



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA BALDO RODRIGUES CARVALHO

**ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL DO CORPO GORDUROSO DE
LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Londrina
2008

RENATA BALDO RODRIGUES CARVALHO

**ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL DO CORPO GORDUROSO DE
LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Profa. Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C331e Carvalho, Renata Baldo Rodrigues.
Estudo histológico, histoquímico e ultraestrutural do corpo gorduroso de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidóptera : Noctuidae) / Renata Baldo Rodrigues Carvalho. – Londrina, 2008. 84f. : il.

Orientador: Ângela Maria Ferreira Falleiros.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.
Inclui bibliografia.

1. Lagarta da soja – Larva – Morfologia – Teses. 2. Histoquímica – Teses. 3. Lagarta da soja – Controle biológico – Teses. I. Falleiros, Ângela Maria Ferreira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 595.78

RENATA BALDO RODRIGUES CARVALHO

**ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL DO CORPO GORDUROSO DE
LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Antonio Cirino ZequiUNIFIL

Profa. Dra. Sheila Michele LevyUEL

SUPLENTES

Profa. Dra. Ana Cláudia SwarçaUEL

Profa. Dra. Fernanda Lassance MoniceUEL

Profa. Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de maio de 2008.

*A Deus, por estar presente em todas as dificuldades
Aos meus pais Misael e Valderez (in memoriam), pelo carinho e
dedicação
Ao meu esposo Sidiney pelo amor e paciência
À Ângela, orientadora, amiga e mãe por adoção*

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, em todas as dificuldades me amparou, na solidão me estendeu a mão, na tristeza me fez rir, no abandono resgatou-me com seu amor. O universo é pequeno para expressar minha gratidão e amor pelos anos de companheirismo e doação ao meu lado.

Aos meus filhos Filipe e Rafael, pela paciência e amor incondicionais durante a confecção desta dissertação, no brilho de seus olhares reflete-se minha alma.

Aos meus irmãos Renato e Rodrigo pelo carinho e atenção, minha eterna gratidão.

À minha orientadora não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, força espiritual e também pelos puxões de orelha (merecidos), que serão sempre lembrados com carinho.

Aos professores do departamento de Histologia, pelo carinho e paciência durante as fases de desvairio.

Ao meu amigo Fábio Goulart de Andrade, pai “desnaturado” que abandonou o projeto de filho (corpo gorduroso) sob meus cuidados, obrigada pelo companheirismo, carinho e ajuda.

À professora e amiga Sheila Michele Levy, pela ajuda, carinho e conselhos sempre de grande valia.

Ao Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina, por ter permitido o afastamento das atividades do laboratório, para o desenvolvimento desta dissertação.

À Embrapa Soja por fornecer a “matéria prima”, imprescindível à realização deste trabalho.

Ao laboratório de Microscopia e Microanálise da UEL, pela utilização dos microscópios de transmissão e varredura nos quais foram obtidas as eletron micrografias deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Sonhei que caminhava pela areia, acompanhado do Senhor, e que na tela da noite estavam sendo retirados todos os dias de minha vida.

Olhei para trás e vi que a cada dia em que passava o dia de minha vida, surgiam duas pegadas na areia: uma a minha e uma do Senhor. Assim continuamos andando até que todos os meus dias se acabaram.

Então parei e olhei para trás.

Reparei que, em certos lugares, havia apenas uma pegada. E esses lugares coincidiam justamente com os dias mais difíceis da minha vida. Os dias de maior angústia, de maior medo, de maior dor e de maior tristeza.

Perguntei então ao Senhor:

- Senhor, tu disseste que estaria comigo todos os dias da minha vida, e eu aceitei viver contigo. Mas porque Tu me deixaste nos piores momentos da minha vida?

E o senhor respondeu:

- Meu filho, eu te amo e sempre te amei.

Disse que estaria contigo por toda a tua caminhada e que não te deixaria um minuto sequer. E não te deixei.

Os dias em que tu viste apenas uma pegada na areia, foram os dias em que eu te carreguei!”

(Anônimo)

CARVALHO, Renata Baldo Rodrigues. **Estudo Histológico, Histoquímico e Ultraestrutural do Corpo Gorduroso de Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O corpo gorduroso (CG) dos insetos participa do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas promovendo o equilíbrio entre os recursos alimentares e as exigências energéticas durante o desenvolvimento do animal. Suas células respondem a alterações nutricionais e hormonais, suprindo as necessidades de crescimento, metamorfose e reprodução do inseto. A lagarta da soja, é uma praga importante da sojicultura e seu controle biológico é realizado pelo vírus AgMNPV. A infecção viral em insetos acarreta alterações na composição da hemolinfa, que são geralmente atribuídas à patogenicidade viral no corpo gorduroso, já que ele é o órgão responsável, entre outras funções pela síntese da maioria dos elementos constituintes da hemolinfa. A literatura oferece dados sobre os aspectos biológicos e comportamentais desta lagarta, porém pouco se conhece sobre a sua morfologia interna, sendo ausentes as descrições deste órgão, até mesmo em condições de não patogenia. Este trabalho descreve a morfologia do CG da lagarta da soja e a composição química de suas células, pelo PAS (polissacarídeos), Sudan Black B (lipídeos), Fast Green (proteínas) e Tricrômico de Mallory (conjuntivo). Morfologicamente o CG apresenta a porção parietal (PA) e a perivisceral (PV). A PA é uma fita alongada de aspecto granuloso e delicado, que ocupa posição periférica, abaixo do tegumento e lateral ao tubo digestivo. Suas células, os trofócitos, são altas, cilíndricas e recobertas por uma lâmina acelular com projeções filiformes. O citoplasma é acidófilo com intensa vacuolização, e núcleo de formato e localização variável. O REG é bem desenvolvido, distribuído na periferia e ao redor do núcleo, com numerosas cisternas dilatadas; as ilhas de glicogênio são grandes, numerosas e distribuídas ao redor das gotículas de lipídeo. A PV é escassa e dorsal, aderida ao tubo digestivo. Suas células são pequenas, arredondadas, formando aglomerados em forma de cacho recobertos por uma lâmina acelular lisa. O citoplasma é ligeiramente basófilo com grande vacuolização; núcleo central e formato variado. O REG é predominante na periferia e contém poucas cisternas dilatadas; o complexo de Golgi é pouco desenvolvido; as ilhas de glicogênio são pequenas e distribuídas, juntamente com as gotículas de lipídeos, ao redor do núcleo. Histoquimicamente a PA e a PV apresentaram: reação positiva ao PAS, com maior intensidade na PA e com diferenças na distribuição dos grânulos de glicogênio; vacúolos positivos para lipídeos, sendo que na PV estes eram maiores e mais numerosos e grânulos de tamanhos variados fortemente positivos ao Fast Green. A lâmina acelular reagiu fracamente ao Sudan Black B e Fast Green, e negativa ao PAS e se revelou de natureza conjuntiva pelo tricrômico. Ambas as porções estão envolvidas com os processos de síntese proteica e polissacarídica e com a armazenagem de lipídeos, sendo que a PV se revelou com grande capacidade de armazenar lipídeos. A organização, arquitetura, distribuição e composição histoquímica do CG nestas larvas são similares às de outros lepidópteros, porém com variações estruturais e de componentes químicos em suas células, o que permite inferir que as duas porções possam apresentar funções diferenciadas no mesmo indivíduo e também com o estágio estudado.

Palavras-chave: Trofócitos. Morfologia. Controle biológico. Pragas da soja.

CARVALHO, Renata Baldo Rodrigues. **Histological, Histochemical and Ultrastructural Study of the Larvae Fatty Body *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2008. 88p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The fatty body of the insects participates of the lipids metabolism, carbohydrates and proteins promoting the food balance resources and energetic demands during the animal development. Its cells respond to nutritional and hormonal variations, providing needs of growth, insect metamorphosis and reproduction. Soy caterpillar is an important pest of soy plantation and its biological control is carried out by the virus AgMNPV. The viral infection in insects leads to hemolymph composition alterations, which is generally attributed to the pathogenesis viral in the fatty body, once it is the responsible organ, among other functions for the synthesis of most hemolymph constituent elements. The literature offers data on biological and behavioral aspects of this caterpillar, however, little is known about its internal morphology, there is not enough description of this organ, and not even about its pathogenic conditions. This paper describes the morphology of soy caterpillar fatty body and its cells chemical composition, by the PAS (Polysaccharides), Sudan Black B (lipids), Fast Green (proteins) and Trichromic of Mallory (conjunctive). Morphologically the Fatty body presents parietal (PA) and perivisceral (PV) portion. The parietal portion is a lengthened strip with grainy and delicate aspect, which occupies a peripheral position, below the tegument and besides the digestive tube. Its cells, the trophocytes, are high, cylindrical and recovered by an acellular lamina. The cytoplasm is an acidophil with intense vacuolization and variable format nucleus and location. REG is well developed, distributed in the periphery and around the nucleus, with numerous dilated cisterns; the islands of glycogen are big, numerous and distributed around droplets of lipids. The PV is scarce and dorsal, attached to the digestive tube. Its cells are small, round, forming artificial groups in the form of a bunch recovered by a flat acellular lamina. The cytoplasm is lightly basophile with great vacuolization; central nucleus and varied format. REG is predominant in the periphery and it contains few dilated cisterns; Golgi complex is not much developed; the islands of glycogen are small and distributed, jointly with the droplets of lipids, around the nucleus. Histochemically PA and PV presented: positive reaction to PAS, with bigger intensity in the PAS and with differences in the glycogenic granules distribution; lipids positives vacuoles, once in the PV these were bigger and more numerous and granules of varied sizes strongly positive to a Fast Green. The acellular lamina reacted weakly to Sudan Black B and Fast Green, and negatively to PAS and it was revealed as conjunctive nature by the Trichromic. Both portions are involved by the processes of protein and polysaccharide synthesis and by lipids storage, PV revealed itself with great capacity of store lipids. The organization, architecture, distribution and Histochemical composition of these larvae fatty body are similar to other Lepidoptera, however with structural variations and with chemical components in its cells, which allows inferring that two portions could present specific functions in the same individual and also with the studied training.

Keywords: Trophocytes. Morphology. Biological Control. Soybean pests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> com características gerais de identificação	16
Figura 2.2 – Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentando-se de folhas de soja	17
Figura 2.3 – Fotomicrografia dos Nucleopoliedrovirus replicando-se no interior do núcleo dos hemócitos de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	19
Figura 4.1 – Localização e distribuição do corpo gorduroso de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar – sem coloração e com coloração verde luz	47
Figura 4.2 – Corpo gorduroso de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar porções parietal (PA) e perivisceral (PV)	48
Figura 4.3 – Ultraestrutura de Transmissão do corpo gorduroso Parietal de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar	49
Figura 4.4 – Ultraestrutura de Transmissão do corpo gorduroso Parietal de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar	50
Figura 4.5 – Ultraestrutura de Transmissão do corpo gorduroso Perivisceral de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar	51
Figura 4.6 – Ultraestrutura de Varredura do corpo gorduroso Parietal de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar	52
Figura 4.7 – Ultraestrutura de Varredura do corpo gorduroso Perivisceral de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar	53
Figura 4.1 – Corpo gorduroso Parietal de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar, coloração pelo Tricrômico de Mallory	78
Figura 4.2 – Corpo gorduroso Parietal e Perivisceral de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar submetidos a técnica do PAS	79
Figura 4.3 – Corpo gorduroso Parietal e Perivisceral de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em 4 ^o ínstar submetidos as técnicas de Sudan Black B e Fast Green	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Resultados Histoquímicos do Corpo Gorduroso de <i>A. gemmatalis</i>	75
---	----

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A SOJA	14
2.2 CONTROLE DA LAGARTA DA SOJA	17
2.3 BACULOVÍRUS	18
2.4 RESISTÊNCIA DA LAGARTA DA SOJA AO AgMNPV	20
2.5 MECANISMOS DE DEFESA NOS INSETOS	21
2.6 CORPO GORDUROSO	23
2.7 HISTOQUÍMICA	26
2.7.1 Lipídeos	26
2.7.2 Carboidratos	27
2.7.3 Proteínas	28
2.8 REFERÊNCIA	29
3 ARTIGO 1 - ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRAESTRUTURAL DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 OBTENÇÃO DE INSETOS	38
2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO CORPO GORDUROSO	39
3 ANÁLISE HISTOLÓGICA	39
3.1 MICROSCOPIA DE LUZ	39
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	41
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	42
4 RESULTADOS	42
4.1 ANATOMIA	42
4.2 MICROSCOPIA DE LUZ (ML)	43
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	44

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	45
5 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	46
6 DISCUSSÃO	57
6.1 MORFOLOGIA DO ÓRGÃO	57
7 CONCLUSÕES	63
8 REFERÊNCIA.....	64

4 ARTIGO 2: ESTUDO HISTOQUÍMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS

DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE). 67

RESUMO	67
ABSTRACT.....	68
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 OBTENÇÃO DE INSETOS	70
2.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO CORPO GORDUROSO	71
3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA.....	72
4 RESULTADOS	75
5 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	77
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	84
8 REFERÊNCIA.....	85
9 CONCLUSÕES GERAIS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente na produção de soja, sendo esta cultura de grande importância no complexo agroindustrial do país. Os incentivos científicos e tecnológicos para aumentar a qualidade e a produtividade deste grão têm sido estrategicamente intensificados. Dentre estes, o combate às pragas que atacam a soja é cada vez mais criterioso, sendo que o manejo integrado de pragas (MIP) vem garantindo sucesso ao seu cultivo.

Considerando as vantagens da produção mais econômica, da diminuição do impacto ambiental, do aumento da segurança alimentar e da menor exposição dos trabalhadores rurais a substâncias tóxicas, o controle biológico mostra-se como uma alternativa bastante viável para a agricultura. Hoje é possível reduzir em até 60% a aplicação de agrotóxico com o uso de manejo ecológico adequado.

O controle biológico da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* (HÜBNER, 1818) é realizado preferencialmente pela aplicação do bioinseticida formulado à base do *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV), vírus da poliedrose nuclear multicapsídeo, específico para este inseto. Entretanto o aparecimento de larvas resistentes a esse vírus, mesmo que em laboratório, tem suscitado discussões em busca de novos conhecimentos e tecnologias para o entendimento dessa resistência.

Embora exista uma ampla literatura sobre os aspectos biológicos e comportamentais das larvas de *A. gemmatilis*, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de defesa frente ao AgMNPV.

O corpo gorduroso (CG) dos insetos é um órgão de múltiplas funções metabólicas, que participa diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas nos insetos (CHAPMAN, 1998; ELDRIDGE; EDMAN, 2004). Funcionalmente é análogo ao fígado dos vertebrados e hepatopâncreas dos crustáceos (STANLEY, 2006). Além de armazenar lipídio em quantidades maciças (NIJHOUT, 1998) é o órgão responsável pela síntese da trealose, desaminação e transaminação de aminoácidos, bem como da remoção de sais de cálcio, uratos e outros produtos nitrogenados da hemolinfa, que são posteriormente excretados pelos túbulos de Malpighi (WIGGLESWORTH, 1984; KRITSKY, 2002). Em lepidópteros, as células do CG são capazes também de realizar fagocitose e participar da remodelação tecidual na metamorfose (WIGGLESWORTH, 1984).

O significado biológico deste órgão consiste na sua habilidade de manter um equilíbrio entre recursos alimentares e exigências energéticas durante o desenvolvimento do inseto. Durante períodos em que o inseto se alimenta ativamente, o corpo gorduroso sintetiza e acumula suas moléculas de reserva que poderão ser catabolisadas em períodos de escassez alimentar. Muitas das respostas às necessidades fisiológicas ocorrem em uma escala relativamente grande e podem ter o impacto substancial na biologia do inseto (STANLEY, 2006). Assim, as células do CG podem alterar suas atividades em resposta a sinais nutricionais e hormonais para suprir as necessidades de crescimento do inseto, metamorfose e reprodução (GULLAN; CRANSTON, 2005) variando também sob condições ambientais diversas (CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1983).

Sabe-se que as células do corpo gorduroso (CG), são alvos da infecção viral, e que esta mesmo sendo secundária, acarreta interferência direta na síntese de componentes da hemolinfa relacionados à defesa humoral. Entretanto, não é encontrado na literatura especializada, informações sobre a constituição do CG da lagarta da soja, bem como o envolvimento deste órgão nos mecanismos relacionados à suscetibilidade e resistência das lagartas ao AgMNPV.

Deste modo, para estimar o grau de resposta à infecção, faz-se necessário desenvolver previamente o estudo do órgão alvo, ou seja, do CG, em condições de desenvolvimento não patológico, fundamentado na ausência de informações na literatura especializada sobre este tecido em *A. gemmatalis*, no estágio larval.

Diante destes propósitos, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Caracterizar a organização e distribuição do corpo gorduroso de larvas do 4^o instar de *A. gemmatalis*;
- ✓ Descrever a morfologia do corpo gorduroso sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- ✓ Identificar a composição histoquímica do corpo gorduroso;
- ✓ Comparar os dados obtidos com o que já foi descrito na literatura para outros insetos.

* Este trabalho foi elaborado em conformidade com as “Normas do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UEL para apresentação de Dissertações e Teses – ABNT/NBR 6023: 2002 “com modificações”.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SOJA

A soja é uma planta pertencente à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydae, ordem Rosales, subordem Leguminosinae, família Leguminosae, subfamília Papilionaceae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* (Moench) e à espécie *Glycine max* (L.) Merrill (GAZZONI, 1994).

A soja é originária da China, onde é conhecida desde aproximadamente 2000 a.C. Sua chegada ao continente americano ocorreu no final do século XVIII e o primeiro registro no Brasil data de 1882, no estado da Bahia. Entretanto, a notável expansão do cultivo de soja no Brasil ocorreu somente a partir de 1970, passando então a figurar entre os principais produtos rentáveis ao país (FERRAZ, 2001).

Os principais estados brasileiros, por ordem de produção são: Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, representando juntos aproximadamente 70% da produção nacional (BISOTTO; FARIAS, 2001).

A principal forma de utilização da soja ocorre através do consumo de óleo e derivados. O farelo residual da indústria do óleo é utilizado para alimentação animal. Grande parte da produção é exportada e, somada à exportação do farelo, resulta em importante geração de divisas para o país (ALMEIDA, 1997).

Atualmente, a soja pode ser encontrada em muitos alimentos além daqueles mais tradicionais como shoyu, tofu e cereais. O grão tem sido utilizado como ingrediente de biscoitos, chocolates, margarina e temperos. O interesse por produtos como leite de soja e suco de frutas enriquecido com soja têm aumentado cada vez mais. A melhoria mercadológica não se refletiu apenas nas embalagens, mas no próprio sabor do produto, tornando-o mais palatável e fazendo com que os valores nutricionais do grão fossem cada vez mais conhecidos.

A soja é uma excelente fonte de minerais como ferro, potássio, fósforo, cálcio, e vitaminas do complexo B (FEDERAÇÃO, 2003). É rica em proteínas, possui isoflavonas e ácidos graxos insaturados que têm ação na prevenção de doenças crônico-degenerativas como a osteoporose (RICKARD et al., 2003).

Além dos produtos comestíveis, a soja também é muito utilizada pela

indústria, estando presente em desinfetantes, inseticidas, tecidos, tintas para impressão, óleo refogado, produtos farmacêuticos e medicinais, revestimentos, plastificadores, massa para vidraceiro, sabão e cimento à prova d'água. A lecitina, um dos derivados da soja, é usada na fabricação de álcool, tintas, cosméticos, pigmentos, produtos químicos e até como agente antiderrapante (FEDERAÇÃO, 2003).

Embora seja uma planta originária de regiões temperadas, ela se adapta bem em uma ampla faixa de temperatura, o que possibilita seu cultivo nos climas subtropical e tropical. As temperaturas médias, ótimas para o melhor desenvolvimento da soja estão entre 20 e 35° C. Precipitações pluviométricas anuais de 700 a 1.200 mm bem distribuídas preenchem perfeitamente suas necessidades hídricas (DIEHL; JUNQUETTI, 2002).

A época de semeadura é um dos fatores que mais influenciam o rendimento da soja, pois determina sua exposição à variação dos fatores climáticos limitantes. No Estado do Paraná a época de semeadura indicada estende-se de outubro a dezembro (HÜBNER, 2003).

A soja possui grande diversidade quanto ao ciclo (número de dias da emergência à maturação), que pode durar de 100 a 160 dias nas variedades brasileiras. O ciclo total da planta pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa abrange o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores e a fase reprodutiva compreende o período do início da floração até a maturação. A estatura da planta é altamente dependente das condições ambientais, apresentando altura média de 60 a 120 cm. O período total de florescimento pode durar de 3 a mais de 5 semanas, dependendo do genótipo e do ambiente (VERNETTI, 1983).

Desde o início do cultivo da soja no Brasil, os agricultores vêm se preocupando com os prejuízos causados por pragas, especialmente insetos. Várias espécies de insetos estão associadas a essa leguminosa, porém poucas são consideradas pragas-chave ou potencialmente nocivas à soja. Os insetos considerados “pragas verdadeiras” ou “pragas-chave” são assim classificados devido sua ocorrência ter sido registrada em todas ou quase todas as regiões produtoras de soja (FUNDAÇÃO CARGIL, 1986).

A Convenção Internacional de Proteção de Plantas (IPPC/FAO) definiu o termo praga, como sendo qualquer organismo vivo que constitua uma ameaça à produção ou à qualidade de produtos agropecuários, podendo ser vertebrados, invertebrados, fitopatógenos e plantas daninhas (EMBRAPA SOJA, 1998).

Dentre os insetos são consideradas como principais pragas da soja, as lagartas desfolhadoras *A. gemmatalis*, conhecida como lagarta da soja, *Pseudoplusia*

inclusens (WALKER, 1857), os percevejos fitófagos *Nezara viridula* (LINNAEUS, 1758), *Piezodorus guildini* (WESTWOOD, 1837) e *Euschistus heros* (FABRICIUS 1794) (FUNDAÇÃO CARGIL, 1986).

A lagarta da soja apresenta desenvolvimento do tipo holometábolo e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (DIEHL; JUNQUETTI; SAVOLDI, 2002).

Na fase adulta de *A. gemmatalis*, que dura em média 15 dias, a mariposa apresenta envergadura de 30 a 38 mm e coloração variando de cinza, marrom avermelhado ou amarelado sem dimorfismo sexual. A ovoposição ocorre na face inferior das folhas, podendo durar até 3 dias. Os ovos são arredondados e achatados na superfície inferior, com 1 a 2 mm de diâmetro e apresentam cor branca até a eclosão da larva, após a qual adquirem coloração rosa. O período larval pode durar até 25 dias, podendo ocorrer seis instares. A lagarta pode atingir 48 mm de comprimento e sua coloração é variável, apresentando listras longitudinais verde-escuras proeminentes e listras estreitas nas cores branca, amarela ou rosa (Figs. 2.1 e 2.2).

No estágio de pré-pupa, que dura em média 2 dias, as larvas encolhem atingindo um comprimento médio de 25 mm e adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais.

O estágio pupal dura em média 7 dias. As pupas são lisas, podendo apresentar cor verde ou marrom, com 18 a 20 mm no comprimento e 4 a 6 mm na largura. São encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de aproximadamente 2 cm (BARBARA, 2003).



Figura 2.1 – Larvas de *A. gemmatalis** com características gerais de identificação

*Fonte: <http://www.ipmimages.org/images/768x512/2722030.jpg>

Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatalis*, que a princípio raspam as folhas da soja, com seu desenvolvimento passam a

provocar prejuízos consideráveis comendo tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até a fase de pré-pupa (Figs. 2.1 e 2.2).

Durante a fase larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes sua própria massa a cada 24 horas (GALLO et al., 2002).



Figura 2.2 – Larvas de *A. gemmatalis* alimentando-se de folhas de soja (*Glicine max*)*

*Fonte: <http://www.ipmimages.org/images/768x512/5110006.jpg>

2.2 CONTROLE DA LAGARTA-DA-SOJA

O controle de pragas, principalmente em sistemas de produção agrícola é realizado mediante aplicações frequentes de inseticidas químicos, como método predominante para reduzir o risco de danos econômicos em lavouras. Embora o controle químico seja importante para este fim, o uso de produtos de alta toxicidade e de amplo espectro pode resultar em efeitos adversos ao homem e ao ambiente (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

O controle químico de pragas resulta no aumento do custo de produção, trazendo problemas tanto para o produtor quanto para o consumidor, e para o ambiente. O mercado mundial de defensivos agrícolas chega a valores próximos de US\$ 1,8 bilhões, sendo os inseticidas e os acaricidas responsáveis por 30% do total. O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos, devido à necessidade de novas formulações mais adequadas às pragas, que se tornam mais resistentes ao seu uso, o que tem feito crescer o interesse pela pesquisa de inseticidas alternativos, como os bioinseticidas (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001).

Os bioinseticidas apresentam custo menor que os inseticidas químicos e maior tempo de vida útil dado à dificuldade da praga em se tornar resistente ao seu uso, além

de serem mais específicos e menos poluentes. Porém, em contrapartida exigem estudos mais aprofundados, tanto no isolamento de novos patógenos como nos testes de seleção, produção e formulação.

Vários países utilizam bioinseticidas para o controle de pragas da lavoura, sendo que esses agentes, atualmente representam mais de 2% do mercado de inseticida do mundo (RIBEIRO; PINEDO, 2001).

As estratégias utilizadas para o controle biológico consistem na regulação do número de vegetais e animais por seus inimigos naturais, sendo realizado através da utilização racional de patógenos, visando à manutenção da população de pragas a níveis abaixo dos de dano econômico (ALVES, 1998).

Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (SOUZA et al., 2002). O Brasil possui o maior programa mundial de uso de baculovírus para o controle de insetos, implantado no início da década de 1980 pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), através do emprego do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI, 1998; RIBEIRO; PINEDO, 2001).

2.3 BACULOVIRUS

Os baculovirus são vírus com DNA dupla fita que infectam principalmente artrópodes (FREDERICI, 1986) e, como são específicos aos seus hospedeiros, constituem agentes ideais para o controle de pragas, sem riscos aos vertebrados, a outros organismos não visados e ao meio ambiente (MOSCARDI; SOUZA, 2002). Os baculovírus representam um dos mais conhecidos e bem estudados grupos de vírus, atuando somente sobre a fase larval do inseto, não apresentando efeito direto sobre as fases do ovo, pupa ou adulto (RIBEIRO; PINEDO, 2001; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

A família *Baculoviridae* é composta por dois gêneros: os granulovirus (GV) e os nucleopoliedrovirus (NPV). Os GV são caracterizados pelo formato de cápsula ou grânulos dos seus nucleocapsídeos, com diâmetro inferior a 0,5 μm e constituídos principalmente pela proteína granulina. Já os NPV produzem, no núcleo das células infectadas, nucleocapsídeos com formato poliédrico e diâmetro de 0,5 - 15 μm , constituídos de poliedrina. Uma peculiaridade dos baculovírus é a produção de dois tipos de vírus

fenotipicamente distintos, os vírus extracelulares (BV) e os vírus derivados do corpo de inclusão (CPI) (SOUZA et al., 2002).

Os BV ou “budded virus” são produzidos na fase inicial da infecção, sendo responsáveis pela disseminação do vírus de célula a célula, dentro do inseto. A outra forma do vírus é produzida na fase tardia da infecção e resulta da oclusão de virions em corpos protéicos de inclusão (CPI). Essa forma do vírus é denominada de corpo de inclusão ou poliedro e é responsável pela disseminação do vírus entre insetos, no meio ambiente (RIBEIRO; PINEDO, 2001; SOUZA et al., 2002).

A lagarta da soja ao se alimentar de partes da planta hospedeira contaminadas com CPI, propicia a penetração dos corpúsculos virais no seu sistema digestivo. O pH alcalino do intestino médio propicia a solubilização dos CPI, liberando os virions. Estes são formados por um nucleocapsídeo envolto por um envelope viral que se fundem às membranas das microvilosidades das células epiteliais do intestino. Em seguida, os nucleocapsídeos migram no citoplasma da célula e penetram através dos poros nucleares, atingindo o núcleo, liberando o DNA viral, ocorrendo então à transcrição dos genes do vírus e a replicação do seu genoma (Fig. 2.3). Nessa fase primária de infecção são sintetizados no núcleo apenas nucleocapsídeos (FUNK et al., 1997; CASTRO et al., 1999).

Esses nucleocapsídeos saem do núcleo, migram para a base da célula e atravessam a membrana basal, adquirindo um novo envelope, sendo então chamados de BV. Estes, atingindo a hemolinfa e o sistema traqueal do inseto, espalham-se e provocam infecções secundárias em outros tecidos como os túbulos de Malpighi e o corpo gorduroso. Nas células destes tecidos ocorre a formação de mais BV que se disseminam de célula a célula.

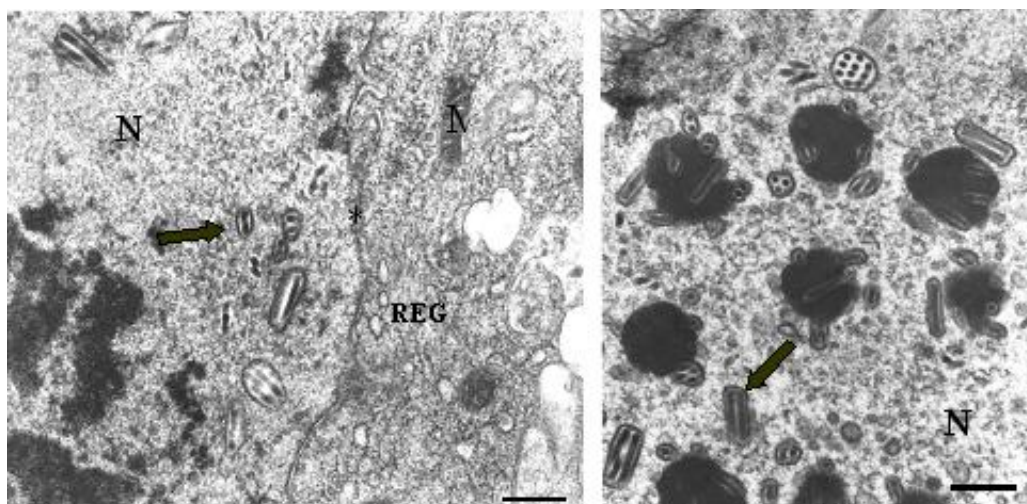


Figura 2.3 – Nucleopoliedrovírus replicando-se no interior do núcleo (N) dos hemócitos de larvas de *A. gemmatalis*. Partícula viral (➔) com envelope, (*)membrana nuclear, (M) mitocôndria, (REG) retículo endoplasmático rugoso. Barra = 0,25 μm (Fonte: Levy, S.M. 2005).

Em estágios avançados da infecção, há a formação de CPI, nos quais ocorre a oclusão dos virions. Gradativamente, os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de CPI, havendo a ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de CPI na hemolinfa do hospedeiro (FUNK et al., 1997; CASTRO et al., 1999).

Durante o processo infeccioso, o inseto torna-se debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, apresentando o comportamento característico de se deslocar para as partes superiores da planta hospedeira indo a óbito em aproximadamente 8 dias após a infecção, apresentando o corpo descolorido (amarelo-esbranquiçado) em relação à lagarta sadia. Em aproximadamente 2 dias após a morte, o corpo da lagarta se rompe e libera grande quantidade de CPI sobre partes da planta. Dessa forma, lagartas infectadas ou mortas servem de inóculo do vírus, disseminando-o por meio da chuva e do movimento de artrópodes nas plantas, bem como pela predação e parasitismo em insetos infectados (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

2.4 RESISTÊNCIA DA LAGARTA DA SOJA AO AgMNPV

Utilizado em aproximadamente 2,0 milhão de hectares cultivados com soja no Brasil, o AgMNPV proporciona ao país, uma economia estimada em 13 milhões de reais/ano, uma vez que elimina a aplicação de cerca de 1,2 milhão de litros de inseticidas nas lavouras brasileiras (EMBRAPA SOJA, 2002). Este fato aliado à crescente exigência mundial de não contaminação ambiental vem aumentando a utilização do bioinseticida, o que tem acarretado uma maior pressão de seleção sobre a população de insetos no campo. O aumento desta pressão demonstrou que a *A. gemmatilis* tem alto potencial para desenvolver resistência ao AgMNPV (ABOT et al., 1995; ENGELHARD; VOLKMAN, 1995).

O surgimento de indivíduos resistentes em uma população pode estar condicionado a múltiplos fatores que influenciam no desenvolvimento de resistência a vírus em populações de insetos no campo: como os fatores genéticos, frequência de alelos resistentes, histórico de exposição a outros vírus (epizootias naturais ou individuais), fatores biológicos ou ecológicos, como número de gerações por ano, persistência do patógeno no ambiente, e estágio de desenvolvimento exposto (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2001).

Baseado nisso, a resistência a um vírus por parte de uma lagarta pode ocorrer em dois aspectos fundamentais: uma resistência generalizada de todas as células do

inseto, que se transformam em não suscetíveis ao vírus, ou uma resistência localizada nas estruturas responsáveis pela entrada do vírus no organismo, como o tubo digestivo por onde a infecção se inicia (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2001).

Em estudos visando verificar o possível desenvolvimento de resistência de populações de *A. gemmatalis* ao AgMNPV (FUXA; RICHTER, 1990; ABOT et al., 1995, 1996), foi demonstrado que em populações de insetos, após 15 gerações submetidas à pressão de seleção por vírus em laboratório, foram capazes de desenvolver resistência acima de 1000 vezes, quando comparadas aos insetos suscetíveis (ABOT et al., 1996). Segundo Fuxa e Richter (1990), as larvas podem retornar ao nível de suscetibilidade original quando esta pressão é removida. Moscardi e Sosa-Gómes (1993) afirmaram, entretanto, que esta recuperação é lenta, e nem sempre alcança os níveis originais.

O aparecimento de lagartas resistentes ao AgMNPV, mesmo que em laboratório e sob pressão de seleção levou os pesquisadores a questionar sobre quais os mecanismos da defesa da lagarta estariam envolvidos nesta resistência (ABOT et al., 1996).

Abot et al (1995) e Moscardi (1998) indicam a possibilidade desta resistência ser atribuída a mecanismos de defesa diferencial.

2.5 MECANISMOS DE DEFESA NOS INSETOS

Nos insetos, a cutícula e exoesqueleto apresentam componentes antimicrobianos que impedem a penetração de bactérias, vírus e protozoários na hemocele, constituindo assim, a primeira linha de defesa contra patógenos e parasitas (BULET et al., 1999). Internamente, a presença da membrana peritrófica, que recobre as células epiteliais do tubo digestivo, também representa um mecanismo de defesa aos patógenos que porventura atinjam o intestino dos insetos por via oral (SILVA, 2002).

Todavia, uma vez que o patógeno vence estas barreiras e atinge a hemocele do inseto, desencadeia a defesa hemocitária, que segundo Bulet et al. (1999) seria a resposta imunológica.

A defesa imunológica nos insetos, como nos vertebrados, pode ser subdividida em dois componentes: um componente humoral e outro celular representado pelos hemócitos (NIERE et al., 1999).

No componente humoral do sistema de defesa dos insetos, não foram evidenciadas imunoglobulinas específicas (anticorpos monoclonais) para reconhecimento de antígenos (WILLOTT et al., 1994; NIERE et al., 1999; SILVA, 2002). Sabe-se hoje que os insetos possuem um sistema de reconhecimento de patógenos capaz de ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e de coordenar a expressão de vários genes (FRANC; WHITE, 2000).

Sabe-se que alterações ocorridas na composição da hemolinfa em insetos infectados por vírus são geralmente atribuídas à perturbação viral no CG, órgão responsável, entre outras funções pela síntese da maioria dos elementos constituintes da hemolinfa (HAPNER; STEBBINS, 1986; NIJHOUT, 1998).

A habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico de qualquer organismo. Nos insetos, a natureza das moléculas de reconhecimento não está bem definida. Alguns receptores associados à membrana dos hemócitos e outros solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas (PATHAK, 1993a).

As aglutininas constituem um grupo heterogêneo de moléculas de glicoproteínas, não-imunoglobulinas e que não apresentam atividades enzimáticas, identificadas pela capacidade de se ligarem a resíduos de carboidratos específicos, como também a açúcares livres ou partes de oligo ou polissacarídeos (FELTON; GATEHOUSE, 1996). Podem estar presentes em microrganismos, plantas e animais, vertebrados e invertebrados, podendo ser identificadas e detectadas por sua capacidade de aglutinar diferentes tipos de células alvo, tais como hemácias, bactérias, fungos, protozoários, espermatozoides, dentre outros (OLAFSEN, 1986). Quando estas aglutininas têm determinado o tipo de carboidrato específico de ligação, são então denominadas de lectinas.

As lectinas representam uma classe de glicoproteínas que participam de muitos processos biológicos, que se liga a glicolipídios, glicoproteínas ou polissacarídeos na superfície de células animais, causando a sua aglutinação e ou precipitação. As unidades glicídicas dessas moléculas têm grande potencial para codificar informações biológicas (PATHAK, 1993b).

Nos insetos, as lectinas são produzidas pelo corpo gorduroso e pelos hemócitos (ROWLEY, et al., 1986) durante os processos infecciosos, nas injúrias do tegumento e na degradação dos tecidos durante os estágios de desenvolvimento (BOUCIAS; PENDLAND, 1993; DRIF; BREHÉLIN, 1993; KAWASAKI et al, 1996).

As lectinas têm sido detectadas na hemolinfa, agindo como opsoninas (proteínas que se fixam e transformam as propriedades da superfície dos patógenos), aglutinando os microrganismos, e como receptores na membrana dos hemócitos, auxiliando-os no reconhecimento e na fagocitose dos tecidos (GREGÓRIO, 1990; PATHAK, 1993b).

Os componentes humorais e celulares estão inter-relacionadas, pois os hemócitos secretam fatores humorais que, por sua vez, estão envolvidos nas atividades destas células (TANADA; KAYA, 1993).

Os hemócitos são as células circulantes na hemolinfa dos insetos, responsáveis pelas reações de defesa, fornecendo uma resposta ágil e eficiente contra agentes estranhos que penetram sua hemocele (FALLEIROS; GREGÓRIO, 1995; INOUE; BELLONCIK, 1989). Apresentam morfologia variável e funções distintas, como reconhecimento, fagocitose, formação de nódulos, encapsulação, coagulação e citotoxicidade (GUPTA, 1985; RATCLIFFE et al., 1985).

2.6 CORPO GORDUROSO

A denominação “corpo gorduroso” deriva da semelhança deste órgão com o tecido adiposo de vertebrados (STANLEY, 2006), além do fato de frequentemente armazenar lipídio em quantidades maciças (NIJHOUT, 1998).

Análogo ao fígado dos vertebrados, o CG é um órgão de múltiplas funções metabólicas, que participa diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas nos insetos (CHAPMAN, 1998; ELDRIDGE; EDMAN, 2004).

O CG é o órgão responsável pela síntese da trealose, desaminação e transaminação de aminoácidos, bem como da remoção de sais de cálcio, uratos e outros produtos nitrogenados da hemolinfa, que são posteriormente excretados pelos túbulos de Malpighi (WIGGLESWORTH, 1984; KRITSKY, 2002). Em lepidópteros, as células do CG são capazes também de realizar fagocitose e participar da remodelação tecidual na metamorfose (WIGGLESWORTH, 1984).

O significado biológico deste órgão consiste na sua habilidade de manter um equilíbrio entre recursos alimentares e exigências energéticas durante o desenvolvimento do inseto. Durante períodos em que o inseto se alimenta ativamente, o corpo gorduroso sintetiza e acumula suas moléculas de reserva que poderão ser catabolisadas em períodos de escassez

alimentar. Muitas das respostas às necessidades fisiológicas ocorrem em uma escala relativamente grande e podem ter o impacto substancial na biologia do inseto (STANLEY, 2006). Assim, as células do CG podem alterar suas atividades em resposta a sinais nutricionais e hormonais para suprir as necessidades de crescimento do inseto, metamorfose e reprodução (GULLAN; CRANSTON, 2005) variando também sob condições ambientais diversas e nos quadros patológicos (CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1983).

Nos insetos em estágio larval, as células do CG estão envolvidas na síntese, secreção e troca de proteínas e no acúmulo de lipídeos. A pupa preserva parte dessas reservas e no adulto o corpo gorduroso está envolvido na mobilização e utilização das mesmas. Essas mudanças funcionais estão acompanhadas por um intenso processo de remodelamento tecidual que ocorre durante o desenvolvimento (CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1983).

Em muitos insetos, principalmente em larvas de holometábolos, o CG é um componente evidente da anatomia interna e apresenta-se como um tecido opaco, branco ou amarelado, suspenso na hemocele (SNODGRASS, 1993; GULLAN; CRANSTON, 2005). É um órgão difuso, localizado principalmente no abdômen, podendo ser encontrado no tórax e na cabeça do inseto, desigualmente distribuído entre todos os segmentos do corpo do inseto, entremeado em outros tecidos (CHAPMAN, 1998; ELDRIDGE; EDMAN, 2004).

Em geral, duas porções de CG são reconhecidas, com base na sua localização em cada parte do corpo: parietal ou subepidermal (distribuído abaixo do tegumento e periférico ao tubo digestivo) e perivisceral (distribuído ao redor do tubo digestivo e órgãos reprodutores) (GULLAN; CRANSTON, 2005).

Sua morfologia varia consideravelmente entre os vários grupos de insetos, porém é constante em cada espécie (WIGGLESWORTH, 1984). Em geral é formado por pequenos agregados, frouxos e irregulares de células, geralmente arredondadas ou poliédricas, com núcleo central e irregular (RICHARDS; DAVIES, 1994), envolvidos por delgada lâmina de tecido conjuntivo, localizadas próximas aos principais órgãos, incluindo os reprodutores, o tubo digestivo, os músculos e os elementos do sistema nervoso. Esta associação, além do seu contato íntimo com a hemolinfa circulante, permite uma troca constante de moléculas entre a maioria dos tecidos e órgãos (WIGGLESWORTH, 1984; RICHARDS; DAVIES, 1994; STANLEY, 2006).

Sua principal característica morfológica é a presença de gotas de glicogênio e lipídio no seu citoplasma (HARRISON; LOCKE, 1998). Segundo Oliveira e Cruz-Landim, 2003, estas células não são simples depósitos de lipídeos, elas estocam também proteínas e açúcares.

O CG tem origem mesodérmica, e às vezes também apresenta células de origem ectodérmica. As células de origem mesodérmica são os trofócitos e seus derivados, e as de origem ectodérmica os oenócitos (OLIVEIRA, CRUZ-LANDIM, 2003).

Os trofócitos são as principais células constituintes do CG dos insetos e na maioria das ordens, representam o único tipo celular encontrado neste órgão (CHAPMAN, 1998). São responsáveis pela maioria das funções metabólicas do órgão (RICHARDS; DAVIES, 1994), pois apresentam grande diversidade funcional sendo comparadas aos hepatócitos nos vertebrados (HARRISON; LOCKE, 1998).

Como características ultraestruturais, os trofócitos apresentam riqueza de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e lisossomos (HARRISON; LOCKE, 1998). O núcleo geralmente é rodeado por um anel de citoplasmático com organelas celulares, no seu citoplasma periférico, no entanto, carece destas estruturas. Encontra-se ainda um labirinto periférico de canais de extensão variável limitados pelas membranas (HARRISON; LOCKE, 1998).

Diferenças no tamanho do corpo gorduroso em diferentes indivíduos da mesma espécie refletem a quantidade de material armazenado pelos trofócitos (GULLAN; CRANSTON, 2005), uma vez que a morfologia destas células varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do inseto e seu estado nutricional (CHAPMAN, 1998).

Durante os períodos de alimentação, os trofócitos aumentam de tamanho, apresentam citoplasma vacuolizado, repleto de gotas de lipídio e glicogênio. No entanto, em períodos de escassez alimentar ou logo após a ecdise, os trofócitos são pequenos e apresentam citoplasma escasso e pobreza de organelas (WIGGLESWORTH, 1984; SNODGRASS, 1993).

Além de armazenamento estas células secretam substâncias de exportação e exercem as funções de detoxificação e excreção (KILBY, 1965; ISAC; BOWENS, 1982 apud OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003).

Segundo a literatura, existem outros tipos celulares no CG, entre eles as células de urato (urócitos) e os micetócitos (CHAPMAN, 1998). Segundo Gullan e Cranston, 2005 podem existir também um 4^o tipo celular, porém raro, que são os cromatócitos. As células de urato são caracterizadas morfologicamente pela presença de grandes esférulas cristalizadas de ácido úrico, situadas próximo ao núcleo (SNODGRASS, 1993, CHAPMAN, 1998). Sua função relaciona-se ao armazenamento e excreção de ácido úrico e outros resíduos nitrogenados (GULLAN; CRANSTON, 2005). Já os micetócitos são caracterizados pela presença de bactérias endossimbiontes em seu citoplasma (GULLAN; CRANSTON, 2005). Estas bactérias apresentam papel crucial na nutrição do inseto, fornecendo determinadas

vitaminas e outros nutrientes essenciais que não podem ser absorvidos diretamente na dieta (STANLEY, 2006). Os raros cromatócitos são considerados trofócitos modificados. Estas células são achatadas e possuem um núcleo central e saliente, organizadas em camadas ou células isoladas lado a lado, envoltas por trofócitos característicos, mas separadas destes pela lâmina basal. Estas células estão presentes em larvas de alguns insetos aquáticos (*Simuliidae* e *Thaumaleidae*), os quais possuem um tegumento transparente (GULLAN; CRANSTON, 2005).

2.7 HISTOQUÍMICA

O termo usado para indicar métodos que identificam e localizam substâncias em cortes histológicos ou em células cultivadas chama-se histoquímica. Vários procedimentos são usados para obter este tipo de informação, a maioria deles baseados em reações químicas específicas ou em interações de alta afinidade ente moléculas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Este método normalmente origina substâncias insolúveis, coloridas ou elétron-densas que permitem a identificação e localização de átomos ou moléculas com o auxílio de microscópios de luz ou eletrônicos presentes nas células e tecidos.

2.7.1 Lipídeos

Nos insetos segundo CHAPMAN (1998) os lipídeos estão representados pelos glicerídeos, onde no CG há o predomínio de triglicerídeos e na hemolinfa de diglicerídeos. A mobilização de lipídeos no CG é feita através da hidrólise destes lipídeos pela lipase. Os ácidos graxos acumulados na forma de triglicerídeos fornecem mais reserva de energia do que os carboidratos, por isto os lipídeos possuem maior potencial de energia e mais campos metabólicos aquosos por unidade de peso. Esta reserva energética é construída durante períodos de alimentação intensa e utilizados durante os períodos de diapausa, período pupal e embriogênese.

As reações histoquímicas para a localização de lipídeos devem ser feitas com preparados que não sofram a ação de solventes orgânicos que possam removê-los (VIDAL;

MELLO, 1987). Os corantes utilizados devem se dissolver rapidamente nas gorduras, os tecidos contendo lipídeos podem ser imersos em soluções alcoólicas saturadas de corantes muito lipossolúveis e fracamente álcool solúveis, pois após certo tempo o corante utilizado transfere-se do álcool para os lipídeos dos tecidos tornando-os coloridos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os corantes mais utilizados para a evidenciação de lipídeos são o sudan IV e o sudan negro, que coram lipídeos em vermelho e preto respectivamente (SHEEHAN; HRAPCHAK, 1980). Segundo Lison (1953) para a coloração de lipídeos pode-se obter bons resultados utilizando-se sudan negro dissolvido em etanol 70% saturado a quente.

Devido ao uso de solventes orgânicos, os tecidos não podem ser embebidos em parafina ou nitrocelulose e recomendam-se sempre cortes em congelamento (HUMASON, 1962). No entanto excelentes resultados foram obtidos por Nair e George (1964) na preservação dos lipídeos presentes em tecidos embebidos em parafina ao fixar o corpo gorduroso larval de *Anthrenus vorax* (REITTER, 1879) (Coleoptera) no fluído de Ciaccio.

2.7.2 Carboidratos

Os carboidratos mais importantes nos insetos são o glicogênio e a trehalose. Eles estão em grandes quantidades na hemolinfa, sendo uma reserva que pode ser mobilizada rapidamente como fonte de energia para o vôo, metamorfose e períodos de falta de alimento (KILBY, 1965).

O glicogênio é um polissacarídeo solúvel em água e que constitui a maior reserva de energia dos insetos. Pode ser encontrado em pequenas quantidades na maioria dos tecidos, mas geralmente as maiores reservas estão localizadas no corpo gorduroso (CHAPMAN, 1998).

Segundo KILBY (1965) estas reservas podem sofrer variações dependendo do estágio de vida dos insetos. Glicogênio, polissacarídeos neutros e glicoproteínas podem ser evidenciadas nos organismos através da reação do Periodic Acid Schiff – ácido periódico Schiff (PAS) idealizadas por McMANUS em 1946.

2.7.3 Proteínas

As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem, quase invariavelmente das interações com outras moléculas. A natureza transitória destas interações é essencial para a vida permitindo que um organismo responda a mudanças ambientais e metabólicas de maneira rápida e reversível. As proteínas são distribuídas em duas classes, as fibrosas com funções estruturais nas células e tecidos, e as globulares com funções mais complexas nos processos fisiológicos (LEHNINGER, 2006)

São componentes essenciais de todas as células e nos insetos participam de muitas secreções especiais como a produção de fios da seda nas glândulas sericígenas, ou glândulas de veneno associadas à base do ferrão ou ovipositor. A síntese das proteínas é realizada através da polimerização de unidades chamadas de aminoácidos que se unem entre si formando ligações peptídicas. Nos insetos grande parte destes aminoácidos constituintes das proteínas é sintetizada no corpo gorduroso (CHAPMAN, 1998).

Segundo PEARSE (1985) os métodos originais para identificação de proteínas *in vitro* produzem alterações sobre os tecidos. Isto explica as modificações introduzidas em alguns destes métodos visando torná-los menos ofensivos e mais confiáveis. Em ovários de *Diatrea saccharalis*, (FABRICIUS) Santos e Gregório (2002) obtiveram reação positiva ao Fast Green ácido pH 2,7 onde o citoplasma do oócito, das células foliculares e a membrana vitelínica são intensamente coradas, indicando a presença de proteínas.

Com o que foi relatado, conclui-se que o estudo do CG em larvas de *A. gemmatalis* é importante, pois permitirá maior conhecimento de sua fisiologia, bem como de suas funções metabólicas, fornecendo informações importantes de como as defesas imunológicas destes insetos são ativadas, uma vez que o mesmo é responsável pela síntese da maioria dos elementos constituintes da hemolinfa, fornecendo deste modo informações importantes para o desenvolvimento de novas formas de controle biológico (SILVA, 2002).

2.8 REFERÊNCIA ^{*1}

ABOT, A. R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brasil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus. **Journal Entomological. Science.**, v.30, p. 62-69, 1995.

ABOT, A. R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J. R.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RICHTER, A. R.. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v. 9, p. 126-130, 1996.

ALMEIDA, F. R. F.. Soja – cresce o plantio da soja. **Agroanalysis**. v.17, n. 9, p. 30-32, 1997.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 20. p. 30-33, 2001.

ALVES, S. B.. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 21-37.

BARBARA, K. A.. **Velvetbean caterpillar - *Anticarsia gemmatalis***. Disponível em: <<http://creatures.ifas.ufl.edu/field/velvetbean.htm>>. Acesso em: 14 out. 2003.

BISOTTO, V.; FARIAS, A. D.. Algumas considerações sobre a cultura da soja. In: **29ª Reunião de Pesquisa da Soja da Região Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2001. p. 7-17.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.. The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 233-242, 1993.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMAN, D.. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. **Deveopmental and Comparative Immunology**. v. 23. p. 329-344, 1999

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M.. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, p.1733-1761, 1999.

CHAPMAN, R. F.. **The Insects**: structure and function. 4.ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998. p. 38-68.

CUNHA, M. A. S.; CRUZ-LANDIM, C.. Modificações Histológicas e Histoquímicas do Corpo Gorduroso de Rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera, Formicidae) Durante o Primeiro Ciclo Reprodutivo. **Acta Biológica** v. 12, (1,2,3,4), p. 11-12, 1983.

^{*1} Referências Bibliográficas de acordo com normas do programa de mestrado em agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2006.

*

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: referências, informação, documentação e elaboração. Rio de Janeiro, 2002

DIEHL, S. R. L.; JUNQUETTI, M. T. G.. **Soja (*Glycine max*)**. Disponível em: <http://www.agrocasa.com.br/Arquivos_culturas/Culturas/SOJA.htm>. Acesso em: 15 out. 2002.

ELDRIDGE, F. B.; EDMAN, D. J.. **Medical Entomology**. Springer, 2004. 672p.

EMBRAPA SOJA. **Cell Culture Derived AgMNPV Bioinsecticide: Biological Constraints and Bioprocess Issues** Disponível na Internet via Gopher. URL: www.cnpso.embrapa.br. Arquivo capturado em 21 out. 1998.

EMBRAPA SOJA. **Manejo de pragas**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br> acesso em 02 set. 2002.

ENGELHARD, E. K., VOLKMAN, L. E.. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 209, p. 384-389, 1995.

FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.. Hemócitos fagocitários em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.12, n.4, p.751-758, 1995.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO. **Soja é muito mais que óleo de cozinha**. Disponível em: <<http://www.famato.org.br/soja>>. Acesso em: 14 out. 2003.

FELTON, G. W.; GATEHOUSE, J. A.. Antinutritive plant defense mechanisms. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996. p.373-416.

FERRAZ, L. C. C. B.. As meloginoidoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja e Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-38.

FRANC, N. C.; WHITE, K.. Innate recognition in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. Special issue: Innate recognition systems in host defence. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 30, p. 243-250, 2000.

FREDERICI, B. A.. Ultrasturcture of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FREDERICI; B. A. (ed.). **The biology of baculoviruses**. v. 1. Boca Raton: CRC Press Inc., 1986. p. 61-88.

FUNDAÇÃO CARGIL. Pragas da soja. In: _____. **A soja no Brasil central: revista e ampliada**. Campinas, 1986, p. 215 – 233.

FUNK, C. J.; BRUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F.. Baculovirus structure.. In: MILLER, L. K. (ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-32

FUXA, J. R.; RICHTER, A R.. Response of nuclear polyhedrosis virus-resistant *Spodoptera frugiperda* larvae to other pathogens and to chemical insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 272-277, 1990.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C.. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: ESALQ, 2002. 920 p

GAZZONI, D.L.. Botany. In: Embrapa-CNPSO. **Tropical soybeans improvement and production**. Plant Production and Protection Series n^o 27. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 1994. p. 1-12.

GREGÓRIO, E. A.. **Agglutininas, fatores líticos e o sistema de profenoloxidase em *Rodnius prolixus* e *Triatoma infestans*: estudo *in vitro***. 1990. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S.. **The insects an outline of entomology**. 3ed. Blackwell Publishing, 2005. 505p.

GUPTA, A. P.. Cellular elements in the hemolymph. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 3. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 401-451.

HAPNER, K. D., STEBBINS, M. R.. Biochemistry of arthropod agglutinins. In: GUPTA, A P. **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. Nova York: Wiley Interscience, 1986. p.227. n.51.

HARRISON, F. W.; LOCKE, M.. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. vol 11B, New York: Wiley-Liss, 1998

HÜBNER, O.. **Soja**. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/seab/deral/rev305.rtf>>. Acesso em: 14 out. 2003.

HUMASON, L.G..**Animal Tissue Techniques**. USA: W.H. Freeman and Company, 1962.468p.

INOUE, H.; BELLONCIK, S.. Infection of a *Bombix* cell line with a cytoplasmic polyhedrosis virus of the white cutworm, *Euxoa scandens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.24, p.318-320, 1989.

JUNQUEIRA, L, C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^aed, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2008. p. 524

KAWASAKI, K.; KUBO, T.; NATORI, S.. Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 355-364, 1996.

KILBY, B.A..Intermediary Metabolism and the insect fat body. In: GOODWIN, T.W.. **Aspects of Insect Biochemistry**. New York: Academic Press, 1965, p39-48.

KRITSKY, G.. **A Survey of Entomology**. Universe, 2002. 308p.

LEHNINGER, A., L.; NELSON. D., L. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ed. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 1232.

LISON, L. **Histochemie et Cytochimie Animales**. Paris: Gauthier Villars, 1953.607p.

Mc MANUS, J.F.A. Demonstration of certain fatty substances in paraffin sections. **Journal Pathology of Bacteria**, v.58, p.93-95, 1946.

MOSCARDI, F.. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: BUXTON, I.; SHIBLES, D. R.; FORSBURG, R. A.; BLAD, B. L.; ASAY, K. H.; PAULSEN, G. M.; WILSON, R. F. (Eds.). **International Crop Science**. Crop Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, p. 115-119, 1993.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.. Baculovírus para o controle de pragas. **Biociência e Desenvolvimento**. v. 24. p. 22-29, 2002.

NAIR, K.S.S.; GEORGE, J.C.. A histological and histochemical study of the larval fat body of *Anthrenus vorax* Waterhouse (Dermestidae; Coleoptera). **Journal. Insect Physiology**, v.10, p.509-519, 1964.

NIERE, M; MEIBLITZER; DETTLOFF, M; WEISE, C; ZIEGLER, M; WIESNER, A.. Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1433. p. 16-26, 1999.

NIJHOUT, F. H.. **Insect Hormones**. Princeton University Press, 1998. 280p.

OLAFSEN, J. A.. Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In: BREHELIN, M. (Ed). **Immunity in invertebrates - cells, molecules and defence reactions**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. p. 94-111.

OLIVEIRA, V. T. P.; CRUZ-LANDIM, C.. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências**. v. 11. p. 195-205, 2003.

PATHAK, J. P. N.. Cell-mediated defence reactions in insects. In: PATHAK, J. P. N.(Ed.) **Insect Immunity**. India: Kluwer Academic Publishers, 1993a. p. 47-58.

PATHAK, J. P. N.. Haemagglutinins (lectins) in insects. In: PATHAK, J. P. N.(Ed.) **Insect Immunity**. India: Kluwer Academic Publishers, 1993b. p. 149-169.

PEARSE, A., G., E.. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London: Churchill, 1985. p.1054.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGEALD, S. W.; RHODES, C. P.. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**. v. 97, p. 183-279, 1985.

RIBEIRO. B. M. R.; PINEDO, F. J. R.. Baculovírus recombinante para controle de praga. **Biociência e Desenvolvimento**. v. 22. p. 50-58, 2001.

RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G.. **IMM'S General Textbook of Entomology**. vol one: Structure, Physiology and Development. London: Chapman & Hall, 1994.

RICKARD, D. J.; MONROE, D. G.; RUESINK, T. J.; KHOSLA, S. RIGGSB, L. SPELSBERG, J.. Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 89, n. 3, 633-646, 2003.

ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A.; LEONARD, C. M.; RICHARDS, E. H.; RENWRANTZ, L.. Humoral recognition factors in insect with particular reference to agglutinins and the prophenoloxidase system. In: GUPTA, A. P. (Ed). **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. Nova York: Wiley Interscience, 1986. p. 381-406

SANTOS, D. C.; GREGÓRIO, E. A. . Ultrastructure of the ovariole sheath in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Pyralidae). **Biocell** (Mendoza), Argentina, v. 26, n. 2, p. 229-235, 2002.

SAVOLDI, M.. **Ocorrência de lagartas representa uma ameaça à cultura da soja**. Disponível em: <<http://www.cnpt.EMBRAPA.br/not0008.htm>>. Acesso em: 15 out. 2002.

SHEENAN, D., C.; HRAPCHAK, B., B.. **Theory and practice of histotechnology**. 2^a ed, London: Mosby Company, 1980. p. 190-191.

SILVA, C. C.. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 24, p. 68-72, 2002.

SNODGRASS, R. E.. **Principles of Insect Morphology**. Ithaca and London: Cornell University Press, 1993. p. 407-410.

SOSA-GÓMEZ, D.; MOSCARDI, F.. Resistência de lepidópteros a los nucleopoliedrovirus: el caso de *Anticarsia gemmatalis*-AgMNPV. In: CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. (Eds.). **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Espanha: Universidad Pública de Navarra, 2001. p. 451-478.

SOUZA, M. L. S.; CASTRO, CASTRO; M. E. B; SILHER, W. RIBEIRO, Z. M. A.; MOSCARDI, F.. Caracterização de baculovírus utilizados no controle de pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 24. p. 18- 20., 2002.

STANLEY, D. **Welcome to the Entomology 401/801-- Insect Physiology**. Disponível em <<http://entomology.unl.edu/ent801/ent801home.html>>. Acesso em: 20 mar. 2006

TANADA, Y; KAYA, H. K.. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.

VERNETTI, F.. Origem da espécie, introdução e disseminação no Brasil. In: **FUNDAÇÃO CARGIL. Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**. Campinas, 1983. p. 3-123.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 347p.

WIGGLESWORTH, V. B.. **The Principles of Insect Physiology**. 8ed. London: Chapman & Hall, 1984. 191p.

WILLOT, E.; TRENCZEK, T.; THROWER, L.; KANOST, M.R.. Immunochemical identification of insect populations monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. **European Journal of Cellular Biology**. v. 65, p. 417-423, 1994.

3 ARTIGO 1: ESTUDO HISTOLOGICO E ULTRAESTRUTURAL DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

RESUMO

O corpo gorduroso (CG) nos insetos é funcionalmente análogo ao fígado dos vertebrados e ao hepatopâncreas nos crustáceos, participando diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos, proteínas e ativamente na síntese da maioria dos elementos da hemolinfa, responsável direta pela defesa humoral nestes animais. Sabe-se que durante a infecção viral, o CG é um dos órgãos que se apresenta infectado, podendo acarretar interferência direta na síntese destes componentes. A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*, uma das principais pragas da sojicultura é controlada biologicamente através da utilização do vírus *nucleopoliedrovirus AgMNPV*, específico para este inseto. Embora a literatura sobre os aspectos biológicos e comportamentais da lagarta da soja seja ampla, pouco se conhece sobre a morfologia interna desta praga, sendo ausentes as descrições deste órgão até mesmo em condições de não patogenia. Este trabalho descreve a morfologia do CG de larvas de *A. gemmatalis*, do 4^o instar (10-12 dias de desenvolvimento), com técnicas de microscopia de luz convencional, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. O CG destas larvas foi coletado e processado para as respectivas análises, sendo encontradas duas porções distintas, a porção parietal (PA) e a porção perivisceral (PV). Ambas formadas por um só tipo celular, denominado trofócito. A PA ocupa posição periférica, abaixo do tegumento e lateral ao tubo digestivo, apresenta formato de fita alongada de aspecto granuloso e delicado, que se estende desde a região anterior do protórax até o último segmento abdominal. Os trofócitos da PA são células altas, cilíndricas e recobertas por uma lâmina acelular com projeções filiformes, citoplasma acidófilo com intensa vacuolização, e núcleo de formato e localização variável. O REG é bem desenvolvido, localiza-se tanto na periferia quanto ao redor do núcleo, sendo que na periferia apresenta numerosas cisternas dilatadas; o complexo de Golgi está ausente ou com poucos perfis, não sendo então observável; as ilhas de glicogênio são grandes, numerosas e distribuídas ao redor das gotículas de lipídeo por todo o citoplasma. A PV é escassa, localiza-se na região dorsal intimamente aderida, em pequenas quantidades à parede do tubo digestivo. Os trofócitos são células pequenas, arredondadas e formam aglomerados em forma de cacho recobertos por uma lâmina acelular lisa, conferindo um aspecto alveolar ao órgão. O citoplasma dos trofócitos da PV é ligeiramente basófilo com grande vacuolização; núcleo central e formato variado. O REG é predominante na periferia e contém poucas cisternas dilatadas; o complexo de Golgi embora presente é pouco desenvolvido; as ilhas de glicogênio são pequenas e distribuídas, juntamente com as gotículas de lipídeos, ao redor do núcleo. Os trofócitos dos CG da lagarta da soja apresentam diferenças morfológicas e ultraestruturais, em conformidade com a porção em que se encontram, isto é, na PA ou na PV. A organização, arquitetura e distribuição do corpo gorduroso nestas larvas são similares às de outros lepidópteros, porém com variações em sua estrutura celular, o que permite inferir que as duas porções possam apresentar funções diferenciadas no mesmo indivíduo.

Palavras-chave: Trofócitos, Morfologia, Controle biológico, Pragas da soja.

3 ARTICLE 1: Histological and Ultrastructural Study of the Larvae Fatty Body *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT

The fatty body in the insects is functionally analogous to the vertebrates' liver and to the hepatopancreas in the shellfishes, participating straightly at the lipids metabolism, carbohydrates and protein and actively in the synthesis of most hemolymph elements, directly responsible for humoral defense of these animals. It is known that during a viral infection, the fatty body is one of the organs which presents infected, leading to straight interference in the synthesis of these components. The soy caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, one of the main pests of the soy plantation, is biologically controlled through the nucleopolyhedrovirus use (AgMNPV), specific for this insect. Although there is a wide literature on the biological and behavioral aspects of the soy caterpillar, little is known about its internal morphology, and there is not description of this organ even in conditions of non pathogen. This paper describes the morphology of the larvae fatty body *A. gemmatalis*, the 4th instar, (10-12 days of development), with techniques of conventional electronic light microscopic (transmission and search) . The fatty body of these larvae was collected and processed for its respective analyses, and it was found two specific portions, pariental portion (PA) and perivisceral portion (PV). Both formed by one cell type, so-called trophocytes. PA occupy peripheral position, below the tegument and besides the digestive tube, which presents a format of lengthened strip of grainy and delicate aspect, which stretches from the previous portion of the prothorax up to the last abdominal segment. The PA trophocytes are represented by high, cylindrical cells recovered by an acelular lamina with filiforme projections, acidophilic cytoplasm with intense vacuolization, and nucleus of variable format and location. REG is well developed, placed either at the periphery or around the nucleus, once at the periphery presents numerous dilated cisterns, the Golgi complex is absent or with few profiles, not being observed, the glycogenic islands are big, numerous and distributed around lipids droplets in all cytoplasm. PV is scarce, placed in the dorsal region intimately joint in small quantities to the digestive tube wall. The trophocytes are round small cells and form groups in a form of bunch recovered by a flat acelular lamina, giving the alveolar aspect to the organ. The PV trophocytes cytoplasm is slightly basophile and with a great vacuolization; central nucleus and varied format. REG is mainly in the periphery and contains few dilated cisterns; Golgi complex though present is little developed; the glycogenic islands are small and distributed simultaneously with lipids droplets, around the nucleus. The Soy caterpillar fatty body trophocytes present morphological and ultrastructural differences, according to the portion they place, that is, PA or PV. The organization, architecture and distribution of the fatty body in these larvae are similar to other Lepidoptera, however with small variations in its cell structure what permits to infer that the two portions can present different functions in the same individual:

Key words: Trophocytes, Morphology, biological Control, Soybean pests

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja é de grande importância para o complexo agroindustrial do Brasil, e os incentivos científicos e tecnológicos para o aumento da qualidade e produtividade deste grão tem sido intensificado. Grande parte do controle das pragas que atacam a soja é realizado por métodos químicos, seguido pelo método do controle biológico. Em especial o da lagarta da soja, é realizado preferencialmente pela utilização de um patógeno específico, o nucleopoliedrovírus multicapsídeo “*Baculovirus anticarsia*” (AgMNPV).

O uso crescente desta metodologia tem gerado preocupações a cerca da possibilidade destas lagartas desenvolverem resistência ao produto. Assim em laboratório, e sob pressão de seleção, tem-se obtido exemplares de larvas resistentes ao AgMNPV, o que tem possibilitado aos pesquisadores providenciarem estudos sobre a condição de resistência destas larvas.

A resistência ao vírus implica em um sistema de defesa mais aprimorado que permite ao inseto sobreviver aos diferentes ataques. O sistema de defesa nos insetos está relacionado aos componentes naturais como: os agentes antimicrobianos da cutícula, as barreiras físicas, como o tubo digestivo e o sistema imune. Além daqueles que atuam indiretamente, e contribuem com a formação de elementos de defesa como o corpo gorduroso.

Análogo ao fígado dos vertebrados e ao hepatopâncreas nos crustáceos, o CG dos insetos é um órgão de múltiplas funções metabólicas, que participa diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (CHAPMAN, 1998; ELDRIDGE; EDMAN, 2004). É o órgão responsável pela síntese da trealose, desaminação e transaminação de aminoácidos, bem como da remoção de sais de cálcio, uratos e outros produtos nitrogenados da hemolinfa, que são posteriormente excretados pelos túbulos de Malpighi (WIGGLESWORTH, 1984; KRITSKY, 2002).

Em lepidópteros, as células do CG são capazes também de realizar fagocitose e participar da remodelação tecidual na metamorfose (WIGGLESWORTH, 1984).

O significado biológico deste órgão consiste na sua habilidade de manter um equilíbrio entre recursos alimentares e exigências energéticas durante o desenvolvimento do inseto. Durante períodos em que o inseto se alimenta ativamente, o corpo gorduroso sintetiza e acumula suas moléculas de reserva que poderão ser catabolisadas em períodos de escassez alimentar. Muitas das respostas às necessidades fisiológicas ocorrem em uma escala relativamente grande e podem ter o impacto substancial na biologia do inseto (STANLEY, 2006). Assim, as células do CG podem alterar suas atividades em resposta a sinais

nutricionais e hormonais para suprir as necessidades de crescimento do inseto, metamorfose e reprodução (GULLAN; CRANSTON, 2005) variando também sob condições ambientais diversas e nos quadros patológicos (CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1983).

Sabe-se que a habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico de qualquer organismo. Nos insetos esta habilidade é de responsabilidade dos elementos constituintes da hemolinfa.

A infecção de insetos pelo vírus pode acarretar alterações na composição da hemolinfa e são geralmente atribuídas à patogenicidade viral no corpo gorduroso, já que ele é o órgão responsável, entre outras funções pela síntese da maioria dos elementos constituintes da hemolinfa (HAPNER; STEBBINS, 1986; NIJHOUT, 1998).

Assim espera-se que o CG da lagarta da soja, durante a infecção causada por seu vírus controlador o AgMNPV, apresente alterações morfológicas que possam comprometer diretamente a defesa destes animais.

A literatura especializada não fornece informações a cerca da constituição e morfologia do CG da lagarta da soja. Além disso, não se encontram na literatura trabalhos que correlacionem o CG deste inseto e seus mecanismos de suscetibilidade e ou resistência ao AgMNPV.

Buscando contribuir para o enriquecimento da literatura especializada, bem como para o aperfeiçoamento de técnicas de controle de pragas na agricultura, este trabalho teve por objetivo estudar o CG de larvas de *A. gemmatalis*, no 4^o instar (10 - 12 dias) caracterizando-o morfológicamente, do ponto de vista estrutural e ultraestrutural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de Insetos

As lagartas de *A. gemmatalis*, foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Soja, Londrina-PR, onde eram criadas em sala climatizada, regulada à temperatura de $25\pm 27^{\circ}\text{C}$, em regime de fotoperíodo com 14 L: 10 E, umidade relativa de 80%, e alimentadas com dieta artificial segundo Hoffmann-Campo *et al.* (1985).

2.2 Coleta e Processamento do Corpo Gorduroso

A coleta do material foi realizada com exemplares de 4^o instar, com idade variando entre 10 a 12 dias de desenvolvimento.

As lagartas foram limpas, em álcool 70%, anestesiadas por resfriamento no congelador por 5 minutos e mantidas no gelo até a dissecação. A dissecação foi realizada sob microscópio estereoscópico OLYMPUS SZ60, com solução salina para insetos (1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada – q.s.p. 100 mL). Cada lagarta foi presa pelas extremidades por alfinetes entomológicos, em placa de Petri parcialmente preenchida com paraplast. Em seguida, com auxílio de uma tesoura oftalmológica, foi feita uma incisão longitudinal ao longo da região ventral, do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal. A cutícula foi rebatida e presa de cada lado da lagarta com alfinetes entomológicos.

Para facilitar a localização do CG, as larvas foram dissecadas e coradas com gotas de soluções testes de verde luz ou azul de metileno a 0,5% para maior contrastação. A documentação foi realizada com câmera HSCD-5 da SONY, e objetiva macro de 50 mm. Em seguida o corpo gorduroso (CG) foi retirado e fixado conforme os procedimentos descritos a seguir.

3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Visando a obtenção de melhores resultados para análise histológica, o CG foi submetido a vários protocolos experimentais, onde foram testados fixadores, tempo de fixação, meios de inclusão e colorações.

3.1 Microscopia de Luz

A- MATERIAL INCLUÍDO EM PARAPLAST (Oxford)

Para a inclusão do corpo gorduroso em paraplast, foram testados os seguintes fixadores: 1) Solução de Bouin aquoso (75 mL de solução saturada de ácido pícrico;

25 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por 4 e 8 horas; 2) Solução de glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato (0,1M; pH7,2) por 4 e 8 horas. Após a fixação, os corpos gordurosos foram lavados em álcool 70% ou no tampão fosfato; desidratados em séries crescentes de soluções alcoólicas; diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em paraplast conforme o seguinte protocolo:

- ☞ Desidratação em álcool 95% – 3 x 10 min;
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 2 x 15 min;
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 20 min;
- ☞ Diafanização em xilol I – 2 x 15 min;
- ☞ Diafanização em xilol II – 15 min (estufa $\pm 37^{\circ}\text{C}$);
- ☞ Infiltração em paraplast – 3 x 25 min;
- ☞ Infiltração em paraplast – 30 min;
- ☞ Inclusão em paraplast.

Os cortes seriados, com aproximadamente $7\mu\text{m}$ de espessura, foram realizados em micrótomo rotativo semi-automático, modelo Leica RM 2145, colocados em lâminas de vidro previamente limpas com álcool-éter e corados com Hematoxilina e Eosina alcoólica e ou com Hematoxilina e Eosina aquosa. Os cortes foram montados em bálsamo, recobertos por lamínula de vidro e analisados em microscópio de luz Axiophot Zeiss.

B- GLICOLMETACRILATO (CERRI; SASSO-CERRI, 2003)

Após a coleta, os CG foram fixados por 4 e 8 horas, a temperatura ambiente, em solução de glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato (0,1M; pH7,2) e em solução de Bouin aquoso. O material fixado foi lavado em solução tampão fosfato (0,1M pH 7,2) e em álcool 70% para os fixados em Bouin, desidratados em soluções de concentrações crescentes de etanol conforme o protocolo:

- ☞ Desidratação em álcool 30% , 50%, 70%, 90% – 15 min;
- ☞ Desidratação em álcool 95% – 20 min;
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 25 min.

Após a desidratação, o CG foi embebido em solução de resina glicolmetacrilato e álcool 95° (1:1) por 4 horas à temperatura ambiente para a pré-infiltração, seguida por resina pura para infiltração por 24 horas a temperatura de 4°C . A inclusão foi realizada em moldes apropriados de polietileno contendo 7,5 mL de resina básica + 1,0 mL de polimerizador (Embedding Kit - LEICA HISTORESIN). Os moldes permaneceram em estufa a uma temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas até a completa polimerização da resina. O material

incluído foi submetido a cortes de 7 μ m com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo semi-automático LEICA RM 2145 e colocados em lâminas de vidro previamente limpas com álcool-éter.

As lâminas contendo os cortes foram colocadas em uma chapa aquecedora 37 \pm 2° C (modelo 186 FANEM) para melhor estiramento e aderência dos cortes. Após este processo, foi realizada coloração em Hematoxilina e Eosina (aquosa ou alcoólica), seguidos de desidratação e diafanização conforme o protocolo:

- ☞ Hidratação em água destilada - 2 min;
- ☞ Coloração em hematoxilina - 60 min. (37 \pm 2° C);
- ☞ Lavagem em água corrente - 10 min. (viragem);
- ☞ Coloração em eosina aquosa ou alcoólica - 60 min;
- ☞ Desidratação em etanol 70% - 2 segundos;
- ☞ Desidratação em etanol 95% - 5 min;
- ☞ Desidratação em etanol 100% - 2 x 10 min;
- ☞ Desidratação em álcool 100% + xilol – 10 min;
- ☞ Diafanização em xilol – 2 x 10 min.

Em seguida os cortes foram montados com bálsamo em lâmina de vidro e recobertos por lamínula e analisados em microscópio de luz (Axiophot Zeiss) do Departamento de Histologia/UEL.

3 2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise ao MET, os CG foram fixados em duas soluções testes: 1) glutaraldeído (2,5 %) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. 2) glutaraldeído (2,5 %) em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, ambos por 4 e 8 horas a temperatura ambiente. Posteriormente cada material foi lavado em seu respectivo tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 horas. A seguir os CG foram contrastados em bloco com acetato de uranila 0,5% em água destilada por 2 horas, antes de serem submetidos ao seguinte protocolo:

- ☞ Desidratação em acetona 50%, 70%, 90% - 2 x 10 min;
- ☞ Desidratação em acetona 100% - 3 x 15 min;
- ☞ Infiltração em resina Araldite[®] e acetona 100% (24 h);
- ☞ Embebição em resina pura na estufa a \pm 37°C (1 h);
- ☞ Inclusão em resina pura e polimerização em estufa a \pm 60°C (48 h).

Os cortes semifinos com 2µm realizados em ultramicrótomo modelo ULTRACUT UCT (LEICA), foram corados a quente com uma solução de azul de toluidina a 1%, azur II 1% em bórax 1% (1:1), examinados ao microscópio de luz para seleção de blocos e obtenção de cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos (50 nm) foram contrastados em solução alcoólica saturada de acetato de uranila (20 min) e citrato de chumbo (20 min), e analisados ao MET TECNAI 12 (FEI), do (LMEM/UEL).

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O CG foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) por 4 horas, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1,0 % em tampão fosfato por 1 hora e submetidos ao protocolo:

- ☞ Lavagem em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 – 3 x 15 min;
- ☞ Desidratação em seqüência crescente de soluções de álcool etílico;
- ☞ Secagem em aparelho Ponto Crítico CPD 030 (Bal-Tec), com CO₂ líquido;
- ☞ Colagem dos materiais em suportes apropriados;
- ☞ Metalização em aparelho SCD 050 (Bal-Tec), com camada de 10 nm de ouro.

A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em MEV QUANTA 200 (FEI), com voltagens variando de 10-20 kV do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL (LMEM/UEL).

4 RESULTADOS

4.1 Anatomia

A melhor coloração para a visualização e localização do CG foi obtida com o verde luz, uma vez que, o azul de metileno promoveu uma acentuada retração do órgão com desidratação, impedindo desta forma o estudo da sua morfologia.

O CG de lagartas de *A. gemmatalis*, mostrou-se como uma massa esbranquiçada de aspecto esponjoso suspensa na hemocele e sustentada por traquéias. Essa massa preenchia grande parte da hemocele, ao mesmo tempo em que envolvia os outros órgãos da cavidade, como glândulas, traquéias e tubo digestivo (Figs. 4.1A e B).

Apresentou duas porções distintas: a porção PA e a porção PV. A PA foi observada ocupando uma posição periférica, logo abaixo do tegumento e lateralmente ao tubo digestivo, com o qual mantinha relação anatômica. Apresentou o formato de uma fita alongada de aspecto granuloso e delicado, com distribuição irregular (Figs. 4.1A e B), estendendo-se desde a porção anterior do protórax até o último segmento abdominal, onde se tornava mais abundante. A PV mostrou-se escassa, encontrada na região dorsal aderida em pequenas quantidades à parede do tubo digestivo.

4.2 Microscopia de Luz (ML)

O melhor protocolo para o estudo morfológico ao ML foi aquele que utilizou o fixador de Karnovsky por 4 horas, incluídos em glicolmetacrilato e corados por Hematoxilina e Eosina alcoólica.

De um modo geral, tanto a PA como a PV do CG de larvas do 4^o instar de *A. gemmatalis*, apresentaram apenas um tipo celular, identificado como trofócito. A PA era constituída por uma única camada de células altas, cilíndricas, contíguas, recoberta em ambos os lados por uma lâmina acelular, que mantinha o agrupamento das células emperfiladas (Figs. 4.2A, B e C). O citoplasma dos trofócitos é acidófilo, com intensa vacuolização; o núcleo apresenta localização e formato variado e exibe cromatina em pequenos grumos (Figs. 4.2C e D).

A PV apresentou aspecto alveolar semelhante a favo de mel, onde os trofócitos eram pequenos e arredondados, que formavam aglomerados, recobertos pela lâmina acelular (Figs. 4.2E e F). O citoplasma destas células apresentou regiões basófilas próximas ao núcleo; e uma grande quantidade de gotículas bem arredondadas, com características lipídicas. O núcleo era central com formato variável de acordo com a quantidade de gotículas presentes no citoplasma e com cromatina pouco evidente.

4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Observou-se que a PA era formado por células alongadas dispostas lado a lado em uma fita com uma camada de célula de espessura. Apresentava-se revestido por uma camada espessa de material elétron denso, formando a lâmina acelular que mantinha as células agrupadas e ao mesmo tempo isoladas da hemolinfa (Figs. 4.3 A e B). Entre a lâmina acelular e a membrana plasmática observou-se um espaço pouco elétron denso (Figs. 4.4A e B). A membrana plasmática mostrou dobras que eram acompanhadas pela lâmina acelular, formando canais que invadiam o citoplasma dos trofócitos. Estes espaços formavam os sistemas de retículos que por vezes continham pequenos corpos lamelares de aspecto mielínico (Figs. 4.3B, 4.4B e C).

O citoplasma destas células apresentaram elétron densidade variada, sendo que nas regiões citoplasmáticas próximas à membrana celular e ao núcleo, esta elétron densidade estava aumentada (Figs. 4.3A e 4.4A), provavelmente devido a grande concentração de organelas (Figs. 4.3B e 4.4D), com abundância de REG, formando cisternas dilatadas, preenchidas por um material menos elétron denso (Figs. 4.3C, 4.4B e C); presença de alguns corpos densos de formatos variados (Figs. 4.3B e 4.4C); grande quantidade de mitocôndrias de formas variadas arredondadas e alongadas, distribuídas de maneira irregular ao redor do núcleo e na periferia do citoplasma (Figs. 4.3B, 4.4A e C).

Entre as regiões mais densas, observou-se que o citoplasma era pouco elétron denso, com inúmeras vesículas de lipídeos com formatos e tamanhos variados (Fig. 4.3A), e ilhas pouco elétron densas, contendo glicogênio. (Figs. 4.3C, 4.4A e D). Estas ilhas muitas vezes mantinham um íntimo contato com as vesículas de lipídeos (Fig. 4.3C). O núcleo nestas células não apresentou posição definida e apresentou formato irregular com grumos de material heterocromático (Figs. 4.3A e 4.4D).

A PV apresentou-se como uma bicamada de aglomerados celulares recobertas por uma camada espessa de material amorfo (Figs. 4.5A e B), suas células se mantinham individualizadas com espaços entre suas membranas (Fig. 4.5B). Na superfície externa desta bicamada observou-se a formação de diversas galerias, formando o sistema reticular criado por dobras da membrana plasmática que eram acompanhadas pela lâmina, permitindo o contato entre o meio celular com o meio extracelular (Fig. 4.5B).

No espaço intercelular, observa-se também os sistemas de retículos, formados por dobras da membrana plasmática (Fig. 4.5C).

Próximos aos limites celulares e perinuclearmente observaram-se no citoplasma a presença de inúmeras organelas como mitocôndrias, de formato alongado e redondo; REG, podendo estar algumas vezes distendidos formando cisternas contendo material elétron denso, corpos lamelares com aspecto mielínico e complexo de Golgi pouco desenvolvido (Fig. 4.5C).

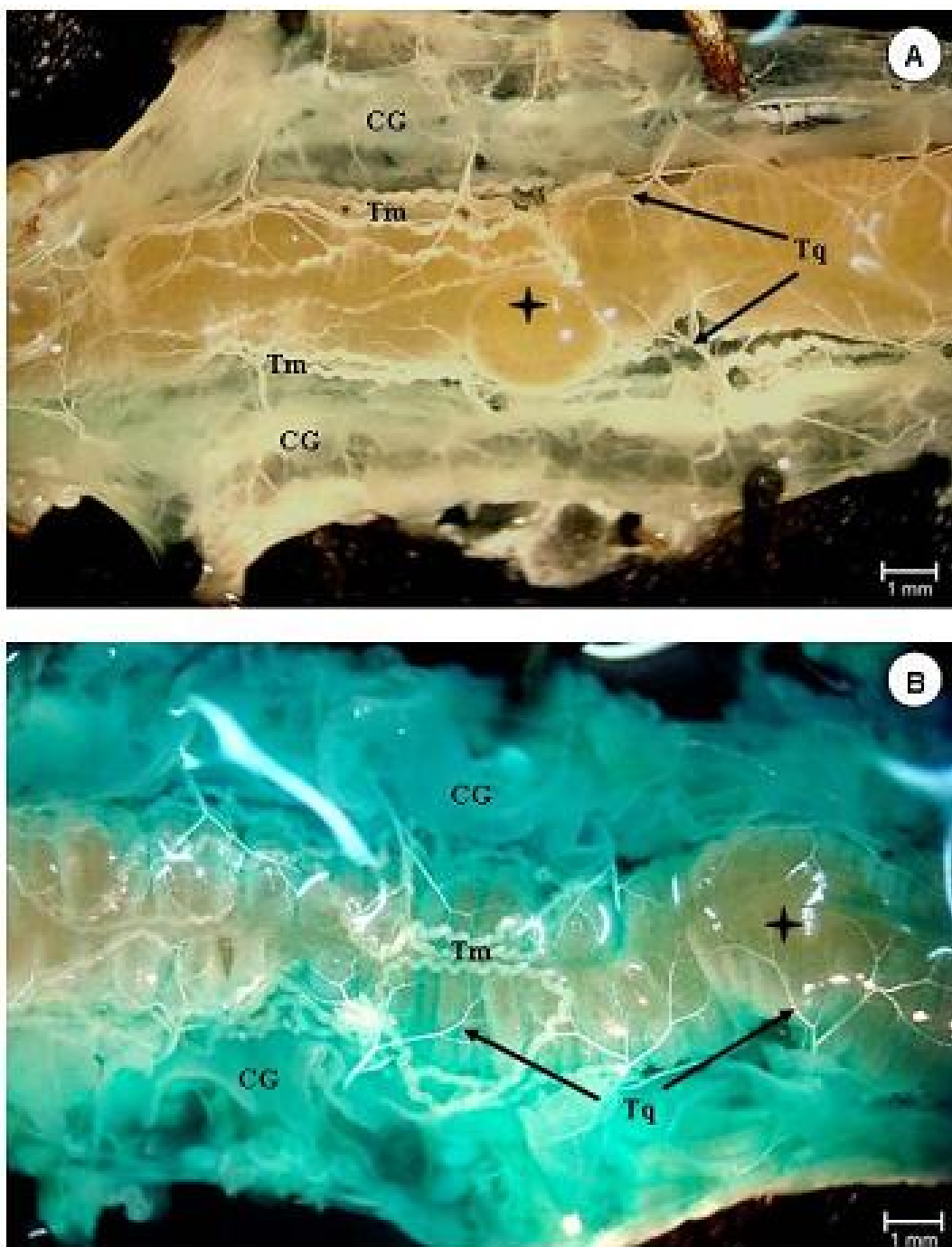
No citoplasma periférico notou-se a presença de várias vesículas, de lipídeos (Figs. 4.5A e B). Ao redor e em contato com estas vesículas foram observadas inúmeras ilhas de vários tamanhos com material pouco elétron denso, identificado como depósito de glicogênio (Figs. 4.5A e B). O núcleo destas células tinham o formato irregular, e em seu interior podia-se ver o material heterocromático disperso em grumos (Fig. 4.5B).

4 4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A PA do CG mostrou-se formada por uma camada de células altas, colunares dispostas lado a lado num arranjo paliçádico (Figs. 4.6A e B). Estas células encontravam-se envolvidas por uma fina membrana contínua, formada de substância amorfa, com projeções longas e delicadas, formando um tapete (Fig. 4.6C). Ao mesmo tempo em que revestia externamente a superfície dos trofócitos, esta lâmina acelular os mantinham isolados da hemolinfa (Figs. 4.6A, B e C). Foi possível visualizar proeminências formadas pelas gotas de lipídeos, de formas e tamanhos variados, dispostas na periferia da célula (Figs. 4.6A e B).

A PV do CG apresentou células achatadas e largas, formando lâminas sobrepostas umas as outras (Figs. 4.7A e B). Envolvendo estas lâminas acelulares pode-se observar uma membrana delgada, lisa e contínua que acompanha externamente a superfície dos trofócitos e os separa da hemolinfa. Os trofócitos formavam aglomerados celulares com aspecto lobular (Figs. 4.7B e C). No citoplasma dos trofócitos observaram-se gotículas de lipídeos arredondadas e de tamanhos diferentes, bastante evidentes, que se distribuía de forma irregular por todo o citoplasma (Figs. 4.7A, B e C).

5 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



Figuras 4.1

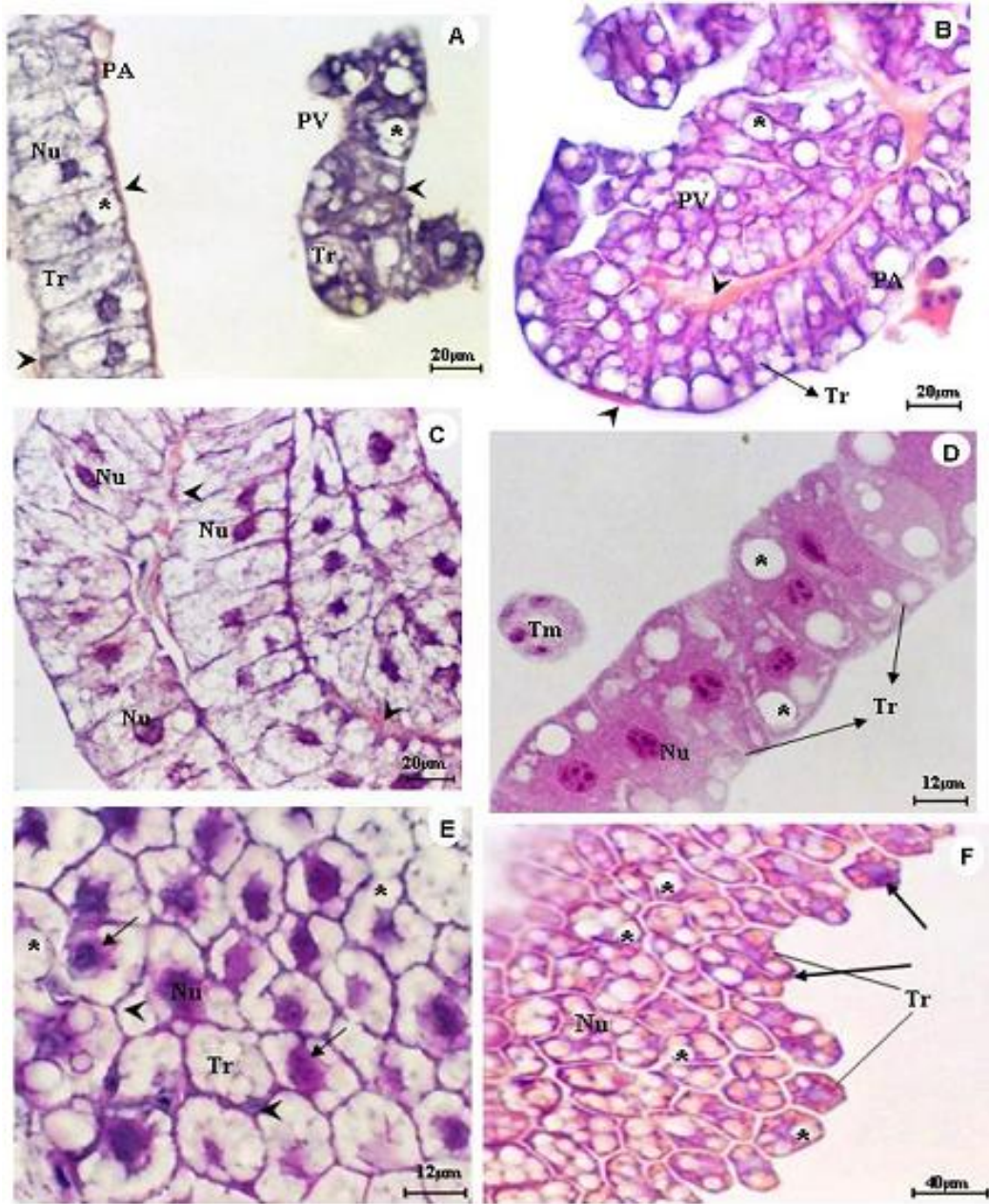


Figura 4.2

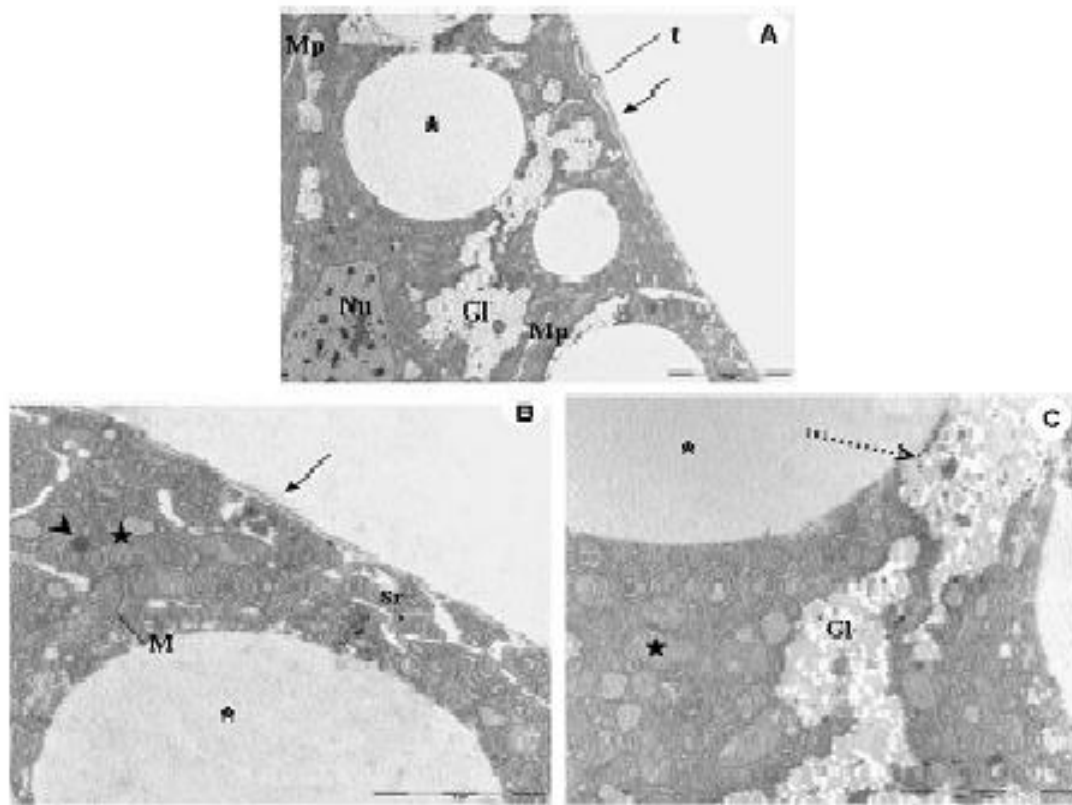


Figura 4.3

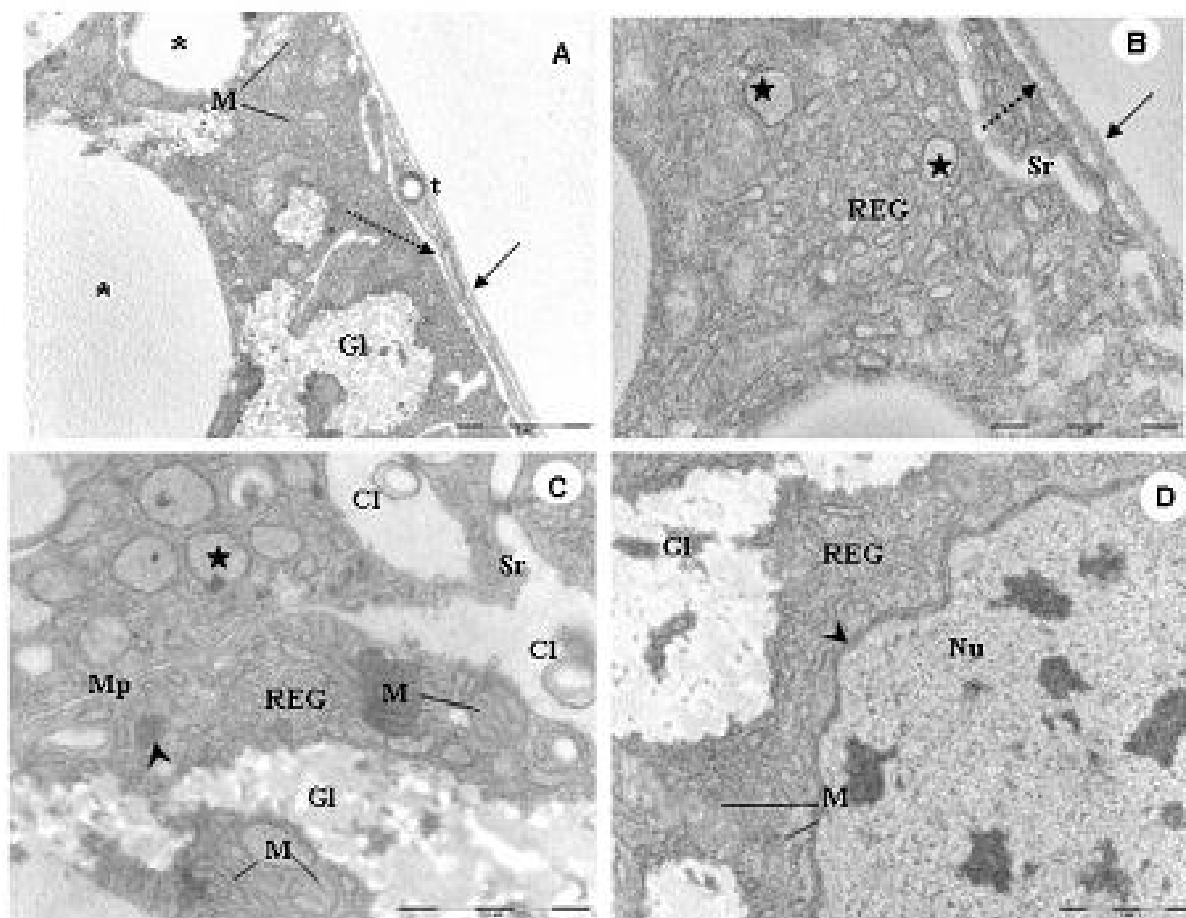


Figura 4.4

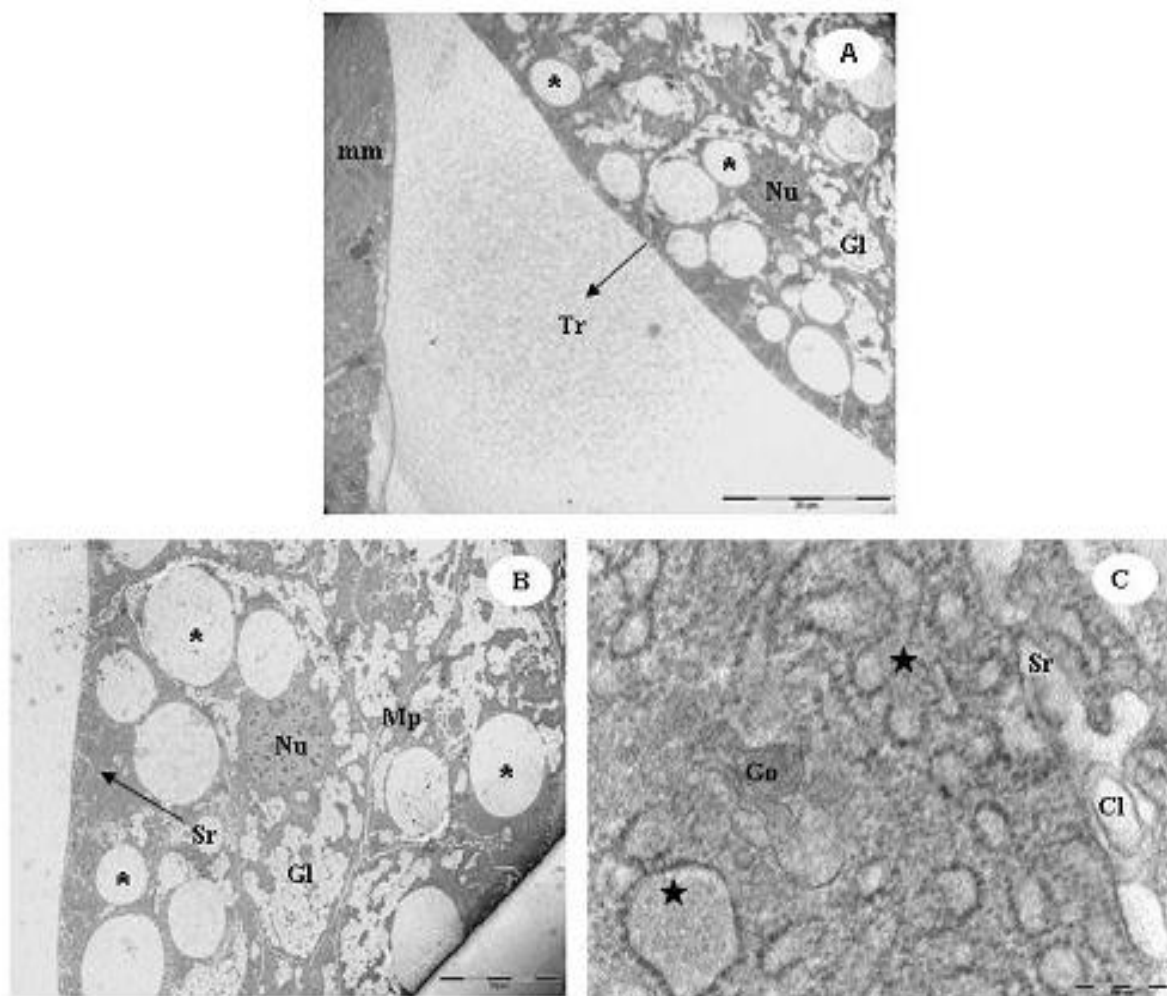


Figura4.5

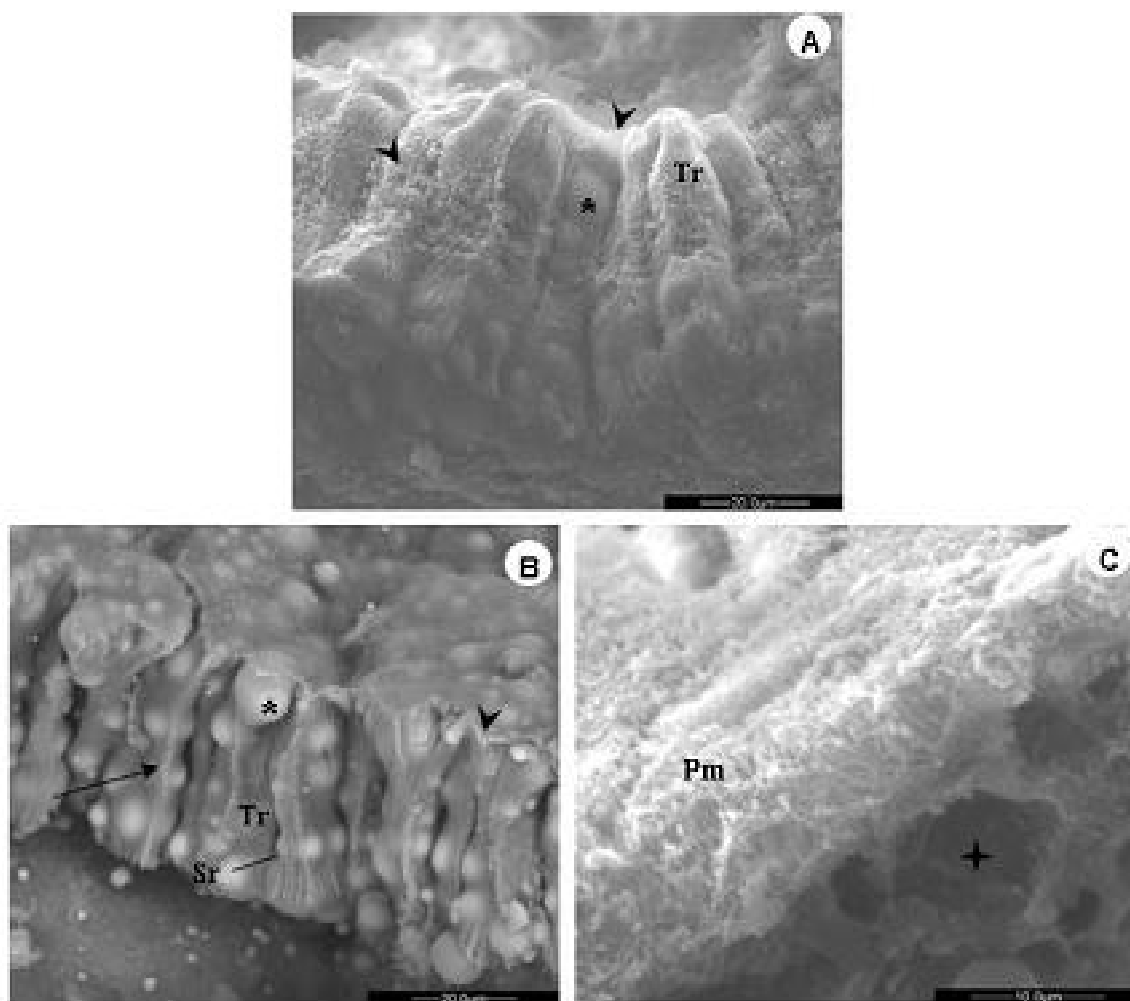


Figura 4.6

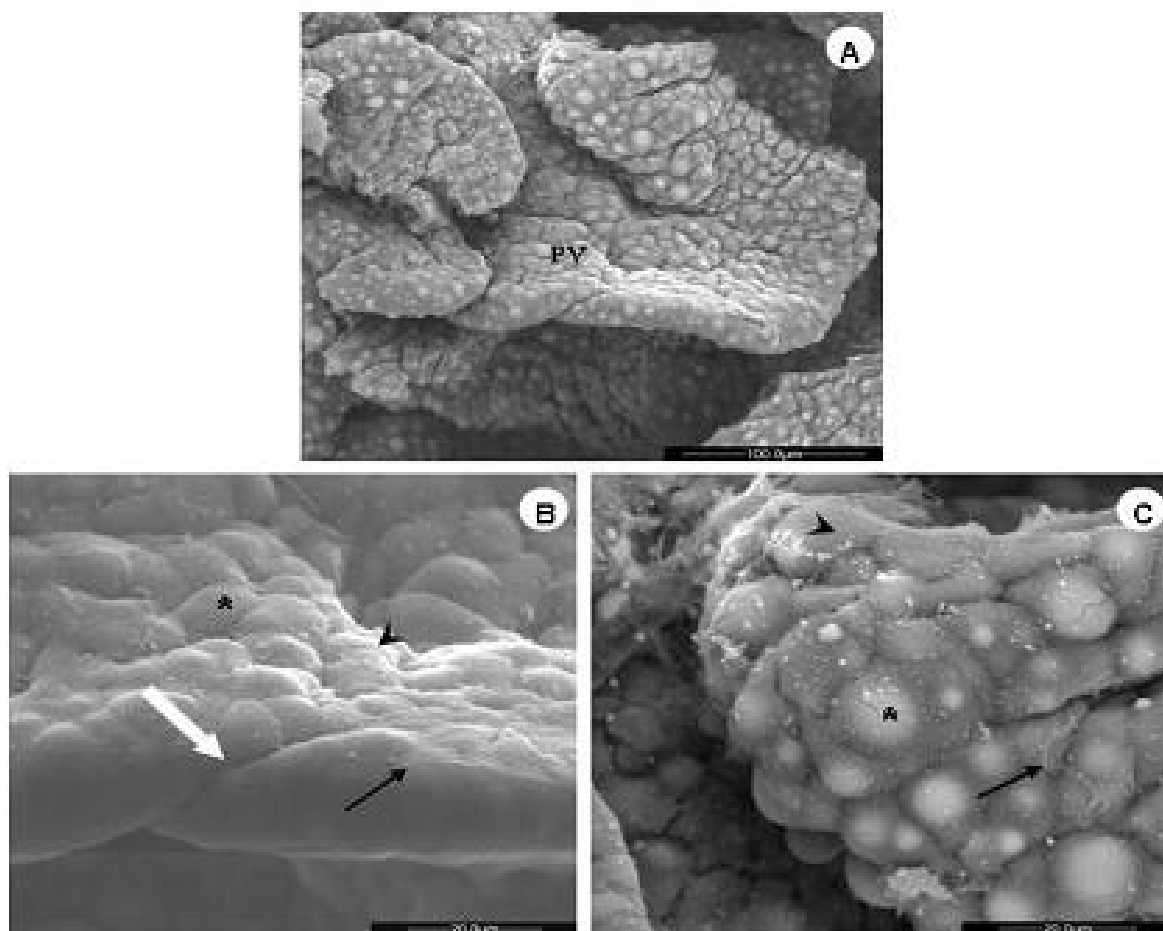


Figura 4.7

FIGURA 4.1 – Localização e distribuição do corpo gorduroso (CG) de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar, observar aspecto geral da porção parietal, ao redor do tubo digestivo (+), notar a presença dos túbulos de malpighi (Tm) e traquéias (Tq).

A – Sem coloração. Barra = 1 mm.

B – Coloração: verde luz 0,5%. Barra = 1 mm.

FIGURA 4.2 – CG de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar porções parietal (PA) e perivisceral (PV), fixação Karnovsvk e coloração hematoxilina e eosina alcoólica, inclusão paraplast (A, C, E); inclusão GMA (glicolmetacrilato) (B, D, F).

A – Aspecto geral da porção parietal (PA) e perivisceral (PV): lâmina acelular (➤), gotas de lipídeo (*), trofócitos (Tr), núcleo (Nu). Barra = 20 µm.

B – Porções PA e PV: trofócitos (Tr); lâmina acelular (➤) gotas de lipídeo(*). Barra = 20 µm.

C – Dobras da porção parietal mostrando lâmina acelular (➤), citoplasma e núcleos (Nu) dos trofócitos. Barra = 20 µm.

D – Porção PA, mostrando trofócitos (Tr) colunares acidófilos com gotas de lipídeo (*). Notar núcleo (Nu) em várias posições. Tm (túbulo de Malpighi). Barra = 12 µm.

E – Detalhe da PV mostrando trofócitos (Tr) poligonais e arredondados com discreta basofilia citoplasmática (→) ao redor do núcleo (Nu). (➤) limite celular; (*) gotas de lipídeo. Barra = 12 µm.

F – Aspecto geral da PV: trofócitos (Tr) com regiões basófilas (→). (Nu) núcleo, (*) gotas de lipídeo. Barra = 40 µm.

FIGURA 4.3 – Ultraestrutura de Transmissão do Corpo Gorduroso Parietal de Larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar. Fixação GA 2,5% em tampão fosfato 8h.

A – Aspecto geral do trofócito mostrando a distribuição das gotas de lipídeo (*), ilhas de glicogênio (Gl) e núcleo (Nu). Notar limites da membrana celular (Mp) e presença de traqueíola (t). Lâmina acelular (→). Barra = 5 µm.

B – Detalhe da célula mostrando a lâmina acelular espessa (→), os sistemas de retículos (Sr), cisternas dilatadas do REG (★), corpos densos (➤), mitocôndrias (M), gotas de lipídeo (*). Barra = 2 µm.

C – Detalhe evidenciando a relação de comunicação (---➤) entre ilha de glicogênio(Gl) com o lipídeo (*), cisternas dilatadas do REG (★). Barra = 2 µm.

FIGURA 4.4 – Ultraestrutura de Transmissão do Corpo Gorduroso Parietal de Larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar. Fixação GA 2,5% em tampão fosfato 8h.

A – Aspecto geral: notar a presença de um espaço menos elétron denso (↗) entre a lâmina acelular (→) e a membrana do trofócito (Tr), ilhas de glicogênio (Gl), vesículas de lipídeo (*), mitocôndrias (M), traqueíola (t) envolvida pela lâmina. Barra = 2 µm.

B – Periferia do trofócito mostrando riqueza de retículo endoplasmático granular (REG) com cisternas dilatadas (★). Lâmina acelular (→) espessa com espaço menos elétron denso (↗), sistemas de retículo (Sr). Barra = 1 µm.

C – Detalhe da região periférica do trofócito mostrando a presença de corpos lamelares (Cl) nos espaços dos sistemas de retículos (Sr). REG com grande quantidade de vesículas dilatadas (★), corpos densos (▶), mitocôndrias (M), ilhas de glicogênio (Gl); membrana celular (Mp). Barra = 1 µm.

D – Detalhe da região perinuclear: notar riqueza de retículo endoplasmático granular (REG) sem dilatações, ilhas de glicogênio (Gl) e mitocôndrias (M). Núcleo (Nu) e envoltório nuclear (▶) Barra = 1 µm.

FIGURA 4.5 – Ultraestrutura de Transmissão do Corpo Gorduroso Perivisceral de Larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar. Fixação GA 2,5% em tampão fosfato 8h.

A – Aspecto geral mostrando os trofócitos (Tr) desta porção, com núcleo central (Nu), ilhas de glicogênio (Gl), vesículas de lipídeo (*) distribuídas ao redor do núcleo. Músculo (mm). Barra = 20 µm.

B – Detalhe mostrando trofócitos e suas relações de vizinhança. Observar presença de sistemas de retículos (Sr) na periferia livre da célula; gotas de lipídeo (*) e ilhas de glicogênio (Gl), ao redor do núcleo (Nu). Membrana celular (Mp). Barra = 10 µm.

C – Detalhe mostrando a presença de um Golgi (Go) pouco desenvolvido, cisternas com dilatações do REG (★) e corpos lamelares (Cl) nos sistemas de retículo (Sr). Barra = 0,2 µm.

FIGURA 4.6 – Ultraestrutura de Varredura do Corpo Gorduroso Parietal de Larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar. Fixação em GA 2,5% em tampão fosfato por 2h.

A – Aspecto geral mostrando camada única de trofócitos colunares (Tr) recobertos pela lâmina acelular (▶). (*) vesículas de lipídeo. Barra = 20 µm.

B – Aspecto de uma região de quebra da PA, mostrando os trofócitos (Tr), revestidos pela lâmina acelular (▶). Notar gotas de lipídeo (*), membrana celular (→) e sistemas de retículos (Sr). Barra = 50 µm.

C – Detalhe da lâmina acelular com projeções filiformes (Pm). (◆) espaços

citoplasmáticos anteriormente ocupado por lipídeo. Barra = 10 μm .

FIGURA 4.7 – Ultraestrutura de Varredura do Corpo Gorduroso Perivisceral de Larvas de *A. gemmatalis* em 4^o ínstar. Fixação em GA 2,5% em tampão fosfato por 8h.

A – Aspecto geral da porção perivisceral (PV), mostrando sua organização em lóbulos. Barra = 10 μm .

B – Detalhe mostrando a lâmina acelular lisa (▶) recobrendo os trofócitos, que se encontram em camadas sobrepostas (⇨). (*) proeminências das gotas de lipídeo, (→) traqueíolas. Barra = 10 μm .

C – Detalhe mostrando os trofócitos recobertos pela lâmina acelular lisa (▶), gotas de lipídeo (*) e traqueíolas (→). Barra = 20 μm .

6 DISCUSSÃO

6.1 Morfologia do Órgão

Nesse trabalho foram utilizados CG de larvas de 4^o instar (10 – 12 dias) pois este ínstar se encontra distante das fases iniciais do desenvolvimento e além disso, o controle biológico deste inseto pelo vírus (AgMNPV) é bastante eficaz em larvas de 2^o até no máximo 4^o instar.

Com o intuito de facilitar a observação e localização do corpo gorduroso foram testados dois tipos de corantes vitais: a solução verde luz 0,5% e a solução de azul de metileno 0,5%, sendo que o melhor resultado foi obtido pela 1^a solução, uma vez que o azul de metileno causou acentuada desidratação no tecido impedindo a observação da sua morfologia.

Anatomicamente o CG de larvas de *A. gemmatalis* de 4^o instar é muito semelhante ao que Keeley (1985), Conte (1994), Richards e Davies (1994) descreveram para outros lepidópteros. Trata-se de uma massa esbranquiçada de aspecto esponjoso que preenche grande parte da hemocele, sustentado por traquéias e traquéolas. A presença das traquéias e traquéolas atravessando o corpo gorduroso destes insetos oferecem uma maior sustentação, ao mesmo tempo em que promove a troca gasosa neste órgão.

A descrição do corpo gorduroso em fitas na cavidade da hemocele segue o padrão encontrado em outros lepidópteros (KEELEY, 1985; SNODGRASS, 1993; CONTE, 1994). Segundo Wigglesworth (1965) e Dean et al. (1985), essa disposição pode variar muito entre as ordens, mas é constante em uma mesma espécie. Keeley (1985) cita que o corpo gorduroso em Hemiptera ocorre em formações lamelares, em Diptera estas lamelas são fenestradas e em Orthoptera encontram-se como cordões delgados ligados ao tegumento. Em todos esses casos observaram-se uma camada parietal logo abaixo do tegumento e uma camada perivisceral ao redor do intestino, sendo este também, o padrão de distribuição do CG encontrado em larvas de *A. gemmatalis*.

Os resultados mostraram-se divergentes daqueles descritos em *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) (Verhoeff, 1938) por Fontanetti et al (2004), que relataram que o CG parietal está distribuído nas regiões dorsal e ventral sendo facilmente separado das vísceras, e o perivisceral está disposto ao redor do tubo digestivo em fitas aderidas ao piloro, e ao redor das gônadas como uma massa anastomótica de células. Já em *Pachycondyla villosa*

(Fabricius, 1804) (Formicidae), Zara e Caetano 2004, afirmaram que o CG encontra-se distribuído como uma única camada entre a cutícula e o trato digestivo, formando um conjunto de células agrupadas e recobertas por uma fina membrana.

Para o estudo histológico, as várias condições de processamento que sofreu o material neste experimento, deveram-se ao fato de que a literatura não relata um procedimento padrão, sendo bastante variáveis as técnicas utilizadas pelos autores neste quesito.

Os melhores resultados foram obtidos com o material fixado em Karnovsky, incluído em glicolmetacrilato e corado com hematoxilina e eosina alcoólica (H-E alc.). A seleção destes parâmetros permitiu uma melhor visualização dos contornos e dos componentes celulares, à exemplo dos encontrados por Levy (2005), trabalhando com tubo digestivo do mesmo inseto. Para a análise ultraestrutural, o fixador que melhor preservou as estruturas celulares foi a solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato.

Histologicamente, o corpo gorduroso de larvas de *A. gemmatalis* apresentou similaridade aos CG descritos por vários autores em diferentes insetos. Wigglesworth (1965); Richards et al. (1994); Oliveira e Cruz-Landim (2003); Fontanetti et al. (2004); Zara e Caetano (2004), relataram o CG como sendo formado por agregados de células frouxas em formato de fita ou em massas compactas, com uma ou duas células de espessura, recobertas por uma fina lâmina acelular.

Dentre as denominações encontradas para as células do CG descritas por vários autores, optou-se neste trabalho por adotar o termo trofócito para identificar as células constituintes do CG, à semelhança das denominações feitas por (ROSEL; WHEELER, 1995, OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003; ZARA; CAETANO, 2004; SARMENTO et al., 2004, ROMA et al., 2005), e contrapondo-se a autores como (CONTE, 1994; FONTANETTI et al., 2004, GULLAN; CRANSTON, 2005), que utilizaram o termo adipócito para se referirem a estas células, uma vez que estas células, em insetos de estágio larval, não são simples depósitos de gordura.

Justifica-se ainda o uso desta terminologia para estas células, o paralelismo ou analogia conceitual com as células adiposas dos mamíferos, em especial as do homem, onde nestes últimos são células que fazem parte do tecido adiposo, sendo responsáveis pelo armazenamento de lipídeos, e conseqüentemente servem como reservatório energético corporal. Deste modo a terminologia adipócito para estas células nos insetos induz a perspectiva de serem apenas células armazenadoras de gorduras e não células sintetizadoras, secretoras e tróficas como realmente o são. Além disso, o conceito de que os adipócitos são

células secretoras, é bastante recente e surgiu nos últimos anos, após a constatação de que os adipócitos secretam leptina como produto do gene *ob*. A partir de então, alguns poucos autores estabeleceram o tecido adiposo como um órgão endócrino que se comunica com o sistema nervoso central (WAJCHENBERG, 2000). Os adipócitos sintetizam e liberam uma variedade de peptídeos e não-peptídeos, bem como expressam outros fatores além de sua capacidade de depositar e mobilizar triglicerídeos, retinóides e colesterol. Estas propriedades permitem uma interação do tecido adiposo com outros órgãos, bem como com outras células adiposas.

O CG das larvas de *A. gemmatalis* apresentou diferenças estruturais, a exemplo daquelas descritas por Buys, (1924); Coupland (1957) e Wang; Hannerland, (1993) e diferenças anatômicas como aquelas relatadas (DEAN et al., 1985; CONTE, 1994; FONTANETTI et al., 2004). Estas diferenças permitiram dividir o CG em porções distintas, a porção parietal (PA) e a porção perivisceral (PV).

De modo geral a PA constituiu a maior parte do órgão e apresentou-se formada por células altas dispostas de forma contígua, com uma única célula de espessura. A PV mostrou-se formada por massa de células pequenas sobrepostas como se fossem “clusters”, ambas as porções se encontravam revestidas por uma lâmina acelular, que recobria as células, agrupando-as e mantendo-as separadas da hemolinfa.

O citoplasma dos trofócitos da PA apresentou-se acidófilo, dado à presença de várias organelas, enquanto que a basofilia citoplasmática dos trofócitos da PV deveu-se a grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. Na PA, chamou a atenção o encontro de trofócitos cujo citoplasma era menos acidófilo, com discreta basofilia, o que pode indicar uma transição entre o CG da PA e da PV. Entretanto não se encontrou relatos na literatura que corroborassem ou não estas observações. Também não foi possível elucidar, pela metodologia utilizada, se existe a transformação de um tipo celular em outro; e caso isto possa ocorrer, qual porção do CG que inicia este processo e como qual mecanismo, são dúvidas a serem sanadas.

A intensa vacuolização observada no citoplasma dos trofócitos da PA e da PV se deve a presença de gotas de lipídeo, e à medida que aumenta a deposição desta substância nos trofócitos da PA, pode-se observar que as gotículas aumentavam de tamanho e se fundiam formando grandes gotas lipídicas, alterando a forma e a posição do núcleo. Este resultado é concordante com os descritos por Conte (1994); Oliveira e Cruz-Landim (2003). Na PV, as gotas de lipídeos aparecem como espaços vazios arredondados de tamanhos variados, porém o núcleo ocupa posição central e apenas o seu formato é o que fica à mercê

da variação na quantidade de lipídeo presente em seus vacúolos. Além dos lipídeos observou-se também, a presença de grandes depósitos de glicogênio em ambas as porções (PA e PV). Estas substâncias podem estar sendo sintetizadas e ou sendo obtidas de outras fontes, como por exemplo, da hemolinfa pelos trofócitos, indicando intensa atividade biossintética, destas células.

Tanto a PA como a PV eram recobertas por uma lâmina acelular espessa, entretanto na PA esta lâmina era mais espessa e apresentava superfície irregular com inúmeras projeções, diferentemente daquela observada na PV, que apresentou uma superfície laminar bastante lisa e também mais delgada. Este fato é um indicativo que estas duas porções podem apresentar diferenças funcionais. A presença de uma lâmina acelular como a da PA, é corroborada por Conte 1994, que descreveu a mesma morfologia no corpo gorduroso de larvas de *D. saccharalis*, sem precisar, no entanto, a porção a que pertencia este tipo de lâmina.

A presença desta lâmina acelular, em PA e PV, leva a crer que ela promove a filtração de partículas, sem no entanto, impedir a troca de substâncias entre os dois ambientes, o interno (citoplasma com os trofócitos) e o externo, a hemolinfa. Esta função seletiva também foi descrita por Harrison e Locke (1998) e segundo eles, esta seleção ocorre porque a lâmina basal é carregada negativamente separando e aglutinando cátions e excluindo partículas acima de 15 nm de diâmetro.

As projeções em várias direções na lâmina acelular da PA podem estar auxiliando além da filtração a retenção de partículas nesta porção, indicando um caráter de agregação celular, sustentando e mantendo a morfologia do órgão, mais rígida, como a fita formada por células dispostas de forma contígua.

Fontanetti et al (2004) descreveram as células do CG de *Rhinocriscus padbergi* (Verhoeff, 1938) ao microscópio de varredura como sendo unidas por finos prolongamentos, sugerindo que estas estruturas possam ser partes contínuas da membrana ou um material de adesão natural. Chapman, (1998) relatou que em alguns raros casos podem-se ver junções comunicantes e adesivas entre as células.

No material deste trabalho não foi observado, tanto em PA quanto em PV a união de células sendo feita por prolongamentos, porém verificou-se a presença de estruturas membranosas, bem como da lâmina acelular que promovem esta adesão. Corroborando estas idéias, Harrison e Locke 1998; relataram que devido a sua morfologia há indícios de que esta membrana esteja relacionada com a adesão e permeabilidade de substâncias presentes na hemolinfa e no interior das células, promovendo trocas de íons e macromoléculas.

Abaixo da lâmina basal tanto em PA como em PV notou-se uma região de baixa densidade com uma largura mais ou menos uniforme que a mantinha separada da membrana plasmática, esta disposição de estruturas confere com o que relata Conte (1994) em *D. saccharalis* e provavelmente refere-se a formação de um ambiente propício para efetuação da trocas entre os ambientes.

No lado interno da lâmina acelular tanto na PA como na PV, observaram-se dobras da membrana plasmática formando câmaras contínuas com o espaço intercelular chamados de sistemas reticulares. Esta descrição confere com os resultados descritos em larvas de 5^o instar, e em adultos, de *Calpodes ethlius*, (Stoll, 1780) feita por Harrison e Locke (1998). Esses mesmos autores afirmaram que estes sistemas desaparecem quando o inseto entra em fase de pupa e é refeito quando ele se torna adulto.

Os sistemas de retículos encontrados tanto em PA quanto em PV, também estão em concordância com Harrison e Locke (1998), que relataram a presença de espaços intercelulares contínuos com a membrana plasmática. A provável função destes sistemas de retículos é o de permitir maior contato entre as células e a hemolinfa, facilitando as trocas metabólicas.

O surgimento destes espaços coincide com o aumento da atividade metabólica do inseto e permite que parte da hemolinfa fique separada do resto circulante na hemocele. Esta linfa contida nos espaços permite que a célula tenha um maior controle no transporte de moléculas, como proteínas e lipídeos, de dentro para fora e de fora para dentro nas células. BEW (1987) cita que uma das funções do sistema reticular em células de *Manduca sexta* (Cramer, 1779) pode ser a de absorver proteínas para o interior do corpo gorduroso.

Nos trofócitos de *Calpodes ethlius* (Stoll, 1780) foram descritos 11 tipos diferentes de vacúolos originados em geral da membrana plasmática, porém eles não ocorrem todos ao mesmo tempo (HARRISON; LOCKE, 1998). Em larvas de *A. gemmatalis* foi observado no citoplasma da PA e PV apenas um tipo de vacúolo que continha em seu interior grande quantidade de lipídeos. Na PA estes vacúolos se fundem transformando-se em grandes vesículas que mantém contato com as ilhas elétrons lucentes, cheias de glicogênio. Estes sítios ou ilhas de glicogênio também foram relatados por Conte (1994), Chapman (1998) e Oliveira e Cruz-Landim (2003).

Não se observou a presença de nenhum outro tipo de vacúolo, como os descritos por Mori et al. (1970), Tojo et al. (1978), Wigglesworth (1984), Locke, (1984), Dean et al. (1985), Conte (1994) e Cruz-Landim (2000), bem como de corpos

multivesiculares nos trofócitos do CG, tanto na PA como na PV de larvas de *A. gemmatalis* do 4^o instar.

Observou-se a presença de corpos lamelares nos espaços dos sistemas de retículos e próximos ao retículo endoplasmático rugoso. Este dado é corroborado por McDermid e Locke (1983) que relataram que os corpos lamelares estão envolvidos no “turnover” das membranas, aparecendo no corpo gorduroso quando uma grande quantidade de membranas é liberada, devido à passagem de tirosina dos vacúolos para a hemolinfa.

A vasta ocorrência de retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas relatadas neste trabalho foi descrita também por Bhakthan e Gilbert (1972), em *Hyalophora cecropia*, Conte (1994), em *D. saccharalis* e Harrison e Locke (1998), em *C. ethlius*, que informam o envolvimento das células do corpo gorduroso com a síntese de proteínas, lisossomos e vitelogenina, secreção da hemolinfa, nos primeiros estágios do desenvolvimento, e o acúmulo de membranas ou proteínas destinadas à formação de peroxissomos.

Dentre as organelas, o complexo de Golgi raramente foi observado, e o REL esteve ausente nos trofócitos do CG nas larvas de *A. gemmatalis* estudadas. A ausência deste último indica que os trofócitos aparentemente não fazem síntese de lipídeos apenas armazenados em seu citoplasma e que esta substância pode ser depositada após ser capturada através da hemolinfa. Estes dados podem ser corroborados por Conte (1994). As mitocôndrias apresentaram vários formatos e segundo (HARRISON; LOCKE 1998) elas tendem a ser alongadas em larvas e no adulto tendem a ser esféricas.

Os trofócitos do CG de *A. gemmatalis* apresentaram muitas mitocôndrias com formatos alongados e arredondados a exemplo do relatado por Conte (1994), e Harrison e Locke (1998). É provável que esta variação na morfologia das mitocôndrias esteja relacionada ao aumento na quantidade de cristas, indicando que isto possa ocorrer devido ao estado de síntese e armazenamento ao qual este órgão se propõe.

7 CONCLUSÕES

Em larvas de *A. gemmatalis* de 4o instar, o CG apresenta coloração branca leitosa, consistência delicada, suspenso na hemocele por meio de traquéias, sendo formado por duas porções distintas: porção parietal (PA) e a porção perivisceral (PV), nitidamente identificáveis ao ML, MEV e MET.

A PA constitui a maior parte do órgão e tem o formato de fita; enquanto que a PV é encontrada em pequena quantidade e restrita ao redor do tubo digestivo. Ambas as porções são formadas por um único tipo celular, os trofócitos, que apresentam arranjo e organização citoplasmática diferenciadas. Os trofócitos da PA são altos, justapostos, formando longas fitas, com uma camada de células, recobertas por uma lâmina acelular com projeções filiformes. Os trofócitos da PV são pequenos, poliédricos, formam aglomerados celulares em forma de cachos, em camadas sobrepostas, recobertas por lâmina acelular lisa.

Ultraestruturalmente, na PA, o REG é bem desenvolvido, localiza-se tanto na periferia quanto ao redor do núcleo, sendo que na periferia apresenta numerosas cisternas dilatadas; o complexo de Golgi está ausente ou pouco desenvolvido; as ilhas de glicogênio são grandes, numerosas e distribuídas ao redor das gotículas de lipídeo por todo o citoplasma. Na PV o REG é predominante na periferia e contém poucas cisternas dilatadas; o complexo de Golgi está presente e é pouco desenvolvido; as ilhas de glicogênio são pequenas e distribuídas, juntamente com as gotículas de lipídeos, ao redor do núcleo.

O trânsito de moléculas entre os trofócitos e a hemocele, via hemolinfa, é facilitado por canais, que formam os sistemas reticulares da membrana plasmática, que são bastante numerosos na PA. Devido às diferenças na distribuição e quantidade das organelas é provável que as células das duas porções deste órgão estejam envolvidas em processos diferentes durante o desenvolvimento larval de *A. gemmatalis*.

8 REFERÊNCIA

- BEW, L., K..The fat body of *Manduca sexta*: A developmental survey of the structure function relationship during the fifth instar. **Master of Science (Biochemistry)**, Arizona: University of Arizona, 1987. 77p.
- BHAKTHAN, N., M., G.; GILBERT, L., I.. Studies on the cytophysiology of the fat body of American silk-moth. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 124, p: 433-444, 1972.
- BUYS, K., S..Adipose tissue in insects. **Journal. Morphology.**, v.38, p.485-527, 1924.
- CERRI, P., S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v.34, n 8, p.365, 2003.
- CHAPMAN, R., F.. **The Insect: Structure and Function**, Cambridge: University Press, 1998. p. 770
- CONTE, H.. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia falvipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, 1994. Tese (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- COUPLAND, R., E..Observations on the normal histology and histochemistry of the fat body of the locust (*Schistocerca gregaria*). **Journal Experimental Biology**, v.34, p.290-296, 1957.
- CRUZ-LANDIM, C.. Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 83-88, 2000.
- CUNHA, M. A. S.; CRUZ-LANDIM, C.. Modificações Histológicas e Histoquímicas do Corpo Gorduroso de Rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera, Formicidae) Durante o Primeiro Ciclo Reprodutivo. **Acta Biológica** v. 12, (1,2,3,4), p. 11-12, 1983.
- DEAN, R., L; LOCKE, M.; COLLINS, J., V.. Structure of fat body. In: KERBUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.), **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. v. 3. London: Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 155-210,
- ELDRIDGE, F. B.; EDMAN, D. J.. **Medical Entomology**. Springer, 2004. 672p.
- FONTANETTI, C.,S.; CAMARGO-MATHIAS, M., I.; TIRITAN, B., M., S.. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida), **Iheringia Serie Zoologia**. v. 94, 4ed, p. 351-355, 2004.
- GULLAN, P., J.; CRANSTON, P., S.. **The insects on outline of entomology**. 3ed. London: Blackweel Publishing, 2005. 505p.
- HAPNER, K., D.; STEBBINS, M., R.. Biochemistry of arthropod agglutinins. In: GUPTA, A., P.. **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. Nova York: Wiley Interscience, 1986. p.227-51.

HARRISON, F., W.; LOCKE, M.. **Microscopic anatomy of invertebrates.** vol. 11B. New York: Willey-Liss, 1998. p. 641-686.

HOFFMAN-CAMPO, C., B.; OLIVEIRA, E., B.; MOSCARDI, F.. **Criação massal da lagarta da soja.** Londrina: EMBRAPA, 1985.

KEELEY, L., L.. Physiology and biochemistry of the fat body. In: **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Kerkut, G., A.; Gilbert, L., I.; v. 3, p. 211-248, Oxford: Pergamon Press, 1985.

KRITSKY, GENE.. **A Survey of Entomology.** New York: Universe, 2002. 308p.

LEVY, S., M.. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepdoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (*AgMNPV*): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LOCKE, M..The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: KING, R.C.; AKAI, H..**Insect Ultrastructure.** New York: Plenum Press. 1984. p.151-197.

MCDERMID, H.; LOCKE, M. Tyrosine storage vacuoles in insect fat body. **Tissue and Cell**, Essex, v. 15, p. 137-158, 1983.

MORI, T., AKAI, H.; KOBAYASHI, M..Ultrastructural changes of the fat body in the silkworm during postembryonic development. **Journal Science Japan**, v.39, p.51-61, 1970.

NIJHOUT, F., H.. **Insect Hormones.** Princeton University Press, 1998. 280p.

OLIVEIRA, V., T., P.; CRUZ-LANDIM, C.. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 195-2005, 2003.

PEARSE, A., G., E.. **Histochemistry: Theoretical and Applied.** Churchill, London, 1985.

RICHARDS, O., W.; DAVIES, R., G. **Imm's General text book of entomology. vol one: Structure, physiology and development.** London, Chapman & Hall, 1994.

ROMA, G., C.; MATHIAS, M., I.,C.; BUENO, O., C.. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. **Mícron.** v. 7, p. 234-242, 2005.

ROSSEL, R., C.; WHEELER, D., E. Storage function and ultrastructure of the adult fat body in workers of the ant *Camponotus festinatus* (Bukley) (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, Oxford, v. 24, p. 413-426, 1995.

SARMENTO, R., A.; OLIVEIRA, H., G.; HOLTZ, A., M.; SILVA, S., M.; SERRÃO, J., E.; PALLINI, A. Fat body morphology of *Eriops connexa* (Coleóptera, Coccinelidae) in function of two alimentary sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 47, n. 3, p. 407-411, 2004.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology: with a new foreword by George C. Eickworth**, Ithaca and London: Cornell University Press, 1993. 667p.

STANLEY, D. **Welcome to the Entomology 401/801-- Insect Physiology**. Disponível em <<http://entomology.unl.edu/ent801/ent801home.html>>. Acesso em: 20 mar. 2006

TOJO, S.; BETCHAKU, T.; ZICCARDI, V., J.; WYATT, G., R.. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. **Journal Cellular Biology**, v.78, p.823-838, 1978.

WAJCHENBERG.; LÉO-WAJCHENBERG, B.. Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol. 44, n°1, p. 13-20, 2000.

WANG, Z.; HAUNERLAND, N., H. Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 259, p. 673-678, 1993.

WIGGLESWORTH, V., B.. **The Principles of Insect Physiology**. 8ed. London: Chapman & Hall, 1984. 191p.

WIGGLESWORTH, V., B. .**The principles of insect physiology**. 6ed, London: Methuen & Co Ltd, 1965. 741p.

ZARA, F., J.; CAETANO, F., H.. Ultramorphology and histochemistry of fat body cells from last instar larval of the *Pachycondyla*(= *Neoponera*) *villosa*(Fabricius) (Formicidae: Ponerinae). **Brazilian Journal Biology**, vol.64, n°3B, p.725-735, 2004.

4 ARTIGO 2: ESTUDO HISTOQUÍMICO DO CORPO GORDUROSO DE LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

RESUMO

O corpo gorduroso (CG) dos insetos participa diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, análogo ao fígado dos vertebrados e hepatopâncreas dos crustáceos. Armazena lipídio é responsável pela síntese da trealose, desaminação e transaminação de aminoácidos, remoção de sais de cálcio, uratos e produtos nitrogenados da hemolinfa. Em lepidópteros, as células do CG são capazes também de realizar fagocitose e participar da remodelação tecidual na metamorfose. Este órgão mantém o equilíbrio entre recursos alimentares e exigências energéticas durante o desenvolvimento do inseto e pode alterar suas atividades em resposta a sinais nutricionais e hormonais para suprir as necessidades de crescimento do inseto, metamorfose e reprodução. A lagarta da soja, *A. gemmatalis*, é uma praga importante da cultura da soja e seu controle biológico é realizado preferencialmente pelo nucleopoliedrovírus AgMNPV. A rota natural da infecção no hospedeiro é através da ingestão de poliedros virais presentes no alimento, estes atingem o intestino médio das lagartas, onde são dissolvidos e liberam as partículas de vírus. Estes vírus adentram as células colunares do IM e se replicam no núcleo destas células. Os vírus recém formados atravessam a membrana basal, caem na hemolinfa e vão infectar outros órgãos, onde continuam sua replicação finalizando com a morte do hospedeiro. Sabe-se que a infecção viral em insetos acarreta alterações na composição da hemolinfa, que são geralmente atribuídas à patogenicidade viral no CG, já que ele é o órgão responsável, entre outras funções pela síntese da maioria dos elementos constituintes da hemolinfa. Apesar de sua importância, raros são os trabalhos que relatam sobre o CG da *A. gemmatalis* em condições de infecção ou não, incluindo a constituição química deste. Este trabalho descreve a composição química das células do CG de larvas de *A. gemmatalis*, através de métodos histoquímicos para detecção de polissacarídeos (PAS); lipídeos (Sudan Black B), proteínas totais (Fast Green) e identificação de tecido conjuntivo (Tricrômico de Mallory). As porções de PA e PV, apresentaram reação positiva à coloração de PAS, com diferença de intensidade e disposição. Após a diastase se confirmou os grânulos como sendo glicogênio. Os trofócitos da PA e PV apresentaram vacúolos positivos ao método de detecção de lipídeos, sendo que estes se mostraram maiores e mais numerosos na PV. Os trofócitos da PA e PV apresentaram grânulos de tamanhos variados fortemente positivos ao Fast Green, distribuídos ao redor do núcleo e dos vacúolos. A lâmina acelular mostrou-se fracamente positiva aos métodos de Sudan Black B e Fast Green, e negativa ao PAS, e o tricrômico revelou a presença de material de natureza conjuntiva nesta lâmina. Estas técnicas possibilitaram a diferenciação histoquímica das porções PA e PV, mostrando que ambas as porções estão envolvidas com os processos de síntese proteica e polissacarídica e com a armazenagem de lipídeos, sendo que a PV se revelou com grande capacidade de armazenar lipídeos. A composição histoquímica do CG nestas larvas é similar às de outros lepidópteros, com pequenas variações que podem estar relacionadas ao estágio larval estudado.

Palavras-chave: Trofócitos, Morfologia, Controle biológico, Pragas da soja.

4 ARTICLE 2: HISTOCHEMICAL STUDY OF LARVAE FATTY BODY OF *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT

The fatty body of the insects participates directly into the lipids metabolism, carbohydrates and proteins, analogous to the vertebrates' liver and hepatopancreas of shellfish. It stores lipids and it is responsible for the trehalose synthesis, carbohydrates amino acids desamination and transamination, removal of calcium salt, urates and of hemolymph. In Lepidoptera, the fatty body cell is able to carry out phagocytes and to participate of the tissue factor remodeling in the metamorphosis. This organ keeps the balance among the food resources and energetic demands during the insect development and can alter its activities in response to nutritional and hormonal signals to provide the insect growth needs, metamorphosis and reproduction. The Soy caterpillar, *A. gemmatalis*, is an important pest of soy plantation and its biological control is done preferably by nucleopolydnavirus AgMNPV. The natural infection route in the host is done through the ingestion of food viral polyhedron, they reach the caterpillar medium intestines where they are dissolved and release some virus particles. These viruses enter IM column cell and they double in this cell nucleus. The virus recently formed cross the basal membrane, fall at the hemolymph and infect other organs, where they keep their replication finalizing into the host death. It is known that insects viral infections leads to hemolymph composition alterations which are generally attributed to the viral pathogenic of the fatty body, once it is responsible, among other functions by the synthesis of most hemolymph constituents elements. Despite of its importance, rare are the papers which describe about *A. gemmatalis* fatty body in infection conditions or not, including its chemical constitution. This paper describes the cell chemical composition of larvae fatty body *A. gemmatalis*, through methods Histochemical to polysaccharides detection (PAS), lipids (Sudan Black B), total proteins (Fast Green) and the identification of conjunctive tissue (Mallory Trichromic). The PA and PV portions, present a positive reaction to PAS coloration, as a difference of intensity and disposition. After this diastases it was confirmed the granules as glycogenic. The PA and PV trophocytes present positive vacuoles to the lipids detection method, once these show themselves bigger and more numerous in the PV. PA and PV trophocytes presented some granules with varied sizes strongly positive to Fast Green, distributed around the nucleus and vacuoles. The acellular lamina presented itself weakly positive to the methods of Sudan Black B and Fast Green, and negative to PAS, and the Trichromic revealed the presence of conjunctive nature material in this lamina. These techniques provided the histochemical differentiation of PS and PV portions, showing both portions are involved into the proteic and polysaccharide synthesis process and with lipids storage, where PV revealed with great capacity to store lipids. The Histochemical composition of these larvae fatty body is similar to other Lepidoptera, with small variations which can be related to the larval period studied.

Key Word: Trophocytes, Morphology, Biologic control, Soybean pests

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente na produção de soja, sendo esta cultura de grande importância no complexo agroindustrial do país. Os incentivos científicos e tecnológicos para aumentar a qualidade e a produtividade deste grão têm sido estrategicamente intensificados. Dentre estes, o combate às pragas que atacam a soja é cada vez mais criterioso, sendo que o manejo integrado de pragas (MIP) vem garantindo sucesso ao seu cultivo.

Considerando as vantagens da produção mais econômica, da diminuição do impacto ambiental, do aumento da segurança alimentar e da menor exposição dos trabalhadores rurais a substâncias tóxicas, o controle biológico mostra-se como uma alternativa bastante viável para a agricultura. Hoje é possível reduzir em até 60% a aplicação de agrotóxico com o uso de manejo ecológico adequado.

O controle biológico da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) é realizado preferencialmente pela aplicação do bioinseticida formulado à base do *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV), vírus da poliedrose nuclear multicapsídeo, específico para este inseto.

Embora exista uma ampla literatura sobre os aspectos biológicos e comportamentais das larvas de *A. gemmatalis*, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de defesa frente ao AgMNPV.

Sabe-se que as células do corpo gorduroso (CG), são alvos da infecção viral, e que esta mesmo sendo secundária, acarreta interferência direta na síntese de componentes da hemolinfa relacionados à defesa humoral. Entretanto, não é encontrado na literatura especializada, informações sobre a constituição do CG da lagarta da soja, bem como o envolvimento deste órgão nos mecanismos relacionados à defesa deste animal, frente ao AgMNPV.

Deste modo, para estimar o grau de resposta à infecção, faz-se necessário desenvolver previamente o estudo do órgão alvo, ou seja, do CG, em condições de desenvolvimento não patológico, fundamentado na ausência de informações na literatura especializada sobre este tecido em *A. gemmatalis*, no estágio larval.

Nos insetos em estágio larval, as células do corpo gorduroso (CG) estão envolvidas com síntese, secreção, troca de proteínas e acúmulo de lipídeos (SATURENGO DA CUNHA; CRUZ-LANDIM, 1983).

O CG é considerado como o principal local do metabolismo intermediário dos insetos, incluindo todas as reações celulares relacionadas com a produção de secreções especiais, síntese e decomposição química dos constituintes celulares, metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (PRICE, 1973, WOLF et al.,1977)

Gullan e Crasnton (2005) afirmaram que as células do CG estocam e sintetizam proteínas específicas durante o último instar de desenvolvimento dos insetos holometábolos e os acumulam na hemolinfa para serem usados durante a metamorfose, como fonte de aminoácidos para a síntese de proteínas, durante a pupação.

Nas larvas de lepidópteros, em determinados estágios de desenvolvimento, grandes quantidades de proteínas são sintetizadas no CG e a maioria delas é exportada para a hemolinfa (LOCKE; COLLINS, 1968, IZUMI et al., 1980). Testes bioquímicos aplicados a *Galleria mellonella* através da eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstraram que a maior parte das proteínas retiradas da hemolinfa, pelo CG, são glicoproteínas ou glicolipoproteínas (COLLINS; DOWNE, 1970).

A literatura especializada fornece poucas informações sobre a constituição do CG da lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Sabe-se que morfologicamente o CG de larvas de *A. gemmatalis* de 4^o instar (10-12 dias de desenvolvimento), está formado duas porções distintas: a porção parietal (PA) e a porção perivisceral (PV), ambas formadas por um só tipo celular, denominado trofócito. Estas células apresentaram diferenças morfológicas e ultraestruturais, em conformidade com a porção em que se encontram, isto é, na PA ou na PV. Sobre a composição química destas células a literatura não fornece nenhuma informação. Assim, este trabalho descreve composição química das células do CG de larvas de *A. gemmatalis*, em 4^o instar, através do uso de técnicas histoquímicas, buscando identificar e localizar os compostos ou radicais químicos presentes nestas células, baseados em reações químicas específicas ou em interações de alta afinidade entre moléculas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2 1 Obtenção de Insetos

As larvas de *A. gemmatalis*, foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Soja, Londrina-PR, onde eram criadas em sala climatizada, regulada à temperatura de 25±27°C, em regime de fotoperíodo com 14 L e 10 E, umidade

relativa do ar de 80%, e alimentadas com dieta artificial segundo Hoffman-Campo et al. (1985).

2.2 Coleta e Processamento do Corpo Gorduroso

As larvas em 4^o instar foram limpas em álcool 70%, anestesiadas por resfriamento no congelador por 5 minutos e mantidas no gelo até a dissecação queção foi realizada sob microscópio estereoscópico com solução salina de insetos (1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl₂; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada – q.s.p. 100ml).

O CG foi retirado e fixado em diferentes soluções de acordo com procedimento histoquímico a ser realizado. A seguir o material foi incluído em paraplast ou em resina glicolmetacrilato conforme os seguintes protocolos:

A- INCLUSÃO EM PARAPLAST

Após a fixação os corpos gordurosos foram lavados em álcool 70%, e submetidos ao seguinte protocolo:

- ☞ Desidratação em álcool 95% – 3 x 10 min.
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 2 x 15 min.
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 20 min.
- ☞ Diafanização em xilol I – 2 x 15 min.
- ☞ Diafanização em xilol II – 15 min. (estufa $\pm 37^{\circ}\text{C}$)
- ☞ Infiltração em paraplast – 3 x 25 min.
- ☞ Infiltração paraplast – 30 min.
- ☞ Inclusão em paraplast (Oxford)

B- GLICOLMETACRILATO

Após a coleta, os CG foram fixados por 4 horas, à temperatura ambiente, em solução de glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2). O material fixado foi lavado em solução tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) e submetidos ao protocolo:

- ☞ Desidratação em álcool 30%, 50%, 70% e 90% – 15 min.
- ☞ Desidratação em álcool 95% – 20 min.
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 25 min.

Após a desidratação, o CG foi embebido em solução de resina glicolmetacrilato e álcool 95° (1:1) por 4 horas à temperatura ambiente para a pré-infiltração, seguida por resina pura para infiltração por 24 horas à temperatura de 4°C. A inclusão foi realizada em moldes de polietileno contendo 7,5 ml de resina básica + 1,0 ml de polimerizador (Embedding Kit - LEICA HISTORESIN), onde permaneceram em estufa a uma temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas até a completa polimerização da resina. O material incluído foi submetido a cortes de 7 μm com navalha de tungstênio em micrótomo rotativo semi-automático LEICA RM 2145 e colocados em lâminas de vidro previamente limpas com álcool-éter.

As lâminas contendo os cortes foram colocadas em uma chapa aquecedora à temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$ para melhor estiramento e aderência dos cortes.

3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Com base nos estudos realizados sobre o CG em diferentes espécies de insetos descritos na literatura, foram realizados os seguintes testes histoquímicos:

A – TÉCNICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE TECIDO CONJUNTIVO, pelo método do TRICRÔMICO DE MALLORY AO AZUL DE ANILINA (SHEEHAN e HRAPCHAK, 1980).

Após a coleta e a fixação em solução fixadora de Helly (4 hs), o material foi incluído em paraplast, submetidos a cortes com 7 μm de espessura, colocados em lâminas de vidro e corados segundo protocolo a seguir:

- ☞ Desparaplastização em Xilol – 2 x 10min;
- ☞ Hidratação em séries decrescentes de álcool 100%, 95% e 70% – 5 min;
- ☞ Hidratação em água destilada – 5 min;
- ☞ Lugol 100% - banhos rápidos;
- ☞ Lavagem em água destilada – 5 min;
- ☞ Coloração na solução A de Mallory – 5 min;
- ☞ Coloração na solução B de Mallory – 60 min;
- ☞ Lavagem em água destilada – banho rápido;
- ☞ Desidratação em álcool 95% e 100% - 5 min;

☞ Diafanização em xilol.

Em seguida os cortes foram montados com bálsamo em lâmina de vidro, recobertos por lamínula e analisados ao microscópio de luz.

B – TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS através do método do ÁCIDO PERIÓDICO-SCHIFF (PAS) (LISON, 1953) seguido de bloqueio pela ACETILAÇÃO (McMANUS, 1946) e digestão pela ALFA AMILASE (FIORE-DONNO e BAUME, 1966).

O material foi fixado em Bouin aquoso (4 hs) e submetido a inclusão em paraplast. Os cortes com aproximadamente 7 μ m de espessura, foram corados segundo protocolo a seguir:

- ☞ Desparaplastização em Xilol – 2 x 15 min;
- ☞ Hidratação em álcool 100%, 90%, 80%, 70% - 1 min;
- ☞ Hidratação em água destilada – 2 x 1 min;
- ☞ Ácido periódico (solução) – 15 min;
- ☞ Lavagem em água destilada – 2 x 2 min;
- ☞ Reativo de Schiff – 10 min;
- ☞ Lavagem água sulfurada – 2 min;
- ☞ Lavagem água corrente – 5 min;
- ☞ Desidratação em álcool 70%, 80%, 90% – 1 min;
- ☞ Desidratação em álcool 100% – 3 x 1 min;
- ☞ Diafanização em xilol – 3 x 1 min.

Em seguida os cortes foram montados com bálsamo em lâmina de vidro e recobertos por lamínula e analisados ao microscópio de luz.

B.1 – BLOQUEIO PELA ACETILAÇÃO

- ☞ Desparaplastizar e hidratar em álcool absoluto;
- ☞ Lavar em piridina;
- ☞ Tratar em anidrido acético e piridina – 20 h;
- ☞ Lavagem em séries crescentes de alcoóis e água;
- ☞ Submeter os cortes ao PAS.

B.2 – DIGESTÃO PELA ALFA AMILASE (Diastase)

- ☞ Desparaplastizar e hidratar em séries crescentes de alcoóis e água;
- ☞ Solução de amilase 0,5% ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) – 2 h;
- ☞ Lavagem em água corrente – 1 min;
- ☞ Lavagem em água destilada– 1 banho rápido;

☞ Submeter os cortes ao PAS.

Os cortes foram montados com bálsamo e recobertos por lamínula e analisados ao microscópio de luz (AXIOPHOT ZEISS)

C - TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS,
pelo método do SUDAN BLACK B (LISON; HADLER, 1960)

O material fixado em Solução de ELFTMAN por 24 hs foi incluído em paraplást, submetido a cortes com aproximadamente 7 μ m de espessura, colocados em lâminas de vidro e corados segundo protocolo a seguir:

- ☞ Desparaplastização em Xilol – 2 x 15 min;
- ☞ Hidratação em etanol 70% – 5 min;
- ☞ Solução saturada de Sudan B em etanol 70% – 30 min;
- ☞ Lavar em etanol 70% – 30 seg;
- ☞ Hidratação em água destilada – 1 banho rápido.

Em seguida os cortes foram montados com glicerina em lâmina de vidro, recobertos por lamínula e analisados em microscópio de luz (AXIOPHOT ZEISS).

D – TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS,
pelo método do FAST GREEN (MELLO e VIDAL, 1980)

Os CG foram fixados à temperatura ambiente em solução de glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato (0,1M, pH7,2) (4 hs). Incluído em resina glicolmetacrilato e submetido a cortes com aproximadamente 7 μ m de espessura, foram colocados em lâminas de vidro submetidos ao protocolo:

- ☞ Lavagem dos cortes em água destilada;
- ☞ Imersão em solução de Fast Green 0,1% em ácido acético 1% pH 2,7 – 30 min;
- ☞ Desidratação em butanol – 3 x 2 min.

Em seguida os cortes foram secos ao ar, montados com bálsamo em lâmina de vidro, recobertos por lamínula e analisados ao microscópio de luz (AXIOPHOT ZEISS).

4 RESULTADOS

Foram utilizados os critérios expressos na tabela 4.1 para a caracterização histoquímica dos conteúdos das duas porções PA e PV, do CG de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar.

TABELA 4.1: Resultados Histoquímicos do CG de *A. gemmatalis*

TESTES	Porções	Lâmina Acelular	Citoplasma	Núcleo
PAS	PA	–	+++	–
	PV	–	++	–
DIASTASE	PA	–	+	–
	PV	–	+	–
SUDAN BLACK B	PA	+	++	–
	PV	+	+++	–
FAST GREEN	PA	+	+++	+
	PV	+	+++	+

Critérios:

Negativo: – Fracamente positivo: + Medianamente positivo: ++ Fortemente positivo: +++

A coloração pelo Tricômico de Mallory evidenciou a presença de um material amorfo de coloração azulada, a lâmina acelular, que envolve e preenche os espaços entre os trofócitos (Figs. 4.1A e B), tanto da PA quanto da PV, demonstrando a natureza conjuntiva desta matriz.

Ambas as porções de PA e PV, das larvas de *A. gemmatalis* apresentaram reação positiva à coloração de PAS (ácido periódico–Schiff), com grânulos de coloração púrpura em seu citoplasma, distribuídos de forma irregular e ao redor do núcleo (Figs. 4. 2A, B e C). Aparentemente a reação ao PAS foi mais intensa na PA quando comparada a PV (Figs. 4.2A e B). A disposição dos grânulos PAS positivos também foi diferenciada, sendo que na PA as granulações se concentravam periféricamente (Fig. 4 2A) enquanto que na PV essas granulações se distribuíam mais homoganeamente por todo o citoplasma (Fig. 4 2B).

Após a diástase pela amilase, observou-se considerável redução na quantidade de grânulos PAS positivos presentes no citoplasma dos trofócitos, tanto da PA quanto da PV. A lâmina acelular não apresentou positividade ao método, portanto não foi observada (Fig. 4.2D).

Para lipídeos totais, através do método de Sudan Black B, observou-se que os trofócitos da PA e PV, apresentaram vacúolos positivos ao método de detecção de lipídeos (Figs. 4.3A e B).

Esta técnica mostrou ainda que os vacúolos apresentaram características diferentes nas duas porções do CG. Em PA, os vacúolos se mostraram pouco menores e menos numerosos que em PV. A lâmina acelular raramente é evidenciada, mas em alguns pontos pode-se notá-la levemente enegrecida (Figs. 4.3A e B).

Quanto ao método do Fast Green os trofócitos em ambas as porções, apresentaram grânulos de tamanhos variados fortemente positivos, distribuídos ao redor do núcleo e dos vacúolos (Figs. 4.3C e D). Outras estruturas também mostraram reação positiva corando-se mais fracamente que os grânulos, como os contornos celulares e a lâmina acelular (Figs. 4.3C e D).

Nos procedimentos histoquímicos realizados, a lâmina acelular mostrou-se fracamente positiva aos métodos de Sudan Black B e Fast Green, e negativa ao método do PAS (Figs. 4.3A, B, C, D e 4.2A).

5 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

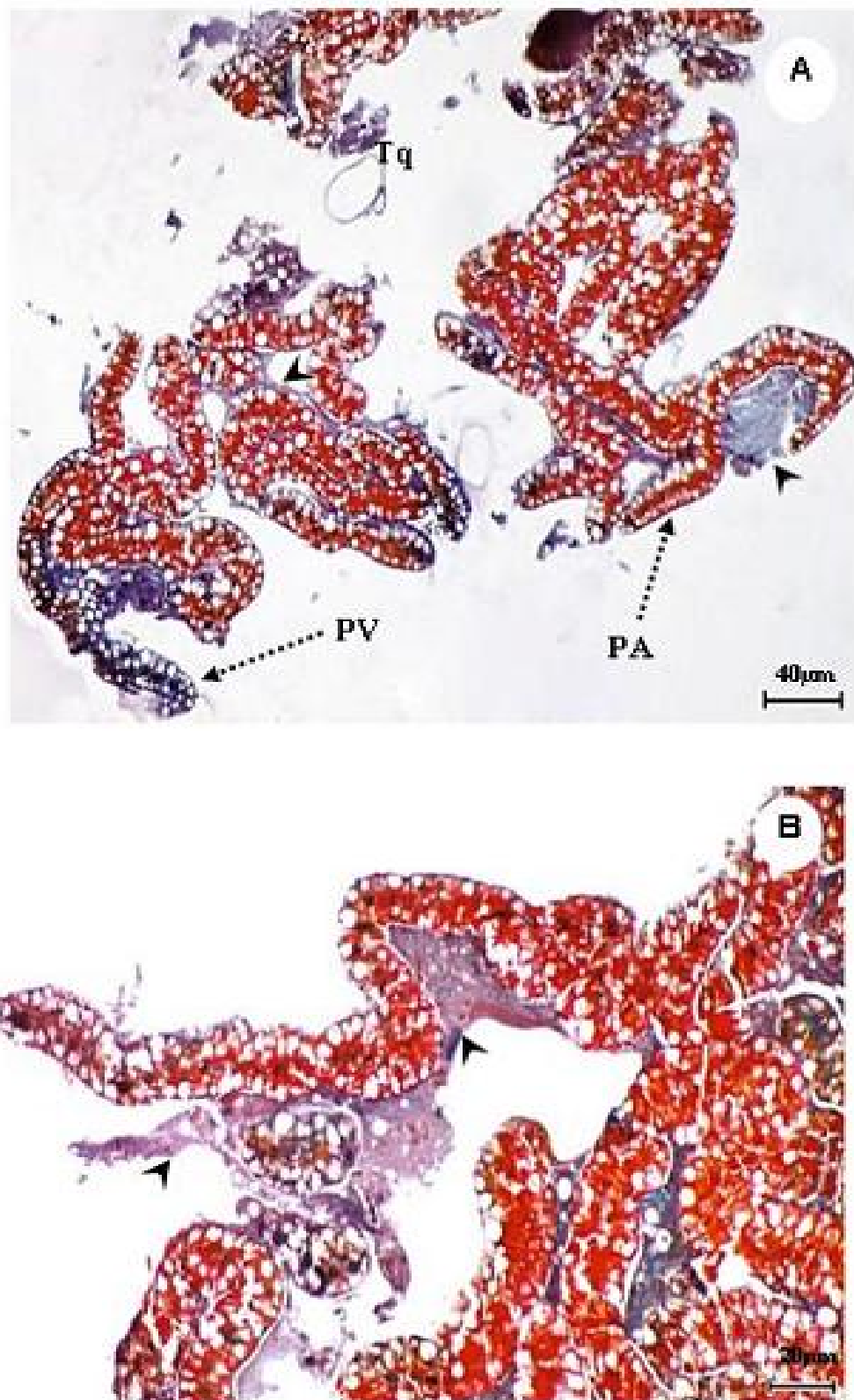


Figura 4.1

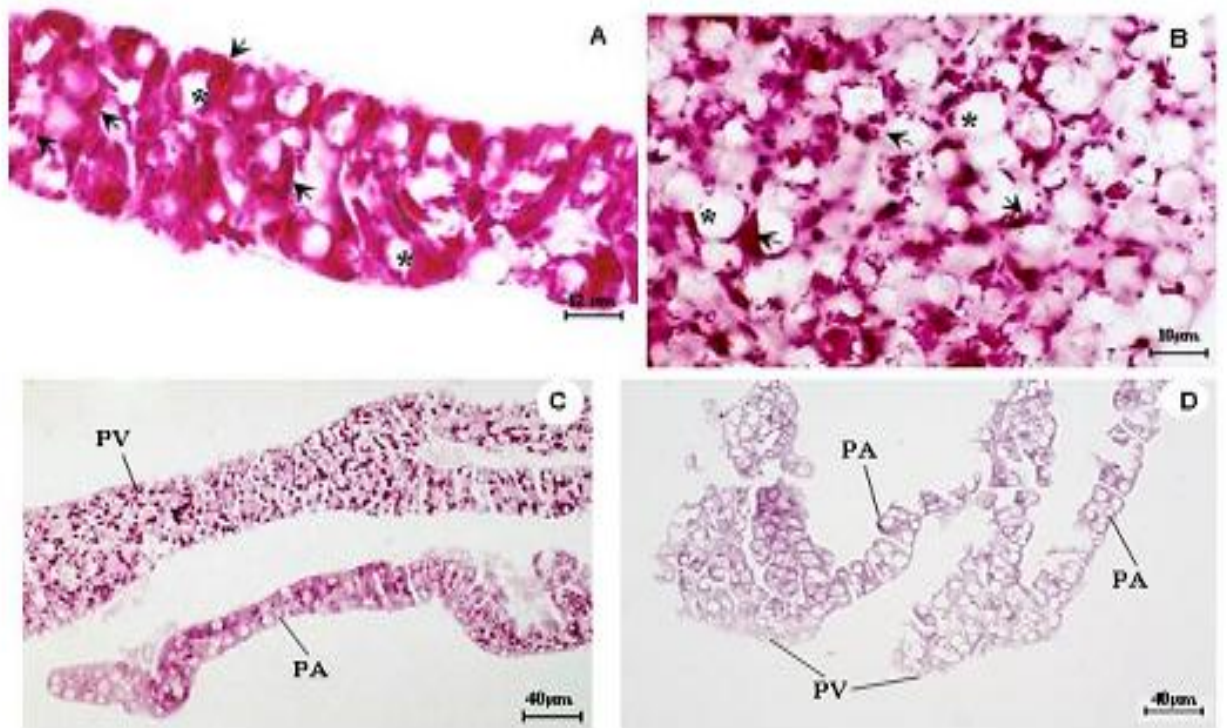


Figura 4.2

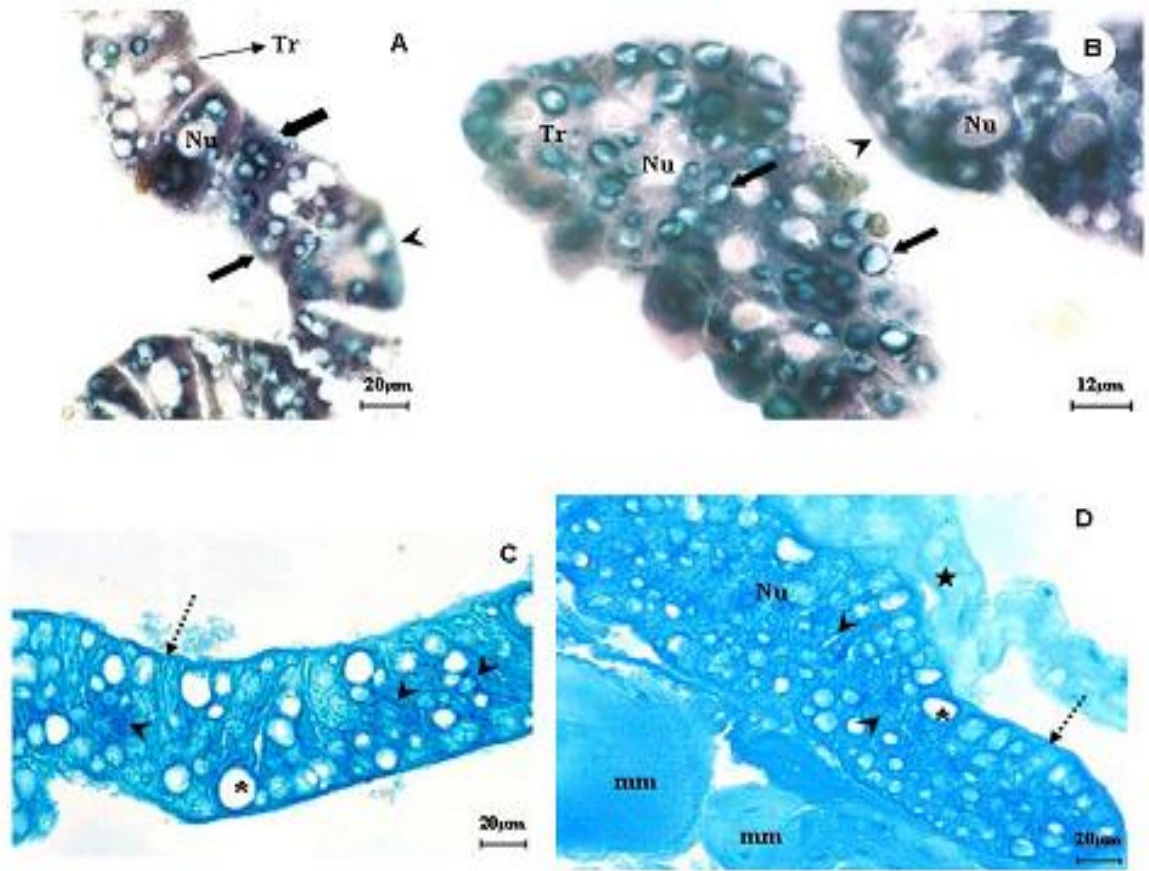


Figura 4.3

FIGURA 4.1 – Corpo Gorduroso de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o ínstar. Fixação: Helly, inclusão Paraplast, coloração Tricrômico de Mallory.

A – Porção parietal (PA) e perivisceral (PV), lâmina acelular (▶), traquéia (Tq). Barra = 40 µm.

B – Detalhe da porção parietal mostrando lâmina acelular (▶) entre os trofócitos. Barra = 20 µm.

FIGURA 4.2 – Corpo Gorduroso Parietal e Perivisceral de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar submetidos a técnica do PAS. Fixação Bouin (4h), inclusão Paraplast.

A – Porção parietal mostrando grânulos PAS positivos (▶) distribuídos ao acaso ao redor das gotas de lipídeo. Barra = 12 µm.

B – Porção perivisceral: detalhe do citoplasma dos trofócitos, notar as granulações (▶) PAS positivas distribuídas no citoplasma de forma uniforme ao redor das gotas de lipídeo (*). Barra = 10 µm.

C – Aspecto geral da porção perivisceral (PV) e parietal (PA), antes da diastase, com grânulos PAS positivos no citoplasma. Barra = 40 µm.

D – Aspecto geral das porções parietal (PA) e perivisceral (PV) submetidos ao método da diastase, notar a falta de reatividade ao método confirmando a presença de glicogênio. Barra = 40 µm.

FIGURA 4.3 – Corpo Gorduroso de larvas de *A. gemmatalis* do 4^o instar, submetidas aos métodos de Sudan Black B (A e B) fixação Elftman (24hs), inclusão paraplast e Fast Green. (C e D) fixação GA 2,5% + Para 4,0% em tampão fosfato (4h), inclusão glicolmetacrilato.

A – Trofócitos (Tr) da porção parietal: notar lâmina acelular levemente marcada (▶), gotas de lipídeo (→), núcleo (Nu). Barra = 20 µm

B – Porção perivisceral: trofócitos (Tr), lâmina acelular (▶), gotas de lipídeo dispersas no citoplasma (→), núcleo (Nu). Barra = 12 µm.

C – Porção parietal: lâmina acelular (↔), grânulos dispersos no citoplasma (▶), gotas de lipídeo (*). Barra = 20 µm.

D – Porção perivisceral: lâmina acelular (↔), grânulos (▶) próximos ao núcleo (Nu), gotas de lipídeo (*), material amorfo (★) e músculo (mm). Barra = 20 µm.

6 DISCUSSÃO

Os tricrômicos são normalmente utilizados para evidenciar estruturas da matriz, principalmente fibras de colágeno do tipo I e III, formadoras do tecido conjuntivo. Na PA e PV de CG da lagarta da soja ficou evidente uma grande quantidade de material amorfo entre, e sobre os trofócitos, indicando que a lâmina acelular é de natureza conjuntiva. Esta lâmina é secretada pelos próprios trofócitos com o intuito de manter a sua organização, isolá-los da hemolinfa e promover a seleção de substâncias que entram e saem do meio intra e extracelular.

O método histoquímico do PAS revelou que os trofócitos do CG de *A. gemmatalis* mostram grânulos irregulares PAS positivos distribuídos no citoplasma e ao redor do núcleo. As porções PA e PV mostraram granulações que reagiam diferentemente ao PAS, sendo que a reação foi mais intensa na PA, indicando maior quantidade de glicogênio nesta porção.

Segundo Irshad e Steele (1997) o CG de baratas e de muitos outros insetos contém grandes reservas de glicogênio, que podem ser utilizadas para a síntese de trealose, com sua subsequente liberação para a hemolinfa. O aumento da taxa da síntese de trealose pelo glicogênio é promovida pelo hormônio hipertrealossemico.

A fim de se confirmar a presença de glicogênio nos trofócitos da PA e da PV, ambas foram submetidas ao método de digestão pela amilase (diastase). Após este procedimento o citoplasma mostrou-se fracamente PAS positivos, confirmando a presença de glicogênio em grânulos em seu citoplasma.

A presença de glicogênio no citoplasma dos trofócitos pode ser corroborada por vários autores, Conte (1994), Zara e Caetano (2004) e Cruz Landim (1983), que relataram a presença de grânulos PAS positivos nas regiões citoplasmáticas, ao redor de vacúolos e de gotas de lipídeos no CG dos seguintes insetos *Diatrea saccharalis*, *Pachycondyla villosa* e *Melipona quadrifasciata*, e após a diástase verificaram tratar-se de glicogênio.

A diferença na quantidade de glicogênio da PA em larvas de *A. gemmatalis*, pode indicar que nesta porção, esta substância pode estar sendo depositada para ser mobilizada para o processo de intermuda, na produção de trealose para a formação do novo tegumento, indo ao encontro de Butterworth et al. (1967), que relataram que em *Drosophila ssp* as variações nas taxas de glicogênio parecem ocorrer no momento da muda.

Os trofócitos do CG de *A. gemmatalis* submetidos à análise histoquímica pelo Fast Green, apresentaram inúmeros grânulos proteicos fortemente positivos distribuídos

de forma irregular ao redor do núcleo e dos vacúolos no citoplasma da PA e da PV. Bem como outras estruturas menos intensamente coradas, como os contornos celulares, nucléolos e lâmina acelular. A presença de grânulos proteicos tem sido descrita em várias ordens de insetos tais como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Orthoptera, com exceção da ordem Hymenoptera. Estes grânulos estão relacionados com o estoque de proteínas para a metamorfose, sendo reabsorvidos pelos próprios trofócitos e utilizados como aminoácidos durante a formação de novos tecidos no adulto (DEAN et al., 1985).

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados relatados por CONTE (1994), uma vez que os adipócitos da PA do CG da broca da cana de açúcar apresentaram muitos grânulos protéicos ao redor dos vacúolos e núcleos. Este autor relatou também que estes grânulos diminuem no início do 3^o instar e durante as ecdises, este fato não pode ser observado nas lagartas da soja. É concordante também com Zara e Caetano (2004) e com Roma et al. (2006) que descreveram a presença de grânulos de proteína fortemente positivos ao azul de bromofenol ao redor do núcleo dos trofócitos da PA e da PV em *P. villosa*, *Cyphomyrmex rimosus*, e em *Mycetarotes parallelus* onde a reação positiva foi vista, somente entre os vacúolos destas células.

É provável que a presença destes grânulos em larvas de *A. gemmatalis* esteja relacionada ao estoque de proteínas durante os processos de intermuda e metamorfose deste inseto.

O teste histoquímico para o Sudan Balck B, mostrou que os lipídeos nos trofócitos do CG de *A. gemmatalis* em 4^o instar mostraram-se como vesículas arredondadas distribuídas de forma irregular nas porções PA e PV. As vesículas dos trofócitos da PV eram menores, mais numerosas, distribuídas ao redor do núcleo e bastante coradas. Nos trofócitos da PA, vacúolos maiores, pouco numerosos e menos corados que na PV e distribuídos perifericamente no citossol. O aumento no tamanho das vesículas da PA no CG parece estar relacionado à sua coalescência, pois sua observação ao microscópio de transmissão mostrou a existência de comunicação entre elas. Estas vesículas estão rodeadas por ilhas elétron lucentes de glicogênio com as quais mantém contato, indicando que esta agregação facilitaria a mobilização do glicogênio e a sua utilização durante os processos de intermuda, pupação e manutenção da vida no inseto adulto.

Os resultados encontrados nas larvas de *A. gemmatalis* são concordantes com o que descreve Conte (1994), em *D. saccharalis* com relação aos depósitos de lipídeos, mas, discorda quanto à presença de vacúolos com membranas, uma vez que, não se observou estas estruturas no citoplasma dos trofócitos, e são corroborados também por ROMA et al.,

(2006), que ao aplicar o teste histoquímico nos trofócitos de *Cyphomyrmex rimosus*, *M. parallelus*, *Acromyrmex disciger* e *Atta. laevigata* relataram a positividade de inclusões citoplasmáticas ao Sudan Black B.

A maioria dos lipídeos localizados no CG dos insetos são triglicérides, sendo a lipase responsável pelas hidrólises dos triglicérides e diglicérides (CHAPMAN, 1991). Segundo Oliveira e Cruz-Landim (2003), o principal tecido de estoque de lipídeos é o CG, e a quantidade de lipídeos em seu interior pode variar de acordo com o desenvolvimento e o estado nutricional do inseto. As células do CG estão intimamente relacionadas aos hemócitos, uma vez que hemócitos velhos, repletos de lipídeos podem ser incorporados ao corpo gorduroso, pois em várias espécies ele também é capaz de fazer fagocitose (RICHARDS; DAVIES, 1994).

Os resultados de positividade às técnicas histoquímicas observadas na lâmina acelular, indicam que esta matriz conjuntiva seja provavelmente formada por lipoproteína.

7 CONCLUSÕES

Quanto à constituição histoquímica há diferença entre as porções do CG parietal e perivisceral, revelada pela positividade aos métodos, distribuição e quantidade no citoplasma de glicogênio, lipídeos e proteínas.

Ambas as porções estão relacionadas com síntese de proteína, carboidratos e estocagem de lipídeos. A porção PA apresenta maior quantidade de glicogênio e de proteínas em relação à PV, enquanto que a PV apresenta maior quantidade de gotículas de lipídeos. Por outro lado as gotículas de lipídeos aparentemente são maiores na PA do que na PV.

Estas diferenças indicam que as porções deste órgão estão envolvidas em processos diferentes durante o desenvolvimento larval de *A. gemmatalis*, sendo a que a PA pode estar mais relacionada com a síntese proteínas e de glicogênio e a PV estar mais relacionada com a estocagem de lipídeos em grande quantidade.

A lâmina acelular é secretada pelos trofócitos, e sua natureza conjuntiva indica que a sua constituição é lipoprotéica.

8 REFERÊNCIA

ARRESE, E., L.; CANAVOSO, L., E.; JOUNI, Z., E.; PENNINGTON, J., E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M., A.. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 31, p. 7-17, 2000.

BUTTERWORTH, F., M.; BODENSTEIN, D.; KING, R., C.. Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. In: An experimental study of larval fat body. **Journal Experimental Zoology**, v.158, p.141-154, 1967.

CHAPMAN, R., F.. **The Insects Structure and Function**. American Elsevier Publishing Company, Inc., 1991. 919p.

COLLINS, J., V.; DOWNE, A., E., R.. Seletive accumulation of hemolymph proteins by the fat body of *Galleria mellonella*. **Journal insect Physiology**, v.16, p.1697-1708, 1970

CONTE, H.. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia falvipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro, 1994. Tese (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

CRUZ-LANDIM, C.. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep (Apidae: Meliponinae). **Naturalia**, v.8, p. 7-23, 1983.

DEAN, R., L.; LOCKE, M.; COLLINS, J., V.. Structure of fat body. In: KERBUT, G., A.; GILBERT, L., I., (Ed.), **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, v. 3, 1985. p. 155-210.

FIORE-DONNO, G.; BAUME, L., J.. Etude histochemique de Lla dentinogénese humaine. **Helvetica Odontológica Acta**. v. 10: supplementum IV, p. 141-185, 1966.

GULLAN, P., J.; CRANSTON, P., S.. **The insects on outline of entomology**. 3ed. London: Blackweel Publishing, 2005. 505p.

HOFFMAN-CAMPO, C., B.; OLIVEIRA, E., B.; MOSCARDI, F.. **Criação massal da lagarta da soja**. Londrina: EMBRAPA, 1985.

IRSHAD, A.; STEELE, J., E.. Hypertrehalosemic hormones increase the concentration of free fatty acids in trophocytes of the cockroach (*Periplaneta Americana*) fat body. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 118A, n. 4, p. 1225-1231, 1997.

IZUMI, S.; TOJO, S.; TOMINO, S.. Translation of fat body mRNA from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry**, v.10, p.429-434, 1980.

LISON, L., HADLER, S.. **Histochemie et cytochemie animales pincipes et methods**. 55ed. v.2, Paris: Gauthiers-Villars, 1960. 749p.

LISON, L.. **Histochemie et Cytochemie Animales**. Paris: Gauthier Villars, 1953. 607p.

LOCKE, M.; COLLINS, J., V.. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of in a insect. **Journal Cellular Biology**, v.36, p.453-483, 1968.

McMANUS, J, F, A..Demonstration of certain fatty substances in paraffin sections. **Journal Pathology Bacteria**, v.58, p.93-95, 1946.

MELLO, M, L, S.; VIDAL, B, C..**Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1980, 69p.

OLIVEIRA, V, T, P; CRUZ-LANDIM, C.. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 195-205, 2003.

PRICE, G., M.. Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. **Biology Reviews**, v.48, p.333-375, 1973.

RICHARDS, O.,W.; DAVIES, R., G.. **Imm's General text book of entomology. Vol. one: Structure, physiology and development**. London: Chapman & Hall, 1994. 418p.

ROMA, G., C.; MATHIAS, M.,I.,C.; BUENO, O., C.. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipds and polysaccharides detection. **Mícron**. v. 37, p. 234-242, 2006.

SHEEHAN, D., C.; HRAPCHAK, B., B.. **Theory and practice of histotechnology**. 2 ed, London: Mosby Company, 1980. p. 190-191.

STAURENGO DA CUNHA, M., A.; CRUZ-LANDIM, C.. Modificações histológicas e histoquímicas do corpo gorduroso de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) durante o primeiro ciclo reprodutivo. **Acta Biológica do Paraná**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 11-22, 1983.

WOLF, J.; AKAM, M., E.; ROBERTS, D., B.. Biochemical and imunological studies on larval serum protein. I. The major hemolymph proteins of *Drosophila melanogaster* third-instar larvae. **European Journal of Biochemistry**, v.79, p. 47-53, 1977.

ZARA, F., J.; CAETANO, F., H..Ultramorphology and histochemistry of fat body cells from last instar larval of the *Pachycondyla(= Neoponera) villosa*(Fabricius) (Formicidae: Ponerinae).**Brazilian Journal of Biology**, vol.64, n°3B, p.725-735, 2004.

9 CONCLUSÕES GERAIS

1 - O CG de larvas de *A. gemmatalis* em 4^o instar é formado por duas porções; a porção PA e a porção PV, distintas na sua constituição, arquitetura e quantidade. Apresentam uma coloração branca leitosa, de aspecto muito delicado onde a PA forma uma fita, e a PV aglomerados ao redor de outros órgãos.

2 - Este órgão é formado por células de um único tipo, denominadas trofócitos, estas células são envoltas e mantidas juntas por uma lâmina acelular. Esta lâmina na PA apresenta superfície irregular, cheia de projeções, e na PV esta lâmina acelular é lisa.

3 - O trânsito de moléculas entre as células e a hemolinfa é constante e facilitada por canais que se interconectam chamados de sistemas reticulares da membrana plasmática.

4 - As diferenças morfológicas e ultraestruturais indicam que as porções PA e PV participam de processos diferentes durante o desenvolvimento larval deste inseto.

5 - As diferenças da composição química, de distribuição, localização e de quantidade de substâncias presentes nos trofócitos, confirmam a envolvimento destas porções em processos fisiológicos diferentes.

6 - A PA pode estar mais relacionada aos processos de armazenamento e também de síntese proteica e polissacarídica, que irão formar os elementos da hemolinfa, além de armazenagem de lipídeos. É provável que a PV esteja mais relacionada à armazenagem de lipídeos do que a PA sendo então, neste caso um reservatório de energia análogo ao tecido adiposo dos vertebrados.

7 - As variações na estrutura celular, e a não observação de algumas organelas, podem estar relacionadas ao estágio larval estudado.

8 - Pela caracterização ultraestrutural, acredita-se que o CG de larvas de 4^o instar de *A. gemmatalis*, tanto PA como PV, seja responsável por síntese de várias substâncias outras, que não o lipídeo.

9 - Pelo cotejamento dos dados deste trabalho com os de outros autores, embora os insetos sejam ectotérmicos, pode-se inferir que em larvas de insetos homotérmicos, como é o caso da *A. gemmatalis*, aparentemente a PV se comporta analogamente como a variedade de tecido adiposo multilocular nos mamíferos, sendo o principal fornecedor de energia para as atividades de alimentação e crescimento acelerado desta fase, estando

diminuído ou ausente no adulto; enquanto que a PA seria a responsável além das funções metabólicas larval, pela permanência deste tecido no adulto da espécie.

Este trabalho prévio servirá de base comparativa entre o corpo gorduroso de larvas de *A gemmatalis* do 4^o ínstar resistentes e não resistentes ao AgMNPV, e poderá contribuir para a melhoria de técnicas de controle da lagarta da soja.