

HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO E GÔNADAS DO *Anthonomus grandis* BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTO AO LUFENUROM

por

HILTON NOBRE DA COSTA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

Anthonomus grandis (Boheman), é considerada praga-chave do algodoeiro no Brasil e tem causado prejuízos econômicos. Seus hábitos alimentares e reprodutivos dificultam o seu controle, pois seu desenvolvimento ocorre no interior dos botões florais e maçãs. Seu rápido crescimento demanda o uso de inseticidas de larga escala, porém, isso tem gerado problemas de várias magnitudes. Assim, é necessário o uso de produtos com baixo impacto ambiental, se adequado ao MIP. O inseticida Match[®] (lufenurom) apresenta-se como alternativa no seu controle, em decorrência de possuir vantagens ecotoxicológicas e eficiência contra vários insetos. Testou-se a hipótese do Match[®] causar impacto na histologia, histoquímica e apoptose nas células do intestino médio, levando à consequências na gametogênese em adultos de *A. grandis*. Botões florais de algodoeiro foram imersos na calda inseticida durante 30 segundos e oferecidos aos insetos para alimentação (24 horas), a avaliação ocorreu após 24 e 120 horas para o intestino médio e 120 horas para as gônadas. No controle apenas água destilada foi usada. Os resultados mostram que o Match[®] nos dois períodos avaliados causou alterações histopatológicas como: desorganização, vacuolização e descamação do epitélio intestinal; e alterações histoquímicas, como mudanças no padrão de distribuição de carboidratos. A apoptose não foi observada, porém evidenciou-se

aumento no número de ninhos de células regenerativas. Houve redução na quantidade de espermatozoides nos testículos, e nos ovários ocorreu desorganização estrutural das células foliculares e redução de vitelo. A histoquímica das gônadas revelou redução de carboidratos nos testículos e de proteínas nos ovários em relação ao controle. Assim, conclui-se que o inibidor de síntese de quitina Match[®] provoca alterações histopatológicas e histoquímicas do epitélio do intestino médio e das gônadas de adultos de *A. grandis*, refletindo nos processos de espermatogênese e oogênese, mostrando-se uma ferramenta promissora para o controle de uma importante praga da cotonicultura.

PALAVRAS-CHAVE: Bicudo-do-algodoeiro, benzoiluréias, histofisiologia, apoptose, necrose, intestino médio, gônadas, morfometria.

HISTOCHEMICAL AND HISTOLOGY OF MIDGUT AND GONADS OF *Anthonomus grandis*
BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSED TO LUFENUROM

por

HILTON NOBRE DA COSTA

(Under the direction of Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

ABSTRACT

Anthonomus grandis (Boheman), is considered a key cotton pest in Brazil and has caused economic losses. Direct feeding and reproduction of boll weevil partially protected inside cotton fruiting structures hinder efficacious control. Most insecticides recommended for boll weevil control are of broad-spectrum resulting in problems of various magnitudes. Thus, the use of products with low environmental impact is needed, appropriate to the MIP. The Match[®] insecticide (lufenuron) is presented as an alternative in its control, due to its ecotoxicological advantages and efficiency against various insects. Thus we tested the hypothesis that lufenuron can impact the histology, immunohistochemistry and apoptosis in the midgut cells, leading to effects on gametogenesis in *A. grandis* adults. Floral buds of cotton were immersed in the insecticidal mix for 30 seconds and offered for insect feeding (24 hours), the evaluation took place after 24 and 120 hours for the midgut and 120 hours for the gonads. In control only distilled water was used. The results showed that lufenuron in both periods caused histopathological changes such as disorganization, vacuolization and sloughing of the intestinal epithelium; and histochemical changes, such as changes in carbohydrate distribution pattern. Apoptosis was not observed, but showed an increase in the number of regenerative cells nests. There was a reduction in the quantity of sperm in the testes, and ovarioles, occurred structural disorganization of

follicular cells and calf reduction. The histochemistry of gonads revealed reduction of carbohydrates in the testes and protein in ovarioles compared to control. Thus, it is concluded that the lufenuron chitin synthesis inhibitor causes histopathologic and histochemical changes of the midgut epithelium and gonad of *A. grandis* adults, reflecting in spermatogenesis and oogenesis process, proving to be a promising tool for control of an important pest of cotton culture.

KEY WORDS: Boll weevil, benzoylureas, histophysiology, apoptosis, necrosis, midgut, gonads, morphometry.

HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO E GÔNADAS DO *Anthonomus grandis* BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTO AO LUFENUROM

por

HILTON NOBRE DA COSTA

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 – 2016

HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO E GÔNADAS DO *Anthonomus grandis* BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTO AO LUFENUROM

por

HILTON NOBRE DA COSTA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Franklin Magliano da Cunha – PNPd/UFRPE

HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO E GÔNADAS DO *Anthonomus grandis* BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EXPOSTO AO LUFENUROM

por

HILTON NOBRE DA COSTA

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Franklin Magliano da Cunha – UFRPE

Aos meus pais Hildemario Coelho da Costa (*in memoriam*) e Nadjane Mateus Nobre de Lima,
por todo o carinho, amor e educação. E a minha amada esposa e amiga
Ana Paula Silva de Sousa Nobre que me faz feliz a
cada dia e me dá forças com seu amor
para continuar a vencer.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu Deus e Senhor na pessoa do Salvador Jesus Cristo e do Espírito Santo, que tem cuidado de mim a cada dia, me fazendo surpresas, como a conclusão deste trabalho. Pois “Tudo coopera para o bem daqueles que amam a Deus” (Romanos 8.28). Te amo Deus.

Agradeço ao meu pai Hildemario (*in memoriam*) que me abençoava o tempo inteiro dizendo que eu iria ter sucesso na vida e a minha mãe Nadjane que sempre me disse que tudo iria dá certo e que não se preocupasse que Deus estava cuidando de tudo. Meu muito obrigado a vocês.

A minha amada esposa Ana Paula Silva Sousa Nobre por toda a sua paciência e amor, que me orientou a fazer as melhores escolhas durante todo esse período. Te amo.

A toda a minha família e amigos que torceram para a conclusão deste trabalho e a todos os amigos e irmãos em Cristo que oraram e intercederam por mim a Deus. As vossas orações foram atendidas.

Cursar o mestrado foi uma grande oportunidade para mim, portanto agradeço a UFRPE e ao PPGEA, pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos científicos e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira e co-orientador Dr. Álvaro Aguiar C. Teixeira pela confiança e credibilidade a mim conferidas para a elaboração deste projeto. Muito obrigado por tudo.

Ao Dr. Franklin Magliano por toda a co-orientação e ajuda nos experimentos. Ao doutorando Guilherme G. Rolim por ter disponibilizado os bicudos e ajuda nas análises estatísticas, além da amizade. A Doutoranda Glaucilane S. Cruz por ter me ajudado nas correções finais deste trabalho, além da sua amizade e palavras de incentivo.

A todos os amigos do Laboratório de Histologia que me ajudaram de forma direta e indireta: Carolina Guedes, Ismaela Melo, Hilda Santos, Carolline Guimarães, Cintia Giselle, Solange Bezerra, Welma Emídio e Aline Mariano.

A todos os colegas do curso de mestrado Cleane Souza, Elisabete Albuquerque, Antônio Almeida e Paulo Duarte, e a todos os professores do Programa, em especial ao Dr. Jorge B. Torres por ter me disponibilizado o inseticida.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	9
2 IMPACTO DO LUFENUROM SOBRE O INTESTINO MÉDIO DE <i>Anthonomus grandis</i> BOHEMAN (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E SEU REFLEXO NA GAMETOGÊNESE.....	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO.....	26
AGRADECIMENTOS.....	32
LITERATURA CITADA.....	32
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do algodão (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae) é uma das principais culturas de fibras do Brasil e do mundo, gerando muitos empregos de forma direta e indireta. Anualmente, uma média de 35 milhões de hectares são destinados a essa cultura por todo o mundo, e os estudos mostram um aumento da demanda mundial desde a década de 1950 a uma taxa anual média de 2%, movimentando todos os anos cerca de US\$ 12 bilhões e envolvendo mais de 350 milhões de pessoas em sua produção. Produzido por mais de 60 países nos cinco continentes, China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e Brasil, são destaques no quesito principais produtores dessa fibra (Abrapa 2015).

Junto com outros cultivos, a cotonicultura tem levado o Brasil a investir em tecnologias que permitiram aumentar a produtividade e, conseqüentemente, a qualidade da fibra por meio de técnicas avançadas de plantio incorporadas a cultivares melhores adaptadas ao solo e clima das diversas zonas de produção, atendendo, assim, às exigências do mercado nacional e internacional (Ministério da Agricultura 2015). O quinto levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento para a safra de 2014/2015 revela que deverá alcançar os 995,8 mil hectares em área de plantação, com uma produção de 1.542,9 mil toneladas (Conab 2014, Abrapa 2015).

Por esse motivo, o Brasil tem se tornado o quinto maior em produtividade e o primeiro em produtividade em sequeiro, o terceiro maior em exportação e o quinto maior em consumo (quase 1 milhão toneladas/ano), sendo Mato Grosso e Bahia responsáveis por 82% dessa produção nacional (Ministério da Agricultura 2015, Abrapa 2015). Um dos fatores que limitam a expansão do algodoeiro no país são as perdas advindas do ataque de pragas, que devido a esse plantio

intensivo, proporcionou o aumento de infestação de uma variedade de espécies pragas do algodoeiro no Brasil: bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman), broca-do-algodoeiro (*Eutinobothrus brasiliensis*, Hambleton), percevejo castanho (*Scaptocoris castanea*, Perty), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*, Hufnagel), tripes (*Frankliniella* spp., *Thrips tabaci* Lindeman, *Hercothrips* spp), pulgões (*Aphis gossypii*, Glover) e (*Myzus persicae*, Sulzer), mosca branca (*Bemisia argentifolii*, Gennadius), broca da haste (*Conotrachelus denieri*, Hust), curuquerê (*Alabama argillacea*, Hübner), besouro amarelo (*Costalimaita ferruginea*, Fabricius), lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*, Fabrício), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*, Saunders), ácaros (*Tetranychus urticae*, Koch) (*Tetranychus ludeni*, Zacher), (*Polyphagotarsonemus latus* Banks) e percevejos (*Horcias nobilellus*, Berg, *Dysdercus* spp., *Gargaphia torresi*, Lima) (Alves & Serikawa 2006, Almeida *et al.* 2013).

É importante salientar, em relação a importância do algodão, que os custos com controle de insetos-praga tem sido um dos principais fatores que acarretam maior parcela no custo de produção do algodoeiro. O grande número de aplicações necessárias à cultura, mais ou menos 12 a 14 pulverizações, é uma das principais causas que encarecem a sua produção (Richetti *et al.* 2004).

Dentre as pragas que atacam a cultura do algodoeiro, a ordem Coleoptera tem grande importância, não só pelo número de insetos, mas pelos prejuízos causados por eles. Das 12 espécies descritas do gênero *Anthonomus*, apenas algumas são consideradas pragas de diversas culturas de importância econômica, sendo o bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis* uma delas. É um besouro de coloração castanha-ferruginosa quando jovem, e cinza quando se tornam mais velhos, sua dieta é baseada de botões florais (preferencialmente), flores e maçãs de algodoeiro, podendo alimentar-se de folhas jovens e pecíolo, caso falte as outras estruturas relacionadas (Praça 2007, Agrofit 2015).

A oviposição é feita preferencialmente nos botões florais, onde os ovos elípticos, com 0,8 mm de comprimento, são colocados isoladamente através de um orifício feito pela fêmea, que o fecha com uma secreção cerosa produzida por ela mesma, o que facilita a diferenciação dos orifícios decorridos da alimentação, pois estes não são fechados (Praça 2007, Agrofit 2015).

Na cotonicultura, esse inseto aparece em evidência como praga-chave (constantemente ocasionando perdas) em muitos países desde 1983, onde em fevereiro desse mesmo ano, houve o primeiro relato de sua existência no Brasil, especificamente no estado de São Paulo, porém atualmente encontra-se instalado em todas as regiões produtoras de algodão no país (Coutinho & Cavalcanti 1988, Ramalho *et al.* 2001, Almeida *et al.* 2013).

As injúrias provocadas surgem na época de maturação da cultura, onde as fêmeas depositam seus ovos dentro dos botões florais (preferencialmente) e das maçãs, resultando, respectivamente, no amarelamento e caída, e na abertura irregular do capulho (Coutinho & Cavalcanti 1988, Almeida *et al.* 2013). Assim, as larvas desenvolvem-se dentro dessas estruturas reprodutivas, dificultando o contato com inseticidas e, conseqüentemente, provocando prejuízos que variam de 3 a 75% da produtividade das fibras, sendo as perdas da ordem de US\$ 140 a 350 por hectare/ano (Degrande 2006, Abreu *et al.* 2013).

Por conta do elevado poder de destruição, em detrimento de sua alta capacidade reprodutiva e de numerosas gerações que se reproduzem em um ciclo agrícola, a bioecologia dessa praga passou a ser o centro em muitos estudos desenvolvidos, chegando a ser uma das pragas mais pesquisadas do mundo (Busoli *et al.* 1994), aumentando, dessa forma, os conhecimentos sobre a mesma. Qualquer ser vivo em seu habitat natural, está submetido às diversas inter-relações no meio, podendo, assim, sofrer com algum fator que limite o seu crescimento. Parasitóides, como *Catolaccus grandis* (Burks) e *Bracon sp.*, predadores, doença e dessecação pela baixa umidade e alta temperatura do solo, já são confirmados como fatores de

mortalidade natural do bicudo (Ramalho & Silva 1993, Ramalho *et al.* 1993, Cardoso *et al.* 2009). Apesar disso, esse inseto é visto constantemente ocasionando perdas, pois sua densidade populacional é capaz de causar dano econômico.

Tentando minimizar esses problemas, práticas culturais estão sendo utilizadas para diminuir os impactos causados pelo bicudo, dentre elas: antecipação e agrupamento das datas de plantio, policultivo, coleta e destruição dos botões florais atacados, além dos caídos (Silvie *et al.* 2006). No entanto, essa prática tem sido limitada em virtude do aumento da produção e, conseqüentemente, das áreas plantadas. Em contrapartida, o controle biológico tem se mostrado muito eficaz, com destaque para a produção em massa dos parasitóides *C. grandis* e *B. vulgaris* mencionados anteriormente, que controlam bem o bicudo, bem como a utilização dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisoplae* (Metschnikoff) Sorokin, pois os mesmos têm apresentado patogenicidade à praga (Silva 2001, Lins-Júnior *et al.* 2007, Praça 2007, Giometti *et al.* 2010). Além disso, isolados da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), caracterizada por produzir proteínas formadoras de cristais inseticidas, vem sendo utilizados em grande escala nos diversos programas de manejo de pragas, inclusive do bicudo-do-algodoeiro (Martins *et al.* 2007).

Para uma maior eficácia de controle da praga, no entanto, os métodos ainda se baseiam na aplicação de produtos químicos (Azambuja & Degrande 2014). Com isso, há uma demanda do uso de produtos de amplo espectro, como por exemplo, os inseticidas neonicotinóides, piretróides e organofosforados, que ainda são utilizados para controle do bicudo no Brasil (Fonseca *et al.* 2011, Godoy & Nakano 2011, Agrofit 2015). Não obstante, a utilização desses produtos tem resultado em sérios problemas à saúde e ao meio ambiente, em virtude dessas moléculas não agirem de forma seletiva, deixando resíduos nas plantas e no solo, contaminando ecossistemas

aquáticos e eliminando insetos benéficos (polinizadores e os inimigos naturais), além de favorecer a seleção de populações resistentes.

A partir disso, busca-se usar produtos com baixo impacto ambiental, pois é um dos objetivos do Manejo Integrado de Pragas. De forma alternativa, inseticidas pertencentes ao grupo dos reguladores de crescimento, mostram vantagens ecotoxicológicas em relação aos inseticidas convencionais, devido a apresentarem maior especificidade e baixo nível de toxicidade para mamíferos (Ávila & Nakano 1999). Assim, inseticida como Match[®], que tem como princípio ativo o lufenurom, molécula do grupo das benzoiluréias (inseticidas que possuem como fórmula geral a estrutura carbonyl-2,6-difluorobenzamide), apresenta-se como uma boa alternativa no controle do bicudo-do-algodoeiro, em decorrência de possuírem essas características.

Sua ação é inibir a síntese de quitina, não permitindo que o inseto produza um exoesqueleto novo por conta das alterações no processo de ecdise, deixando-o preso na sua antiga carapaça até a morte (Mansur *et al.* 2010, Savoy 2011). Trabalhos tem relatado ao longo dos últimos anos a capacidade de outras moléculas do grupo das benzoiluréias em interferir na reprodução de besouros adultos. A exemplo de Elek & Longstaff (1994) que não observaram geração F1 em *Rhyzopertha dominica* (Fabricius), *Sitophilus oryzae* (Linné), *Oryzaephilus surinamensis* (Linné) e *Tribolium castaneum* (Herbst), quando os adultos destas espécies foram expostos a grãos de trigo tratados com os reguladores de crescimento triflumuron, chlorfluazuron, teflubenzuron e flufenoxuron. Segundo os relatos de Marco & Castañera (1996), quando não há a esterilização total, moléculas como hexaflumuron são capazes de promover drástica redução, por longos períodos, na eclosão dos ovos de *Aubeonymus mariaefranciscae* (Roudier) quando os adultos foram alimentados com folhas tratadas por este inseticida.

Esta ação, foi observada em insetos pragas pertencentes à outras ordens, como o heteróptero *Euschistus heros* (Fabricius), que teve sua longevidade reduzida significativamente

quando adultos e ninfas foram tratados com lufenurom, diflubenzuron e teflubenzuron, causando impactos sobre a fecundidade das fêmeas e viabilidade de ovos quando só os adultos foram expostos (Roggia *et al.* 2011). Além disso, a lagarta *Anticarsia gemmatalis* (Hueb), é bem controlada a partir do quarto dia de exposição ao lufenurom pulverizado sobre plantas de soja (Silva *et al.* 2003), como também os lepidópteros *Plutella xilostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Linné) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith), que tiveram suas viabilidades de ovos afetadas e, dessa forma, reflexo na geração F1, revelando a ação transovariana do lufenurom (Pratissoli *et al.* 2004, Bortoli *et al.* 2006).

Em insetos, a quitina além de está presente na cutícula, também é encontrada na matriz peritrófica do intestino médio, na traquéia e em ovos e ovariolos de alguns insetos (Kramer & Muthukrishnan 2005, Moreira *et al.* 2007), portanto, a inibição da síntese desse polissacarídeo, aumenta as chances de ocorrerem complicações no organismo do inseto.

Para uma melhor compreensão da ação dos inseticidas na fisiologia dos insetos, nos últimos anos o sistema digestivo tornou-se uma importante estrutura nas pesquisas que visam controlar o ataque de pragas, pois o mesmo permite o contato dos insetos com o meio externo (Levy *et al.* 2004, Chapman 2013). Dividido em três regiões, estomodeu (ou intestino anterior), mesêntero (ou intestino médio) e proctodeu (ou intestino posterior), o trato digestivo dos insetos é considerado uma barreira física e química eficaz contra agentes patogênicos potencialmente invasivos que são ingeridos na alimentação (Gallo *et al.* 2002, Levy *et al.* 2004, Gullan & Cranston 2012). Dentre essas regiões, o intestino médio ganha destaque, porque é nela onde ocorre a absorção dos nutrientes e a síntese e secreção de enzimas e hormônios (Gallo *et al.* 2002, Gullan & Cranston 2012).

Em curculionídeos, o intestino médio começa na válvula stomodeal, esta se diferencia em região anterior e posterior, e termina na válvula pilórica (Baker *et al.* 1984, Sánchez *et al.* 2000,

Rubio *et al.* 2008). Sendo assim, pode-se dizer que essa região é a mais ativa do canal alimentar, e quaisquer complicações nessa área pode afetar o crescimento e o desenvolvimento do inseto, bem como, outras atividades fisiológicas, dependentes da absorção e transformação da alimentação adequada, como a gametogênese [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000].

Os inseticidas também podem causar outros efeitos como apoptose (Turrens 2003, Malaspina & Silva-Zacarin 2006, Buyukguzel & Kalender 2009, James & Xu 2012). Esse processo é um tipo de morte celular geneticamente programada e muito conservada nos organismos multicelulares, na qual células desnecessárias, danificadas ou potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual ou sob alguma condição atípica do organismo, como doenças (Ashe & Berry 2003). Em insetos, a apoptose também está relacionada com a reorganização tecidual que ocorre durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na fase adulta (Gregorc *et al.* 2004).

Os mecanismos de morte celular são normalmente divididos em dois tipos, a morte celular programada por apoptose, que necessitam de energia, e os mecanismos de morte celular por necrose, que não necessitam (Elmore, 2007). Além do mais, a morte celular por necrose, tipicamente provoca uma forte resposta imunitária, ao passo que a apoptose não (Taylor *et al.*, 2008). A apoptose pode ocorrer por duas vias: intrínseca (mitocondrial) ou via extrínseca (citoplasmática). Esses processos são mediados por proteínas pró-apoptóticas, antiapoptóticas, e pelas caspases (Lockshin & Zakeri 2001). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. Na via intrínseca os sinais que são traduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Arends & Wyllie 1991).

Gupta *et al.* (2010) quando submeteram larvas de terceiro instar de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) Meigen a diferentes concentrações do inseticida organofosforado Clorpirifós (0,015 – 15,0 µg/L) observaram que as células do intestino médio entraram no processo de apoptose, induzidas pelo aumento exacerbado dos produtos resultantes do estresse oxidativo causado pelo inseticida.

Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial. Os diversos sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF- 1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose celular (Lockshin & Zakeri 2001, Grivicich *et al.* 2007, Gregorc & Ellis 2011). As caspases são uma família de cisteína proteases que realizam papéis importantes na execução da apoptose, e pode ser dividida em dois grupos, iniciadoras e efetoras (Li & Yuan, 2008). Estas enzimas inicialmente são sintetizadas como zimógenos inativos e devem ser submetidas a um processo de ativação para adquirir atividade catalítica completa.

Os inseticidas Clorpirifós, imidacloprid, amitraz, fluvalinato, coumaphos; Fungicidas microbutanil e clorotalonil; e Herbicidas glifosato e simazina, também foram capazes de desencadear um aumento da apoptose no intestino médio de larvas de *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae) no grupo tratado em relação ao não tratado (Gregorc & Ellis 2011). Os autores ainda destacaram, que foi possível identificar apoptose também nas células regenerativas do epitélio, e sugerem a hipótese de que esse fenômeno ocorreu para manter a proporção adequada de células no intestino médio, ou seja, um grande número de células regenerativas podem morrer

para compensar o número insuficiente de células epiteliais. Já Gregorc & Bowen (2000) quando avaliaram a morte celular induzida no intestino médio também de larvas de abelhas *A. mellifera* utilizando a bactéria *Paenibacillus larvae*, o acaricida amitraz e o antibiótico oxitetraciclina, relataram que houve tanto apoptose quanto necrose, indicando que os diferentes tipos de morte celular podem ocorrer simultaneamente após a exposição a pesticidas. Sendo assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar possíveis efeitos do inseticida Match[®] (lufenuron) sobre o intestino médio (morfologia, morfometria, histoquímica e apoptose) e suas consequências na gametogênese em adultos de *A. grandis*.

Literatura Citada

- Abrapa. 2015.** Disponível em:<<http://www.abrapa.com.br/Paginas/default.aspx>>, acessado em: 08/05/2015.
- Abreu, S.C., M.P.V. Resende, S.A. Rios, C.D. Alvarenga & N.P. Gonçalves. 2013.** Desempenho de genótipos de algodoeiro sob pressão de bicudo. *Biotemas* 26: 77-82.
- Agrofit (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários). 2015.** Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>, acessado em: 08/05/2015.
- Almeida, R.P., C.A. Domingues & F.S. Ramalho. 2013.** Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. Campina Grande, Embrapa Algodão, 59p.
- Alves, A.P. & R.H. Serikawa. 2006.** Controle químico de pragas do algodoeiro. *Rev. Bras. Ol. Fibras* 10: 1197-1209.
- Arends, M.J. & A.H. Wyllie. 1991.** Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 223-254.
- Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psych* 27: 199-214.
- Ávila, C.J. & O. Nakano. 1999.** Efeito do Regulador de Crescimento Lufenuron na Reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 28: 293-299.

- Azambuja, R. & P.E. Degrande. 2014.** Thirty years of cotton boll weevil in Brazil. *Arq. Inst. Biol* 1: 1-34.
- Baker, J.E., S.M. Woo & R.V. Byrd. 1984.** Ultrastructural features of the gut of *Wheat weevil* L. (Coleoptera, Curculionidae) with notes on distribution of proteases and amylases in crop and midgut. *Can. J. Zool* 62: 1251-1259.
- Bortoli, S.A., R.T. Thuler & B.S. Lopes. 2006.** Efeito de lufenuron e azadiractina sobre adultos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Científica* 34: 53-58.
- Buyukguzel, E. & Y. Kalender. 2009.** Exposure streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. *Pestic. Biochem.* 94: 112-118.
- Busoli, A.C., J.J. Soares & F.M. Lara. 1994.** O bicudo-do-algodoeiro e seu manejo. Jaboticabal, Funep, 32p.
- Cardoso, U.P., M.A. Castellani, L.C. Forti, A.O. Menezes Júnior, A.A. Moreira, Y.C. Colmenarez, M.E.C.R. Oliveira & A.L. Bittencourt. 2009.** Índice de infestação e fatores de mortalidade do bicudo-do-algodoeiro (Coleoptera: Curculionidae) no semi-árido do sudoeste da Bahia, Brasil. *Entomotropica* 24: 111-122.
- Chapman, R.F. 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Coutinho, J.L.B. & V.A.L.B. Cavalcanti. 1988.** Utilização do fungo *Beauveria bassiana*, no controle biológico do bicudo-do-algodoeiro em pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras* 23: 455-461.
- Degrande, P.E., W.J. Santos & A.F.C.P. Silva. 2004.** Programa nacional contra o bicudo. *Cult. Grandes Cult.* 68: 08-0.
- Degrande, P.E. 2006.** Ameaça do bicudo exige organização e empenho de todos. *Visão Agríc.* 6: 55-58.
- Elek, J.A. & B. C. Longstaff. 1994.** Effects of chitin-synthesis-inhibitors on insect pest of stored grain. *Pestic. Sci* 40: 225-230.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495-516.
- Fonseca, P.R.B., I.S. Lima Júnior, M.F. Soria, C. Kodama & P.E. Degrande. 2011.** Inseticidas neonicotinoides no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) e a falha de controle do endossulfan. *Arq. Inst. Biol* 78: 545-551.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S.R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ/USP, 920p.

- Godoy, M.S. & O. Nakano. 2011.** Efeitos de inseticidas sobre a reprodução e sobrevivência do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* boh. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. *Rev. Verde* 6: 12-22.
- Gregorc, A. & I.D. Bowen. 2000.** Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biol. Int* 24: 319-324.
- Gregorc, A., A. Pogacnik & I.D. Bowen. 2004.** Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35: 453-460.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 200-207.
- Grivicich I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev. Bras. Cancerol* 53: 335-343.
- Gupta, S.C., M. Mishra, A. Sharma, T.G.R.D. Balaji, R. Kumar, R. Mishra & D.K. Chowdhuri. 2010.** Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through reperation of reactive oxygen species. *Ecotoicol. Environ. Saf.* 6: 1415-1423.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 494p.
- James, R.R. & J. Xu. 2012.** Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol* 109: 175-182.
- Kramer, K.J. & S. Muthukrishnan. 2005.** Chitin metabolism in insects, p. 193-225. *In* L.I. Gilbert, K. Iatrou & S.S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Pergamon, 3300p.
- Li, J. & J. Yuan. 2008.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27: 6.194-6.206.
- Lockshin, R.A. & Z. Zakeri. 2001.** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2: 545-550.
- Malaspina, O. & E.C.M. Silva-Zacarin. 2006.** Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *J. Morphol. Sci.* 23: 303-309.
- Mansur, J.F., J. Figueira-Mansur, A.M. Santos, H. Santos-Junior, I.B. Ramos, M.N. Medeiros, E.A. Machado, C.R. Kaiser, S. Muthukrisnan, H. Masuda, A.M.H. Vasconcellos, A.C.A. Melo & M.F. Moreira. 2010.** The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98: 59-67.

- Marco, V. & P. Castañera, 1996.** Eficacia de aplicaciones foliares de insecticidas con Torre de Potter, sobre adultos de *Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier (Coleoptera: Curculionidae). Bol. San. Veg. Plagas 22: 659-666.
- Ministério da Agricultura. 2015.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>, Acessado em 08/05/2015.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. An. Soc. Entomol. Brasil 29: 615-632.
- Moreira, M.F., A.S. Santos, H.R. Marotta, J.F. Mansur, I.B. Ramos, E.R. Machado, G.H.M.F. Souza, M.N. Eberlin, C.R. Kaiser, K.L. Kramer, S. Muthukrishnan & A.M.H. Vasconcellos. 2007.** A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggs hells, eggs and ovaries. Insect Biochem. Molec. Biol. 37: 1249-1261.
- Praça, L. B. 2007.** *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae). Brasília, Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia, 23p.
- Pratissoli, D., R.T. Thuler, F.F. Pereira, E.F. Reis & A.T. Ferreira. 2004.** Ação transovariana de lufenuron (50g/l) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Ciênc. Agrotec. 28: 9-14.
- Ramalho, F.S. & J.R B. Silva, 1993.** Período de emergência e mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. Pesq. Agropec. Bras. 28: 1221-1231.
- Ramalho, F. S., Gonzaga, J. V. & J. R. B. Silva. 1993.** Método para a determinação das causas de mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. Pesq. Agropec. Bras. 28: 877-887.
- Ramalho, F.S., R.S. Medeiros & W.P. Lemos. 2001.** Bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), p. 113-119. In E.F. Vilela, R.A. Zucchi & F.Cantor (eds.), Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos, 173p.
- Richetti, A., Melo Filho G. A. Lamas, F. M. Staut, L. A. & A. C. Fabrício. 2004.** Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2004/05, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Dourados, Embrapa Pecuária Oeste, 16p. (Comunicado Técnico 91).
- Roggia, S., B.S. Corrêa-Ferreira, A.F. Bueno, & J.B. Alves. 2011.** Efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre a sobrevivência, desempenho reprodutivo e atividade alimentar do percevejo marrom da soja. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil 32: 100-103.
- Rubio, J.D., A.E. Bustillo, L.F. Vallejo, J.R. Acuña & P. Benavides. 2008.** Alimentary Canal and Reproductive Tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Neotrop. Entomol. 37: 143-151.

- Sánchez, P.A., F. Sánchez, F.H. Caetano & K. Jaffé. 2000.** El tubo digestivo en adultos de *Rhynchophorus palamrum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Morfología y ultraestructura. Bol. Entomol. Venez. 15: 195-216.
- Savoy, V. L. T. 2011.** Classificação dos agrotóxicos. Inst. Biol. 73: 91-92.
- Silva, M.T.B, E.C. Costa & A. Boss. 2003.** Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. Ciência Rural 33: 601-605.
- Taylor, R.C., S.P. Cullen & S.J. Martin. 2008.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9: 231-241.
- Turrens, J.F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 55: 335–344.

CAPÍTULO 2

IMPACTO DO LUFENUROM SOBRE O INTESTINO MÉDIO DE *Anthonomus grandis* (BOHEMAN) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E SEU REFLEXO NA GAMETOGÊNESE¹

HILTON N. COSTA¹, FRANKLIN M. CUNHA², GLAUCILANE S. CRUZ¹, CAROLLINE G.D' ASSUNÇÃO²,
GUILHERME G. ROLIM¹, MARIA E. G. BARROS², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA² E VALÉRIA W. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua D.
Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Hilton N. Costa, Franklin M. Cunha, Glaucilane S. Cruz, Carolline G. D' assunção, Guilherme G. Rolim, Maria Edna G. Barros, Álvaro A.C. Teixeira & Valéria W. Teixeira. Impacto do lufenurom sobre o intestino médio de *Anthonomus grandis* (BOHEMAN) (Coleoptera: Curculionidae) e seu reflexo na gametogênese. Submetido na Pestic Biochem. Physiol.

RESUMO - O Inseticida Match[®] (lufenurom), um dos principais Reguladores de Crescimento utilizado no controle de pragas, vem se apresentando como alternativa viável no controle do bicudo-do-algodoeiro por inibir a síntese de quitina. Assim, objetivou-se analisar se o Match[®] interfere na síntese da matriz peritrófica, levando a alterações no epitélio intestinal, acarretando déficit nutricional, refletindo no processo de gametogênese em adultos de *Anthonomus grandis*. Botões florais de algodoeiro foram imersos na calda inseticida (800 µL de Match[®] + 200 mL de água destilada) e oferecidos aos insetos, à avaliação do intestino médio ocorreu após 24 e 120 horas da alimentação e a das gônadas, após 120 horas. Os resultados demonstraram que o Match[®] nos dois períodos avaliados ocasionou alterações histopatológicas como: desorganização, vacuolização e descamação do epitélio intestinal; e alterações histoquímicas, com mudanças no padrão de distribuição de carboidratos, mesmo sem alteração na quantificação, e acentuada diminuição nos níveis protéicos. Não houve apoptose celular, entretanto, observou-se aumento no número de ninhos de células regenerativas. Nos testículos tratados, houve redução na quantidade de espermatozoides, redução dos níveis de carboidratos, porém não houve diferença nos níveis protéicos. Já os ovários apresentaram desorganização estrutural das células foliculares, redução de vitelo, redução nos níveis de proteína, contudo, não houve alteração nos níveis de carboidratos. Conclui-se que o Match[®] provoca alterações histopatológicas e histoquímicas do epitélio do intestino médio e gônadas de adultos de *A. grandis*, refletindo nos processos de gametogênese, apresentando-se como ferramenta promissora no controle desta importante praga da cotonicultura.

PALAVRAS-CHAVE: Regulador de crescimento, algodão, benzoiluréia, apoptose, membrana peritrófica, bicudo-do-algodoeiro

LUFENURON IMPACT ON THE GUT *Anthonomus grandis* AVERAGE BOHEMAN
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) AND ITS REFLECTION IN GAMETOGENESIS

ABSTRACT – Insecticide Match[®] (lufenuron), one of the main growth regulators used in pest control, has been presented as a viable alternative in controlling the boll weevil by inhibiting chitin synthesis. The objective was to analyze if the Match[®] interferes with synthesis of peritrophic matrix, leading to changes in intestinal epithelium, resulting in malnutrition, reflecting the gametogenesis process in adult *Anthonomus grandis*. Floral cotton buds were immersed in insecticide mix (800 uL of Match[®] + 200 mL of distilled water) and offered to insects, evaluation of the midgut occurred after 24 and 120 hours of feeding and the gonads, after 120 hours. The results showed that the Match[®] in both periods resulted in histopathological changes such as disorganization, vacuolization and sloughing of the intestinal epithelium; and histochemical changes in the pattern of distribution of carbohydrates, even with no alteration in quantification, and intense decrease in protein levels. There was no cell apoptosis, however, there was an increase in the number of regenerative cells nests. In the treated testes, there was a reduction in the amount of sperm, reducing the levels of carbohydrates, however there was no difference in protein levels. Ovarioles showed structural disorganization of follicular cells, calf reduction, reduced protein levels, however, there was no change in the levels of carbohydrates. It is concluded that the Match[®] causes histopathologic and histochemical of the midgut epithelium and gonad of *A. grandis* adults, reflecting the gametogenesis processes, presenting itself as a promising tool in the control of this important pest of cotton culture.

KEY WORDS: Growth regulator, Cotton, Benzoylurea, Apoptosis, Peritrophic membrane, Boll weevil

Introdução

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman) se destaca como praga-chave do algodão, em decorrência do seu comportamento reprodutivo e alimentar ocorrer dentro do botão floral e maçã do algodoeiro, dificultando o contato com os inseticidas empregados no seu controle. O rápido crescimento da praga demanda o uso de produtos de amplo espectro, porém, as consequências desse uso, como por exemplo, os riscos à saúde e ao meio ambiente, evidenciam-se, em virtude dessas moléculas não agirem de forma seletiva (Almeida *et al.* 2013).

O lufenurom, pertencente ao grupo das benzoiluréias, é um dos principais IRCs (Inseticidas Reguladores de Crescimento) utilizado no controle de pragas, e apresenta-se como uma alternativa que pode ser viável no controle do bicudo, pelo fato de sua ação estar ligada a inibição da síntese de quitina, o que o classifica como um produto de baixo impacto ambiental (Mansur *et al.* 2010). A quitina é um polissacarídeo amino-açúcar predominantemente composto por unidade de N-acetil-D-glicosamina, que está presente no exoesqueleto, na traquéia, ovos e ovariolos dos insetos e na matriz peritrófica do intestino médio (Gallo *et al.* 2002, Kramer & Muthukrishnan 2005, Moreira *et al.* 2007, Gullan & Cranston 2012). Essa matriz desempenha um papel muito importante no sistema digestivo, protegendo o epitélio contra abrasões e possíveis patógenos que vem junto com o alimento (Gallo *et al.* 2002, Gullan & Cranston 2012). Sendo assim, alterações na síntese desta molécula podem debilitar os insetos, e conseqüentemente refletir na histofisiologia de diversos sistemas, inclusive o reprodutor.

Os eventos reprodutivos dos insetos dependem de vários fatores ambientais (umidade, fotoperíodo, disponibilidade de alimento, etc.), porém, esses mesmos fatores podem ser modificados por fatores internos, como o estado de maturação dos oócitos e a condição nutricional do inseto (Gullan & Cranston 2012). Desta maneira, pode-se afirmar que a

gametogênese é dependente dos nutrientes implicados na absorção e transformação durante o processo de digestão, principalmente em insetos holometábolos.

Muitas pesquisas mostram alterações celulares, como apoptose, provocadas pelos inseticidas sintéticos (Dubovskii *et al.* 2005, Buyukguzel & Kalender 2009, Aslanturk *et al.* 2011, Gregorc & Ellis 2011). A apoptose é um processo fisiológico normal, responsável pela remoção de células indesejadas ou danificadas, incluindo células infectadas por vírus, contudo, trata-se, também de um processo modulador envolvido na regeneração tecidual, (Huang *et al.* 2013)

Dessa forma, nossa pesquisa testou a hipótese de que o regulador de crescimento Match[®] (lufenurum) pode interferir na síntese da matriz peritrófica levando a alterações histopatológica e histoquímica no epitélio intestinal com consequente apoptose das células digestivas levando a um déficit nutricional refletindo no processo de gametogênese em adultos de *A. grandis*.

Material e Métodos

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Obtenção e Criação de *Anthonomus grandis*. A criação de *A. grandis* foi estabelecida a partir da coleta dos botões florais de plantas de algodoeiro cultivadas no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os botões caídos no solo e infestados com larvas e pupas foram transferidos para o Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE e mantidos em bandejas plásticas no interior de gaiolas de emergência. Folhas de papel toalha umedecidas diariamente foram postas sobre os botões para evitar o ressecamento destes, favorecendo ainda o desenvolvimento e emergência dos

bicudos. Os adultos sexados foram mantidos individualizados em recipientes plásticos de 80 mL e alimentados com botões florais de algodão até a instalação dos experimentos.

Tratamentos com o Match[®]. Os tratamentos com a solução inseticida (800 µL de Match[®] + 200 mL de água destilada), dose recomendada pelo fabricante, para avaliação do efeito sobre a histofisiologia (morfologia e histoquímica) do intestino médio e gônadas e, na indução da apoptose, foi realizada em três repetições, onde cada uma (controle e tratamento) constou de 50 insetos. Os bioensaios foram realizados com insetos de 24h após emergência, e mantidas em câmara climatizada com as seguintes regulações: fotoperíodo de 12h, $25 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de 70-80%. Os adultos foram separados em recipientes plásticos de 80 mL com tampa, forrados com papel de filtro umedecido.

Para avaliação do efeito do Match[®], botões florais foram mergulhados na calda inseticida, deixados para evaporar o excesso de umidade por 30 minutos, em temperatura ambiente, e oferecidos aos insetos para alimentação durante 24 horas, separando-se em 3 grupos: avaliação do efeito do inseticida após 24 horas e avaliação do efeito do inseticida após 120 horas e o controle com água destilada. No período de 120h novos botões florais foram oferecidos a cada 24 h sem inseticida.

Coleta do Intestino Médio e Gônadas para Análise Histológica e Histoquímica. Foram coletados dez intestinos de adultos de *A. grandis* de cada grupo (controle, Match 24h e Match 120 h). Do mesmo modo, dez testículos e dez ovariolos também foram coletados, apenas no tempo de 120 horas (controle e tratamento). Acreditamos que o tempo de 24 horas não seja suficiente para que o produto alcance as gônadas, sendo a avaliação desses órgãos realizada após 120 horas. Os insetos foram imobilizados a baixa temperatura (4°C) e dissecados com o auxílio de um estereomicroscópio, fixados em formol 10% por 24 horas e conservados em álcool 70%. O intestino médio foi seccionado e juntamente com os testículos e ovariolos foram desidratados em

banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 minutos cada, embebidos em álcool+hioresina (1:1) por 24 horas e finalmente incluídos em hioresina pura (Leica[®]). Cortes com 3µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica[®] RM 2035. Os cortes foram submetidos às técnicas de coloração pelo Azul de Toluidina para análise morfológica dos órgãos, e para as análises histoquímicas, o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) (detecção de polissacarídeos neutros) (Junqueira & Junqueira 1983) e Xylidine Ponceau (detecção de proteínas totais) (Pearse 1960). Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica[®]. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software LAS Leica Image.

Quantificação Média de Polissacarídeos Neutros e Proteínas Totais. As imagens capturadas foram submetidas ao programa editor de imagens GIMP[®] 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) que converte imagens digitais para uma escala de cinza (preto e branco). Essa segmentação das cores, permite a mensuração dos valores de pixels referentes a marcação selecionada no tecido (Solomon 2009). Os resultados dos teores de proteína e glicogênio foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade. Para cada tratamento utilizou-se 3 lâminas de indivíduos diferentes, sendo mensurados 4 campos de cada lâmina, totalizando 12 campos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Os dados assumiram normalidade, sendo, portanto, utilizado testes paramétricos. Para comparar três grupos foi usado o teste ANOVA one way, com post hoc de Tukey e, quando comparou-se apenas dois grupos foi utilizado o teste t, apresentando diferença significativa quando $p < 0,05$.

Apoptose por Imunofluorescência das Células do Intestino Médio. Foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose utilizando-se kits comerciais (ApopTag[®] Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation). Cinco tubos digestivos oriundos do grupo controle e cinco do grupo tratado com Match[®] após 24 horas e 120 horas foram coletados,

depois seccionado à região mediana e em seguida colocados em formol tamponado a 10% por 24 horas, sendo posteriormente desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), cada banho com duração de 20 min, e em seguida impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados com lâminas silanizadas. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 a 0,1M) à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se a Proteinase K (20 mg/mL). Os cortes foram então lavados em PBS e receberam o tampão de equilíbrio para posterior incubação com a enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,4 a 0,1M) e incubadas com a anti-digoxigenina conjugada à Rodamina por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente foram enxaguadas em PBS e montadas utilizando o meio de montagem antifading associado ao corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindole (DAPI), para marcação dos núcleos das células. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com varredura a laser (Modelo LSM 700 Carl Zeiss), nos filtros: 415 nm (azul) e o 735 nm (vermelho), com câmera acoplada e Software Zen integrado. Todas as fotos foram tiradas com a resolução de 1.048 x 1.048.

Quantificação dos Ninhos de Células Regenerativas do Intestino Médio. A quantificação dos ninhos de células regenerativas foi realizada utilizando-se 2 secções da região mediana do intestino médio de quatro adultos por tratamento, corados com azul de toluidina. A captura de imagens foi feita por meio de uma câmera de vídeo Sony[®], acoplada a um microscópio Olympus[®] BX50. Em cada repetição (lâmina com a secção do corte) foram contados ninhos em todo o intestino médio. O número médio de ninhos obtido nas amostras (repetições) de adultos de *A. grandis* foi submetido a análise de variância e as comparações das médias foram realizadas por

meio do método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias pelo teste de Comparações Múltiplas de Dunn's ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.

Resultados

Morfologia e Histoquímica do Intestino Médio de Adultos de *Anthonomus grandis*. Os adultos do controle, tanto após 24 horas quanto após 120 horas, apresentaram o intestino médio constituídos por duas camadas de tecido muscular estriado, uma interna, com músculo disposto circularmente, e outra externa, com músculos dispostos longitudinalmente e com feixes espaçados. Internamente evidenciou-se o tecido epitelial simples colunar composto por dois tipos de células: células colunares, com inúmeras microvilosidades em seu ápice e núcleos esféricos centrais; e células regenerativas formando ninhos, com citoplasma bastante basófilo e núcleo esférico. Além disso, evidenciou-se a presença da matriz peritrófica na região da luz do intestino, separando o bolo alimentar da camada de células colunares (Figs. 1A e 1B).

O intestino médio de adultos tratados com o Match[®] apresentou após 24 horas o tecido muscular aparentemente bem preservado. No entanto, houve uma desorganização estrutural no epitélio, com vários núcleos sendo ejetados para o lúmen, e a presença de vacúolos nas células colunares (Figs. 1C e 1D). Além disso, nesse tratamento ocorreu a presença de núcleos que se apresentaram mais condensados e com tamanho reduzido, caracterizados como picnóticos.

No tratamento com o Match[®] após 120 horas, o intestino médio apresentou as mesmas características do tratamento com 24 horas em relação a camada muscular. O epitélio apresentou-se muito desorganizado e descamado, também com núcleos sendo expelidos para o lúmen e com um aumento significativo de ninhos de células regenerativas em toda a camada, porém com bastante vacuolização nas mesmas (Figs. 1E e 1F). Não foi evidenciado a presença da matriz peritrófica nos insetos tratados com o Match[®] nos períodos avaliados.

Histoquimicamente, de modo geral, as células epiteliais do intestino médio de adultos do grupo controle e do grupo tratado, tanto após 24 horas quanto após 120 horas, demonstraram reação positiva para o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). No controle, evidenciou-se uma distribuição de modo uniforme de grânulos de glicogênio por todo o citoplasma das células epiteliais (Fig. 2A). No epitélio dos grupos tratados com Match[®] (24 horas e 120 horas), houve uma mudança no padrão de distribuição dos grânulos de glicogênio para o ápice das células (Figs. 2B e 2C). Apesar disso, a quantificação de glicogênio revela que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os tratados, mostrando que a quantidade de carboidratos neutros não foi alterada pelo inseticida (Fig.2D).

De igual forma, a histoquímica para os teores de proteínas totais (Xylidine Ponceau) mostrou uma coloração positiva tanto para o controle quanto para os tratamentos (Figs. 3A, 3B e 3C). A quantificação em pixels de proteínas totais apresentou diferença significativa entre os grupos controle e tratados, sendo mais evidenciada nos tratados com 120h em relação ao controle. Contudo não apresentou diferença entre os respectivos tratamentos (24 horas e 120 horas) (Fig. 3D).

Apoptose por Imunofluorescência do Intestino Médio. O método TUNEL como indicador de apoptose utilizando-se kits comerciais (ApopTag[®] Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation) nos intestinos médios tanto do grupo controle quanto dos tratamentos 24 horas e 120 horas não detectou atividade apoptótica. Todos os grupos apresentaram seus núcleos emitindo fluorescência azul (Figs. 4A, 4B, 4C e 4D), o que caracteriza-os como núcleos normais sem estarem em apoptose, na qual emitem fluorescência vermelha.

Quantificação dos Ninhos de Células Regenerativas no Intestino Médio. A análise quantitativa dos ninhos de células regenerativas mostrou que houve aumento apenas no grupo

tratado com Match[®] após 120 horas, demonstrando um crescimento substancial de ninhos de células regenerativas nesse tempo (Fig. 5).

Morfologia e Histoquímica do Testículo de Adultos de *Anthonomus grandis*. Os adultos provenientes do grupo controle apresentaram os testículos revestidos por tecido conjuntivo, ou cobertura peritoneal, em toda a sua extensão, com invaginações formando septos, dividindo-se em vários folículos testiculares (Figs. 6A e 6B). Verificou-se ainda vários espermatozoides e a presença destes no vaso deferente.

Testículos dos adultos oriundos do grupo tratado após 120 horas com Match[®] exibiram o mesmo perfil morfológico do controle, entretanto, constatou-se que não houve transformação das espermátides na maioria dos folículos e, conseqüentemente, uma redução do número de espermatozoides (Figs. 6C e 6D).

Em relação à detecção de carboidratos neutros, os espermatozoides do testículo dos adultos do controle apresentaram maior reação de positividade ao P.A.S. em comparação com os espermatozoides do tratamento com o Match[®] após 120 horas, confirmada pela significativa diferença na quantificação dessa macromolécula entre os grupos, (Fig. 7). Em contrapartida, a quantificação média para proteínas totais (Xylidine Ponceau) não exibiu diferença significativa entre os grupos controle e tratado com Match[®] após 120 horas (Fig. 8).

Morfologia e Histoquímica do Ovariolo de Adultos de *Anthonomus grandis*. Nos ovariolos dos insetos do grupo controle, a região vitelária se apresentou bem desenvolvida, sendo o oócito revestido por um epitélio constituído de células foliculares e revestindo todo o ovariolo há uma bainha de tecido conjuntivo (Figs. 9A e 9B).

Já os ovariolos provenientes dos adultos do tratamento com o Match[®] após 120 horas mostraram o mesmo padrão morfológico com o controle, porém com patologias caracterizadas

por desorganização do epitélio de células foliculares, presença de vacúolos nas mesmas e reduzida quantidade de vitelo (Figs. 9C e 9D).

Histoquimicamente, os ovariolos de adultos do controle não apresentaram diferença na quantificação de carboidratos neutros quando comparados com os ovariolos tratados com Match[®] após 120 horas (Fig.10). Para a quantificação de proteínas totais nos ovariolos, os resultados revelam diferença significativa entre o grupo controle e tratado com Match[®] após 120 horas (Fig. 11), corroborando a reação de positividade ao corante Xylidine Ponceau.

Discussão

O perfil morfológico do intestino médio de *A. grandis* descrito nesse trabalho foi semelhante ao relatado por Cunha *et al.* (2015) para este inseto e também para outros coleópteros, como o Curculionídeo *Rhynchophorus phoenicis* (Fabricius) (Temitope 2013), e o Tenebrionídeo *Platynotus belli* (F.) (Sarwade & Bhawane 2013). A desorganização estrutural e descamação do epitélio do intestino médio visto nos tratamentos com Match[®], tanto após 24 horas quanto 120 horas, como vários núcleos sendo expelidos para o lúmen, vacuolização das células colunares e aumento significativo do número de ninhos de células regenerativas apenas no período de 120 horas, além da presença de núcleos condensados e reduzidos (picnóticos) no tratamento após 24 horas, indicam que o inseticida provoca sérias alterações nessa região. Vale ressaltar, que a matriz peritrófica não foi presenciada nos grupos tratados com o inseticida, o que provavelmente explica todas essas alterações histológicas. Spies & Spence (1985) afirmaram que a renovação epitelial pela proliferação e diferenciação das células regenerativas é estimulada pela liberação de fatores que podem estar ligados a alterações nas células colunares.

Os resultados observados no intestino médio neste experimento, corroboram com as respostas celulares aos patógenos na tentativa de defesa do epitélio como relatados por Chiang *et*

al. (1986), a descamação das células colunares, que apesar de ser considerada prejudicial, estimula a proliferação das células regenerativas a fim de recuperar o epitélio danificado. Como foi visto por um aumento substancial no número de ninhos de células regenerativas em várias áreas do grupo tratado com Match[®], sobretudo com o tratamento após 120 horas. Isso demonstra que o produto atua nas células colunares do epitélio intestinal e com o passar do tempo, estimula o aumento dos ninhos à medida que o organismo fica exposto ao inseticida.

Sendo assim, o epitélio do intestino médio torna-se mais vulnerável pelas alterações histológicas relevantes (Correia *et al.* 2009). Estes mesmos autores quando submeteram larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith) à folhas tratadas com nim, observaram após 96 horas a 1,0% e 144 horas a 0,5% resultados parecidos com os da presente pesquisa, como a degeneração do epitélio do intestino médio, porém com redução das células regenerativas, o que não foi observado nesse trabalho. O que provavelmente pode estar relacionado com as características do modo de ação dos inseticidas avaliados.

As patologias observadas no intestino médio ocasionadas pelo Match[®] em *A. grandis* também foram vistas nos intestinos médios de lagartas de *S. frugiperda* quando tratadas com a interação da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) com extratos vegetais de *Petiveria alliacea* (L.), *Zingiber officinale* (Roscoe), *Cymbopogon citratus* (Stapf), *Malva silvestris* (L.), *Baccharis genistelloides* (L.) e *Ruta graveolens* (L.) (Knaak *et al.* 2010). Assim, a utilização do regulador de crescimento Match[®], sugere a hipótese de que esse inseticida também pode ter eficiência na promoção da morte e/ou patologia em insetos-praga, como o bicudo-do-algodoeiro.

A quantificação dos carboidratos no intestino médio não apresentou diferença, sugerindo que possivelmente o inseticida dentro do organismo nesse período não reduza as taxas dessa macromolécula uma vez que os carboidratos funcionam como principal fonte de fornecimento

energético nos insetos, sendo requerida em diversos processos, dos quais inclui a defesa contra agentes estressantes, como os inseticidas (Arrese *et al.* 2010, Rosas-Mejía *et al.* 2015). A mudança no padrão de distribuição dos grânulos de glicogênio observada nos tratamentos, assemelha-se aos resultados encontrados por Cunha *et al.* (2012), onde foi observado um deslocamento dos carboidratos para a região apical das células colunares de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), alimentados com *S. frugiperda* tratadas com folhas de algodão Bt. Este fato sugere que houve um requerimento energético maior, como um mecanismo de resposta ao tratamento.

A redução na quantidade de proteínas totais no intestino dos indivíduos tratados, pode estar relacionado ao modo de ação dos inseticidas, pois segundo Leonardi *et al.* (1996, 2001) a aplicação de inseticidas reguladores de crescimento, como o fenoxicarbe, pode interferir na absorção de aminoácidos, a exemplo da leucina, ocasionando, por consequência, uma redução característica na síntese proteica.

Analisando imunohistoquimicamente o intestino verificou-se que o Match[®] não induz apoptose no epitélio intestinal, sugerindo que a degeneração ocorra por um processo necrótico, caracterizado pela perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Grivicich *et al.* (2007) sugerem que estas etapas são característica deste tipo de processo. Estes autores ainda afirmam que a necrose não é apenas uma resposta passiva a injúria celular, podendo ser, regulada geneticamente. Pesquisas realizadas por Qi *et al.* (2011) em lagartas *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com o um componente inseticida extraído da casca da raiz do agridoce chinês (*Celastus angulatus* Maxim) resultou em morte celular por necrose, com a lise da membrana plasmática e o vazamento do conteúdo citoplasmático para o lúmen do intestino médio.

As análises histológicas dos testículos mostram que os grupos do tratamento com Match[®] após 120 horas tiveram uma redução do número de espermatozoides em comparação com o controle. Ao que parece, a espermiogênese (transformação das espermatídes em espermatozoides) foi afetada. Além disso, grande parte dos folículos apresentam uma pequena separação entre si, sugerindo a hipótese de que o tecido conjuntivo que forma os septos (cobertura peritoneal) esteja em processo de desintegração. Vale ressaltar que o Match[®] é um inseticida regulador de crescimento, atuando como inibidor da síntese de quitina, porém apresenta efeitos ligados a capacidade reprodutivas dos insetos (Storch *et al.* 2007). Resultados semelhantes aos experimentos foram encontrados por Cruz *et al.* (2014) e Alves *et al.* (2013) que também relataram redução do número de espermatozoides e baixo processo de diferenciação das espermatídes nos testículos de lagartas de *S. frugiperda* tratadas com óleos essenciais de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*, L.) e Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*, C. DC.), respectivamente, visto que muitos óleos essenciais possuem um modo de ação semelhante a inseticidas sintéticos.

A redução significativa nos teores de carboidratos neutros nos testículos do tratamento com Match[®] após 120 horas, confirmam a hipótese de que essas macromoléculas são importantes fontes de energia para os insetos e ficam armazenados no corpo gorduroso na forma de glicogênio (Oliveira & Cruz-Ladim 2003). Entretanto, como o processo de absorção foi afetado, tal molécula tem seu uso requerido durante a espermiogênese. A não diferença do teor de proteínas no testículo pode estar relacionada ao fato de que sua principal fonte seja o corpo gorduroso, uma vez que no testículo, essa produção é limitada apenas a células da bainha (Miller *et al.* 1990).

A histologia dos ovários também revelou que o Match[®] causou patologias graves nessa região, como a desorganização do epitélio de células foliculares visto nos resultados, e isso provavelmente explica a redução na quantidade de vitelo dos oócitos do grupo tratado em

comparação ao controle, uma vez que a capacidade de absorção de nutrientes promovida por essas células e direcionadas aos oócitos pode ter sido comprometida. A histologia dos ovários de *S. frugiperda* quando tratadas com óleo de citronela também foi afetada, porém as patologias registradas foram estratificação das células foliculares, presença de lacunas circundadas por epitélio no interior do vitelário, espaços sem vitelo, células nutrizas pouco desenvolvidas e bainha conjuntiva mais delgada, não observadas nesse trabalho (Silva *et al.* 2016).

Os níveis de carboidratos neutros nos ovários do tratamento e do controle não foram significativamente diferentes. Esses carboidratos neutros são importantes fontes de energia para os insetos e ficam armazenados no corpo gorduroso na forma de glicogênio (Oliveira & Cruz-Ladim 2003). Sendo assim, uma possível explicação para essa não redução, está na capacidade que células do corpo gorduroso possuem de mudar suas atividades como resposta aos sinais nutricionais e hormonais a fim de suprir as necessidades dos insetos, sendo um dos tecidos mais importantes para os processos de manutenção e reprodução (Roma *et al.* 2010, Gullan & Cranston 2012).

Com relação à diminuição do teor de proteínas nos ovários dos insetos tratados com Match[®], pode-se atribuir a um possível aumento na atividade das células foliculares, pois além de proteger e nutrir o oócito em crescimento e formar o córion, estão envolvidas também na vitelogênese, onde produzem proteínas precursoras do vitelo nos oócitos em maturação (McKearin *et al.* 2005, Swevers *et al.* 2005).

A taxa de desenvolvimento folicular pode ser alterada em mais de 60 vezes, em insetos como *D. melanogaster* Meigen, em dietas pobres em proteína (Drummond-Barbosa & Spradling 2001). Essa alteração do nível proteico também foi notada no mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) quando exposto à ésteres metílicos de ácidos graxos durante 1 hora, e em *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), que não só teve seus níveis de

proteínas alterados, mas também os de carboidratos e lipídios quando expostos a diferentes concentrações de metais pesados como Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) (Baghban *et al.* 2014). Esses resultados histoquímicos são de suma importância, pois os carboidratos e as proteínas servem como precursores do metabolismo de diversas substâncias, e sua redução ocasiona efeitos indesejáveis em diversos processos fisiológicos.

Todas essas complicações histológicas e histoquímicas vistas nas gônadas podem estar associadas às patologias encontradas no intestino médio, pois a descamação, desorganização estrutural e vacuolização das células colunares pode impedir e/ou retardar o processo de absorção e transformação dos nutrientes. A diminuição na reprodução pode estar geralmente associada a distúrbios alimentares e deficiência nutricional. Engelman (1998), por exemplo, afirmou que o número de ovários pode ser modificado pela quantidade e qualidade dos nutrientes e metabólitos secundários obtidos durante a diferenciação dos ovários por ovário, trazendo, como consequência, alterações no processo de vitelogênese, maturação de óvulos e produção de ovos.

Mas isso também pode estar relacionado ao fato do Match[®] apresentar ação transovariana como visto nos experimentos de Ávila & Nakano (1999). Estes autores observaram que *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae), quando alimentados com folhas de feijão tratadas com Match[®] durante 13 dias, após o acasalamento, reduziam o número médio de ovos por fêmea (177,5) e a viabilidade dos ovos obtidos dos casais tratados (19,8%) em comparação aos casais não tratados, os quais tiveram fecundidade média de 375,4 ovos/fêmea e viabilidade de ovos de 68,7%. Resultados semelhantes foram encontrados por Pratissoli *et al.* (2004) quando submeteram *S. frugiperda* ao Match[®], que comprometeu a viabilidade média dos ovos consideravelmente, em todas as dosagens usadas, principalmente a dosagem recomendada pelo fabricante (4,75%), com redução de 93% em comparação ao grupo controle. Os autores ainda afirmam que essa ação transovariana pode ser constatada pelo desenvolvimento embrionário,

observado através do córion dos ovos do tratamento, uma vez que após 3 – 4 dias apresentavam-se “murchos”.

Sendo assim, conclui-se que o inibidor de síntese de quitina Match[®] é capaz de provocar alterações patológicas na estrutura histológica e histoquímica do epitélio do intestino médio e das gônadas de adultos de *A. grandis*, refletindo nos processos de espermatogênese e oogênese, apresentando-se como uma ferramenta promissora para o controle desta importante praga da cotonicultura.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado.

Literatura Citada

Almeida, R.P., C.A. Domingues & F.S. Ramalho. 2013. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. Campina Grande, Embrapa Algodão, 59p.

Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F. M. Cunha. 2013. Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 11: 1-11.

Arrese, E.L., A.D. Howard, R.T. Patel, O.J. Rimoldi & J.L. Soulages. 2010. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. Insect Biochem. Mol. Biol 40: 91-99.

Aslanturk, A., S. Kalender, M. Uzunhisarcikli & Y. Kalender. 2011. Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. J. Entomol. Res. Soc. 13: 27-38.

Ávila, C.J. & O. Nakano. 1999. Efeito do Regulador de Crescimento Lufenuron na Reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). An. Soc. Entomol. Brasil 28: 293-299.

- Baghban, A., J.J. Sendi, A. Zibae & R. Khosravi. 2014.** Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pl. Prot. Res. 54: 367-373.
- Buyukguzel, E. & Y. Kalender. 2009.** Exposure streptomycin alters oxidative and antioxidative response in larval midgut tissues of *Galleria mellonella*. Pestic. Biochem. 94: 112-118.
- Chiang, A.S., D.F. Yen & W.K. Peng. 1986.** Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 4: 333-39.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, M.O. Breda, T.J.S. Alves, F.M. Cunha, A.A.C. Teixeira, K.A. Dutra & D.M.A.F. Navarro. 2014.** Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales:Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without Formulated Bta on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 107: 144-153.
- Cunha, F.M., F.H. Caetano, V. Wanderley-Teixeira, J.B. Torres, A.A.C. Teixeira & L.C. Alves. 2012.** Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on Bt-cotton. Micron 43: 245-250.
- Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, B.F. Pereira, F.H. Caetano, J.B. Torres, G.G. Goncalves & F.A.B. Santos. 2015.** Effects of Pymetrozine on biochemical parameters and the midgut ultrastructure of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae). Anim. Biol. 65: 271-285.
- Drummond-Barbosa, D. & A.C. Spradling. 2001.** Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. Develop. Biol. 231: 265-278.
- Dubovskii, I. M., O. A. Olifrenko and V. V. Glupov. 2005.** Level and activities of antioxidants in intestine of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) at peroral infestation by bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*, J. Evol. Biochem. Physiol. 41: 20-25.
- Engelmann, F. 1998.** *In vitro* germplasm conservation. Acta Hort. 461: 41-47.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S.R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ/USP, 920p.
- Gregorc, A. & J.D. Ellis. 2011.** Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. Pestic. Biochem. Physiol. 99: 200-207.

- Grivicich, I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev. Bras. Cancerol.* 53: 335-343.
- Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca 494p.
- Huang, N., S. Civciristov, C.J. Hawkins & R.J. Clem. 2013.** SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 43: 444-454.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira, 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan 123p.
- Knaak, N., M.S. Tagliari & L.M. Fiuza. 2010.** Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arq. Inst. Biol.* 77: 83-89.
- Kramer, K.J. & S. Muthukrishnan. 2005.** Chitin metabolism in insects, p. 193-225. *In* L.I. Gilbert, K. Iatrou & S.S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Pergamon, 3300p.
- Leonardi, M.G., S. Cappellozza, Ianne, P. Cappellozza, L. Parenti, P. & B. Giordana. 1996.** Effects of the topical application of an insect growth regulator (fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 113: 361-365.
- Leonardi, M.G., P. Marciani, P.G. Montorfano, S. Cappellozza, B. Giordana & G. Monticelli. 2001.** Effect of fenoxycarb on leucine uptake and lipid Composition of midgut brush border membrane in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 70: 42-51.
- Mansur, J.F., J. Figueira-Mansur, A.M. Santos, H. Santos-Junior, I.B. Ramos, M.N. Medeiros, E.A. Machado, C.R. Kaiser, S. Muthukrisnan, H. Masuda, A.M.H. Vasconcellos, A.C.A. Melo & M. F. Moreira. 2010.** The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98: 59-67.
- McKearin, D., D.A. Dansereau & P. Lasko. 2005.** Oogenesis, p. 39-85. *In* L.I. Gilbert, K. Iatrou & S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Pergamon, 3300p.
- Miller, S.G., R.F. Leclerc, S.J. Seo & C. Malone. 1990.** Synthesis and transport of storage proteins by testes in *Heliothis virescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14: 151-170.
- Moreira, M.F., A.S. Santos, H.R. Marotta, J.F. Mansur, I.B. Ramos, E.R. Machado, G.H.M.F. Souza, M.N. Eberlin, C.R. Kaiser, K.J. Kramer, S. Muthukrishnan & A.M. H. Vasconcellos. 2007.** A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggs shells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 1249-1261.

- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociência* 11: 195-205.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Histochemistry: theoretical and applied. London, Churchill, 998p.
- Pratissoli, D., R.T. Thuler, F.F. Pereira, E.F. Reis & A. T. Ferreira. 2004.** Ação transovariana de lufenuron (50g/l) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ciênc. Agrotec.* 28: 9-14.
- Qi, Z., B. Shi, Z. Hu, Y. Zhang & W. Wu. 2011.** Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separate* walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 439-444.
- Roma, G.C., O.C. Bueno & M.I. Camargo-Mathias. 2010.** Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron* 41: 395-401.
- Rosas-Mejía, M., A. Correa-Sandoval, C.S. Venegas-Barrera & J.V. Horta-Veja. 2015.** Preferências entre cinco carboidratos em *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zool. Mex.* 31: 291-297.
- Sarwade, A.B. & G.P. Bhawane. 2013.** Anatomical and histological structure of digestive tract adult *Platynotus belli*. *F* (Coleoptera: Tenebrionidae). *BFIJ* 5: 47-55.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & A.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) treated with citronela oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118: 347-352.
- Silva, L.N.D., L.A.R.S. Lima, S.N. Alves, V.F. Cortes, H.L. Santos & L.A. Barbosa. 2013.** Avaliação de dois ésteres metílicos de ácidos graxos no perfil bioquímico e na atividade da na, k atpase de larvas de *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. Biotechnol. Rep.* 2: 54-56.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. *Am. J. Roentgenol.* 192: 330-334.
- Spies, A.G. & K.D. Spence. 1985.** Effect of a sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca sexta*: a SEM study. *Tissue Cell* 17: 379-394.
- Storch, G., A.E. Loeck, R.S. Borba, D.A. Magano, C.L. Moraes & A.D. Grützmacher. 2007.** Efeito de inseticidas aplicados em doses subletais sobre a dieta artificial e em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Agrociência* 13: 175-179.

Swevers, L., A.S. Raikhel, T.W. Sappington, P.D. Shirk & K. Iatrou. 2005. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. *In* L.I. Gilbert, K. Iatrou & S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, Pergamon, 3300p.

Temitope, O.O. 2013. Morphology and histology of the alimentary tract of adult palm weevil, *Rhynchophorus phoenicis* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae). *J. Develop. Biol. Tissue Eng.* 5: 13-17.

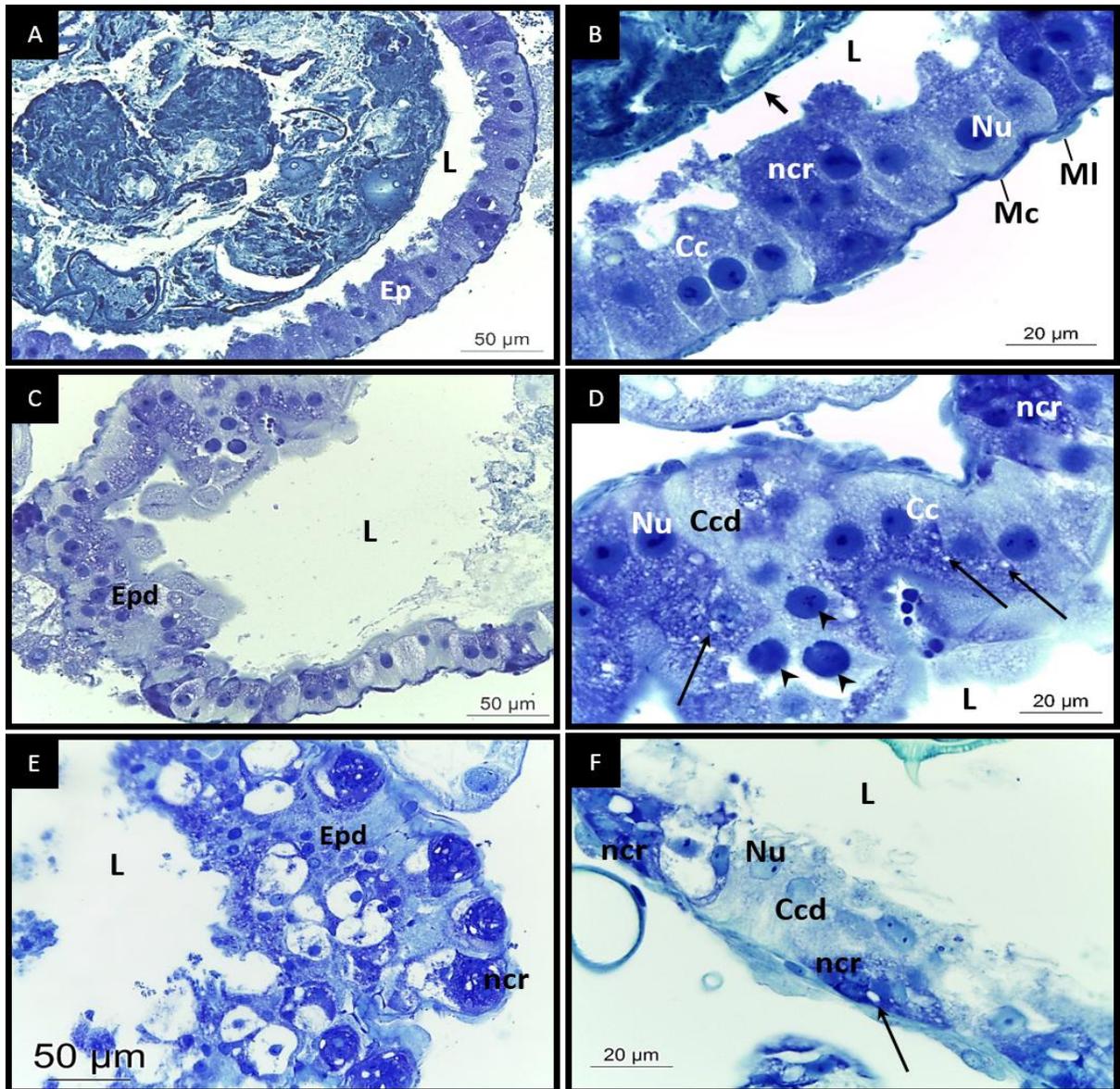


Figura 1. Corte transversal do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B, controle. Em C e D, tratado com Match[®] após 24 h. Em E e F, tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração Azul de Toluidina. A – observar vista geral do intestino médio e em B, detalhe do intestino médio exibindo células colunares (Cc) com núcleos (Nu) distribuídos na região mediana da célula, nota-se ainda as células regenerativas formando ninhos (ncr) e revestindo externamente o órgão evidenciar músculo circular (Mc) e músculo longitudinal (MI). Notar ainda a presença da matriz peritrófica (seta curta) no lúmen (L). C – Notar desorganização do intestino médio. D – Detalhe das alterações nas células colunares (Ccd) com vários núcleos ejetados para o lúmen intestinal (ponta de seta) e presença de vários vacúolos (setas longas). E. Verificar desorganização do intestino médio Epd, com grande quantidade de vacúolos e presença de vários ninhos de células regenerativas. F – notar detalhes da desorganização nas células colunares com vacúolos e células regenerativas formando ninhos.

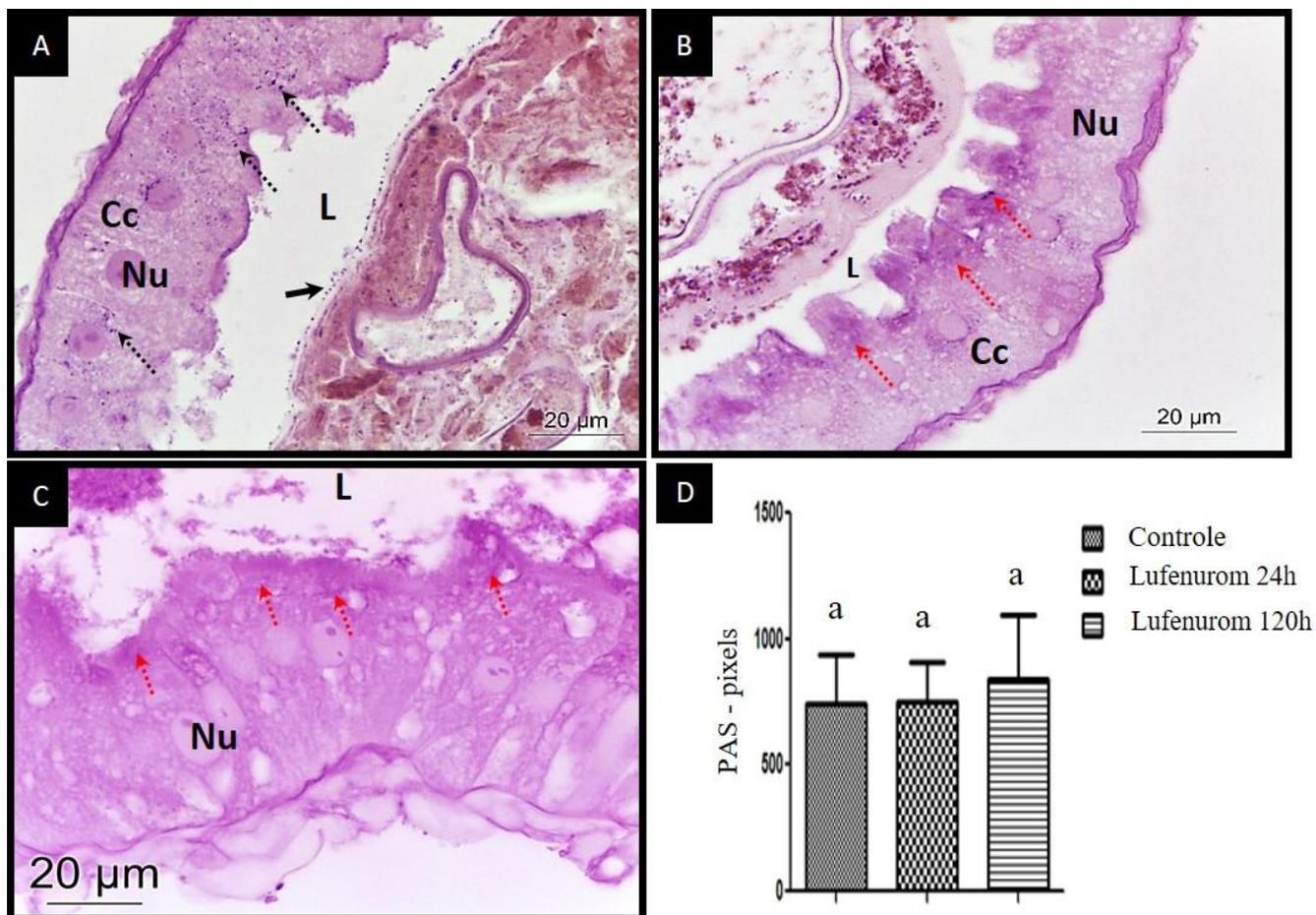


Figura 2. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para polissacarídeos neutros. Em A controle. Em B, tratado com Match® após 24 h. Em C, tratado com Match® após 120 horas. Coloração P.A.S. A – notar distribuição uniforme de grânulos de glicogênio no citoplasma das células (setas pontilhadas) e matriz peritrófica (seta pequena). B e C – evidenciar mudança no padrão de distribuição de grânulos de glicogênio para o ápice das células (setas pontilhadas vermelhas). D – quantidade média de pixels para polissacarídeos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$. L (Lúmen); Cc (Células colunares); Nu (núcleo); Seta pequena (matriz peritrófica).

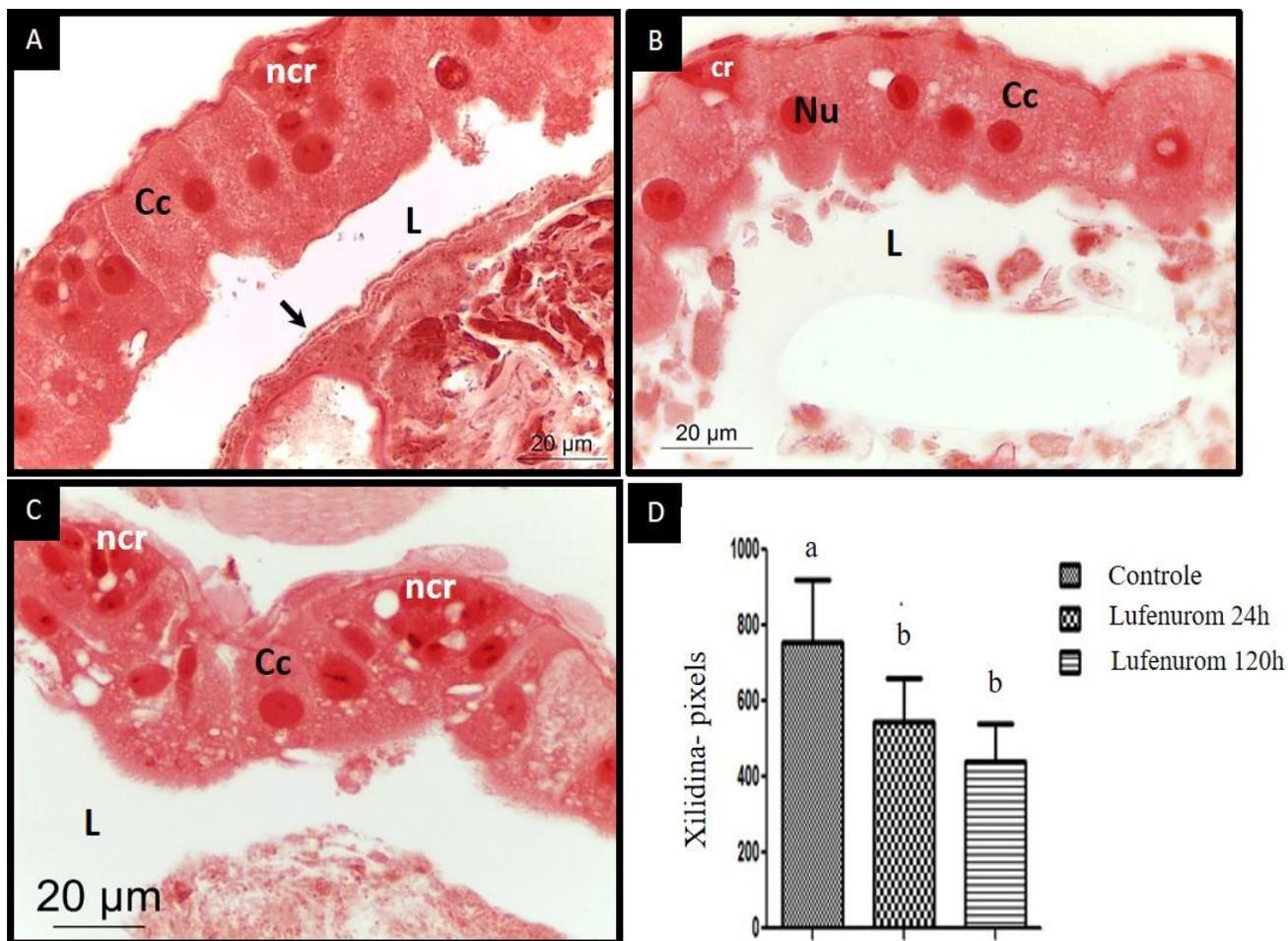


Figura 3. Histoquímica do intestino médio de adultos de *Anthonomus grandis* para proteínas totais. Em A controle. Em B, tratado com Match[®] após 24 h. Em C, tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração Xilidina Ponceau. D – quantidade média de pixels para proteína total. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$. L (Lúmen); Cc (Células colunares); Nu (núcleo); cr (célula regenerativa); ncr (ninho de células regenerativas); Seta pequena (matriz peritrófica).

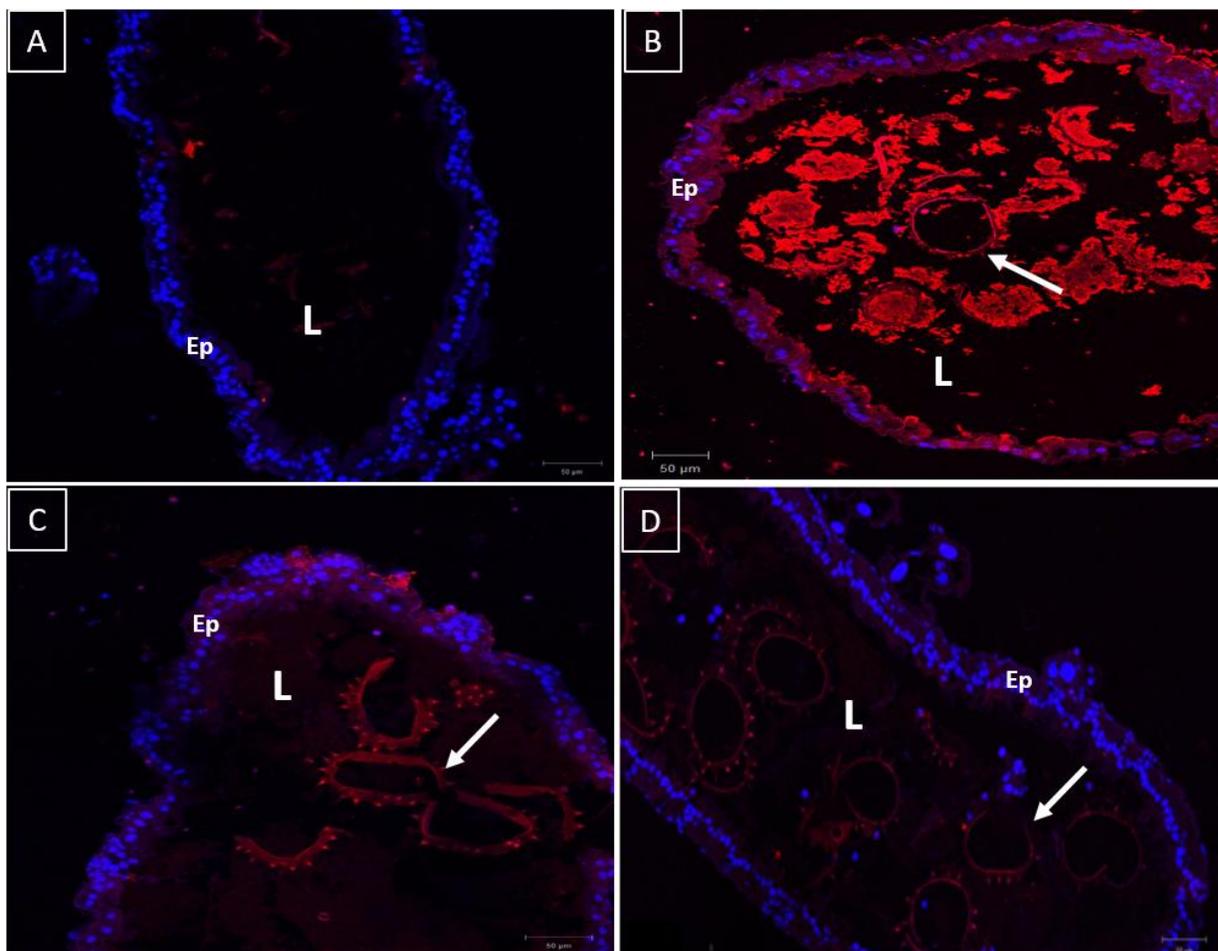


Figura 4. Imunofluorescência para detecção de apoptose no Intestino Médio de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A controle de 24 horas. Em B tratado com Match[®] durante 24 horas. Em C controle de 120 horas. Em D tratado com Match[®] após 120 horas. Observar núcleos normais emitindo fluorescência azul em todos os grupos. Seta (Grão de Pólen); Ep (Epitélio); L (Lúmen).

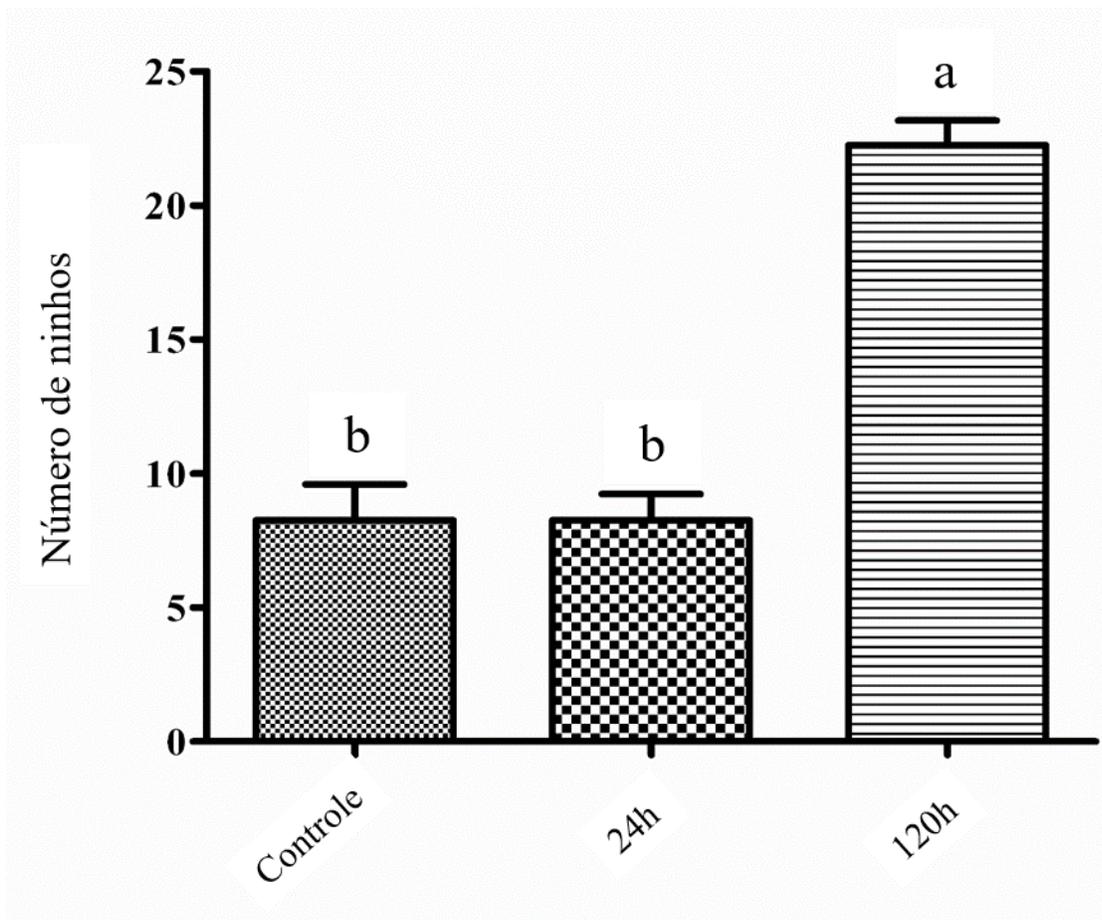


Figura 5. Médias do número de ninhos de células regenerativas no intestino médio de *Anthonomus grandis*, 24 e 120 horas após tratamento com lufenuron. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Comparações Múltiplas de Dunn's ($p < 0,05$).

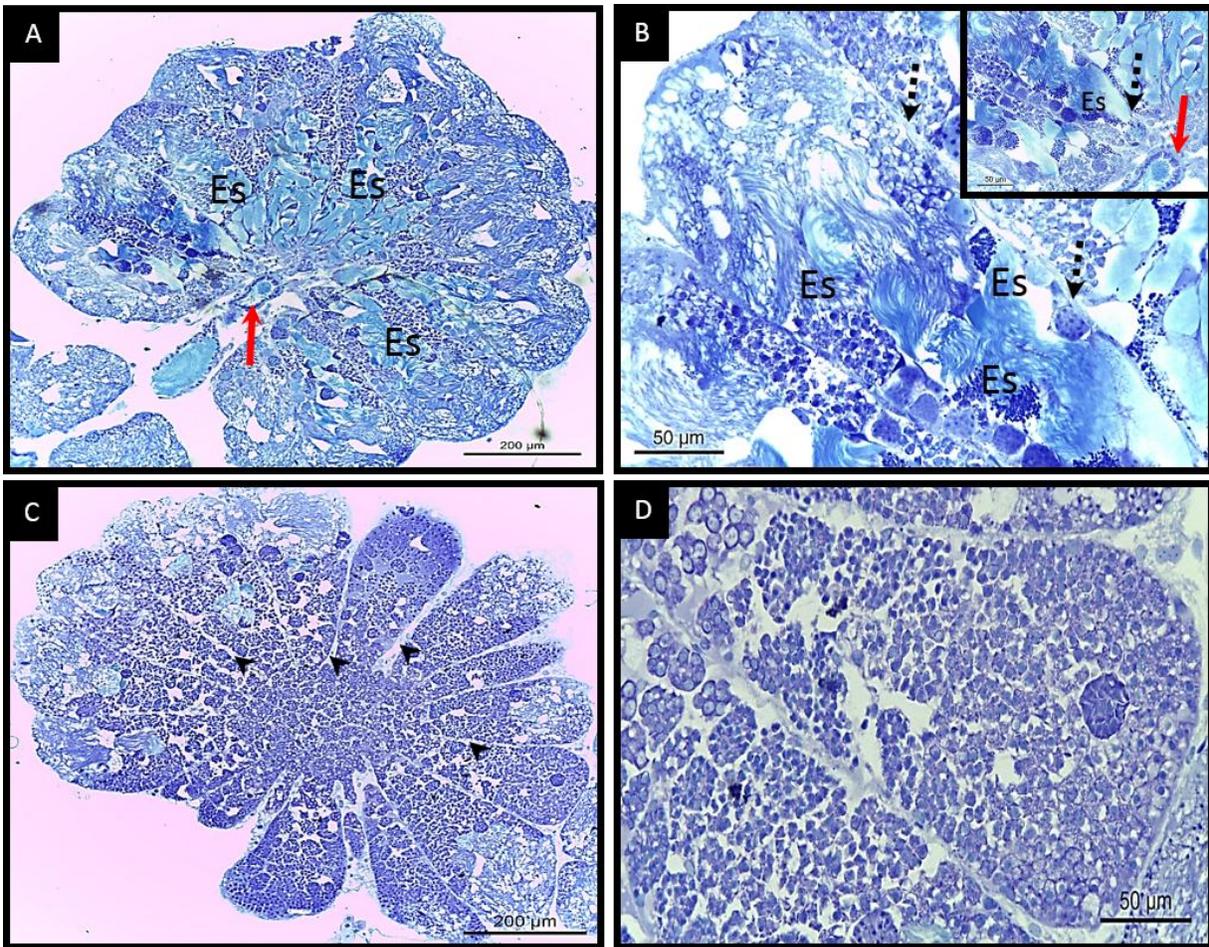


Figura 6. Testículos de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C e D tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração Azul de Toluidina. A - observar vista geral do testículo com vários espermatozoides (Es) sendo direcionados para o vaso deferente (seta vermelha), em B, detalhe de um folículo testicular com bastantes espermatozoides em formação (Es) e, em destaque, continuação do folículo testicular até o vaso deferente (seta vermelha). C - notar vista geral dos testículos tratados e espaços entre os folículos (ponta de seta). D - reparar detalhe de um folículo testicular sem espermatozoide formado. Cobertura peritoneal (seta pontilhada).

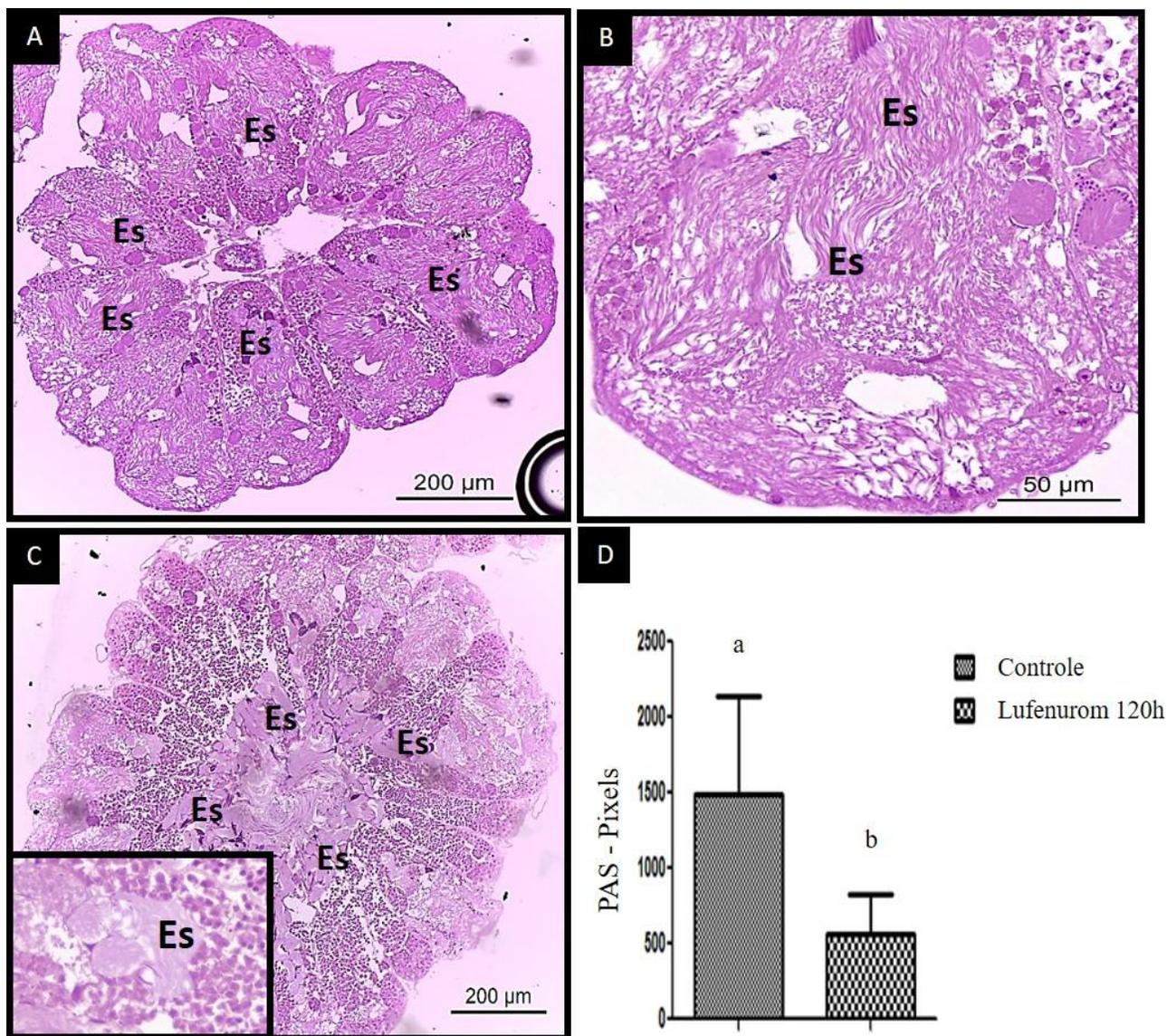


Figura 7. Histoquímica dos testículos de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração P.A.S. A e B – verificar maior reação de positividade ao P.A.S. nos espermatozoides (Es) do controle em comparação aos espermatozoides do tratamento C. Ainda em C, notar destaque dos espermatozoides com pouca positividade ao corante. D - quantidade média de pixels para polissacarídeos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

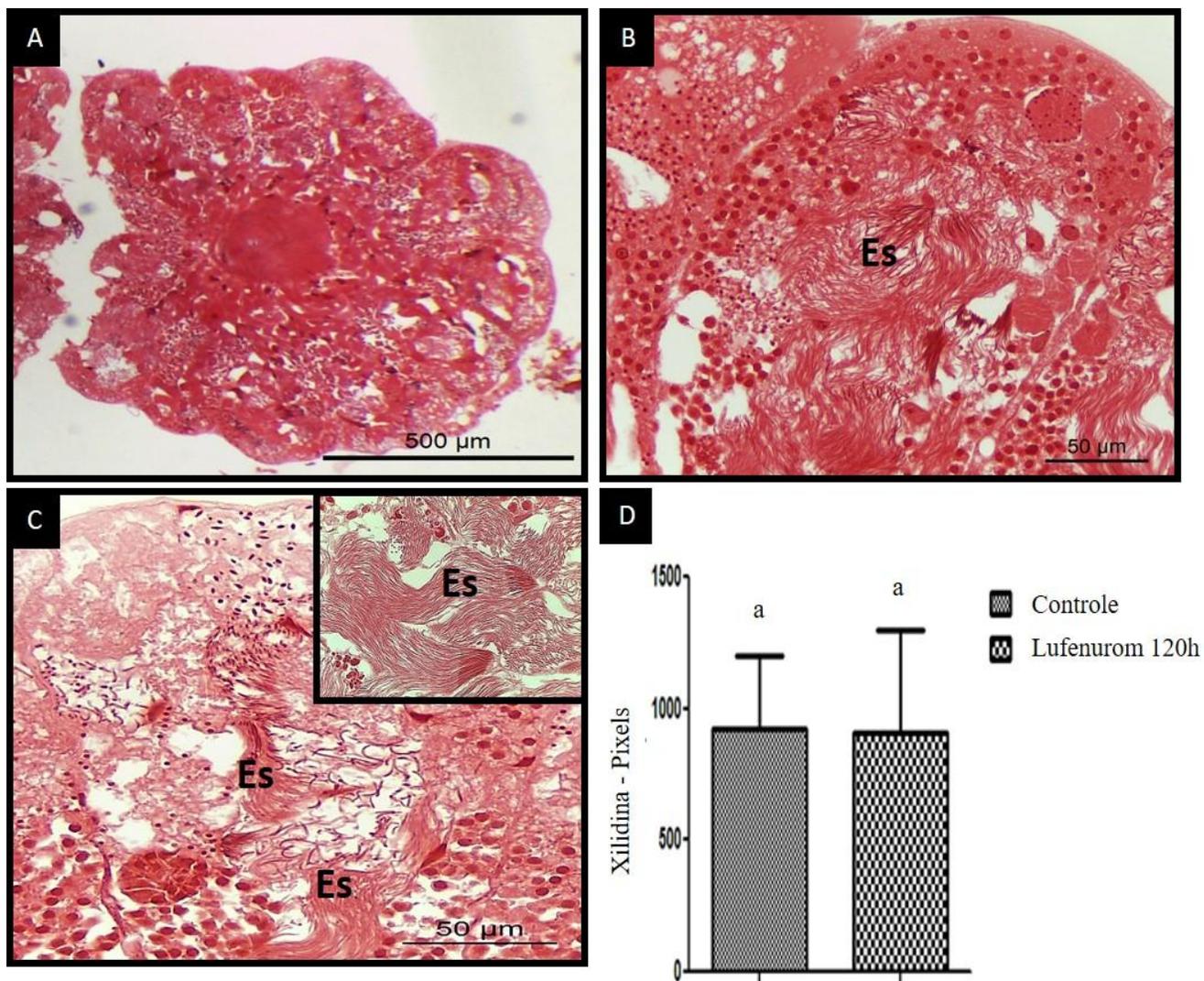


Figura 8. Histoquímica dos testículos de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração Xilidina Ponceau. A e B – notar maior reação do corante Xilidina Ponceau nos espermatozoides (Es) do grupo controle em relação aos espermatozoides do grupo tratamento C. Ainda em C, observar espermatozoides em destaque. D - quantidade média de pixels para proteínas totais. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

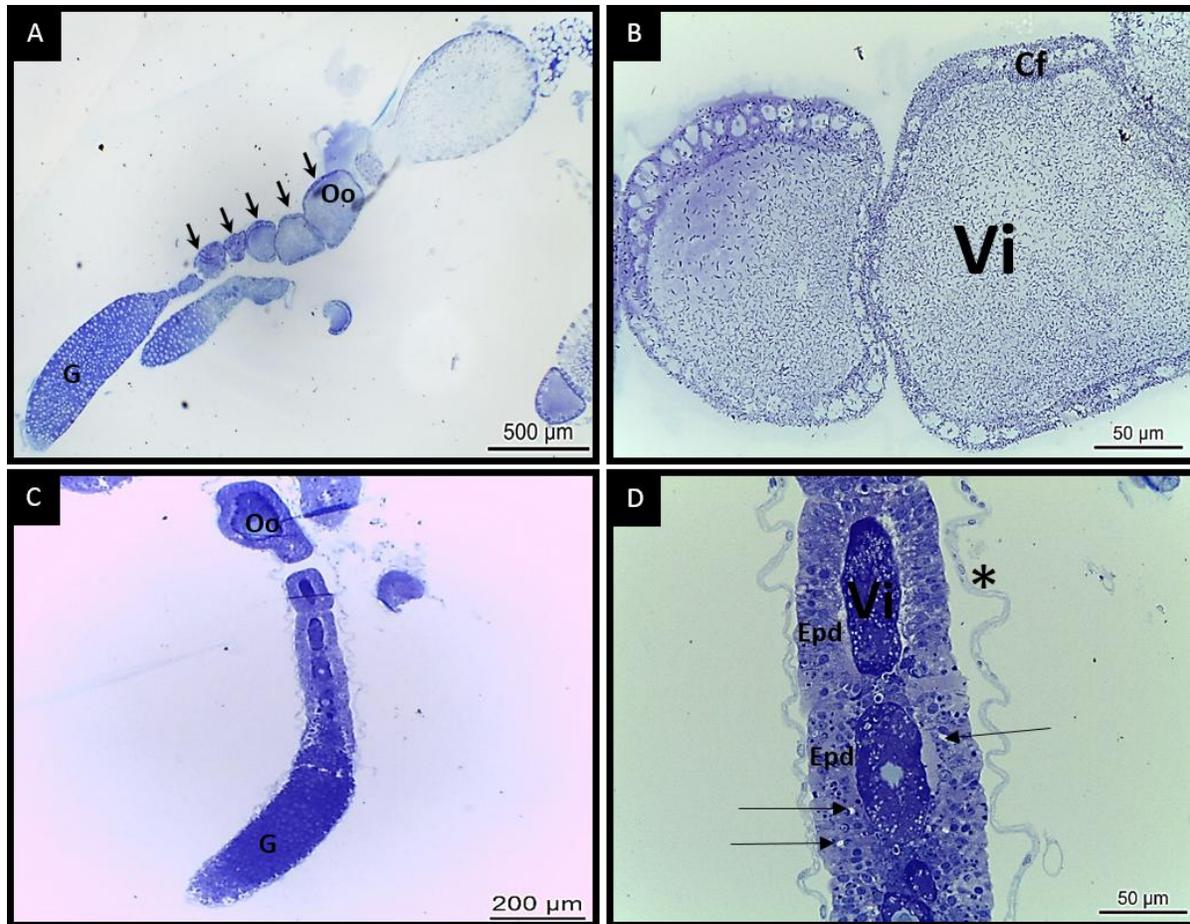


Figura 9. Ovariolos de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C e D tratado com Match[®] após 120 horas. Coloração Azul de Toluidina. A e B - observar ovariolo com germário (G) e vitelo (Vi) bem desenvolvidos, com presença de oócitos (Oo) em vários estágios de maturação (setas). C e D – notar pouca quantidade de vitelo (Vi) nos oócitos (Oo) em maturação, epitélio de células foliculares desorganizado (Epd) e vacuolização nas células foliculares (seta longa). Cf (Células foliculares); Asterisco (Bainha de Tecido Conjuntivo).

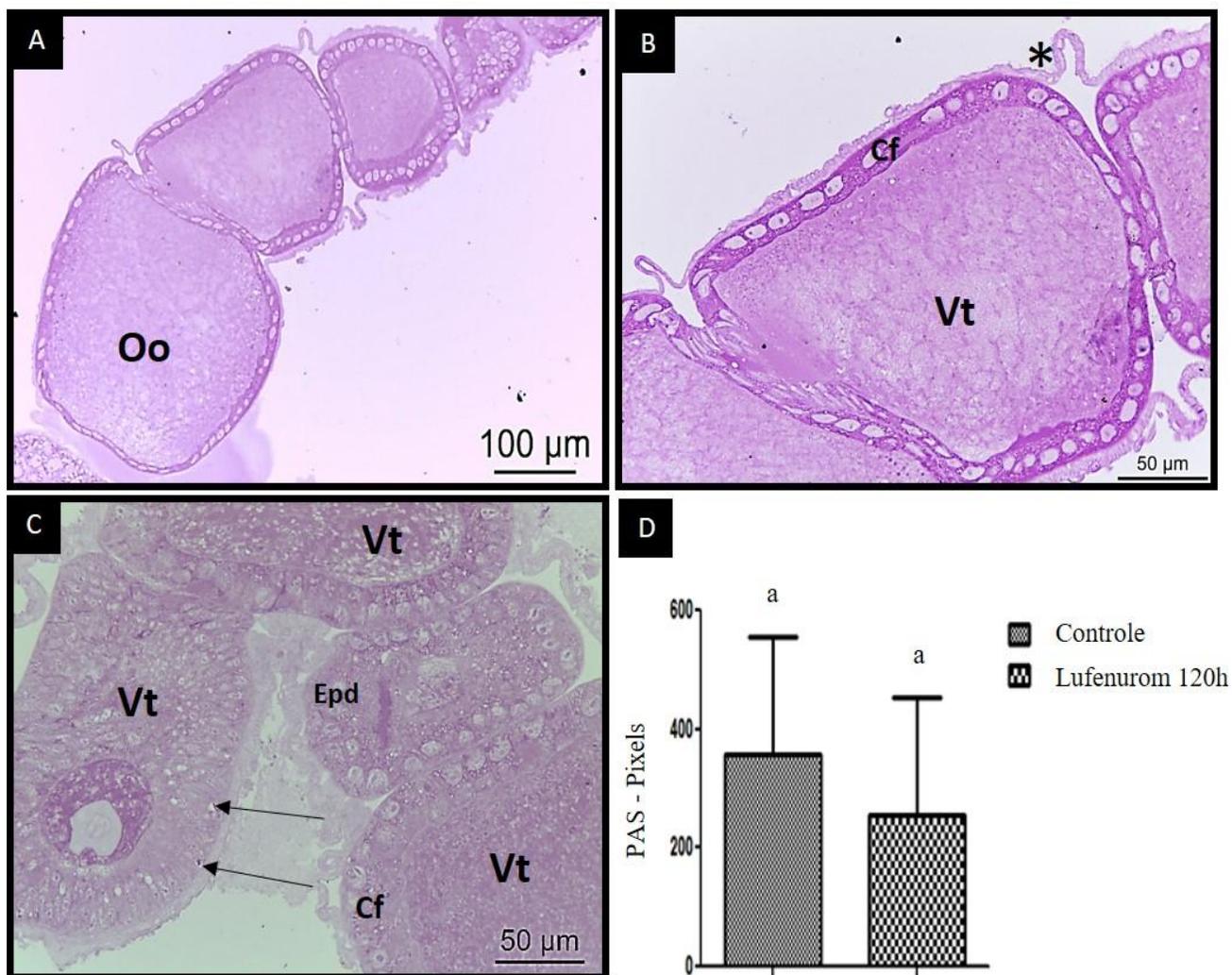


Figura 10. Histoquímica dos ovariolos de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C tratado com Match® após 120 horas. Coloração P.A.S. A e B – verificar maior reação de positividade ao P.A.S. no ovariolo do grupo controle. C – notar menor reação de positividade ao P.A.S. D - quantidade média de pixels para polissacarídeos neutros. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Oócitos (Oo), Desorganização do epitélio (Epd), Vacúolos (seta longa) e Bainha de Tecido Conjuntivo (asterisco).

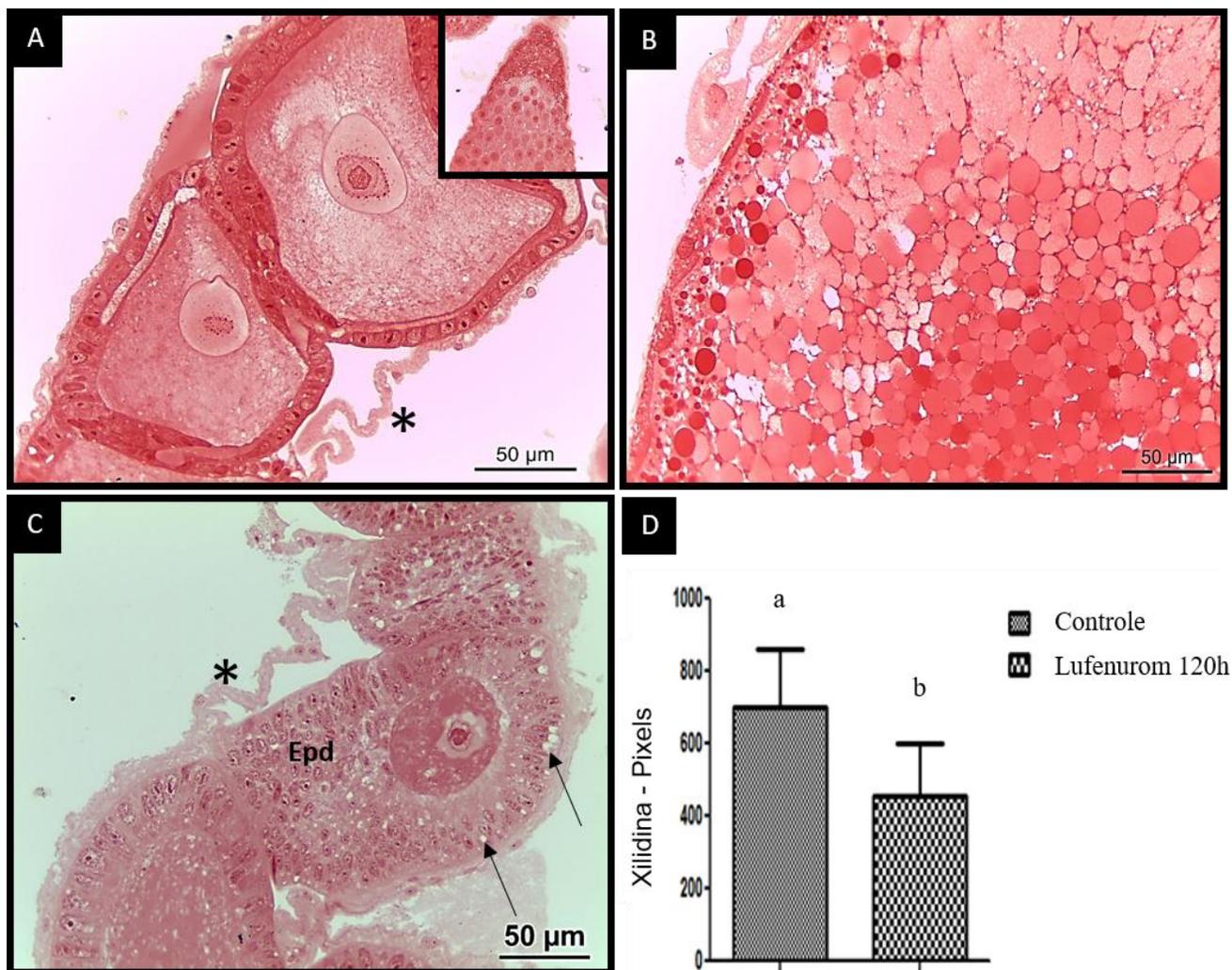


Figura 11. Histoquímica dos ovários de adultos de *Anthonomus grandis*. Em A e B controle. Em C tratado com Match® após 120 horas. Coloração Xilidina Ponceau. A e B – verificar maior detecção de proteínas no ovário do controle em relação ao ovário do grupo tratamento C. Ainda em A notar germário em destaque. D - quantidade média de pixels para proteínas totais. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Epd (Desorganização do epitélio); seta longa (Vacúolos); Asterisco (Bainha de Tecido Conjuntivo).

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento realizado mostrou que o Match[®] (lufenurom) inibiu a síntese de quitina da matriz peritrófica no intestino médio de adultos tratados, promovendo, por sua vez, complicações na estrutura histológica e padrões histoquímicos tanto do epitélio dessa região quanto das gônadas (testículos e ovários). Os resultados aqui obtidos são de suma importância e fornecem uma grande contribuição para o conhecimento do modo de ação dessa molécula na fisiologia de uma importante praga do algodoeiro. Não obstante, mais pesquisas são necessárias para um maior conhecimento desses resultados a nível ultraestrutural.