes nanus* Constantino.

Costa-Leonardo (1995) menciona que o tubo digestivo dos cupins é geralmente bastante desenvolvido, ocupando grande parte do abdome, e de acordo com Oliveira *et al.* (1988) a preferência alimentar desses insetos se reflete em diferenças morfológicas no tubo digestivo que podem ser detectáveis em nível de microscopia óptica de luz e eletrônica, sendo de grande importância na sistemática, além de ser um valioso auxílio na interpretação ecológica.

Na Ordem Isoptera as características do tubo digestivo dos operários e pseudo-operários são normalmente utilizadas em sistemáticas e filogenia, e várias pesquisas têm confirmado o valor do modelo espiral e morfologia do tubo digestivo dos operários para a sistemática em cupins superiores, principalmente na família Termitidae quando comparado aos cupins inferiores como,

por exemplo, os da família Kalotermitidae, onde a anatomia é mais uniforme (Gonçalves 1979, Johnson 1979, Fontes 1992, Noirot 1995, Constantino 1998, Godoy 2004).

Fontes (1987), analisando a morfologia e configuração do tubo digestivo de cupins operários de oito gêneros (*Convexitermes*, *Atlantitermes*, *Araujotermes*, *Coatitermes*, *Subulitermes*, *Agnathotermes*, *Cyranotermes* e *Angularitermes*) da família Termitidae, observou modificações na moela, no proctodeu, na válvula entérica, na pança, no cólon e segmento mesêntero-proctodeu. No entanto, não há relatos sobre os aspectos morfológicos do tubo digestivo de cupins do gênero *Nasutitermes*.

Assim, a presente pesquisa teve o objetivo de descrever a histologia do canal alimentar de operários de *N. coxipoensis*, por meio da microscopia de luz, visando obter informações que contribuam para sistemática desse gênero.

### **Material e Métodos**

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

**Obtenção dos Insetos.** Os cupinzeiros foram coletados em canavial no município de Itambé-PE e transportados para o Departamento de Agronomia da UFRPE, onde foram mantidos em sementeiras contendo plantios de cana-de-açúcar.

**Coleta do Canal Alimentar para Análise em Microscopia de Luz.** Operários de *N. coxipoensis* foram imobilizados a baixa temperatura ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) de acordo com Gonçalves (1979) e posteriormente colocados em lâminas de vidro contendo solução fixadora de Bouïn aquoso (75 mL de solução saturada de ácido pícrico, 25 mL de formaldeído, e 5 mL ácido acético). Utilizando-se pinça, lâminas de bisturi e esteromicroscópio (QUIMIS – modelo 1069), a cabeça do cupim foi decapitada, tomando-se cuidado para preservação da faringe. Em seguida, foi feita a remoção dos

dois últimos segmentos abdominais para facilitar a extração do canal alimentar que foi puxado cuidadosamente pela abertura feita no abdome. Após distender o canal alimentar o mesmo foi imerso para fixação em líquido de Bouin por um período de 24h. Para a inclusão das regiões (estomodeu, mesêntero e proctodeu) do canal alimentar, estas foram desidratadas em banhos de álcool etílico 70% (30 minutos), 90% e 100% por 10 minutos cada e diafanizadas em xilol por 10 minutos. Em seguida foram impregnados em banhos de “paraplast” diluído em xilol na proporção de 50% e 100%, durante uma hora cada, e incluídos, após o último banho. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (LEICA RM 2035) ajustado para 6 µm. Os cortes assim obtidos foram submetidos às técnicas de colorações pela Hematoxilina – Eosina (H-E) e Tricrômico de Mallory, empregando-se a metodologia descrita por Behmer *et al.* (1976), Junqueira & Junqueira (1983) e Michalany (1990). A análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

## Resultados

Histologicamente o canal alimentar dos operários de *N. coxiipoensis* apresenta as seguintes características:

**Faringe.** É revestida internamente por tecido epitelial constituído por uma única camada de células que variam de pavimentosa a colunar alta. Na superfície dessas células foi evidenciada íntima bem desenvolvida com áreas contendo espinhos ou espículas, a qual junto com o epitélio formam pequenas projeções para a luz do órgão. A faringe é envolvida por tecido muscular estriado disposto em duas camadas, onde a mais interna apresenta-se em pequenos feixes descontínuos entre si e dispostos longitudinalmente, enquanto que a camada mais externa é contínua e disposta circularmente (Fig. 1A).

**Inglúvio.** Essa região caracteriza-se por ser revestida por uma camada de epitélio simples com células colunares com núcleo elíptico, localizado na região basal e nucléolo bem evidente. A lâmina epitelial que também contém uma íntima, porém sem espícula, projeta-se para a luz do órgão formando dobras bem mais definidas em relação à faringe. Essas projeções são em torno de 13. Externamente esse órgão é revestido por uma delgada camada de tecido muscular disposta circularmente. Na base de algumas projeções nota-se a presença de fibras musculares arrançadas longitudinalmente (Fig. 1B).

**Proventrículo.** Lâmina epitelial formada por numerosas dobras longitudinais as quais variam de forma e tamanho de acordo com a região desse órgão. Nota-se na região anterior, 12 dobras maiores, intercaladas por dobras menores totalizando 24 dobras (Fig. 1C). A lâmina epitelial dessas dobras apresenta-se do tipo simples colunar, sendo revestida por uma íntima sem espícula e bastante espessa (Fig. 1D). Já na região posterior evidenciou-se apenas 12 dobras, sendo seis maiores com morfologia foliar e seis menores com morfologia piramidal (Figs. 1E e 1F). Nessas dobras é possível observar uma íntima espessa revestindo a lâmina epitelial que é do tipo simples colunar apoiado numa delgada lâmina própria. Essa lâmina própria também foi evidenciada entre as fibras musculares que reveste externamente esse órgão (Fig. 2A).

**Mesêntero.** Apresenta uma parede bastante espessa sendo constituída internamente por tecido epitelial do tipo simples, constituído por dois tipos de células: células regenerativas, agrupadas na base da lâmina epitelial e células colunares altas com microvilos (Fig. 2B). Envolvendo o material digerido verificou-se a presença da membrana peritrófica. Externamente esse órgão apresenta uma fina camada de tecido muscular disposto circularmente. Não foi evidenciada lâmina própria neste órgão (Fig. 2C). Próximo ao mesêntero observou-se tubos de Malpighi constituídos por uma camada simples de tecido epitelial (Fig. 2D).

**Proctodeu.** Na região do cólon o epitélio é recoberto por uma espessa íntima e constituído por células colunares com núcleo esférico, basal e volumoso. A lâmina epitelial apresenta evaginações digitiformes que preenche grande parte da cavidade intestinal. Externamente evidencia-se uma espessa camada muscular disposta circularmente (Fig. 2E). O reto, de forma geral, apresentou as mesmas características histológicas do cólon, exceto pela ausência de evaginações e pela presença de uma delgada camada de tecido muscular (Fig. 2F). No proctodeu não foi evidenciada lâmina própria.

### Discussão

De um modo geral a estrutura histológica do estomodeu de *N. coxipoensis* é bastante simples, sendo constituído por uma camada externa de músculo circular, algumas fibras musculares longitudinais e uma camada de tecido epitelial simples coberto pela íntima. A histologia da faringe apresentou-se semelhante às características observadas por Gonçalves (1980) para a espécie *Rugitermes niger* (Oliveira) (Isoptera: Kalotermitidae), porém diferindo com relação à morfologia das células epiteliais, onde este autor relata uma variação de achatada a cúbica para esta espécie. As características histológicas das dobras observadas no Inglúvio são semelhantes às descritas por Noirot (1995) para as seguintes famílias de cupins inferiores: Termopsidae, Hodotermitidae, Mastotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitinae. No entanto, *N. coxipoensis* apresenta uma delgada camada de tecido muscular envolvendo todo o órgão, característica esta comum nos cupins superiores (Noirot 2001). Embora, tenham sido observadas 13 dobras da lâmina epitelial nessa região, essa característica não é considerada de importância para a sistemática ou hábito alimentar desses insetos, pois vários autores relatam que essas dobras diminuem de número e se tornam menos elevadas de acordo com o volume do conteúdo alimentar ingerido (Gonçalves 1980, Noirot 2001).



No proventrículo, tanto na região anterior como na posterior, só foram evidenciadas dobras de primeira e segunda ordem, as quais modificam de forma e tamanho ao longo do órgão. Estes achados são semelhantes aos observados por Czolij *et al.* (1984) em *Mastotermes darwiniensis* (Froggatt) (Isoptera: Mastotermitidae) e por Costa-Leonardo (1995) em *Serritermes serrifer* (Hagen) (Isoptera: Serritermitidae). A estrutura apresentada pelo proventrículo está relacionada com a função e conseqüentemente com os hábitos alimentares dos cupins, assim, as espécies que se alimentam de madeira, por exemplo, necessitam de um proventrículo mais complexo que aqueles cuja alimentação baseia-se em húmus (Brune & Kühl 1996). Apesar de ser observada dobras de primeira e segunda ordem, Gonçalves (1980) relatou a presença de dobras de terceira e quarta ordem ocorrendo no proventrículo de cupins inferiores.

As descrições histológicas do mesêntero de *N. coxipoensis* são similares aos encontrados por Oliveira *et al.* (1988) ao analisarem ultra-estruturalmente o mesêntero das espécies *Rugitermes niger* (Oliveira), *Arminitermes euamignathus* (Silvestri) e *Cornitermes cumulan* (Kollar). As células regenerativas encontradas agrupadas são denominadas por Snodgrass (1993), Costa-Leonardo (1995) e Chapman (1998), de ninhos. De acordo com Gonçalves (1980) e Noirot (1995) esses ninhos em cupins inferiores são numerosos e estão bem próximos uns dos outros. No entanto, em *N. coxipoensis* os ninhos encontram-se mais afastados e em menor número. Este fato pode estar relacionado com a presença da membrana peritrófica, pois de acordo com as observações de Oliveira *et al.* (1988) essa estrutura, juntamente com secreções mucosas, pode atenuar os danos mecânicos nas células digestivas causado pelo atrito com o alimento ingerido, resultando assim numa menor taxa de renovação dessas células.

As descrições feitas para a região do proctodeu são similares às relatadas para os cupins de um modo geral (Gonçalves 1980, Costa-Leonardo 1995, Noirot 1995). Assim, a morfologia das células epiteliais e os tipos de dobras presentes na região do estomodeu, a disposição e número

dos ninhos, bem como a presença da membrana peritrófica na região do mesêntero em operários de *N. coxipoensis* podem ser utilizados como um recurso a mais para a diferenciação entre as espécies de cupins do gênero *Nasutitermes*.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e ao Profº. Antônio Fernando de Souza Leão Veiga pelo auxílio nas coletas dos cupinzeiros.

### **Literatura Citada**

- Albuquerque, A.C., K.C.A. Pereira, F.M. Cunha, A.F.S.L. Veiga, A.C.R. Athayde & E.A.L.A. Lima. 2005.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren)(Isoptera:Termitidae). Neotrop. Entomol. 34: 585-592.
- Behmer, O.A., E.M.C. Tolosa & A.G. Freitas Neto. 1976.** Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, Edart. 115p.
- Brune, A. & M. Kühl. 1996.** pH Profiles of the extremely alkaline hindguts of soil-feeding termites (Isoptera: Termitidae) determined with microelectrodes. J. Insect. Physiol. 42:1121-1127.
- Chapman, R.F. 1998.** The Insects: structure and function, 4th edn. Cambridge, Cambridge University Press, 788p.
- Costa-Leonardo, A.M. 1995.** Morphology of the digestive tube in termite *Serritermes serrifer* (ISOPTERA, SERRITERMITIDAE). Naturalia 20: 31-44.

- Constantino, R. 1998.** Catalog of the living térmites of the New World (Insect: Isoptera). Arq. Zool. 35:135-231.
- Constantino, R. 2002.** The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. J. Appl. Ent. 126: 355-365.
- Culliney, T.W. & J.K. Grace. 2000.** Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bull. Entomol. Res. 90:9-21.
- Czolij, R., M. Slaytor, P.C. Veivers & R.W.O. Brien. 1984.** Gut morphology of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae). Int J Insect Morphol Embryol. 13:337-355.
- Edwards, R. & A. Mill. 1986.** Térmite in buildings – their biology and control, East Grinstead, Rentokil Ltd., 263p.
- Fontes, L.R. 1987.** Morfology of the worker digestive tube of the soil-feeding Nasute termites (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from the Neotropical region. Rev. Bras. Zool. 3:474-501.
- Fontes, L.R. 1992.** Key to the genera of New World Apicotermitinae (Isoptera: Termitidae), p.242-248. In D.Quintero & A. Aiello (eds), Insects of Panama and Mesoamerica. Selected studies. Oxford, Oxford University Press, 692p.
- Godoy, M.C. 2004.** Gut structure of two species of the Neotropical genus *Tauritermes* Krishna (Isoptera: Kalotermitidae). Neotrop. Entomol. 33:163-167.
- Gonçalves, S. de I. 1979.** Anatomia do tubo digestivo de *Rugitermes niger* Oliveira, 1979 (Isoptera:Kalotermitidae). Rev. Bras. Entom. 23:229-243.

- Gonçalves, S. de I. 1980.** Histologia do tubo digestivo de *Rugitermes niger* Oliveira, 1979, (Isoptera:Kalotermitidae). Rev. Bras. Entom. 24: 215-226.
- Johnson, R.A. 1979.** Configuration of the digestive tube as an aid to identification of worker Termitidae (Isopeta). Syst. Entomol. 4:31-38.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. São Paulo, Editora Santos, 123p
- Martius, C. 1998.** Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). Rev. Bras. entomol. 41:179-194.
- Michalany, J. 1990.** Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo, Editora Michalany, 277p.
- Miranda, C.S., A.Vasconcellos & A.G. Bandeira. 2004.** Termites in sugar cane in Northeast Brazil: ecology aspects and pest status. Neotrop. Entomol. 33: 237-241.
- Noirot, C. 1995.** The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. I Lower termites. Ann. Soc. Entomol. Fr. 31: 197-226.
- Noirot, C. 2001.** The gut of termites (Isoptera) comparative anatomy, systematics, phylogeny. II. – Higher termites (Termitidae). Ann. Soc. Entomol. Fr. 37: 431-471.
- Oliveira, G.M.F.; C. da Cruz-Landrim, & A.M. Costa-Leonardo. 1988.** Ultra-estrutura comparada do mesêntero em três espécies de térmitas. Rev. Brasil. Biol. 48: 289-298.
- Pizano, M.A. 1995.** Controle de cupins de cana-de-açúcar, p 115-120. In: E. Berti Filho (ed), Alguns aspectos atuais da Biologia e Controle de Cupins. Piracicaba, FEALQ.183 p.
- Snodgrass, R.E. 1993.** Principles of insect morphology. 2. ed. London, Cornell University Press, 667p.

**Su, N.Y. & R.H. Scheffrahn. 2000.** Termites as pests of buildings, In: Abe, T., D.E. Bignell & M. Higashi (eds). Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 437-453.

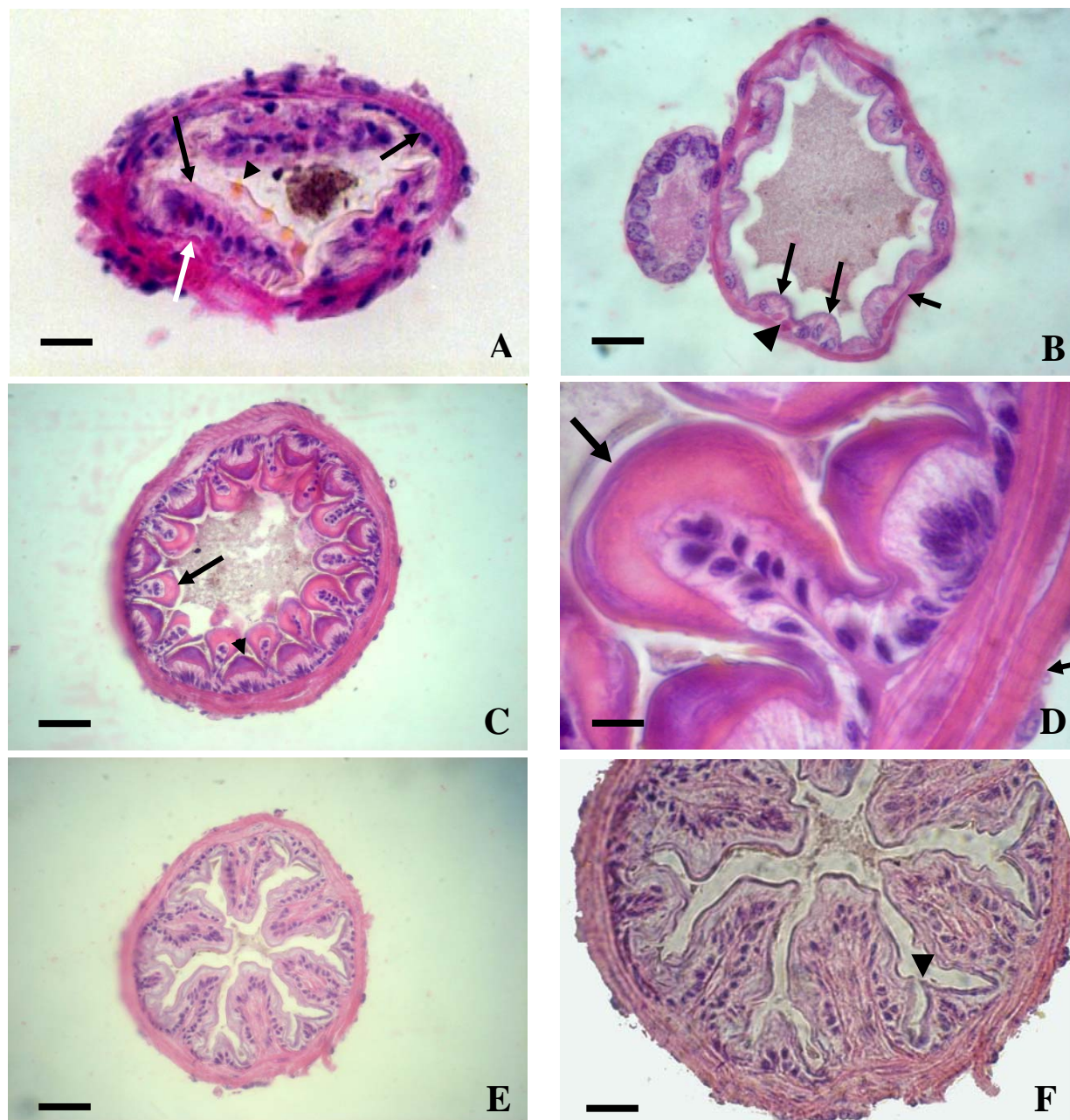


Fig. 1. (A) Faringe: epitélio com células variando de pavimentosa (seta curta) a colunar alto (seta longa), íntima com espícula (ponta de seta) e pequenos feixes de fibras musculares longitudinais na base do epitélio (seta branca). Barra 10 $\mu$ m. (B) Inglúvio: projeções do epitélio (setas longas), fibras musculares longitudinais (ponta de seta) e circulares (seta curta) Barra 400 $\mu$ m. (C) Proventrículo região anterior: dobras maiores (seta) e menores (ponta de seta) do epitélio. Barra 400 $\mu$ m. (D) Proventrículo região anterior: células colunares altas revestidas por espessa íntima (seta longa) apoiada no tecido muscular (seta curta). Barra 10 $\mu$ m. (E) Proventrículo região posterior: dobras de tamanho e forma variadas. Barra 400 $\mu$ m. (F) Proventrículo região posterior: dobras de primeira ordem (seta curta) e segunda ordem (ponta de seta). Barra 10 $\mu$ m. Coloração H-E.



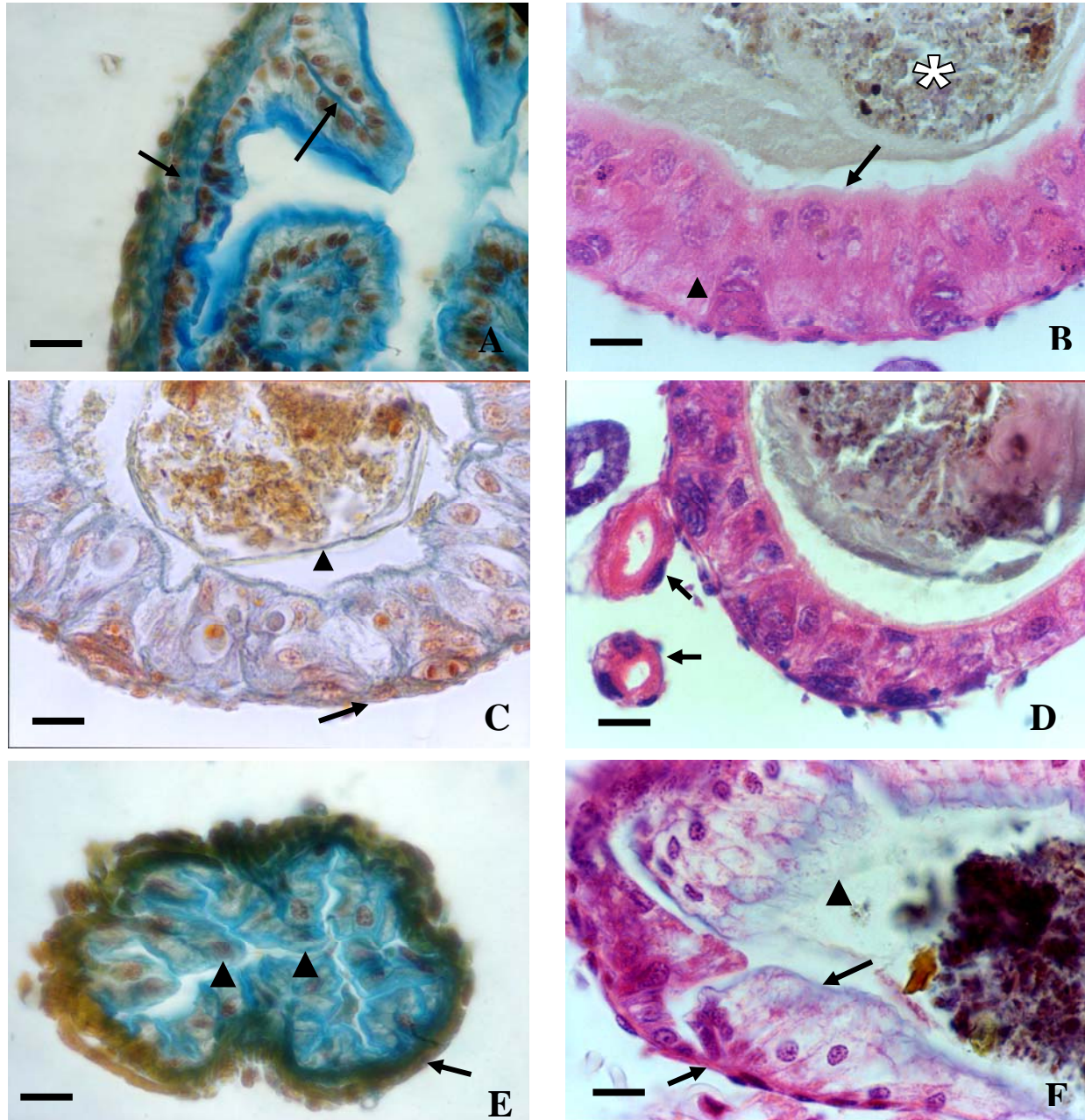


Fig. 2. (A) Proventriculo região posterior: lâmina própria delgada apoiando o epitélio (seta longa) e entre as fibras musculares (seta curta). Barra 10 $\mu$ m. Tricrômico de Mallory. (B) Mesêntero: tecido epitelial simples, com células colunares altas (seta) e células regenerativas agrupadas na base da lâmina epitelial (ponta de seta) nota-se ainda na luz do órgão presença do conteúdo alimentar (\*). Barra 400 $\mu$ m. H-E. (C) Mesêntero: membrana peritrófica (ponta de seta) e delgada camada de tecido muscular (seta). Barra 400 $\mu$ m. Tricrômico de Mallory. (D) Tubos de Malpighi associados ao mesêntero (setas). Barra 400 $\mu$ m. H-E. (E) Proctodeu região anterior: lâmina epitelial formando evaginações (pontas de seta), e espessa camada de tecido muscular estriado (seta). Barra 10 $\mu$ m. Tricrômico de Mallory. (F) Proctodeu região posterior: epitélio simples colunar (seta longa) com íntima (ponta de seta), e delgada camada muscular (seta curta). Barra 10 $\mu$ m. H-E.