

RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E MECÂNICAS EM POPULAÇÃO SUSCETÍVEL E
RESISTENTE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A
FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley-Teixeira)

RESUMO

A resistência de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) pode ser atribuída a vários mecanismos como alterações nos receptores de membrana celular no mesêntero e a resposta imune às toxinas do *Bacillus thuringiensis* Berliner. A pesquisa testou as hipóteses de que após exposição a formulações Bt: população suscetível (PS) e população resistente (PR) da traça apresentam alterações quantitativas e qualitativas diferenciadas dos hemócitos e dos níveis de óxido nítrico na hemolinfa, alterações histopatológicas e histoquímicas diferenciadas no mesêntero e de que PR apresenta capacidade de recuperação do mesêntero. PS e PR expostas ao Dipel[®] 1,35 mg/L (PS), 64,93mg/L (PR); XenTari[®] 5,17 mg/L (PS), 236,24 mg/L (PR), além da testemunha, tiveram hemolinfa coletada nos intervalos de 1, 6 e 12 h para contagem total e diferencial dos hemócitos e quantificação de óxido nítrico. O mesêntero foi coletado nos intervalos: 0, 1, 6 e 12 h. A quantificação das células regenerativas foi efetuada através do programa ImageLab 2000. Apesar de PR ter apresentado menor número de hemócitos, exibiu maior quantidade de plasmatócitos, prohemócitos e esferulócitos, podendo isto estar relacionado à resistência. Dipel[®] foi efetivo na redução do número total de hemócitos das PS e PR, enquanto que o XenTari[®] alterou significativamente a contagem diferencial. O óxido nítrico aumentou em

ambas as populações, não diferindo entre os inseticidas, indicando a não participação deste na resistência. Os inseticidas ocasionaram alterações, de intensidades diferentes, no mesêntero das PS e PR, Dipel[®] mostrou ser mais agressivo independente da população, levando a degeneração do epitélio. A presença de esferites revestindo a lâmina epitelial, a hipertrofia das células colunares e a riqueza de muco podem estar envolvidas na preservação do mesêntero em larvas da população resistente, porém essas características não foram suficientes para impedir a degeneração do epitélio ou induzir a hiperplasia das células regenerativas.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-crucíferas, inseticida biológico, nitric oxide, hemócitos, histopatologia, morfologia.

IMMUNOLOGICALS AND MECANICALS RESPONSES IN SUSCEPTIBLE AND
RESISTANT POPULATION OF *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)
STAND UP TO COMMERCIALS FORMULATIONS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER

by

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

(Under the direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira)

ABSTRACT

The resistance of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) has been attributed to many mechanisms as alterations in cell membrane receptors on midgut and the immune response to *Bacillus thuringiensis* Berliner toxin. The research tested the possibility that after expositions to Bt formulations, insects from a susceptible population (SP) and a resistant population (RP) presented qualitative and quantitative differentiated alterations of hemocytes and nitric oxide levels in hemolymph, histopathological and histochemical differenced alterations in midgut and that RP presented capacity of recovery midgut. SP and RP were exposed to Dipel[®] 1,35 mg/L (SP), 64,93mg/L (RP); XenTari[®] 5,17 mg/L (SP), 236,24 mg/L (RP) plus witness had hemolymph collected in intervals of 1, 6 and 12 h for total and differential counting of hemocytes and quantification of nitric oxide. The midgut was collected in the intervals: 0, 1, 6, 12 h. The regenerative cells quantification was made through the ImageLab 2000 program. In spite of RP had showed less number of hemocytes, it exhibited greater quantity of plasmatocytes, prohemocytes and spherulocytes, this can be related to resistance. Dipel[®] was effective in reduction of total numbers of hemocytes of SP and RP, while XenTari[®] changed significantly the

differential counting. The nitric oxide increased in both populations and it not differed between the insecticides, indicating the no participation of it in the resistance. The insecticides induced alterations in different intensities on midgut in SP and RP, Dipel[®] showed to be more aggressive independently of population, taking to degeneration of epithelium. The presence of spherites covering the epithelial lamina, the hypertrophy of columnar cells and mucus abundance can be involved in midgut preservation in larvae of resistant population, however these features were not sufficient to avoid the degeneration of epithelium or induce the hyperplasia of regenerative cells.

KEY WORDS: Diamondback moth, biological insecticide, nitric oxide, hemocytes, histopathology, morphology.

RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E MECÂNICAS EM POPULAÇÃO SUSCETÍVEL E
RESISTENTE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A
FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

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

RECIFE - PE

Fevereiro – 2010

RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E MECÂNICAS EM POPULAÇÃO SUSCETÍVEL E
RESISTENTE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A
FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E MECÂNICAS EM POPULAÇÃO SUSCETÍVEL E
RESISTENTE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A
FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

LÍLIAN MARIA DA SOLIDADE RIBEIRO

Orientador: _____
Valéria Wanderley-Teixeira - UFRPE

Examinadores: _____
Maria Helena Neves Lobo Silva Filha – FIOCRUZ

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Aos meus pais, Terezinha e Luiz, por quem tenho
grande amor, respeito e carinho e
a todos que
amo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve e está ao meu lado concedendo-me força para superar os obstáculos.

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

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amados pais Terezinha Rocha Ribeiro e Luiz Carlos Ribeiro pelo esforço contínuo para sempre me oferecer o melhor e pelos seus maravilhosos ensinamentos.

Aos amigos conquistados durante o curso, poucos, porém verdadeiros, cuja relação vai além da conveniência e da superficialidade. Em especial, agradeço a Vando Rondelli, Ricardo Lopes, Jefferson Ellias, Andresa Cristina e Tadeu Martins, saibam que moram no meu coração, num cantinho muito especial. Obrigada pelos conselhos, apoio e paciência.

Aos colegas de laboratório Mateus Ribeiro, Maria Júlia, Diogo Galindo, Paulo Estevão, Ismaela Maria, Hilda Michelly, Alicely Correia, Thiago Alves, Vanessa Feitosa e Glaucilane dos Santos pelos momentos de descontração e pelo apoio.

Às amadas irmãs (Biopoderosas) que Deus me permitiu escolher: Ana Cláudia Carvalho, Carolina Ribeiro, Renata Janaína Carvalho e Vanessa de Castro (sempre em ordem alfabética); Em especial, a Ana Cláudia Carvalho que muito me ajudou em vários momentos e pelo grande exemplo que tem sido para mim, a cada dia que se passa aprendo a admirá-la mais.

A Franklin Magliano, pessoa maravilhosa, iluminada, que também muito me ajudou e tanto admiro.

À Ana Janáina pelo amparo prestado nos momentos de dificuldade e pelos bons conselhos.

A minha orientadora Valéria Wanderley Teixeira por ser uma pessoa tão especial e por ter me presenteado com a oportunidade de trabalhar com o que tanto me identifico.

Ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pela disponibilidade em ajudar e pela amizade estabelecida.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pela paciência e assistência prestada.

Ao professor Jorge Braz Torres pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, que me ajudaram no cumprimento de mais uma etapa profissional da minha vida. Em particular ao professor José Vargas de Oliveira que tanto admiro e considero.

Ao professor Valdemiro Amaro da Silva Junior da UFRPE por ter permitido a utilização das instalações Laboratório de Patologia Veterinária para confecção das lâminas do material processado em historesina.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e me apoiaram de alguma forma, cujos nomes não foram citados.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	04
2 ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE POPULAÇÕES RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER	08
RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	19
AGRADECIMENTOS.....	23
LITERATURA CITADA.....	23
2 HISTOPATOLOGIA DO MESÊNTERO DE POPULAÇÕES RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE <i>Plutella xylostella</i> (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> BERLINER	37

RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	47
AGRADECIMENTOS.....	50
LITERATURA CITADA.....	51

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O microlepidóptero, *Plutella xylostella* (L.), vulgarmente conhecida como traça-das-crucíferas, é considerada a principal praga das plantas da família Brassicaceae no Brasil e no mundo. As injúrias causadas por esse inseto, além de provocar a depreciação do produto, podem acarretar perda total da lavoura, inviabilizando a produção (Castelo Branco & Gatehouse 2001). As injúrias são ocasionadas pelas larvas, pois se alimentam inicialmente do parênquima foliar e posteriormente da epiderme da parte inferior das folhas, resultando em perfurações que inutilizam o produto para a comercialização (Imenes *et al.* 2002).

Dentre as diferentes técnicas de redução populacional de *P. xylostella*, o controle químico tradicional é o mais empregado. Embora os danos causados pela praga justifiquem a adoção dessa medida de controle, seu uso traz riscos de intoxicação para os produtores, animais domésticos e selvagens, contaminação ambiental, danos aos inimigos naturais, podendo ainda deixar resíduos nos alimentos que geralmente são consumidos in natura ou com pouco preparo. O uso contínuo e desordenado de inseticidas também tem resultado na seleção de populações resistentes de *P. xylostella* (Castelo Branco & Medeiros 2001, Castelo Branco & Amaral 2002, Medeiros *et al.* 2005).

Como alternativa ao controle químico, o uso de bactérias entomopatogênicas, a exemplo de *Bacillus thuringiensis* Berliner, surgiu como uma importante ferramenta para o controle da traça-das-crucíferas, uma vez que seu uso oferece diversas vantagens diante dos produtos químicos clássicos: efeito não poluente ao meio ambiente, inocuidade aos mamíferos e aos outros

vertebrados, ausência de toxicidade para as plantas e especificidade para o inseto alvo (Cárdenas *et al.* 2001, Hererro *et al.* 2001a, Siegel *et al.* 2001).

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada em diversos substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados, sintetizando, durante a fase de esporulação, inclusões protéicas que se acumulam na periferia dos esporos sob a forma de cristais. Estes são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de delta-endotoxinas ou “Insecticidal Crystal Proteins” (ICPs), apresentando ação extremamente tóxica a insetos das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera.(Estela *et al.* 2004, Medeiros *et al.* 2005, Bravo *et al.* 2007).

As proteínas Cry são sintetizadas sob a forma de protoxinas, necessitando ser ativadas para desempenhar seus efeitos tóxicos. Ao serem ingeridos pelos insetos suscetíveis, os cristais sofrem ação do pH intestinal, sendo solubilizados e em seguida processados por proteases específicas. Os produtos resultantes desses processos ligam-se irreversivelmente a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células epiteliais do intestino médio (mesêntero), causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana, ruptura da integridade intestinal e conseqüente morte do inseto (Copping & Menn 2000, Herrero *et al.* 2001b, Oestergaard *et al.* 2007).

Apesar da eficiência do *B. thuringiensis* ser comprovada para diversas pragas de diferentes Ordens, tem sido relatada a seleção de populações resistentes de *P. xylostella* a esta bactéria em várias partes do mundo, cuja resistência foi observada por Tabashnik (1990), Zhao *et al.* (1993), Perez & Shelton (1997) e Wright *et al.* (1997) em populações dos USA (Flórida, Havaí e Nova Iorque), América Central (Costa Rica, Guatemala, Honduras e Nicarágua) e Ásia (Japão, Malásia). No Brasil, Castelo Branco *et al.* (2003) observaram resistência desta praga em

populações provenientes de ambientes onde é comum o uso de *B. thuringiensis* e onde não se usava o entomopatógeno como bioinseticida.

A resistência da traça-das-crucíferas ao *B. thuringiensis* pode ser atribuída a alterações nos receptores de membrana localizados nas células do mesêntero, ocasionando perda ou redução na ligação da toxina ao receptor, e conseqüente perda da eficiência do inseticida (Ferré & Van Rie 2002, Sayyed *et al.* 2004). No entanto, outros mecanismos ou combinação de mecanismos também podem reduzir a toxicidade do Bt, tais como mudanças no processamento proteolítico das protoxinas, mudanças de pH no lúmen do mesêntero (Ma *et al.* 2005a) e recuperação das células do intestino após exposição às toxinas (Loeb *et al.* 2001). Ao estudar insetos suscetíveis e resistentes de *Helicoperva armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), Ma *et al.* (2005b) propôs um mecanismo de resistência baseado em elevada resposta imune, envolvendo aumento da melanização e reações de coagulação que impediriam a solubilização das toxinas Bt.

O sistema imunológico dos insetos é composto por barreiras estruturais e por respostas ativas contra elementos estranhos. As barreiras estruturais compreendem o rígido exoesqueleto, o sistema digestivo e o sistema respiratório que constituem a primeira linha de defesa dos insetos (Lavine & Strand 2002, Schmid-Hempel 2005). Quando essas barreiras estruturais são rompidas, os agentes estranhos atingem a hemocele desencadeando complexos e interconectados mecanismos celulares e humorais.

As defesas celulares são mediadas por células livres circulantes na hemolinfa, os hemócitos, e referem-se a respostas imunes como fagocitose, nodulação, encapsulação e citotoxicidade (Schmid-Hempel 2005), sendo o sucesso da defesa dependente do número e dos tipos de hemócitos envolvidos nesses mecanismos (Russo *et al.* 2001).

A resposta humoral consiste da síntese de uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos, ativação de uma complexa cascata proteolítica que leva à coagulação e

melanização da hemolinfa, bem como reações intermediárias de oxigênio e nitrogênio (Bogdan *et al.* 2000, Vass & Nappi 2001, Lavine & Strand 2002).

Diante da dificuldade de controle do inseto em questão, das vantagens inerentes ao uso de *B. thuringiensis*, do surgimento de populações resistentes ao Bt, a presente pesquisa objetivou testar hipóteses que possam estar relacionadas a essa resistência tais como: o envolvimento de outras células epiteliais do mesêntero, a hiperplasia das células intestinais, a capacidade de recuperação do mesêntero em insetos resistentes, alterações histoquímicas, bem como modificações nas respostas imunológicas celular e humoral de *P. xylostella*, frente a formulações comerciais a base de *B. thuringiensis*.

Literatura Citada

- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423–435.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff & A. Diefenbach. 2000.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76.
- Cárdenas M.I., L. Galán-Wong, J. Ferré-Manzanero & B. Pereyra-Alferez. 2001.** Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. *Ciencia Uanl.* 4: 51-62.
- Castelo Branco, M. & P.S.T. Amaral. 2002.** Inseticidas para controle da traça-das-crucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal? *Hortic. Bras.* 20: 410-415.
- Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.** Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.

- Castelo Branco, M. & A.G. Gatehouse. 2001.** A survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 30: 327-332.
- Castelo Branco, M. & M.A. Medeiros. 2001.** Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traças-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 36: 7-13.
- Copping, L.G. & J.J. Menn. 2000.** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manage. Sci.* 56: 651–676.
- 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.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Herrero, S.S., B. Oppert & J. Ferré. 2001a.** Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- Herrero, S., J. González-Cabrera, B. Tabashnik, & J. Ferré. 2001b.** Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5729–5734.
- Imenes, S.D.I., T.B. campos, S.M. Rodrigues Neto & E.C. Bergman. 2002.** Avaliação da atratividade de feromônio sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. *Arq. Inst. Biol.* 69: 81-84.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.

- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakin, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599-606.
- Ma, G., M. Sarjan, C. Preston, S. Asgari & O. Schmidt. 2005a.** Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. *Insect. Sci.* 12: 319-330.
- Ma, G., H. Roberts, M. Sarjan, N. Featherstone, J. Lahnstein, R. Akhurst & O. Schmidt. 2005b.** 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.
- Medeiros, P.T., M.N. Ferreira, E.S. Martins, A.C.M.M. Gomes, R. Falcão, J.M.C.S Dias & Monnerat, R.G. 2005.** Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-dascrucíferas *Plutella xylostella*. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 1145-1148.
- 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.
- Perez, C.J. & A.M. Shelton. 1997.** Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.* 90: 87-93.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. Melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47: 167-172.
- Sayed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004.** Genetic and biochemical characterization of field evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in Diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010-7017.

Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. J. Invert. Pathol. 77: 13-21.

Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50: 529-551.

Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson, & M.W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83:1671-1676.

Vass, E. & A.J. Nappi. 2001. Fruit fly immunity. BioEssays 51: 529-535.

Wright, D.J., M. Iqbal, F.Granero & J. Ferré. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1814-1819.

Zhao, J.Z., G.R. Zhu, Z.L. Zhu & W.Z. Wang. 1993. Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in china. Res. Pest Manage. 5: 11-12.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE COMPARATIVA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE POPULAÇÕES RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

LÍLIAN M.S. RIBEIRO¹, HERBERT A.A. SIQUEIRA¹, FRANKLIN M. CUNHA¹, VALÉRIA WANDERLEY-
TEIXEIRA² E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

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

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

Ribeiro, L.M.S., H.A.A. Siqueira, F.M. Cunha, V. Wanderley-Teixeira & A.A.C. Teixeira. Análise comparativa da resposta imunológica de populações resistente e suscetível de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner. A ser submetido a Neotropical Entomology.

RESUMO – Apesar da eficiência do *Bacillus thuringiensis* Berliner ser comprovada, a seleção de populações resistentes de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a essa bactéria tem sido relatada em todo o mundo. Estudos têm proposto um mecanismo de resistência baseado na resposta imune às toxinas Bt. Assim, testamos as hipóteses de que alterações quantitativas e qualitativas nos hemócitos de larvas de *P. xylostella*, bem como modificações nos níveis de óxido nítrico na hemolinfa dos insetos tratados com formulações Bt, possam estar relacionadas a resistência. Utilizou-se uma população suscetível (PS) e outra resistente (PR) da traça ao Dipel[®] e XenTari[®]. Insetos expostos às seguintes concentrações: Dipel[®] 1,35 mg/L (PS), 64,93 mg/L (PR); XenTari[®] 5,17 mg/L (PS), 236,24 mg/L (PR) além da testemunha, tiveram sua hemolinfa coletada nos intervalos de 1, 6 e 12 h para contagem total e diferencial dos hemócitos e quantificação da produção de óxido nítrico. Apesar de PR ter apresentado menor número de hemócitos, exibiu maior quantidade de plasmatócitos, prohemócitos e esferulócitos, fato que pode estar relacionado à resistência devido à função desempenhada por estes tipos celulares no processo de defesa. A resposta imune celular independente da suscetibilidade sofreu influência dos inseticidas, sendo o Dipel[®] efetivo na redução do número total de hemócitos de insetos PS e PR, enquanto que o XenTari[®] alterou de forma significativa a contagem diferencial dessas células. O óxido nítrico aumentou em ambas as populações, não diferindo entre os inseticidas utilizados, indicando a não participação desta molécula na resistência da praga.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-crucíferas, Dipel, Xentari, hemócitos, óxido nítrico

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF *Plutella xylostella* (L.)
(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) RESISTANT AND SUSCEPTIBLE POPULATIONS
STAND UP TO COMERCIAL FORMULATIONS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER

ABSTRACT – Despite the efficiency of *Bacillus thuringiensis* Berliner has been proved, the selection of resistant population of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to this bacterium has been reported worldwide. Studies have been proposed a mechanism of resistance based on the immune response to Bt toxins. Therefore we tested the hypothesis that the quantitative and qualitative alterations in hemocytes of *P. xylostella* larvae, as well modifications in nitric oxide levels in hemolymph of insects treated with Bt formulations, could be related to mechanism of resistance. It were used a susceptible population (SP) and other resistant (RP) of the moth to Dipel[®] e XenTari[®]. Insects were exposed to the following concentrations: Dipel[®] 1,35 mg/L (SP), 64,93 mg/L (RP); XenTari[®] 5,17 mg/L (SP), 236,24 mg/L (RP), besides a untreated group and hemolymph was collected in intervals of 1, 6 and 12 h to total and differential counting of hemocytes, and quantification of nitric oxide production. Despite RP showed less number of hemocytes, it exhibited greater quantity of plasmatocytes, prohemocytes and spherulocytes, and this fact can be related to the resistance due the function played for these cells types in defense process. The cell immune response independently of the susceptibility status suffer the influence of insecticides. Dipel[®] was effective in reduction of total numbers of hemocytes of SP and RP insects, while XenTari[®] changed significantly the differential counting. The nitric oxide increased in both populations and it not differed between the used insecticides, indicating the no participation of this molecule in the resistance.

KEY WORDS: Diamondback moth, Dipel, Xentari, hemocytes, nitric oxide

Introdução

Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), também conhecida como traça-das-crucíferas, é considerada a principal praga das plantas da família Brassicaceae acarretando enorme gasto em compostos químicos ou biológicos para seu controle (Talekar & Shelton 1993). O manejo desse inseto é dificultado pela facilidade com que evolui para a resistência, sendo mencionado como o lepidóptero que se tornou resistente à maior quantidade de princípios ativos diferentes, mais de 51 ingredientes ativos (Vasquez 1995), incluindo a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Tabashnik *et al.* 1990, Castelo Branco *et al.* 2003).

Vários mecanismos de resistência dos insetos a *B. thuringiensis* têm sido propostos (Ferré & Van Rie 2002). O mais conhecido envolve mudanças nos receptores de ligação da toxina das células colunares do intestino médio como relatado em linhagens resistentes de *P. xylostella* (Ferré & Van Rie 2002, Sayyed *et al.* 2004). No entanto, baixa ativação ou alta degradação das protoxinas (Forcada *et al.* 1996), a ativação proteolítica diferenciada destas (Lightwood *et al.* 2000), seu sequestro por proteases (Milne *et al.* 1995) e elevada resposta imune, envolvendo aumento da melanização e reações de coagulação que impediriam a solubilização das toxinas Bt. (Ma *et al.* 2005) também têm sido descritos como potenciais mecanismos alternativos de resistência às toxinas de *B. thuringiensis*.

Sabe-se que os insetos possuem um sistema imunológico inato que tem revelado ser altamente adaptado e efetivo contra várias espécies microbianas em concentrações potencialmente fatais a vertebrados (Kavanagh & Reeves 2004). A imunidade inata dos insetos é mediada por componentes celulares e humorais (Ribeiro & Brehélin 2006).

As reações celulares são executadas pelos hemócitos e envolvem os processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulação. A variação no número e na proporção dos diversos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa constitui um dos parâmetros de grande

relevância a ser considerado em um quadro infeccioso. Em resposta a presença de patógenos, tais variações decorrem da produção elevada de alguns tipos celulares e da imobilização de hemócitos em nódulos e cápsulas ao redor dos organismos invasores (Silva 2002, Lavine & Strand 2002).

A defesa humoral é representada pela ação de peptídeos antimicrobianos, por uma complexa cascata enzimática que regula a coagulação ou melanização da hemolinfa (Lavine & Strand 2002), por mecanismos oxigênio-dependentes que incluem a síntese de lisozima, enzimas proteolíticas e hidrolíticas e pela geração de compostos intermediários reativos do nitrogênio e do oxigênio (Nappi *et al.* 1995, Meister *et al.* 1997, Whitten *et al.* 2001).

O óxido nítrico (NO) tem sido apontado como molécula citotóxica, capaz de destruir células tumorais e patógenos e como molécula sinalizadora em diversos processos fisiológicos nos vertebrados (Dowling & Simmons 2009). Em invertebrados, muitos estudos têm relacionado a produção de NO com os efeitos citotóxicos contra patógenos (Nappi & Ottaviani 2000, Gourdon *et al.* 2001, Foley & O' Farel 2003), sendo o aumento da sua produção pelos hemócitos correlacionado com a resposta contra agentes estranhos (Faraldo *et al.* 2005).

Diante da existência de diferentes mecanismos de resistência a *B. thuringiensis* e devido à facilidade com que *P. xylostella* evoluiu para a resistência, esta pesquisa testou as hipóteses de que alterações quantitativas e qualitativas nos hemócitos de larvas de *P. xylostella*, bem como modificações nos níveis de óxido nítrico produzido na hemolinfa dos insetos tratados com formulações a base de *B. thuringiensis*, possam estar relacionadas à resistência desse inseto.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Interação Insetos-Tóxicos e Controle Biológico e Ecologia de Insetos, ambos pertencentes ao Departamento de Agronomia, e no

Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e manutenção dos insetos. Foram utilizadas duas populações de *P. xylostella*: uma suscetível e outra resistente às formulações comerciais Dipel[®] (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) e XenTari[®] (*B. thuringiensis* var. *aizawai* ATTC SD-1372, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D) obtidas de coletas realizadas em cultivos de brássicas nos municípios de Recife-PE (população suscetível) e Camocim de São Félix-PE (população resistente). As duas populações foram mantidas individualmente no Laboratório de Interações Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), alimentadas com folhas de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* sem contato com inseticidas. A população de Recife- PE tem sido mantida desde 1998 em condições de laboratório, enquanto que a população de Camocim de São Félix-PE foi coletada durante a realização do experimento em área com relato de dificuldade de controle e aplicação dos inseticidas Dipel[®] e XenTari[®]. Os insetos coletados em Camocim de São Félix-PE foram levados para o laboratório onde foram multiplicados e utilizados na F-1 para realização dos testes de suscetibilidade e para coleta da hemolinfa.

Ensaio de suscetibilidade. Curvas de concentração-resposta foram estabelecidas para os inseticidas Dipel[®] e XenTari[®] com as duas populações através de bioensaios para verificação da suscetibilidade/resistência e obtenção das concentrações a serem utilizadas nos experimentos subsequentes. Para a realização dos bioensaios, discos de folhas de couve de 5 cm de diâmetro foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 5%, enxaguados em água corrente e tratados com concentrações crescentes dos inseticidas. Após secagem a temperatura ambiente, os discos foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm), contendo papel de filtro (5 cm) umedecido

com água destilada. Foram utilizadas sete concentrações de cada inseticida em água destilada com o espalhante adesivo Triton X-100 a 0,01%, sendo cada concentração testada em triplicada. As concentrações utilizadas para a população suscetível foram 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L (Dipel[®]) e 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L (XenTari[®]). Para a população resistente as concentrações utilizadas foram 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mg/L (Dipel[®]) e 50; 100; 200; 400; 600; 800 e 1000 mg/L (XenTari[®]). A testemunha contou de folhas tratadas em água destilada com Triton X-100 na mesma concentração. Para cada placa foram transferidas 10 larvas de segundo ínstar, em seguida estas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h onde permaneceram por 72 h. Após este intervalo de tempo a mortalidade foi avaliada e os dados submetidos à análise de Probit utilizando o programa POLO-PC (LeOra Software 1987). Os valores de CL_{50} foram estimados e a razão de resistência entre as populações foi obtida dividindo-se a CL_{50} da população resistente pela CL_{50} da população suscetível para ambos inseticidas.

Caracterização, contagem total e diferencial dos hemócitos. Foram realizadas coletas de hemolinfa de insetos no quarto ínstar larval, submetidos aos seguintes tratamentos com as CL_{50} s estimadas através dos ensaios de suscetibilidade: larvas alimentadas com folhas de couve tratadas com Dipel[®], XenTari[®], além da testemunha (água destilada contendo o espalhante adesivo Triton X-100 a 0,01%) de ambas as populações. Discos de folhas de 7 cm de diâmetro foram imersos por 30 segundos no inseticida a ser utilizado e após secagem à temperatura ambiente foram postos em placas de Petri (80 x 15 mm) sobre papel de filtro (7 cm) levemente umedecido com água destilada. As coletas foram realizadas nos intervalos de 1, 6 e 12 h após os tratamentos. Para contagem total de hemócitos realizou-se uma pequena incisão entre as falsas pernas dos insetos e uma alíquota de 0,5 µL de hemolinfa de duas larvas (total de 1 µL) foi diluída em 9 µL de solução anticoagulante II para insetos (Mead 1986). O material coletado foi depositado em

câmara de Neubauer e a contagem realizada mediante observação em microscópio óptico de luz OLYMPUS® BX-49. A contagem diferencial foi feita por meio da técnica de perfusão, descrita em Brayner *et al.* (2005). Com um capilar de vidro foi injetada solução anticoagulante para insetos no corpo de larvas com posterior sucção da hemolinfa. Esta foi, então, depositada em lâminas de vidro, sendo confeccionadas 10 lâminas, constituindo 10 repetições para cada intervalo de tempo/tratamento, contendo hemolinfa de 10 insetos cada. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico de luz da marca OLYMPUS® BX-49. A caracterização dos hemócitos foi realizada em lâminas confeccionadas com a hemolinfa das larvas da testemunha. Para análise da dinâmica hemocitária e verificação de possíveis alterações morfológicas nos tipos celulares, foram observadas e contadas 300 células (Falleiros *et al.* 2003) por lâmina de todos os tratamentos. Os dados das contagens total e diferencial foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 3 x 2 x 3, considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel® e XenTari®), as duas populações e os três intervalos de avaliação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade e, quando necessário, comparadas através do teste t. Após teste de normalidade, os dados da contagem total foram transformados para $\log(x + 1)$, enquanto que os da contagem diferencial foram transformados em raiz $(x + 0,5)$, apenas para análise dos prohemócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 1999-2001).

Análise dos níveis de óxido nítrico na hemolinfa. A produção de óxido nítrico foi determinada com base no reagente de Griess (Green *et al.* 1981), conforme metodologia descrita em Faraldo *et al.* (2005). Foram realizadas comparações das concentrações do íon nitrito (NO_2^-) nas amostras de hemolinfa coletadas nos intervalos de 1, 6, 12 h após tratamento com as formulações de *B. thuringiensis*. Cada amostra constou da coleta de hemolinfa de dez insetos de quarto ínstar,

totalizando 5 μL , os quais foram depositados em tubo Eppendorf contendo 55 μL de sulfanilamida (1%) em H_3PO_4 (5%). Após coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Para determinar as concentrações de NO_2^- , uma alíquota de 30 μL de cada amostra/intervalo/tratamento (cinco amostras no total) foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços contendo 30 μL de naphthylenediamine dihydrochloride (NEED, Sigma, St. Louis, MO). Após cinco minutos, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas (Biotek®) com filtro de 562 nm. O NO_2^- foi quantificado usando uma curva padrão de NaNO_2 como referência. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 3 x 2 x 3, considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel® e XenTari®), as duas populações e os três intervalos de avaliação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade e quando necessário comparadas através do teste t. Após teste de normalidade, os dados foram transformados em raiz ($x + 0,5$), utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados

As $\text{CL}_{50\text{s}}$ estimadas para a população de Recife-PE foram de 1,3 mg/L para Dipel® e 5,1 mg/L para XenTari®, sendo esta população considerada como suscetível por apresentar valores de CL_{50} inferiores quando comparada com a população de Camocim de São Félix-PE, cujos valores obtidos foram de 64,9 mg/L e 236,2 mg/L, para Dipel® e XenTari® respectivamente. Pelo cálculo da razão de resistência, a população de Camocim de São Félix-PE apresentou 49,9 vezes mais resistente ao Dipel® e 46,3 vezes mais resistente ao XenTari® (Tabela 1).

Na contagem total de hemócitos circulantes na hemolinfa de larvas do quarto ínstar de *P. xylostella*, verificou-se que o número total dessas células na população resistente foi significativamente menor em comparação com a população suscetível. Os insetos de ambas as

populações apresentaram redução significativa no número total de hemócitos após exposição ao Dipel[®], não sendo detectada variação significativa no número de hemócitos dos insetos submetidos ao XenTari[®] (Fig. 1). Não foram verificadas diferenças entre os intervalos de tempo analisados ($F = 2,57$, $P = 0,0795$).

A análise morfológica revelou a existência de seis tipos celulares na hemolinfa de *P. xylostella*: plasmatócitos, granulócitos, prohemócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides (Fig. 2). Não foram observadas alterações morfológicas nesses tipos celulares decorrentes dos tratamentos com Dipel[®] e XenTari[®], tanto nos insetos suscetíveis quanto nos resistentes.

Os tipos celulares mais abundantes na hemolinfa de *P. xylostella* na população resistente foram os plasmatócitos e os granulócitos com percentuais de 84,01% e 9,2% respectivamente, seguidos dos esferulócitos (3,03%), oenocitóides (2,4%), adipohemócitos (0,76%) e prohemócitos (0,6%). Na população suscetível também os plasmatócitos e os granulócitos foram os tipos celulares mais frequentes com percentuais de 81,53% e 12,86%, respectivamente. As outras células apresentaram os seguintes percentuais: oenocitóides (2,21%), adipohemócitos (1,8%), esferulócitos (0,98%) e prohemócitos (0,62%).

Diferenças significativas na quantidade dos tipos celulares foram verificadas entre as populações, pois insetos resistentes apresentaram maior quantidade de plasmatócitos, prohemócitos e esferulócitos que os insetos suscetíveis, enquanto que estes exibiram maior número de granulócitos e adipohemócitos. Os oenocitóides foram as únicas células que não diferiram significativamente em quantidade entre as populações ($F = 0,01$, $P = 0,9030$) (Fig. 3).

A análise de variância mostrou que plasmatócitos, granulócitos, prohemócitos e oenocitóides não apresentaram interação população x tratamento, sendo então os dados de ambas as populações agrupados para observação da variação quantitativa desses tipos celulares em

função da exposição aos inseticidas. Nos insetos tratados com XenTari[®], o número de plasmatócitos aumentou significativamente, enquanto que granulócitos, prohemócitos e oenocitóides sofreram redução acentuada em relação à testemunha. Com relação ao inseticida Dipel[®] verificaram-se apenas diferenças significativas dos oenocitóides em relação à testemunha (Fig. 4).

Os esferulócitos e adipohemócitos foram os únicos tipos celulares que variaram diferentemente entre as populações mediante tratamento com os inseticidas. O número de esferulócitos foi significativamente maior na testemunha e nos insetos tratados com XenTari[®] na população resistente em relação a população suscetível. Insetos suscetíveis apresentaram menor número dessas células quando tratados com XenTari[®] em relação a Dipel[®], embora não tenham diferido significativamente da testemunha, nos insetos resistentes, seu número foi significativamente menor nos insetos tratados com XenTari[®] em comparação com a testemunha (Fig. 5). Com relação aos adipohemócitos, a população suscetível apresentou quantidade significativamente maior dessas células na testemunha e nos insetos tratados com Dipel[®] que a população resistente. Nos insetos resistentes, o número dessas células não variou significativamente entre os tratamentos, enquanto que nos suscetíveis reduziram significativamente após tratamento com o XenTari[®] (Fig. 6).

Variações em função dos tempos de avaliação foram significativas apenas para os prohemócitos e adipohemócitos, os quais sofreram redução significativa no intervalo de 6 horas ($F = 3,18$, $P = 0,0440$ e $F = 3,55$, $P = 0,0307$, respectivamente). Analisando estatisticamente a interação entre os tratamentos e intervalo de tempo verificou-se, que apenas no intervalo de 1 h, houve redução acentuada dos adipohemócitos em relação à testemunha, sendo esta mais significativa para XenTari[®] ($F = 3,37$, $P = 0,0112$).

Os níveis de óxido nítrico não diferiram entre as populações ($F = 0,81$, $P = 0,4469$), desta forma os dados das duas populações foram agrupados para analisar os efeitos do tempo e dos tratamentos. A concentração de óxido nítrico aumentou nos insetos tratados com inseticidas em relação à testemunha, sendo mais elevada no intervalo de 12 h diferindo da testemunha em ambos os tratamentos (Tabela 2).

Discussão

De acordo com a análise morfológica, foram encontrados seis tipos celulares na hemolinfa de *P. xylostella* os quais seguiram o padrão morfológico descrito por outros autores para a Ordem Lepidoptera (Falleiros *et al.* 2003, Andrade *et al.* 2003, Negreiro *et al.* 2004, Correia *et al.* 2008). Tal achado além de contribuir para uma padronização dessas células serve de subsídio para estudos fisiológicos envolvendo o inseto em questão.

A comparação estatística do hemograma de populações suscetível e resistente de larvas do quarto instar de *P. xylostella* revelou que a população resistente apresentou significativamente menor número de hemócitos circulantes, fato este também observado por Ericsson *et al.* (2009), em linhagem resistente de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) ao Bt. Este achado sugere uma possível correlação entre a resistência e menor quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa, indicando assim, que o número de hemócitos não é um fator determinante que poderia contribuir com a resistência e que os tipos celulares e ou aumento da resposta humoral poderiam estar diretamente relacionados com este processo, visto que na presente pesquisa a contagem diferencial dos hemócitos nos insetos resistentes mostrou que os plasmatócitos, prohemócitos e esferulócitos são as células mais numerosas nos insetos resistentes, quando comparados com os insetos da população suscetível, sendo essas células envolvidas diretamente na resposta de defesa celular (Lavine & Strand 2002, Costa *et al.* 2005, Ling *et al.* 2005, Ling & Yu 2006).

Götz (1987) verificou que o número reduzido de hemócitos em larvas de *Chironomus* (Insecta: Diptera), foi compensado pela rápida e eficiente capacidade de melanização quando este inseto foi desafiado com elevado número de bactérias e de acordo com Ma *et al.* (2005) ao analisarem linhagens suscetível e resistente de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), verificaram que insetos resistentes apresentaram elevada resposta humoral, traduzida pela alta taxa de melanização no plasma e nos extratos intestinais em comparação com os suscetíveis quando expostos à toxina Cry 1Ac. Esses autores também detectaram a presença de uma glicoproteína solúvel na hemolinfa e no lúmen intestinal dos insetos resistentes com capacidade de se ligar a toxina ativada de *B. thuringiensis*, evitando sua interação com os receptores presentes no intestino.

Quando as larvas de *P. xylostella* de ambas as populações foram tratadas com os inseticidas houve redução significativa no número total de hemócitos em resposta apenas ao Dipel[®], mostrando dessa forma que as formulações a base de Bt podem interferir diferentemente na resposta imunológica independentemente da suscetibilidade ou não da praga. Essa redução pode ter sido em decorrência do aumento da atividade celular, pois de acordo com Dubovskiy *et al.* (2008) há um aumento da atividade fagocítica e da taxa de encapsulação em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) durante infecção ocasionada por doses subletais de *B. thuringiensis*. Mostafa *et al.* (2005) verificaram elevada formação de nódulos na hemocele de larvas de *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) alimentadas com trigo contendo *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Assim, o provável envolvimento dos hemócitos de *P. xylostella* nesses eventos justificaria a redução do número total dessas células na hemolinfa.

Embora o tratamento com XenTari[®] não tenha provocado modificação significativa no número total de hemócitos, ocasionou variação na quantidade dos tipos celulares presentes na hemolinfa de *P. xylostella* de ambas as populações. Enquanto o Dipel[®] foi efetivo apenas na

redução dos oenocitóides. As variações no número de plasmatócitos e granulócitos estão provavelmente relacionadas à função desses tipos celulares, os quais apresentam envolvimento direto com o processo de defesa celular através da fagocitose e da formação de nódulos (Lavine & Strand 2002). A redução dos granulócitos pode está relacionada ao envolvimento dessas células no processo inicial de nodulação, já que são as primeiras células ao entrarem em contato com o corpo estranho. De acordo com Dean *et al.* (2004) o processo de nodulação compreende os seguintes passos: reconhecimento e aderência dos granulócitos aos microrganismos invasores, degranulação dos granulócitos com conseqüente aglutinação dos microrganismos, recrutamento de plasmatócitos, difusão dos plasmatócitos em torno do nódulo em crescimento, formação do nódulo e finalmente sua remoção da circulação pela adesão a parede do corpo do inseto. O fato dos plasmatócitos só participarem dos estágios finais desse processo justificaria o seu aumento. O declínio de prohemócitos e aumento dos plasmatócitos sugerem que os prohemócitos, os quais são células indiferenciadas, tenham se diferenciado nesses tipos celulares, contribuindo assim para o seu aumento (Yamashita & Iwabuchi 2001, Jiravanichpaisal 2006). Este processo parece ocorrer mais intensamente nos insetos resistentes, já que apresentam maior quantidade de prohemócitos e plasmatócitos circulantes na hemolinfa, podendo isto contribuir de forma positiva na resposta celular desses insetos. Vale ressaltar que as diferentes repostas aos inseticidas podem estar relacionadas à composição destes uma vez que são compostos por diferentes toxinas Cry.

Uma vez que a formação de nódulos é geralmente acompanhada pelo processo de melanização e esta resulta de reações de oxidação catalisadas pela enzima fenoloxidase, a lise de oenocitóides para liberação dessa enzima explicaria a sua redução na hemolinfa. (Silva 2002, Lavine & Strand 2002). A diminuição no número de adipohemócitos verificada nos insetos suscetíveis tratados com XenTari poderia estar relacionada ao gasto das reservas energéticas destas células para reparação dos danos ocasionados pelas toxinas Cry no intestino das larvas

(Hillyer & Christensen 2002). Já o declínio verificado no número de esferulócitos dos insetos resistentes tratados com XenTari[®] possivelmente é devido ao fato dessas células mediarem a produção e liberação de heteroaglutininas, atuantes na destruição de bactérias (Yeaton 1983). Caracteristicamente, insetos resistentes apresentaram maior quantidade de esferulócitos, sendo também o terceiro tipo celular mais freqüente na hemolinfa, o que atribuiria vantagem a esses insetos em relação aos suscetíveis dada a atuação deste tipo celular na defesa contra bactérias.

A produção de óxido nítrico não diferiu entre as populações, no entanto, os insetos tratados com os inseticidas apresentaram produção mais elevada em relação à testemunha no intervalo de 12 h, evidenciando o envolvimento desta molécula no processo imune de defesa de *P. xylostella*. O aumento na produção de óxido nítrico tem sido mencionado na literatura em insetos desafiados por patógenos e parasitóides, Nappi *et al.* (2000) detectaram aumento na produção de óxido nítrico durante processo de encapsulação em larvas de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) e *D. teissieri* (Diptera: Drosophilidae) em resposta a presença de ovos do parasitóide *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae). Faraldo *et al.* (2005) verificaram elevada produção desta molécula em *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) após inoculação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, verificando diferenças entre os diferentes períodos de avaliação, pois um pico na produção ocorreu com 24 horas, seguido por uma redução 48 horas após tratamento. Os autores atribuíram este fato a possível tentativa de controlar a proliferação do microrganismo na hemocele.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que larvas do quarto ínstar de populações resistente e suscetível de *P. xylostella* apresentaram resposta celular diferenciada aos inseticidas Bt, sendo o Dipel[®] efetivo na redução do número total de hemócitos, enquanto que o XenTari[®] alterou de forma significativa a contagem diferencial dessas células sem, no entanto, diferirem quanto a produção de óxido nítrico. Larvas da população resistente apresentaram menor número

total de hemócitos circulantes, porém contém quantidade elevada de plasmatócitos, prohemócitos e esferulócitos, o que pode ser um fator relacionado com a resistência da traça-das-crucíferas. Mediante o exposto, estudos complementares envolvendo outros mecanismos humorais tornam-se relevantes para averiguar o possível envolvimento na resistência de *P. xylostella*.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

Andrade, G.A., M.C.C. Negreiro, E.A. Gregório, F. Moscardi & A.M.F. Falleiros. 2003.

Hemocytes of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. *Acta Microsc.* 12: 59-63.

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.

Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.

Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.

Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, J.V. De Oliveira & J.B. Torres. 2008.

Dinâmica hemocitaria en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas con nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Bol. Sanidad Veg. Plagas* 34: 357-365.

- Costa, S.C.P., C. Ribeiro, P.A. Girard, R. Zumbihl & M. Brehélin. 2005.** Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. *J. Insect Physiol.* 51: 39–46.
- Dowling, D.K. & L.W. Simmons. 2009.** Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B.* 276: 1737-1745.
- Dean, P., U. Potter, E.H. Richards, J.P. Edwards, A.K. Charnley & S.E. Reynolds. 2004.** Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 20: 1027–1036.
- Dubovskiy, I.M., N.A. Krukova & V.V. Glupov. 2008.** Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 360–362.
- 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.
- 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. Sá-Nunes, E.A. Del Bel, L.H. Faccioli & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 13: 240-246.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Foley, E. & P.H. O'Farrel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Devel.* 17: 115-125.

- Forcada, C., E. Alcácer, M.D. Garcerá, A. Tato & R. Martínez. 1996.** Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 31: 257-272.
- Gourdon, I., M.C. Guérin, J. Torreilles & P. Roch. 2001.** Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Nitric Oxide-Biol. Chem. 5:1-6.
- 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.
- Götz, P., G. Enderlein & I. Roettgen. 1987.** Immune reactions of *Chiromonus* larvae (Insecta: Diptera) against bacteria. J. Insect Physiol. 3: 993–1004.
- Hillyer, J.F. & B.M. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochem. Cell Biol. 117: 431-440.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee & K. Söderhäll. 2006.** Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiol. 211: 213–236.
- Kavanagh, K. & E.P. Reeves. 2004.** Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 28:101-112.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32:1295-1309.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC: a user's guide to Probit Logit analysis. Leora Software, Berkely, CA.
- Lightwood, D.L., D.J. Ellar & P. Jarrett. 2000.** Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1A α -endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5174-5181.
- Ling, E., K. Shirai, R. Kanekatsu & K. Kiguchi. 2005.** Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. Cell Tissue Res. 320: 353–543.

- Ling, E. & X.Q. Yu. 2006.** Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 301–309.
- 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.
- Mead, G.P., N.A. Ratcliffe & L.R. Renwranz. 1986.** The separation of insect hemocyte types on percoll gradients: methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32:167-177.
- Meister, M., B. Lemaitre & J.A. Hoffmann. 1997.** Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays* 19: 1019-1026.
- Milne, R.E, A.S.D. Pang & II. Kaplan. 1995.** A protein complex from *Choristoneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 1101-1114.
- Mostafa, A.M., P.G. Fields & N.J. Holliday. 2005.** Effect of temperature and relative humidity on the cellular defense response of *Ephestia kuehniella* larvae fed *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 79–84.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469-480.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 1995.** Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 68: 450-456.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 4: 423–430.

- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. *Semina: Cienc. Agric.* 25: 293-308.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect haemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- SAS Institute.1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Sayed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004.** Genetic and biochemical characterization of field evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010-7017.
- Silva, C.C.A. da. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotechnol. Ciênc. Desenv.* 24: 68-72.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson, & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83:1671-1676.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Vasquez, B.L. 1995.** Resistance to most insecticides. In T.J. Walker (ed.), *University of Florida of Insect Records. Chapter 15: Resistant to Most Insecticides: Department of Entomology & Nematology. University of Flórida, Gainesville.* Disponível em: <<http://ufbir.ifas.ufl.edu/chap15.htm>>. Acessado: 05/01/2010.
- Whitten, M.M., C.B. Mello, S.A.O Gomes, Y. Nigam, P. Azambuja, E.S. Garcia & N.A. Ratcliffe. 2001.** Role of superoxide and rective nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp. Parasitol.* 98: 44-57.

Yamashita, M. & K. Iwabuchi. 2001. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47: 325–331.

Yeaton, R.L.W. 1983. Wound responses in insects. *Am. Zool.* 23: 195-203.

Tabela 1. Suscetibilidade das populações de *Plutella xylostella* aos inseticidas Dipel® e XenTari® após 72 h de exposição.

População	Inseticida	N ⁽¹⁾	Inclinação±EPM ⁽²⁾	CL ₅₀ (IC 95%) mg/L ⁽³⁾	χ^2 ⁽⁴⁾	RR ⁽⁵⁾
Recife- PE	Dipel®	213	1,30 ± 0,18	1,3 (0,95 - 2,10)	4,64	-
	XenTari®	184	2,47 ± 0,33	5,1 (4,01 - 6,58)	4,66	-
Camocim-PE	Dipel®	209	1,24 ± 0,17	64,9 (43,89 - 43,89)	4,25	49,9
	XenTari®	214	2,81 ± 0,29	236,2 (193,80 - 283,11)	3,72	46,3

¹ Número total de insetos usados em cada bioensaio.

² Erro padrão da média.

³ Concentração letal em miligramas de ingrediente ativo por litro de água para 50% dos insetos com intervalo de confiança de 95% e 5 graus de liberdade.

⁴ Teste de qui-quadrado (P>0,05).

⁵ Razão de resistência: CL₅₀ da população resistente/CL₅₀ da população suscetível.

Tabela 2. Concentrações de óxido nítrico (μM de $\text{NO}_2^-/\mu\text{L}$ de hemolinfa) em larvas de *Plutella. xylostella* das populações suscetível e resistente agrupadas submetidas aos inseticidas Dipel[®] e XenTari[®] em diferentes intervalos de tempo.

Tratamento	Tempo	N	Média(\pm EP)	Estatística ¹
				F=6,62; ¹ P=0,0001
Testemunha	1	10	6.6 \pm 0.63 a A	
	6	10	5.0 \pm 0.34 a A	
	12	10	4.4 \pm 0.13 a B	
Dipel [®]	1	9	5.2 \pm 0,17a A	
	6	10	5.0 \pm 0.18 a A	
	12	10	5.8 \pm 0.22 a A	
XenTari [®]	1	10	5.4 \pm 0.50 a A	
	6	10	6.1 \pm 0.29 a A	
	12	10	6.1 \pm 0.29 a A	

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

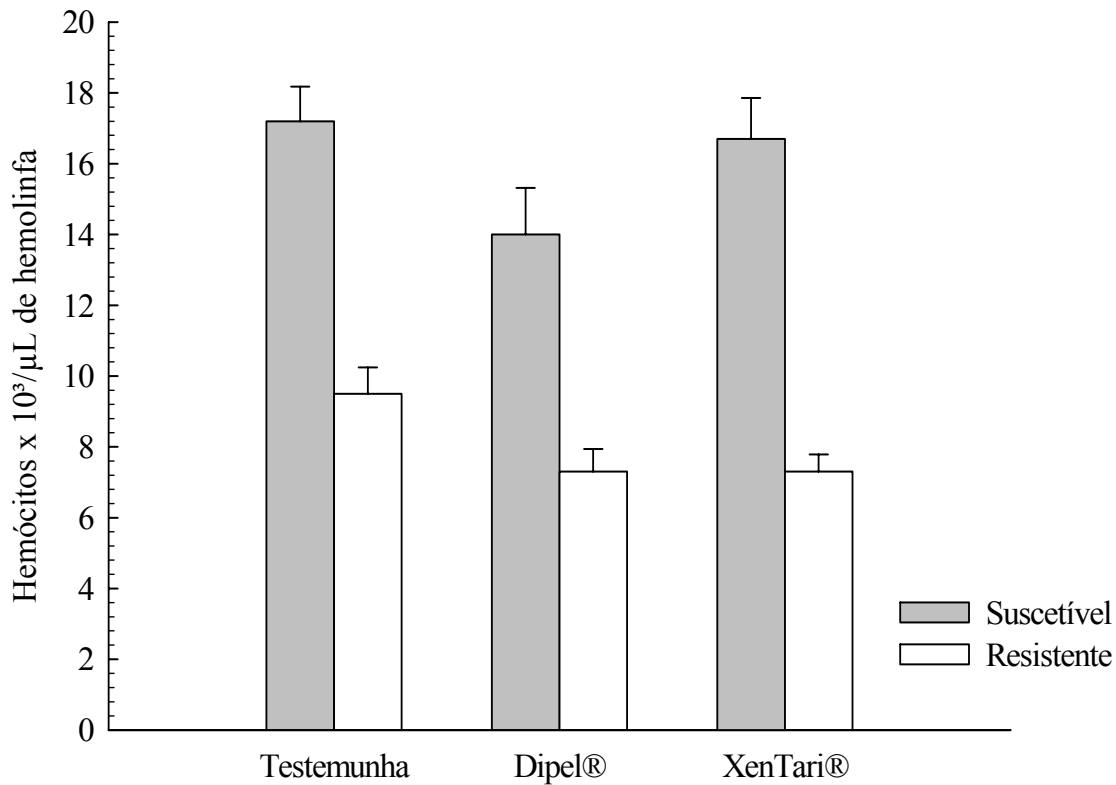


Figura 1. Número total de hemócitos de larvas de *Plutella xylostella* (Média ± EP), suscetíveis e resistentes, após tratamento com Dipel® e XenTari®. *Estatisticamente significante entre as populações dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,05$). Médias indicadas com mesma letra maiúscula entre os tratamentos para a população suscetível e minúscula para população resistente, não diferem pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

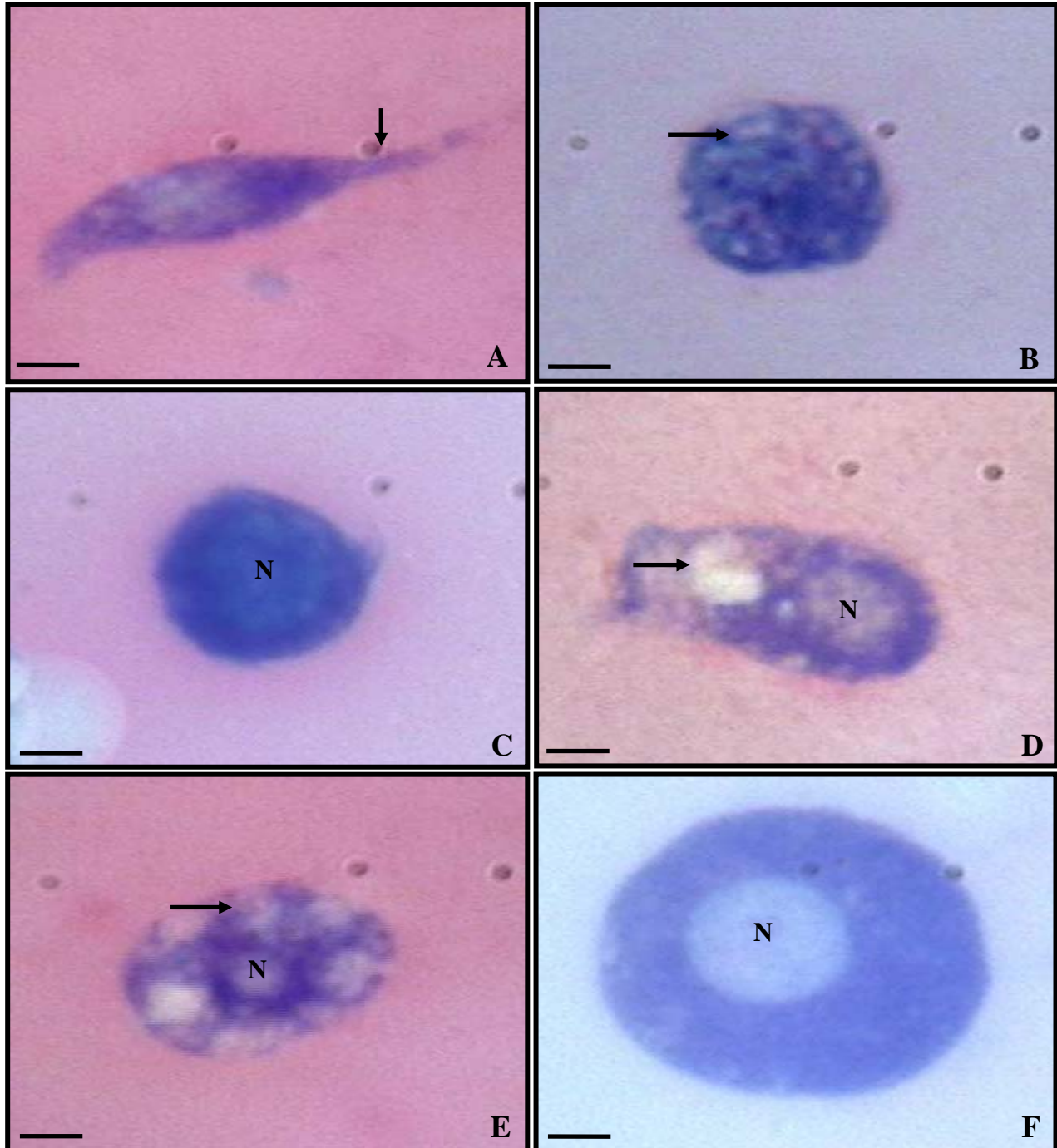


Figura 2. Hemócitos de larvas de *Plutella xylostella*. **Plasmatócito** (A) exibindo prolongamentos citoplasmáticos (seta). **Granulócito** (B) com grande quantidade de grânulos irregulares no citoplasma (seta), encobrindo o núcleo. **Prohemócito** (C) apresentando núcleo volumoso (N) e escasso citoplasma. **Adipohemócito** (D) com gotículas de lipídios de forma e tamanhos irregulares no citoplasma (seta) próximas ao núcleo (N). **Esferulócito** (E) com vesículas (seta) dispostas em torno do núcleo (N). **Oenocitóide** (D) caracterizado pelo seu tamanho volumoso e núcleo excêntrico (N). Coloração Giemsa. Barras = 10 μ m.

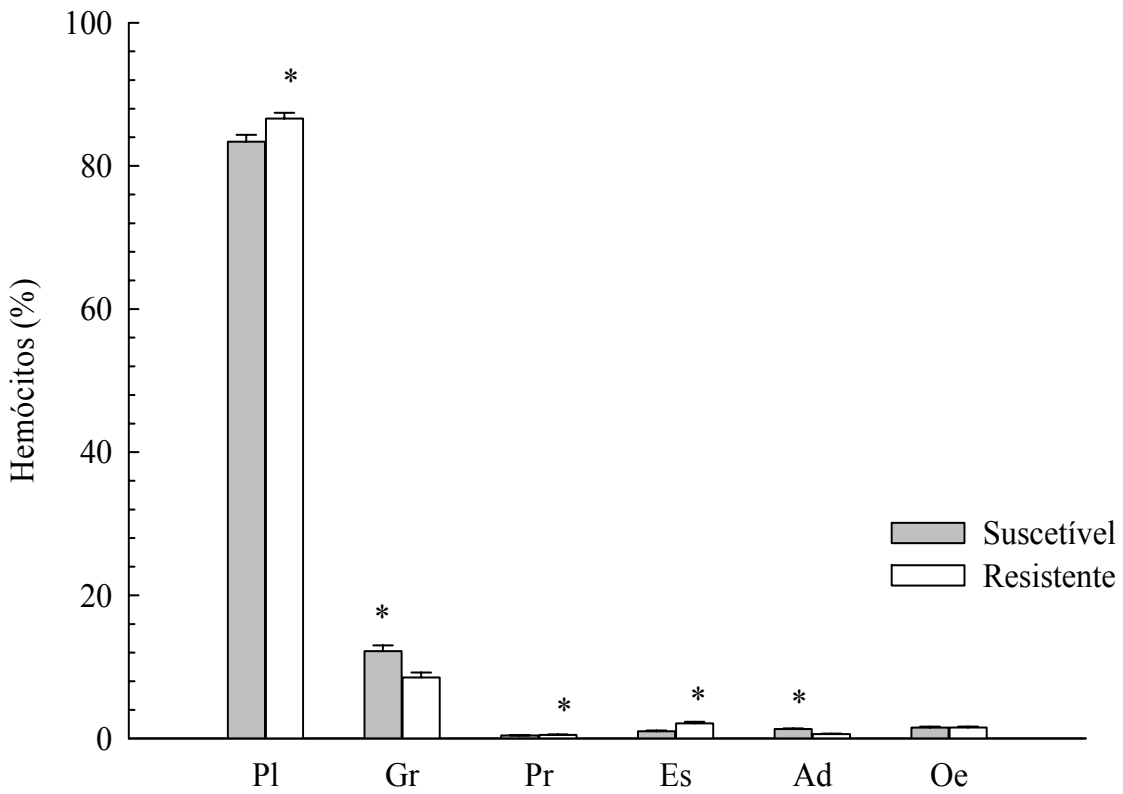


Figura 3. Diferenças quantitativas (Média \pm EP) de cada tipo celular (Pl: plasmatócito, Gr: granulócito, Pr: prohemócito, Es: esferulócito e Oe: oenocitóide) entre larvas *Plutella xylostella* suscetíveis e resistentes. *Estatisticamente significativa entre as populações pelo teste t ($P < 0,05$).

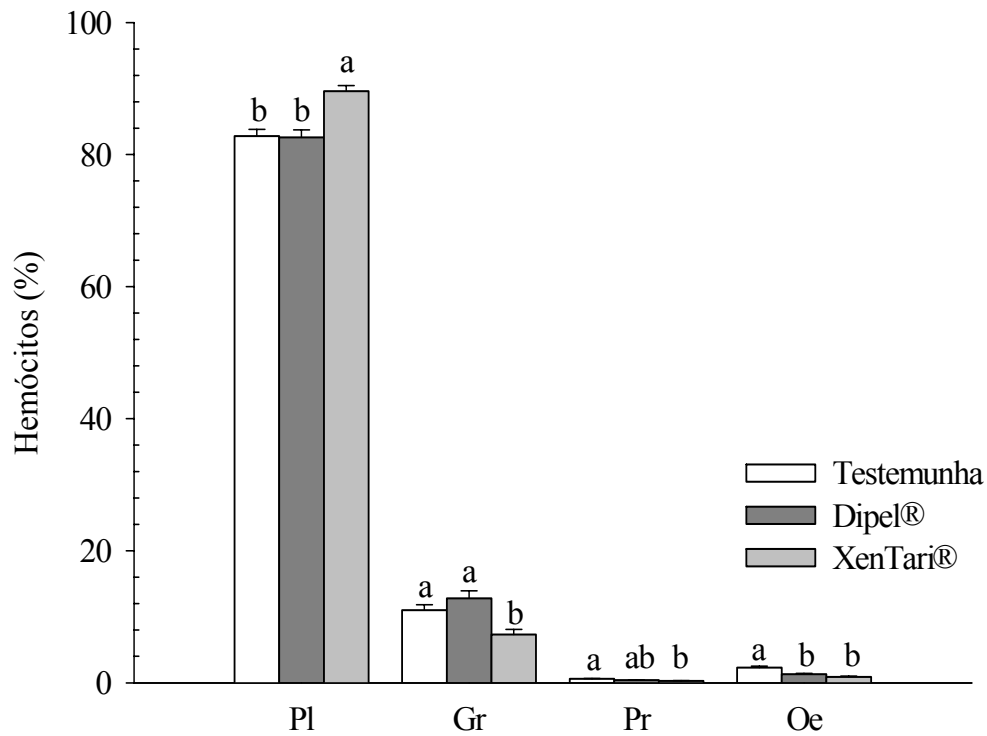


Figura 4. Média (\pm EP) da contagem diferencial dos hemócitos de larvas de *Plutella xylostella* após exposição aos inseticidas Dipel® e XenTari®. Pl: plasmatócito, Gr: granulócito, Pr: prohemócito e Oe: oenocitóide de ambas as populações. Médias com mesma letra não diferem entre os tratamentos para cada tipo celular pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

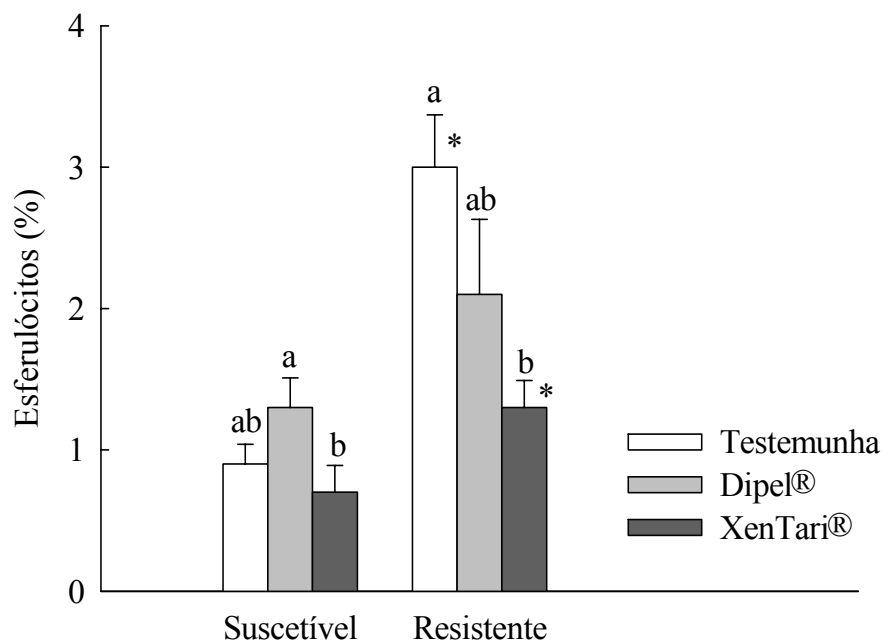


Figura 5. Média (\pm EP) da contagem de esferulócitos de larvas de *Plutella xylostella* após exposição aos inseticidas Dipel® e XenTari®. Médias com mesma letra não diferem entre os tratamentos dentro de cada população pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade. *Significativo entre as populações pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

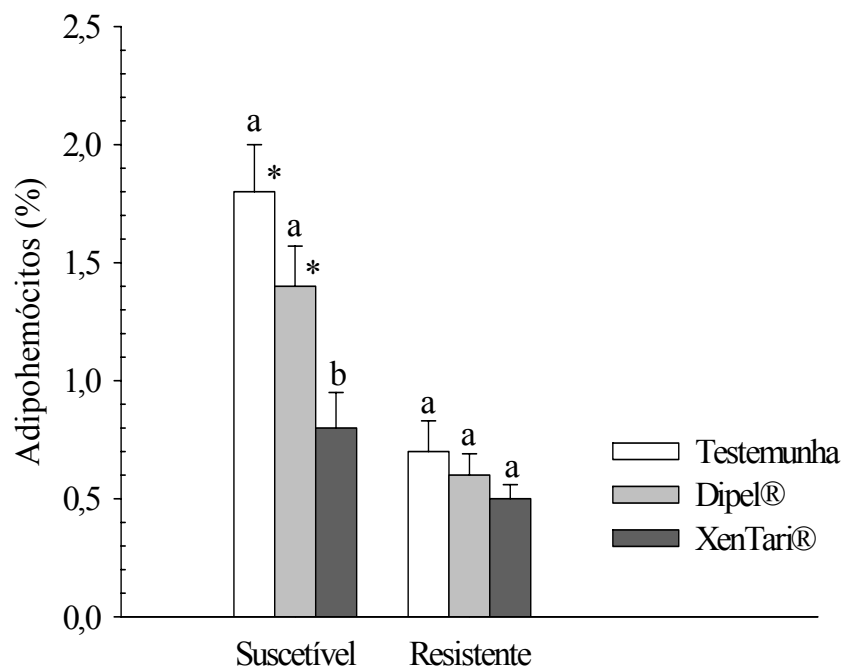


Figura 6. Média (\pm EP) da contagem de adipohemócitos de larvas de *Plutella xylostella* após exposição aos inseticidas Dipel® e XenTari®. Médias com mesma letra não diferem entre os tratamentos dentro de cada população pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

*Significativo entre as populações pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 3

HISTOPATOLOGIA DO MESÊNTERO DE POPULAÇÕES RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

LÍLIAN M.S. RIBEIRO¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA², HERBERT A.A. SIQUEIRA¹, ANA JANAINA J.M. LEMOS² E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

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

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

Ribeiro, L.M.S., V. Wanderley-Teixeira, H.A.A. Siqueira, A.J.J.M. Lemos & A.A.C. Teixeira. Histopatologia do mesêntero de populações resistente e suscetível de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner. A Ser submetido a Micron.

RESUMO – A resistência de *Plutella xylostella* (L.) ao *Bacillus thuringiensis* Berliner pode ser atribuída a alterações nos receptores de membrana das células colunares do mesêntero. Entretanto, outros mecanismos ou combinação destes também podem reduzir a toxicidade das toxinas Bt. A pesquisa testou as hipóteses de que populações suscetível e resistente de *P. xylostella*, apresentam alterações histopatológicas diferenciadas no mesêntero, tais como: alterações morfológicas, hiperplasia e hipertrofia das células regenerativas, bem como alterações histoquímicas e que insetos resistentes após exposição às formulações Bt apresentam capacidade de recuperação do mesêntero. Utilizou-se uma população suscetível (PS) e outra resistente (PR) da traça ao Dipel[®] e XenTari[®]. Insetos expostos às seguintes concentrações: Dipel[®] 1,35 mg/L (PS), 64,93 mg/L (PR) e XenTari[®] 5,17 mg/L (PS), 236,24 mg/L (PR) além da testemunha, tiveram o mesêntero coletado nos intervalos: 0, 1, 6 e 12 h e processado para análise em microscopia de luz. A quantificação das células regenerativas foi efetuada através do aplicativo de pontos, associado ao programa ImageLab 2000. De acordo com os resultados, conclui-se que, embora os inseticidas estudados tenham ocasionado alterações histopatológicas, de intensidades diferentes, no mesêntero em ambas as populações, o Dipel[®] mostrou ser mais agressivo independente da população. A presença de esferites revestindo a lâmina epitelial, a hipertrofia das células colunares e a riqueza de muco podem estar envolvidas na preservação do mesêntero em larvas da população resistente.

PALAVRAS-CHAVE: Traça-das-crucíferas, resistência, inseticida biológico, morfologia

MIDGUT HISTOPATHOLOGY OF *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)
RESISTANCE AND SUSCEPTIBLE POPULATIONS STAND UP TO COMERCIAL
FORMULATIONS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER

ABSTRACT – The resistance of *Plutella xylostella* (L.) to *Bacillus thuringiensis* Berliner has been attributed to alterations in receptors from columnares cells of midgut. However, other mechanisms or the combinations of these can also decrease the activity of Bt toxins. This study tested the hypothesis that the susceptible and resistant population of *P. xylostella*, presents differentiated histopathological alterations in midgut, such as morphological alterations, hyperplasia and hypertrophy of regenerative cells, as well histochemical alterations and that resistant insects after exposition to Bt formulations shows capacity to recover the midgut epithelium. It were used a susceptible population (SP) and other resistant (RP) of the moth to Dipel[®] e XenTari[®]. Insects were exposed to the following concentrations: Dipel[®] 1,35 mg/L (SP), 64,93mg/L (RP); XenTari[®] 5,17 mg/L (SP), 236,24 mg/L (RP), besides an untreated control, had midgut collected in intervals of 1, 6 and 12 h and processed for analyses to light microscopy. The quantification of regenerative cells was performed through applicative of points, associated to ImageLab 2000 program. In accord with the results it was concluded that nevertheless the studied insecticides had been provoked histopathological alterations of different intensities in midgut of both populations, the Dipel[®] showed to be more aggressive independently of the population. The presence of spherites covering the epithelial lamina, the hypertrophy of columnar cells and mucus abundance can be involved in midgut preservation in larvae of resistant population.

KEY WORDS: Diamondback moth, resistance, biological insecticide, morphology

Introdução

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada a principal praga em todas as regiões que cultivam espécies da família Brassicaceae (Castelo Branco & Gatehouse 2001). Seu controle se caracteriza pela intensa utilização de inseticidas, havendo relatos de até dezesseis aplicações por cultivo (Dias *et al.* 2004), o que tem acarretado problemas à saúde do agricultor, danos ao meio ambiente, além de proporcionar a seleção de populações da praga resistentes a diversos compostos químicos como piretróides e organofosforados (Vasquez 1995, Castelo Branco & Gatehouse 1997).

Bioinseticidas a base de proteínas tóxicas produzidas por *Bacillus thuringiensis* Berliner surgiram como uma alternativa segura e eficaz à utilização de produtos químicos, constituindo uma das mais importantes ferramentas no estabelecimento do manejo integrado de pragas. No entanto, várias pesquisas vêm demonstrando também o desenvolvimento de resistência de *P. xylostella* às toxinas de *B. thuringiensis*, tanto em campo quanto em laboratório (Tabashnik 1994, Wright *et al.* 1997, Sayyed *et al.* 2000).

O canal alimentar representa uma área de contato entre os insetos e o meio ambiente, sendo o foco de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas (Chapman 1998, Levy *et al.* 2004), principalmente a região do mesêntero, pois alterações nessa região podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos mesmos, bem como todos os eventos fisiológicos, os quais dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000]. Em insetos da Ordem Lepidoptera, o epitélio do mesêntero é composto por quatro tipos de células, as quais estão envolvidas nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes),

função endócrina (células endócrinas) e na renovação do epitélio (células regenerativas) (Terra *et al.* 2006, Pinheiro *et al.* 2008a).

A resistência da traça a *B. thuringiensis* pode ser atribuída a alterações nos receptores de membrana localizados nas células colunares do mesêntero, ocasionando perda ou redução na ligação da toxina ao receptor, e conseqüente perda da eficiência do inseticida (Ferré & Van Rie 2002, Sayyed *et al.* 2004). No entanto, outros mecanismos ou combinação destes também podem reduzir a toxicidade das toxinas Bt, tais como mudanças no processamento proteolítico, mudanças de pH no lúmen do mesêntero (Ma *et al.* 2005) e recuperação das células do intestino após exposição às toxinas (Loeb *et al.* 2001).

Diante do surgimento de populações resistentes ao Bt, a presente pesquisa objetivou testar as hipóteses de que populações suscetível e resistente de *P. xylostella*, apresentam alterações histopatológicas diferenciadas no mesêntero, tais como: alterações morfológicas, hiperplasia e hipertrofia das células regenerativas, bem como alterações histoquímicas após exposição às formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* e de que insetos resistentes apresentam capacidade de recuperação do mesêntero após exposição às concentrações testadas.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia e no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e manutenção dos insetos. Foram utilizadas duas populações de *P. xylostella*: uma suscetível e outra resistente às formulações comerciais Dipel[®] (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 com Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) e XenTari[®] (*B. thuringiensis* var. *aizawai* ATTC SD-1372 com Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D) obtidas de coletas realizadas em cultivos

de brássicas nos municípios de Recife-PE (população suscetível) e Camocim de São Félix-PE (população resistente). As duas populações foram mantidas individualmente no Laboratório de Interações Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) alimentadas com folhas de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* sem contato com inseticidas. A população de Recife – PE tem sido mantida desde 1998 em condições de laboratório, enquanto que a população de Camocim de São Félix-PE foi coletada durante a realização do experimento em área com relato de dificuldade de controle e aplicação dos inseticidas Dipel[®] e XenTari[®], os insetos coletados foram levados para o laboratório onde foram multiplicados e utilizados na F-1 para realização dos testes de suscetibilidade e montagem dos bioensaios para coleta do canal alimentar.

Coleta do mesêntero para análise em microscopia de luz e histoquímica. Curvas de concentração-resposta foram estabelecidas para os inseticidas Dipel[®] e XenTari[®] com as duas populações através de bioensaios para verificação da suscetibilidade/resistência e obtenção das concentrações a serem utilizadas no experimento. Insetos do quarto ínstar larval de cada população foram expostos por 24 h às CL_{50s} estimadas para cada inseticida através das curvas de concentração-resposta, perfazendo os seguintes tratamentos: larvas alimentadas com discos de folhas de couve tratadas com Dipel[®] nas concentrações de 1,35 mg/L (população suscetível) e 64,93 mg/L (população resistente); larvas alimentadas com discos de folhas de couve tratadas com XenTari[®] nas concentrações de 5,17 mg/L (população suscetível) e 236,24 mg/L (população resistente) e larvas alimentadas com discos de folhas de couve tratadas com água destilada contendo o espalhante adesivo Triton X-100 a 0,01% (testemunha). Em seguida, larvas de cada tratamento alimentadas por 24 h (considerado intervalo de 0 h) foram dissecadas para remoção do canal alimentar, e as outras restantes receberam folhas de couve não tratadas para coleta do canal alimentar nos intervalos de 1, 6 e 12 h, seguindo a metodologia modificada de Knaak & Fiuza

(2005). Para descrição histológica do mesêntero e quantificação das células regenerativas, o material coletado foi fixado em Formol a 10% com tampão Mollinig-Carson 0,1 M pH 7.2 por 24 h. A desidratação foi realizada em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80 e 95%) por 10 minutos cada e a impregnação realizada em historesina Leica® durante 24 h. Cortes de 4 µm obtidos em micrótomo Leica® RM 2245 foram corados com azul de toluidina. Para histoquímica o material coletado foi fixado em Bouïn aquoso por 24 h. Após o período de fixação foi realizada a desidratação com banhos de álcool etílico (70, 90 e 100%) durante 10 minutos cada, em seguida foram imersos por 10 minutos em Xilol (P.A) aquecido em estufa a 60 °C para diafanização. A impregnação foi realizada em Paraplast diluídos em xilol nas seguintes proporções: 25, 50, 75 e 100% com 1 h cada e incluídos após o último banho. Os cortes obtidos através de um micrótomo tipo Minot (LEICA® RM 2035) ajustado para 7 µm foram colocados em lâminas previamente revestidas com albumina de Mayer e mantidas em estufa regulada à 37 °C, durante 24 h. A coloração das lâminas foi realizada pelo tricrômico de Mallory e P.A.S (Ácido Periódico de Schiff), conforme a metodologia descrita por Behmer *et al.* (1976), Junqueira & Junqueira (1983), Michalany (1990). Cada larva correspondeu a uma repetição, sendo utilizadas cinco repetições/tratamento/intervalo.

Quantificação das células regenerativas. A quantificação foi realizada utilizando cinco secções de cortes/tratamento/intervalo, corados pelo azul de toluidina, obtidas da região do mesêntero. A captura de imagem foi efetuada por meio de câmera de vídeo Sony® acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através do aplicativo de pontos, associado ao programa ImageLab 2000 para Windows 3x. Em cada repetição (lâmina com a secção do corte) foram contadas células regenerativas em todo o mesêntero. O número médio de células regenerativas obtido nas amostras (repetições) de larvas de *P. xylostella* foi submetido a análise

de variância em esquema fatorial 3 x 4 considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel[®] e XenTari[®]) e quatro intervalos de avaliação (0, 1, 6 e 12 h) como fatores principais. No caso de resposta significativa na quantidade de células regenerativas em função do intervalo de avaliação após tratamento, os resultados foram submetidos à análise de regressão para a sua interpretação e selecionadas as equações com base na sua significância (F e P) e maior coeficiente de determinação (R²). As análises foram conduzidas utilizando o programa Estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados

Cortes histológicos do mesêntero de larvas do quarto ínstar de *P. xylostella* de ambas as populações, suscetível e resistente, sem exposição às formulações Bt, alimentadas por 24 h com folhas de couve tratadas apenas com água destilada mostraram que o epitélio é do tipo simples apoiado em duas camadas de músculo, sendo a interna disposta circularmente e a externa longitudinalmente (Fig. 1A). No epitélio foram identificados quatro tipos de células: colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas distribuídas por toda a sua extensão. As células mais frequentes foram as colunares, células de tamanho variado com sua borda em escova característica, núcleo com localização variando de central a apical e bastante heterocromático. As células caliciformes caracterizaram-se pela presença de uma cavidade típica em forma de cálice limitada pelas projeções da membrana plasmática, com núcleo basal. As células regenerativas estão dispostas isoladamente na base do epitélio, com núcleo central e volumoso (Fig. 1B). A célula endócrina foi observada na população suscetível, com morfologia alongada contendo vários grânulos densos dispersos por todo o citoplasma, características típicas dessa célula (Fig. 2D).

Na população suscetível algumas células colunares exibiram grande quantidade de grânulos citoplasmáticos bastante densos e dispersos, podendo também ser encontrados em fragmentos do citoplasma no lúmen (Fig. 1C). Na região apical dessas células evidenciou-se ainda a presença de vacúolos bem proeminentes (Fig. 1D). Já na população resistente notou-se que esses grânulos densos estão localizados apenas na superfície da borda em escova e em contato com o alimento, além de vesículas basófilas no lúmen do mesêntero (Figs. 1E e 1F).

Quando as larvas suscetíveis de *P. xylostella* foram expostas ao XenTari[®], por 24 h o mesêntero revelou áreas da lâmina epitelial íntegra (Fig. 2A) e áreas com alterações, caracterizadas por apresentar células colunares bastante altas e bem vacuolizadas (Fig. 2B), modificações na morfologia de algumas células caliciformes, as quais também apresentaram grânulos densos e lúmen totalmente preenchido por material de secreção (Figs. 2C, 2D e 2E), além de hipertrofia das células regenerativas (Fig. 2F). Já o mesêntero de larvas da população resistente exposta ao mesmo inseticida pelo mesmo período apresentou o epitélio íntegro com células colunares altas e células caliciformes apresentando morfologia padrão (Fig. 3A), porém algumas células colunares apresentaram grande protuberância citoplasmática (Fig. 3B).

O tratamento com o Dipel[®] ocasionou alterações mais drásticas no mesêntero de larvas da população suscetível produzindo uma desorganização total do tecido epitelial com áreas de estratificação (metaplasia) sinalizando provavelmente uma tentativa de regeneração desse tecido (Fig. 3C), além de afastamento das células. Verificou-se ainda que os grânulos densos permaneciam no interior das células colunares (Fig. 3D). No entanto, analisando o mesêntero das larvas da população resistente evidenciou-se que o epitélio continuava íntegro com células colunares altas e várias células caliciformes. Os grânulos densos foram observados apenas na superfície das células e em contato com o alimento (Figs. 3E e 3F).

Com o objetivo de esclarecer se ocorre ou não a recuperação da lâmina epitelial, larvas tanto da população suscetível como da resistente após tratamento com os inseticidas por 24 h foram em seguida alimentadas com folhas de couve sem tratamento e o mesêntero analisado nos intervalos de 1, 6 e 12 h. Na população suscetível submetida ao XenTari[®], após o intervalo de 1 h verificou-se também metaplasia, porém algumas células colunares mostravam núcleos vacuolizados, indicando processo degenerativo (Figs. 4A e 4B). No intervalo de 6 h é nítida a intensa secreção das células caliciformes, vacuolização e formação de protuberâncias nas células colunares, e o intenso afastamento entre essas células (Figs. 4C e 4D), e com 12 h evidenciou-se parcial degradação do mesêntero (Fig. 4E). O tratamento com Dipel[®] foi extremamente agressivo apresentando degeneração total do epitélio já no intervalo de 1 h (Fig. 4F).

Analisando o intervalo de 1 h após tratamento com XenTari[®], as larvas da população resistente mostrou a lâmina epitelial do mesêntero completamente revestida pelos grânulos densos (Fig. 5A) e epitélio íntegro, embora tenha sido observado vacuolização proeminente e hipertrofia das células colunares, além de alterações em algumas células caliciformes em determinadas áreas (Fig. 5B). Essas características também permaneceram nos intervalos de 6 e 12 h. Com Dipel[®] a lâmina epitelial apresentou áreas de metaplasia (Fig. 5C), células colunares com núcleo e citoplasma vacuolizados (Fig. 5D) e intensa secreção das células caliciformes (Fig. 5E), nos intervalos de 1 e 6 h. No intervalo de 12 h evidenciou-se degradação do mesêntero (Fig. 5F).

Histoquimicamente as larvas da população suscetível e resistente sem e com exposição aos inseticidas por 24 h mostraram reação positiva pelo tricrômico de Mallory apenas na superfície da lâmina epitelial, fato este também observado nas larvas da população suscetível nos intervalos estudados (Figs. 6A e 6B). Contudo nas larvas da população resistente evidenciou-se um aumento significativo da secreção no interior das células caliciformes semelhantemente em todos os

intervalos, quando comparado com o tratamento com 24 h e em relação à população suscetível (Figs. 6C e 6D). A reação pelo P.A.S. mostrou-se mais positiva nas larvas suscetíveis em todos os tratamentos e intervalos de tempo quando comparado com as larvas da população resistente (Figs. 6E e 6F).

A análise quantitativa das células regenerativas mostrou que os tratamentos com os inseticidas nas larvas da população suscetível ocasionaram uma redução significativa dessas células apenas no tratamento com o Dipel[®], a partir do intervalo de 1 h (Fig. 7). No entanto, nas larvas da população resistente verificou-se uma redução significativa dessas células no tratamento com Dipel[®] somente a partir do intervalo de 6 h e com XenTari[®] no intervalo 12 h (Fig. 8).

Discussão

Histologicamente o mesêntero de larvas do quarto ínstar de *P. xylostella* de ambas as populações, sem exposição às formulações Bt mostraram as mesmas características descritas para os insetos da Ordem Lepidoptera (Cristofolletti *et al.* 2001, Pinheiro *et al.* 2003, Sousa *et al.* 2009). No epitélio evidenciaram-se as células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (tipo fechada) (Cavalcante & Cruz-Landim 1999), sendo esta última não identificada facilmente na microscopia de luz pelas técnicas de rotina, corroborando as informações de Pinheiro *et al.* (2008a) e Sousa *et al.* (2009) os quais citam a necessidade de análise ultraestrutural e imunohistoquímica.

Os grânulos densos observados nas células e lúmen do mesêntero se assemelham às estruturas denominadas de esferites, descritas em células de diferentes órgãos em invertebrados, além da presença no mesêntero de insetos (Cruz-Landim 2000, Serrão & Cruz-Landim 2000). Vários autores têm relatado que estes grânulos estão associados com excreção de íons e detoxificação celular (Cruz-Landim 2000, Lipovsek *et al.* 2002, 2004), e alguns estudos têm

demonstrado a liberação de esferites para o lúmen intestinal (Serrão & Cruz-Landim 1996). Os esferites são relacionados também ao processo de transporte rápido de fluidos e excreção de metais pesados, materiais orgânicos, e materiais inorgânicos armazenado por eles (Hazelton *et al.* 2001). Assim, podemos supor que os grânulos densos encontrados revestindo a superfície na lâmina epitelial exerceu um efeito protetor a formulação do XenTari[®], nas larvas da população resistente. Este resultado corrobora Pinheiro *et al.* (2008b) os quais observaram que os esferites foram mais numerosos no mesêntero de larvas de *D. saccharalis* parasitadas com *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) do que em larvas não parasitadas.

Algumas células colunares apresentaram rica vacuolização quando expostas ao Bt. É sabido que essa bactéria ocasiona alterações na membrana celular, e de acordo com Al-Jahdali & Bisher (2007) e Sayım (2007) alterações na fisiologia da membrana podem levar a formação de vacúolos citoplasmáticos que é uma manifestação comum de degeneração celular.

Quando as larvas suscetíveis foram expostas ao XenTari[®], por 24 h o mesêntero apresentou alterações histopatológicas similares, porém menos drásticas aos observados por Sousa (2009) em estudos com *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) após 20 minutos de ingestão de cerca de $0,183 \pm 0,077$ ng de Cry1Ac, presente em algodão Bt AcalaDTL/-90B. Já nas larvas resistentes o mesêntero apresentou-se íntegro mostrando, no entanto protuberâncias nas células colunares. Segundo Pinheiro *et al.* (2008a) essas protuberâncias são resultantes do processo de secreção apócrina de enzimas digestivas para o lúmen, porém Hakim *et al.* (2010) mencionam que as protuberâncias podem estar associadas à morte celular, pois quando o mesêntero é infectado por agentes microbianos, as células colunares incham e formam protuberâncias apicais, liberando todo seu conteúdo no lúmen.

No presente estudo vesículas foram encontradas no lúmen do mesêntero das larvas resistentes antes da exposição aos inseticidas, o que provavelmente está relacionado à secreção apócrinas das células colunares, visto que se desprendiam das células e permaneciam no lúmen intestinal. Oliveira *et al.* (2009) relataram presença de vesículas basófilas no mesêntero de larvas *Aedes aegypti* L., *A. albipennis* Lynch-Arribáizaga (Diptera: Culicidae) e *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) quando expostas ou não as toxinas das linhagens 2362 e S1116 de *B. sphaericus* (Neide).

A hipertrofia celular e de seus núcleos também foram relatadas por Ruiz *et al.* (2004) e Pandey *et al.* (2009), em estudos realizados em larvas de *A. aegypti*. *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) e *C. quinquefasciatus* expostas à toxina Cry11bB de *B. thunriensis* Medellin, e em larvas de *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) após ingestão de delta toxina do *B. thunriensis*, respectivamente. Segundo Kumar *et al.* (2004) a hipertrofia representa uma resposta adaptativa das células ao aumento da exigência funcional, aumento do estímulo hormonal e em decorrência de infecções por vírus, bactérias ou fungos. Nas larvas das populações suscetível e resistente, tratadas com Dipel[®] foi observado metaplasia, porém em decorrência do processo degenerativo da lâmina epitelial evidenciou-se redução do número de células regenerativas, sendo este evento mais lento nas larvas resistente, pois só foi visualizado a partir do intervalo de 6 h. A redução significativa das células regenerativas nas larvas da população resistente exposta ao XenTari[®] no intervalo de 12 h, pode estar relacionado a hipertrofia das células colunares, pois devemos mencionar que através de técnicas de imunohistoquímica, foi possível determinar que elas são as principais fonte de produção do fator de diferenciação das células do mesêntero (MDF), e que seus níveis aumentam em culturas de células colunares tratadas com Bt (Goto *et al.* 2000, Loeb *et al.* 2001, Hakim *et al.* 2010). Dessa forma, é possível que as células colunares tenham liberado este fator promovendo a diferenciação

das células regenerativas levando assim uma redução do seu número. Esse evento não foi verificado na população suscetível, uma vez que não ocorreu hipertrofia das células colunares.

Em ambas as populações verificaram-se aumento de secreção das células caliciformes, entretanto, a análise histoquímica mostrou que a natureza de secreção nas larvas suscetíveis é de carboidratos neutros (P.A.S. positivo) e nas larvas da população resistente é mucosa, pois o tricrômico de Mallory reage com as mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas) presentes no muco (Behmer *et al.* 1976, Junqueira & Junqueira 1983, Michalany 1990). Sabe-se que as mucinas são glicoproteínas poliméricas cuja principal função é proteger o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos, que podem estar presentes na luz intestinal (Deplancke & Gaskins 2001, Myers *et al.* 2008). Isto sugere a participação dessa substância na preservação da lâmina epitelial, pois houve aumento dessa secreção nos intervalos de 1, 6 12 h em relação ao intervalo de 0 h.

De acordo com os resultados, conclui-se que, embora os inseticidas estudados tenham ocasionado alterações histopatológicas, de intensidades diferentes, no mesêntero em ambas as populações, o Dipel[®] mostrou ser mais agressivo independente da população. A presença de esferites revestindo a lâmina epitelial, a hipertrofia das células colunares e a riqueza de muco, podem estar envolvidas na preservação do mesêntero em larvas da população resistente, porém essas características não foram suficientes para impedir a degeneração do epitélio ou induzir a hiperplasia das células regenerativas.

Agradecimentos

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

Literatura Citada

- Al-Jahdali, M.O. & A.S.B. Bisher. 2007.** Testicular histopathological alterations in rats treated with sumithion[®] NP 25/2.5 EC, insecticide. *J. Biol. Sci.* 7: 520-525.
- Behmer, O.A., E.M.C. Tolosa & A.G. Freitas Neto. 1976.** Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. São Paulo, Edart, 115p.
- Castelo Branco, M. & A.G. Gatehouse. 1997.** Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. *An. Soc. Entomol. Brasil* 26: 75-79.
- Castelo Branco, M. & A.G. Gatehouse. 2001.** A survey of insecticide susceptibility in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 30: 327-332.
- Cavalcante, V.M. & C. Cruz-Landim. 1999.** Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-39.
- Chapman, R.F. 1998.** The Insects: Structure and Function. Cambridge, Cambridge University Press, 770 p.
- Cristofolletti, P.P., A.F. Ribeiro & W.R. Terra. 2001.** Apocrine secretion of amylase endocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47: 143–155.
- 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). *Biosci. J.* 16: 87-99.
- Deplancke B & H.R. Gaskins. 2001.** Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nut.* 73: 1131-1141.

- Dias, D.G.S., C.M.S. Soares & R.G. Monnerat. 2004.** Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle de traça-das-crucíferas em couve-flor no Distrito Federal. *Hortic. Bras.* 22: 387-390.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Fiandra, L., M. Casartelli & B. Giordana. 2006.** The paracellular pathway in the lepidopteran larval midgut: Modulation by intracellular mediators. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 144: 464-473.
- Goto, S., M. Takeda, R.S. Hakim & M.J. Loeb. 2000.** Immunohistochemical localization of MDF1 (midgut differentiating factor) in midgut cells of *Heliothis virescens*. *In Vitro. Cell Develop. Biol.* 36: 38A.
- Hakim, R.S., K. Baldwin & G. Smaghe. 2010.** Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 593–608.
- 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.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira. 1983.** Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. São Paulo, Santos, 123 p.
- Klionsky, D.J. & S.D. Emr. 2000.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717–1721.
- Knaak, N. & L.M. Fiuza. 2005.** Histopathology of *Anticarsia gematalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki. *Braz. J. Microbiol.* 36: 196-200.

- Kumar, V., R.S. Cotran & S.L. Robbins. 2004.** Basic Pathology. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 904 p.
- 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.
- Lipovsek, S., I. Letofsy-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.
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakin, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599-606.
- Ma, G., M. Sarjan, C. Preston, S. Asgari & O. Schmidt. 2005.** Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. *Insect. Sci.* 12: 319-330.
- Michalany, J. 1990.** Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo, Gráfica-Editora Michalany S/A, 247 p.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 615-632.

Myers, B.M., J.L. Fredenburgh. & W.E Grizzle. 2008. Carbohydrates, p. 161-187. In Bancroft, J.D. & M. Gamble (eds.), Theory and Practice of Histological Techniques. Philadelphia, Elsevier, 744 p.

Oliveira, C.D., W.P. Tadei & F.C. Abdalla. 2009. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribáizaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? Neotrop. Entomol. 38: 624-663.

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. Plant Prot. 42: 376-383.

Pinheiro, D.O., I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2008a. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. Neotrop. Entomol. 37: 413-419.

Pinheiro, D.O., H. Conte, & E.A. Gregório. 2008b. Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. Biocell. 32: 61-67.

Pinheiro, D.O., R.J. Silva, I. Quagio-Grassiotto & E.A. Gregório. 2003. Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). Neotrop. Entomol. 32: 453-459.

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.1999-2001. SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

- Sayim, F. 2007.** Histopathological effects of dimethoate on testes of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78: 479-484.
- Sayed, A.H., R. Haward, S.H. Juan Ferré, & D.J. Wright. 2000.** Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509-1516.
- Sayed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004.** Genetic and biochemical characterization of field evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010-7017.
- Serrão, J.E. & C. Cruz-Landim. 1996.** Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios.* 88: 161-171.
- Serrão, J.E. & C. Cruz-Landim. 2000.** Ultrastructure of the midgut epithelium of meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *J. Apicultural Res.* 39: 9-17.
- Sousa, M.E.C. 2009.** Análise morfológica e ultra-estrutural do mesêntero de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) frente à toxina Cry1Ac. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 54 p.
- 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.
- Tabashnik, B.E. 1994.** Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Terra, W.R., R.H. Costa & C. Ferreira. 2006.** Plasmic membranes from insect midgut cells. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 78: 255-269.

- Vasquez, B.L. 1995.** Resistance to most insecticides. In T.J. Walker (ed.), University of Florida of Insect Records. Chapter 15: Resistant to Most Insecticides: Department of Entomology & Nematology. University of Florida, Gainesville. Disponível em: <<http://ufbir.ifas.ufl.edu/chap15.htm>>. Acessado: 05/01/2010.
- Weissman, A.M. 2001.** Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 169–178.
- Wright, D.J., M. Iqbal, F. Granero & J. Ferré. 1997.** A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1814-1819.

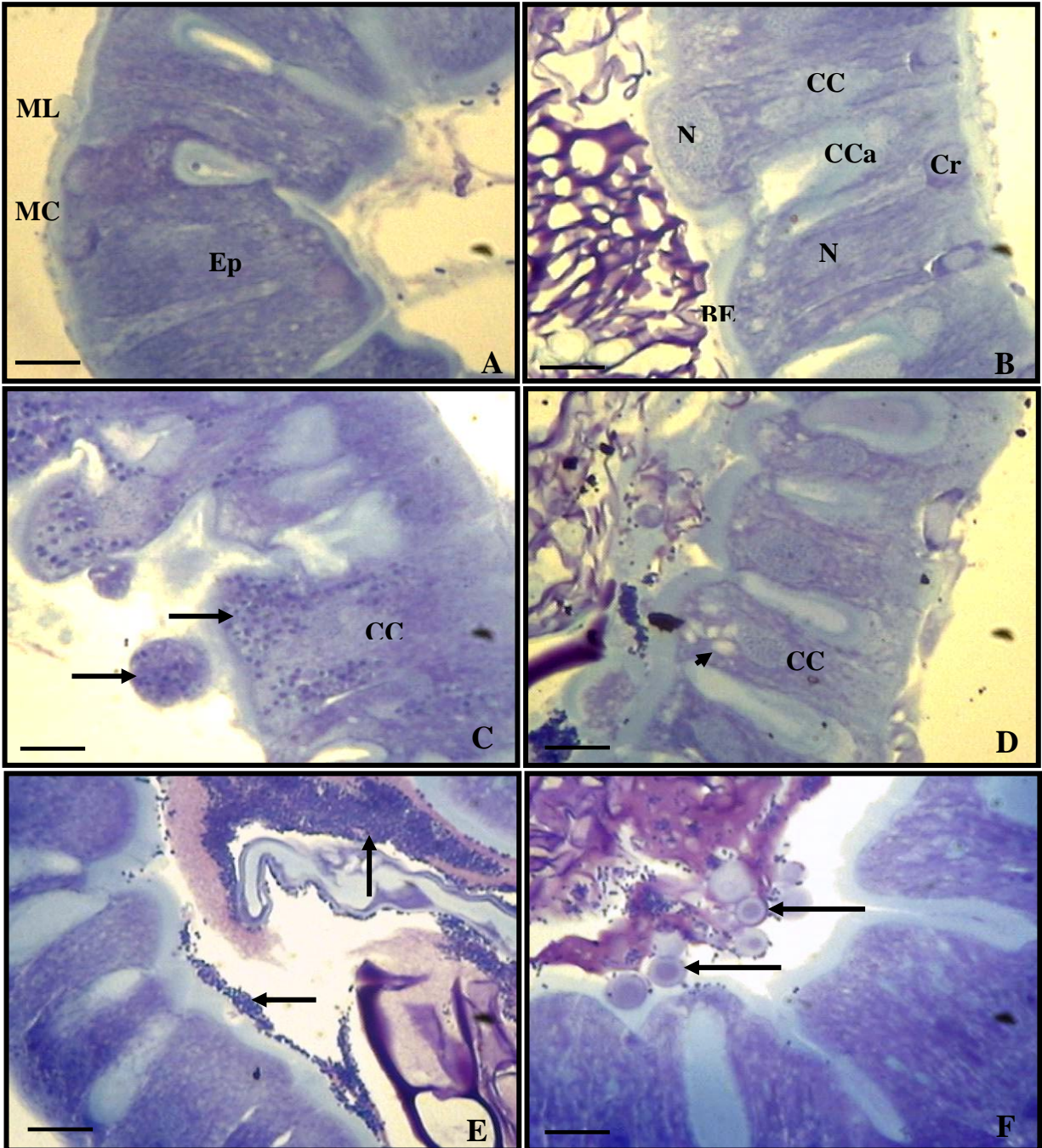


Figura 1. Mesêntero de larvas suscetíveis de *Plutella xylostella* sem exposição aos inseticidas. (A) Epitélio simples apoiado em duas camadas de músculo. (B) Células epiteliais. (C) Notar grânulos densos no citoplasma das células colunares e em fragmentos destacando-se para o lúmen. (D) Células colunares com vacúolos proeminentes. Barras = 25 μ m. Mesêntero de larvas resistentes de *P. xylostella* sem exposição aos inseticidas. (E) Grânulos densos sobre a borda em escova e em contato com o alimento. Barra = 25 μ m. (F) Vesículas basófilas no lúmen. Barra = 10 μ m. Ep – epitélio simples, MC – músculo circular, ML – músculo longitudinal, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, BE – borda em escova, N – núcleo, Seta curta – grânulos, Ponta de seta – vacúolos, Seta longa – vesículas basófilas. Coloração Azul de Toluidina.

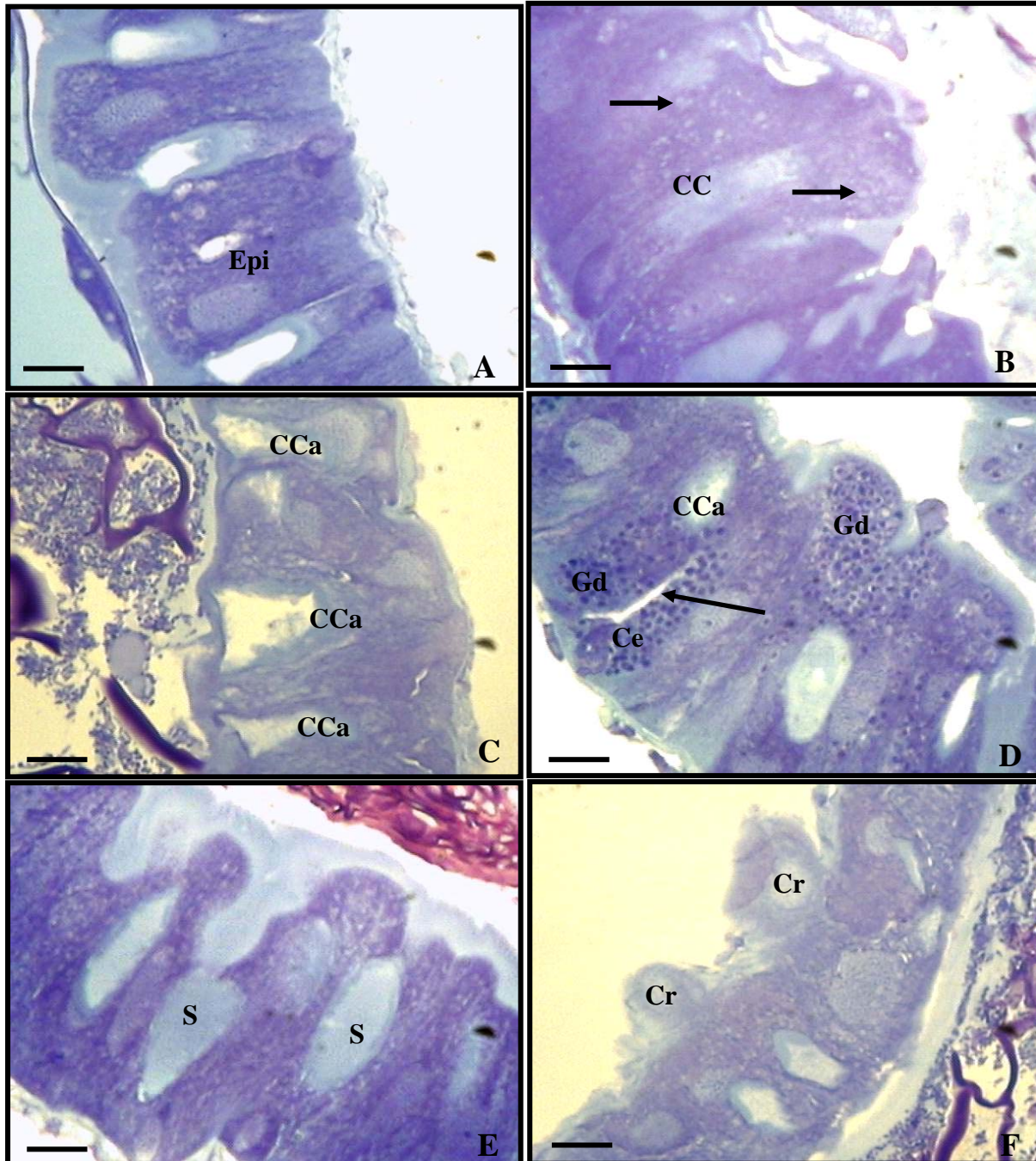


Figura 2. Mesêntero de larvas suscetíveis de *Plutella xylostella* expostas ao XenTari[®] por 24 h. (A) Área de epitélio íntegro. (B) Células colunares altas e ricamente vacuolizadas. (C) Células caliciformes com morfologia alterada. (D) Presença de grânulos densos na célula caliciforme e discreto afastamento entre essa e a célula endócrina. (E) Intensa secreção da célula caliciforme. (F) Hipertrofia das células regenerativas. Barras = 25 μ m. Epi – epitélio íntegro, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, Cr – célula regenerativa, Seta curta – vacúolos, Seta longa – afastamento das células epiteliais, Gd - grânulos densos, S - secreção. Coloração Azul de Toluidina.

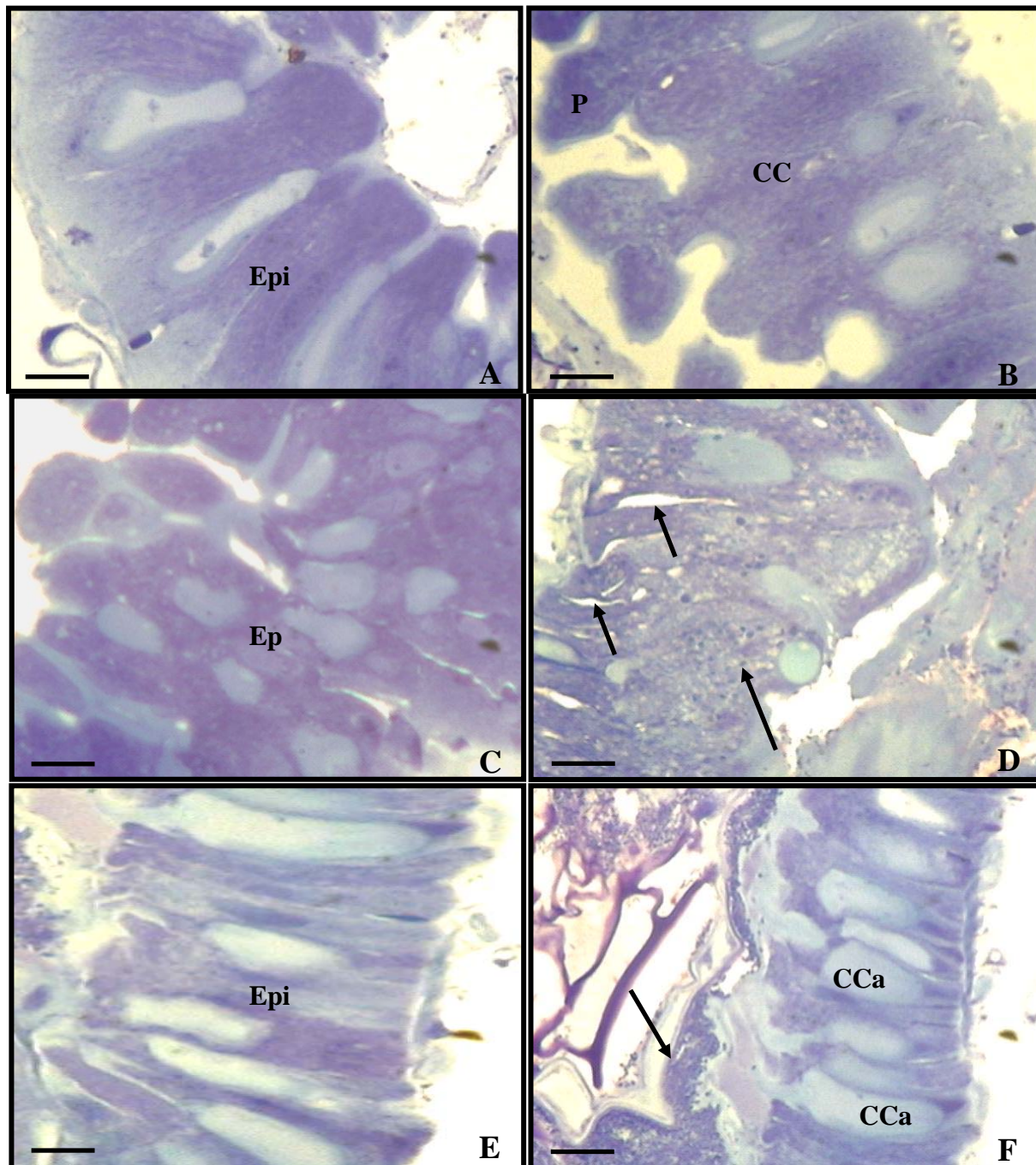


Figura 3. Mesêntero de larvas resistentes de *Plutella xylostella* expostas ao XenTari[®] por 24 h. (A) Epitélio íntegro. (B) Células colunares altas com protuberâncias. Barras = 25 µm. Mesêntero de larvas suscetíveis de *P. xylostella* expostas ao Dipel[®] por 24 h (C) Desorganização e estratificação do epitélio. (D) Afastamento das células epiteliais e presença de grânulos densos no interior da célula colunar. Barras = 25 µm. Mesêntero de larvas resistentes de *P. xylostella* expostas ao Dipel[®] por 24 h (E) Epitélio íntegro. Barra = 50 µm. (F) Abundância de células caliciformes e grânulos densos no lúmen. Barra = 25 µm. Epi – epitélio íntegro, Ep – epitélio, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, P – protuberância, Seta curta – afastamento das células epiteliais, Seta longa - grânulos densos. Coloração Azul de Toluidina.

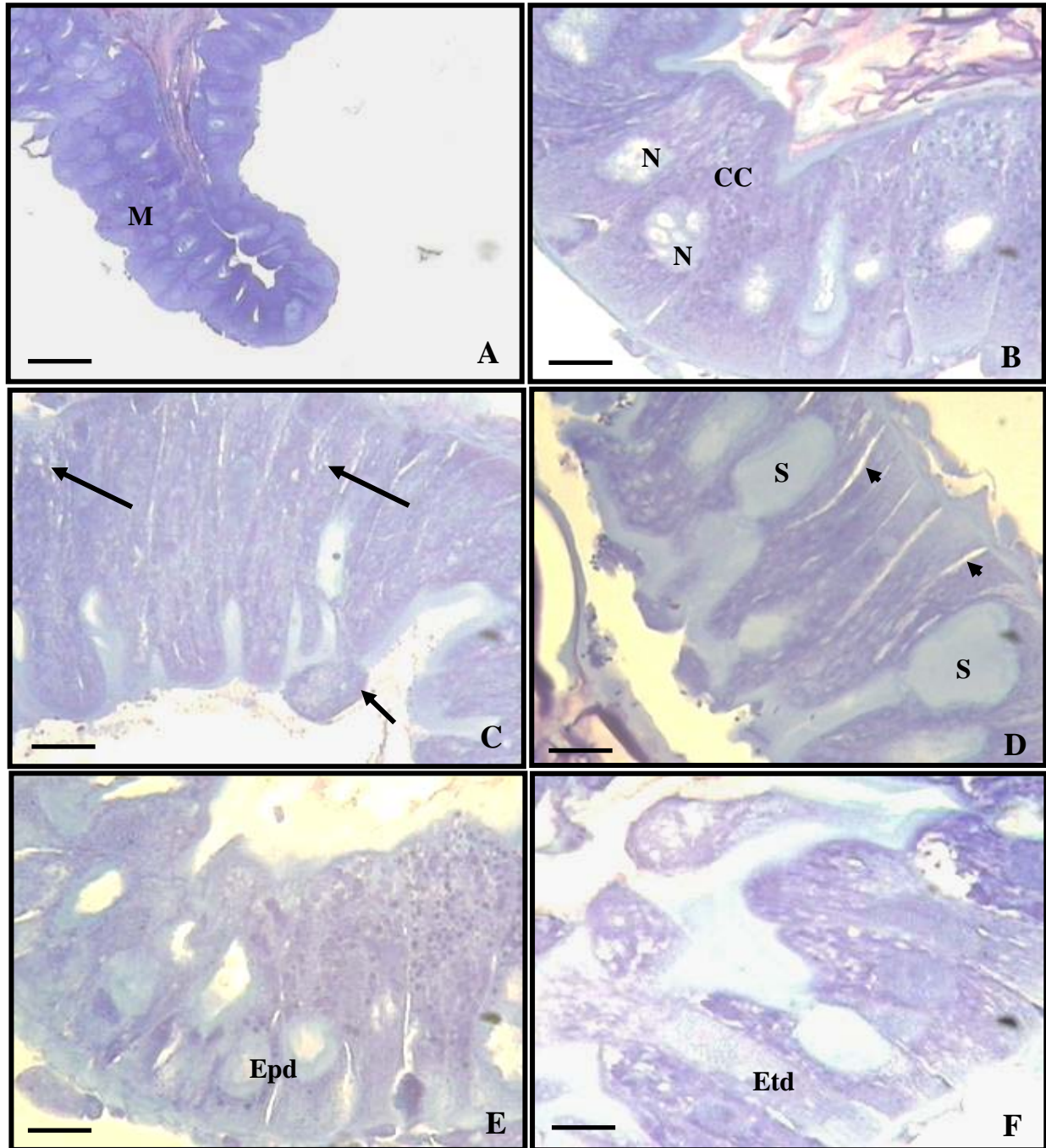


Figura 4. Mesêntero de larvas suscetíveis de *Plutella xylostella* expostas ao XenTari[®] por 24 h. Intervalo de 1 h. (A) Metaplasia e (B) Núcleo vacuolizado. Barras = 100 µm. Intervalo de 6 h. (C) Vacuolização e protuberâncias nas células colunares e (D) Intensa secreção das células caliciformes e afastamento entre as células. Intervalo de 12 h. (E) Parcial degradação do mesentero. Barras = 25 µm. Mesêntero de larvas suscetível de *P. xylostella* expostas ao Dipel[®] por 24 h. Intervalo de 1 h. (F) Total degradação do mesentero. (F) Abundância de células caliciformes e grânulos densos no lúmen. Barras = 25 µm. M – metaplasia, N – núcleo, Epd – epitélio parcialmente degradado, Etd – epitélio totalmente degradado, CC – célula colunar, S – secreção, Ponta de Seta – afastamento das células epiteliais, Seta longa – vacúolos, Seta curta – protuberância. Coloração Azul de Toluidina.

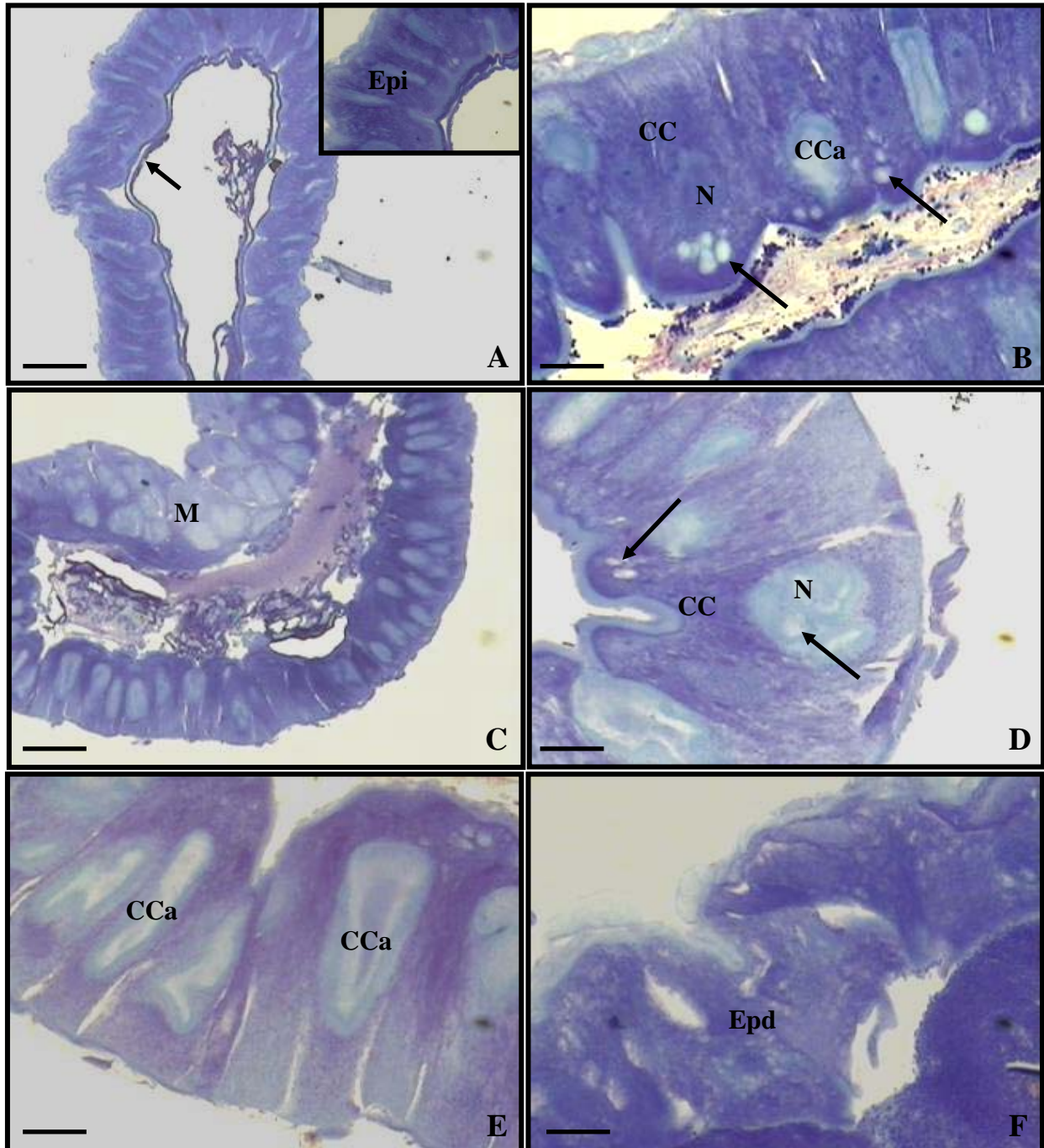


Figura 5. Mesêntero de larvas resistentes de *Plutella xylostella* expostas ao XenTari[®] por 24 h. Intervalo de 1 h. (A) Grânulos densos revestindo a lâmina epitelial e em detalhe epitélio íntegro. Barra = 100 µm. (B) Hipertrofia da célula colunar e vacúolos proeminentes. Barra = 25 µm. Mesêntero de larvas resistentes de *P. xylostella* expostas ao Dipel[®] por 24 h. Intervalo de 1 h. (C) Metaplasia epitelial Barra = 100 µm. (D) Célula colunar com núcleo e citoplasma vacuolizado. e (E) Secreção da célula caliciforme. Intervalo de 12 h. (F) Degradação do mesenterio. Barras = 25 µm. Seta curta – grânulos densos, Setas longas – vacúolos M – metaplasia, N – núcleo, Epi – epitélio íntegro, CC – célula colunar, CCa – célula caliciforme, Epd - epitélio degradado. Coloração Azul de Toluidina.



Figura 6. Histoquímica do mesêntero de larvas (A) suscetível e (B) resistente de *Plutella xylostella* sem exposição aos inseticidas por 24 h. Observar em ambos presença de muco na superfície epitelial Barras = 25 μ m. (C) mesêntero de larvas resistente de *P. xylostella* exposta ao Dipel[®] intervalo 1 h, e (D) mesêntero de larvas resistente de *P. xylostella* exposta ao XenTari[®] intervalo 6 h. Notar secreção mucosa nas células caliciformes. Barras = 25 μ m. (E) Notar reação positiva pelo P.A.S. no mesêntero de larva suscetível sem exposição aos inseticidas e em (F) reação negativa pelo P.A.S. no mesêntero de larva resistente sem exposição aos inseticidas. Barras = 25 μ m. CCa – células caliciformes, Setas – muco.

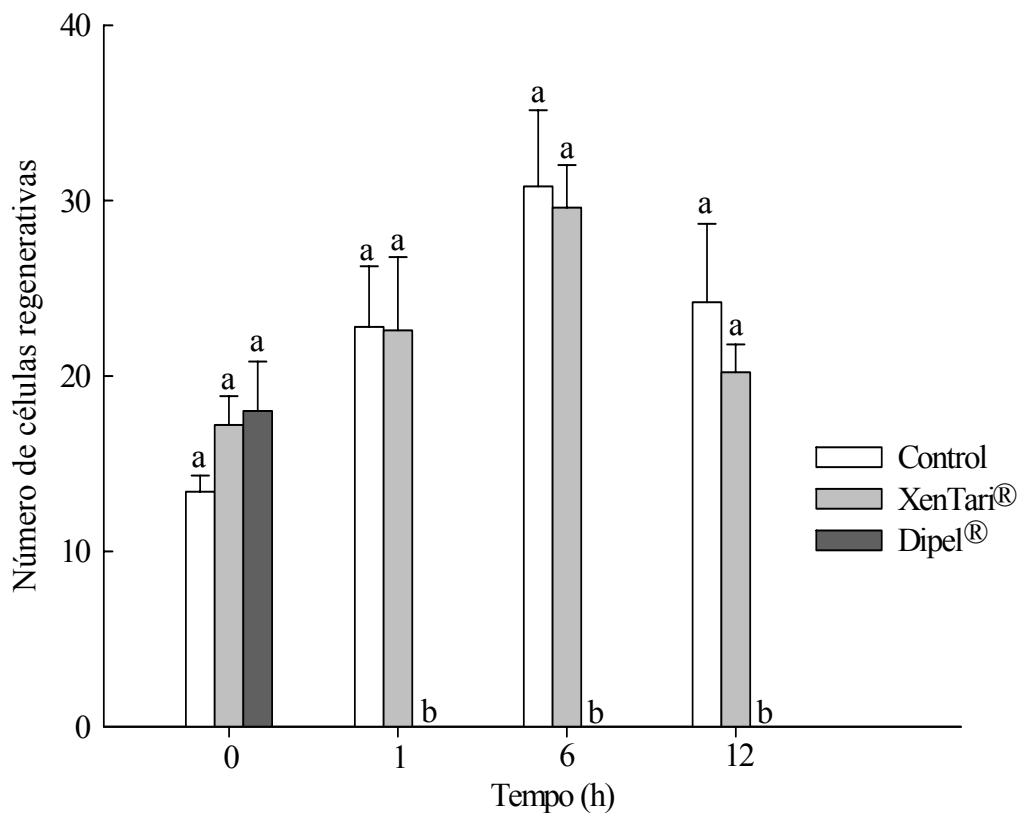


Figura 7. Número médio (\pm EP) de células regenerativas da região do mesêntero de larvas suscetíveis de *Plutella xylostella*: testemunha (\hat{y} = média = $22,8 \pm 2,18$ e após tratadas com XenTari® (\hat{y} = média = $22,4 \pm 1,61$) e Dipel® ($\hat{y} = 8,975 - 0,942x$; $F = 7,47$; $P = 0,0136$; $R^2 = 0,29$) nos intervalos de 0, 1, 6 e 12 h. Médias com mesma letra dentro de cada intervalo de tempo não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

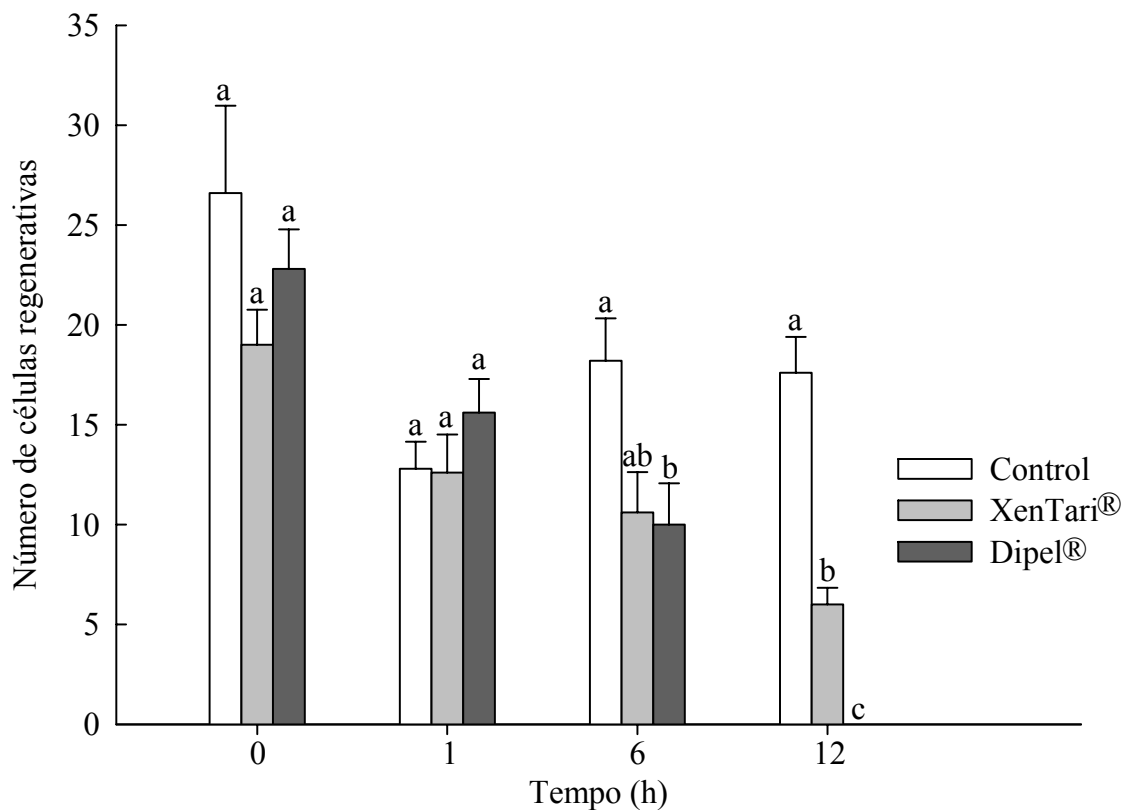


Figura 8. Número médio (\pm EP) de células regenerativas da região do mesêntero de larvas resistentes de *Plutella xylostella*, testemunha (\hat{y} = média = $18,8 \pm 1,67$) e após tratadas com XenTari® ($\hat{y} = 16,276 - 0,890x$; $F = 20,88$; $P = 0,0002$; $R^2=0,53$) e Dipel® ($\hat{y} = 20,176 - 1,70x$; $F = 79,22$; $P < 0,0001$; $R^2 = 0,81$) nos intervalos de 0, 1, 6 e 12 h. Médias com mesma letra dentro de cada intervalo de tempo não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.