

ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DO MESÊNTERO DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE À TOXINA Cry1Ac

POR

MARIA ESMERALDA CAVALCANTE DE SOUSA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira)

RESUMO

Alabama argillacea (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga desfolhadora da cultura do algodão, provocando perdas entre 21 e 35%. Plantas transgênicas que expressam proteínas tóxicas de genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) foram recentemente liberadas no Brasil. O algodão Bt AcalaDTL-90B, que expressa a proteína Cry1Ac, é resistente às principais pragas da Ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão.. Embora as toxinas de *Bt* interajam com pelo menos um receptor final, desencadeando o efeito tóxico, vários fatores endógenos estão associados à seletividade diferencial das toxinas *Bt*. Desta forma, estudos da interação da Cry1Ac com o intestino de insetos pragas do algodoeiro são de fundamental importância. Assim, esta pesquisa objetivou descrever histoquimicamente, morfológicamente e ultra-estruturalmente o mesêntero de larvas de *A. argillacea* alimentadas com a isolinha (AcalaDTL-90), bem como algodão-Bt (AcalaDTL-90B). As características morfológicas, histoquímicas e ultra-estruturais do mesêntero de *A. argillacea*, de modo geral, foram semelhantes às descritas na literatura para a maioria dos insetos da Ordem Lepidoptera. No entanto, o polimorfismo mitocondrial e microvilosidades bifurcadas sugerem uma modificação ultra-estrutural e fisiológica, que pode ocasionar uma maior absorção e secreção nas células colunares. Tal hipótese pode favorecer uma ação mais rápida de toxinas e/ou agentes microbianos,

sugerindo que esta espécie pode ser altamente suscetível para alguns destes agentes. Larvas de 4º instar após 20 min de alimentação com folhas de algodão Bt (AcalaDTL-90B) mostraram modificações na parede do mesêntero de *A. argillacea*. Neste tempo de alimentação, foram observadas alterações morfológicas e ultra-estruturais nas células colunares e caliciformes, sendo mais expressivas nessas últimas. Também houve uma redução no número das células regenerativas, degeneração da camada muscular e destruição da membrana peritrófica em algumas regiões do mesêntero. Assim, conclui-se que a toxina Cry1Ac age relativamente rápida no mesêntero da *A. argillacea*, ocasionando alterações drásticas e irreversíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Bollgard I[®], microscopia, *Bacillus thuringiensis* curuquerê-do-
algodoeiro, canal alimentar, histoquímica

MORPHOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF MIDGUT OF *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRONT TO THE TOXIN Cry1Ac

by

MARIA ESMERALDA CAVALCANTE DE SOUSA

(Under the direction of Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

The cotton leafworm, *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is an important cotton pest in Brazil, occurring almost in the whole growing season and causing economic losses between 21 and 35%. Bt cotton expressing Cry1Ac protein, a toxin from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt), has recently been released in Brazil. It is resistant to the main cotton lepidopteran pests occurring in Brazil. Bt toxins must interact with a receptor to trigger a toxic effect, although other endogenous factors may account for the differential Bt toxins selectivity towards insects. Therefore, studies on the Cry1Ac interaction with the cotton pests midguts are important to understand insect responses when exposed to the Bt cotton. Then, the aim of this work was to provide an histochemical, morphological, and ultrastructural description of the midgut of *A. argillacea* larvae fed with the isoline cotton (AcalaDTL-90) and the Bt cotton (AcalaDTL-90B). The morphological, histochemical, and ultrastructural characteristics of the *A. argillacea* midgut were very similar to those previously described for most lepidopterans. However, the mitochondrial polymorphism and bifurcate microvilli suggest an ultrastructural and physiological modification, which may cause a higher absorption and secretion in the columnar cells. Such hypothesis may account for faster toxin and/or microbial agent action, suggesting that this species may be highly susceptible to some of

these agents. After 20 min, *A. argillacea* 4th-instar larvae feeding on Bt cotton leaves (AcalaDTL-90B) showed alterations on the midgut walls. During that time, morphological and ultrastructural alterations in the goblet and columnar cells were observed, although more prominent on the former. Also, a reduced number of regenerative cells, a deterioration of the muscle layer, and the peritrophic membrane destruction in some midgut regions were observed. The study overall conclusion is that the Cry1Ac toxin acts relatively fast in the *A. argillacea* midgut, causing severe and irreversible alterations.

KEY WORDS: Bollgard I[®], microscopy, *Bacillus thuringiensis*, cotton leafworm, food channel, histochemical

ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DO MESÊNTERO DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE À TOXINA Cry1Ac

por

MARIA ESMERALDA CAVALCANTE DE SOUSA

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 - 2009

ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DO MESÊNTERO DE *Alabama*
argillacea (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE À TOXINA Cry1Ac

por

MARIA ESMERALDA CAVALCANTE DE SOUSA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Fábio André Brayner dos Santos – CPqAM-FIOCRUZ

RECIFE - PE

Fevereiro - 2009

ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DO MESÊNTERO DE *Alabama*
argillacea (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE À TOXINA Cry1Ac

por

MARIA ESMERALDA CAVALCANTE DE SOUSA

Orientador:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores:

Luiz Carlos Alves – CPqAM-FIOCRUZ

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Aos meus pais, Abílio e Josefa
Por quem tenho grande amor, respeito e carinho
Por serem o meu porto seguro

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) pela oportunidade de execução deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Deus, por iluminar meus passos me dando sabedoria, proteção e principalmente muita força para vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais Abílio Bernardo e Josefa Cavalcante, aos meus irmãos e sobrinhos que apesar de todas as dificuldades sempre estiveram ao meu lado e se esforçaram para que eu pudesse continuar minha jornada.

A minha Orientadora Valéria Wanderley Teixeira pelas condições de trabalhos oferecidas, pela orientação e apoio, pelos ensinamentos constantes e principalmente pela confiança.

Aos meus co-orientadores e amigos Fábio Brayner e Luiz Carlos, pela confiança, pela orientação, ensinamentos, paciência, companheirismo, pelo estímulo e por todo o aprendizado durante minha jornada científica.

Ao meu co-orientador Herbert Álvaro A. de Siqueira pela amizade, pelos conhecimentos passados para execução deste trabalho.

Ao Professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pelos ensinamentos, aconselhamentos e valorosos empréstimos de separatas que foram indispensáveis para elaboração desta dissertação.

Ao Professor Jorge Braz Torres pelo auxílio na quantificação da toxina Cry1Ac e pelas orientações prestadas.

Aos Professores do PPGEA, Ailton Lôbo, Auristela Albuquerque, Edmilson Marques, Herbert Siqueira, Manoel Guedes, Reginaldo Barros, Souza-Leão, Valéria Teixeira e José Vargas.

Ao amigo Alexandre Conte pelo companheirismo, amizade sincera e presença constante em todos os momentos da minha vida profissional.

Aos amigos da Pós-Graduação Andréa Moreira, Solange, Agna, Vanessa, Tadeu pelos momentos sérios e de descontração.

Ao Professor Alex Benício da Silveira (UFPE) pela amizade e pela presteza no fornecimento de protocolos importantes para realização experimental deste trabalho.

Aos meus amigos Yara e Mineo Nacazawa pelos ensinamentos, respeito, apoio que sempre me deram e principalmente pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Alicely, Franklin, Ismaela, Hilda, Andresa, Solange, Mirna e Marcela pelos momentos de descontração, pelas palavras de incentivo e principalmente pela amizade.

Aos secretários da Coordenação da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia, Darci e Romildo pela amizade, presteza e dedicação.

Ao Professor José Luiz de Lima Filho pela infra-estrutura do LIKA que possibilitou a realização de uma das etapas deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica Rafael Padilha, Marília, Marcela, Guilherme, Juliana, Júnior, Kássia, Lídia, Adriana, Rita, Lânia e Diana pela amizade, carinho e pelos momentos de descontração.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que pudesse realizar este sonho.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA	05
2 MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO MESÊNTERO DE <i>Alabama argillacea</i> (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	17
AGRADECIMENTOS	21
LITERATURA CITADA	21
3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRA-ESTRUTURAIS DO MESÊNTERO DE <i>Alabama argillacea</i> (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADAS COM ALGODÃO Bt.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO.....	33

MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	40
AGRADECIMENTOS	43
LITERATURA CITADA	43

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O algodão se fez presente como uma cultura de exportação durante toda a história do Brasil, tendo picos de retomadas de crescimento sempre que havia problemas na produção norte-americana (Mendonça 1973, Takeya 1985). A produção nacional tornou-se firme e crescente, somente a partir de 1890, devido ao crescimento e consolidação da indústria têxtil no Brasil, no qual era produzido de 10 a 20% de excedentes para exportação (Takeya 1985, Beltrão 1996). Atualmente, o Brasil é considerado um dos principais produtores e exportadores do mundo, sendo superado apenas pela China, Estados Unidos, Índia e Paquistão (IBGE 2007).

A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em seu último levantamento de 2008, divulgou que a área cultivada com algodão no País totalizou 1,09 milhão de hectares, superior à safra anterior em 27,2% (232,5 mil hectares). Em relação ao mesmo levantamento a CONAB relata que as regiões Centro-Oeste e Nordeste participam com 93% da produção do País, com destaques para os estados de Mato Grosso e Bahia, principais produtores nacionais, onde a área foi acrescida em 50% e 19% respectivamente. Por outro lado, nos estados de São Paulo e Paraná, o algodão cedeu área para a cana-de-açúcar (CONAB 2007).

O sucesso da cultura do algodoeiro no cerrado foi impulsionado pelas condições de clima favorável, terras planas, que permitem a mecanização da lavoura, pela existência de programas de incentivo à cultura implementada pelos estados da região Centro-Oeste e, sobretudo, pelo uso intensivo de tecnologias modernas (Ibge 2005). Atualmente os principais estados produtores de algodão no País são: Mato Grosso, Goiás, Bahia, Mato grosso do Sul, Ceará, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (CONAB 2007). A perda da produtividade agrícola devido ao ataque de insetos

pode ser devastadora. Estima-se que, mundialmente, 15% das perdas da produção ocorrem devido a esses ataques (Braun *et al.* 1991).

O algodoeiro é atacado por um complexo de insetos incluindo pulgões, percevejos, mosca-branca e outras espécies de menor projeção. No entanto, o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae), é considerado a praga mais severa da cotonicultura brasileira, pelos danos que ocasiona e pela dificuldade do seu controle, e dentro da Ordem Lepidoptera a lagarta da maçã *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta rosada *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), e o curuquerê do algodoeiro *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), destacam-se como pragas chave dessa cultura (Miranda & Suassuna 2004, Embrapa Algodão 2008).

O curuquerê-do-algodoeiro, *A. argillacea* é um inseto que pode ocorrer em toda a fase do desenvolvimento da cultura, cujas lagartas alimentam-se das folhas e, por esta razão, é considerada a principal praga desfolhadora, e quando em alta densidade, pode desfolhar completamente as plantas, reduzindo consideravelmente a produção (Gravena & Cunha 1991, Jácome *et al.* 2001, Quirino & Soares 2001). Este inseto pode provocar perdas entre 21 e 35%, sendo observadas ocorrências freqüentes em qualquer local onde se plante o algodão, bem como em qualquer estágio fenológico da cultura (Bleicher *et al.* 1983, Gravena & Cunha 1991).

A importância socioeconômica do algodão está relacionada à questão do controle de insetos-praga por ser um dos fatores de maior custo na sua produção (Dias *et al.* 2002). O grande número de pulverizações requeridas é um dos fatores que oneram a produção, superando os gastos com aplicação de fertilizantes (Richetti *et al.* 2004). A necessidade de redução de custos, principalmente ao aumento da produtividade da cultura, deve ser buscada constantemente para que deste modo haja diminuição tanto dos valores finais de produção quanto do preço do produto ao consumidor. A adoção de medidas de controle enquadradas dentro do manejo integrado de

pragas (MIP) pode maximizar a produtividade da cultura, por utilizar táticas adequadas que venham reduzir os custos da produção (Embrapa 2002).

Alternativas de controle de insetos, incluindo a utilização de microrganismos entomopatogênicos como bactérias, fungos e vírus, plantas transgênicas que expressam genes de bactérias ou inibidores de proteinases de insetos, e inimigos naturais têm sido amplamente estudados (Betz *et al.* 2006). Esses agentes podem ser manipulados para o aumento da patogenicidade, ampliação do espectro de ação, produção industrial ou a incorporação de genes inseticidas em espécies vegetais levando à obtenção de plantas transgênicas (Perlak *et al.* 1990). Dos vários agentes microbianos que possuem atividade entomopatogênica, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Berliner), pertencente à família Bacillaceae que envolve o gênero de grande importância, *Bacillus* (Habib & Andrade 1998). O gênero *Bacillus* apresenta várias características que colocam suas espécies entre os agentes altamente promissores no controle de insetos pragas, como *B. thuringiensis* (Priest 2000).

A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* está relacionada com a produção de cristais com ação inseticida, que são sintetizados a partir da fase estacionária e acumulados no compartimento da célula-mãe durante a esporulação, podendo corresponder até 25% do peso seco das células (Aglaisse & Lereclus 1995). Uma das grandes vantagens de sua utilização é sua inocuidade ao homem e animais domésticos, além de seu efeito não poluente ao ambiente (Arango *et al.* 2002).

Cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas codificadas pelos genes *cry* e conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas cristal. Baseando-se na identificação dos aminoácidos, 96 seqüências gênicas da δ -endotoxinas foram distribuídas em 17 grupos (Peferoen, 1997). De acordo com Crickmore *et al.* (1998) as toxinas Cry1Aa1, Cry1Ab1, Cry1Ac1, Cry1Ad1, Cry1Ba1, Cry1Ca1, Cry1Ea1, Cry1Ia1, Cry2Aa1, Cry2Ac1 e Cry9Aa1 são tóxicas para

a Ordem Lepidoptera. Laboratórios em todo o mundo procuram estirpes com novas toxinas e outras características de patogenicidade, que possibilitem uma maior disponibilidade de princípios ativos que poderão ser usados para o estabelecimento de estratégias de controle.

O algodão BollgardTM, o milho MaximizerTM da Novartis, e a batata NewleafTM da Monsanto são exemplos de plantas geneticamente modificadas introduzidas no mercado norte-americano desde 1995, sendo genericamente conhecidas como plantas-Bt (Jouanin *et al.* 1998). A introdução de genes de Bt codificadores de proteínas tóxicas (δ -endotoxinas) no genoma dos vegetais permite a expressão contínua destas proteínas em todos os tecidos da planta, atingindo os insetos-praga que se alimentam dos seus tecidos (Boborowski *et al.* 2003). Uma vez presente no trato digestivo dos insetos suscetíveis, as proteínas tóxicas associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio (mesêntero) dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana, ruptura da integridade intestinal e conseqüente morte do inseto (Fiuza *et al.* 1996, Schnepf *et al.* 1998).

A toxina Cry1Ac liga-se a três receptores de diferentes maneiras para diferentes grupos de insetos e vários fatores endógenos estão associados à seletividade diferencial de toxinas Bt, incluindo a Cry1Ac (Hoffmann *et al.* 1998). Desta forma, estudos da interação desta toxina com o intestino de insetos pragas e seus inimigos naturais na cultura do algodão são de fundamental importância para aspectos da sobrevivência de ambos os grupos quando expostos ao algodão-Bt. Em decorrência dos questionamentos sobre os possíveis efeitos diretos e indiretos causados nos organismos alvos, por meio da utilização da toxina do algodão-Bt, esta pesquisa teve como objetivo descrever o mesêntero de larvas de *A. argillacea* alimentadas com a isolinha (Acala DP 90), e algodão-Bt (Acala DP 90B), esclarecendo os níveis de alterações morfológicas, ultra-estruturais e histoquímica.

Literatura Citada

- Aglaisse, H. & Lereclus, D. 1995.** How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriol. 177: 6027-6032.
- Arango, J.A., Romero, M. & Orduz, S. 2002.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombiawith insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Appl. Microbiol. 92: 466-474.
- Beltrão, N.E.M. 1996.** Informações sobre o algodão no Brasil: situação, problemas, perspectivas e possíveis soluções. Campina Grande: CNPA-EMBRAPA, 20p (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 48).
- Betz, F.S, B.G. Hammond & R.L. Fuchs. 2006.** Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32: 156-173.
- Bleicher, E, A.B.P. Melo, F.M.M. Jesus & C.T. Ferraz. 1983.** Distribuição vertical de lagartas de *Alabama argillacea* (Hübner, 18180) (Lepidoptera: Noctuidae) em plantas de algodoeiro herbácea. An. Soc. Entomol. Brasil 12: 117-183.
- Boborowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H.B. Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. Cienc. Rural 33: 843-850.
- Braun, C.J, J. M. Jilka, C.L. Hemenway & N.E. Tumer. 1991.** Interations between plants, pathogens and insects: possibilities for engineering resistance. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 193-198.
- Conab. 2007. Companhia Nacional de Abastecimento.** Quarto levantamento de avaliação da safra 2005/2006 abril/06. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: Dez.2007.

- Crickmore, N., Zeigler, D.R. Feitelson, J. Schnepf, E. Van Rie, J. Lereclus, D. Baum, J. & D.H. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- Dias, D.G.S, Soares, C.M.S. & Monnerat, R.G. 2002.** Avaliação de larvicidas de Origem Microbiana no Controle de traça-das-crucíferas em Couve-Flor no Distrito Federal. Comunicado técnico n° 74, 4.
- Embrapa Algodão. 2008.** Zoneamento para as culturas dos algodoeiros arbóreo e herbáceonoNordeste.Disponívelem:<http://www.cnpa.embrapa.br\algodao\zoneamento.html>. Acesso em: 04/10/2008.
- Embrapa. 2002.** Balanço Ambiental. Brasília, DF. 67p.
- Fiuza, L.M., Leroux, C.N., Goze, E., Frutos, R. & Charles, J. 1996.** Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry 1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidea): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1544-1549.
- Gavena, S. & Cunha, H. F. da. 1991.** Artrópodes predadores na cultura algodoeira. Jaboticabal: FUNEP, 120p.
- Habib, M.E. & C.F.S. Andrade. 1998.** Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves. Controle microbiano de Insetos. Piracicaba, Livroceres, 1163p.
- Hoffmann, C, H. Vanderbruggen, J. Höfte, J. Van Rie, H. Jansens, J. Van Rie & J. Mellaert. 1988.** Specificity of *Bacillus thuringiensis*-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7844-7848.

- IBGE. 2005.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa. Acesso em 04/10/2008.
- IBGE. 2007.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Indicadores produção agropecuária. <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em 30 de Abril de 2008.
- Jácome, A.G, J.J Soares, R.H. Oliveira & F.P. Cordão Sobrinho. 2001.** Efeito da remoção das folhas no desenvolvimento vegetativo e na produção do algodoeiro. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 36: 751-755.
- Jouanin, L., M. Bonade-Bottino, C. Girard & G. Morrot Gibamd. 1998.** Transgenic plants for insect resistance-review. *Plant Sci.* 131: 1-11.
- Mendonça, E.R. de. 1973.** Manual do produtor e do beneficiador do algodão. Brasília, Editora Nacional. 222p.
- Miranda, J.E. & N.D. Suassuna. 2004.** Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Goiânia, Fundação Goiás, 83p.
- Peferoen, M. 1997.** Insect control with transgenic plants expressing Bt crystal proteins, p. 21-48. In: N. Carozzi & M. Koziel (ed.), *Advances in insect control: the role of transgenic plants.* London, Taylor & Francis, 316p.
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. & Fischhoff, D. 1990.** A insect resistant cotton plants. *Biotechnol.* 8: 939-963.
- Priest, F.G. 2000.** Biodiversity of the entopathogenic, endospore – forming bacteria, p. 1-22. In J.F. Charles, A. Delécluse & C. Nielsen-le Roux (ed.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.* Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 524p.

- Quirino, E.S & J.J. Soares. 2001.** Efeito do ataque de *Alabama argillacea* no crescimento vegetativo e sua relação com a fenologia do algodoeiro. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 36: 1005-1010.
- Richetti, A., G.A. Melo Filho, F.M. Lamas, L.A. Staut & A.C. Fabrício. 2004.** Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2004/05, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Comunicado Técnico No. 91. Embrapa Pecuária Oeste, Dourados, MS. 16p.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Takeya, D.M. 1985.** Um outro nordeste: o algodão na economia do Rio Grande do Norte (1880-1915). Fortaleza: BNB/ETENE, 138p.

CAPÍTULO 2

MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO MESÊNTERO DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

MARIA E. C. SOUSA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA², HERBERT A.A.
SIQUEIRA¹, FÁBIO A.B. SANTOS³ E LUIZ C. ALVES³

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

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

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

M.E.C. Sousa, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos, L.C. Alves. Morfologia e ultra-estrutura do mesêntero de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Micron.

RESUMO – A região do mesêntero tem sido o foco de várias pesquisas, pois alterações nessa região podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos, os quais dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação. Assim, a presente pesquisa teve como objetivos descrever a morfologia, histoquímica e ultra-estrutura do mesêntero de larvas de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), praga chave da cultura do algodão no Brasil. Para obter informações, microscopia de luz e eletrônica de transmissão foi usada para coletar imagens de cortes do mesêntero de larvas do quarto instar de *A. argillacea*. As características morfológicas, histoquímicas e ultra-estruturais do mesêntero de *A. argillacea*, de modo geral, foram semelhantes às descritas na literatura para a maioria dos insetos da Ordem Lepidoptera. No entanto, a presença de polimorfismo mitocondrial e microvilosidades bifurcadas sugerem uma modificação ultra-estrutural e fisiológica, podendo ocasionar uma maior atividade de absorção e secreção nas células colunares nessa espécie. Tal aumento de atividade pode favorecer uma ação mais rápida de toxinas e/ou agentes microbianos, sugerindo que esta espécie pode ser altamente suscetível para alguns destes agentes. Contudo, esta hipótese precisa de investigação adicional.

PALAVRAS-CHAVE: Intestino médio, curuquerê-do-algodoeiro, algodão, histologia, histoquímica

MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF MIDGUT OF *Alabama argillacea*
(HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT - The insect midgut has ultimately been the focus of several researches tempting to control insect pests because alterations in the gut section may affect, not only insects growth and development, but also physiological events such as nutrient absorption and transformation. The objective of the present work was to describe the morphology, histochemical, and ultrastructural the larvae midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a cotton key pest in Brazil. To gather information, light and electronic transmission microscopy were used to obtain images from midgut sections of late fourth-instar larvae of *A. argillacea*. The morphology, histochemistry, and ultrastructure characteristics of *A. argillacea* midgut were, in general, very similar to those described in the literature for other lepidopteran species. However, it was observed a mitochondrial polymorphism and bifurcate microvilli, which suggest a ultrastructural and physiological modification possibly associated with a higher absorption and secretion activity by the columnar cells of this species. Such higher activity may favor a faster action of microbial agents and/or toxins, suggesting that this species may be highly susceptible to some kind of these agents. Nevertheless, this hypothesis needs further investigation.

KEY WORDS: Midgut, cotton leafworm, cotton, histology, histochemical

Introdução

O canal alimentar dos insetos está diferenciado em três regiões principais com diferentes origens embriológicas: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou mesêntero e intestino posterior ou proctodeu. Esse canal representa uma área de contato entre os insetos e o meio ambiente, sendo o foco de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas (Chapman 1998, Levy *et al.* 2004), principalmente a região do mesêntero, pois alterações nessa região podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos, os quais dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000].

Em Lepidoptera, o epitélio do mesêntero é composto por quatro tipos de células, as quais estão envolvidas nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes), função endócrina (células endócrinas) e na renovação do epitélio (células regenerativas) (Terra *et al.* 2006, Pinheiro *et al.* 2008). Um mecanismo de defesa nessa região é a membrana peritrófica que tem um papel fundamental na biologia do intestino médio, por estar posicionada entre o conteúdo alimentar e o revestimento epitelial, desempenhando a função de proteger esse epitélio de danos mecânicos, exercendo ainda uma barreira contra toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (Terra *et al.* 2001).

Várias pesquisas relacionadas com a descrição morfológica e ultra-estrutural do mesêntero em insetos da Ordem Lepidoptera tais como: *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lep.: Pyralidae), *Manduca sexta* L. (Lep.: Sphingidae), *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) (J. E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) sugerem que a distribuição e morfologia das células epiteliais podem ser variáveis ao longo dessa região (Pinheiro *et al.* 2003, Levy *et al.* 2004, Pinheiro *et al.* 2006). Essas diferenças morfológicas são principalmente detectadas em nível ultra-estrutural (Santos *et al.* 1984, Lehane & Billingsley 1996).

No Brasil, a principal praga desfolhadora do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. raça latifolium Hutch é o curuquerê, *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae). Na América Tropical, o seu ataque pode ocorrer em qualquer época do ano ou durante todo o ciclo da planta dependendo das condições climáticas de cada região (Silva *et al.* 1980). As lagartas alimentam-se das folhas e quando em altas densidades populacionais, podem desfolhar completamente o algodoeiro. No Nordeste brasileiro, o seu ataque é mais acentuado na fase inicial de desenvolvimento da cultura e, na região Centro-Sul, na fase de frutificação, causando prejuízos à produção (Gravena & Cunha 1991).

Um aspecto particular do curuquerê do algodoeiro é que essa espécie é monófoga. Em virtude disso, esta praga adquire uma grande importância para a cultura do algodão (Azevedo *et al.* 2002). Embora existam estudos sobre a biologia de *A. argillacea* nenhum enfoque tem sido dado à descrição morfológica e ultra-estrutural do canal alimentar dessa espécie. Assim, a presente pesquisa teve como objetivos descrever a morfologia, histoquímica e ultra-estrutura do mesêntero de lagartas do quarto instar de *A. argillacea*.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Toxicologia de Inseticidas do Departamento de Agronomia, no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM – FIOCRUZ – Recife, PE.

Obtenção, Manutenção e Criação dos Insetos. As lagartas *A. argillacea* utilizadas nos experimentos foram obtidas da criação estoque do Laboratório de Toxicologia de Inseticidas, oriunda de Paulínia-SP, e foram mantidas em uma câmara climática a 25°C, 70 ± 10% UR e

fotofase de 12h, empregando-se a metodologia de Santos & Boiça Júnior (2001). Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC de 20cm x 19,5 cm, sendo a extremidade inferior acomodada em um prato para vasos de jardinagem de 20cm (diâmetro), forrado com papel toalha interfolhado de 23 x 20,5cm, e na extremidade superior coberta com tecido *voil*. Internamente as gaiolas foram revestidas com papel sulfite branco para a obtenção das posturas. Os adultos foram alimentados com mel e água a 5%, embebida em algodão hidrófilo acondicionado em tampa plástica. Diariamente, os papéis com posturas eram retirados e transferidos para gaiolas iguais às aquelas utilizadas para os adultos. Próximo à eclosão, foram oferecidas folhas de algodoeiro cultivar isolinha suscetível Acala 90, retiradas do terço superior das plantas, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,15% e enxaguadas com água. Retirou-se posteriormente o excesso de umidade das folhas e seus pecíolos foram acondicionados em vidros contendo água, objetivando a conservação das folhas. Para as lagartas de primeiro e segundo ínstars, as folhas eram trocadas a cada dois dias, para as lagartas de ínstars mais avançados, devido ao maior consumo de folhas, estas eram trocadas diariamente. As pupas foram separadas por sexo e mantidas em gaiolas de PVC de 10cm de altura x 10cm de diâmetro até a emergência dos adultos.

Coleta do Mesêntero para Análise em Microscopia de Luz e Histoquímica. Larvas de quarto instar foram imobilizadas a baixa temperatura (-4°C) por cinco minutos e realizadas as dissecações das mesmas para retirada do mesêntero, o qual foi imediatamente colocado em recipientes contendo solução fixadora de Bouin aquoso (75mL de solução saturada de ácido pícrico, 25mL de formaldeído e 5mL ácido acético) permanecendo neste por um período de vinte e quatro horas, a 4°C . Para a inclusão do mesêntero, este foi submetido ao processo de desidratação crescente em banhos de álcool etílico 70%, 90% e 100% por 20 minutos cada, álcool etílico 100% + xilol (1/1) por 20 minutos e a diafanização feita em xilol por 20 minutos. Decorrida esta etapa, a impregnação foi feita em banhos de parafina diluída em xilol na proporção

de 50% e 100% a 58°C, durante uma hora cada, e incluídos em moldes de 2cm³, após o último banho. Os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (LEICA RM 2035) ajustado para 7µm de espessura, os cortes obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à 37°C, durante 24h. Posteriormente, estas lâminas foram submetidas às técnicas de colorações pelo tricrômico de Mallory e Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.), empregando-se a metodologia descrita por Michalany (1990). A análise histológica foi realizada utilizando-se um microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49, e fotografado em fotomicroscópico OLYMPUS BX-51 pertencente ao Laboratório de Histologia.

Coleta do mesêntero para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram coletados fragmentos do mesêntero de lagartas de quarto ínstar após serem imobilizadas a baixa temperatura (-4°C) por cinco minutos, fixados em seguida na solução de glutaraldeído a 2,5%, PFA 4% e tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente foram lavados três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. A pós-fixação em Tetróxido de Ósmio (OsO₄) a 2% (1:1), por 1h. Em seguida procedeu-se mais três lavagens em Tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e a desidratação em séries crescentes de acetona (de 30, 50, 70, 90 e 3x de 100%) por 30 min cada, a temperatura ambiente. A infiltração foi realizada em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) e acetona em temperatura ambiente. O material foi emblocado em moldes flexíveis e posto para polimerizar a 70°C por 72h. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo (Reichert Ultracut), contrastados em acetato de uranila por 1h e em citrato de chumbo por 10 min e analisado em microscópio Zeiss EM109.

Resultados

Cortes semifinos do mesêntero de larvas do quarto ínstar de *A. argillacea* revelou que este é formado por um epitélio simples apoiado em duas camadas de músculo, sendo a interna disposta circularmente e a externa longitudinalmente (Fig. 1A). No epitélio foram identificados apenas três tipos de células: colunares, caliciformes e regenerativas distribuídas por toda sua extensão (Fig. 1B). No entanto, ultra-estruturalmente foi possível detectar a presença de um quarto tipo celular, a célula endócrina (Fig. 4B). As células mais frequentes foram as colunares, células altas com sua borda em escova característica, núcleo com localização variando de central a apical e bastante heterocromático. Na região apical várias protuberâncias citoplasmáticas foram evidenciadas, as quais se destacam em direção ao lúmen (Figs. 1B e 1C). Observações detalhadas da região apical dessas células revelaram numerosos microvilos longos, alguns bifurcados, e entre eles vesículas de secreção (Figs. 2A e 2B). Na região subjacente aos microvilos notou-se riqueza de mitocôndrias de tamanho variado apresentando morfologia esférica, alongada, em forma de capuz e algumas contendo no seu interior material elétron luscente, caracterizando polimorfismo mitocondrial (Figs. 2C e 2D). O material elétron luscente apresentou-se constituído por polissomos e retículo endoplasmático liso (Fig 3A). Entre as mitocôndrias também foi observado à presença de vacúolo autofágico (Fig. 3B). As células colunares estão intimamente conectadas na região lateral próximo ao pólo apical por meio de especializações do tipo zônula de oclusão, sendo ainda bem nítida a presença de espaços entre essas especializações, enquanto que na região basolateral foram observadas invaginações (Fig. 3C). A região central das células colunares caracterizou-se por apresentar grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e algumas mitocôndrias (Fig.3D). Na região basal evidenciaram-se numerosas invaginações da membrana plasmática formando um labirinto (Fig. 4A). A célula caliciforme foi bem caracterizada pela presença de uma cavidade em forma de cálice limitada pelas projeções da

membrana plasmática, com núcleo basal bastante heterocromático e nucléolo bem evidente (Figs 1D e 4B). Tanto em observações feitas em microscopia de luz e eletrônica, as células regenerativas caracterizaram-se por apresentarem morfologia piramidal, dispostas isoladamente na base do epitélio. Seu citoplasma mostrou-se bastante denso com predominância de polissomos livres, núcleo central, volumoso e com cromatina dispersa (Figs 1D, 4C e 4D). As células endócrinas, assim como as células regenerativas não se estendem para o lúmen, portanto são de localização basal. Essas células apresentaram morfologia alongada, contendo vários grânulos, em geral concentrados na região basal da célula (Fig. 4B). Histoquimicamente o mesêntero mostrou secreções de natureza mucosa e glicoprotéica, quando corado pelo tricrômico de Mallory e Ácido periódico de Schiff, respectivamente (Figs. 5A e 5B).

Discussão

A literatura relata que o epitélio do mesêntero para os insetos da Ordem Lepidoptera pode apresentar-se simples (Jordão *et al.* 1999, Cristofolletti *et al.* 2001, Pinheiro *et al.* 2003) ou pseudo-estratificado (Levy *et al.* 2004), constituído por quatro tipos de células. Histologicamente o epitélio de *A. argillacea* apresentou-se do tipo simples, constituído pelas células colunares, caliciformes, endócrinas e regenerativas, seguindo, portanto, o padrão geral. As células colunares foram predominantes ao longo do epitélio do mesêntero em *A. argillacea* e caracterizaram-se pelos numerosos microvilos longos e alguns bifurcados, além de protuberâncias citoplasmáticas. A observação de dicotomia nos microvilos dessas células é o primeiro relato e pode levar a discussão da possível presença de estereocílios, visto que estes são projeções na região apical das células epiteliais que podem se anastomosar, tendo também o papel de absorção (Junqueira & Carneiro 2008). Embora, Guo *et al.* (2000) estudando o arranjo estrutural dos microvilos sugeriram que modificações nas proteínas do citoesqueleto podem levar a deformação dos

mesmos sem alterar sua função. Protuberâncias citoplasmáticas também foram observadas por Pinheiro *et al.* (2008) nas células colunares do mesêntero em *D. saccharalis* Fabricius. Segundo esses autores essas protuberâncias são resultantes do processo de secreção apócrina de enzimas digestivas para o lúmen.

Ultraestruturalmente foram observados ainda na região apical das células colunares polimorfismo mitocondrial e presença de vacúolo autofágico. Segundo Abdalla & Cruz-Landim (2001, 2004) a variação no tamanho e forma das mitocôndrias é uma ocorrência comum nas células secretoras dos insetos em geral. Porém, não há relatos na literatura consultada da presença do polimorfismo mitocondrial nas células colunares do mesêntero em lepidópteros. Abdalla & Cruz-Landim (2005) estudando esse polimorfismo em células da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae) caracterizaram as mitocôndrias de morfologia esférica como sendo do tipo 1, as alongadas, tipo 2, as em forma de capuz ou as que contêm polissomos e retículo endoplasmático liso na sua matriz do tipo 3, e as que contêm lipídio na sua matriz, tipo 4. Porém nas células colunares de *A. argillacea* não foi observado o último tipo. De acordo com Caetano *et al.* (2002) esse polimorfismo resulta de um ciclo de desenvolvimento com mudanças morfológicas pela quais as mitocôndrias passam, e aos poucos acumulam secreção lipídica na sua matriz.

No mesêntero a degradação de componentes citoplasmáticas é um processo importante na fisiologia celular, participando da apoptose ou da renovação das organelas (Weissman 2001). Durante a degradação as organelas são isoladas do citoplasma em vesículas com dupla membrana denominadas de vacúolos autofágicos (Klionsky & Emr 2000). Portanto, a presença desses vacúolos nas células colunares representa uma condição fisiológica normal nas células epiteliais. Embora a origem das membranas dos vacúolos autofágicos seja um assunto de debate, evidências indicam que elas são derivadas do retículo endoplasmático rugoso (Dunn 1990).

A membrana plasmática das células colunares na região lateral próxima ao pólo apical, apresentou por toda a sua extensão, especialização do tipo zônula de oclusão intercaladas por espaços intercelulares. Esses espaços podem sugerir o local de troca de substância entre as células, pois de acordo com Abdalla (2002) a presença de junções delimitando esses espaços não permite que substâncias encontradas nessa região cheguem diretamente ao lúmen ou a hemocele. Já no pólo basolateral observou-se invaginações. Essas invaginações podem variar de tamanho de acordo com a função desempenhada pela célula e sua localização no intestino médio (Terra *et al.* 2006). O labirinto observado na região basal é responsável por aumentar a superfície de contato entre a membrana basolateral da célula e a hemolinfa (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Terra *et al.* 2006).

As células caliciformes observadas neste inseto são similares às encontradas em outros lepidópteros, apresentando a típica cavidade, denominada de câmara globosa. Essas células, localizadas por todo epitélio do mesêntero, intercaladas por células colunares, têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células colunares na absorção de metabólitos (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Klowden 2002). Através da análise histoquímica foi possível constatar a intensa atividade secretora de natureza mucosa dessas células pela reação com o tricrômico de Mallory, pois este corante reage com as mucinas presentes no muco (Behmer *et al.* 1976, Junqueira & Junqueira 1983, Michalany 1990). A reação negativa das células caliciformes pelo P.A.S. confirma os relatos de Pinheiro *et al.* (2008) de que a secreção glicoprotéica observada é produzida exclusivamente pelas células colunares.

As células regenerativas são relativamente indiferenciadas e responsáveis pela renovação do epitélio do intestino médio, substituindo as células principais que se desgastam e se perdem durante o processo de digestão além de possibilitar o crescimento do canal alimentar a cada

ecdise. São encontradas na base do intestino médio, isoladamente ou em grupos formando ninhos (Chapman 1998, Cavalcante & Cruz Landim 1999, Wanderley-Teixeira *et al.* 2006, Martins *et al.* 2006).

A não visualização das células endócrinas no mesêntero de *A. argillacea* nas preparações histológicas para análise em microscopia de luz corrobora com os trabalhos de Montuenga *et al.* (1989), Jimenez & Gilliam (1990) e Pinheiro *et al.* (2008) os quais relatam que estas células não são facilmente identificadas na microscopia de luz pelas técnicas de rotina, sendo necessárias análises ultraestruturais e imunohistoquímicas. Ultraestruturalmente em *A. argillacea* essas células si dispõem na base do epitélio sem, no entanto, atingirem o lúmen. De acordo com Cavalcante & Cruz-Landim (1999) as células endócrinas que não entram em contato com o lúmen são classificadas de tipo aberto, já as que estão em contato direto com o lúmen são do tipo fechado. As características morfológicas, histoquímicas e ultra-estruturais do mesêntero de *A. argillacea*, de modo geral, foram semelhantes às descritas na literatura para a maioria dos insetos da Ordem Lepidoptera. No entanto, a presença de polimorfismo mitocondrial e microvilos bifurcados sugere uma modificação ultra-estrutural e fisiológica, ocasionando uma maior atividade de absorção e secreção das células colunares nessa espécie. Tal atividade aumentada pode favorecer uma ação mais rápida de toxinas e/ou agentes microbianos, sugerindo que esta espécie pode ser altamente suscetível para alguns destes agentes. Contudo, esta hipótese precisa de investigação adicional.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e a Rafael Padilha (LIKA/UFPE) pela colaboração no preparo e observação do material em microscopia eletrônica.

Literatura Citada

- Abdalla, F.C. & C. Cruz-Landim. 2001.** Changes in the morphology of the Dufour gland of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during the life stages of the female castes. Rev. Bras. Entomol. 45: 123-129.
- Abdalla, F.C. & C. Cruz-Landim. 2004.** Occurrence, morphology and ultrastructure of the Dufour gland in *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini). Rev. Bras. Entomol. 48: 1-19.
- Abdalla, F.C. & C. Cruz-Landim. 2005.** Ocorrência, morfologia e ultra-estrutura da glândula de Dufour de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). Neotrop. Entomol. 34: 47-57.
- Abdalla, F.C. 2002.** Glândula de Dufour. p. 127-149. In C. Cruz-Landim & F.C. Abdalla (eds.), Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto, FUNPEC-RP, 181p.
- Azevedo, F. R., K.O. Mattos & F.V. Vieira. 2002.** Comportamento alimentar de *Alabama argillacea* Hubner (Lep.: Noctuidae) em algodoeiro. Ciên. Agron. 33: 5-9.
- Behmer, O.A., E.M.C. Tolosa & A.G. Freitas Neto. 1976.** Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, Edart. 115p.
- Caetano, F.H., F.J. Zara & E.A. Gregório. 2002.** The origin of lipid droplets in the post-pharyngeal gland of *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae). Cytology 67: 301-308.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999.** Types of cells present in the midgut of the insects: a review. Naturalia E24: 19-39.
- Chapman, R. F. 1998.** The insects: structure and function. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 770p.

- Cristofolletti, P.P., A.F. Ribeiro & W.R. Terra. 2001.** Apocrine secretion of amylase endocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47: 143–155.
- Dunn, W.A.J. 1990.** Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell. Biol.* 110: 1923-1933.
- Gravena, S.H., F. Cunha. 1991.** Predation of cotton leafworm first instar larvae, *Alabama argillacea* (Lep. Noctuidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1544-1549.
- Guo, P., A.M. Weinstein & S. Weinbaum. 2000.** A hydrodynamic mechanosensori hypothesis for brush border microvilli. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F698–F712.
- Jimenez, D. & M. Gilliam. 1990.** Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and non specific esterase. *Cell Tissue Res.* 261: 431-443.
- Jordão, B.P., A.N. Capella, W.R. Terra, A.F. Ribeiro & C. Ferreira. 1999.** Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45: 29-37.
- Junqueira, L.C. & J. Carneiro. 2008.** Tecido epitelial, p.73. In L.C. Junqueira & J. Carneiro (eds), *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 540p.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo, Santos, 123p.
- Klionsky, D.J. & S.D. Emr. 2000.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717–1721.
- Klowden, M.J. 2002.** *Physiological systems in insects*. New York, Academic Press, 415p.

- Lehane, M.J. & P.F. Billingsley. 1996.** Biology of the insect midgut. 1 ed. Chapman & Hall, London, 504p.
- Levy, S.M., A.M.F. Falleiros, E.A. Gregório, N.R. Arrebola & L.A. Toledo. 2004.** The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. Braz. J. Biol. 64: 633-638.
- Martins, G.F., C.A. Neves, L.A.O. Campos & J.E. Serrão. 2006.** The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. Micron 37: 161-168.
- Michalany, J. 1990.** Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo, Editora Michalany, 247p.
- Montuenga, L.M., M.A. Barrenechea, P. Sesma & J.J. Vásquez. 1989.** Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). Cell Tissue Res. 258: 577-583.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. J. Insect Physiol. 39: 903-924.
- 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.
- Pinheiro, D.O., I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2008.** Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. Neotrop. Entomol. 37: 413-419.
- Pinheiro, D.O., R.J. Silva & E.A. Gregório. 2006.** Morphometry of the midgut epithelium of *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1774 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). J. Invertebr. Pathol. 93: 60-62.

- Pinheiro, D.O., R.J. Silva, I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2003.** Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). Neotrop. Entomol. 32: 453-459.
- Santos, T.M. & A.L. Boiça Júnior. 2001.** Resistência de genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 30: 297-303.
- Santos, C.D., A.F. Ribeiro, C. Ferreira & W.R. Terra. 1984.** The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. Cell Tissue Res. 237: 565–574.
- Silva, A.L., P.C. Neto Prado & H.F. Cunha. 1980.** Avaliação da produtividade, segundo efeito da desfolha e eliminação de estruturas frutíferas nos diferentes estágios do algodoeiro, p. 120-125. In Relatório Técnico da Emgopa. Goiânia-GO. 125p.
- Terra, W.R. 2001.** The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47: 47-61.
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006.** Plasma membranes from insect midgut cells. Ann. Braz. Acad. Sci. 78: 255-269.
- Wanderley-Teixeira, V., A.A.C. Teixeira, F.M. Cunha, M.K.C.M. Costa, A.F.S.L. Veiga & J.V. Oliveira. 2006.** Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). Braz. J. Biol. 66: 1045-1049.
- Weissman, A.M. 2001.** Themes and variations on ubiquitylation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 169–178.

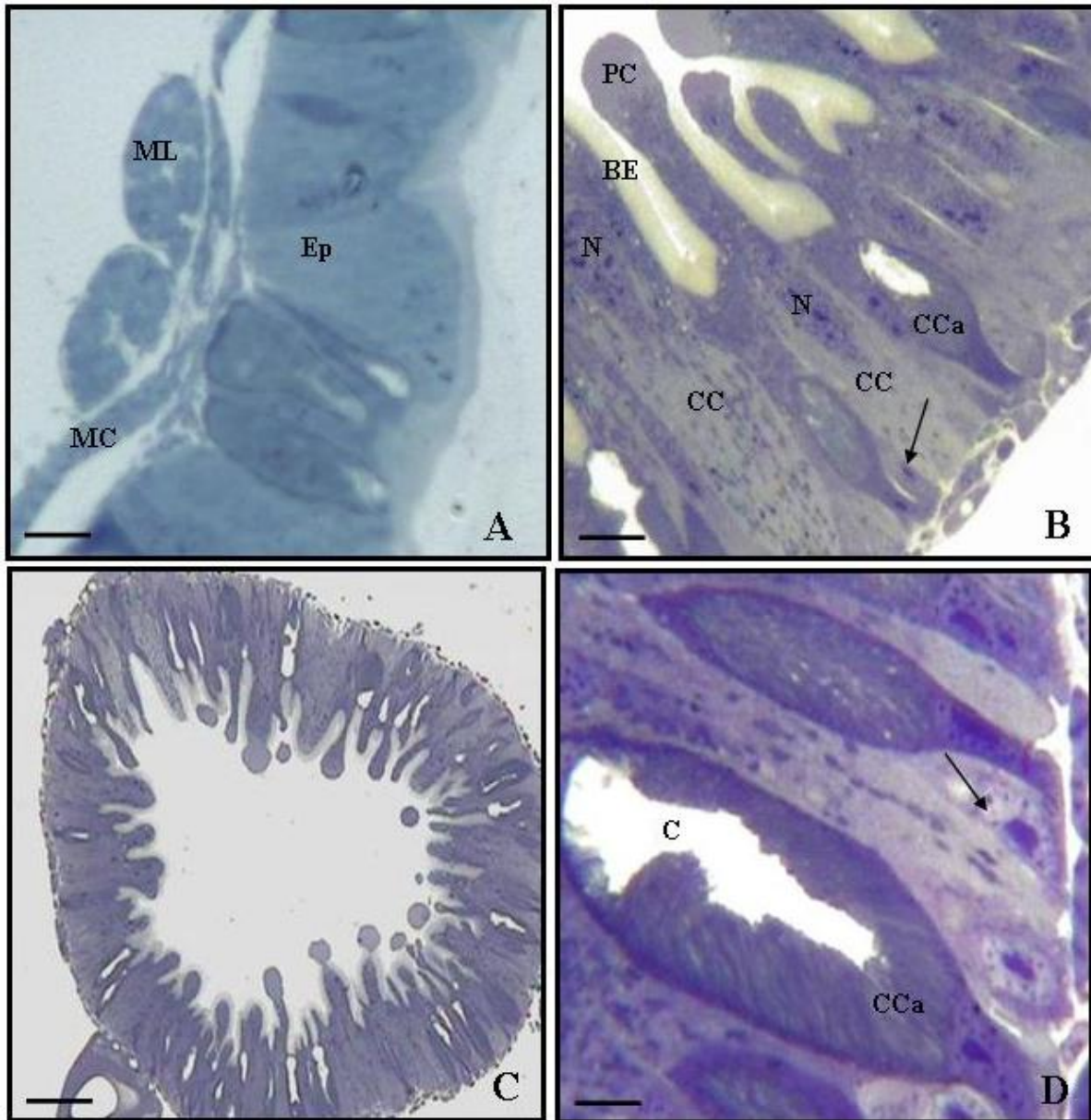


Figura 1. Microscopia de luz: (A) Mesêntero de *A. argillacea* mostrando epitélio simples apoiado em duas camadas de músculo. Barra = 100µm. (B) Detalhe das células epiteliais. Barra = 100µm. (C) Notar várias protuberâncias citoplasmáticas nas células colunares destacando-se para o lúmen. Barra = 200µm. (D) Observar células: caliciforme e regenerativa. Barra = 25µm. Ep – epitélio simples, MC – músculo circular, ML – músculo longitudinal, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, Seta – célula regenerativa, N – núcleo, PC – protuberância citoplasmática, C – câmara globosa, BE – borda em escova. Coloração Azul de Toluidina.

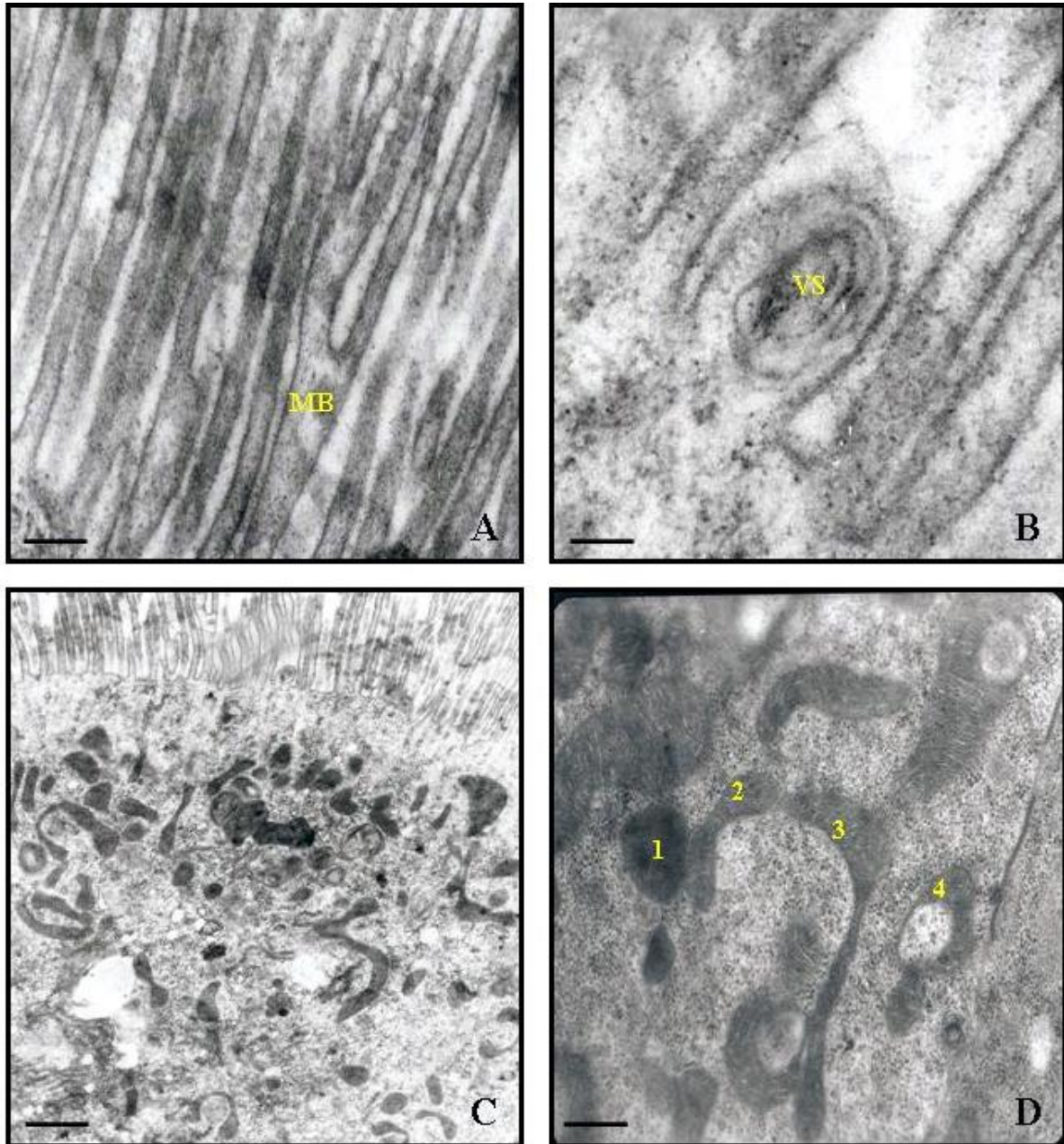


Figura 2. Eletromicrografias de transmissão da região apical da célula colunar: (A) microvilosidades. Barra = 0,2 μ m. (B) observar processo de secreção. Barra = 0,2 μ m. (C) riqueza de mitocôndrias. Barra = 0,5 μ m. (D) polimorfismo mitocondrial. Barra = 0,2 μ m. MB – microvilo bifurcado, VS – Vesícula de secreção, 1- mitocôndria esférica, 2 – mitocôndria alongada, 3 – mitocôndria em forma de capuz, 4- mitocôndria armazenando material elétron luscente.

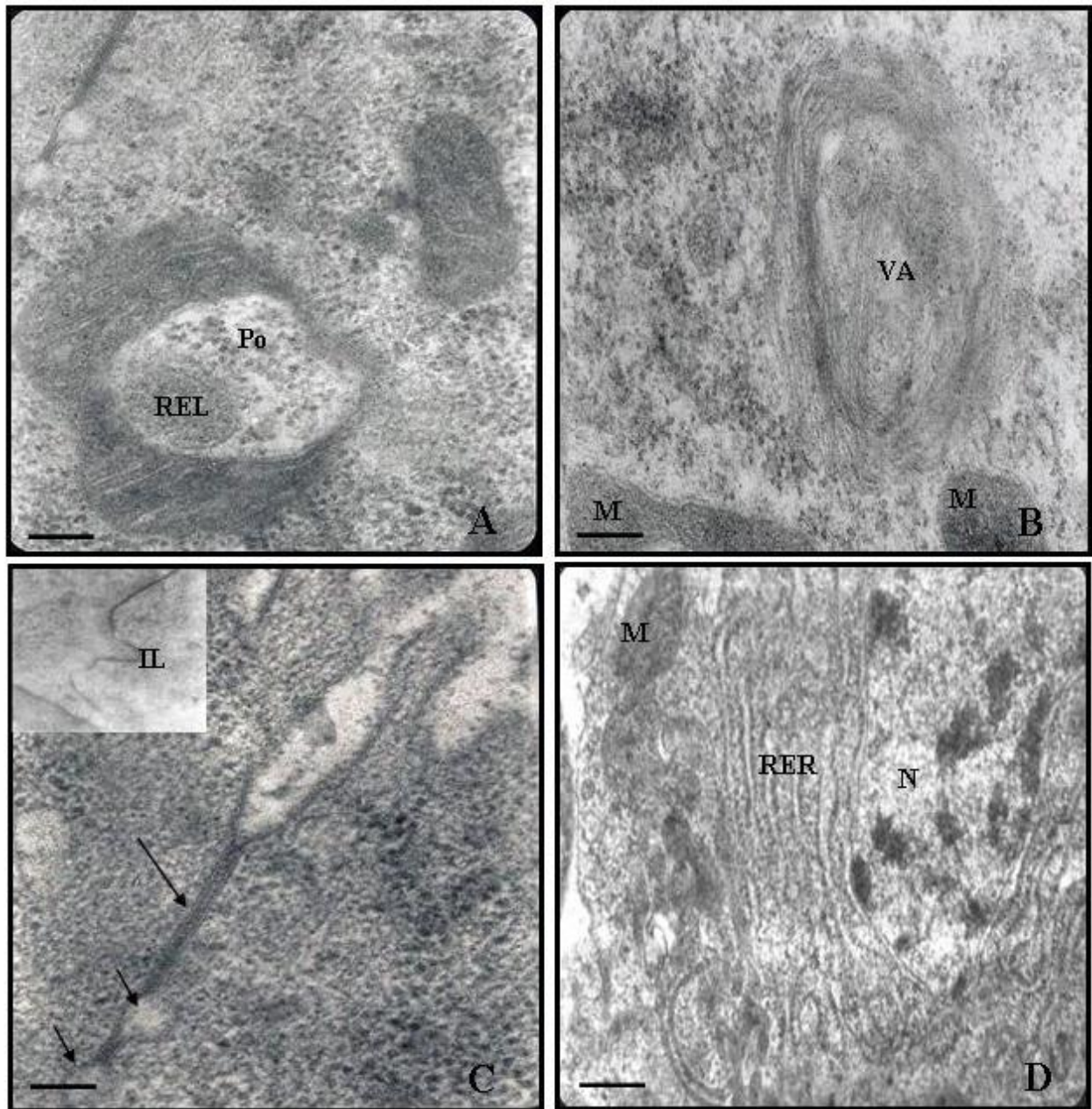


Figura 3. Eletromicrografias de transmissão: (A) detalhe da mitocôndria contendo material elétron luscente. Barra = 0,3 μ m. (B) vacúolo autofágico Barra = 0,3 μ m. (C) junção entre as células colunares Barra = 0,5 μ m.. (D) região central da célula colunar Barra = 0,5 μ m.. Po – polissomos, REL – retículo endoplasmático liso, VA - vacúolo autofágico, M – mitocôndria, Seta longa – zônula de oclusão, Setas curtas – espaços intercelulares, IL – detalhe da região lateral da célula colunar mostrando invaginação lateral RER – retículo endoplasmático rugoso, N - núcleo.

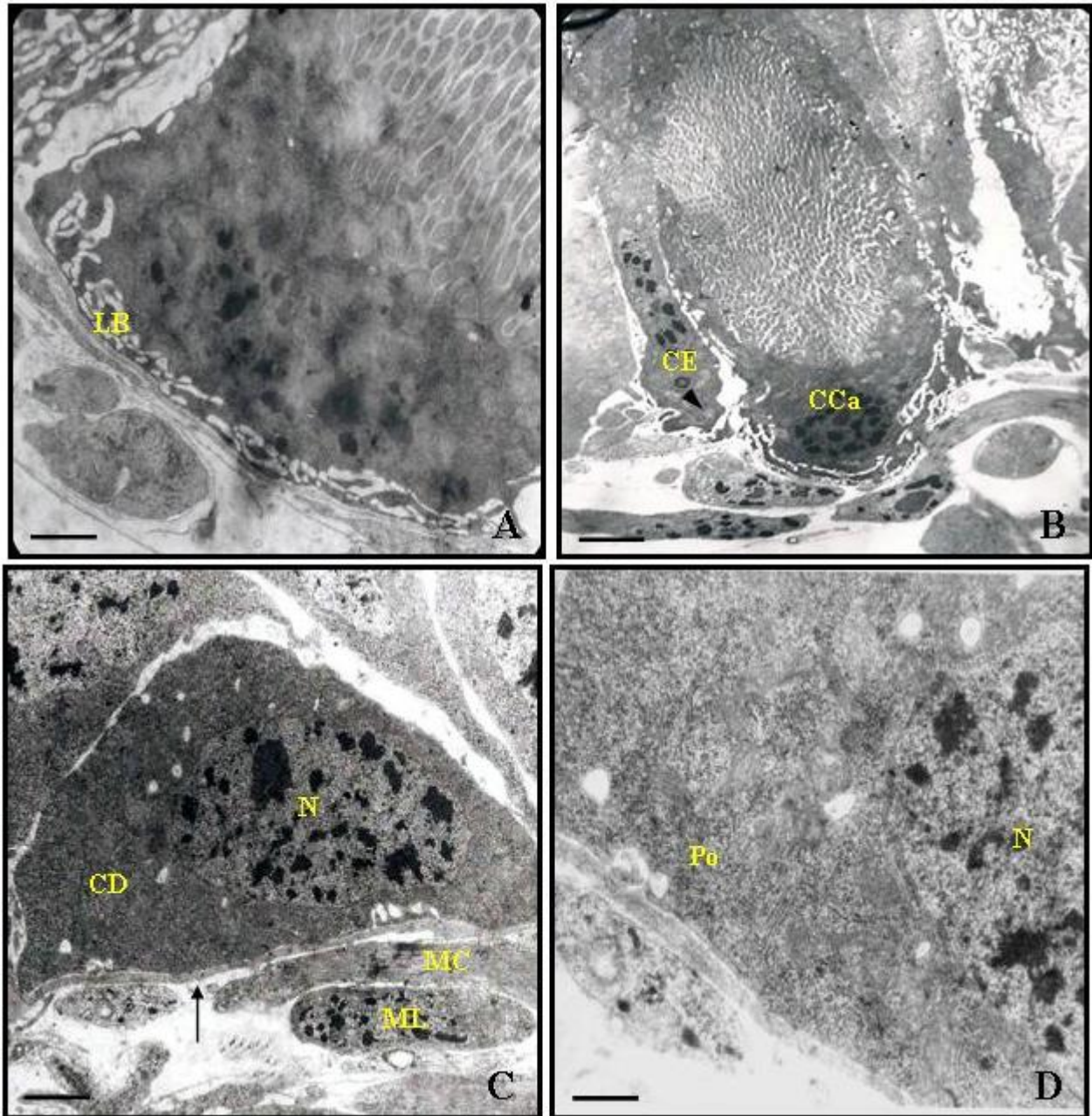


Figura 4. Eletromicrografias de transmissão: (A) região basal da célula colunar. Barra = 0,5 μ m. (B) células: caliciforme e endócrina. Barra = 0,5 μ m. (C) e (D) célula regenerativa. Barra = 0,5 μ m e 0,25 μ m, respectivamente. LB – labirinto basal, CCa – célula caliciforme, CE – célula endócrina, Ponta de seta – grânulo, N – núcleo, CD – citoplasma denso, MC – músculo circular, ML – músculo longitudinal, Po - polissomos.

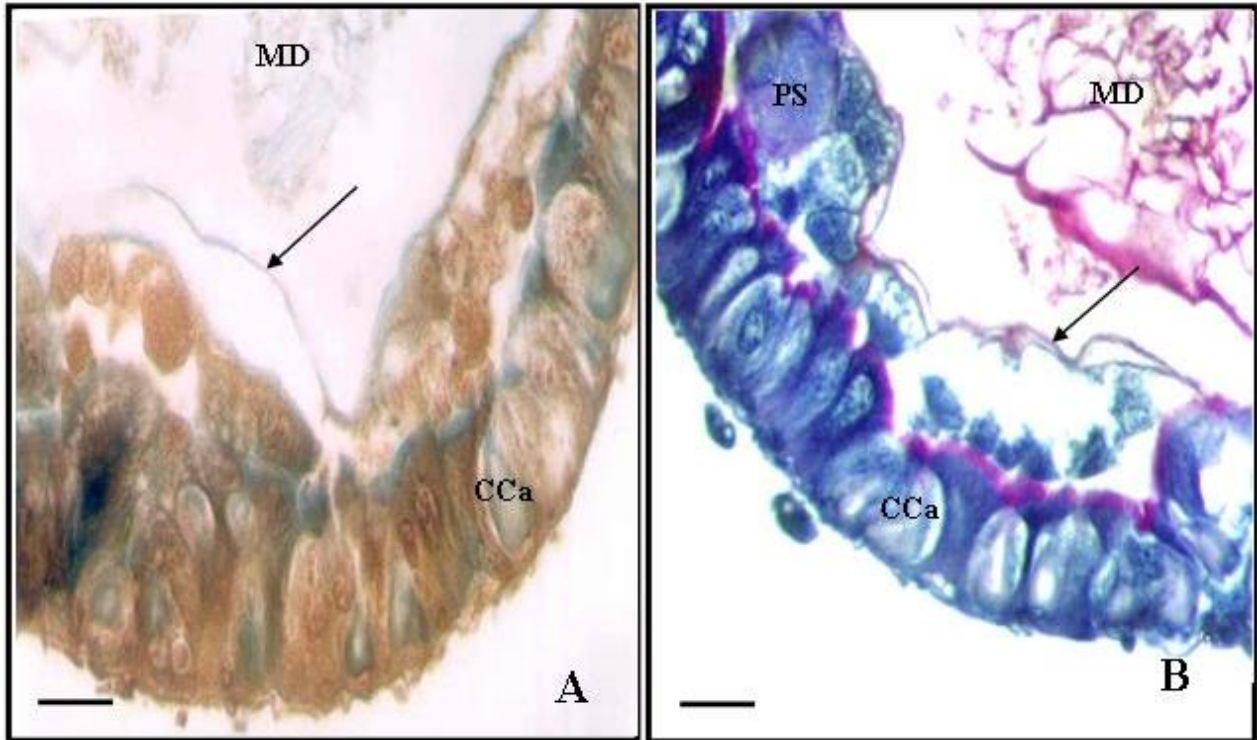


Figura 5. Histoquímica do mesêntero de *A. argillacea*: (A) Observar a natureza mucosa das células caliciformes. tricrômico de Mallory. Barra = 25µm. (B) Notar reação positiva pelo P.A.S. na superfície epitelial e no produto de secreção. Barra = 25µm. Seta - membrana peritrófica, CCa – célula caliciforme, PS – produto de secreção, MD –material digerido.

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRA-ESTRUTURAIS DO MESÊNTERO DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADAS COM ALGODÃO Bt

MARIA E. C. SOUSA¹, FÁBIO A.B. SANTOS³, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², ÁLVARO A.C.
TEIXEIRA², HERBERT A.A. SIQUEIRA¹ E LUIZ C. ALVES³

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

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

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

M.E.C. Sousa, F.A.B. Santos, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, L.C. Alves, J.B. Torres. Alterações morfológicas e ultra-estruturais do mesêntero de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com algodão Bt. Micron.

RESUMO – O algodão Bt AcalaDTL-90B, que expressa a proteína Cry1Ac, é resistente às principais pragas da Ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão, como o curuquerê-do- algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*). Estudos histopatológicos e ultra-estruturais têm mostrado a interação entre a toxina Bt com o mesêntero em larvas de alguns lepidópteros, porém não há relatos dessa interação em *A. argillacea*. Assim, esta pesquisa teve como finalidade comprovar os impactos sobre a morfofisiologia do mesêntero de *A. argillacea* alimentadas com algodão Bt AcalaDTL-90B, esclarecendo os níveis de alterações morfológicas e ultra-estruturais. Após 20 minutos de ingestão de cerca de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac, presente nos discos de folhas de algodão Bt AcalaDTL-90B, as larvas do quarto instar de *A. argillacea* apresentaram modificações na parede do mesêntero com alterações morfológicas e ultra-estruturais nas células colunares e caliciformes, redução no número das células regenerativas, bem como degeneração da camada muscular, além de provocar destruição da membrana peritrófica em algumas regiões do mesêntero. Assim, conclui-se que após ingestão em média de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac, foram suficientes para ocasionar alterações a níveis morfológico e ultra-estrutural no mesêntero de larvas do quarto instar de *A. argillacea*.

PALAVRAS-CHAVE: Bollgard I[®], lepidoptera, microscopia, *Bacillus thuringiensis*

MORPHOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS OF MIDGUT OF *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FED WITH Bt COTTON

ABSTRACT – The Bt cotton (AcalaDTL-90B line), which express the Cry1Ac protein, is resistant to the main cotton lepidopteran pests such as the cotton leafworm, *Alabama argillacea*, the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*, and the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. Histopathological and ultrastructural studies have showed the effects of the Bt toxins interaction with the larval midgut of many lepidopterans, however no documentation exists regarding these interactions with *A. argillacea*. Thus, the aim of this study was to show the Cry1Ac impacts on the midgut morphophysiology of *A. argillacea* fed with Bt cotton, particularly the morphological and ultra-structural alterations. Based on our detection, 20 min after exposure to Cry1Ac, 4th-instar larvae presented modifications on the midgut walls with morphological and ultra-structural alterations in the columnar and goblet cells, a reduced number of regenerative cells, degeneration of muscle layer, and destruction of peritrophic membrane in some midgut regions. The overall conclusion, after ingestion of 0.183 ± 0.077 ng de Cry1Ac for 20 min, is that in average this amount was enough to cause morphological and ultra-structural alterations in the larval midgut of the *A. argillacea*.

KEY-WORDS: Bollgard I[®], Lepidoptera, Microscopy, *Bacillus thuringiensis*

Introdução

O curuquerê *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga desfolhadora do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. raça latifolium Hutch, no Brasil. As lagartas alimentam-se das folhas e quando em altas densidades populacionais, podem desfolhar completamente o algodoeiro. No Nordeste brasileiro, o seu ataque é mais acentuado na fase inicial de desenvolvimento da cultura e, na região Centro-Sul, na fase de frutificação, causando prejuízos à produção (Leonard *et al.* 1999, Santos & Boiça Júnior 2002).

A principal forma de controle dos insetos que atacam o algodoeiro tem sido feita pela utilização de produtos químicos, cuja aplicação exige grande investimento, além de causar danos ao meio ambiente e gerar riscos de intoxicação ao homem. Uma alternativa foi à introdução de algodão que expressa uma proteína inseticida do *Bacillus thuringiensis* Berliner (algodão Bt). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva que produz, durante sua fase de esporulação, proteínas cristalinas (delta-endotoxinas), denominadas de Cry toxinas ou proteínas Cry (Estela *et al.* 2004).

O algodão Bollgard[®] evento 531, também conhecido como Ingard[®], produzido pela empresa Monsanto, é resistente às principais pragas da Ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão, como o curuquerê-do-algodão (*A. argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*). O algodão Bollgard foi geneticamente modificado a partir da transformação da variedade comercial Coker 3212, por meio do sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend). A transformação inseriu os genes *nptII*, *aad*, e o gene Cry1Ac que é proveniente de *B. thuringiensis*, no genoma dessa variedade de algodão (CTNBio 2007).

Uma vez presente no trato digestivo dos insetos suscetíveis, as proteínas Cry associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio (mesêntero) dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana,

ruptura da integridade intestinal e conseqüente morte do inseto (Herrero *et al.* 2001, Boborowski *et al.* 2003, Cavados *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2004, Oestergaard *et al.* 2007).

Embora existam trabalhos na literatura comprovando a suscetibilidade dos insetos da Ordem Lepidoptera ao *B. thuringiensis* (Monnerat *et al.*, 2000, Mohan & Gujar 2001, Medeiros *et al.*, 2006), um problema em potencial associado a esta primeira geração de algodão transgênico expressando a toxina Cry1Ac, é a possibilidade de que populações de insetos possam desenvolver resistência a esta toxina (Sayyed *et al.* 2000, Estela *et al.* 2004).

Alguns casos de resistência à toxina Cry mostraram ocorrer devido à alteração nos locais de ligação desta toxina na membrana celular (Lee *et al.* 1995, Tabashnik *et al.* 1997, Jurat-Fuentes *et al.* 2002). De acordo com Estela *et al.* (2004), estudos sobre a interação da proteína Cry com o mesêntero de larvas pode determinar a eficiência de variedades de algodão Bt na expressão da toxina, pois a demonstração do local de atuação e da forma de ação tem grande importância para a potencialização de seus efeitos.

Estudos histopatológicos e ultra-estruturais têm mostrado a interação entre a toxina Bt com o mesêntero em larvas de alguns lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), *H. virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidea) e *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) (Martin & Wolfersberger 1995, Fiúza *et al.* 1996, Jurat-Fuentes *et al.* 2002, Estela *et al.* 2004, Ayra-Pardo *et al.* 2006, Dequech *et al.* 2007). No entanto, não há relatos dessa interação em *A. argillacea*. Em decorrência dos questionamentos sobre os possíveis efeitos diretos e indiretos causados nos organismos alvos, por meio da utilização da toxina do algodão Bt, esta pesquisa teve como finalidade comprovar os impactos sobre a morfofisiologia do mesêntero de *A. argillacea* alimentadas com algodão-Bt, esclarecendo os níveis de alterações morfológicas e ultra-estruturais.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Toxicologia de Inseticidas do Departamento de Agronomia, no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco.

Obtenção, Manutenção e Criação dos Insetos. As lagartas *A. argillacea* utilizadas nos experimentos foram obtidas da criação estoque do Laboratório de Toxicologia de Inseticidas, oriunda de Paulínia-SP, e foram mantidas em uma câmara climatizada a 25°C, 70 ± 10% UR e fotofase de 12h, empregando-se a metodologia de Santos & Boiça Júnior (2001). Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC de 20cm x 19,5cm, sendo a extremidade inferior acomodada em um prato para vasos de jardinagem de 20cm (diâmetro), forrado com papel toalha interfolhado de 23cm x 20,5cm, e na extremidade superior coberta com tecido *voil*. Internamente as gaiolas foram revestidas com papel sulfite branco para a obtenção das posturas. Os adultos foram alimentados com solução de mel e água a 5%, embebida em algodão hidrófilo acondicionado em tampa plástica. Diariamente, os papéis com posturas eram retirados e transferidos para gaiolas iguais àquelas utilizadas para os adultos. Próximo à eclosão, foram oferecidas folhas de algodoeiro cultivar isolinha suscetível AcalaDTL-90, retiradas do terço superior das plantas, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,15% e enxaguadas com água. Retirou-se posteriormente o excesso de umidade das folhas e seus pecíolos foram acondicionados em vidros contendo água, objetivando a conservação das folhas. Para as larvas de primeiro e segundo instares, as folhas eram trocadas a cada dois dias, para as larvas de instares mais avançados, devido ao maior consumo de folhas, estas eram trocadas diariamente. As pupas foram separadas por sexo e mantidas em gaiolas de PVC de 10cm de altura x 10cm de diâmetro até a emergência dos adultos.

Instalação do Bioensaio. Larvas de *A. argillacea* no quarto ínstar (referente ao sétimo dia de eclosão) foram transferidas e individualizadas por 24 horas em tubos Falcon de 15mL, sem alimentação e mantidas nas mesmas condições descritas no item anterior. Posteriormente foram submetidas a dois tratamentos cada um constando de dez repetições: Lagartas alimentadas com algodão Bt AcalaDTL-90B e não Bt AcalaDTL-90, provenientes da Monsanto Brasil, São Paulo, SP. Foram utilizados discos de folhas de 9mm de diâmetro, obtidos da parte central de folhas medianas de algodão Bt e não Bt. Esses discos foram confeccionados em duplicatas, sendo um oferecido às larvas e o outro congelado para posterior quantificação dos níveis da toxina Cry1Ac. Antes e após os discos serem oferecidos às lagartas estes foram pesados para posterior cálculo da quantidade de toxina ingerida e foram dispostos sobre papel de filtro umedecido em água destilada, no interior da placa plástica, por um período de 20 minutos.

Quantificação da Toxina Cry1Ac. Os níveis da proteína Cry1Ac nas folhas de algodão Bt foram quantificados, utilizando-se placas PathoScreen[®] já preparadas com anticorpos para Bt-Cry1Ac/Cry1Ab ELISA e conjugados com a enzima peroxidase (Agdia[®] Inc., Elkhart, IN). Por ocasião as amostras foram coletadas e acondicionadas em tubos Eppendorfs e congeladas até a análise de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), para extração e, posterior, quantificação dos níveis de expressão de Cry1Ac. Foram utilizadas quinze amostras de 0,027g de folha. A extração da proteína Cry1Ac foi feita pelo maceramento das amostras em solução salina fosfatada e Tween20 (PBST), nas concentrações de 1:5 (peso/volume).

O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorfs. A quantificação de Cry1Ac foi feita empregando placa de ELISA, na qual foi adicionado 100µL da enzima peroxidase fornecida junto ao kit ELISA adquirido da Agdia[®] Inc. (Elkhart, IN), nos 96 poços da placa. A placa foi diagramada com adcionamento dos controles (branco e amostra não-Bt), com concentrações

decrecentes do positivo Cry1Ac de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125ng/mL para a obtenção de uma curva padrão objetivando estimar a quantidade de Cry1Ac nas amostras testadas e alíquotas de 100µL de cada amostra por poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente (25°C) por 2 horas e, então, realizado seis lavagens com PBST. Após as lavagens foi adicionado 100µL de TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) e incubado por 15 minutos, quando então a reação foi paralisada adicionando 50µL de ácido sulfúrico a 3M para possibilitar a leitura a 450nm. Posteriormente, a placa foi submetida à leitura de absorvância a 450nm empregando leitora de placa ELISA BioteK EL x 800TM (Absorbance Micropole Reader) (Dutton *et al.* 2002, Torres *et al.* 2006).

Coleta do Mesêntero para Análise em Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão (MET). Foram coletados fragmentos do mesêntero de larvas de ambos os tratamentos após serem imobilizadas a baixa temperatura (-4°C) por cinco minutos, fixados em seguida na solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2). Posteriormente foram lavados três vezes em tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,2 por 1h. Em seguida procedeu-se a lavagem e a desidratação em séries crescentes de acetona por 30 min. cada, a temperatura ambiente. A infiltração foi realizada em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) e acetona em estufa a 70°C por 48h para polimerização. Cortes semifinos foram corados pelo azul de toluidina para análise em microscopia de luz. Os cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila por 1h e em citrato de chumbo por 10 min e analisado em microscópio Zeiss EM109.

Quantificação das Células Regenerativas do Mesêntero. A quantificação foi realizada utilizando cinco secções de cortes semifinos, corados pelo azul de toluidina, obtidas da região mediana do mesêntero de cinco lagartas. Cada lagarta correspondeu a uma repetição, sendo utilizadas cinco repetições/tratamento. A captura de imagem foi efetuada por meio de câmera de

vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50. A morfometria foi realizada através do aplicativo de pontos, associado ao programa ImageLab 2000 para Windows 3x. Em cada repetição (lâmina com a secção do corte) foram contadas células regenerativas em dez campos aleatórios. O número médio de células regenerativas obtidas nas amostras (repetições) de lagartas de *A. argillacea* foi submetido a análise de frequência de escolha e avaliados pelo teste qui-quadrado, mediante o programa computacional SAS version 8.02 (SAS Institute 2001).

Resultados

As lagartas as alimentadas com algodão não Bt apresentaram histologicamente a parede do mesêntero íntegra constituída por um epitélio do tipo simples e revestida externamente por duas camadas de músculo, sendo a mais interna circular e a mais externa longitudinal (Fig 1A). No epitélio foram facilmente observadas em cortes semifinos, as seguintes células: colunares com borda em escova, protuberância citoplasmática e núcleo heterocromático; as caliciformes com a câmara globosa delimitada pelas projeções da membrana plasmática, núcleo oval e basal; e as células regenerativas na base do epitélio, com morfologia piramidal, núcleo volumoso e nucléolo bem evidente (Figs. 1B e 1C). Notou-se ainda a presença da membrana peritrófica envolvendo o material ingerido (Fig. 1D)

A análise quantitativa dos discos de folhas do algodão Bt oferecidos as larvas do quarto instar de *A. argillacea* apresentaram nível médio de toxina Cry1Ac (média \pm EP) de $0,023 \pm 0,007$ μ g de Cry1Ac/g de peso fresco de folhas. Verificou-se que em média as larvas ingeriram cerca de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac. Histologicamente o mesêntero das larvas alimentadas com esses discos mostraram alterações bem expressivas, após 20 minutos de ingestão. Em cortes semifinos foi possível detectar alterações tanto na lâmina epitelial como na musculatura. No epitélio evidenciaram-se algumas áreas com estratificação e em outras áreas, mesmo o epitélio

permanecendo simples, este apresentou projeções para o lúmen dando um aspecto pregueado ao mesmo (Figs 2A e 2B). Foram observadas expressivas modificações morfológicas nas células colunares e caliciformes. As células colunares apresentaram-se mais alongadas e delgadas e no seu citoplasma numerosos vacúolos de tamanho e forma variados (Fig. 2C). Um grande número de células caliciformes mostrou deformações na sua forma característica (cálice) e adquiriram aspecto alongado, oval, globoso e fusiforme, além de redução ou ausência das projeções da membrana plasmática que delimitam a câmara globosa (Figs. 2D e 3A). A camada muscular apresentou evidências de degeneração (Fig. 3A) e em algumas cortes não foi detectada a presença da membrana peritrófica.

A análise quantitativa das células regenerativas mostrou que a toxina Cry1Ac ocasionou uma redução significativa no número dessas células na região mediana do mesêntero nas larvas em relação à testemunha ($GL = 4,43$, $t = -6,15$, $P = 0,0025$) (Fig. 4). No entanto, as poucas células observadas apresentaram-se bem preservadas na base do epitélio, com características morfológicas semelhantes ao grupo controle, porém sem nucléolo evidente (Fig. 3B).

A análise ultra-estrutural revelou que as células colunares nas larvas alimentadas com algodão não Bt apresentaram microvilos bastante longos e bifurcados, mitocôndrias com tamanho e forma variada (polimorfismo mitocondrial) na região apical, e na região basal, dobras da membrana plasmática as quais são conhecidas como labirinto basal (Figs. 3C, 3D e 5A). Nas larvas alimentadas com algodão Bt observaram-se alterações nos microvilos das células colunares, os quais apresentaram-se em menor número, mais curtos e alguns em degeneração (Fig. 5B). Notou-se ainda que na região apical dessas células houve uma menor variação na morfologia das mitocôndrias (Fig. 5C) e na região basal, ausência de dobras da membrana plasmática (Fig. 5D).

A célula caliciforme nas larvas alimentadas com algodão não Bt apresentou numerosas projeções da membrana voltadas para a câmara globosa, com núcleo basal, de morfologia oval,

bastante heterocromático e nucléolo bem evidente (Fig. 6A). Já nas larvas alimentadas com algodão Bt, essas células apresentaram degeneração das projeções da membrana e alteração na morfologia nuclear (Fig. 6B).

As células regenerativas e endócrinas não apresentaram modificações ultra-estruturais significativas entre os tratamentos, onde nas regenerativas o citoplasma foi bastante denso com predominância de polissomos livres, núcleo central, volumoso e com cromatina dispersa (Figs. 6C e 6D), enquanto as endócrinas células mostram morfologia alongada, contendo vários grânulos, em geral concentrados na região basal da célula (Fig. 6A).

Discussão

Após 20 minutos de ingestão de cerca de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac, presente nos discos de folhas de algodão Bt AcalaDTL-90B, as larvas do quarto instar de *A. argillacea* apresentaram modificações na parede do mesêntero com alterações morfológicas e ultra-estruturais nas células colunares e caliciformes, redução no número das células regenerativas, bem como degeneração da camada muscular, além de provocar destruição da membrana peritrófica em algumas regiões do mesêntero. As modificações morfológicas e ultra-estruturais observadas nas células colunares foram similares às reportadas por Lane *et al.* (1989), que alimentando larvas do quarto instar de *M. sexta*, com 10 μ L de δ -endotoxina do *B. thuringiensis var. Kurstaki* observaram após 1 a 5 minutos de exposição á toxina, modificações na morfologia dos microvilos e presença de vacúolos no citoplasma associado ao aparelho de Golgi, e que após 15 a 30 minutos de tratamento com a toxina, as células colunares apresentaram-se mais vacuolizadas e as mitocôndrias começaram a apresentar morfologia anormal. No entanto, os resultados da presente pesquisa revelaram que 20 minutos de ingestão de folhas de algodão Bt já foram suficientes para ocasionar essas alterações bem como modificações na morfologia das mitocôndrias e degeneração de alguns microvilos.

Copping & Menn (2000) mencionam que quando ocorre à associação das δ -endotoxinas com receptores específicos na membrana apical das células colunares há formação de poros aumentando sua permeabilidade, produzindo assim os efeitos observados nestas células. No entanto, as alterações nas microvilosidades e modificações na morfologia das mitocôndrias sugerem uma atuação direta ou indireta da toxina Cry1Ac também nas estruturas citoplasmáticas, pois estudos indicaram que as toxinas Cry podem interagir com proteínas intracelulares do citoesqueleto, especialmente a actina, durante as fases iniciais do seu modo de ação (Griffitts *et al.* 2003). Existem também evidências para a hipótese de ativação do mecanismo de apoptose pela proteína Cry1Ac, após sua ligação com as caderinas, proteínas de cobertura da membrana plasmática (Zhang *et al.* 2005). Assim, as modificações nas microvilosidades podem ser explicadas pela interferência da toxina Cry1Ac com a actina, uma proteína do citoesqueleto presente nessas especializações, enquanto que as alterações nas mitocôndrias podem estar relacionadas ao início do processo de apoptose desencadeado pela toxina, já que esta organela participa diretamente desse processo (Ribeiro *et al.* 2004, van Ginkel *et al.* 2007).

As modificações evidenciadas nas células caliciformes, no mesêntero das larvas alimentadas com algodão Bt indica que as células colunares não são os únicos alvos da toxina Cry1Ac como parece ser reportada na literatura de um modo geral. Na membrana apical das células caliciformes a enzima V-ATPase (complexo vacuolar ATPase) representa a principal fonte de energia servindo como um transportador iônico do H^+/K^+ por todo o intestino médio do inseto (Klein *et al.* 1996, Wieczorek *et al.* 1999, Gringorten 2001), e foi demonstrado por Krishnamoorthy *et al.* (2007) em *H. virescens* que a subunidade A da V-ATPase funciona também como sítio de ligação para a toxina Cry1Ac. Essa subunidade é parte periférica catalítica do complexo vacuolar ATPase, sendo essencial para a função desta enzima (Wieczorek *et al.* 2000). Assim, os resultados do presente trabalho reforçam a hipótese de que Cry1Ac ligada a V-ATPase, interfere com o transporte iônico

do H^+/K^+ e, conseqüentemente, desestabiliza tanto o equilíbrio iônico como o pH levando a um colapso do metabolismo (Knowles 1994).

As células regenerativas e endócrinas não apresentaram modificações morfológicas ou ultra-estruturais nas larvas alimentadas com algodão Bt. Porém, verificou-se uma redução significativa do número de células regenerativas, o que pode está relacionada ao processo de diferenciação das mesmas para reparar os danos provocados nas células colunares e caliciformes, evidenciado pela estratificação no epitélio. De acordo com Loeb *et al.* (2001), analisando cultura de células epiteliais do mesêntero de larvas de *H. virescens*, tratadas com doses subletais de toxina das linhagens AA 1-9 (800pg/ μ L) e HD-73 (600pg/ μ L) de *B. thuringiensis*, ao final de dois dias observaram que a linhagem HD-73 foi mais eficiente por conter a toxina Cry1Ac (Gould & Anderson 1991), produzindo redução no número de células colunares e caliciformes, além da diferenciação das células regenerativas para reposição dessas células. Devemos mencionar ainda que através de técnicas de imunohistoquímica, foi possível determinar que a célula colunar é a principal fonte de produção do fator de diferenciação das células do mesêntero (MDF), e que seus níveis aumentaram em culturas de células colunares tratadas com Bt (Loeb *et al.* 1999, Goto *et al.* 2000, Loeb *et al.* 2001). Dessa forma, é possível que as células colunares tenham liberado este fator promovendo a diferenciação das células regenerativas levando assim a estratificação do epitélio, e conseqüentemente reduzindo seu número. Já com relação às células endócrinas, a ausência de modificações pode esta relacionada ao fato dessas células não possuírem receptores para a toxina Cry1Ac ou por serem do tipo aberto, não entrando assim em contato com o lúmen (Cavalcante & Cruz-Landim 1999), e, por conseguinte não interagindo com toxina. Assim, conclui-se que após ingestão em média de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac, por um período de 20 minutos com algodão Bt AcalaDTL-90B, foram suficientes para ocasionar alterações a níveis morfológico e ultra-estrutural no mesêntero de larvas do quarto instar de *A. argillacea*, não apenas

nas células colunares e camada muscular, mas também nas células caliciformes, bem como redução significativa das células regenerativas.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho, a Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (DMFA/UFRPE) pelas valiosas contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho e a Jorge Braz Torres (DEPA/UFRPE) pelo auxílio na quantificação da toxina Cry1Ac.

Literatura Citada

Ayra-Pardo, C., L. Rodríguez-Cabrera, Y. Fernández-Parlá & P. Téllez-Rodríguez. 2006.

Increased activity of a hybrid Bt toxin against *Spodoptera frugiperda* larvae from a maize field in Cuba. *Biotec. Apl.* 23: 236-239.

Boborowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H.B. Zanettini. 2003. Genes de *Bacillus*

thuringiensis: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciê. Rural* 33: 843-850.

Cavados, C.F.G., S. Majerowicz, J.Q. Chaves, C.J.P.C. Araújo-Coutinho & L Rabinovitch.

2004. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* Larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 493-498.

Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects:

a review. *Naturalia* 24: 19-39.

Copping, L.G. & J.J. Menn. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and

efficacy. *Pest Manage. Sci.* 56: 651-676.

- Ctnbio. 2008.** Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Parecer técnico prévio conclusivo do Algodão-Bt. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em novembro de 2008.
- Dequech, S.T.B., L.M. Fiuza, R.F.P. Silva & R.C. Zumba. 2007.** Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis aizawai* e com ovos de *Campoletis flavicincta* (Hym., Ichneumonidae) Ciên. Rural 37: p.273-276.
- Dutton, A., H. Klein, J. Romeis & F. Bigler. 2002.** Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for predator *Chrysoperla carnea*. Ecol. Entomol. 27: 441-447.
- Estela, A., B. Escriche & J. Ferré. 2004.** Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Environ. Microbiol. 70: 1378–1384.
- Fiuza, L.M., C.N. Leroux, E. Goze & E.R. Frutos Charles. 1996.** Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry 1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidea): evidence of shared binding sites. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1544-1549.
- Goto, S., M. Takeda, R.S. Hakim & M.J. Loeb. 2000.** Immunohistochemical localization of MDF1 (midgut differentiating factor) in midgut cells of *Heliothis virescens*. In Vitro Cell Develop. Biol. 36A: 38-A.
- Gould, F. & A. Anderson. 1991.** Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 20: 30–38.
- Griffitts, J.S., D.L. Huffman, J.L. Whitacre, B.D. Barrows, L.D. Marroquin, R. Muller, J.R. Brown, T. Hennet, J.D. Esko & R.V. Aroian. 2003.** Resistance to a bacterial toxin is

mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.* 278: 45594–45602.

Gringorten, J.L. 2001. Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*, p.167–207. In I. Ishaaya (ed.), *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer-Verlag, Berlin, 334p.

Herrero, S., J. González-Cabrera, B. Tabashnik, & J. Ferré. 2001. Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5729–5734.

Jurat-Fuentes, J.L., F.L. Gould & M.J. Adang. 2002. Altered glycosylation of 63 and 68 kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5711–5717.

Klein, U., A. Koch & D.F. Moffett. 1996. Ion transport in Lepidoptera, p.236–264. In M.J. Lehane & P.F. Billingsley (eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London, 522p.

Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24: 275–308.

Krishnamoorthy, M., J.L. Jurat-Fuentes, R.J., McNall, T. Andacht & M.J. Adanga. 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses *Insect Bioch. Mol. Biol.* 37: 189–201.

Lane, N.J., J.B. Harrison & W. M. Lee. 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial d-endotoxin. *J. Cell Sci.* 93: 337-347.

- Lee, M.K., F. Rajamohan, F. Gould & D. H. Dean. 1995.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3836–3842.
- Leonard, B.R., J.B. Graves & P.C. Ellsworth. 1999.** Insect and mite pests of Cotton. p. 491-493. In C.W. Smith & T.J. Cothren (eds.), *Cotton: origin, history, technology and production*. John Wiley & Sons, New York, 864p.
- Loeb, M.J., H. Jaffe, D.B. Gelman & R.S. Hakim. 1999.** Two polypeptide factors that promote differentiation of insect midgut stem cells in vitro. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 40: 129–140
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakim, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599–606.
- Martin, F.G. & M.G. Wolfersberger. 1995.** *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exp. Biol.* 198: 91–96.
- Medeiros, P.T., E.H. Sone, C.M.S. Soares, J.M.C.S. Dias & R.G. Monnerat. 2006.** Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. *Hortic. Bras.* 24: 245-248.
- Michalany, J. 1990.** Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo, Editora Michalany, 247p.
- Mohan, M. & G.T. Gujar. 2001.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain end commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Crop Prot.* 20: 311-316.
- Monnerat, R.G., D. Bordat, M. Castelo Branco & F.H. França. 2000.** Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e Inseticidas Químicos Sobre a Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitóides. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 723-730.

- Oestergaard, J., R.U. Ehlers, A.C. Martínez-Ramírez & M.D. Real. 2007.** Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3623–3629.
- Ribeiro; J.N., A.R. Silva & R.A. Jorge. 2004.** Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40: 383-390.
- Ruiz, M.L., C. Segura, J. Trujillo & S. Orduz. 2004.** In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 73-79.
- Santos, T.M. & A.L. Boiça Júnior. 2001.** Resistência de Genótipos de Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 30: 297-303.
- Santos, T.M. & A.L. Boiça Júnior. 2002.** *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae) e *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera, Pentatomidae) em genótipos de algodoeiro: preferência para oviposição e capacidade predatória. *Acta Scientiarum* 24: 1341-1344.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User`s guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C.
- Sayyed, A.H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferre´ & D.J. Wright. 2000.** Genetic and biochemical approach characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509–1516.
- Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J. L. Ménsua & J. Ferré.. 1997.** Global variation in the genetic and biochemical basis of

diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12780–12785.

Torres, J.B., J.R. Ruberson & M.J. Adang. 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. Agric. For. Entomol. 8: 191-202.

van Ginkel, P.R., D. Sareen, L. Subramanian, Q. Walker, S.R. Darjatkoko, M.J. Lindstrom, A. Kulkarni, D.M. Albert & A.S. Polans. 2007. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. Clin. Cancer Res. 13: 5162-5169.

Wieczorek, H., G. Gruber, W.R. Harvey, M. Huss & H. Merzendorfer. 1999. The plasma membrane H⁺ V-ATPase from tobacco hornworm midgut. J. Bioenerg. Biomembr. 31: 67–74.

Wieczorek, H., G. Gruber, W.R. Harvey, M. Huss, H. Merzendorfer & W. Zeiske. 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H(+)V-ATPase. J. Exp. Biol. 203: 127–135.

Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, L. Rose-Young & L.A. Bulla. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R(1) expressed in insect cells. Cell Death Differ. 12: 1407–1416.

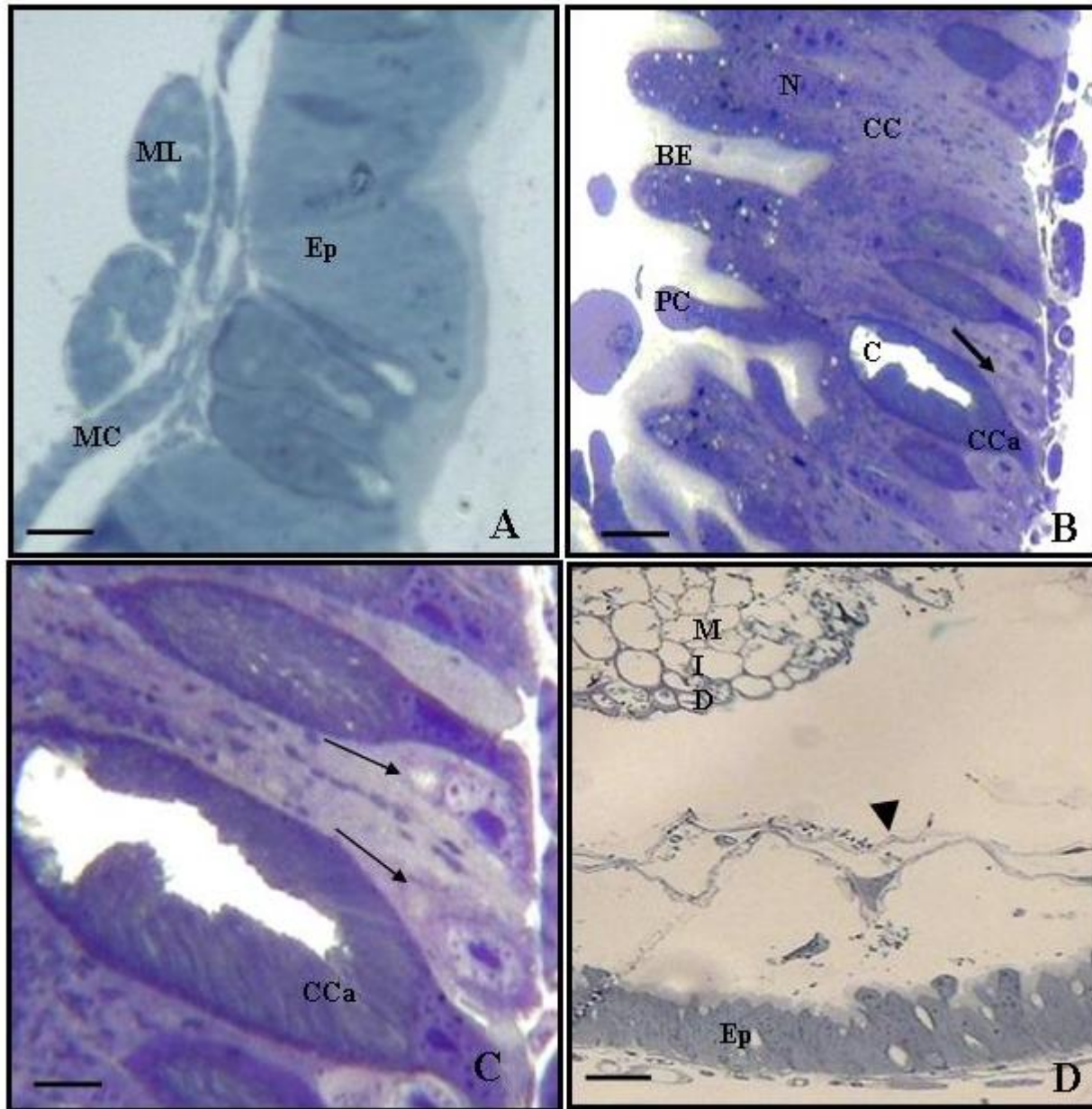


Figura 1. Microscopia de luz do mesêntero de *A. argillacea* alimentadas com algodão não Bt. (A) Detalhe da musculatura e epitélio. Barra = 100µm. (B) Células epiteliais. Barra = 100µm. (C) Detalhe das células: caliciforme e regenerativa. Barra = 25µm. (D) Notar membrana peritrófica entre o epitélio e o material ingerido. Barra = 200µm. Ep – epitélio simples, MC – músculo circular, ML – músculo longitudinal, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, Setas – célula regenerativa, N – núcleo, PC – protuberância citoplasmática, C – câmara globosa, BE – borda em escova, Ponta de seta – membrana peritrófica, M – material ingerido. Coloração Azul de Toluidina.

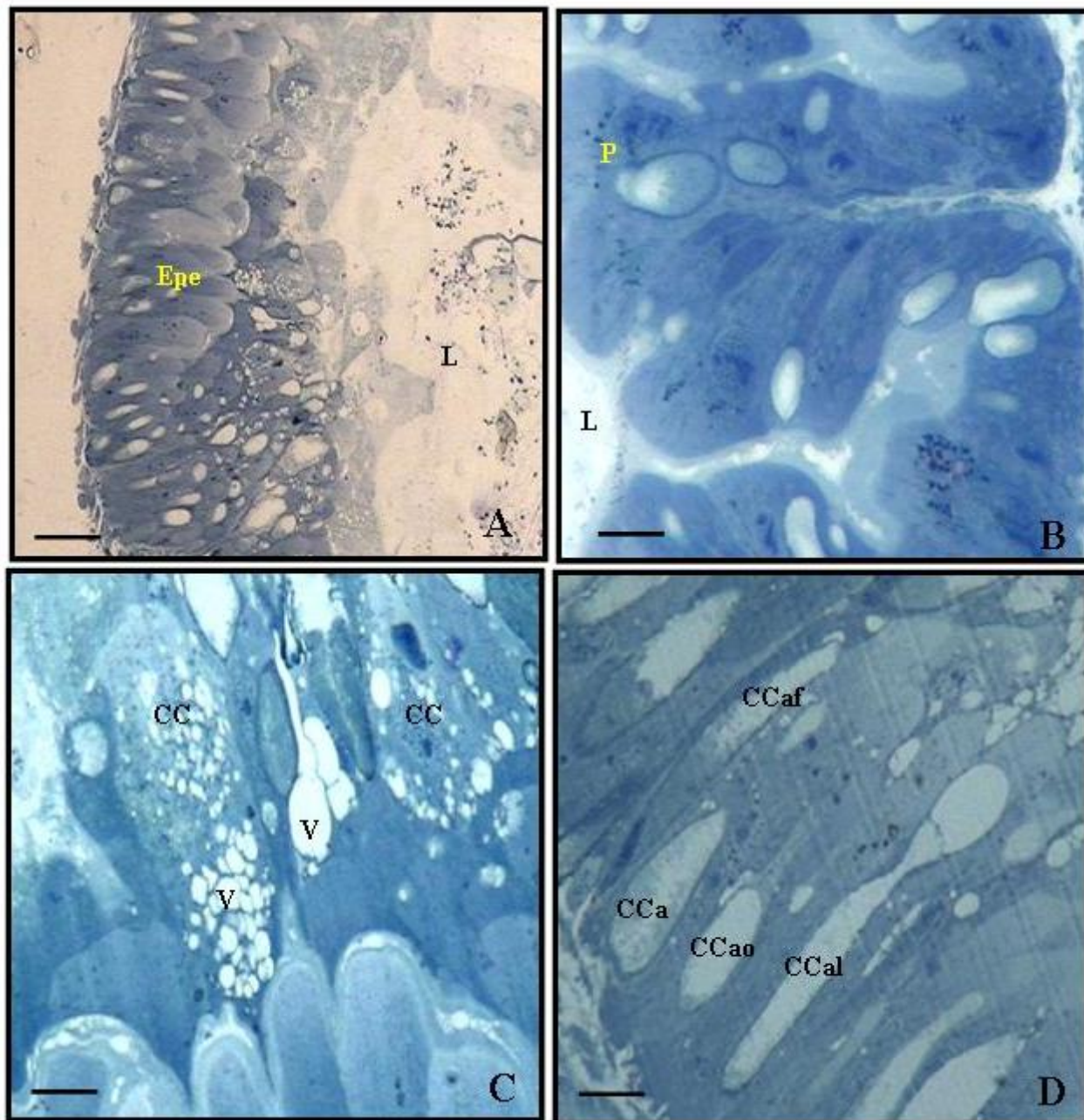


Figura 2. Microscopia de luz do mesêntero de *A. argillacea* alimentadas com algodão Bt. (A) Epitélio com estratificação. Barra = 100µm. (B) Epitélio simples com pregas. Barra = 25µm. (C) Célula colunar com numerosos vacúolos. Barra = 25µm. (D) Células caliciformes com morfologia variada. Barra = 25µm. Epe – epitélio estratificado, P – pregas do epitélio, CC – célula colunar, V – vacúolo, CCa – célula caliciforme, CCaf – célula caliciforme fusiforme, CCao – célula caliciforme oval, CCal – célula caliciforme alongada e ausência de projeções da membrana plasmática, L - lúmen. Coloração Azul de Toluidina.

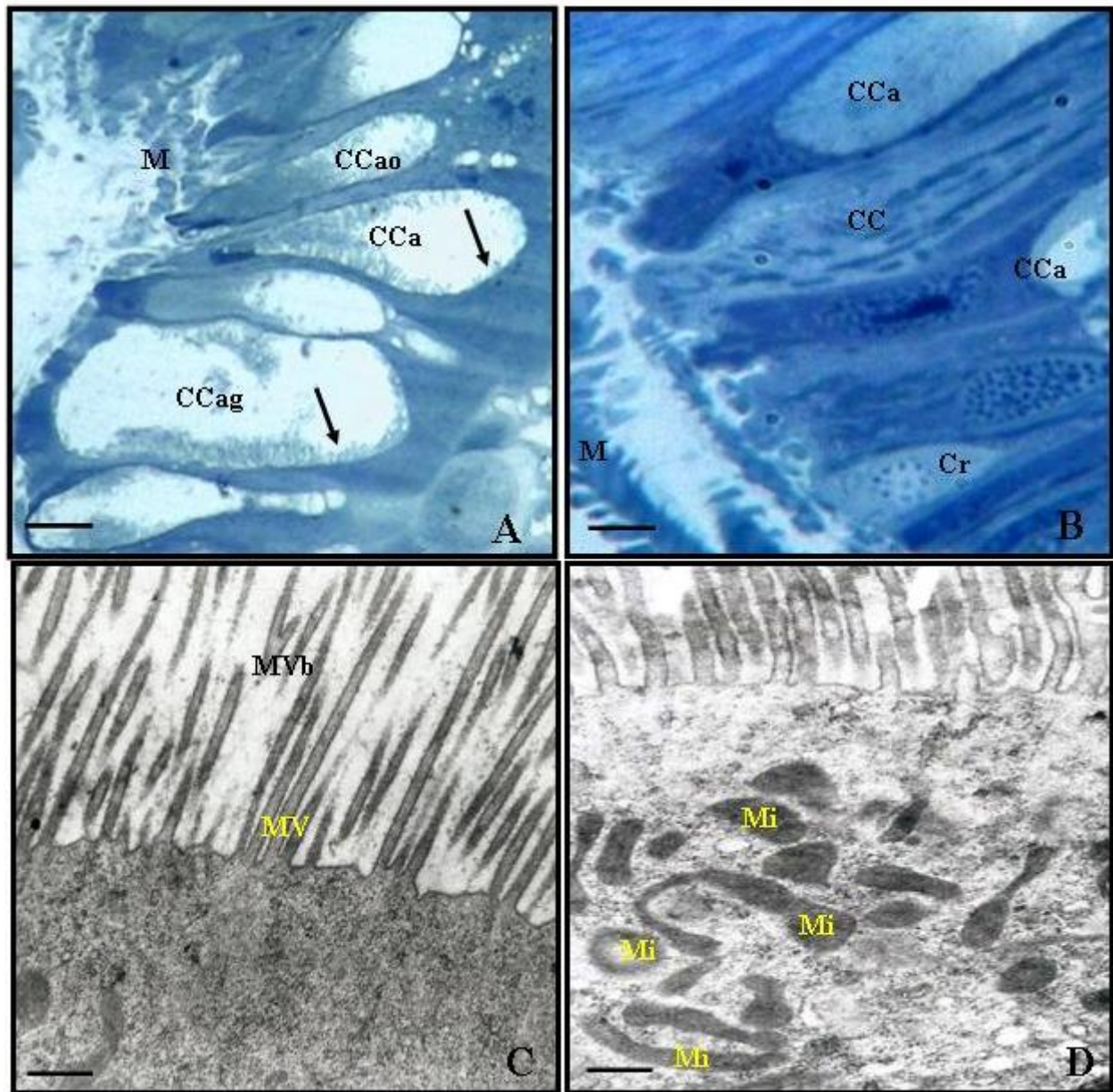


Figura 3. Microscopia de luz do mesêntero de *A. argillacea* alimentadas com algodão Bt. (A). Células caliciformes com morfologia alterada e com redução nas projeções da membrana plasmática. Barra = 25 μ m. (B) Célula regenerativa. Barra = 25 μ m. Coloração Azul de Toluidina. (C e D) Microscopia eletrônica de transmissão da região apical da célula colunar das larvas alimentadas com algodão não Bt. Barra = 0,5 μ m e Barra = 1,4 μ m, respectivamente. CCa – célula caliciforme, CCao – célula caliciforme oval, CCag – célula caliciforme globosa, Seta – projeções da membrana plasmática, M – músculo em degeneração, CC – célula colunar, Cr – célula regenerativa. MV – microvilos, MVb – microvilos bifurcados, Mi – mitocôndrias.

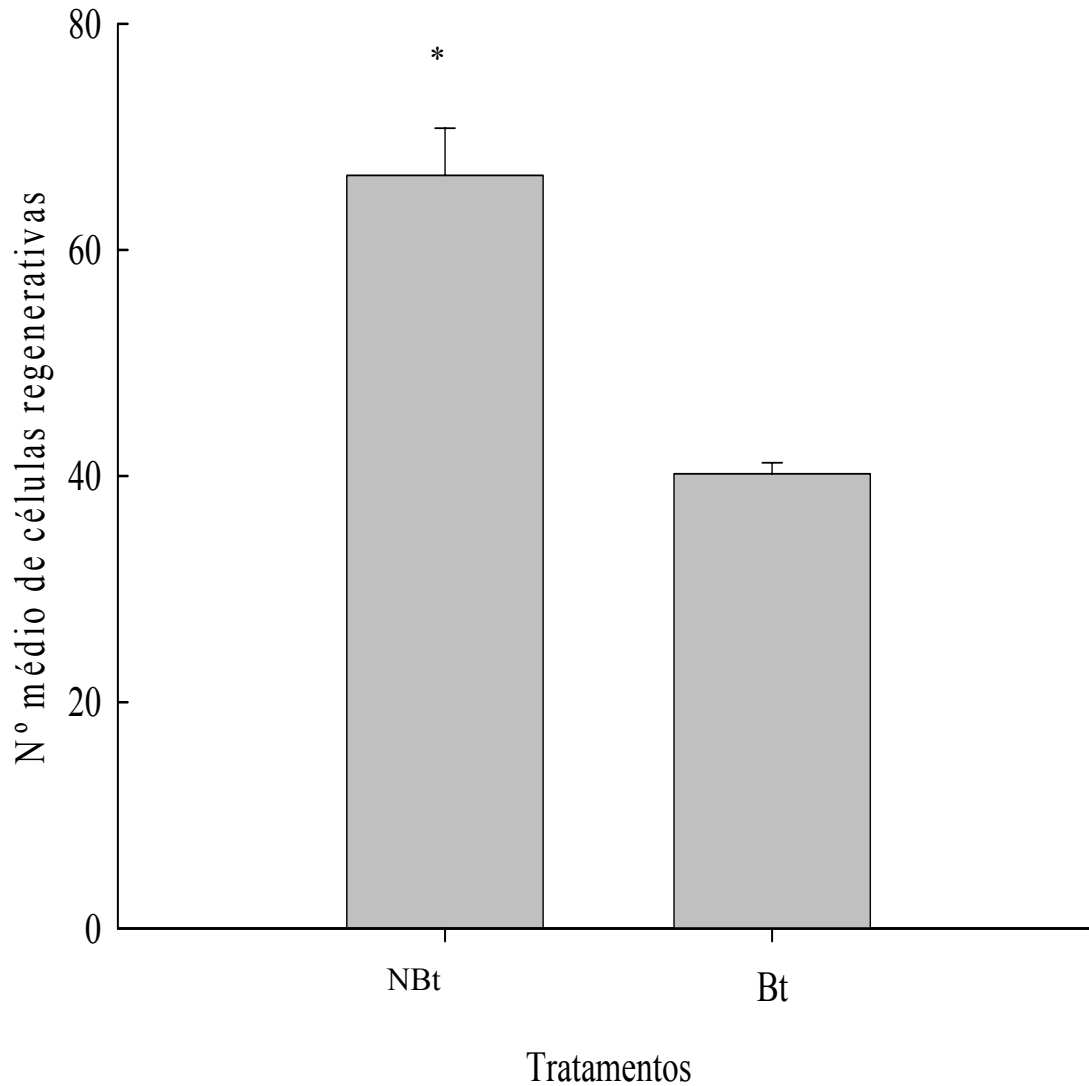


Figura 4. Número médio de células regenerativas do mesêntero de larvas de *A. argillacea*, alimentadas com folha de algodoeiro não-Bt (AcalaDTL-90) e Bt (AcalaDTL-90B). Temp: 25°C, UR: 70 ± 10% e fotofase de 12h. *Médias (± EP) diferem estatisticamente pelo teste de “t” entre os tratamentos (GL = 4,43, t = -6,15, P = 0,0025).

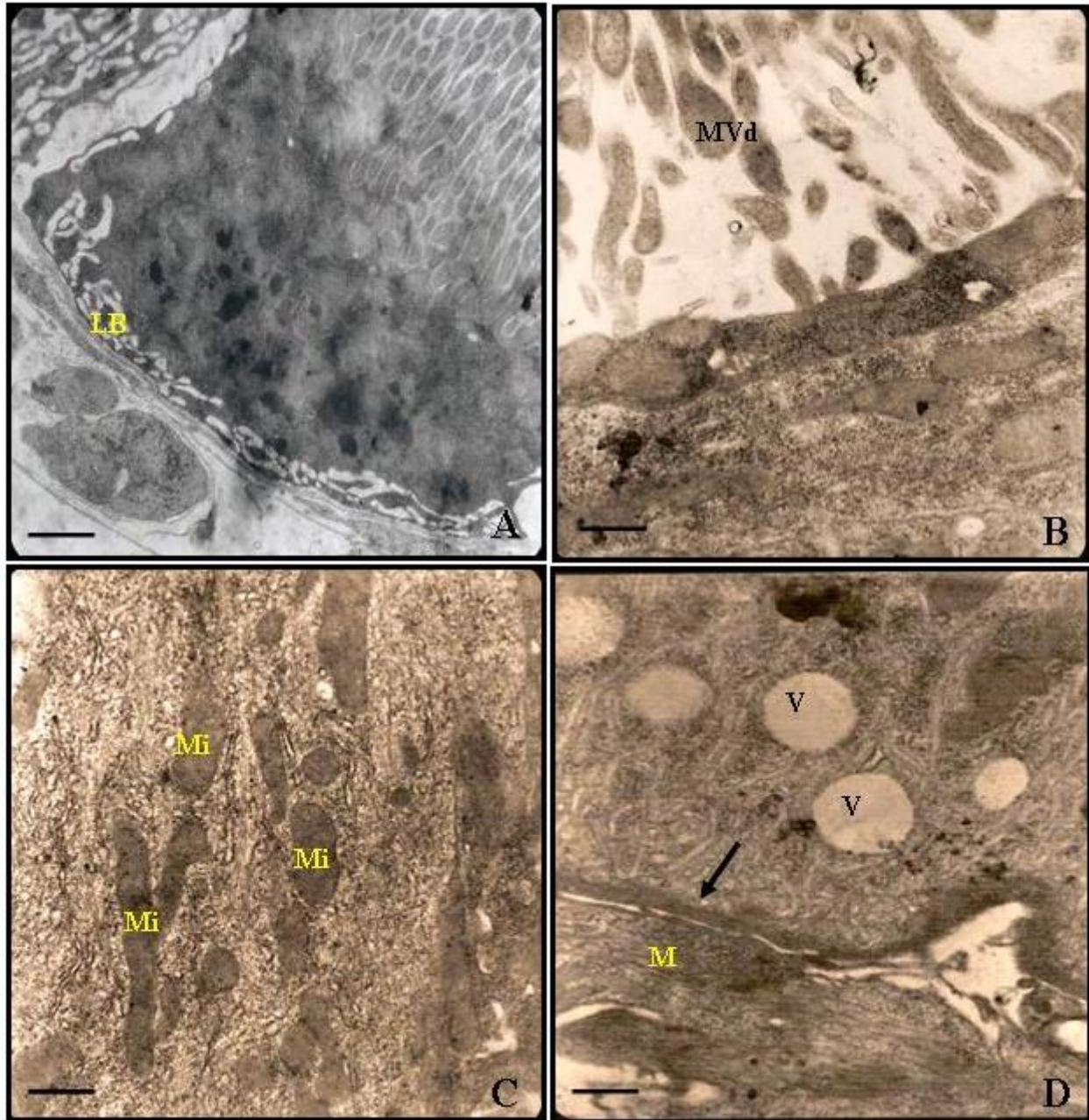


Figura 5. Eletromicrografias de transmissão: (A) Região basal da célula colunar de lagarta alimentada com algodão não Bt. Barra = 0,5 μ m. (B e C) Região apical da célula colunar de larva alimenta com algodão Bt. Barra = 0,5 μ m e Barra = 0,8 μ m, respectivamente. (D) Região basal da célula colunar de larva alimentada com algodão Bt. Barra = 0,5 μ m. LB - labirinto basal, MVd – microvilos em degeneração, Mi – mitocôndrias, M – músculo, Seta – ausência de labirinto basal, V - vacúolos.

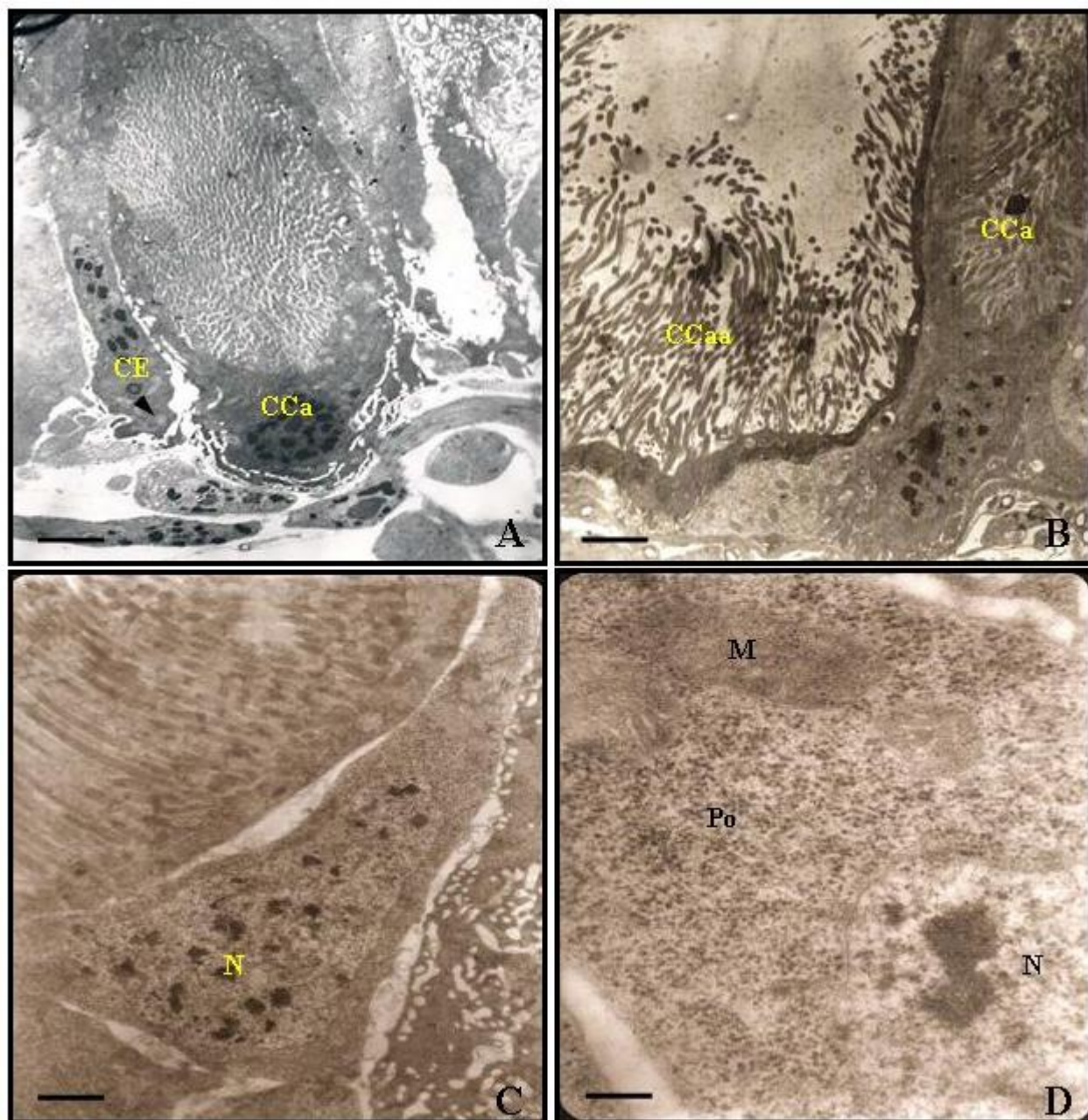


Figura 6. Eletromicrografias de transmissão: (A) Células: caliciforme e endócrina do mesêntero de larva alimentada com algodão não Bt. Barra = 0,5 μ m. (B) Célula caliciforme do mesêntero de larva alimentada com algodão Bt. Barra = 3,3 μ m. (C) e (D) célula regenerativa do mesêntero de larva alimentada com algodão Bt. Barra = 1,2 μ m e Barra = 0,2 μ m, respectivamente. CCa – célula caliciforme, CE – célula endócrina, Ccaa – célula caliciforme alterada, M – mitocôndria, N – núcleo, Po - polissomos.