

## ANÁLISES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE INSETOS DA ESPÉCIE *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) SUBMETIDOS A AZADIRACTINA.

Tais Protzek Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lucas Costa Cabral, Ana Sílvia Lapenta (Orientadora) e-mail: aslapenta@uem.br, Adriana A. S. Gigliolli (Co-orientador).

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área: Ciências Biológicas**  
**Subárea: Genética Animal**

**Resumo:** Os insetos da espécie *Tribolium Castaneum*, são pragas que aparecem em grãos armazenados. O uso excessivo de inseticidas tem levado à resistência a estes compostos e as esterases são enzimas relacionadas com o mecanismo de detoxificação. Neste trabalho o inseticida utilizado foi o Azadiractina e foi verificado os padrões de esterases em insetos expostos assim como as mudanças histológicas do mesêntero quando ingerido o inseticida.

### Introdução

De acordo com levantamentos da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção nacional de grãos deve atingir 234,1 milhões de toneladas 2018/2019. Deste total, estima-se que 10% são perdidos durante o armazenamento principalmente pelo ataque de insetos praga. Desta forma, o controle dessa espécie é necessário para implementação de melhorias na produtividade alimentar e econômica. No entanto, a deficiência de inseticidas registrados e, conseqüentemente, o uso indiscriminado destes compostos, tem favorecido a seleção de populações de insetos praga resistentes. Sendo assim, vários pesquisadores têm avaliado o potencial de compostos secundários produzidos por vegetais no controle de pragas.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo analisar histologicamente e bioquimicamente os insetos da espécie *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) submetido a Azadiractina.

### Materiais e métodos

A linhagem LabS de *Tribolium castaneum* analisada neste trabalho foi mantida em laboratório a uma temperatura constante de  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C no escuro em recipientes de vidro contendo farinha de trigo como dieta alimentar.

Foram realizados testes de toxicidade por contato e ingestão. Por contato, papéis filtro embebidos em 1 ml de solução de Azadiractina acondicionados em placas de Petri, onde os insetos permaneceram por 24 horas. Várias concentrações foram testadas, são elas: 05%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e o controle. Foram

colocados 30 insetos em cada placa de Petri, com quatro repetições. A mortalidade foi avaliada.

Para análise por ingestão, os insetos foram colocados em recipientes contendo 50 g de farinha, a qual, foi adicionado 1 mL de solução nas concentrações 25 e 50% de Azadiractina. Para cada bioensaio, foram adicionados 30 insetos adultos não sexados e, a análise da mortalidade realizada em 24, 48 e 72 horas.

Após este período, os insetos sobreviventes ao teste por ingestão, foram congelados para análise de esterases e alterações morfológicas no mesêntero. Para análise das esterases foi empregada técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% de concentração. A solução para visualização das esterases continha os substratos  $\alpha$ -naftil acetato e  $\beta$ -naftil acetato e o corante Fast Blue.

As alterações morfológicas no mesêntero foram realizadas por meio de microscopia de luz. Para tanto, os insetos foram anestesiados à frio e dissecados em solução salina. Os mesênteros foram coletados e fixados em Bouin aquoso, desidratados em série crescente de álcoois diafanizados em Xilol, incluídas em parafina, seccionadas a 6  $\mu$ m em micrótomo, coletadas em lâminas de vidro, reidratadas e coradas com Hematoxilina/Eosina (H/E) (Junqueira e Junqueira, 1983). As análises foram realizadas em microscópio de luz Olympus seguindo-se a documentação fotográfica.

## Resultados e Discussão

### *Efeito da Azadiractina na mortalidade de T. castaneum*

A exposição dos insetos à Azadiractina por contato revelou uma baixa mortalidade mesmo em altas concentrações. Do total de 130 insetos para cada concentração testada, o resultado obtido foi de 0% - 3 mortos, 5% - 8 mortos, 10% - 24 mortos, 20% - 37 mortos, 30% - 17 mortos, 40% - 12 mortos, 50% - 13 mortos, 60% - 7 mortos. Com estes resultados não foi possível o cálculo da concentração letal que mata 50% (CL50).

### *Análise das esterases em T. castaneum expostos à Azadiractina*

Os insetos sobreviventes submetidos à Azadiractina a 50% e a 60% tiveram seu padrão de esterases analisados por eletroforese (figura 1).

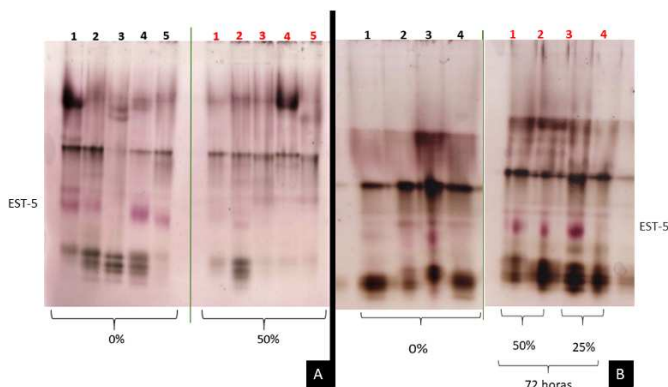


Figura 1. A - Eletroforese em gel de poliacrilamida de *Tribolium castaneum* expostos à Azadiractina por contato com o papel filtro durante 24 horas. B - Eletroforese em gel de poliacrilamida de *Tribolium castaneum* expostos a Azadiractina por ingestão durante 72 horas.

Em insetos expostos à Azadiractina (50%) por contato, ocorreu uma inibição da EST-5 após 24 horas (figura 1A). Em insetos expostos à Azadiractina (25 e 50%) por ingestão, observou-se um aumento da expressão da EST-5 após 72 horas (figura 1B). Estes resultados juntos indicam a participação desta enzima na detoxificação deste composto, uma vez que em 24 h ocorre a inibição da EST-5 e com a exposição contínua ocorre um aumento na sua síntese, contribuindo para a recuperação do inseto submetido à Azadiractina, explicando em parte a baixa mortalidade. A EST-5 tem se mostrado uma importante enzima na detoxificação de outros compostos em *T. castaneum*, como verificado por JULIO et al. (2017) com relação aos inseticidas Pirimifós-metil e bifentrina.

#### *Alterações do mesêntero em Tribolium castaneum expostos à Azadiractina*

O intestino médio de *T. castaneum* é um tubo cilíndrico de espessura uniforme com sua superfície coberta por criptas. Consiste em epitélio simples composto de células digestivas, regenerativas e endócrinas. Esta camada é suportada pela lâmina basal acidofílica e é envolvido por musculatura fina constituído por fibras circulares e longitudinais (Gigliolli et al., 2015) (figuras 2 A e B). Em insetos expostos a 25% durante 48 horas (figuras 2C-E) pode-se observar degeneração das criptas regenerativas, o surgimento de espaços intercelulares entre as células digestivas, descolamento do epitélio em relação a lâmina basal e afrouxamento da musculatura. As mesmas alterações foram observadas em insetos expostos a 50% durante 48 horas, com intensificação da degeneração do epitélio com liberação das células digestivas para o lúmen (figuras 2 F e G). Nos insetos expostos a 25 % (figura 2H) e 50% (figura 2I) durante 72 horas, ocorreram as mesmas modificações, contudo, regiões de regeneração podem ser observadas. Levando em consideração o papel do intestino médio na absorção de nutrientes, síntese e secreção de enzimas, bem como, de hormônios, sabe-se que alterações nesta região podem comprometer toda fisiologia do inseto e levá-los a morte caso o tecido não seja regenerado. Por um mecanismo ainda desconhecido, as células regenerativas podem iniciar esse processo, e o epitélio ao ser regenerado, tem a sua capacidade funcional restabelecida, o que garante a sobrevivência dos insetos mesmo quando expostos ao contaminante.

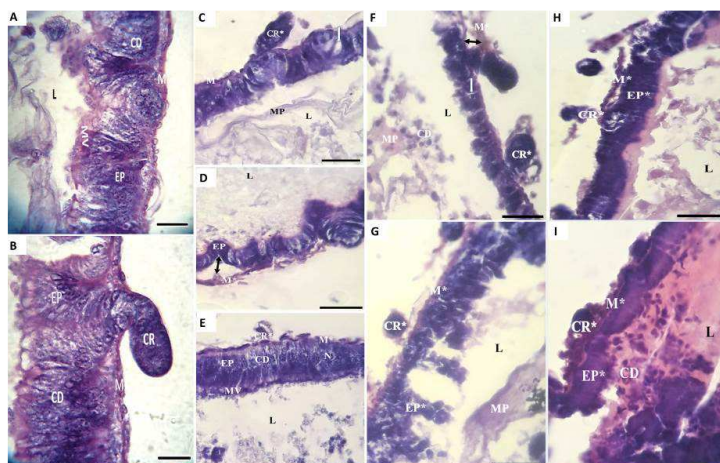


Figura 2. Micrografia de luz do intestino médio de *T. castaneum* adultos. Controle (A, B): células digestivas (CD), musculatura (M), microvilosidades (MV), lúmen (L), epitélio (EP), criptas regenerativas (CR). Barra = 100µm. Mesêntero de insetos expostos à AZAMAX a 25% (C,D,E) e 50% após 48 horas (F, G), 25% (H) e 50% (I) após 72 horas: criptas regenerativas degeneradas (CR\*), espaço intercelular (↓), descolamento da musculatura (↓), musculatura degenerada (M\*), núcleo (N). Mesêntero de insetos expostos ao inseticida: epitélio degenerado (EP\*). Barra = 100µm

## Conclusões

Devido a possível atuação da EST-5 na detoxificação metabólica do inseticida Azadiractina em *T. castaneum*, uma menor quantidade do contaminante deve ser absorvido. Desta forma, o epitélio do mesêntero inicia a regeneração, e, garante a sobrevivência de um grande número de insetos, evidenciando a importância desta região do sistema digestório para manutenção de diferentes processos fisiológicos do inseto.

## Agradecimentos

Agradecimentos a UEM pelo financiamento do projeto e ao laboratório de genética pelo suporte durante o desenvolvimento desse trabalho.

## Referências

GIGLIOLLI, A.A.S et al. Morpho-functional characterization and esterase patterns of the midgut of *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitized by *Gregarina cuneata* (Apicomplexa: Eugregarinidae). **Micron**, v:76, p. 68–78, 2015.

JULIO, A. H. F. ; GIGLIOLI, A. A. S. ; CARDOSO, K. A. K. ; DROSDOSKI, S. D. ; KULZA, R. A. ; SEIXAS, F. A. V. ; TAKASUSUKI, Maria Claudia C R ; SOUZA, M. C. G. ; LAPENTA, A.S. . Multiple resistance to pirimiphos-methyl and bifenthrin in *Tribolium castaneum* involves the activity of lipases, esterases, and laccase2. **Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology**, v. 195, p. 27-43, 2017.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: **Editores Santos**, 1983. 123p.