

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EXPOSTOS A CRY1AC

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira)

RESUMO

Apesar da eficiência de formulações *Bacillus thuringiensis* (Bt) e plantas transgênicas Bt contra vários lepidópteros, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta baixa suscetibilidade a maioria deles. As razões dessa baixa suscetibilidade especificamente para toxinas Cry1Ac e Cry1Ab não estão totalmente esclarecidas. É possível que espécies moderadamente ou não suscetíveis ao Cry1Ac possam adquirir essa toxina e expô-la ao terceiro nível trófico. Este estudo investigou a resposta de *S. frugiperda* relacionadas ao Bt baseado em três hipóteses sobre sua baixa suscetibilidade: células regenerativas do intestino médio são ativadas pela toxina Cry1Ac e renovam as células epiteliais (i), na hemolinfa aumentam a produção de óxido nítrico e fenoloxidase como resposta à toxina (ii), e a tolerância está associada a variações qualitativas e quantitativas dos hemócitos. Testamos ainda a hipótese de que o consumo de *S. frugiperda* alimentadas com algodão Bt pode levar a alterações na ultra-estrutura e histoquímica das células digestivas, nos parâmetros humorais, hemograma e ultra-estrutura dos hemócitos de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Conclui-se que toxina Cry1Ac no algodão Bt não é suficientemente tóxica para matar as lagartas, mas induz alteração humoral e celular como sinal de resposta a um xenobiótico. A toxina Cry1Ac ingerida

por *S. frugiperda* pode expor o terceiro nível trófico (*P. nigrispinus*) e ocasionar alterações na distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio em decorrência da desorganização da matriz perimicrovilar. O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) revelou a presença de esferocristais que parecem estar envolvidos na defesa contra toxina. Os parâmetros humorais e o hemograma de *P. nigrispinus* não são afetados quando são criados com presa *S. frugiperda* alimentadas diariamente com folhas frescas de algodão Bt. No entanto, é capaz de induzir modificações pequenas em granulócitos e plasmócitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus thuringiensis*, predador, lagarta do cartucho-do-milho, ultra-estrutura, histoquímica, imunologia.

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND MORPHOPHYSIOLOGICAL ON *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EXPOSED TO CRY1AC

by

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

(Under the Direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

Despite of the Bt formulation and transgenic Bt plants efficiency against several lepidopteran species, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) exhibits low susceptibility to the majority of them. The reasons to this low susceptibility specifically to toxins Cry1Ac and Cry1Ab are not fully clarified. Also, it is possible that species moderately or not susceptible to Cry1Ac can convey the toxin to the third trophic level. This study investigated response of *S. frugiperda* related to Bt with three hypotheses about its low susceptibility: regenerative cells from midgut are activated by Cry1Ac protein and renovate the epithelial cells (i) in hemolymph they increase the nitric oxide and phenoloxidasas as a toxin response (ii) and the tolerance is associated to the qualitative and quantitative variations from hemocytes. We still tested the hypothesis that *S. frugiperda* fed with Bt-cotton can induce alterations in the ultrastructure and histochemistry of digestive cells, in humoral parameters, hemogram and ultrastructure of hemocytes of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), a generalist predator. It was concluded that Cry1Ac in Bt-cotton is not toxic enough to kill the armyworm, but it induce to humoral and cellular alterations as signal of response to xenobiotic. The Cry1Ac toxin ingested by *S. frugiperda* can expose the third trophic level (*P. nigrispinus*)

and it causes alterations in the distribution of glycogen, lipids and calcium caused by perimicrovillar matrix disorganization. The TEM revealed the presence of spherocrystals that appear to be involved in the defense against the toxin. The humoral parameters and the hemogram of *P. nigrispinus* are not affected when they are reared with prey *S. frugiperda* fed daily with leaf Bt-cotton. However it is capable of induces little modifications in granulocytes and plasmocytes.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, predator, fall armyworm, ultrastructure, histochemistry, immunology.

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EXPOSTOS A CRY1AC

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

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

RECIFE - PE

Fevereiro - 2011

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J.  
E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) EXPOSTOS A CRY1AC

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Jorge Braz Torres – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E MORFOFISIOLÓGICOS EM *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EXPOSTOS A CRY1AC

por

FRANKLIN MAGLIANO DA CUNHA

Orientador:

---

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores :

---

Jorge Braz Torres – UFRPE

---

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

---

Fábio André B. dos Santos - CPqAM-FIOCRUZ

---

Luiz Carlos Alves – CPqAM-FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

A professora Ana Carolina Faraldo (*in memoriam*)  
que mesmo pelo pouco tempo de contato abriu nossos  
horizontes para a realização deste trabalho.

DEDICO.

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

OFEREÇO.



## AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ e Laboratório de Pesquisa Keizo Asami (LIKA/UFPE), representados pelos pós-doutores Fábio A. B. Santos e Luiz Carlos Alves, por facultarem o desenvolvimento de parte da minha pesquisa.

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

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

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

Aos meus parentes por todo o carinho e incentivo.

Aos meus orientadores Valéria Wanderley Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Jorge Braz Torres por todo respeito, carinho, amizade e profissionalismo compartilhados comigo durante todos esses anos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Histologia e aos colegas de turma pela sincera amizade e constante disposição em colaborar comigo.

Ao professor Flávio H. Caetano, ao doutorando Bruno Fioreli e a graduanda Rebeca Alves (UNESP – Rio Claro,SP) pela colaboração na microscopia eletrônica.

Ao professor Valdemiro Amaro da Silva Júnior pela disponibilidade na utilização do Laboratório de Patologia na UFRPE para preparação dos cortes em historesina.

## SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS .....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	01
LITERATURA CITADA.....	08
2 RESPOSTA IMUNE E MECÂNICA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AO ALGODÃO BT E AO BT FORMULADO ..	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO .....	29
AGRADECIMENTOS .....	32
LITERATURA CITADA .....	32
3 ULTRA-ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS DIGESTIVAS DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ALIMENTADOS COM PRESAS CRIADAS EM ALDOGÃO-Bt .....	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT .....	52
INTRODUÇÃO .....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	55

	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
	AGRADECIMENTOS .....	60
	LITERATURA CITADA .....	60
4	INTERAÇÕES INSETO/ALDOGÃO-Bt SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURA DOS HEMÓCITOS DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE).....	69
	RESUMO.....	70
	ABSTRACT .....	71
	INTRODUÇÃO .....	72
	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
	RESULTADOS.....	77
	DISCUSSÃO .....	79
	AGRADECIMENTOS .....	81
	LITERATURA CITADA .....	81

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das plantas domesticadas de grande significado para a humanidade devido a sua alta capacidade de aproveitamento, principalmente, em relação as suas fibras (Corrêa 1989). O algodão é cultivado em mais de 80 países em uma área superior a 33,8 milhões de hectares, com uma estimativa de produção para a safra 2009/2010 em torno de 22,5 milhões de toneladas no mundo. No Brasil as estimativas são de que a cultura ocupe uma área entre 753,4 a 805,6 mil hectares com produtividade entre 1.129,8 a 1.210,0 toneladas (CONAB 2010).

A importância socioeconômica do algodão atrela-se à questão do controle de insetos-praga como sendo um dos fatores que traz a maior parcela de custo na produção dessa cultura. Segundo Richetti *et al.* (2004), o grande número de aplicações requeridas pela cultura (cerca de 12 a 14 pulverizações) é um dos fatores que mais encarecem a sua produção, chegando a superar os gastos com aplicação de fertilizantes. O algodoeiro hospeda mais de 250 espécies de insetos e ácaros (Silva *et al.* 1968), que se utilizam da planta e que podem assumir status de praga. Dentre essas, aproximadamente 32 espécies são mais comumente consideradas como pragas do algodoeiro ocasionando redução significativa na sua produção.

Como um dos maiores causadores de prejuízos nesta cultura os lepidópteros se destacam por promoverem danos diretos e indiretos ao algodoeiro. Mundialmente, espécies de *Helicoverpa*, *Heliiothis* e *Spodoptera* são os mais importantes. No Brasil, os principais lepidópteros pragas do algodoeiro são a lagarta das maçãs (*Heliiothis virescens* Fabricius), a

lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saunders), o curuquerê (*Alabama argillacea* Hübner), e espécies do complexo *Spodoptera* (Santos 2001, Fernandez 2002).

*Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) vulgarmente conhecida como lagarta militar ou do cartucho-do-milho é a principal praga do milho e possui distribuição cosmopolita. Esse inseto originário das zonas tropical e subtropical das Américas encontra-se na atualidade amplamente distribuído no continente Americano (Cruz 1995). Devido a sua aptidão polífaga, consegue se alimentar em mais de 30 hospedeiros, incluindo o algodoeiro (Cruz 1995, Pogue 2002). No entanto, demonstra preferência alimentar por plantas pertencentes à família das Gramineae como milho, milheto, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar (Capinera 2002).

As perdas causadas por esse lepidóptero no Brasil variam entre 15 e 34% da produção na cultura do milho independente do potencial de produção. Lagartas de *S. frugiperda* alimentam-se principalmente de folhas, reduzindo a área foliar e afetando a capacidade fotossintética da planta, e conseqüentemente a produção. Nos estágios mais avançados da planta podem danificar o pendão e a espiga. Estas injúrias são diferenciadas em função da espécie de planta atacada, estágio fenológico, época de ataque e intensidade de infestação (Cruz *et al.* 1999). O principal problema causado por essas lagartas no algodoeiro advém da destruição de estruturas reprodutivas como botões florais e maçãs, onde são menores os teores de gossipol, como no interior das maçãs (Meyer *et al.* 2004).

O controle realizado para minimizar a ação dessas lagartas consiste geralmente no emprego de inseticidas sintéticos, que apesar de eficientes, podem promover diversos problemas como a presença de resíduos nos alimentos acima dos limites permitidos por lei, ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias, intoxicações aos aplicadores e seleção de populações de pragas resistentes, entre outros efeitos diretos e indiretos (Roel *et al.* 2000). Além disso, o controle de *S. frugiperda* vem se caracterizando como um grande desafio daqueles ligados ao desenvolvimento

agrícola do país, apesar dos inúmeros estudos já realizados, com os mais diversos métodos de controle (Kennedy 2008).

Como alternativa aos métodos de controle convencionais, o uso de plantas transgênicas na agricultura tem aumentado nos últimos 17 anos, através das técnicas de modificações genética promovidas pela biotecnologia, e tem sido considerada como um dos grandes avanços na agricultura, onde segundo Fontes *et al.* (2002) só se compararia a revolução verde ocorrida na década dos anos 70. O uso de plantas geneticamente modificadas (GM) com genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) visando à proteção completa da planta ao longo do seu desenvolvimento contra certas espécies de lepidópteros e coleópteros tem obtido grande destaque no cenário agrícola mundial (James 2009).

Para expressarem resistência a insetos praga, plantas Bt são obtidas através da técnica do DNA recombinante, que no caso do algodão, utiliza-se de genes oriundos do Bt. Esta bactéria durante o seu processo de esporulação produz inclusões cristalinas que são pró-toxinas chamadas de  $\delta$ -endotoxina (Glare & O'Callaghan 2000). E quando ingerida pelo inseto, é solubilizada e convertida proteoliticamente em fragmentos de polipeptídeos tóxicos de aproximadamente 650 aminoácidos (65 Kda). Estes ao se ligarem especificamente aos receptores presentes nas microvilosidades das células digestivas do intestino médio de insetos suscetíveis promovem a criação de poros na membrana celular.

Essas lesões causam desbalanceamento iônico no interior da célula, causando lise do epitélio intestinal e morte do inseto pela desnutrição e septicemia (Visser *et al.* 1990, Li *et al.* 1991, Gill *et al.* 1992, Lambert & Peferoen 1992, Sousa *et al.* 2010). As  $\delta$ -endotoxinas produzidas pela bactéria são codificadas por genes *cry* (= Cristais), os quais até o presente momento são descritos em mais de 400 genes (Crickmore *et al.* 2011).

Os benefícios do cultivo de culturas Bt, como o arroz, milho, batata e algodão foram bem descritos. Pragas, principalmente da ordem Lepidoptera, como a broca do milho europeia (*Ostrinia nubilalis* Hübner) e a lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera* Hübner), foram controladas com sucesso em culturas Bt, resultando em aumentos na produtividade da cultura e valor econômico, ao mesmo tempo que permite uma redução drástica da utilização de pesticidas destinadas as pragas alvo (Shelton *et al.* 2002, Smith 2005, Fitt 2008).

Como as toxinas Bt estão contidas nos tecidos das plantas, a exposição de organismos não-alvo que não se alimentam da própria planta é significativamente reduzido em relação à exposição resultante de pulverização com inseticidas sintéticos (Jouanin *et al.* 1998). Dessa forma, as pragas que se alimentam em partes das plantas que não são atingidas por pulverizações, tais como as brocas do caule que se alimentam dentro do caule, são expostas às toxinas transgênicas Bt (Thies & Devare 2007).

Um outro fator positivo é que as toxinas sendo expressas no tecido vegetal, os insetos alvo tornam-se expostos a estas por todo período de infestação, incluindo as pragas mais vulneráveis em suas fases de desenvolvimento (Jouanin *et al.* 2008). É importante notar ainda o nível de especificidade das toxinas Bt, que são tóxicas apenas para um número limitado de espécies dentro de poucas ordens de insetos e o desenvolvimento de resistência as plantas Bt, portanto, é muito mais específico para o inseto-alvo do que muitos inseticidas (Avisar *et al.* 2009)

Apesar de todas estas vantagens estabelecidas pelas plantas Bt, a especificidade da primeira geração de algodão e de milho modificadas para produzir toxinas Cry1Ac e Cry1Ab, respectivamente, não oferecem o controle de *S. frugiperda* (Adamczyk *et al.* 1998, Perlak *et al.* 2001, Santos & Torres 2010). A falta de eficácia contra esse lepidóptero, entre outras razões, levou a necessidade de utilização dos genes adicionais Cry1F e Cry2Ab, produzindo consequentemente uma nova geração de transgênicos para o milho e algodão visando o sucesso



do controle dessa praga e outras espécies (Adamczyk *et al.* 2001, Adamczyk & Gore 2004). No entanto, as razões da baixa suscetibilidade observada em *S. frugiperda* para Cry1Ac e Cry1Ab ainda não estão totalmente esclarecidas.

A resistência ou tolerância a essas endotoxinas do Bt são em grande parte, atribuídas a mutações em receptores do intestino médio que podem ser única para o inseto, e específico para as proteínas em ação (Van Rie *et al.* 1990, Pigott & Ellar 2007). Estudos realizados por Wang *et al.* (2007) demonstram, por exemplo, que em populações de *Trichoplusia ni* (Hübner), oriundas de casa de vegetação, a resistência parece estar ligada a incompatibilidade entre os receptores das células do intestino médio e as toxinas que aí deveriam se ligar. Conseqüentemente, devido a essa especificidade, é possível que custos fisiológicos ao Bt também variem entre as espécies alvos.

Até o momento, sabe-se que a ação das proteínas Cry1Ac, expressada por muitas variedades transgênicas, depende de fatores, que incluem a variabilidade geográfica das populações-alvo e os seus diferentes graus de suscetibilidade, os níveis de expressão de toxinas em partes da planta e as diferenças entre as variedades utilizadas (Gould & Tabashnik *et al.* 1998). A origem geográfica das populações e diferenças na suscetibilidade a toxinas Cry já foram investigadas para *S. frugiperda* e os resultados favorecem o apoio sobre as questões de variabilidade genética (Monnerat *et al.* 2006). Entretanto, os níveis de toxina Cry1Ac expressada no algodão Bt não são suficientes para causar a mortalidade dessa lagarta (Perlak *et al.* 2001, Santos & Torres 2010).

Outros mecanismos, ou combinações destes também podem reduzir a ação das toxinas do Bt. Estes incluem reações de coagulação, que impedem a solubilização das toxinas Bt (Ma *et al.* 2005a), as mudanças no processamento proteolítico das toxinas, mudanças no pH do lúmen intestinal e elevada resposta imune (Ma *et al.* 2005b). Além disso, a capacidade de reparação das células do intestino médio aos danos promovidos pelas toxinas do Bt como ocorrem, por

exemplo, em populações resistentes de *H. virescens*, ampliam a relação desses mecanismos com a baixa susceptibilidade e resistência em lagartas de pragas-alvos para as toxinas Cry (Ferré & van Rie 2002).

Como toda tecnologia em constante desenvolvimento, além da elucidação dos mecanismos de resistência ligados a essas culturas, o emprego de plantas GM, como o algodoeiro Bt, apresenta outros aspectos que necessitam de constantes pesquisas como, por exemplo, o exame dos potenciais efeitos adversos sobre organismos não-alvo que poderiam existir através do transporte de proteínas Bt do corpo da presa/hospedeiro não alvo ou pouco susceptível aos predadores e parasitóides como uma provável via de impacto a esses organismos, para que desta maneira não haja perda de sua eficácia ou impossibilidade de uso (Head *et al.* 2001, Bernal *et al.* 2002, Conner *et al.* 2003, Dutton *et al.* 2003).

Na maioria dos trabalhos realizado com predadores e parasitóides o objetivo principal é verificar os possíveis efeitos deletérios relacionados à tabela de vida e fertilidade destes, e seus reflexos sobre suas aptidões ecológicas quando expostos a toxinas Cry (Romeis *et al.* 2006, Torres & Ruberson 2006). Essas análises têm demonstrado que não há efeitos negativos sobre esses parâmetros que possam estar diretamente relacionados às toxinas Cry (Barraclough *et al.* 2009, Lundgren *et al.* 2009, Mann *et al.* 2010). No entanto, poucas pesquisas tem investigado o efeito tritróficos do algodão Bt referentes às interações morfológicas e imunológicas, como é o caso do trabalho de Rodrigo-Simón *et al.* (2006) com *Chrysoperla carnae* (Stephens).

Neste contexto os aspectos relacionados ao papel da imunidade dos insetos tem sido pouquíssimo explorado e no Brasil a ausência de trabalhos deixa uma lacuna para investigar de que maneira as interações de pragas tolerantes a toxina Cry1Ac como *S. frugiperda*, no algodão Bt, poderiam estar sendo afetadas por um possível custo na imunidade em relação a sua tolerância à toxina. E de que maneira isso poderia se refletir em suas relações com organismos

não alvos como predadores e parasitóides, fornecendo assim mais subsídios para melhorar a aplicabilidade das culturas Bt.

Diferente do que ocorre nos vertebrados, que se defendem empregando um mecanismo imune interligado, conhecido como imunidade inata e adquirida, e que se utiliza de células especializadas conhecidas como linfócitos B e T, nos insetos apenas a imunidade inata, a qual é bem desenvolvida permite uma resposta geral e rápida a agentes infecciosos (Lavine & Strand 2002).

Nos insetos o sistema imunológico desencadeia uma resposta celular e humoral. A resposta celular, executada por células especializadas, denominadas de hemócitos que circulam livremente por toda a hemolece através da hemolinfa desempenham ações de estruturação da defesa como, por exemplo, fagocitose, nodulação, melanização e processos de encapsulação em decorrência da presença de partículas ou organismos estranhos ao inseto (Vilmos & Kurucz 1998, Lavine & Strand 2003, Marmaras & Lampropoulou 2009).

As reações do tipo humoral, realizadas na ausência direta dos hemócitos, incluem a produção de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa (Meister *et al.* 2003), intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio (Vass & Nappi, 2001), e as cascatas do complexo enzimático que regulam a coagulação ou melanização da hemolinfa (Gillespie *et al.* 1997; Cotter & Wilson 2002).

Para que o sistema imunológico dos insetos seja desafiado, se faz necessário que agentes patogênicos ultrapassem as suas barreiras estruturais, representadas pela parede externa do corpo, a cutícula e o epitélio do tubo digestivo, que por sua própria organização são consideradas excelentes barreiras mecânicas de defesa (Schmid-Hempel & Ebert 2003). Entretanto, ao serem transpostas, verdadeiros “gatilhos” imunológicos são disparados. Esses são basicamente mediados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que se ligam a moléculas padrão

associadas à patógenos (PAMPs), onde várias destas encontram-se como componentes da parede celular de bactérias na forma de lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanas e  $\beta$ -1,3-glucanas que são reconhecidas pelo sistema por meio dos PRRs dos hemócitos ou fatores humorais (Marmaras & Lampropoulou 2009).

Observações prévias indicam que o sistema imunológico de lagartas de Lepidoptera é induzido após alimentação com dose subletal de formulações de Bt (Rahman *et al.* 2006). Essa indução refletida na hemolinfa é provavelmente causada por danos celulares no revestimento do intestino médio desses insetos (Rahman *et al.* 2004, Ma *et al.* 2005a). Os reflexos dessa ação sobre a imunidade dos insetos segundo Brown (2003), é um traço evolutivo importante, pois as repercussões dos seus efeitos sobre a aptidão do indivíduo são de grande valia nas questões ecológicas.

Assim, a avaliação do uso do algodoeiro Bt e seus possíveis efeitos sobre a morfofisiologia do sistema digestivo e imunológico (celular e humoral) de *S. frugiperda*, e do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas), são de importância para o entendimento das relações tritróficas em culturas GM.

### **Literatura Citada**

**Adamczyk, JJ., J.W. Holloway, G.E. Church, R.B. Leonard & D.J.B. Graves. 1998** Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin. J. Econ. Entomol. 91:539-545.

- Adamczyk, J.J., L.C. Adams & D.D. Hardee. 2001.** Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. J. Econ. Entomol. 94: 1589-1593.
- Adamczyk, J.J. & J. Gore. 2004.** Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F, and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Fla. Entomol. 87: 427-432.
- Avisar, D., H. Eilenberg, M. Keller, N. Reznik, M. Segal, B. Sneh & A. Zilberstein. 2009.** The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. Plant Sci. 176: 315–324.
- Barraclough, E.I., E.P.J. Burgess, B.A. Philip, M.W. Wohlers & L.A. Malone. 2009.** Tritrophic impacts of Bt-expressing transgenic pine on the parasitoid *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae) via its host *Pseudocoremia suavis* (Lepidoptera: Geometridae) J. Biol. Control 49: 192-199
- Bernal, C.C., R.M. Aguda & M.B. Cohen. 2002.** Effect of rice lanes transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividpennis*. Entomol. Exp. Appl. 102:21–28.
- Capinera, J.L. 2002.** Handbook of vegetable pests. San Diego, Academic Press, 2700p.
- CONAB. 2010.** Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura –Pecuária e Abastecimento– MAPA. Brasília.
- Conner, A.J., T.R. Glare & J.P. Nap .2003.** The release of genetically modified crops into the environment – Part II. Overview of ecological risk assessment. Plant J. 33:19-46.
- Corrêa, J.R.V. 1989.** Algodoeiro: Informações básicas para seu cultivo. Belém: Embrapa – UEPAE. 29 p. Documentos, 11

- Cotter, S. & K. Wilson. 2002.** Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity* 88:229–234.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnpef, J. Van Rie & D. Lereclus, J. Baum. 1998.** Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62: 807-813. Disponível em [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acessado em 20/10/2010.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. Circular Técnica, 21.
- Cruz, I., M.L.C Figueiredo & M.J. Matoso. 1999.** Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 40p (Circular Técnica 30).
- Dutton, A., H. Klein, J. Romeis & F. Bigler. 2003.** Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biol. Control* 26:209–215.
- Fernandez, M.G. 2002.** Distribuição espacial e amostragem seqüencial dos principais noctuídeos do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 140p.
- Ferré, J. & J.V. Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501–533.
- Fitt, G.P. 2008.** Have Bt crops led to changes in insecticide use patterns and impacted IPM? p.303-328. In Romeis, J. et al., eds *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs* Berlin, Springer, 441p.
- Fontes, E.M.G., C.S.S. Pires, E. Sujii & A.R. Panizzi. 2002.** The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotrop. Entomol.* 3: 497-513.

- Gill, S.S., E.A. Cowles & P.V. Pietrantonio. 1992.** The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost, & T. Trenczek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42:611-643.
- Glare, T.R. & M.O'Callaghan. 2000.** *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety.* Chichester: John Wiley, 350p.
- Gould, F. & B.E. Tabashnik. 1998.** Bt-cotton resistance management, p. 65-105. In M. Mellon & J. Rissler (eds.). *Now or never: serious new plans to save a natural pest control.* Cambridge, UCS Publications, 149p.
- Head, G., C.R. Brown, M.E. Groth & J.J. Duan. 2001.** Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomol. Exp. Appl.* 99:37–45.
- Jouanin, L., M. Bonadé-Bottino, C. Girard, G. Morrot & M. Giband. 1998.** Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 1: 1-11.
- James, C. 2009.** Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009, Ithaca, NY, ISAAA Briefs 39.
- Kennedy, G.G. 2008.** Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs, p. 1-26. In J. Romeis, A.M. Shelton & G.G. Kennedy (eds.), *Integration of insect-resistant genetically modified crops with IPM systems.* Berlin, Springer, 441p.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295-1309.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2003.** Hemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple *q* and *b* integrin subunits. *Insect Mol. Biol.* 12, 441–452

- Lambert, B. & M. Peferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42:112–122.
- Lundgren, G.J, A.J.Gassmann, J.Bernal, J.J. Duan & J. Ruberson. 2009.** Ecological compatibility of GM crops and biological control. *Crop Prot.* 28:1017-1030.
- Li, J., J. Carrell & D.J. Ellar. 1991.** Crystal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- Ma, G., H. Roberts, M. Sarjan, N. Featherstone, J. Lahnstein, R. Akhurst & O. Schmidt. 2005a.** Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:729–739.
- Ma, G., M. Sarjan, C. Preston, S. Asgari & O. Schmidt. 2005b.** Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. *Insect Sci.* 12, 319–330.
- Mann, R.S., R.S.Gill, A.K.Dhawan & P.S.Shera. 2010.** Relative abundance and damage by target and non-target insects on Bollgard and Bollgard II cotton cultivars. *Crop Prot.* 29:793-801.
- Marmaras, V.J. & M. Lampropoulou. 2009.** Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell. Signal* 21: 186-195.
- Meister, M. & M. Lagueux. 2003.** *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol.* 5: 573-580.
- Meyer, R., S. Vorster & I.A. Dubery. 2004.** Identification and quantification of gossypol in cotton by using packed micro-tips columns in combination with HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* 380:719-724.
- Meister, M. & M. Lagueux. 2003.** *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol.* 5: 573-580.
- Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Ordúz, G. Jaramillo, G. Benintende, J. Cozzi, M.D. Real, A.M. Martinez, C. Rausell, J. Cerón, J.E. Ibarra, M.C. Rincon-Castro, A.M.**



- Espinoza, L. Meza-Basso, L. Cabrera, J. Sánchez, M. Soberon & A. Bravo. 2006.** Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Latin America Is Associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7029–7035.
- Perlak, F.J., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R.A. Ihrig & J.K. Roberts. 2001.** Development and commercial use of Bolgard<sup>®</sup> cotton in the USA – early promises versus today’s reality. *Plant J.* 27: 489-501.
- Pigott, C.R. & D.J. Ellar. 2007.** Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. R* 71:255-281
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Am. Entomol. Soc.* 43: 1-202.
- Rahman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari, O. Schmidt, O. 2004.** Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:2696–2699.
- Rahman, M.M., G. Ma, H.L.S. Roberts & O. Schmidt. 2006.** Cell-free immune reactions in insects. *J. Insect Physiol.* 52:754–762.
- 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.
- Rodrigo-Simón, A., R.A. de Maagd, C. Avilla, P.L. Bakker, J. Molthoff, J.E. González-Zamora & J. Ferré. 2006.** Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1595–1603.

- Romeis, J., M. Meissle & F. Bigler. 2006.** Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotech.* 24: 63–71.
- Romeis, J., A.M. Shelton & G.G. Kennedy. 2008.** Insect resistant transgenic crops and biological control, p. 87–118. In *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs* (Romeis, J. et al., eds), Berlin, Springer, 459p
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000.** Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59: 53-58.
- Santos, W.J. 2001.** Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro, p.181-203. In *Algodão: Tecnologia de Produção/ Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão*. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, 296p.
- Santos, R.L. & J.B. Torres. 2010.** Produção da proteína Cry1Ac em algodão transgênico e controle de lagartas. *Rev. Bras. Ciências Agr.* 5: 509-517.
- Shelton, A.M., J.Z. Zhao, & R.T. Roush. 2002.** Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 845–881
- Silva, A.G.A, C.R. Gonçalves, D.M. Galvão, A.J.L. Gonçalves, J. Gomes, M.N. Silva & L. Simoni. 1968.** Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores. Parte II - 1º tomo. Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro (Brasil): Ministério da Agricultura, 622 p.
- Schmid-Hempel, P. & D. Ebert. 2003.** On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. and Evol.* 18: 27–32.
- Smith, C.M. 2005.** Plant resistance to arthropods: Molecular and conventional approaches. Berlin, Springer, 423p.

- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos & L.C. Alves. 2010.** Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* 56:1913-1919.
- Thies, J.E. & M.H. Devare. 2007.** An ecological assessment of transgenic crops. *J. Dev. Stud.* 43:97–129.
- Torres, J.B. & J.R. Ruberson. 2006.** Spatial and temporal dynamics of oviposition behavior of bollworm and three of its predators in Bt and non-Bt cotton fields. *Entomol. Exp. Appl.* 120:11–22.
- Van Rie, J., S. Jansens. H. Höfte. D. Degheele & H. van Mellaert. 1990.** Receptors on the brush border membrane of the of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- Vass, E. & Nappi, A.J. 2001.** Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 329–348.
- Vilmos, P. & E. KURUCZ, 1998.** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 62:59-66.
- Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker & W.G. Dirkse. 1990.** A novel *Bacillus thuriengiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* – specific crystal protein. *J. Bacteriol.* 172: 6783-6788.
- Wang, P., J.Z. Zhao, A. Rodrigo-Simón, W. Kain, A.F. Janmaat, A.M. Shelton, J. Ferré & J. Myers. 2007.** Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1199-1207.

## CAPÍTULO 2

### RESPOSTA IMUNE E MECÂNICA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AO ALGODÃO BT E AO BT FORMULADO<sup>1</sup>

FRANKLIN M. CUNHA<sup>1</sup>, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA<sup>2</sup>, JORGE B. TORRES<sup>1</sup>, ÁLVARO A.C.  
TEIXEIRA<sup>2</sup>, THIAGO J. S. ALVES<sup>2</sup>, FÁBIO A.B. SANTOS<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco e  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM, Av. Moraes Rego s/n 50670-420, Recife, PE.

---

<sup>1</sup>Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, J.B. Torres, A.A.C. Teixeira, T.J.S. Alves & F.A.B. Santos. Resposta imune e mecânica de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ao algodão bt e ao bt formulado. A Ser submetido a Transgenic Research.

RESUMO – Apesar da eficiência de formulações Bt e plantas transgênicas Bt contra vários lepidópteros, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta baixa suscetibilidade a maioria deles. Este estudo investigou a resposta de *S. frugiperda* relacionadas ao Bt com três hipóteses sobre sua baixa suscetibilidade: células regenerativas do intestino médio são ativadas pela proteína Cry1Ac de algodão transgênico e, assim, renovam as células epiteliais (i), na hemolinfa aumentam a produção de óxido nítrico e fenoloxidase como resposta à toxina (ii) e a tolerância de *S. frugiperda* à Cry1Ac está associada a variações qualitativas e quantitativas dos hemócitos. Lagartas foram criadas em algodão Bt (Acala 90B) e em Acala 90 isolinha não-Bt. Para entendimento da variabilidade entre a resposta dos parâmetros avaliados foram incluídos plantas de milho (hospedeiro preferencial) em comparação às plantas de algodão, e formulação comercial Bt (Xentari®) em comparação a Cry1Ac. Com base nos resultados para as hipóteses, lagartas alimentadas com algodão Bt não estimulam o aumento da proliferação das células do intestino médio. Larvas alimentadas com algodão Bt aumentaram a atividade da fenoloxidase, e alteraram a proporção de hemócitos. No entanto, diminuiu os níveis de óxido nítrico e proteína total quando os genótipos foram acrescidos com Xentari®. A associação algodão Bt com Xentari® teve efeito aditivo, resultando em alterações da camada epitelial e redução na proporção de granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. A toxina Cry1Ac no algodão Bt não é suficientemente tóxico para matar as lagartas, mas induz alteração humoral e celular como resposta a um xenobiótico.

PALAVRAS-CHAVE: Algodão geneticamente modificado, óxido nítrico, fenoloxidase, hemócitos, células regenerativas, lagarta do cartucho

## IMMUNE AND MECHANICAL RESPONSE OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

### (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TO BT-COTTON AND BT FORMULATION

**ABSTRACT** - Commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* and transgenic Bt-cotton have been widely used against various lepidopteran species while the fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* larvae exhibit low susceptibility to the most. This study investigated the response of FAW to Bt based on three hypotheses: the regenerative cells of FAW midgut are activated when in contact with Cry1Ac protein produced by Bt-cotton, and thereby assisting with the renewal of the midgut cells (i); the concentrations of nitric oxide and phenoloxidase increase in the hemolymph of FAW larvae as a defensive response to Cry1Ac (ii); and FAW tolerance to Cry1Ac is associated with changes of qualitative and quantitative hemocytes. FAW larvae were reared on Bt-cotton Acala 90B and its isoline non-Bt Acala 90. To understand the variability in the parameters evaluated were also included maize, as a preferred host, and associations with Bt commercial formulation (Xentari®). Based on the results for the hypotheses, larvae fed on Bt cotton did not stimulate increased proliferation of cells in the midgut. Otherwise, the larvae fed Bt-cotton increased phenoloxidase activity in the hemolymph and exhibited alteration in the proportion of hemocytes. However, there were reduced levels of nitric oxide while total protein increased when treated with Xentari®. The association of transgenic Bt-cotton with Xentari resulted in alterations of the epithelial layer and reduction on the proportions of granulocytes, spherulocytes, and oenocytoids. The Cry1Ac protein levels in Bt-cotton do not kill FAW larvae, but induces immune alterations as a response triggered by a xenobiotic compound.

**KEY WORDS:** Genetically modified cotton, nitric oxide, phenoloxidase, hemocytes, regenerative cell, fall armyworm

## Introdução

Plantas geneticamente modificadas têm mudado o conceito de controle de pragas nos sistemas agrícolas recentemente. Algodão e milho foram geneticamente transformado com genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) que oferecem proteção completa a planta ao longo do seu desenvolvimento contra certas espécies de lepidópteros e larvas de Coleoptera. Os benefícios do uso de plantas transgênicas Bt advém da maneira simples de seu emprego pelos produtores como uma tática de resistência de plantas no manejo integrado de pragas, a eficácia contra certas espécies de pragas chave de lepidópteros e coleópteros, redução de perdas por danos causados por pragas e uso de inseticidas, entre outros. Esses resultados estão entre os principais motivos de aceitação imediata da tecnologia por produtores em todo o mundo, independentemente da área plantada e os insumos tecnológicos (Huesing & English 2004, Naranjo 2009, Torres *et al* 2009).

Apesar de todas estas vantagens, a especificidade da primeira geração de transgênicos Bt de algodão e de milho modificadas para produzir toxinas Cry1Ac e Cry1Ab, respectivamente, não oferecem o controle contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Adamczyk *et al.* 1998, Perlak *et al.* 2001). A falta de eficácia contra essa espécie chave de lepidóptero, entre outras razões, levou a necessidade de utilização de genes adicionais Cry1F e Cry2Ab, produzindo conseqüentemente uma nova geração de transgênicos para o algodão Bt e milho Bt, visando o sucesso do controle dessa praga e outras espécies (Adamczyk *et al.* 2001, Adamczyk & Gore 2004). No entanto, as razões da baixa suscetibilidade encontrado em *S. frugiperda* para Cry1Ac e Cry1Ab ainda não estão bem esclarecidas.

A lagarta de *S. frugiperda* é uma praga importante do milho nas Américas (Capinera 2002), e tornou-se um problema na gestão de pragas do algodoeiro (Barros *et al.* 2010a, b). A susceptibilidade variável de *S. frugiperda* à toxina Cry1A já foi relatado (Frankenhuyzen & Nystrom 2002). Até o momento, sabe-se que a ação das toxinas Cry1Ac, expressada por muitas

variedades transgênicas, depende de fatores, que incluem a variabilidade geográfica das populações-alvo e os seus diferentes graus de susceptibilidade, os níveis de expressão de toxinas em partes da planta e as diferenças entre as variedades utilizadas (Gould 1998, Tabashnik *et al.* 2008). Origem geográfica das populações e diferenças na suscetibilidade a toxinas Cry foram investigadas para *S. frugiperda* e os resultados favorecem o apoio sobre as questões de variabilidade genética (Monnerat *et al.* 2006). Além disso, os níveis de toxina Cry1Ac expressa no algodão Bt não são suficientes para causar a mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* (Perlak *et al.* 2001, Santos & Torres 2010). Por outro lado, a resposta imunológica de lagartas de lepidópteros desafiados com toxinas Bt tem sido pouco estudada e não existem dados sobre as lagartas de *S. frugiperda*. Segundo Rahman *et al.* (2006), lagartas de *Plodia interpunctella* (Hubner) apresentaram resposta no sistema imunológico quando submetidas a formulação comercial de Bt. O curuquerê Oriental, *Spodoptera litura* (Fabricius), ingerindo endotoxinas de Bt, responde com um leve alongamento das células epiteliais (Pandey *et al.* 2009). Resultados semelhantes nas células digestivas também foi encontrado combinando *Baculovirus anticarsia* (AgNPV) e Bt comercial Dipel<sup>®</sup> para *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Knaak & Fiuza 2005). Além disso, Rausell *et al.* (2000) encontraram vacuolizações citoplasmáticas, desarranjos e destruição das células epiteliais em *Lymantria monacha* (L.) tratados com toxinas de *B. thuringiensis* Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e CryB.

As toxinas Cry, uma vez ingerida por lagartas suscetíveis e atingindo o intestino, se ligam a locais específicos nas microvilosidades das células causando lise osmótica através da formação de poros na membrana levando a ruptura do intestino e, conseqüentemente, a morte das lagartas (Herrero *et al.* 2001, Bobrowski *et al.* 2002, Cavados *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2004, Oestergaard *et al.* 2007). Estudos histopatológicos conduzidos por Martínez-Ramírez *et al.* (1999) demonstraram haver aumento na quantidade de células epiteliais na região do intestino médio das



populações resistentes de *Heliothis virescens* (Fabricius) desafiadas com Cry1Ac e Cry1Ab. Assim, a ação da toxina Cry também está relacionada à alteração da morfologia das células do intestino médio e, portanto, a conformação dos receptores. De acordo com Ferré & van Rie (2002) a capacidade de reparação da células intestinais e alteração dos locais de ligação estão entre as características que conferem baixa susceptibilidade e resistência em lagartas de pragas-alvos para as toxinas Cry.

É sabido que a toxina Cry1Ac é capaz de se ligar às microvilosidade das células do intestino médio de *S. frugiperda*, mas não promove a sua mortalidade, e que a CL<sub>50</sub> requerida é maior que 2000ng/cm<sup>2</sup> (Aranda *et al.* 1996). Isto levou-nos à questionar se a interação Cry1Ac com o epitélio intestinal, embora não causando a mortalidade das larvas, é suficiente para ativar células regenerativas e, portanto, uma recuperação do epitélio. Conseqüentemente, as reações imunes celular e/ou humoral seriam desencadeadas, uma vez que o sistema imunológico dos insetos é baseado no reconhecimento de xenobióticos no organismo (Chaput & Boneca 2007, Royet & Dziarski 2007). Assim, a partir dessas questões, o presente estudo testou a hipótese de que a toxina Cry1Ac produzida pelo algodão Bt promove a ativação das células regenerativas do intestino médio de *S. frugiperda* e, portanto, a renovação de células colunares. Além disso, as lagartas *S. frugiperda* alterariam a produção de óxido nítrico e atividade fenoxidase em sua hemolinfa quando alimentadas com folhas do algodão Bt, e as mudanças qualitativa e quantitativa dos hemócitos de *S. frugiperda* podem ser associados com a sua tolerância à toxina Cry1Ac. Dessa forma, estudos imunológicos e histológicos com lagartas de *S. frugiperda* desafiadas com toxinas Bt podem ajudar a elucidar as características, relacionadas à baixa suscetibilidade. Os resultados podem ajudar no desenvolvimento de novas toxinas Bt para lagartas de *S. frugiperda*, e compreender possíveis mecanismos imunológicos e histológicos relacionados com o desenvolvimento de resistência desse inseto a estas toxinas.

## Material e Métodos

**Insetos e Criação.** A colônia de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir das lagartas coletadas em plantas de milho cultivadas no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As lagartas foram transferidas para o Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE. A partir da geração F<sub>1</sub> foi estabelecida uma colônia estoque onde as lagartas foram criadas com dieta artificial de acordo com Greene *et al.* (1976) e mantidas em câmara climatizada regulada para um fotoperíodo de 12h, 27 ± 0,5°C, e umidade relativa de 70-80%.

**Bioensaio.** O processo de criação das lagartas de *S. frugiperda* nas folhas das plantas estudadas (milho, algodão Bt e não-Bt) consistiu em manter todo o grupo de lagartas recém eclodidas a partir de uma única massa de ovos em recipientes de 500mL de plástico forrado com folhas das plantas estudadas. As folhas de milho foram substituídas diariamente, devido à redução da qualidade e rápida desidratação em relação às folhas de algodão, que foram substituídas a cada dois dias. A partir do segundo ínstar, as larvas foram criadas individualmente em recipientes plásticos de 80 mL usando o mesmo esquema de substituição de alimentos. No primeiro dia do quarto ínstar, as larvas foram então submetidas à coleta de hemolinfa e intestino para avaliar os parâmetros imunes, tais como contagem total e diferencial de hemócitos, atividade da fenoloxidase, produção de óxido nítrico e proteína total. Possíveis alterações no epitélio do intestino médio e do número de células regenerativas também foram avaliados.

O milho, planta hospedeira preferencial, foi utilizado como um tratamento de controle global para os tratamentos com plantas de algodão. Embora *S. frugiperda* tenha se tornado uma importante praga do algodão, devido aos danos diretos causados nas estruturas de frutificação, as folhas do algodão não são um alimento favorável para essas lagartas (Barros *et al.* 2010b). Uma possível alteração no sistema imunológico de *S. frugiperda* poderia acontecer apenas por se

alimentarem de algodão não-Bt convencional devido ao efeito natural do gossipol, um sesquiterpeno fenolaldeído com concentrações variáveis na folhagem, dependendo da variedade do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e que apresenta propriedades como a redução da digestibilidade de herbívoros (Elsebae *et al.* 1981). Assim, seis tratamentos foram constituídos: o milho não-Bt (controle total), lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com variedade de algodão Bt Acala 90B, lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com variedade de algodão não-Bt, isogênica Acala 90, e a associação dessas plantas com Bt (*Bacillus thuringiensis* var. *azawai*) formulação comercial Xentari<sup>®</sup> WDG (ABBOTT Laboratories, Chemical & Agricultural Products Division North Chicago, IL). A formulação comercial Xentari<sup>®</sup> (passa a ser referida como "Bta") foi utilizado na concentração de 10g/L como um fator de discriminação na ação da toxina Cry para o sistema imunológico e do intestino médio de *S. frugiperda*. Foram utilizadas 40 lagartas de *S. frugiperda* por tratamento. Estas lagartas foram alimentadas com discos de folhas de 3 cm de diâmetro de cada planta e respectivo tratamento. Os tratamentos com Bta consistiram-se na imersão de discos de folhas na solução de inseticida por cinco segundos. Os discos foliares foram deixados na bancada do laboratório por duas horas, descansando em toalhas de papel, para secar a solução e, posteriormente, oferecido às lagartas. As lagartas foram colocadas sobre os discos de folhas tratadas por 8h para alimentação. Segundo Alves & Pereira (1998), este período de tempo é suficiente para verificar a ação de toxinas do *B. thuringiensis*. Após esse período, as larvas foram submetidas à coleta do material para determinar os parâmetros imunes e as alterações das células do intestino médio. Todos os tratamentos foram realizadas em triplicata.

**Quantificação da Toxina Cry1Ac.** Os níveis de toxinas Cry1Ac nas folhas do algodão Bt foram quantificadas por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O procedimento consistiu em usar o kit comercial de quantificação em placa PathoScreen<sup>®</sup> Kit (Agdia<sup>®</sup> Inc., Elkhart, IN), que utiliza anticorpos contra Bt-Cry1Ac/Cry1Ab e peroxidase conjugada. 15 amostras de folhas (cada

uma cerca de 0,027g) foram analisados seguindo o procedimento de Torres & Ruberson (2008). Absorbância foi lida usando uma ELx800TM leitor de microplacas (Biotek Instruments Inc.) a 450 nm. Para ler os resultados em 450 nm, usando este kit comercial, 50 mL de uma solução 3 M de ácido sulfúrico foi adicionado a cada poço para impedir um maior desenvolvimento da reação dos poços antes da leitura. Padrão de Cry1Ac nas concentrações 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 ng/mL foram usados para construir uma curva de densidade óptica padrão para estimar o teor de toxinas de material testado.

**Extração do Intestino Médio para a Análise de Microscopia de Luz.** Foi realizada após a imobilização das lagartas a baixas temperaturas (4°C) e fixado com formol a 10% em tampão Mollinig-Carson (0,1 M, pH 7,2) por 2 h. A desidratação foi realizada em gradiente crescente de banhos de etanol por 10 minutos e embebidos em historesina Leica<sup>®</sup> por 24 h. Cortes de 3µm, foram obtidos em um micrótomo Leica RM 2245, e corados com azul de toluidina. Cinco lagartas foram utilizadas por tratamento, considerando cada lagarta uma repetição.

**Quantificação das Células Regenerativas.** A quantificação das células regenerativas foi realizada utilizando-se cinco secções da região mediana do mesêntero de cinco lagartas por tratamento, corados com azul de toluidina. A captura de imagens foi feita por meio de uma câmera de vídeo Sony<sup>®</sup>, acoplada a uma microscópio Olympus<sup>®</sup> BX50. A morfometria foi realizada através de pontos de aplicação associada com o ImageLab 2000 para Windows (DIRACON, <http://www.diracon.com.br/>). Em cada seção, o número de células regenerativas em dez campos aleatórios foi registrado. A contagem de células regenerativas obtido foi submetido análise de variância para dois fatores (instalações e Xentari<sup>®</sup> WDG), e as comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey HSD em 0,05 nível de significância utilizando o software SAS (SAS Institute, 2001).

**Imunidade Celular.** Amostras da hemolinfa foram coletadas com ajuda de uma micropipeta após incisão na primeira perna abdominal da lagarta. Amostras de 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa de cada lagarta foi misturada com 20  $\mu\text{L}$  de meio Schneider para cultura de células dentro de um eppendorf de 1 mL. Logo após, as amostras foram transferidas para uma câmara de Neubauer e o número de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado para cada indivíduo e cada lagarta foi considerada como uma repetição. Dez repetições foram utilizadas para cada tratamento e a contagem diferencial (percentagem) foi realizada através de esfregaços de células e coloração com Giemsa após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, onde foram contadas 300 células para cada indivíduo, seguindo os métodos de Falleiros *et al.* (2003) e Cunha *et al.* (2009). Os dados foram submetidos à análise de variância para dois fatores (planta e Bta), e a comparação das médias foi realizado usando teste de Tukey HSD a 0,05% por cento de significância usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

#### **Imunidade Humoral.**

**Dosagem de Óxido Nítrico.** A dosagem de óxido nítrico na hemolinfa de lagartas criadas em milho, algodão Bt, algodão não-Bt, milho + Bta, algodão Bt + Bta, e o algodão não Bt + Bta foi determinada pela concentração de íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), utilizando o reagente de Griess (Green *et al.* 1981). Para isto, 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa por lagarta foram coletados e um *pool* de 50  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foi adicionado a 70  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (1%) em ácido fosfórico (5%), perfazendo uma repetição. Dez repetições foram utilizadas por tratamento. As concentrações de  $\text{NO}_2^-$  foram obtidas após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente da mistura de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra (hemolinfa / sulfanilamida) e 50  $\mu\text{L}$  de NEED (dicloridrato naphthyletyleamine) a 0,1% (Faraldo *et al.* 2005). Absorbância foi lida usando uma leitora de microplacas ELx800TM (Biotek Instruments Inc.) em 562nm utilizando o programa Gen5 ELISA (Biotek®). A curva

padrão foi realizada com concentrações crescentes de nitrito de sódio 0.8-200 mm. A quantidade de nitrito nas amostras foram correlacionadas com valores de absorbância obtidos a partir da curva padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância para dois fatores (planta e Bta), e a comparação das médias foi realizado usando teste de Tukey HSD a 0,05% por cento de significância usando o programa SAS (SAS Institute, 2001).

**Atividade da Fenoloxidase e Proteína Total na Hemolinfa.** Amostras de 10 µL de hemolinfa por lagarta/tratamento foram diluídos em 300 µL de tampão fosfato de sódio a 0,1 M e mantida a -20°C até serem utilizados. Triplicatas de 50 µL da mistura hemolinfa/tampão foram transferidos para microplacas de 96 poços. Ativação da enzima foi realizada utilizando-se 50 µL de L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Absorbância foi lida a 492nm com intervalos de dois minutos durante duas horas. A atividade da enzima foi tomada durante a fase linear da reação dentro dos 20 minutos da avaliação inicial (Faraldo *et al.* 2006). Para determinar a quantidade de proteína total na hemolinfa das lagartas tratadas e não tratadas foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) e albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão de proteína.

## Resultados

**Determinação da Toxina Cry1Ac no Algodão Bt.** Os discos de folhas do algodão Bt oferecidos as lagartas de *S. frugiperda* até o quarto instar expressaram em média ( $\pm$  EP) de  $23 \pm 0,70$  ng de Cry1Ac g<sup>-1</sup> de peso fresco de folha.

**Histologia do Intestino Médio e Quantificação das Células Regenerativas.** A região mediana do intestino médio das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho, algodão não-Bt e algodão Bt sem adição de Bta, apresentaram o mesmo padrão histológico descritos em

estudos anteriores. Porém, nas larvas alimentadas com algodão não-Bt e Bt as células colunares exibiram leve alongamento em comparação às células colunares das lagartas alimentadas com milho (Figs. 1A-F).

Alterações nas células epiteliais foram observadas nas lagartas alimentadas com milho tratadas com Bta, as quais caracterizaram-se por modificações na morfologia celular, vacuolização e estratificação do epitélio (Figs. 2A e B). As alterações nas lagartas alimentadas com algodão não-Bt e Bt associados ao Bta, foram menos expressivas por apresentarem alongamento das células regenerativas, vacuolização nas células caliciformes e colunares, e um ligeiro aumento no espaço entre as células (Figs. 2C-F). Independentemente do genótipo sem adição do Bta, foi observado um aumento de duas vezes no número de células regenerativas, em comparação ao milho (Tabela 1).

**Contagem Total e Diferencial dos Hemócitos.** As análises de variância para as interações imunológicas das lagartas de *S. frugiperda* alimentados com folhas de planta Bt ou folhas tratadas com Bta caracterizaram efeitos sobre o número total de hemócitos (Tabela 2). Na tabela 3 constam as análises estatísticas do número total de hemócitos. Comparando-se o hemograma de lagartas alimentadas com plantas associadas ou não ao Bta, foi possível observar que não houve diferença estatística detectada entre algodão Bt e algodão Bt + Bta. Por outro lado, uma redução significativa no número de hemócitos foi verificada nos tratamentos com plantas não-Bt + Bta independentemente da espécie de planta utilizada (Tabela 3). Analisando-se o hemograma das lagartas alimentadas com folhas sem adição do Bta, verificou-se que houve uma redução significativa no número total de hemócitos nas lagartas alimentadas com algodão Bt em comparação às alimentadas em algodão não-Bt. Além disso, um maior número de hemócitos foi observado no hemograma de lagartas alimentadas com milho. Os tratamentos utilizando Bta não diferiram significativamente em relação à quantidade de hemócitos encontrados (Fig. 3).

Os tipos de hemócitos identificados a partir da contagem diferencial em todos os tratamentos foram plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, prohemócitos, adipohemócitos e oenocitóides. O número desses hemócitos foi similar para as larvas alimentadas com Bt e plantas não-Bt sem associação com Bta. Tratamentos com Bta, no entanto, apresentaram aumento significativo de granulócitos (média  $\pm$  EP) de  $21,6 \pm 1,94\%$  para  $29,1 \pm 1,99\%$  ( $F_{1, 24} = 6,93$ ,  $P=0,0046$ ). Além disso, houve redução na taxa dos esferulócitos e oenocitóides de  $19,5 \pm 9,4$  para  $9,4 \pm 1,33\%$  ( $F_{1, 24} = 21,99$ ;  $P<0,0001$ ) e de  $6,9 \pm 0,89$  para  $2,55 \pm 0,25\%$  ( $F_{1, 24}=22,71$ ;  $P<0,0001$ ), respectivamente. A percentagem média dos outros hemócitos: plasmatócitos, prohemócitos e adipohemócitos permaneceu semelhante entre os tratamentos.

### **Resposta Imunológica Humoral.**

**Dosagem de Óxido Nítrico.** Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com algodão não-Bt, algodão Bt e milho, mostraram uma produção média de óxido nítrico de 2,3, 2,7 e 2,1 mM, respectivamente. No entanto, aquelas lagartas alimentadas com discos de folhas tratadas com Bta exibiram cerca de 50% de redução na produção de óxido nítrico correspondentes a 1,4, 1,1 e 1,1  $\mu$ M na hemolinfa ( $F_{1, 54} = 8,94$ ,  $P < 0,0001$ ) (Fig. 4).

**Atividade Fenoxidase e Proteína Total na Hemolinfa.** Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com algodão Bt, apresentaram maior atividade da fenoxidase em comparação com as lagartas alimentadas de algodão não-Bt e milho (Figs. 5A e B). Entre as plantas não-Bt a atividade da fenoxidase foi maior para as lagartas alimentadas com algodão em relação ao milho (Fig. 5C). Uma maior atividade desta enzima foi observada para lagartas alimentadas com algodão não-Bt tratadas com Bta (Fig. 5D). No entanto, lagartas alimentadas com folhas de milho e algodão-Bt tratadas com Bta não mostraram diferenças na atividade da fenoxidase (Fig. 5E). No algodão Bt tratado com Bta houve uma resposta significativa na atividade da fenoxidase quando



comparada às plantas de algodão não-Bt (Fig. 5F). Não houve diferença na atividade entre os tratamentos milho + Bta e milho, bem como o algodão Bt e algodão Bt + Bta (Fig. 5G e H).

A quantidade de proteína total na hemolinfa de *S. frugiperda* foi alterada apenas para os tratamentos acrescidos com Bta (Tabela 2). Redução significativa de proteína total foi observada apenas para as lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com Bta em comparação com as folhas de algodão não-Bt + Bta (Fig. 6). Em média, a taxa de redução observada de proteína total foi de  $57,8 \pm 4,26 \mu\text{g}$  para  $37,1 \pm 2,84 \mu\text{g}$  para as lagartas alimentadas com as folhas tratadas e não tratadas com Bta, respectivamente.

### Discussão

O tecido epitelial do intestino médio dos lepdópteros é composto por quatro tipos celulares: colunares, caliciformes, regenerativas e células endócrinas (Levy *et al.* 2004, Rost-Roszkowska *et al.* 2008, Souza *et al.* 2009). A ausência das células endócrinas, na técnica de microscopia de luz já é reportada pois, exigem uma análise ultra-estrutural e imuno-histoquímica (Pinheiro *et al.* 2008, Sousa *et al.* 2009). O epitélio da região mediana do intestino médio das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho, algodão não-Bt e algodão Bt sem adição de Bta, seguiu um padrão semelhante aos relatados por Correia *et al.* (2008) para essa mesma espécie.

A quantidade de toxina ingerida pelas lagartas de *S. frugiperda* causou alterações moderadas nas células do intestino médio. Por outro lado, Noctuidae suscetível a Cry1Ac como o curuquerê do algodão *Alabama argillacea* (Hübner), ao ingerir uma quantidade aproximadamente igual da toxina ( $18,3 \pm 0,07 \text{ ng de Cry1Ac}$ ) sofrem drásticas alterações estruturais nas células caliciformes e colunares, e reduziram significativamente o número de células regenerativas (Sousa *et al.* 2010). Segundo Pandey *et al.* (2009) *S. litura* alimentadas com endotoxinas Bt apresentaram apenas um ligeiro alongamento das células epiteliais corroborando com os achados

com *S. frugiperda* em nosso estudo. De fato, significativas alterações nas células do intestino médio somente foram evidenciadas para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com Bta. Essas alterações foram bastante semelhantes mas em menor intensidade aos encontrados por Rausell *et al.* (2000) com *L. monacha* alimentadas com toxinas Cry1aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1B. Além disso, Knaak & Fiuza (2005) combinando o efeito do vírus *B. anticarsia* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* para *A. gemmatalis* observaram os mesmos tipos de danos nas células epiteliais.

A menor intensidade das alterações no intestino médio das lagartas alimentadas com algodão Bt e não-Bt tratadas com Bta pode estar associado ao aumento do número de células regenerativas. As células regenerativas estão diretamente relacionadas com a renovação das células epiteliais (Hakim *et al.* 2010). Sabe-se ainda que o algodão produz naturalmente gossipol, um aldeído sesquiterpeno que confere resistência a herbivoria (Meisner *et al.* 1978). O gossipol age, em geral, como um redutor na digestibilidade por inibição de proteinases (Meisner *et al.* 1978, Elsebae *et al.* 1981, Stipanovic *et al.* 2006). Portanto, completa um mecanismo de *feedback* indireto o que promove a deficiência de aminoácidos essenciais para o herbívoro (Broadway 1995, Silva Filho & Falco 2000).

A redução significativa no número total de hemócitos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com algodão Bt, em comparação com o milho e o algodão não-Bt, demonstrou claramente a interferência da toxina Cry1Ac na resposta imune celular. No entanto, a não diferença entre algodão Bt e algodão Bt + Bta pode estar associada a um mecanismo adaptativo para a toxina Cry1Ac, pois existiram diferenças significativas entre as populações de hemócitos das lagartas que foram alimentadas com algodão não-Bt e milho quando adicionado Bta. Evidência de tolerância para a formulação de Bt foi demonstrada em laboratório com larvas de *Ephestia kuehniella* Zeller, após a exposição a baixas doses de Btk, o que causou um aumento da

tolerância ao inseticida em um nível semelhante ao observado em cepas resistentes. Nos indivíduos tolerantes, o número de hemócitos circulantes foi significativamente menor do que os de insetos suscetíveis (Ericsson *et al.* 2009). Também foi encontrada uma redução significativa no número total de hemócitos em lagartas alimentadas com algodão não-Bt em relação ao milho. Existem grandes grupos de terpenóides, como gossipol, heliocides e hemigossipolone em plantas de algodão, que lhes confere tolerância a várias espécies de Lepidoptera (Benedict *et al.* 2004), que também poderiam interferir com o número de hemócitos circulantes.

As mudanças no percentual dos hemócitos e níveis reduzidos de óxido nítrico foram encontradas somente em larvas alimentadas com folhas tratadas com Bta. Uma hipótese que pode explicar este resultado estaria relacionado com a presença de esporos, ao lado das toxinas, a partir da formulação Bt, estimulando o aumento de granulócitos, que são células com função fagocítica. No entanto, houve uma redução no número de esferulócitos, que também estão envolvidos com o processo de fagocitose de acordo com Kadota *et al.* (2003). Como as células fagocíticas estão diretamente relacionadas com o óxido nítrico (NO) estes achados sugerem que o esferulócitos podem estar envolvidos na produção dessa molécula em *S. frugiperda* (Nappi & Ottaviani 2000, Foley & O'Farrell 2003, Faraldo *et al.* 2005).

A maior atividade da fenoloxidase foi observada em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com algodão Bt, com e sem tratamento com o Bta. As larvas alimentadas com folhas tratadas Bta, no entanto, apresentaram redução no número de oenocitóides, o que pode justificar o aumento na atividade de fenoloxidase. Os oenocitóides estão diretamente associados a produção da enzima (Ribeiro & Brehélin 2006). Além disso, também foi encontrado um aumento de proteínas totais nos tratamentos com Bta. O aumento da atividade da fenoloxidase em larvas alimentadas com folhas de algodão Bt não tratadas com Bta podem está relacionada a tolerância na presença da proteína Cry1Ac. Segundo Rahman *et al.* (2004) e Ma *et al.* (2005), *E. kuenhiella* e *Helicoverpa*

*armigera* (Hubner) a resistência ao Bt foi associada com alta atividade de fenoloxidase. No entanto, Gassmann *et al.* (2009), avaliando a resistência da lagarta-rosada, *P. gossypiella* para *B. thuringiensis* e suas conseqüências diretas sobre a atividade da fenoloxidase sugeriram que a resistência não pôde ser diretamente relacionado ao aumento da atividade dessa enzima. Além disso, estudos realizados por Wang *et al.* (2007) mostrou que as lagartas de *Tricoplusia ni* (Hübner) resistentes à toxina Cry1Ac possuíam níveis mais baixos de fenoloxidase do que as suscetíveis. Portanto, os dados atualizados são variáveis e podem ser espécies específicas deixando uma lacuna de investigação sobre esses aspectos em lagartas de *S. frugiperda*, bem como o envolvimento do corpo gorduroso sobre esta atividade.

Em conclusão, nossos dados indicam que a produção natural de Cry1Ac em algodão Bt (23 ng Cry1Ac g<sup>-1</sup> de peso fresco, em média) não é suficiente para promover alteração morfológica significativa nas células epiteliais do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* em relação ao algodão não-Bt e milho. Uma resposta imunológica humoral e celular, porém, é observada quando as lagartas de *S. frugiperda* são alimentadas com algodão Bt, como um sinal de resposta a um xenobiótico.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho

### **Literatura Citada**

**Aranda, E., J. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68:203-212.

- Adamczyk, J.J., J.W. Holloway, G.E. Church, R.B. Leonard & D.J.B. Graves. 1998** Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin. J. Econ. Entomol. 91:539-545.
- Adamczyk, J.J., D.D. Hardee, L.C. Adams & D.V. Sumerford. 2001.** Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1A(c) delta-endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. J. Econ. Entomol. 94:284-290.
- Adamczyk, J.J., & J.Jr. Gore. 2004.** Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike<sup>®</sup>) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Fla. Entomol. 87:427-432.
- Alves, S.B., & R.M. Pereira. 1998.** Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos, p. 39-54. In: Alves SB (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, São Paulo, 1163p.
- Barros, E.M., J.B. Torres & A.F. Bueno. 2010a.** Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. Neotrop. Entomol. 39: 996-1001.
- Barros, E.M., J.B.Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010b.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. Entomol. Exp. Appl. 37: 237-245.
- Benedict, C.R., G.S. Martin, J. Liu, L. Puckhaber & C.W. Magill. 2004.** Terpenoid aldehyde formation and lysigenous gland storage sites in cotton: variant with mature glands but suppressed levels of terpenoid aldehydes. Phytochemistry 65:1351–1359.

- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Bobrowski, V.L., G. Pasquali, M.H. Bodanese-Zanettini & L.M. Fiuza. 2002.** Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). *Biol. Control* 25:129-135.
- Broadway, R.M. 1995.** Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Insect. Physiol.* 41:1111-1117.
- Capinera, J.L. 2002.** Handbook of vegetable pests. San Diego, Academic Press, 2700p.
- Cavados, C.F.G., S. Majerowicz, J.Q. Chaves, C.J.P.C. Araújo-Coutinho & L. Rabinovitch. 2004.** Histopathological and ultrastructural effects of d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99:493–498.
- Chaput, C. & I.G. Boneca. 2007.** Peptidoglycan detection by mammals and flies. *Microbiol. Infec.* 9:637-647.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2008.** Dinâmica hemocitária en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas con nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Bol. Sanid Veg. Plagas* 34: 357-365.
- Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, A.C. Albuquerque, L.C. Alves & E.A.L. Lima. 2009.** Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop. Entomol.* 38, 293-297

- Ericsson, J.D., A.F. Janmaat, C. Lowenberger & J.H. Myers. 2009.** Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *J. Invertebr. Pathol.* 100:61–67.
- Elsebae, A.H., S.I. Sherby & N.A. Mansour. 1981.** Gossypol as an inducer or inhibitor in *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Environ. Sci. Health-Part B* 16:167-178.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:287-294.
- Faraldo, A.C., A. Sanunes, L.H. Faccioli, E.A. Del Bel & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxid.* 13:240-246.
- Faraldo, A.C., P.M. Nóbile, S. Daffre, E.A. Gregório & E. Lello. 2006.** Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Anais do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular*, p. 136.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501–33.
- Frankenhuyzen, K. & C. Nystrom. 2002.** The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. Disponível em <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>. Acessado em 22/09/2010.
- Foley, E. & P.H. O’Farrel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 17:115–125.
- Gassmann, A.J., J.A. Fabrick, M.S. Sisterson, E.R. Hannon, S.P. Stock, Y. Carrière & B.E. Tabashnik. 2009.** Effects of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* on phenoloxidase activity and susceptibility to entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.* 102:1224-1232.

- Gould, F. 1998.** Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43:701–26
- Green, L.C., K.R., De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7764–7768.
- Greene, G.L., N.C. Leppla & W.A. Dickerson. 1976.** Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69:487-488.
- Hakim, R.S., K. Baldwin & G. Smagghe. 2010.** Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* 55:593–608.
- 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.
- Huesing, J. & L. English. 2004.** The impact of Bt crops on the developing world. *AgBioForum* 7:84-95.
- Kadota, K., S. Waltar, F.G. Claveria, I. Igarashi, D. Taylor & K. Fujisaki. 2003.** Morphological and populational characteristics of Hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysial phase. *J. Med. Entomol.* 40:770-776.
- Knaak, N. & L.M. Fiuza. 2005.** Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) treated with Nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* Serovar *Kurstaki*. *Braz. J. Microbiol* 36:196–200.
- 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.



**Ma, G., H. Roberts, M. Sarjan, N. Featherstone, J. Lahnstein, R. Akhurst & O. Schmidt.**

**2005.** Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 729–739.

**Martínez-Ramírez, A., F. Gould & J. Ferré. 1999.** Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Tech.* 9:239-246.

**Meisner, J., I. Ishaaya, K.R.S. Ascher KRS & M. Zur. 1978.** Gossypol inhibits protease and amylase activity of *Spodoptera littoralis* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71:5–8.

**Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Ordúz, G. Jaramillo, G. Benintende, J. Cozzi, M.D. Real, A.M. Martinez, C. Rausell, J. Cerón, J.E. Ibarra, M.C. Rincon-Castro, A.M. Espinoza, L. Meza-Basso, L. Cabrera, J. Sánchez, M. Soberon & A. Bravo. 2006.** Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Latin America Is Associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7029–7035.

**Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22:469–480.

**Naranjo, S.E. 2009.** Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4, No. 011.

**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 sub-sequent pore formation. Appl. Environ. Microbiol. 73:3623– 3629.

**Pandey, S., B.D. Joshi & L.D. Tiwari. 2009.** Histopathological changes in the midgut of *Spodoptera litura* larvae on ingestion of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin. Arch. Phytopathol. Pl. Prot. 42:376-383.

**Perlak, F.J., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R.A. Ihrig & J.K. Roberts. 2001.** Development and commercial use of Bolgard<sup>®</sup> cotton in the USA – early promises versus today’s reality. Plant J. 27:489-501.

**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.

**Rahman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari & O. Schmidt. 2004.** Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2696–2699.

**Rahman, M.M., G. Ma, H.L.S. Roberts & O. Schmidt. 2006.** Cell-free immune reactions in insects. J. Insect Physiol. 52:754–762.

**Rausell, C., N. Decker De, I. García-Robles, B. Escriche, Van E. Kerkhove, M.D. Real & A.C. Martínez-Ramírez. 2000.** Effects of *Bacillus thuringiensis* Toxins of the Midgut of the Nun Moth *Lymantria monacha*. J. Invertebr. Pathol. 75:288-291.

**Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect haemocytes: What type of cell is that? J. Insect. Physiol. 52:417–429.

**Rost-Roszkowska, M.M., A. Chechelska, M. Fradczak & K. Salitra. 2008.** Ultrastructure of two types of endocrine cells in the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* Hübner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). Zool. Polonoiae 53:27-35.

- Royet, J. & R. Dziarski. 2007.** Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:264-277.
- 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.
- SAS Institute (2001)** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Santos, R.L. & J.B. Torres. 2010.** Produção da proteína Cry1Ac em algodão transgênico e controle de lagartas. *Rev. Bras. Ciências Agr.* 5: 509-517.
- Silva Filho, M.C. & M.C. Falco. 2000.** Interação planta inseto. *Biotechnol. Ciênc. Desenv.* 2:38-42.
- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos & L.C. Alves. 2009.** Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. *Micron* 40:743–749.
- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos, L.C. Alves & J.B. Torres. 2010.** Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* 56:1913-1919.
- Stipanovic, R.D., J.D. Lopez-Junior, M.K. Dowd, L.S. Puckhaber & S.E. Duke. 2006.** Effect of racemic and (+) and (-) gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. *J. Chem. Ecol.* 32:959–968.
- Tabashnik, B.E., A.J. Gassmann, D.W. Crowder & Y. Carrière. 2008.** Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* 26:199–202.

- Torres, J.B. & J.R. Ruberson. 2008.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transg. Res.* 17:345-354.
- Torres, J.B., I.A.V.F. Pontes, R.L. Santos & R.C.S. Neves. 2009.** Principais pragas do algodoeiro em Pernambuco. Informativo REDALGO. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 6p.
- Wang, P., J.Z. Zhao, A. Rodrigo-Simón, W. Kain, A.F. Janmaat, A.M. Shelton, J. Ferré & J. Myers. 2007.** Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1199-1207.

Tabela 1. Resultados para a contagem de células regenerativas do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* de quarto ínstar alimentadas com milho e genótipos de algodoeiro tratadas com formulação de *Bacillus thuringiensis* (Bta) Xentari durante oito horas.

Tratamentos	Gl	Células regenerativas (média ± EP)	F; P <sup>1</sup>
Planta	2		13,61; 0,0001
Bta	1		1,76; 0,1972
Planta*Bta	2		2,51; 0,1026
Error	24		
-----			
Algodão-Bt		6,1 ± 0,47 a <sup>2</sup>	17,54; 0,0003
Algodão não-Bt		6,9 ± 0,65 a	
Milho		3,1 ± 0,21 b	

<sup>1</sup> Valor de P para o teste de Fisher (ANOVA).

<sup>2</sup> Médias (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de teste de Tukey HSD (P > 0,05)

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) da qualidade da planta e efeitos da formulação de *Bacillus thuringiensis* (Bta) Xentari<sup>®</sup> sobre parâmetros imunológicos de *Spodoptera frugiperda* de quarto ínstar.

Parâmetros imunológicos		
Fonte	Gl	F; P <sup>1</sup>
Número total de hemócitos		
Planta	2	24,33; 0,0001
Bta	1	56,88; 0,0001
Planta*Bta	2	13,66; 0,0001
Error	54	
Proteína total na hemolinfa		
Planta	2	0,88; 0,4187
Bta	1	16,10; 0,0002
Planta*Bta	2	1,06; 0,3530
Error	54	
Óxido nítrico		
Planta	2	1,64; 0,2027
Bta	1	27,12; 0,0001
Planta*Bta	2	0,11; 0,8971
Error	54	
Fenoloxidase		
Planta	5	45,26; 0,0001
Bta	60	5,90; 0,0001
Planta*Bta	300	0,14; 1,0000
Error	3294	

<sup>1</sup> Valor de P para o teste de Fisher (ANOVA).

Tabela 3. Média ( $\pm$ EP) de hemócitos por  $\mu$ L de hemolinfa em lagartas de quarto instar de *Spodoptera frugiperda* tratadas com formulação de *Bacillus thuringiensis* var. *azawai* (Bta) XenTari<sup>®</sup> oito horas após o tratamento.

Tratamento	Hemócitos x 10 <sup>3</sup> (Média $\pm$ EP)	Gl	F; P
		18	
Algodão Bt	5,8 $\pm$ 4,81		- 0,82; 0,4215
Algodão Bt + Bta	5,2 $\pm$ 5,32		
Milho	21,4 $\pm$ 0,13		-12,63; 0,0001
Milho + Bta	6,0 $\pm$ 4,63		
Algodão não Bt	15,0 $\pm$ 0,27		-3,16; 0,0055
Algodão não Bt + Bta	7,3 $\pm$ 8,20		

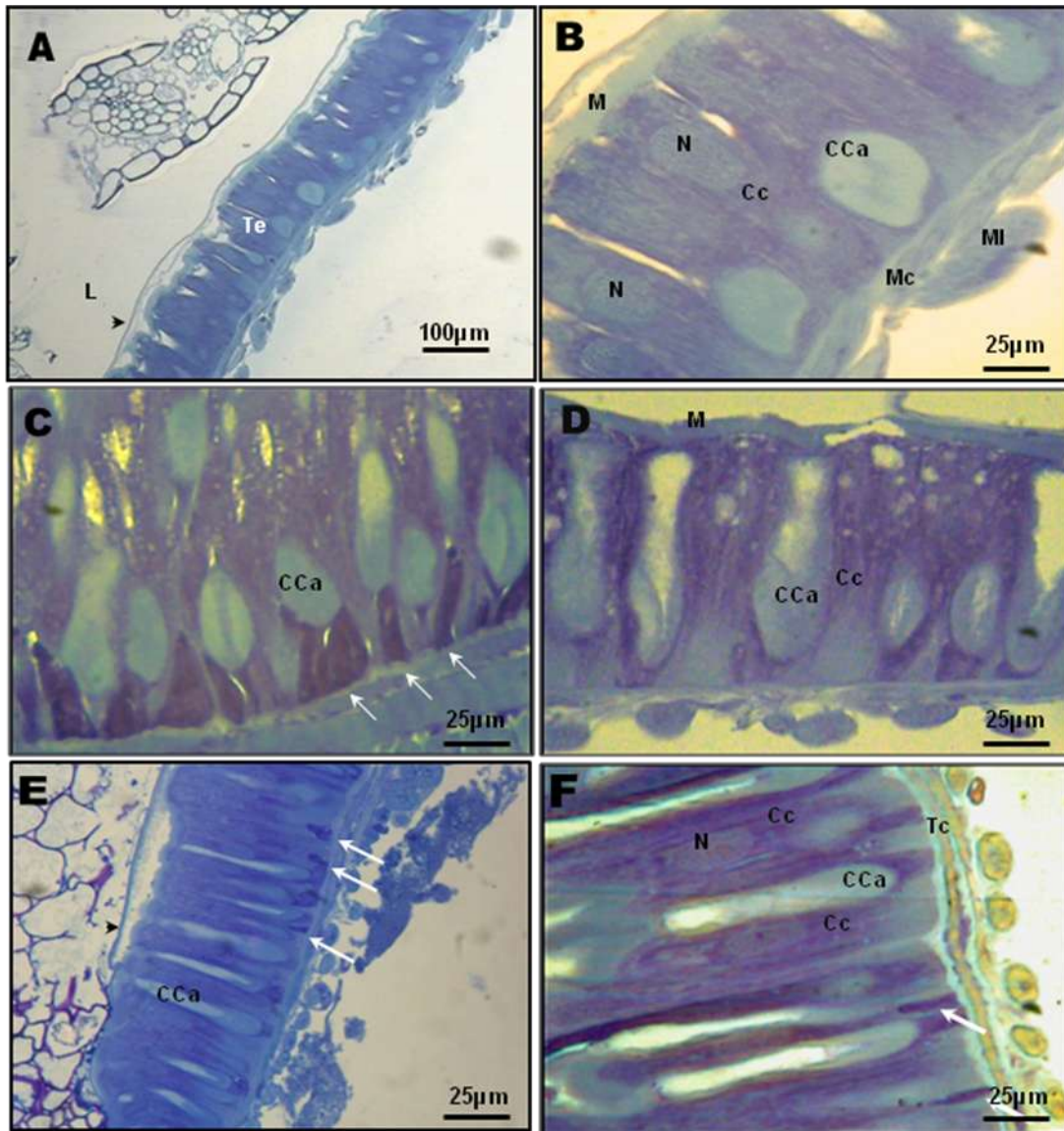


Figura 1. Cortes transversais do intestino médio de lagarta de *Spodoptera frugiperda* de quarto ínstar. A e B - lagartas alimentadas com milho, C e D - lagartas alimentadas com algodão não-Bt, E e F - lagartas alimentadas com algodão Bt. Lumen (L), microvilosidades (M), tecido epitelial (Te), núcleo (N), células caliciformes (CCa), células colunares (Cc), o músculo circular (Mc), músculo longitudinal (MI), matriz peritrófica (ponta seta) , célula regenerativa (setas). Coloração azul de toluidina.



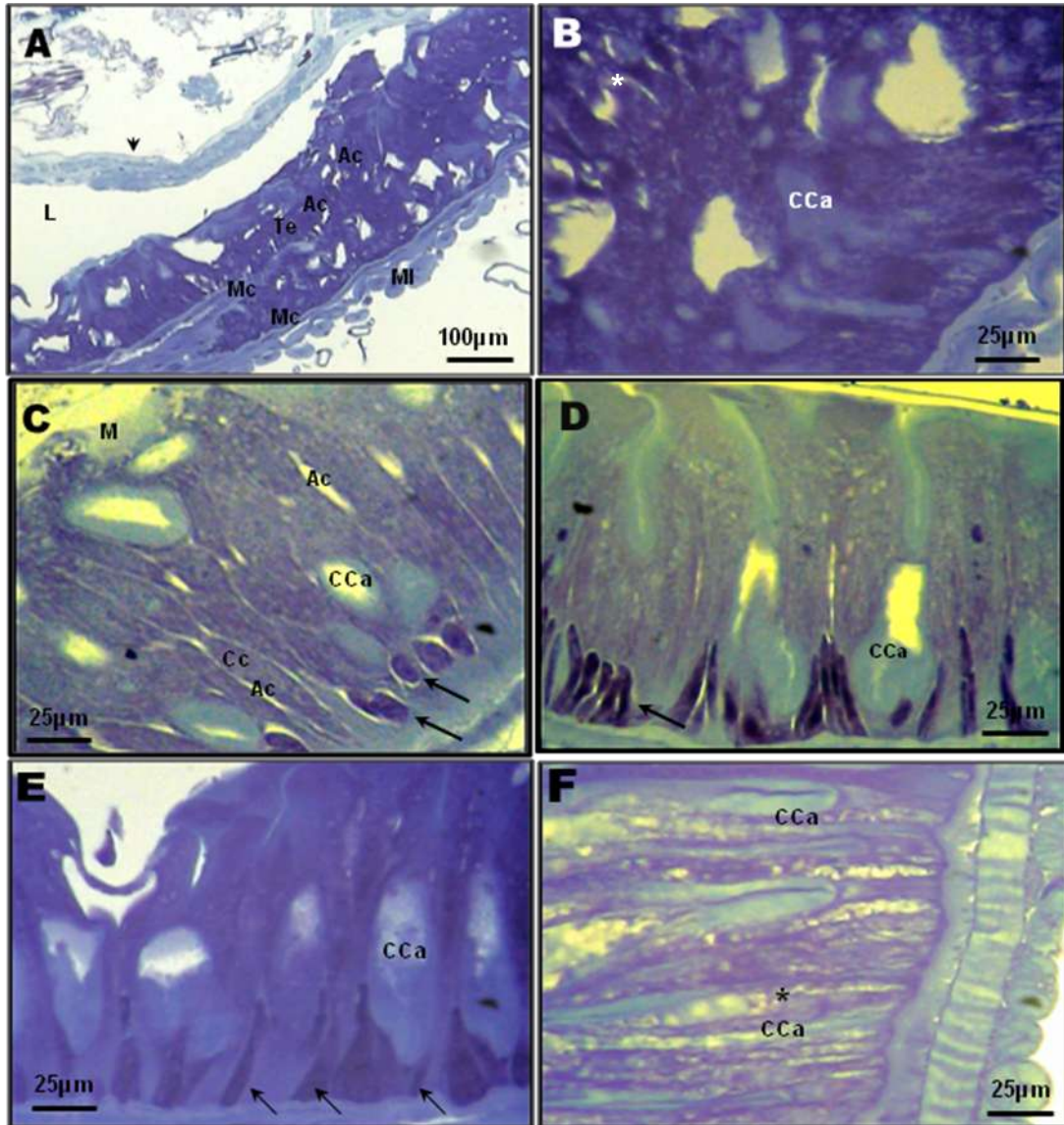


Figura 2. Cortes transversais do intestino médio de lagarta de *Spodoptera frugiperda* de quarto ínstar. A e B - lagartas alimentadas com milho + Bta, C e D - lagartas alimentadas com algodão não-Bt + Bta, E e F - lagartas alimentadas com algodão Bt + Bta. Lúmen (L), microvilosidades (M), núcleo (n), células caliciformes (CCa), células colunares (Cc), tecido muscular circular (Mc), tecido muscular longitudinal (MI), matriz peritrófica (ponta de seta), células regenerativas (setas), afastamento entre as células (Ac) e vacúolos (\*). Coloração azul de toluidina.

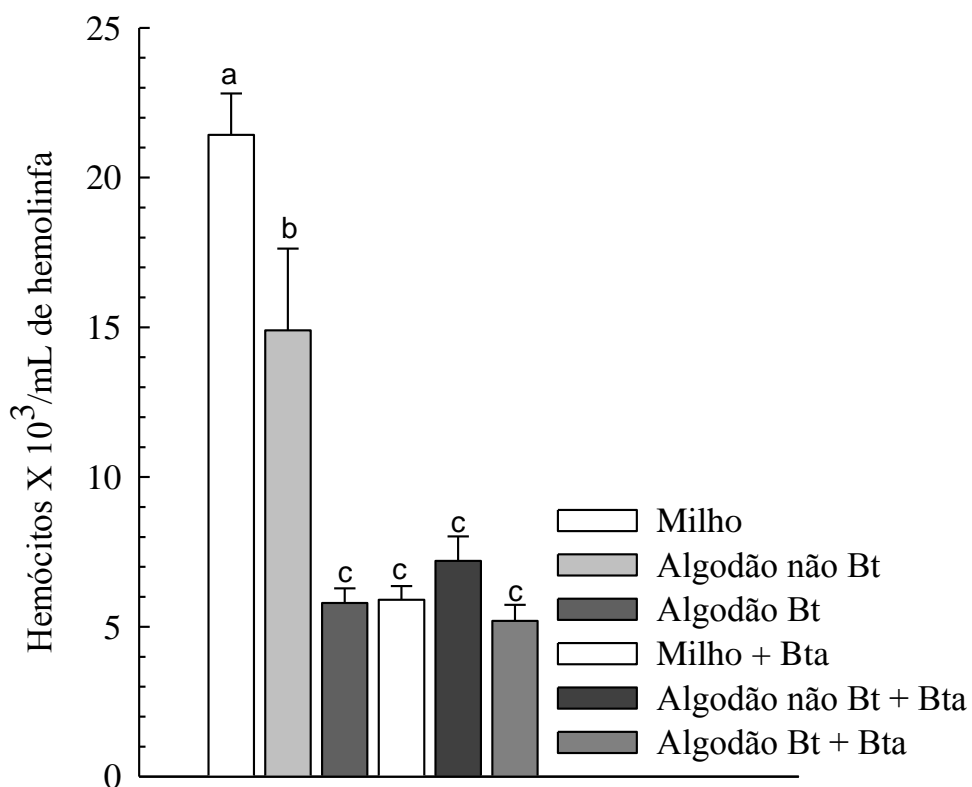


Figura 3. Contagem total (média  $\pm$  EP) dos hemócitos de lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho, algodão não-Bt e Bt, tratadas com formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *azawai* (Bta) Xentari<sup>®</sup>. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 0,05% de significância. n= 10 larvas / tratamento.

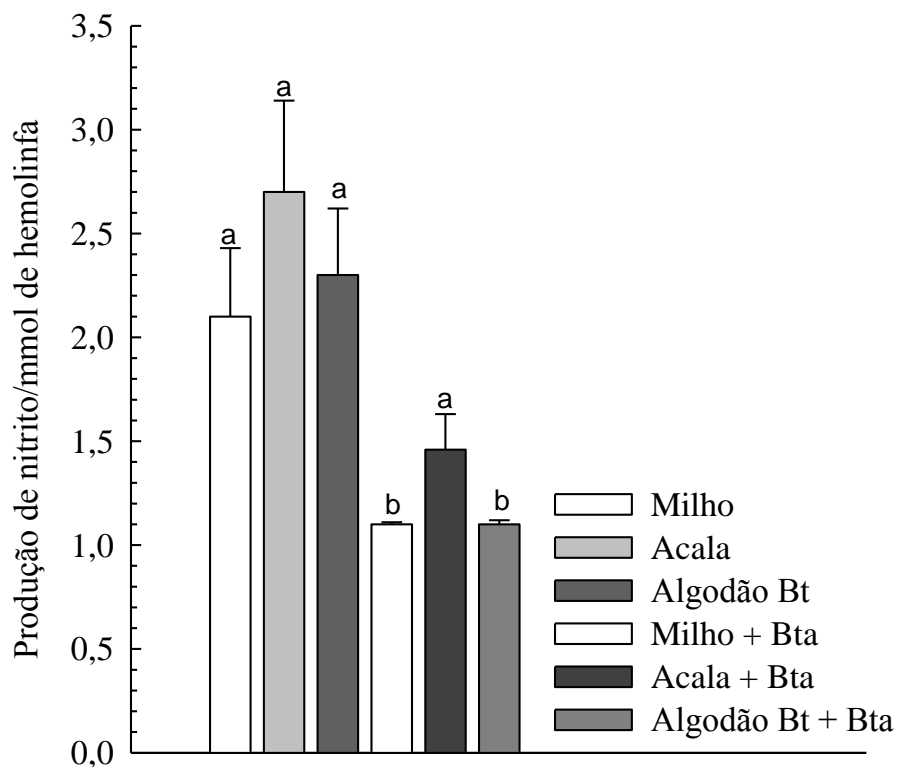


Figura 4. Comparação entre as concentrações ( $\pm$  EP) de nitrito em *pool* de hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* de quarto ínstar alimentadas com milho, algodão não Bt, algodão Bt e tratadas com a formulação de *Bacillus thuringiensis* (Bta) Xentari<sup>®</sup>. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 0,05% de significância. n = 10 larvas / tratamento.

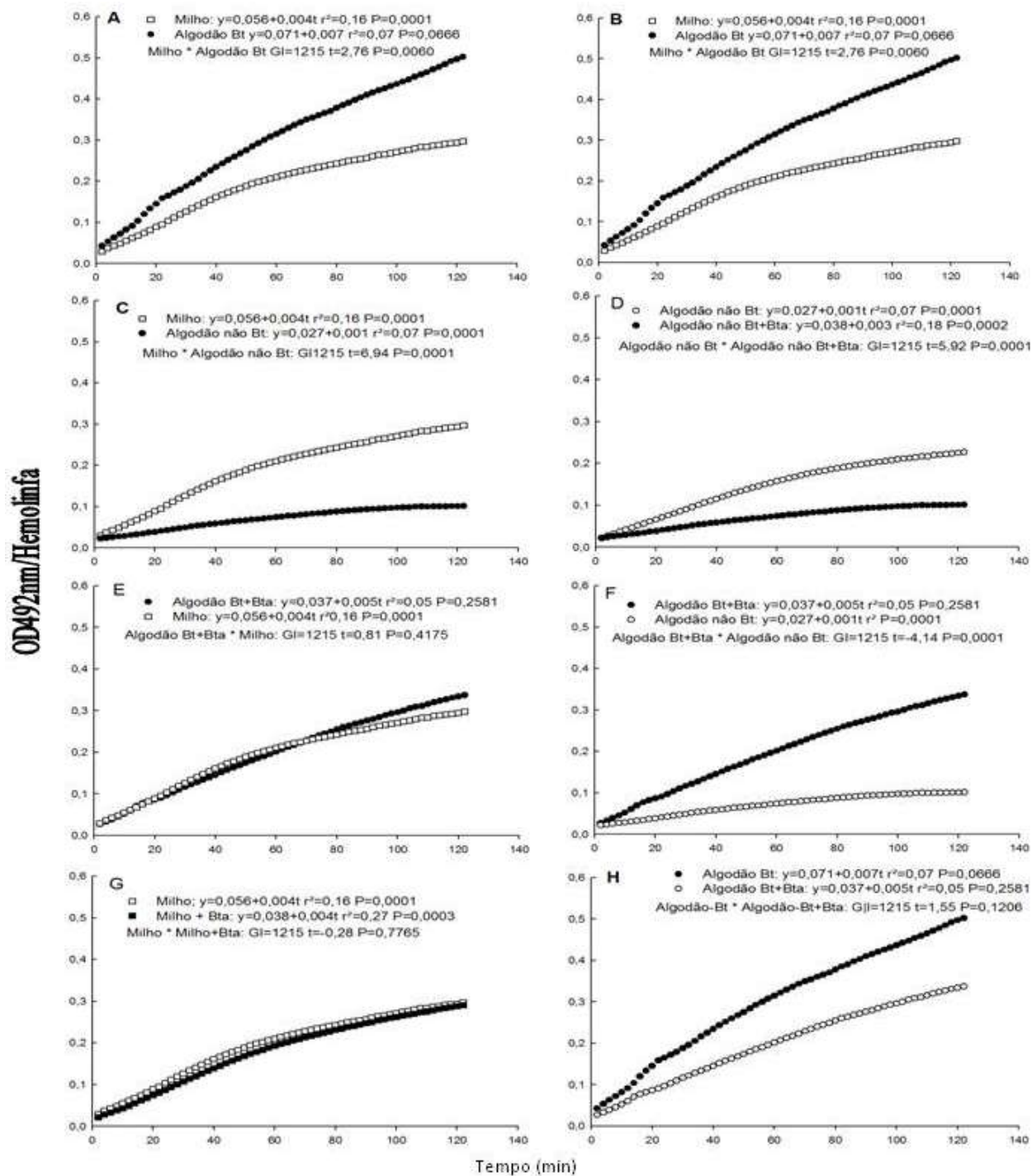


Figura 5. Atividade da fenoloxidase [medida de densidade óptica (DO) a 490 nm na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho, o algodão não Bt, Bt e tratadas com a formulação de *Bacillus thuringiensis* (Bta) Xentari<sup>®</sup> como uma função do tempo (n = 10 larvas).

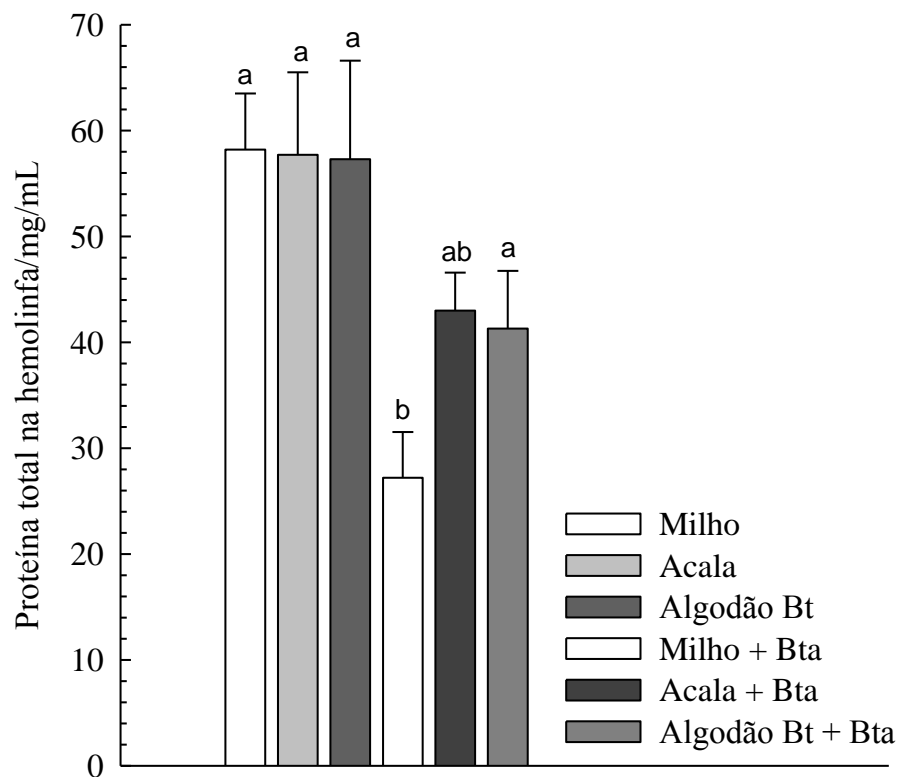


Figura 6. Proteína total (média  $\pm$  EP) na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* de lagartas de quarto ínstar alimentadas com milho, algodão não-Bt, Bt e tratadas com a formulação de *Bacillus thuringiensis* (Bta) Xentari<sup>®</sup>. Barras seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 0,05% de significância. n= 10 larvas / tratamento.

### CAPÍTULO 3

ULTRA-ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS DIGESTIVAS DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ALIMENTADOS COM PRESAS CRIADAS EM ALGODÃO-BT

FRANKLIN M. CUNHA<sup>1</sup>, FLÁVIO H. CAETANO<sup>2</sup> VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIR<sup>3</sup>, ÁLVARO A.C. TEIXEIR<sup>3</sup> E LUIZ C. ALVES<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista. Av. 24 A,1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP.

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

<sup>4</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM, Av. Moraes Rego s/n 50670-420, Recife, PE.

---

<sup>1</sup> Cunha, F.M., F.H. Caetano, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira & L.C. Alves. Ultra-estrutura e histoquímica das células digestivas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados com presas criadas em algodão-Bt. A ser submetido a Micron.

RESUMO – O transporte de proteínas Bt do corpo da presa/hospedeiro aos predadores e parasitóides tem sido investigado como rota de impacto em insetos não-alvos das plantas Bt. Esta pesquisa objetivou analisar a ultra-estrutura e histoquímica das células digestivas da região mediana do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados, desde o segundo instar, com *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) criadas em algodão Bt, variedade Acala 90B e sua isolinha não-Bt Acala 90. Para análise da ultra-estrutura celular, fragmentos dos intestinos médios de adultos de *P. nigrispinus* com 24h de idade foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, incluídos em resina EMBED812/Araldite e analisados através de microscopia eletrônica. Para a análise histoquímica utilizou-se Azul de Bromofenol; P.A.S – Ácido Periódico de Schiff; von Kossa; Alcian Blue pH 2,5 e Sudan Black. No presente estudo conclui-se que a toxina Cry1Ac do algodão Bt ingerida por *S. frugiperda* promove uma desorganização da matriz perimicrovilar de *P. nigrispinus* (terceiro nível trófico) ocasionado assim alterações ultra-estruturais nas células digestivas como alongamento das microvilosidades, presença de esferocristais e grânulos de elétron-densidades diferentes, além de alterar o padrão de distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio dessas células da região mediana do intestino médio.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*, predador, morfologia, planta transgênica, intestino médio

ULTRA-STRUCTURE AND HISTOCHEMISTRY OF DIGESTIVE CELLS OF *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) FED WITH PREY REARED ON Bt-COTTON

ABSTRACT - The transport of Bt proteins from the body of the prey/host to predators and parasitoids has been investigated as a route of impact on non-target insects of Bt crops. This research aimed to analyze the ultrastructure and histochemistry of digestive cells in the median region of the midgut of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) fed, since its second instar, with *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on Bt cotton variety Acala90 B and its non-Bt isolate Acala 90. For the analysis of cell ultra-structure, fragments of the midgut of *P. nigrispinus* were fixed in 2.5% glutaraldehyde, embedded in EMBED812/Araldite resin and analyzed at the Laboratory of Electron Microscopy, UNESP -Rio Claro/SP, Brazil. For the histochemistry analysis, Bromophenol Blue, PAS - Periodic Acid Schiff von Kossa, Alcian Blue pH 2.5 and Sudan Black were used. In the present study we conclude that Cry1Ac toxin of Bt cotton ingested by *S. frugiperda* promotes a disorganization in the perimicrovillar matrix of *P. nigrispinus* (third trophic level), thus generating ultrastructural changes in the digestive cells, as elongation of microvilli, presence of spherocrystals and granules of different electron densities, in addition to alters the distribution pattern of glycogen, lipids and calcium of these cells in the median region of the midgut.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, predator, morphology, transgenic plant, histology



## Introdução

Dentre os métodos adotados para o controle de insetos podemos destacar a utilização de plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam toxinas inseticidas do *Bacillus thuringiensis* Berliner (James 2009). Essas plantas são consideradas uma das mais bem sucedidas aplicações biotecnológicas. *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 Bt (Bollgard I) comercialmente cultivado no Brasil expressa a proteína Cry1Ac (Ali *et al.* 2006).

Uma vez presente no trato digestivo dos insetos suscetíveis, as proteínas Cry associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células digestivas do intestino médio, causando lise osmótica por meio de poros na membrana, ruptura da integridade intestinal e, conseqüentemente, morte do inseto (Cavados *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2004, Oestergaard *et al.* 2007, Sousa *et al.* 2010).

Estudos demonstraram que apenas insetos mastigadores, além de tripes e ácaros (Torres & Ruberson 2006b), são capazes de adquirir a proteína Cry1Ac de plantas, não fazendo parte desse grupo as pragas sugadoras (Raps *et al.* 2001; Torres *et al.* 2006b). No entanto, o transporte de proteínas Bt do corpo da presa/hospedeiro aos predadores e parasitóides tem sido investigado como um potencial rota de impacto em insetos não-alvos das plantas Bt (Head *et al.* 2001; Bernal *et al.* 2002; Dutton *et al.* 2003; Torres & Ruberson 2008), em especial no caso de inimigos naturais que não estão exposto a toxina presente na planta mas passam a ter contato com a toxina através da sua presa.

No algodoeiro é possível que espécies moderadamente ou não suscetíveis a Cry1Ac possam adquirir essa toxina e expô-la ao terceiro nível trófico (Torres *et al.* 2006b). Assim, espécies de

lepidópteros comuns em lavouras de algodão, como por exemplo, as dos gêneros *Spodoptera* e *Pseudoplusia*, podem indiretamente expor os predadores a toxina Cry1Ac.

O ecossistema do algodoeiro suporta um complexo significativo de artrópodes pragas e inimigos naturais, onde os percevejos são reconhecidos como importantes inimigos naturais de pragas-chave e secundárias (Lopez *et al.* 1996). O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) é uma espécie de hábito alimentar generalista, alimentando-se primariamente de larvas e lagartas, sendo constatado como predador natural de 34 diferentes espécies de insetos de importância econômica (Torres *et al.* 2006a).

O intestino médio dos hemípteros apresentam variações morfológicas e funcionais, em decorrência da variação dos hábitos alimentares desses insetos. Guedes *et al.* (2007) relataram que o intestino médio de um Hemiptera zoofitófago é dividido em uma região anterior dilatada, uma mediana tubular e uma posterior também dilatada. A região anterior está envolvida com transporte de íons e água, mantendo o equilíbrio eletrolítico, além da digestão dos carboidratos e representa um importante local para o armazenamento de lipídios. O processo da digestão e secreção de enzima é mais observada nas regiões mediana e posterior.

Nas interações inseto/algodão Bt, surgem questões sobre de que maneira os inimigos naturais poderiam ser afetados através dessa relação com suas presas ou hospedeiros. Dentro deste contexto, a pesquisa objetivou analisar a ultra-estrutura e histoquímica das células digestivas da região mediana do intestino médio de *P. nigrispinus* alimentados com *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) criadas em algodão Bt, bem como a distribuição dos produtos de secreção como compostos protéicos, glicogênio, cálcio, glicosaminoglicanas carboxiladas e lipídios.

## Material e Métodos

**Obtenção dos Insetos.** Ninfas de *P. nigrispinus* foram obtidas da criação do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

**Obtenção da Planta e Quantificação de Toxina Cry1Ac.** O algodão Bt variedade Acala 90B (Bollgard I) e sua isolinha não-Bt Acala 90 foram utilizados neste estudo. Plantas das duas variedades foram cultivadas simultaneamente no campo experimental do Departamento de Agronomia da UFRPE a partir de sementes doadas pela Monsanto do Brasil Ltda (São Paulo, SP).

Os níveis de toxinas Cry1Ac nas folhas de algodão Bt oferecidas às lagartas nos bioensaios foram quantificados por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) no Laboratório de Controle Biológico, utilizando o Kit PathoScreen1 (Agdia Inc., Elkhart, IN), que contém anticorpos contra o Bt -Cry1Ac/Cry1Ab e peroxidase conjugada, seguindo o procedimento de Torres *et al.* (2006b). Absorbância foi lida usando um leitor de placas ELx800™ (Biotek Instruments Inc.) com um filtro de 450 nm após paralização da reação com ácido sulfúrico a 1M.

**Criação de *S. frugiperda*.** Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* obtidas da criação estoque do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE mantidas à temperatura de  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 70-80%, fotofase de 12h e alimentadas com folhas de algodão variedade Acala 90B e sua isolinha não-Bt Acala 90.

**Bioensaio.** Ninfas de *P. nigrispinus* com 24 h de idade foram divididas em dois grupos de 100 insetos cada. O grupo tratamento foi caracterizado por ninfas que se alimentaram de lagartas de *S. frugiperda* do terceiro e quarto instar criadas em folhas de algodão Bt e o grupo controle, ninfas alimentadas com lagartas nos mesmos instares criadas em algodão não-Bt. A criação das ninfas foi realizado em recipientes plásticos de 1 L forrados com papel toalha. Água foi disponibilizada

através de pequenos tubos de ensaio tampado com algodão umedecido. Todo o experimento foi conduzido em câmara climatizada a  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 70-80%.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).** As regiões medianas dos intestinos médios de adultos com 24h de idade de *P. nigrispinus* foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) por 24 h e em seguida levados ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os fragmentos foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada com o mesmo tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 1h. A desidratação foi realizada em banhos crescentes de acetona por 10 minutos cada. Após o processo de desidratação os intestinos foram embebidos em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (UReichert Ultracut), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise do material foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP campus – Rio Claro/SP em microscópio eletrônico CM 100 Phillips em 80 kV.

**Coleta da Região Mediana do Intestino Médio para Microscopia de Luz.** Adultos de *P. nigrispinus* com 24 h de idade foram imobilizados a  $4^{\circ}\text{C}$  e dissecados sob estereomicroscópio (marca QUIMIS - modelo 1069) para a retirada da região mediana do intestino médio em seguida foram fixados em formol 10% em tampão com Mollinig-Carson (0.1 M, pH 7.2) por 24 h. A desidratação foi realizada em banhos com gradiente crescente de etanol (70-95%) durante 10 minutos e embebidos com historesina Leica<sup>®</sup> por 24 h. Cortes de 4  $\mu\text{m}$ , obtidos em microtomo Leica<sup>®</sup> RM 2245 foram corados pelo Azul de Toluidina (Junqueira & Junqueira, 1983).

**Histoquímica.** Para a detecção de compostos protéicos foi utilizado o Azul de Bromofenol (Pearse, 1960); o P.A.S – Ácido Periódico de Schiff (Junqueira & Junqueira, 1983) para glicogênio; von Kossa para cálcio (Junqueira & Junqueira, 1983); Alcian Blue pH 2,5 para glicosaminoglicanas carboxiladas (Junqueira & Junqueira, 1983) e Sudan Black para lipídios (Junqueira & Junqueira, 1983). Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica<sup>®</sup>. As imagens foram capturadas e digitalizadas pelo software Leica Image Manager 50.

### **Resultados e Discussão**

A parede mediana do intestino médio de *P. nigrispinus*, em ambos os tratamentos, mostrou-se constituída por epitélio simples com dois tipos de células: digestiva e regenerativa e por duas camadas musculares, uma circular interna e uma longitudinal externa (Figs. 1A e B), características estas já relatadas para outros insetos da ordem Hemiptera para essa região (Azevedo *et al.* 2009, Laguardia *et al.* 2010).

Histoquimicamente, de modo geral, algumas células digestivas do grupo controle e tratamento demonstraram uma leve reação positiva para glicosaminoglicanas carboxiladas na região apical das células digestivas (Figs. 1C e D). A distribuição dos compostos protéicos nas células digestivas predominou na região basal em ambos os tratamentos (Figs. 1E e F).

As células digestivas do grupo controle exibiram um padrão de distribuição para glicogênio, lipídios e ions de cálcio uniforme por todo o citoplasma (Figs. 2A, C e E). Houve uma alteração na distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio nas células digestivas dos insetos alimentados com presas criadas em algodão Bt onde se verificou um maior acúmulo de glicogênio na região apical e de lipídios na região basal na maioria das células (Figs. 2B e D). No entanto, evidenciou-se menor reação para os íons de cálcio quando comparado com as células do

controle (Fig. 2F). A presença da toxina parece estimular a liberação das reservas energéticas dessas células em resposta a reparação ou processo de defesa.

Ultra-estruturalmente as células digestivas caracterizaram-se pela presença de microvilosidades, vesículas de secreção e gotículas de lipídios na região apical, núcleo central com nucléolo evidente e cromatina descondensada, e algumas pequenas áreas, com cromatina condensada (Fig. 3A). Na região basal verificou-se a presença do labirinto basal associado a mitocôndrias, além de uma rica rede traqueal associada às camadas musculares do intestino médio (Fig. 3B) (Guedes *et al.* 2007, Azevedo *et al.* 2009, Laguardia *et al.* 2010).

Uma característica da região do intestino médio em insetos da ordem Hemiptera é a presença da matriz perimicrovilar, observada em ambos os tratamentos, a qual desempenha função semelhante a da matriz peritrófica, agindo como uma barreira mecânica e de proteção contra toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (Albuquerque-Cunha *et al.* 2004, Terra *et al.* 2006, Alves *et al.* 2007). Segundo Terra (1988, 1990) e Ferreira *et al.* (1988) essa matriz reveste as microvilosidades das células intestinais dos hemipteras limitando um espaço fechado, denominado de espaço perimicrovilar. Nos insetos do tratamento controle a matriz apresentou-se íntegra com distribuição uniforme sobre a superfície apical das células que apresentaram microvilosidades curtas e espaçadas seguindo um padrão típico descrito na literatura (Fig. 3C) (Guedes *et al.* 2007). Entretanto, nos insetos alimentados com presas criadas em algodão Bt evidenciou-se desorganização dessa matriz, além de microvilosidades alongadas e justapostas com acúmulo de material elétron-denso no seu interior (Fig. 3D). O alongamento das microvilosidades pode ter sido um reflexo da desorganização da matriz perimicrovilar e conseqüentemente ocasionando uma alteração no padrão de distribuição do glicogênio, lipídios e cálcio.

As células digestivas dos insetos alimentados com presas criadas em algodão Bt apresentaram esferocristais, polimorfismo mitocondrial, vesículas de tamanhos variados contendo no seu interior material elétron-denso e elétron-luscente. Algumas delas constituídas por dupla membrana, além de grânulos de glicogênio (com predomínio na região apical conforme visualizado pela histoquímica) e gotículas de lipídio (Figs. 3E e 3F).

Pesquisas analisando o intestino médio de populações resistentes de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a formulações a base de Bt também evidenciaram a presença de esferites (dados não publicados). Os esferites ou esferocristais são relatados como grânulos associados com o processo de transporte rápido de fluidos, excreção de metais pesados, materiais orgânicos e inorgânicos, excreção de íons, detoxificação celular e parasitismo (Cruz-Landim 2000, Hazelton *et al.* 2001, Lipovsek *et al.* 2002, 2004, 2008, Pinheiro *et al.* 2008). Os achados na presente pesquisa sugerem que a presença dos esferocristais pode estar relacionada com o transporte de íons cálcio para o lúmen e, conseqüentemente, redução desse íon no citoplasma promovendo assim uma proteção contra a toxina.

As vesículas com dupla membrana que brotam do aparelho de Golgi de acordo com Silva *et al.* (1995) e Silva *et al.* (1996) podem se dirigir para o ápice da célula fusionando-se com a membrana apical para formação da matriz perimicrovilar, o que pode justificar a presença dessas vesículas nas células digestivas dos insetos que entraram em contato com a toxina, visto que se observou a desorganização dessa estrutura. Já a presença de vesículas com eletron densidades diferentes e a presença de polimorfismo mitocondrial são estruturas comuns nas células digestivas dos insetos. De acordo com Habib *et al.* (2008) e Laguardia *et al.* (2010) as vesículas eletron densas estão associadas com a secreção, e as vesículas elétron-luscente, com a absorção, enquanto a variação no tamanho e forma das mitocôndrias é uma ocorrência comum nas células secretoras dos insetos em geral (Abdalla & Cruz-Landim 2001, 2004).

No presente estudo conclui-se que a toxina Cry1Ac do algodão Bt ingerida por *S. frugiperda* promove uma desorganização da matriz perimicrovilar de *P. nigrispinus* (terceiro nível trófico) ocasionado assim alterações ultra-estruturais nas células digestivas como alongamento das microvilosidades, presença de esferocristais e grânulos de elétron-densidades diferentes, além de alterar o padrão de distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio dessas células da região mediana do intestino médio.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho e ao doutorando Bruno Fiorelini Pereira (UNESP, Rio Claro –SP) pelo auxílio nas técnicas histoquímicas.

### **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.
- Albuquerque-Cunha, J.M., C.B. Mello, E.S. Garcia, P. Azambuja, W. Souza, M.S. Gonzalez & N.F.S. Nogueira. 2004.** Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99: 815–822.



- Alves, C.R., J.M. Albuquerque-Cunha, C.B. Mello, E.S. Garcia, N.F. Nogueira, S.C. Bourguignon, W. Souza, P. Azambuja & M.S. Gonzalez. 2007.** *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 116: 44–52.
- Ali, M.I., R.G. Luttrell & S.Y. Yong. 2006.** Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Hiliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* 99: 164-175.
- Azevedo, D.O., C.A. Neves, J.R.S. Mallet, T.C.M. Gonçalves, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2009.** Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* 46: 435-441.
- Bernal, C.C., R.M. Aguda & M.B. Cohen. 2002.** Effect of rice lanes transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cytorhinus lividpennis*. *Entomol. Exp. Appl.* 102: 21–28.
- Cavados, C.F.G., S. Majerowicz, J.Q. Chaves, C.J.P.C. Araújo-Coutinho & L. Rabinovitch. 2004.** Histopathological and ultrastructural effects of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* Larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 493-498.
- Cruz-Landim, C. 2000.** Localization of calcium and acid phosphatase in the Malpighian tubules of nurse workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Bioscience J.* 16: 87-99.
- Dutton, A., J. Romeis & F. Bigler .2003.** Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1A as a case study. *BioControl* 48: 611–636.

- 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.
- Ferreira, C., A.F. Ribeiro, E.S. Garcia & W.R. Terra. 1988.** Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.* 18: 521-530.
- Guedes, B.A.M., J.C. Zanuncio, F.S. Ramalho & J.E. Serrão. 2007.** Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stink bug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1963) (Heteroptera: Pentatomidae). *Pan-Pacific Entomol.* 83: 229–235.
- Hazelton S.R., B.E. Felgenhauer & J.H. Spring. 2001.** Ultrastructural changes in the Malpighian tubules of house cricket, *Acheta domesticus*, at the onset of diuresis: a time study. *J. Morphol.* 247: 80-92.
- Head, G., C.R. Brown, M.E. Groth & J.J. Duan. 2001.** Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomol. Exp. Appl.* 99: 37–45.
- Habib, J., T.A. Coudron, E.A. Backus, S.T. Brandt, R.M. Wagner, M.K. Wright & J.E. Huensig. 2008.** Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 159-171.
- James, C. 2009.** Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009, Ithaca, NY, ISAAA Briefs 39.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.

- Laguardia, L., V. Rocha, C.A. Neves, J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2010.** Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. C. R. Biol. 333:405–415.
- Lipovsek, S., I. Letofsky-Papst, F. Hofer & M.A. Pabst. 2002.** Seasonal and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). Micron 33: 647-654.
- Lipovsek, S., T. Novak, F. Janzekovic, L. Sencic & M.A. Pabst. 2004.** A contribution to the functional morphology of midgut gland in phalangiid harvestmen *Gyas annulatus* and *Gyas titanus* during their life cycle. Tissue Cell 36: 275-282.
- Lipovsek Delakorda, S., I. Letofsky-Papst, T. Novak, F. Hofer, M.A. Pabst. 2008.** Application of elemental microanalysis to elucidate the role of spherites in the digestive gland of the helcid snail *Chilostoma lefeburi*. J. Microsc. 231: 38–46.
- Lopez, Jr J.D., W.L. Sterling, A. Dean & D.A. Norlund. 1996.** Biology and ecology of important predators and parasites attacking arthropod pests, p. 88-142. In King, E.G., Phillips, J.R., Coleman, R.J. (eds.), Cotton Insects and mites: Characterization and Management. The Cotton Foundation. Memphis, m 1008p.
- 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.
- Pearse, A.G.E., 1960.** Histochemistry: theoretical and applied., London, Churchill, 998p.
- Pinheiro, D.O., H. Conte & E.A. Gregório. 2008.** Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. Biocell 32: 61-67.

- Raps, A., J. Kehr, P. Gugerli, W.J. Moar, F. Bigler & A. Hilbeck. 2001.** Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol. Ecol.* 10: 525-533.
- 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.
- Silva, C.P., F.A. Ribeiro, S. Gulbenkian & W.R. Terra. 1995.** Organization, origin and functions of the outer microvillar (perimicrovillar) membrane of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 41: 1093-1103.
- Silva, C.P., F.A. Ribeiro & W.R. Terra. 1996.** Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: pyrrhocoridae) midgut cells. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26: 1011-1018.
- Sousa, M.E.C., F.A.B. Santos, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, L.C. Alves & J.B. Torres. 2010.** Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* 56: 1913-1919.
- Terra, W. R. 1988.** Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol Res.* 21: 675-734.
- Terra, W. R. 1990.** Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 181-200
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006.** Plasma membranes from insect midgut cells. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 78: 255-269.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006a.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in Eucalyptus in Brazil. *CAB Reviews: Persp. Agric. Vet. Sci.* 15: 1-16.

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

**Torres, J.B., & J.R. Ruberson. 2008.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. Transg. Res. 17:345-354.

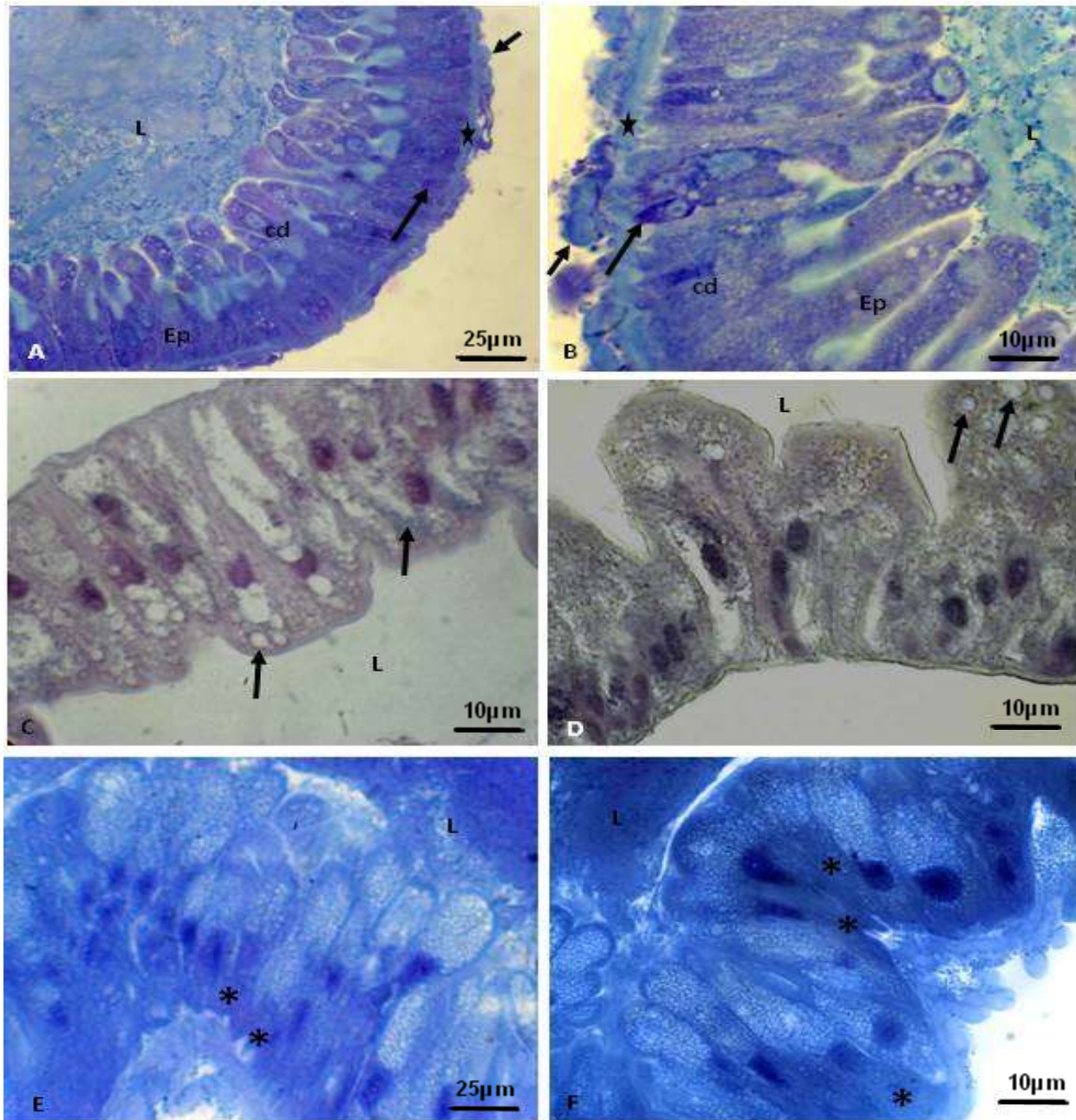


Figura 1. Microscopia de luz da região mediana do intestino médio de *Podisus nigrispinus* do grupo controle (A) e tratado (B). Azul de Toluidina. Leve reação positiva para glicosaminoglicanas carboxiladas na região apical das células para ambos os grupos controle (C) e tratado (D). Alcian Blue. Compostos proteicos na região basal das células digestivas no grupo controle e tratado (E e F, respectivamente). Azul de Bromofenol. Ep – epitélio simples, cd – célula digestiva, Seta longa – célula regenerativa, Seta curta – músculo longitudinal, Estrela – músculo circular, L – Lúmen, Asteriscos – compostos protéicos. Barra = 100µm.

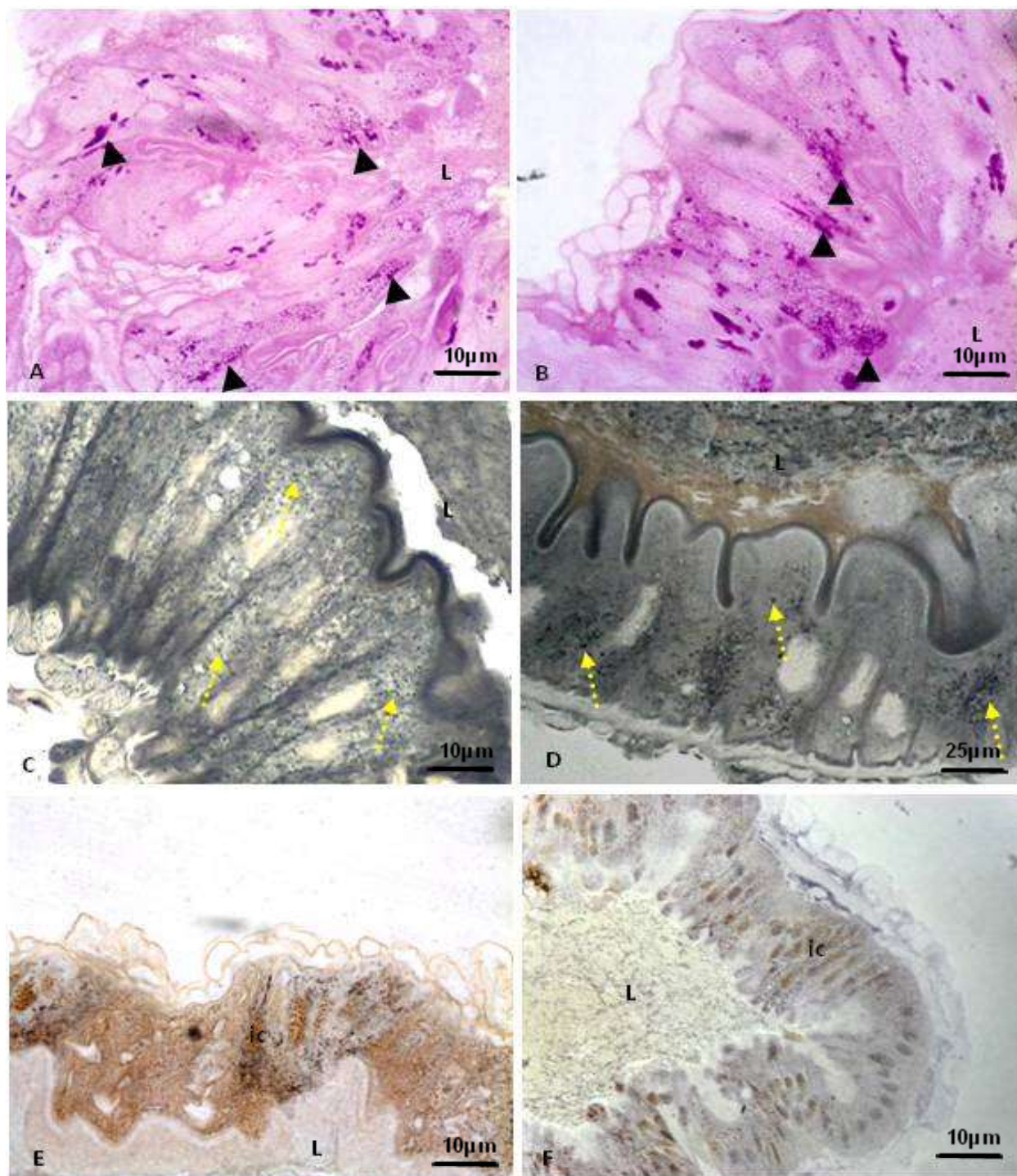


Figura 2. Microscopia de luz da região mediana do intestino médio de *Podisus nigrispinus*. (A) grupo controle exibindo distribuição uniforme de grânulos de glicogênio e (B) grupo tratado mostrando predomínio de glicogênio na região apical. (P.A.S.). (C) distribuição uniforme de lipídios nas células digestivas do grupo controle e (D) evidenciar maior concentração de lipídios na região basal (Sudan Black) e (D) íons Cálcio (von Kossa) por todo o citoplasma. Nos intestinos dos percevejos do grupo tratamento, observa-se maior acúmulo de glicogênio na região basal (B), s (E) e leve reação para íons Cálcio (F). L – Lúmen, Ponta de setas – glicogênio, Setas tracejadas – gotículas de lipídios, ic – íons de cálcio. Barra = 100µm.

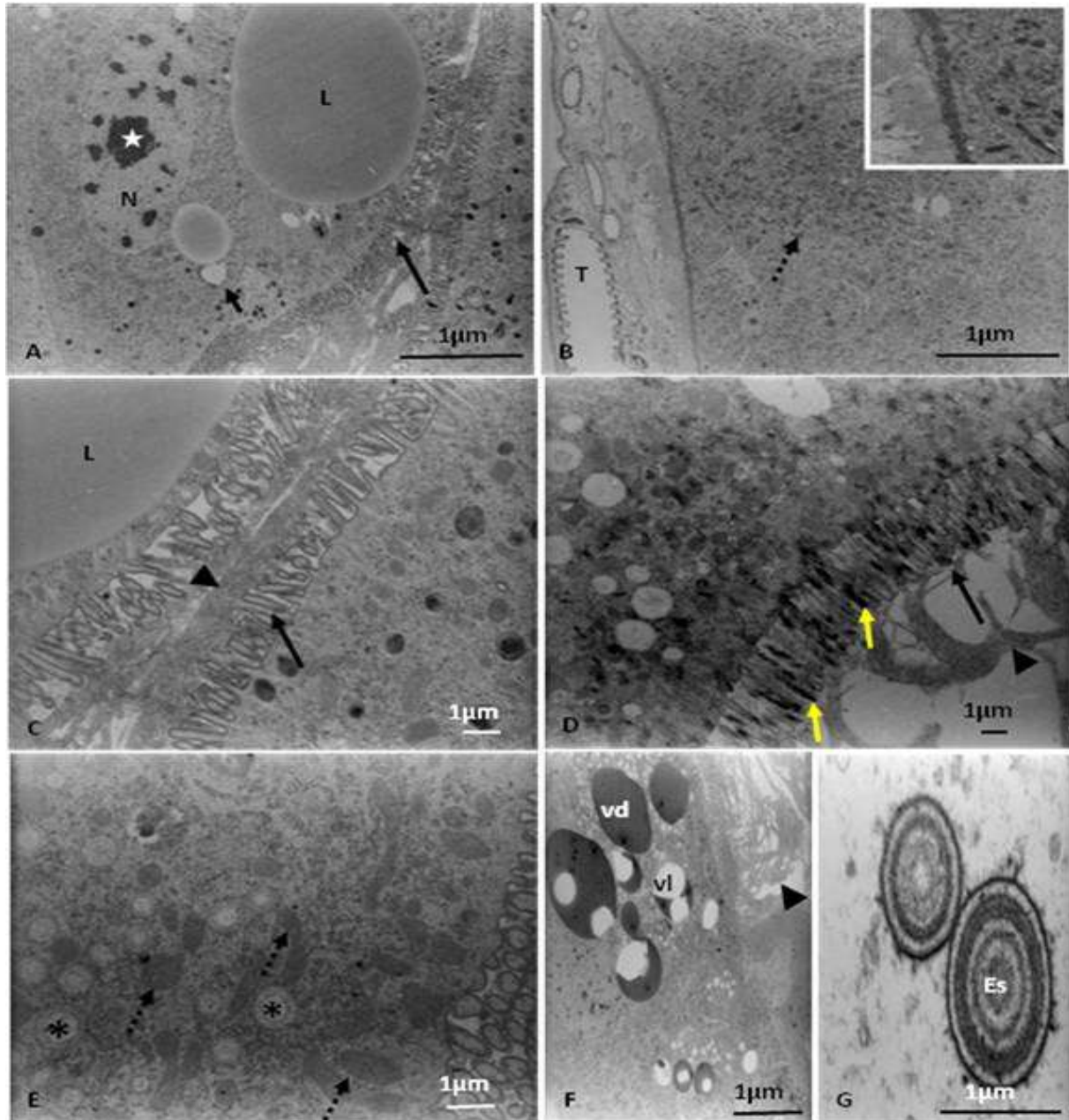


Figura 3. Eletromicrografias de transmissão das células digestivas de *Podisus nigrispinus* do grupo controle: (A) Região apical. (B) Região basal e em detalhe o labirinto basal. (C) Microvilosidades e membrana perimicrovilar. D a G - Ultra-estrutura das células digestivas de *Podisus nigrispinus* alimentados com presas criadas em algodão Bt: (D) Região apical com microvilos longos e justapostos, note a desorganização da membrana perimicrovilar. (E) Polimorfismo mitocondrial e vesículas com dupla membrana. (F) Vesículas com elétrondensidade diferentes. (G) Esferocristais. L – lipídio; N – núcleo; Estrela- nucléolo; Seta longa – microvilos; Seta curta – vesícula de secreção; T- traqueíola; Seta tracejada – mitocôndrias; Ponta de seta – membrana perimicrovilar; Setas amarelas – material elétron-denso; Asteriscos – vesícula com dupla membrana, vd - vesícula elétron-densa, vl – vesícula elétron-luscente, Es – esferocristais.



## CAPÍTULO 4

### INTERAÇÕES INSETO/ALGODÃO BT SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURA DOS HEMÓCITOS DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDADE)

FRANKLIN M. DA CUNHA<sup>1</sup>, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA<sup>2</sup>, ÁLVARO A.C. TEIXEIRA<sup>2</sup>, LUIZ C.  
ALVES<sup>3</sup> E FLÁVIO H. CAETANO<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco e  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM, Av. Moraes Rego s/n 50670-420, Recife, PE..

<sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista. Av. 24 A,1515, CEP 13506-900, Rio  
Claro, SP.

---

Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, L.C. Alves & F.H. Caetano. Interações inseto/algodão Bt sobre parâmetros imunológicos e ultra-estrutura dos hemócitos de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). A ser submetido a Entomological Physiology.

RESUMO – No ecossistema do algodão é possível que espécies moderadamente ou não suscetíveis a Cry1Ac, como as dos gêneros *Spodoptera* e *Pseudoplusia*, possam adquirir essa toxina e expô-la ao terceiro nível trófico (predadores). Assim, testamos a hipótese de que o consumo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com algodão Bt pode levar a alterações nos parâmetros humorais, hemograma e ultra-estrutura dos hemócitos de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Ninfas do predador foram alimentadas até a fase adulta com lagartas de *S. frugiperda* criadas em algodão Bt e sua isolinha não-Bt. Os níveis de toxinas Cry1Ac nas folhas de algodão Bt, dosagem de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase e proteínas totais foram quantificados por ELISA. Foi realizado a contagem total e diferencial dos hemócitos. Para ultra-estrutura os *pellets* de hemolinfa foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, incluídos em resina EMBED812/Araldite e analisados em Microscopia Eletrônica. Conclui-se que embora os granulócitos e plasmatócitos tenham apresentado discretas alterações ultra-estruturais, os parâmetros humorais e o hemograma de *P. nigrispinus* não são afetados quando criados com a presa *S. frugiperda* alimentadas diariamente com folhas de algodão Bt, não afetando dessa forma a relação tritrófica.

PALAVRAS-CHAVE: Predador, planta transgênica, *Bacillus thuringiensis*, morfologia, imunidade

INSECT INTERACTIONS / BT COTTON ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND  
ULTRA-STRUCTURE OF *Podisus nigrispinus* HEMOCYTES (DALLAS) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDADE)

ABSTRACT - In the cotton ecosystem it is possible that species moderately or non-susceptible to Cry1Ac, as the genus *Spodoptera* and *Pseudoplusia*, can acquire this toxin and expose it to the third trophic level (predators). Therefore, we tested the hypothesis that the prey consumption of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) feed with Bt cotton can take to alterations in humoral parameters, hemogram and ultrastructure of hemocytes of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), a generalist predator native from Brazil. The experiment was conducted in climatized chamber in photoperiods of 12 h,  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  and relative humidity of 70-80%. Nymphs of predator were feed with armyworms of *S. frugiperda* raised in Bt cotton and its isolate non-Bt. The level of toxins Cry1Ac in leaves of cotton Bt, measurement of nitric oxide, activity of phenoloxidase and total proteins were quantified by ELISA. It was realized a total and differential count of hemocytes. For ultrastructure the pellets of hemolymph were fixed in Glutaraldehyde to 2,5%, included in resin EMBED812/Araldite and analyzed in the laboratory of electron microscopy of UNESP – Rio Claro/SP. We conclude that although the granulocytes and plasmatocytes have made discrete ultrastructural changes, humoral parameters and hemogram of the *P. nigrispinus* are not affected when reared with prey *S. frugiperda* fed daily with leaves of Bt-cotton, thus not affecting the tritrophic relationship established.

KEY WORDS: Predator, transgenic plant, *Bacillus thuringiensis*, morphology immunity

## Introdução

No Brasil o algodão Bollgard<sup>®</sup> I expressando a toxina Cry1Ac, da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt), foi o primeiro evento transgênico liberado para o controle de insetos pragas, tendo como principais alvos, lepidópteros como *Heliothis virescens* (Fabricius), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Alabama argillacea* (Hübner) (Estela *et al.* 2004, Ali *et al.* 2006). A introdução de genes de Bt codificadores de proteínas tóxicas ( $\delta$ -endotoxinas) no genoma dos vegetais permite a expressão contínua destas proteínas em todos os tecidos da planta, atingindo os insetos-praga suscetíveis 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).

Diante de todos os processos de testes pelos quais são submetidas previamente as culturas transgênicas, como medida de avaliação do seu potencial impacto sobre o ambiente, os seus efeitos sobre os níveis tróficos da comunidade dos organismos não-alvo, como por exemplo, os predadores, devem ser considerados, pelo fato de alimentarem-se da própria planta ou de presas alvos das plantas Bt, que constituem rotas naturais de exposição à toxina (Jepson *et al.* 1994, Schuler *et al.* 1999, Garcia-Alonso *et al.* 2006). Além disso, no ecossistema de algodão, é possível que espécies moderadamente ou não suscetíveis ao Cry1Ac, como por exemplo, as dos gêneros *Spodoptera* e *Pseudoplusia*, possam adquirir essa toxina e expô-la ao terceiro nível trófico (Stewart *et al.* 2001), transmitindo a toxina para seus predadores.

Durante os primeiros anos de análise dos possíveis impactos gerados pelas culturas Bt, os testes demonstram a existência de efeitos adversos sobre predadores, onde parâmetros relacionados ao seu desenvolvimento e longevidade foram afetados (Ponsard *et al.* 2002). No entanto, estudos mais recentes tem demonstrado que esses efeitos, observados sobre estes organismos não-alvo, estão ligados a redução da qualidade da presa, alimentada com tecidos da planta Bt, e não do efeito direto do gene produtor da toxina (Romeis *et al.* 2004, Torres & Ruberson, 2006).

A avaliação dos efeitos das toxinas Cry nas relações tritróficas tem se destinado em sua maioria na análise sobre o desempenho e fisiologia digestiva (Álvarez-Alfageme *et al.* 2009, Lawo *et al.* 2010, García *et al.* 2010), e poucos trabalhos tem mostrado se o sistema de defesa dos predadores é afetado pela toxina Bt. Assim, uma lacuna para avaliação dos possíveis efeitos dessas toxinas Cry sobre os parâmetros imunológicos celular e humoral desses predadores, em especial aquela produzida pela primeira geração de algodão Bt (Cry1Ac), liberada no Brasil fica em aberto.

O presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que consumo de presas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com algodão Bt pode levar a alterações qualitativa, quantitativas e ultra-estrutural dos hemócitos, bem como afetar a atividade da fenoloxidase, produção de óxido nítrico e quantidade de proteínas totais do percevejo *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), um predador de hábito alimentar generalista, alimentando-se primariamente de larvas e coleópteros, sendo constatado como predador natural de mais de 34 diferentes espécies de insetos de importância econômica (Torres *et al.* 2006).

## Materiais e Métodos

**Obtenção dos Insetos.** Ninfas de *P. nigrispinus* foram obtidas da criação do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

**Obtenção da Planta e Quantificação da Toxina Cry1Ac.** O algodão Bollgard®I variedade Acala 90B e sua isolinha não bt Acala 90 foram utilizadas neste estudo. Essa variedade de algodão Bollgard™ é geneticamente modificado com o gene para a produção da toxina Cry1Ac. Plantas das duas variedades foram cultivadas simultaneamente no campo experimental do Departamento de Agronomia da UFRPE a partir de sementes doadas pela Monsanto do Brasil Ltda (São Paulo, SP).

Os níveis de toxinas Cry1Ac nas folhas de algodão Bt oferecidas às lagartas nos bioensaios foram quantificadas por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) no Laboratório de Controle Biológico da UFRPE, utilizando o Kit PathoScree (Agdia Inc., Elkhart, IN). Quinze amostras de folhas (cada uma com cerca de 0,027g) foram analisados seguindo o procedimento de Torres *et al.* (2006). Absorbância foi lida usando um leitor de placas ELx800™ (Biotek Instruments Inc.) com um filtro de 450 nm.

**Criação de *S. frugiperda*.** Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* obtidas da criação estoque do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE mantidas à temperatura de  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 70-80% e fotofase de 12h, e alimentadas com folhas de algodão Bt e não Bt.

**Bioensaio.** Ninfas de segundo instar de *P. nigrispinus* foram divididas em dois grupos de 100 insetos cada. O grupo tratamento foi caracterizado por ninfas criadas até a fase adulta com lagartas de *S. frugiperda* do terceiro e quarto instar, previamente alimentadas em folhas de algodão Bt e o grupo controle, com lagartas provenientes do algodão não Bt. Após 24h de atingir

a fase adulta os percevejos foram imobilizados à baixa temperatura (4°C) para coleta da hemolinfa para a análise da contagem total e diferencial dos hemócitos, quantificação dos níveis de óxido nítrico, proteínas totais e atividade da fenoloxidase, bem como a ultra-estrutura dos hemócitos. O acondicionamento dos insetos foi realizado em recipientes plásticos de 1 L forrados com papel toalha. Água foi disponibilizada através de pequenos tubos de ensaio tamponados com algodão. Todo o experimento foi conduzido em câmara climatizada a  $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12h e umidade relativa de 70-80%.

**Contagem Total e Diferencial dos Hemócitos.** Amostras da hemolinfa foram coletadas com microcapilares de vidro através da região do escutelo dos percevejos. Um *pool* 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foi misturada com 10  $\mu\text{L}$  de meio Schneider para cultura de células dentro de um eppendorf de 1 mL que foi caracterizado como uma repetição sendo realizado 10 repetições para cada tratamento. Logo após, as amostras foram transferidas para câmara de Neubauer e o número de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado. A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços de células coradas pelo Giemsa, em microscopia de luz. O percentual dos tipos de células presentes na hemolinfa de cada tratamento foi determinado, a partir de 10 repetições, dos quais 300 células foram contadas para cada indivíduo, seguindo os métodos de Falleiros *et al.* (2003) e Cunha *et al.* (2009). Os dados obtidos foram submetidos ao Test-t, empregando-se o PROC TTest do programa estatístico SAS (SAS Institute 2001).

**Dosagem de Óxido Nítrico.** A produção de óxido nítrico na hemolinfa de *P. nigrispinus* foi determinada para os dois grupos usando o reagente de Griess (Green *et al.* 1981), sendo avaliada pela concentração do íon nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ). Um *pool* de 50 $\mu\text{L}$  de hemolinfa foi adicionado em 70 $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (1%) em ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (5%) foi caracterizado com uma repetição, sendo realizadas 10 repetições para cada tratamento. As concentrações do  $\text{NO}^{2-}$  foram obtidas

após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente através 50µL de cada amostra (hemolinfa/sulfanilamida) mais 50µL de NEED (dihidroclorito de naftiletilenoamina) a 0,1% (Faraldo *et al.* 2005). A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (ELx800 - Biotek<sup>®</sup>) com filtro 562nm e do programa Gen5 Elisa (Biotek<sup>®</sup>). A curva padrão foi realizada com concentrações crescentes de nitrito de sódio 0,8–200µM. A quantidade de nitrito nas amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão. Os dados obtidos foram submetidos ao Test-t, empregando-se o PROC TTest do programa estatístico SAS (SAS Institute 2001).

**Atividade da Fenoloxidase e Concentração Protéica na Hemolinfa.** Um *pool* de 20 µL de hemolinfa por tratamento foram diluídos em 150 µL de tampão fosfato de sódio a 0,1 M, e mantida a -20 °C até serem utilizadas. Triplicatas de 50 µL da mistura hemolinfa/tampão foram transferidos para placas de 96 poços. A ativação da enzima foi realizada utilizando-se 50 µL de L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Absorbância foi lida a 492nm com intervalos de dois minutos durante duas horas. A atividade da enzima foi tomada durante a fase linear da reação dentro de 20 minutos desde a avaliação inicial (Faraldo *et al.* 2006). Para determinar o total de proteína na hemolinfa de *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de *S. frugiperda* criadas com algodão Bt e não Bt foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976) e albumina de soro bovino (BSA) para configurar a curva padrão de proteína. Os dados obtidos foram submetidos ao Test-t, empregando-se o PROC TTest do programa estatístico SAS (SAS Institute 2001).

**Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).** Adultos de *P. nigrispinus* com 24h de idade foram imobilizados à baixa temperatura (4°C) para coleta da hemolinfa através de microcapilar de vidro e transferida para microtubos de 1,5 mL contendo solução fixadora de glutaraldeído a



2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) por 24h, e em seguida, levados ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. O material coletado foi submetido a três lavagens de 10 minutos cada, alternadas por centrifugações de 5000 rpm com o mesmo tampão. Em seguida os *pellets* foram submetidos a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 1h. A desidratação foi realizada em banhos crescentes de acetona por 10 minutos cada. Após o processo de desidratação, os *pellets* foram embebidos em resina EMBED812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (UReichert Ultracut), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise do material foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP– Rio Claro/SP em microscópio eletrônico CM 100 Phillips em 80 kV.

## Resultados

A análise enzimática para determinação da presença de toxina Cry nas folhas do algodão transgênico demonstrou que os discos de folhas de algodão Bt oferecidos as lagartas de terceiro e quarto instar de *S. frugiperda* tiveram uma produção média ( $\pm$  EP)  $23 \pm 0,70$  ng de Cry1Ac g<sup>-1</sup> por peso de folha fresca.

Nos esfregaços da hemolinfa realizados para microscopia de luz para ambos os tratamentos, cinco tipos de células foram identificados: granulócitos, plasmatócitos, prohemócitos, adipohemócitos e oenocitóides. O hemograma revelou não haver diferenças estatísticas significativas para o número total (Tabela 1) e diferencial (Tabela 2) desses hemócitos, embora numericamente verificou-se um discreto aumento no número total dessas células em adultos de *P. nigrispinus* com 24h de idade alimentados com lagartas de *S. frugiperda* criadas em folhas de

algodão Bt. Em ambos os tratamentos os granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos tiveram os maiores percentuais em relação aos adipohemócitos e oenocitóides.

Ultraestruturalmente os granulócitos exibiram núcleo eucromático com áreas de heterocromatina e nucléolo bem evidente. Seu citoplasma revelou presença de vários grânulos de elétron-densidades diferentes, mitocôndrias de tamanho variado, vários ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso (Figs 1A e B). Entretanto, foi observado diferenças nessas células nos percevejos que foram alimentados com presas criadas no algodão Bt como, por exemplo, grânulos mais elétron-densos e retículo endoplasmático rugoso mais desenvolvido (Fig 1C). Nos plasmatócitos foi observada grande quantidade de vesículas claras no citoplasma em relação aos plasmatócitos dos percevejos que foram alimentados com presas criadas no algodão não Bt. Embora, em ambos os tratamentos essas células apresentem tamanho e forma variada com núcleo acompanhado a morfologia da célula. No citoplasma evidenciou-se a presença de numerosos ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figs. 1D, E e F).

Nenhuma alteração ultraestrutural foi apresentada para os prohemócitos, adipohemócitos e oenocitóides. Os prohemócitos exibiram pequena faixa de citoplasma em decorrência do núcleo volumoso. No citoplasma foi possível evidenciar a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e vesículas (Fig. 2A). Os adipohemócitos apresentaram gotículas lipídicas de vários tamanhos com núcleo central e bastante eucromático (Fig. 2B). Os oenocitóides mostraram núcleo excêntrico com citoplasma basicamente constituído por ribossomos livres, mitocôndrias e vesículas (Figs. 2C e D).

As avaliações realizadas nos parâmetros humoral da hemolinfa de *P. nigrispinus* demonstraram não haver diferenças significativas para a quantidade de proteína total, fenoloxidase e óxido nítrico entre os insetos alimentados com as lagartas de *S. frugiperda*, criadas

com folhas de algodão Bt em comparação aqueles indivíduos alimentados com lagartas criadas com o algodão não Bt (Tabela1).

### **Discussão**

A quantidade média de  $23 \pm 0,70$  ng de Cry1Ac  $g^{-1}$  por peso de folha fresca expressada pelas folhas de algodão Bt diariamente oferecidas às lagartas de *S. frugiperda* não interferiu no seu desenvolvimento larval até o 4º instar sem aparentes efeitos deletérios, comprovando sua tolerância a Cry1Ac. Experimentos realizados por Sousa *et al.* (2010) com *A. argillacea* empregando o mesmo cultivar de algodão Bt, demonstraram que a ingestão de 0,183 ng de Cry1Ac foi capaz de causar danos drásticos as células intestinais das lagartas levando-as à morte após 20 minutos. Deste modo, é possível observar a tolerância de *S. frugiperda* a esta toxina e consequente aumento na probabilidade de transferência de Cry1Ac aos predadores.

No presente estudo, embora não tenham contemplado uma análise completa do perfil nutricional dos percevejos, verificou-se que não houve influência da qualidade das presas sobre os parâmetros da hemolinfa de *P. nigrispinus*. Mesmo havendo relatos prévios da detecção da toxina em predadores após a ingestão de presas alimentadas com algodão Bt ou toxina pura (Torres & Ruberson 2008).

Por outro lado, análises ultraestruturais do intestino médio dos percevejos *P. nigrispinus* foi possível verificar a interações da proteína Cry1Ac sobre este órgão, com consequentes efeitos, caracterizados pela desorganização da matriz perimicrovilar, presença de microvilosidades alongadas e justapostas com acúmulo de material elétron-denso no seu interior (Capítulo 3). Em decorrência dessas interações seria possível justificarmos as discretas alterações na morfologia dos granulócitos e plasmatócitos nos percevejos criados com presas alimentadas com algodão Bt como uma possível resposta a esta alterações promovidas pela toxina. Segundo Zhang *et al.*

(2005 e 2006), a formação de poros para a lise celular é mais um efeito secundário dos efeitos tóxicos desencadeados pela ligação a caderinas (fator fundamental para a morte celular) do que um efeito primário. A ausência de alterações drásticas no intestino médio de *P. nigrispinus* (Capítulo 3) provavelmente não promoveu o disparo de gatilhos imunológicos suficientes para ocasionar mudanças no hemograma e nos parâmetros humorais desse predador (Rahman *et al.* 2004).

Os tipos e as características morfológicas dos hemócitos observados na hemolinfa de *P. nigrispinus* seguiram padrões de similaridade aos aspectos daqueles observados por Borges *et al.* (2008) para o Hemiptera *Rhodnius prolixus* (Stal). No entanto, Berger & Slavíčková (2008) descreveram apenas quatro tipos de hemócitos na hemolinfa de *Phyrrocoris apterus* (L.) como sendo plasmatócitos, granulócitos, prohemócitos e esferulócitos. Ao avaliarmos com mais detalhes as características ultraestruturais desse último tipo celular, caracterizado pelos autores como células exibindo uma morfologia variando de arredondadas a ovais, contendo grande núcleo com nucléolo disposto algumas vezes de forma excêntrica no citoplasma onde se encontram vesículas grandes preenchidas com material elétron-lucente nos levam a pensar que estas estão mais próximas aos adipohemócitos encontrados em nossas preparações do que os esferulócitos. Uma vez, que estas células são identificadas principalmente por apresentarem de maneira muito marcante em suas esférulas estruturas elétron-densas dispostas geralmente em seu centro (Brehélin *et al.* 1978, Brayner *et al.* 2005).

Conclui-se que embora os granulócitos e plasmatócitos tenham apresentado discretas alterações ultra-estruturais, os parâmetros humorais e o hemograma de *P. nigrispinus* não são afetados quando criados com a presa *S. frugiperda* alimentadas diariamente com folhas de algodão Bt, não afetando dessa forma a relação tritrófica.

## Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho.

## Literatura Citada

- Ali, M.I., R.G. Luttrell & S.Y. Yong. 2006.** Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Hiliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. J. Econ. Entomol. 99:164-175.
- Berger J. & K. Slavíčková. 2008.** Morphological characterisation and of the hemocytes in the adult linden bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). Stud Zool. 47:466-472
- Borges, A.R., P.N. Santos, A.F. Furtado, R.C.B.Q. Figueiredo. 2008.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). Micron 39:486-494
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantication of micrograms quantities of protein utilising the principle of dye-binding. Anal. Biochem. 72:248:254.
- Brayner, F.A., H.R.C. Araújo, M.G.S. Cavalcanti, L.C. Alves & C.A. Peixoto. 2005.** Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Micron 36:359-367.
- Brehélin, M., D. Zachary & J.A. Hoffmann. 1978.** A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. Cell Tissue Res. 195:45-57.
- 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. Ciên. Rural 33: 843-850.

- Cunha, F.M., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, A.C. Albuquerque, L.A. Alves & E.A.L. Lima. 2009.** Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. Neotrop. Entomol. 38:293-297.
- 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.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Braz. Arch. Biol. Technol. 46:287-294.
- Faraldo, A.C., A. Sanunes, L.H. Faccioli, E.A. Del Bel & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. Nitric Oxide. 13:240-246.
- Faraldo, A.C., P.M. Nóbile, S. Daffre, E.A. Gregório & E. Lello. 2006.** Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. Anais do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, p. 136.
- Fiuza, L.M., C.N. Leroux, E. Goze & E.R. Frutos Charles. 1996.** Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): evidence of shared binding sites. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1544-1549.
- García, M., F. Ortego, P. Castañera & G.P. Farinós. 2010.** Effects of exposure to the toxin Cry1Ab through Bt maize fed-prey on the performance and digestive physiology of the predatory rove beetle *Atheta coriaria*. Biol. Control 55:225-233.
- Garcia-Alonso, M., E. Jacobs, A. Raybould, T.E. Nickson, P. Sowig, H. Willekens, P. van der Kouwe, R. Layton, F. Amijee, A.M. Fuentes & F. Tencalla. 2006.** A tiered system for

assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. Environ. Biosaf. Res. 5:57-65.

**Green, L.C., K.R. De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7764–7768.

**Jepson, P.C., B.A. Croft & G.E. Pratt GE. 1994.** Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. Mol. Ecol. 3: 81–89.

**Lawo, N.C., F.L. Wäckers & J. Romeis. 2010.** Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. J. Insect Physiol. 56:1702-1710

**Ponsard. S., A.P. Gutierrez & N.J. Mills. 2002.** Effects of Bt toxin (Cry1Ac) in transgenic cotton on the adult longevity of four heteropteran predators. Environ. Entomol. 31:1197-1205.

**Rahman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari, & O. Schmidt. 2004.** Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2696-2699.

**Romeis, J., A. Dutton & F. Bigler. 2004.** *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). J. Insect Physiol. 50:175–183.

**SAS Institute (2001)** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.

**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.

- Schuler, T.H., G.M. Poppy, B.R. Kerry & I. Denholm. 1999.** Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends Biotechnol.* 17: 210–216.
- Sousa, M.E.C., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, H.A.A. Siqueira, F.A.B. Santos, L.C. Alves & J.B. Torres. 2010.** Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. *J. Insect Physiol.* 56:1913-1919.
- Stewart, S.D., J.J. Adamczyk, K.S. Knighten & F.M. Davis. 2001.** Impact of Bt cotton expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J. Econ. Entomol.* 94:752–760.
- Torres, J.B. & J.R. Ruberson. 2008.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transg. Res.* 17:345-354.
- Torres, J.B. & J.R. Ruberson. 2006.** Spatial and temporal dynamics of oviposition behavior of bollworm and three of its predators in Bt and non-Bt cotton fields. *Entomol. Exp. Appl.* 120:11–22.
- 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.
- 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.
- Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig & L.A. Bulla Jr. 2006.** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase-PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:9897-9902.



Tabela 1. Média ( $\pm$  EP) dos percentuais dos tipos de hemócitos em adultos de *Podisus nigrispinus* criados durante todo o período ninfal com lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro e quarto instar alimentadas com folhas de algodão Bt (Bt) e algodão não Bt (NBt).

Parâmetro	n	NBt	Bt	t-estatística; <sup>P(1)</sup>
		(%)		
Granulócito	5	48,6 $\pm$ 1,53	49,8 $\pm$ 1,28	0,60 <sup>0,5651</sup>
Plasmatócito	5	31,0 $\pm$ 1,00	29,2 $\pm$ 0,73	-1,45 <sup>0,1850</sup>
Prohemócito	5	15,6 $\pm$ 3,04	16,0 $\pm$ 1,76	2,99 <sup>0,9122</sup>
Adipohemócito	5	3,0 $\pm$ 0,83	2,8 $\pm$ 0,37	-0,22 <sup>0,8327</sup>
Oenocitóide	5	1,8 $\pm$ 0,37	2,2 $\pm$ 0,58	0,58 <sup>0,5796</sup>

<sup>(1)</sup> Valor do teste de *t* a 0,05% de probabilidade.

Tabela 2. Média ( $\pm$  EP) dos parâmetros imunológicos de adultos de *Podisus nigrispinus* criados durante todo o período ninfal com lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro e quarto instar alimentadas com folhas de algodão Bt (Bt) e algodão não Bt (NBt).

Parâmetro	n	NBt	Bt	t-estatística <sup>P(1)</sup>
THC ( $\mu\text{L}$ ) <sup>(2)</sup>	10	$3,0 \times 10^3 \pm 0,28$	$3,8 \times 10^3 \pm 0,48$	-1,71 <sup>0,1042</sup>
Óxido Nítrico ( $\mu\text{mol}$ )	10	$23,7 \pm 5,70$	$24,3 \pm 5,09$	0,25 <sup>0,8056</sup>
Proteína Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	10	$2,2 \pm 0,91$	$2,0 \pm 1,40$	-0,73 <sup>0,4737</sup>
Fenoloxidase (OD/min)	10	$0,12 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,03$	-0,05 <sup>0,9574</sup>

<sup>(1)</sup> Valor de *P* do teste *t*; <sup>(2)</sup> THC – Contagem total de hemócitos.

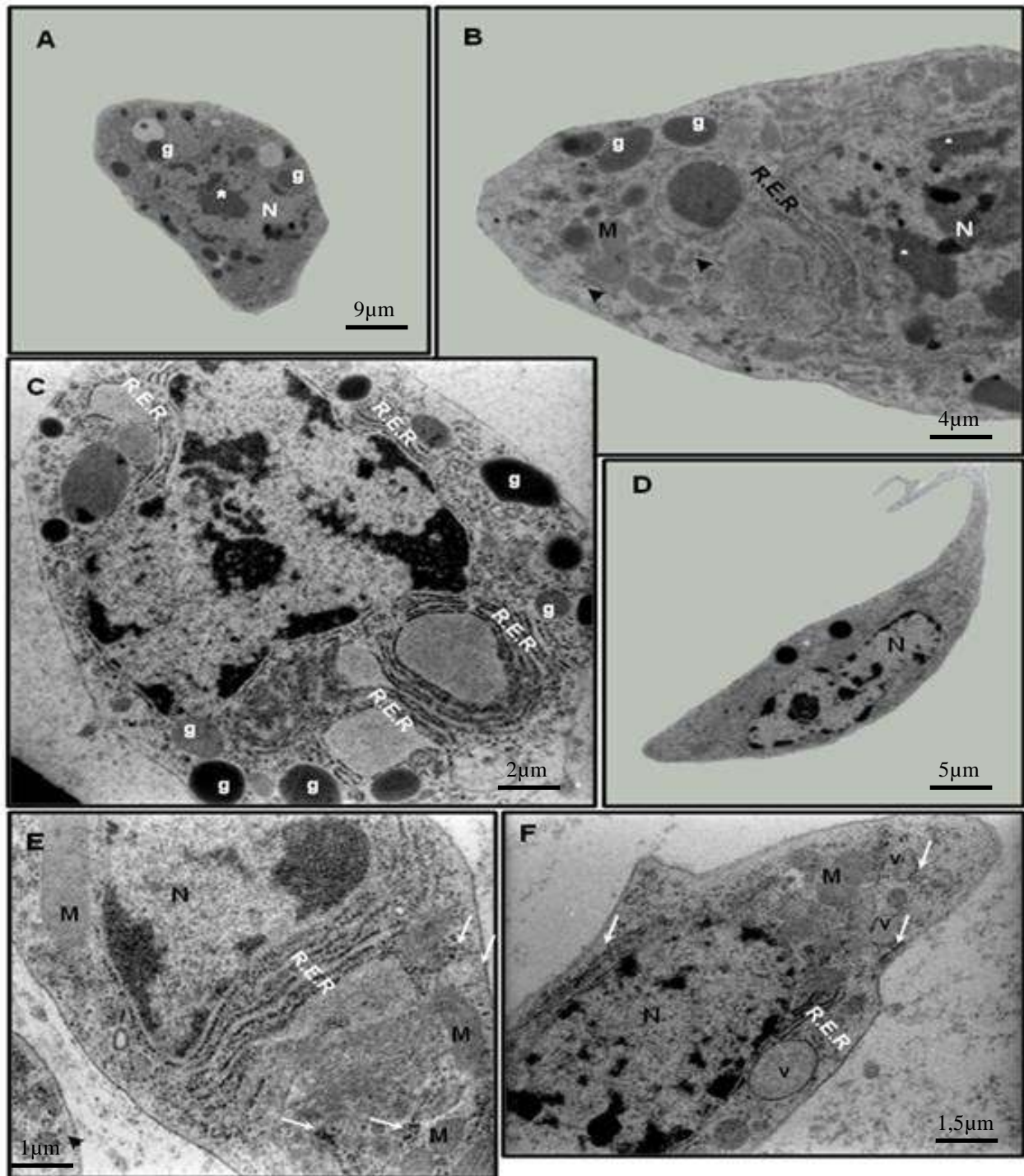


Figura 1. Ultraestrutura dos hemócitos de adultos de *Podisus nigrispinus*. Em (A e B) granulócito; (C) granulócito do tratamento com Bt, (D-E) plasmatócito e (F) plasmatócito do tratamento com Bt. Núcleo (N), nucléolo (\*), retículo endoplasmático rugoso (R.E.R.), grânulos (g), mitocôndria (M), vesículas (v) e ribossomos livres (seta).

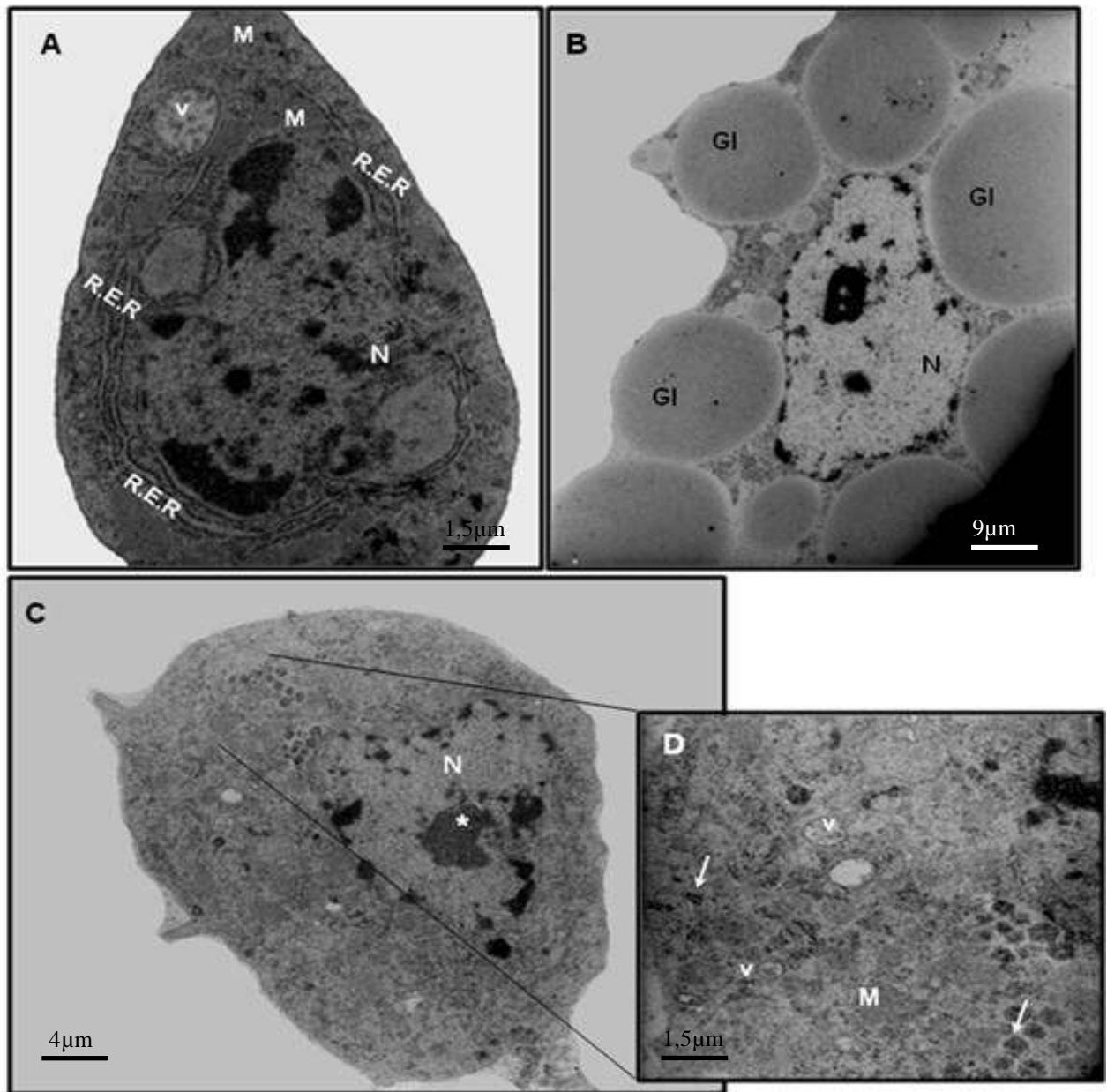


Figura 2. Ultraestrutura dos hemócitos de adultos de *Podisus nigrispinus*. Em (A) prohemócito; (B) adipohemócito; (C-D) oenocitóide. Núcleo (N), nucléolo (\*), mitocôndria (M), retículo endoplasmático rugoso (R.E.R), vesícula (v), gotículas lipídicas (GI) e ribossomos livres (setas).