

NATHALY LARA CASTELLANOS

**ALTERAÇÕES CITOMORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR IMIDACLOPRIDE  
NAS GLÂNDULAS SALIVARES E INTESTINO MÉDIO DE *Euschistus heros*  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L318a  
2015  
Lara Castellanos, Nathaly, 1990-  
Alterações citomorfológicas induzidas por imidaclopride  
nas glândulas salivares e intestino médio de *Euschistus heros*  
(Hemiptera: Pentatomidae) / Nathaly Lara Castellanos. – Viçosa,  
MG, 2015.  
viii, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Euschistus heros*. 2. Glândulas salivares. 3. Intestino  
médio. 4. Células - Transformação. 5. Inseticidas - Toxicologia .  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

NATHALY LARA CASTELLANOS

**ALTERAÇÕES CITOMORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR IMIDACLOPRIDE  
NAS GLÂNDULAS SALIVARES E INTESTINO MÉDIO DE *Euschistus heros*  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2015

---

Khalid Haddi

---

Luis Carlos Martínez Castrillón

---

Adenir Vieira Teodoro

---

Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Orientador)

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela certeza de sua presença fidelidade e refúgio.

Agradeço ao Departamento de Entomologia e à Universidade Federal de Viçosa, pela educação e a oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço à Organização dos Estados Americanos e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras pela concessão da bolsa de estudos pelo Programa PAEC OEA/GCUB.

Agradeço ao Professor e Orientador Eugênio Eduardo de Oliveira pelos ensinamentos em fisiologia e toxicologia, confiança e investimento em mim, dedicação, paciência, extrema competência e rigor nas orientações deste trabalho.

Agradeço ao Professor e Coorientador Jose Eduardo Serrão, pelos ensinamentos sobre morfologia, a disponibilidade, e a valiosa e competente ajuda e orientação.

Agradeço ao Professor Raul Guedes pelo empréstimo de equipamentos e inseticidas.

Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Agradeço a Luis Carlos Martínez pelo apoio técnico na execução dos experimentos, paciência, contribuição com múltiplas ideias, sugestões e correções na realização deste trabalho, e as conversas e lembranças de nossa terra natal.

Agradeço a Khalid Haddi pela ajuda na elaboração dos gráficos e apoio técnico.

Agradeço ao Dr. Adenir Viera por participar da banca de avaliação.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Neurofisiologia e Neurobiologia de invertebrados pelo apoio técnico, amizade e os momentos compartilhados no laboratório. Em especial a Eder Silva pela ajuda na realização dos experimentos e a elaboração dos esquemas.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Ecotoxicologia pelo apoio técnico e amizade.

Agradeço aos meus amigos no Brasil e na Colômbia pelo apoio incondicional, por escutar minhas burradas, rir e dançar comigo, e principalmente por fazer de Viçosa um lar apesar das dificuldades. Em especial, agradeço a meu namorado Luciano Nunes pelo carinho, força, os ensinamentos da cultura brasileira e por ser meu professor oficial de português.

Por último, agradezco de todo corazón a mi familia, especialmente a mi mamita María Mercedes, mi muñequita Melissa y a mi papá Felipe por todo el apoyo que me han ofrecido durante toda mi vida, por la educación que recibí, por no dejarme desfallecer y siempre ayudarme a perseguir mis sueños. No se imaginan cuanta falta me hacen, recuerden que a pesar de la distancia siempre serán las personas más importantes de mi vida. Mando un abrazo enorme y súper caluroso que les haga sentir todo mi amor.

Muito obrigada!!!!!!!

## Biografia

Nathaly Lara Castellanos filha de Maria Mercedes Castellanos Molina e Felipe Lara Navarrete, nasceu em Bogotá, Colômbia no dia 16 de setembro de 1990.

Iniciou a graduação em Biologia em fevereiro de 2008 na Universidade Nacional da Colômbia sede Bogotá, finalizando-a em fevereiro de 2013 quando obteve o título de Bacharel em Biologia.

Trabalhou desde fevereiro de 2013 até janeiro de 2014 como analista de laboratório na empresa Asinal Ltda.

Em março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em Julho de 2015.

## Resumo

CASTELLANOS, Nathaly Lara M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Alterações citomorfológicas induzidas por imidaclopride nas glândulas salivares e intestino médio de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientador: Jose Eduardo Serrão.

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) é uma das pragas mais importantes na cultura da soja. O controle destes insetos acontece mediante utilização de inseticidas, dentre os quais se destaca o inseticida sistêmico imidaclopride. Apesar do sítio principal de ação do imidaclopride ser os receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos (localizados no sistema nervoso central do inseto), alvos secundários também podem ser alterados e influenciar sua toxicidade. As glândulas salivares e o intestino médio são responsáveis pela digestão e absorção do alimento ingerido, além disso estão entre os principais sítios de entrada de inseticidas sistêmicos e podem participar da detoxificação destes compostos. Adicionalmente, até o momento não existem estudos que descrevam a estrutura fina das glândulas salivares nem do intestino médio de *E. Heros*. Por estas razões, os trabalhos aqui descritos foram realizados com o objetivo de avaliar as alterações citomorfológicas destes órgãos expostos a diferentes concentrações de imidaclopride (por contato e ingestão), além de descrever a anatomia e morfologia do sistema salivar e do intestino médio de *E. heros*. Para a descrição anatômica e morfológica, foram dissecadas glândulas salivares e intestino médio, e analisados por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Com base nos resultados histológicos obtidos, o complexo salivar de *E. heros* consiste de um par de glândulas salivares principais bilobadas e um par de glândulas acessórias tubulares. A constrição entre os lobos da glândula principal caracteriza o hilo, onde estão inseridos o ducto salivar e da glândula acessória. As células da glândula principal têm características de células secretoras de proteínas. Diferenças no aspecto dos conteúdos luminiais dos lobos anterior e posterior da glândula salivar principal sugere a produção de substâncias diferentes. Pela primeira vez é relatada a presença de uma camada de células musculares envolvendo as células epiteliais do hilo. As glândulas salivares acessórias participam do transporte de água ou secreção de substâncias. O intestino médio é um órgão tubular que consiste de quatro regiões anatômicas: primeiro (V1), segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículos (V4). Com as regiões V1 e V3 dilatadas e a V4 rodeada com qua-

tro filas de cecos densamente empacotados onde são armazenadas bactérias simbióticas. O epitélio digestivo do intestino médio mostra uma camada simples de células colunares que apresentam núcleos polimórficos e borda estriada bem desenvolvida na superfície apical. Para observar as possíveis alterações morfológicas nas glândulas salivares e intestino médio inicialmente foi determinada a curva concentração-mortalidade para adultos expostos a imidaclopride por contato e ingestão. Posteriormente, machos adultos foram tratados com concentrações de imidaclopride correspondentes a  $CL_5$  (3,75 mg i.a./L),  $CL_{50}$  (112,5 mg i.a./L) e  $CL_{75}$  (375 mg i.a./L) (água destilada foi usada como controle). As glândulas salivares e intestino médio desses machos foram dissecados e processados para análises morfológicas por microscopia de luz. Nas células das glândulas salivares principais de insetos expostos a imidaclopride foram observadas alterações morfológicas severas indicativas de morte celular por necrose, como forma irregular, vacuolização citoplasmática, núcleos dilatados, condensação de cromatina e ruptura da membrana citoplasmática. As células do intestino médio e das glândulas salivares acessórias de insetos tratados apresentaram mudanças morfológicas leves características de células na fase inicial de morte celular por apoptose, como vacuolização citoplasmática e condensação de cromatina. O nível de degeneração celular foi mais pronunciado nas concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{75}$ ), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcionais ao incremento da concentração. Portanto, a exposição aguda a concentrações letais de imidaclopride pode induzir morte celular nas glândulas salivares e no intestino médio de *E. heros*.

## Abstract

CASTELLANOS, Nathaly Lara M.Sc., Universidade federal de Viçosa, July of 2015. **Cy-tomorphological alterations induced by imidacloprid on the salivary glands and midgut of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co- Advisor: Jose Eduardo Serrão.

The neotropical brown stinkbug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) is an important pest of soybean fields in Brazil. Control measures of these insects are based on the use of pesticides, among them the systemic insecticide imidacloprid is of great importance. Despite the target site of imidacloprid is the nicotinic acetylcholine receptors (distributed in the central nervous system of the insect), secondary target may also be affected and influence the toxicity of this compound. The salivary glands and midgut are responsible of digestion and absorption of ingested food, moreover are one of the primary sources of contact of systemic insecticides and can participate of detoxification of these compounds. In addition, no studies have been done to describe the ultra-structure of the salivary glands and the midgut of *E. heros*. For these reasons, the aiming of this studies was evaluate the citomorphologic alterations of this organs exposed to different concentrations of imidacloprid (by contact and ingestion), and describe the anatomy and morphology of the salivary complex and the midgut of *E. heros*. For the anatomic and morphologic descriptions, the salivary glands and midgut were dissected and analyzed by light microscopy and scanning electron microscopy. Based on the histological results, the salivary complex consist of one pair of bilobed principal salivary glands and one pair of tubular accessory glands. In the hilus between anterior and posterior lobe of principal salivary glands, were inserted the salivary duct and the duct of the accessory salivary gland. The cells of the principal salivary glands have characteristics of protein secretory cells. Differences in the aspect of the lumen content of anterior and posterior lobe of principal salivary glands suggest the production of different substances. For the first time is reported the presence of a layer of muscular cells surrounding the hilus epithelium. The accessory salivary glands are involved in the active transport of water or secretion production. The midgut is a tubular organ that consist of four principal regions: the first ventriculus (V1), the second ventriculus (V2), the third ventriculus (V3) and the fourth ventriculus (V4). The V1 and V3 regions are dilated, and V4 is surrounded with four rows of caeca densely packed

storing symbiotic bacteria. The digestive epithelium of the midgut show a single layer of columnar cells presenting polymorphic nucleus and a well-developed brush border in the apical surface. In order to observe the possible morphologic alterations in the salivary glands and midgut, initially we determined concentration-mortality curve in adults exposed to imidacloprid by contact and ingestion. Subsequently, adults males were treated with three concentrations: LC<sub>5</sub> (3,75 mg a.i./L), LC<sub>50</sub> (112,5 mg a.i./L) and LC<sub>75</sub> (375 mg a.i./L) (distilled water used as a control). Salivary glands and midguts of these males were removed and processed for morphological analyses using light microscopy. In the cells of principal salivary glands of insects treated with imidacloprid were observed severe morphologic alterations indicative of cell death by necrosis, like irregular form, cytoplasm vacuolization, nuclear dilatation, chromatin condensation and rupture of the cytoplasm membrane. The cells of the midgut and accessory salivary glands from exposed insect showed slight morphological changes characteristic of the initial phase of cell death by apoptosis, like cytoplasm vacuolization and chromatin condensation. The cell degeneration intensity was greater in lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>75</sub>), showing a gradual increment of cellular alterations proportional to concentration increment. Thus, the acute exposure to lethal concentrations of imidacloprid can induce cell death in the salivary glands and in the midgut of *E. heros*.

# Conteúdo

<b>Introdução Geral</b>	<b>1</b>
Bibliografia . . . . .	5
<b>Morfologia das glândulas salivares de <i>Euschistus heros</i></b>	<b>10</b>
Resumo . . . . .	11
Abstract . . . . .	12
1. Introdução . . . . .	12
2. Material e Métodos . . . . .	14
3. Resultados . . . . .	15
4. Discussão . . . . .	20
5. Agradecimentos . . . . .	23
6. Bibliografia . . . . .	24
<b>Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de <i>Euschistus heros</i></b>	<b>27</b>
Resumo . . . . .	28
Abstract . . . . .	29
1. Introdução . . . . .	30
2. Material e métodos . . . . .	31
3. Resultados . . . . .	33
4. Discussão . . . . .	40
5. Agradecimentos . . . . .	44
6. Bibliografia . . . . .	44
<b>Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de <i>Euschistus heros</i></b>	<b>50</b>
Resumo . . . . .	51
Abstract . . . . .	52
1. Introdução . . . . .	53
2. Material e métodos . . . . .	54
3. Resultados . . . . .	56
4. Discussão . . . . .	63
5. Agradecimentos . . . . .	66
6. Bibliografia . . . . .	67
<b>Conclusões finais</b>	<b>73</b>

# Introdução Geral

A soja (*Glycine max*) é considerada um dos principais produtos brasileiros de exportação, com grande importância socioeconômica devido a seus múltiplos usos como a produção de biodiesel, produtos alimentícios, óleo refinado, entre outros (Campos, 2010). Estimativas dos últimos anos indicam um incremento nas exportações devido ao crescente mercado internacional, principalmente na China (Campos, 2010; Raucci et al., 2015). O cultivo da soja no Brasil emna safra de 2014/15 aponta para uma expectativa de produção de 96 milhões de toneladas, representando um incremento de 11,5% em relação ao produzido no ano passado (CONAB, 2015). A superfície plantada com soja incrementou-se em 1,7 milhões de hectares, resultando em 31,9 milhões de hectares cultivados com o grão no Brasil (CONAB, 2015).

A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas desde a germinação até a colheita, sendo esses organismos maléficis constituídos por insetos, moluscos, diplópodes e ácaros (Avila & Grigolli, 2014; Degrande & Vivan, 2011/2012). No entanto, o complexo de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) e as lagartas desfolhadoras são hoje considerados as pragas-chave da cultura da soja por causarem os maiores danos econômicos na cultura (Avila & Grigolli, 2014; Degrande & Vivan, 2011/2012).

Os pentatomídeos fitófagos se alimentam de várias estruturas da planta hospedeira, sendo as sementes e vagens imaturas os principais sítios de alimentação (Avila & Grigolli, 2014; Panizzi et al., 2012). Nesse grupo, dentre as espécies que ocorrem mais frequentemente estão: o percevejo marrom *Euschistus heros* (F.), o percevejo verde-pequeno *Piezodorus guildinii* (W.) e o percevejo verde *Nezara viridula* (L.) (Degrande & Vivan, 2011/2012; Sosa-Gómez & Omoto, 2012).

Apesar de completar menor número de gerações, o percevejo marrom da soja *E. heros* é o maior componente do complexo de pentatomídeos da soja no Brasil (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012; Silva et al., 2012). Uma vez que, atualmente, dentre os percevejos

## Introdução Geral

da soja o *E. heros* é o mais abundante, menos polífago, e provoca os danos mais severos nas principais regiões produtoras do país (Degrande & Vivan, 2011/2012; Panizzi et al., 2012; Silva et al., 2012). O percevejo marrom é nativo da região neotropical, e adaptado aos climas quentes, ocorrendo principalmente desde o Centro-Oeste brasileiro até o norte do estado do Paraná (Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999; Panizzi et al., 2012; Silva et al., 2012).

O percevejo marrom pode causar danos desde a formação de vagens até o desenvolvimento completo das sementes (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012). As sementes são danificadas através da introdução do aparelho bucal (estiletos) nas vagens as quais se tornam menores, enrugadas, chochas e mais escuras, resultando em uma redução de seu conteúdo de óleos e taxa de germinação (Azambuja et al., 2013; Nunes & Corrêa-Ferreira, 2002; Panizzi et al., 2012) A má formação dos grãos e vagens provoca a retenção foliar nas plantas de soja, que não amadurecem na época de colheita (Azambuja et al., 2013; Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999; Silva et al., 2012). Além disso, as perfurações causadas pelos percevejos facilitam a contaminação dos grãos por patógenos como o fungo *Nematospora corylli*, que pode causar a deterioração das sementes, semelhante ao ataque de bactérias (Azambuja et al., 2013; Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999; Nunes & Corrêa-Ferreira, 2002). Por isso, *E. heros* representa um alto risco à caeia produtiva da soja (Degrande & Vivan, 2011/2012; Panizzi et al., 2012).

Como outros heterópteros, durante a alimentação *E. heros* injeta com seus estiletos amilases e proteases do complexo salivar nos grãos, a fim de liquefazer os tecidos vegetais, facilitar a ingestão e iniciar a degradação química preliminar (Boyd, 2003; Peiffer & Felton, 2014; Silva et al., 2012). O alimento liquefeito, rico em nutrientes, é ingerido através do canal alimentar e posteriormente digerido e absorvido no interior do intestino médio (Hori, 2000; Ramzi et al., 2009; Seddigh et al., 2012).

A degradação enzimática dos nutrientes diretamente no interior do alimento, prévia à ingestão, é um elemento característico de insetos que utilizam digestão extra-oral (Fialho et al., 2012; Oliveira et al., 2006; Vinokurov et al., 2014). O complexo salivar é a principal fonte de enzimas digestivas para a digestão extra-oral (Martínez et al., 2014; Oliveira et al., 2006; Serrão et al., 2008). Além de conter enzimas digestivas, a saliva secretada umedece o alimento, ajusta o pH e o conteúdo iônico, produz a bainha salivar (revestimento

## Introdução Geral

endurecido de saliva no entorno dos estiletes que sela o tecido vegetal e evita a perda de fluidos da planta), protege contra a ação de microrganismos e ajuda na detoxificação de fitoquímicos e outros xenobióticos pela presença de ampla variedade de oxidases (Moreno et al., 2011; Peiffer & Felton, 2014; Pereira et al., 2009).

O processo final da digestão ocorre no intestino médio, funcionalmente a parte mais importante do trato digestivo, participando ativamente da digestão final dos alimentos e absorção de nutrientes (Habes et al., 2006; Habibi et al., 2008; Zhu et al., 2011). No intestino médio são produzidas e secretadas grande parte das enzimas digestivas, incluindo amilases, carboxilases, invertases, lipases, maltases e proteases (Zhu et al., 2011). O intestino médio também produz uma variedade de enzimas detoxificativas que desempenham um papel importante na adaptação ao ambiente alterado por compostos endógenos e xenobióticos como fitoquímicos e pesticidas (Catae et al., 2014; Enayati et al., 2005; Yang et al., 2006). Adicionalmente, evidências recentes sugerem que o intestino médio participa do acionamento da resposta imune após a ingestão de alimento contaminado com microrganismos (Damasceno-Sá & Silva, 2007; Mehrabadi et al., 2012; Xu et al., 2014).

Apesar de sua importância agrônômica pouco se sabe sobre o intestino médio e as glândulas salivares de *E. heros* e outros pentatomídeos fitófagos, embora estes órgãos participem ativamente da digestão e absorção de alimentos, e sejam responsáveis pelo dano causado nas plantas de soja e as perdas econômicas na agricultura brasileira (Mehrabadi et al., 2012; Peiffer & Felton, 2014; Silva et al., 2012). Consequentemente, o estudo morfológico desses sistemas pode fornecer informações relativas à alimentação, nutrição, componentes que induzem o dano na planta e a transmissão de patógenos, bem como elaborar novas estratégias para programas de controle de pragas (Ghanim et al., 2001; Nunes & Camargo-Mathias, 2006).

A principal medida de controle do percevejo *E. heros* é o uso de inseticidas. Os inseticidas mais utilizados para o controle dessa praga de 1960 até 2010 são do grupo dos organofosforados e o ciclodieno Endosulfan (Sosa-Gómez & Omoto, 2012). Porém, a utilização indiscriminada desses produtos em uma mesma safra e por vários anos consecutivos favoreceu o surgimento de populações resistentes no início dos anos 1990, e em 2010 grande parte dos indivíduos susceptíveis a estes inseticidas foi eliminada das populações (Sosa-Gomez et al., 2001; Sosa-Gómez & Silva, 2010). Atualmente, os ingredientes ativos mais

## Introdução Geral

utilizados para o controle têm sido do grupo dos piretroides e neonicotinoides, sendo o neonicotinoide imidaclopride um dos inseticidas mais amplamente usados no controle de *E. heros* (Santos et al., 2015; Sosa-Gómez & Omoto, 2012; Sosa-Gómez et al., 2009).

O imidaclopride é um dos inseticidas amplamente utilizados no mercado mundial e no Brasil desde sua introdução no mercado em 1991, por sua alta eficácia contra grande variedade de insetos-praga e moderada toxicidade a vertebrados (Almeida et al., 2013; Benzidane et al., 2011; Pan et al., 2015). O imidaclopride é um inseticida com ação sistêmica, que interfere na transmissão de impulsos nervosos em insetos, pela ligação irreversível e específica aos receptores nicotínicos de acetilcolina (Lees et al., 2014; Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Tomizawa & Casida, 2005). A ligação específica causa a abertura do canal e despolarização contínua dos neurônios pós-sinápticos, resultando em paralisia e morte (Hatjina et al., 2013; Kalajdžić et al., 2013).

Apesar do sítio de ação do imidaclopride ser o sistema nervoso, alvos secundários também podem ser alterados (Catae et al., 2014), principalmente os tecidos que são atingidos via alimentos contaminados como as glândulas salivares e o intestino médio (Ferreira et al., 2013; Gregorc & Ellis, 2011).

As glândulas salivares e o intestino médio são umas das principais barreiras entre o inseto e o meio ambiente, sendo uns dos primeiros órgãos de entrada de inseticidas (Damasceno-Sá & Silva, 2007; Hakim et al., 2010; Oliveira et al., 2014). Além disso, a degradação metabólica de inseticidas no intestino médio e glândulas salivares, somada à redução de penetração de inseticidas através da parede do intestino médio podem ser razões para diferenças na toxicidade de inseticidas e resistência esses produtos (Avila & Grigolli, 2014; Enayati et al., 2005; Peiffer & Felton, 2014; Pereira et al., 2009). Isso torna esses órgãos interessantes do ponto de vista toxicológico para avaliar alterações morfológicas e celulares produzidas pelos inseticidas (Catae et al., 2014; Cruz et al., 2010; Ferreira et al., 2013).

Em vista dos fatos acima delineados, estes estudos foram realizados com o objetivo de avaliar as possíveis mudanças celulares nas glândulas salivares e intestino médio de *E. heros* expostos (por contato e ingestão) a concentrações crescentes de imidaclopride e adicionalmente, descrever a anatomia do sistema salivar e intestino médio de *E. heros*.

## Bibliografia

- Almeida RC, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P & Malaspina O** (2013) Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. Archives of environmental contamination and toxicology 65: 234-243.
- Avila CJ & Grigolli JFJ** (2014) Pragas de soja e seu controle. Embrapa Agropecuária Oeste-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE).
- Azambuja R, Degrande P & Pereira F** (2013) Comparative biology of *Euschistus heros* (F.)(Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. Neotropical entomology 42: 359-365.
- Benzidane Y, Lapied B & Thany SH** (2011) Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. Pesticide Biochemistry and Physiology 101: 191-197.
- Boyd DW** (2003) Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigritulus* (Uhler)(Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. Annals of the Entomological Society of America 96: 667-671.
- Campos MC** (2010) Expansão da soja no território nacional: o papel da demanda internacional e da demanda interna. Revista Geografares 8: 1-19.
- Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Ferreira Nocelli RC & Malaspina O** (2014) Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Microscopy research and technique 77: 274-281.
- Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB** (2015) Acompanhamento da safra brasileira: grãos - Nono Levantamento Junho/2015 SAFRA 2014/15 2: 1-104.
- Corrêa-Ferreira BS & Panizzi AR** (1999) Percevejos da soja e seu manejo. Embrapa Soja Londrina.
- Cruz SA, Silva-Zacarin EC, Bueno OC & Malaspina O** (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. Cell biology and toxicology 26: 165-176.
- Damasceno-Sá J & Silva J** (2007) Evolução e aspectos do sistema digestório em Hemiptera. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas 1: 32-40.
- Degrande PE & Vivan LM** (2011/2012) Pragas da Soja. Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012. Fundação Mato Grosso do Sul Para Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuárias: 155-206.
- Enayati AA, Ranson H & Hemingway J** (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect molecular biology 14: 3-8.

- Ferreira RAC, Zacarin ECMS, Malaspina O, Bueno OC, Tomotake MEM & Pereira AM** (2013) Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron* 46: 57-65.
- Fialho MC, Moreira NR, Zanuncio JC, Ribeiro AF, Terra WR & Serrão JE** (2012) Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of insect physiology* 58: 850-856.
- Ghanim M, Rosell RC, Campbell LR, Czosnek H, Brown JK & Ullman DE** (2001) Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae) B type. *Journal of Morphology* 248: 22-40.
- Gregorc A & Ellis JD** (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 200-207.
- Habes D, Morakchi S, Aribi N, Farine J-P & Soltani N** (2006) Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84: 17-24.
- Habibi J, Coudron T, Backus E, Brandt S, Wagner R, Wright M & Huesing J** (2008) Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). *Annals of the Entomological Society of America* 101: 159-171.
- Hakim RS, Baldwin K & Smagghe G** (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology* 55: 593-608.
- Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C & Arnold G** (2013) Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44: 467-480.
- Hori K** (2000) Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. *Heteroptera of economic importance*: 11-36.
- Kalajdžić P, Oehler S, Markaki M & Savakis C** (2013) Toxicology and cytogenetic analysis of a *Drosophila melanogaster* mutant resistant to Imidacloprid and DDT. *Genetika* 45: 929-938.
- Lees K, Jones AK, Matsuda K, Akamatsu M, Sattelle DB, Woods DJ & Bowman AS** (2014) Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *International journal for parasitology* 44: 75-81.
- Martínez LC, Fialho MCQ, Zanuncio JC & Serrão JE** (2014) Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535-543.

- Mehrabadi M, Bandani AR, Allahyari M & Serrão JE** (2012) The Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) digestive tract: Histology, ultrastructure and its physiological significance. *Micron* 43: 631-637.
- Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, Kassem M, Aranda M & Fereres A** (2011) Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139: 145-153.
- Nunes MC & Corrêa-Ferreira BS** (2002) Desempenho alimentar e sobrevivência de *Euschistus heros* parasitado por *Hexacladia smithii* em sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1219-1223.
- Nunes PH & Camargo-Mathias MI** (2006) Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Euhemiptera: Cercopidae). *Micron* 37: 57-66.
- Oliveira EE, Pippow A, Salgado VL, Büschges A, Schmidt J & Kloppenburg P** (2010) Cholinergic currents in leg motoneurons of *Carausius morosus*. *Journal of neurophysiology* 103: 2770-2782.
- Oliveira EE, Schleicher S, Büschges A, Schmidt J, Kloppenburg P & Salgado VL** (2011) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system neurons of the stick insect (*Carausius morosus*) by imidacloprid and sulfoximine insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology* 41: 872-880.
- Oliveira J, Oliveira M, Guedes R & Soares M** (2006) Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Bulletin of entomological research* 96: 251-258.
- Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM & Malaspina O** (2014) Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental toxicology* 29: 1122-1133.
- Pan Y, Peng T, Gao X, Zhang L, Yang C, Xi J, Xin X, Bi R & Shang Q** (2015) Transcriptomic comparison of thiamethoxam-resistance adaptation in resistant and susceptible strains of *Aphis gossypii* Glover. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 13: 10-15.
- Panizzi A, Bueno A & Silva F** (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. Hoffman-Campo, CB; et al. Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas. Brasília: EMBRAPA: 335-420.
- Peiffer M & Felton GW** (2014) Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *PloS one* 9: e88483.
- Pereira C, Oliveira P, Furquim K, Bechara GH & Camargo-Mathias M** (2009) Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology* 166: 124-130.

- Ramzi S, Bandani AR, Zibae A & Kwon O** (2009) Comparison of glutathione S-transferase and general esterase in two bugs, *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae) and *Brachynema germari* Kolenati (Heteroptera: Pentatomidae). Entomological Research 39: 225-232.
- Raucci GS, Moreira CS, Alves PA, Mello FF, Almeida Frazão L, Cerri CEP & Cerri CC** (2015) Greenhouse gas assessment of Brazilian soybean production: a case study of Mato Grosso State. Journal of Cleaner Production 96: 418-425.
- Santos M, Santos R, Tomé H, Barbosa W, Martins G, Guedes R & Oliveira E** (2015) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. Journal of Pest Science: 1-10.
- Seddigh S, Masoudi-Nejad A, Tafaghodinia B & Imani S** (2012) Comparing carbohydrate enzymes activity in *Eurygaster integriceps* Putton (Hemiptera: Scutelleridae), *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae) and *Haplothrips tritici* Kurd. (Phlaeothripidae: Thysanoptera) as a complex pest on wheat. Munis Entomology & Zoology 7: 344-351.
- Serrão JE, Castrillon MI, Santos-Mallet JR, Zanuncio JC & Gonçalves TCM** (2008) Ultrastructure of the salivary glands in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). Journal of medical entomology 45: 991-999.
- Silva F, Silva J, Depieri R & Panizzi AR** (2012) Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa mediatibunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical entomology 41: 386-390.
- Sosa-Gomez DR, Corso IC & Morales L** (2001) Insecticide resistance to Endosulfan, Monocrotophos and Metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). Neotropical entomology 30: 317-320.
- Sosa-Gómez DR & Omoto C** (2012) Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Hoffmann-Campo, CB, Corrêa-Ferreira, BS, Moscardi, F. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Embrapa.
- Sosa-Gómez DR & Silva JJ** (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 767-769.
- Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Lopes ION, Corso IC, Almeida AM, Moraes GCP & Baur ME** (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. Journal of economic entomology 102: 1209-1216.
- Tomizawa M & Casida JE** (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 247-268.
- Vinokurov K, Bednářová A, Tomčala A, Stašková T, Krishnan N & Kodrík D** (2014) Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire

## Introdução Geral

bug *Pyrrhocoris apterus* L.(Heteroptera) as a model species. Journal of insect physiology 60: 58-67.

**Xu ZB, Zou XP, Zhang N, Feng QL & Zheng SC** (2014) Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. Insect science.

**Yang Z, Zhang F, Zhu L & He G** (2006) Identification of differentially expressed genes in brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) responding to host plant resistance. Bulletin of entomological research 96: 53-59.

**Zhu YC, Guo Z, Chen M-S, Zhu KY, Liu XF & Scheffler B** (2011) Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of invertebrate pathology 106: 296-307.

**Morfologia das glândulas salivares de**  
***Euschistus heros***

## Morfologia das glândulas salivares de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

### Resumo

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) é uma praga importante da soja no Brasil. A saliva destes insetos é a causa principal do dano aos grãos e vagens, embora, pouco se saiba sobre glândulas salivares de *E. heros* e de outros pentatomídeos fitófagos. Assim, o objetivo deste estudo foi descrever a anatomia e histologia das glândulas salivares de *E. heros* com microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os resultados histológicos, o complexo salivar de *E. heros* consiste de um par de glândulas salivares principais bilobadas (com um lobo anterior curto e um lobo posterior longo) e um par de glândulas acessórias tubulares. A constrição entre os lobos da glândula principal caracteriza o hilo, onde estão inseridos o ducto salivar e da glândula acessória. O epitélio da glândula principal é composto por uma camada simples de células envolvendo um lúmen amplo. Estas células têm características de células secretoras de proteínas: I - são cúbicas ou achatadas, II - possuem múltiplas vesículas secretoras e núcleos bem desenvolvidos. Diferenças no aspecto dos conteúdos luminiais dos lobos anterior e posterior da glândula salivar principal sugere a produção de substâncias diferentes. As células do hilo são colunares com núcleo bem desenvolvido e envolvidas por uma camada inesperada de células musculares. O epitélio cúbico das glândulas acessórias é constituído por células com múltiplos vacúolos e núcleos com cromatina condensada. As glândulas salivares acessórias participam do transporte de água ou produção de outras substâncias. Pela primeira vez é relatada a presença de músculos no hilo da glândula salivar principal e sua função está provavelmente relacionada com a mistura de substâncias produzidas pelas glândulas salivares e controle do volume salivar de *E. heros*.

**Palavras chave:** Epitélio, Músculo, Fitófago, Pentatomidae, Glândula salivar.

## Abstract

The brown stinkbug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) is an important pest of the Brazilian soybean fields. The saliva of these is the principal cause for *E. heros* injuries in the soybean seeds and pods. However, very little is known about the salivary glands of *E. heros* and other phytophagous Pentatomidae. Thus, this study was conducted aiming describe the ultrastructure of the salivary glands of *E. heros* with Light microscopy and Transmission Electron Microscopy. Based on the histological results, the *E. heros*' salivary complex consists of a pair of bilobed principal salivary glands (with a short anterior and a long posterior lobes) and a pair of tubular accessory glands. A constriction between the anterior and posterior lobes characterizing the hilus, where are inserted the salivary and the accessory gland ducts. The principal gland epithelium is composed of a single layer of cells enclosing a large lumen. These cells have typical features of protein secretory cells: I - are cubic or squamous; II- have multiple secretory vesicles and well-developed nuclei. Differences in the aspect of the lumen content of anterior and posterior lobe of principal salivary glands suggest the production of different substances. Cells of the hilus are columnar with well-developed nuclei and are surrounded by unexpected layer of muscular cells. The accessory salivary gland cells are cubic with multiple vacuoles and nuclei with condensed chromatin. The accessory salivary glands participate in the transport of water or secretion production. For the first time the presence of muscles is reported in the hilus of principal salivary glands and their function is possibly related to the mixture of substances produced by the salivary glands and saliva volume control of *E. heros*.

**Key words:** Epithelium, Muscle, Phytophagous, Pentatomidae, Salivary glands

## 1. Introdução

Percevejos Pentatomidae fitófagos, são pragas importantes de diversas culturas, incluindo a soja *Glycine max* L. (Fabaceae), o arroz *Oryza sativa* L. (Poaceae), o trigo *Triticum aestivum* L. (Poaceae), o citros *Citrus sinensis* Osbeck (Rutaceae), coco *Cocos nucifera*

L. (Arecaceae) e o café *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) (Fernandes, 2000).

A produção da soja, em particular, é ameaçada por várias espécies de percevejos (Panizzi et al., 2012; Peiffer & Felton, 2014; Silva et al., 2012). O percevejo-marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) é uma praga sugadora da soja no Brasil e está adaptado às regiões mais quentes do país. Essa espécie é predominante desde o Centro-Oeste Brasileiro até o norte do estado do Paraná (Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999; Panizzi et al., 2012).

O percevejo marrom danifica diretamente os tecidos das sementes, tornando-as chochas e enrugadas, resultando em uma redução do conteúdo de óleos e taxa de germinação, o que afeta consequentemente a produção e a qualidade dos grãos (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012; Silva et al., 2012). Além disso, a perfuração pelos percevejos facilita a contaminação dos grãos por patógenos e pode ainda causar distúrbios fisiológicos na planta, como a retenção foliar e retardamento da maturidade do grão (Depieri & Panizzi, 2011; Oliveira et al., 2006; Peiffer & Felton, 2014).

Pentatomídeos, assim como outros hemípteros, usam enzimas digestivas para digestão extra-oral e o aparelho bucal para se alimentar (Boyd, 2003; Peiffer & Felton, 2014). Percevejos inserem o aparelho bucal nas vagens da soja, lacerando o tecido enquanto injetam saliva contendo enzimas digestivas para liquefazer o tecido vegetal antes da ingestão (Boyd, 2003; Peiffer & Felton, 2014; Silva et al., 2012). O alimento liquefeito é ingerido através do canal alimentar e posteriormente digerido (Boyd, 2003; Hori, 2000; Medrano et al., 2011).

Embora o complexo salivar é a principal fonte de enzimas digestivas e outros componentes proteicos responsáveis dos danos causados nas sementes e diminuição da produção (Oliveira et al., 2006; Peiffer & Felton, 2014). Pouco se sabe sobre as glândulas salivares de *E. heros* e de outros pentatomídeos fitófagos (Panizzi et al., 2012; Peiffer & Felton, 2014; Silva et al., 2012). Portanto, objetivou-se descrever a anatomia e histologia do sistema salivar de *E. heros*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Insetos

Adultos de *E. heros* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa, e fotoperíodo de 14:10 h luz:escuro. Os insetos foram alimentados *ad libitum* com vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos de soja, amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Fabaceae) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (Asteraceae) (Borges et al., 2006).

### 2.2 Anatomia

Adultos de *E. heros* foram crioanestesiados a -4 °C e suas glândulas salivares dissecadas em solução salina para insetos (0,1 M NaCl+ 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e transferidas para solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 12 h a 5 °C. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 99°) transferidas para hexamethyldisilazane por 5 minutos, e secas à temperatura ambiente. As amostras foram metalizadas com ouro (20 nm de espessura), seguindo à análise em microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430.

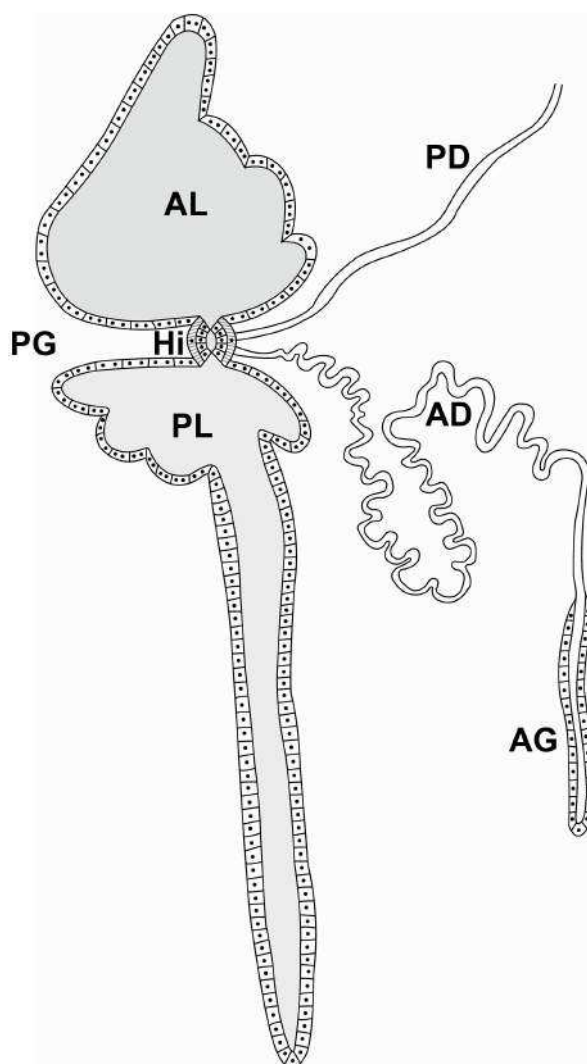
### 2.3 Histologia

Adultos de *E. heros* foram crioanestesiados a -4 °C e as glândulas salivares dissecadas em solução salina para insetos e transferidas para a solução fixadora de Zamboni por 24 h a 5 °C. As amostras foram posteriormente desidratadas em séries crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 95°) e embebidas em historresina JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Seções de 3 µm de espessura, obtidas com navalha de vidro em microtomo Leica RM2255, foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Leica DMLS.

### 3. Resultados

#### 3.1 Anatomia

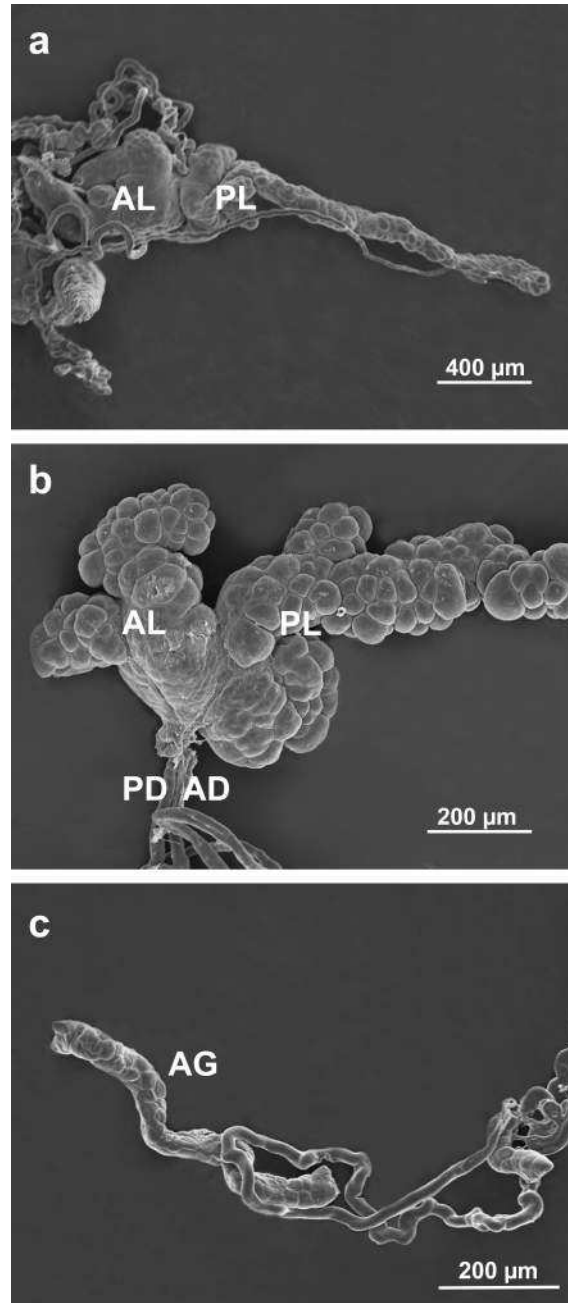
O sistema salivar de *E. heros* consiste de um par de glândulas salivares principais e um par de glândulas acessórias (Fig.1), ambas translúcidas. As glândulas salivares estão localizadas na região torácica, estendendo-se desde a porção anterior do protórax até o metatórax.



**Figura 1** Representação esquemática do sistema salivar de *Euschistus heros* mostrando os epitélios secretores da glândula principal (PG) com seus lobos, anterior (AL) e posterior (PL); o hilo (Hi) com as fibras musculares associadas; o ducto salivar (PD) e o ducto da glândula acessória (AD) conectado com a glândula acessória (AG). Desenho fora de escala.

*Morfologia das glândulas salivares de Euschistus heros*

As glândulas salivares principais são bilobadas, contendo o lobo anterior menor que o lobo posterior (Fig. 2a). O lobo anterior é semi-ovalado com quatro projeções irregulares de diferentes tamanhos. O lobo posterior é ovalado com pequenas projeções na região próxima ao lobo anterior, e apresenta um processo terminal na região distal (Figura 2a).



**Figura 2** Sistema salivar de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae): **a)** Micrografia eletrônica de varredura da visão geral da glândula principal com os lobos anterior (AL) e posterior (PL) e a divisão entre eles (hilo). **b)** Micrografia eletrônica de varredura dos detalhes do hilo entre o lobo anterior (AL) e posterior (PL) com os ductos da glândula salivar principal (DP) e o ducto da glândula acessória (DA). **c)** Micrografia eletrônica de varredura dos detalhes da glândula acessória (AG).

Entre o lobo anterior e posterior há uma região estreita chamada hilo, onde o ducto salivar principal e aquele da glândula acessória estão inseridos (Fig. 2b).

O ducto salivar principal está conectado com os estiletos dentro da cabeça. O ducto da glândula acessória é longo e possui dobras pouco regulares em forma de “U”. Na porção final do ducto está conectado com a glândula acessória. As glândulas acessórias são tubulares e mais estreitas que as glândulas principais (Fig. 2c).

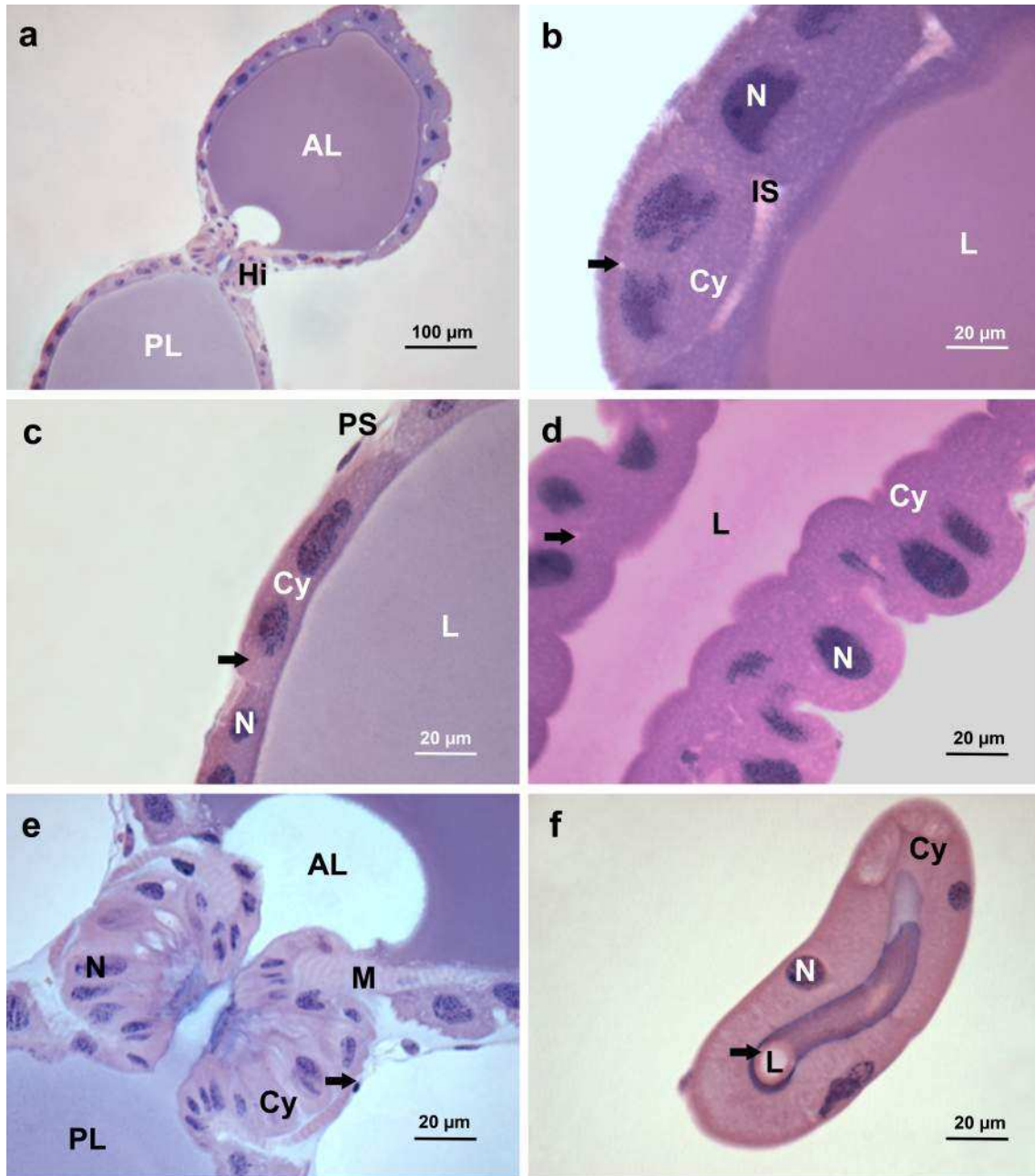
### **3.2 Glândula salivar principal**

Os lobos anterior e posterior da glândula principal possuem características histológicas diferentes (Fig. 3a). O epitélio do lobo anterior tem uma camada simples de células cúbicas, algumas com dois núcleos ameboides bem desenvolvidos com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente (Fig. 3b). O citoplasma é basófilo e apresenta aspecto homogêneo com algumas vesículas. O conteúdo do lúmen do lobo anterior é homogêneo e basófilo.

O conteúdo luminal do lobo posterior da glândula salivar principal é ligeiramente basófilo (Fig. 3a). O epitélio da parte anterior do lobo posterior é uma camada simples de células achatadas, que possuem dois núcleos alongados contendo cromatina pouco condensada, cada um com um ou dois nucléolos (Fig. 3c). O citoplasma é acidófilo, com presença de poucas vesículas. Por outro lado, as células epiteliais da porção final do lobo posterior são cúbicas, contendo um ou dois núcleos esféricos com cromatina granulada e um ou dois nucléolos (Fig. 3d). O citoplasma é basófilo, e com vesículas pequenas.

Os lobos da glândula salivar principal estão cobertos externamente por uma bainha peritoneal constituída de células achatadas com núcleos alongados (Fig. 3c).

Entre os dois lobos se encontra a região do hilo (Fig. 3a), constituído por um epitélio colunar simples, com núcleos elípticos com cromatina condensada, e citoplasma acidófilo, mas na parte basal da célula é basófila (Fig. 3e). As células do hilo estão envolvidas por uma camada inesperada de células musculares estriadas (Fig. 9). O epitélio do hilo também está associado à bainha peritoneal que envolve os lobos da glândula principal (Fig. 3e).



**Figura 3** Glândula salivar principal de *Euschistus heros*: **a)** Visão geral da glândula principal com os lobos anterior (AL) e posterior (PL) e a região do hilo (Hi) que divide eles. **b)** Seção longitudinal do lobo anterior mostrando o lúmen basófilo amplo (L) envolvido no epitélio formado por células cúbicas que possuem citoplasma (Cy) com múltiplas vesículas (seta) e dois núcleos ameboide (N). Entre as células pode-se observar o espaço intercelular (IS). **c)** Seção longitudinal da parte anterior do lobo posterior mostrando o epitélio formado por células achatadas, com dois núcleos alongados (N), e citoplasma (Cy) com múltiplas vesículas (seta). O epitélio envolve um lúmen amplo ligeiramente basófilo (L). O epitélio está envolvido pela bainha peritoneal (PS) formada por células achatadas. **d)** Seção longitudinal do processo terminal do lóbulo posterior mostrando o epitélio cúbico com algumas células contendo dois núcleos (N) e citoplasma basófilo (Cy) com múltiplas vesículas (seta). O epitélio envolve um lúmen amplo ligeiramente basófilo (L). **e)** Detalhe do hilo entre os lobos anterior (AL) e posterior (PL) mostrando o epitélio colunar simples,

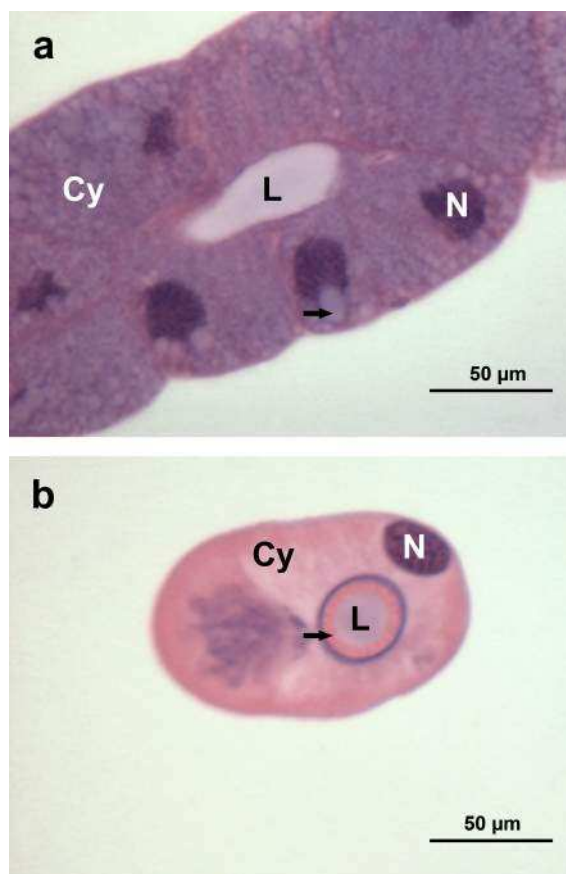
com núcleos elípticos (N) e citoplasma acidófilo (Cy). O epitélio do hilo está envolvido por fibras musculares estriadas (M) e bainha peritoneal (seta). **f**) Ducto da glândula salivar formado por células achatadas com citoplasma acidófilo (Cy), núcleo em forma variável (N), e um camada delgada de cutícula (seta) envolvendo o lúmen (L).

O ducto da glândula principal é formado por uma camada simples de células achatadas, cobertas com cutícula delgada, o núcleo possui diferentes formas, sendo esférico ou pleomórfico, com cromatina condensada, e o citoplasma é acidófilo (Fig. 3f).

### **3.3 Glândula salivar acessória**

A glândula salivar acessória apresenta uma região secretora tubular, formada por uma camada simples de células cúbicas, que envolve um lúmen estreito, cujo conteúdo ficou corado com hematoxilina e eosina (Fig. 4a). O citoplasma das células secretoras é basófilo, e caracterizado pela presença de vacúolos de diferentes tamanhos, na região basal são maiores, preenchidos com conteúdo pouco basófilo que em baixa resolução podem ser vistos como estrias longitudinais. As células têm um núcleo irregular na região basal com o aspecto granulado de cromatina condensada.

O ducto da glândula acessória é formado por células achatadas, que na região apical estão recobertas por uma cutícula delgada, o núcleo é esférico com cromatina condensada, nucléolo evidente, e o citoplasma é acidófilo (Fig. 4b).



**Figura 4** Glândula salivar acessória de *Euschistus heros*: **a)** Seção longitudinal da glândula acessória mostrando o lúmen estreito (L) envolvido no epitélio secretor formado por células cúbicas que possuem citoplasma (Cy) com múltiplos vacúolos (seta) e núcleo basal (N). **b)** Ducto da glândula acessória formado por células achatadas com citoplasma acidófilo (Cy), núcleo esférico (N) e uma camada delgada de cutícula (seta) envolvendo o lúmen (L).

#### 4. Discussão

O padrão anatômico do sistema salivar de *E. heros* é constituído por um par de glândulas principais bilobadas, e por um par de glândulas acessórias tubulares, similar a de outros Pentatomidae fitófagos e predadores (Baptist, 1941; Costa Lima, 1942; Miles, 1964), como por exemplo *Halyomorpha halys* Stål (Peiffer & Felton, 2014), *Podisus nigrispinus* Dallas (Martínez et al., 2014), *Podisus distinctus* Stål (Castro et al., 2013), *Brontocoris tabidus* Signoret (Azevedo et al., 2007). Essa evidência sugere um padrão anatômico similar em Pentatomidae, entretanto, existe diversidade morfológica provavelmente produzida pelos

diferentes hábitos alimentares, sejam esse insetos fitófagos, zoófagos, zoofitófagos e fitozoófagos (Martínez et al., 2014; Miles, 1972). Os Pentatomidae fitófagos, apresentam maior número de projeções nos lobos da glândula principal, similar ao de *E. heros* possivelmente para produzir saliva mais elaborada (Miles, 1972; Serrão et al., 2008). O aspecto translúcido das glândulas salivares pode ser causado pela grande quantidade de água na saliva, resultante do transporte de água da hemolinfa até o lúmen da glândula (Serrão et al., 2008).

O epitélio da glândula salivar principal contém vesículas secretoras em abundância, comumente encontradas em outras glândulas salivares de outros hemípteros (Azevedo et al., 2007; Castro et al., 2013; Martínez et al., 2014), indicando que as glândulas principais são regiões que sintetizam proteínas.

Os núcleos grandes e ameboides das células do epitélio secretor possuem cromatina descondensada, o que indica uma alta atividade metabólica, especialmente na síntese de proteínas. Células com elevada taxa metabólica apresentam núcleos grandes contendo numerosas proteínas envolvidas na transcrição de DNA (Roma et al., 2003). As ramificações observadas no núcleo causam um incremento na superfície e facilitam o transporte de materiais entre o núcleo e o citoplasma, para a síntese de proteínas (Castro et al., 2013; Roma et al., 2003). Portanto, os resultados sugerem que as secreções das glândulas salivares de *E. heros* contêm proteínas, embora sejam necessários mais estudos para confirmar este resultado.

As diferenças no aspecto dos conteúdos dos lobos anterior e posterior da glândula salivar principal, sendo mais basófilo e homogêneo no lobo anterior, sugere que o epitélio secretor dos lobos produz substâncias diferentes, mostrando diferenças na atividade e composição bioquímica (Castro et al., 2013; Kumar & Sahayaraj, 2012; Reis et al., 2003). Esta diferenciação entre os lobos também é observada em outros hemípteros independentemente dos hábitos alimentares, incluindo predadores generalistas e heterópteros fitófagos (Haridass & Ananthakrishnan, 1981; Kumar & Sahayaraj, 2012; Roma et al., 2003).

O processo terminal do lóbulo posterior é composto por um agrupamento de células, com lúmen estreito, similar ao encontrado no predador *B. tabidus* (Azevedo et al., 2007) e em outros pentatomídeos (Baptist, 1941). As células e o lúmen do processo terminal são diferentes dos encontrados no epitélio secretor dos lobos, embora, seja incerta a produção

de diferentes substâncias (Azevedo et al., 2007; Serrão et al., 2008).

As glândulas salivares principais de Pentatomidae não possuem células musculares associadas (Azevedo et al., 2007; Castro et al., 2013; Martínez et al., 2014), sugerindo que o mecanismo de liberação de saliva ocorre com a participação dos músculos do tórax como é descrito para a liberação das secreções das glândulas cefálicas em cupins (Martínez et al., 2014; Santos et al., 2005).

No entanto, pela primeira vez é relatado que o epitélio do hilo está envolvido por uma camada de células musculares. Essas fibras musculares provavelmente auxiliam no transporte das secreções da glândula principal (Nunes & Camargo-Mathias, 2006), e podem selecionar as substâncias que vão ser secretadas, funcionando como um sistema regulador para a liberação de secreções dos diferentes compartimentos das glândulas salivares em resposta a sinais sensoriais do seu ambiente circundante, pois a composição enzimática da saliva dos insetos é variável com a idade e sinais físicos e químicos no tecido da planta, onde ocorre a alimentação (Cooper et al., 2010; Moreno et al., 2011; Torres & Boyd, 2009). Possivelmente, a ação destes músculos é controlada neuralmente via inervação direita do gânglio subesofágico e/ou sistema nervoso estomogástrico (Kumar & Sahayaraj, 2012; Moreno et al., 2011; Vinokurov et al., 2014).

As glândulas acessórias são tubulares, com um lúmen estreito e um ducto que abre no hilo entre os dois lobos da glândula salivar principal, como nos percevejos *P. nigrispinus* (Martínez et al., 2014), *P. distinctus* (Castro et al., 2013) e *B. tabidus* (Azevedo et al., 2007), sugerindo que as secreções produzidas pela glândula salivar acessória são transportadas para o lúmen da glândula principal (Martínez et al., 2014). As características do epitélio das glândulas acessórias não permitem discernir sua função, que pode estar relacionada à produção de secreções ou com funções osmorregulatórias contribuindo com a porção aguada da saliva (Kumar & Sahayaraj, 2012; Martínez et al., 2014; Nunes & Camargo-Mathias, 2006).

O epitélio dos ductos da glândula principal e acessória estão circundados por uma cutícula, indicando a necessidade de separar eficientemente o conteúdo do lúmen da hemolinfa, como proteção contra a autointoxicação, ou prevenindo alterações das secreções que são transportadas (Roma et al., 2003; Nunes & Camargo-Mathias, 2006).

A morfologia das glândulas salivares de *E. heros* sugere que provavelmente há três regiões

responsáveis pela produção de saliva: os lobos anterior e posterior da glândula salivar principal e a glândula salivar acessória (Azevedo et al., 2007; Martínez et al., 2014; Roma et al., 2003). A função de cada uma das regiões pode estar relacionada com a natureza de saliva produzida, a maioria dos hemípteros filófagos secreta dois tipos de saliva (Alhaddad et al., 2011; Haridass & Ananthakrishnan, 1981; Peiffer & Felton, 2014). A primeira, a saliva aguada está envolvida na digestão dos tecidos vegetais e contém enzimas digestivas entre outros componentes proteicos (Kumar & Sahayaraj, 2012; Peiffer & Felton, 2014; Ramzi et al., 2009). A saliva aguada possivelmente é produzida pelas glândulas salivares acessórias e o lobo posterior da glândula salivar principal (Kumar & Sahayaraj, 2012; Moreno et al., 2011; Peiffer & Felton, 2014). A segunda, a saliva gel é a base para a formação da bainha salivar (Peiffer & Felton, 2014; Vinokurov et al., 2014; Will et al., 2012). A bainha salivar é o revestimento endurecido de saliva que sela o tecido vegetal ao redor dos estiletos e evitar a perda de fluidos da planta (Alhaddad et al., 2011; Peiffer & Felton, 2014; Will et al., 2012). A bainha salivar é produzida possivelmente pelo lobo anterior da glândula salivar principal (Haridass & Ananthakrishnan, 1981; Kumar & Sahayaraj, 2012; Peiffer & Felton, 2014).

Conclui-se que o sistema salivar de *E. heros* consiste de um par de glândulas salivares principais bilobadas encarregadas da secreção de proteínas, e um par de glândulas acessórias tubulares que participam do transporte de água ou produção de outras substâncias. Pela primeira vez é relatada a presença de músculos no hilo da glândula salivar principal e sua função está provavelmente relacionada com a mistura de substâncias produzidas pelas glândulas salivares e controle do volume salivar de *E. heros*.

## **5. Agradecimentos**

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## 6. Bibliografia

- Alhaddad H, Coudron TA, Backus EA & Schreiber F** (2011) Comparative behavioral and protein study of salivary secretions in *Homalodisca* spp. sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). *Annals of the Entomological Society of America* 104: 543-552.
- Azambuja R, Degrande P & Pereira F** (2013) Comparative biology of *Euschistus heros* (F.)(Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. *Neotropical entomology* 42: 359-365.
- Azevedo DO, Zanuncio JC, Zanuncio Jr JS, Martins GF, Marques-Silva S, Sossai MF & Serrão JE** (2007) Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 469-477.
- Baptist B** (1941) The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 2: 91-139.
- Borges M, Laumann R, Silva C, Moraes M, Santos H & Ribeiro D** (2006) Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos.
- Boyd DW** (2003) Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigritulus* (Uhler)(Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. *Annals of the Entomological Society of America* 96: 667-671.
- Castro AA, Canevari GD, Pikart TG, Ribeiro RC, Serrão JE, Zanuncio TV & Zanuncio JC** (2013) Salivary gland histology of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 106: 273-277.
- Cooper WR, Dillwith JW & Puterka GJ** (2010) Salivary proteins of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environmental entomology* 39: 223-231.
- Corrêa-Ferreira BS & Panizzi AR** (1999) Percevejos da soja e seu manejo. Embrapa Soja Londrina.
- Costa Lima A** (1942) Insetos do Brasil. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Agronomia, Série didática 2.
- Depieri R & Panizzi A** (2011) Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical entomology* 40: 197-203.
- Fernandes A** (2000) Análise comparativa da espermogênese normal e diapúsica em percevejos fitófagos (Hemiptera, Pentatomidae)–Revisao Universitas. *Biociências (UNICEUB)*. Brasília-Brasil 1: 87-95.

- Haridass E & Ananthakrishnan T** (1981) Functional morphology of the salivary system in some Reduviidae (Insecta-Heteroptera), Vol. 90: Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Animal Sciences (ed. Indian Academy of Sciences, pp. 145-160.
- Hori K** (2000) Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. Heteroptera of economic importance: 11-36. In: Schaefer C W, Panizzi A R (eds.) Heteroptera of economic importance CRC Press Boca Raton FL USA p 828.
- Kumar SM & Sahayaraj K** (2012) Gross morphology and histology of head and salivary apparatus of the predatory bug, *Rhynocoris marginatus*. Journal of Insect Science 12: 19.
- Martínez LC, Fialho MCQ, Zanuncio JC & Serrão JE** (2014) Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). Protoplasma 251: 535-543.
- Medrano EG, Esquivel JF, Bell AA, Greene JK, Roberts PM, Bacheler JS, Marois JJ, Wright DL & Nichols RL** (2011) Analysis of microscopic injuries caused by southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton bolls. Southwestern Entomologist 36: 233-245.
- Miles P** (1964) Studies on the salivary physiology of plant bugs: the chemistry of formation of the sheath material. Journal of insect physiology 10: 147-160.
- Miles PW** (1972) Saliva of Hemiptera. Advances in insect physiology 9: 183-255.
- Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, Kassem M, Aranda M & Fereres A** (2011) Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. Entomologia Experimentalis et Applicata 139: 145-153.
- Nunes PH & Camargo-Mathias MI** (2006) Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Euhemiptera: Cercopidae). Micron 37: 57-66.
- Oliveira J, Oliveira M, Guedes R & Soares M** (2006) Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Bulletin of entomological research 96: 251-258.
- Panizzi A, Bueno A & Silva F** (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. Hoffman-Campo, CB; et al. Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas. Brasília: EMBRAPA: 335-420.
- Peiffer M & Felton GW** (2014) Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). PloS one 9: e88483.
- Ramzi S, BANDANI AR, Zibae A & Kwon O** (2009) Comparison of glutathione S-transferase and general esterase in two bugs, *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae) and *Brachynema germari* Kolenati (Heteroptera: Pentatomidae). Entomological Research 39: 225-232.

- Reis MM, Meirelles RM & Soares MJ** (2003) Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue and Cell* 35: 393-400.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, Arrigoni EB & Marin-Morales MA** (2003) Little Cicada of Sugarcane *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae). A Brazilian Agricultural Pest. Morpho-histological Study of Salivary Glands. *Cytologia* 68: 101-114.
- Santos CA, Costa-Leonardo AM & Serrao JE** (2005) Morphology of the head and frontal gland in Neotropical Nasutitermitinae (Isoptera, Termitidae). *Sociobiology* 46: 579-593.
- Serrão JE, Castrillon MI, Santos-Mallet JR, Zanuncio JC & Gonçalves TCM** (2008) Ultrastructure of the salivary glands in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology* 45: 991-999.
- Silva F, Silva J, Depieri R & Panizzi AR** (2012) Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical entomology* 41: 386-390.
- Torres JB & Boyd DW** (2009) Zoophytophagy in predatory Hemiptera. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 1199-1208.
- Vinokurov K, Bednářová A, Tomčala A, Stašková T, Krishnan N & Kodrík D** (2014) Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *Journal of insect physiology* 60: 58-67.
- Will T, Steckbauer K, Hardt M & van Bel AJ** (2012) Aphid gel saliva: sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu. *PloS one* 7: e46903.

**Alterações celulares mediadas por  
imidaclopride nas glândulas salivares de  
*Euschistus heros***

## **Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**

### **Resumo**

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) é uma importante praga na cultura da soja no Brasil. O controle destes insetos acontece mediante a utilização de pesticidas, dentre os quais se destaca o inseticida sistêmico imidaclopride. Apesar do sítio principal de ação do imidaclopride ser os receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos (localizados no sistema nervoso central do inseto), alvos secundários também podem ser alterados e influenciar sua toxicidade. As glândulas salivares além de serem a principal fonte de enzimas digestivas para a digestão extra-oral, podem estar envolvidas na detoxificação de inseticidas. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações morfológicas nas glândulas salivares de *E. heros* expostos a diferentes concentrações de imidaclopride (por contato e ingestão). Inicialmente foi determinada a curva concentração-mortalidade para adultos expostos a imidaclopride por contato e ingestão. Posteriormente, machos adultos foram tratados com concentrações de imidaclopride correspondentes a  $CL_5$  (3,75 mg i.a./L),  $CL_{50}$  (112,5 mg i.a./L) e  $CL_{75}$  (375 mg i.a./L) (água destilada foi usada como controle). As glândulas salivares desses machos foram dissecadas e processadas para análises morfológicas por microscopia de luz. Nas células das glândulas salivares principais insetos expostos a imidaclopride foram observadas alterações morfológicas severas indicativas de morte celular por necrose, como forma irregular, vacuolização citoplasmática, núcleos dilatados, condensação de cromatina e ruptura da membrana citoplasmática. As células das glândulas salivares acessórias de insetos tratados apresentaram mudanças morfológicas leves características de células na fase inicial de morte celular por apoptose, como vacuolização citoplasmática e condensação de cromatina. O nível de degeneração celular foi mais pronunciado nas concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{75}$ ), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcionais ao incremento da concentração. Conclui-se que a exposição aguda de *E. heros* a concentrações letais de imidaclopride pode induzir

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros*  
necrose nas glândulas principais e por apoptose nas glândulas principais.

**Palavras chave:** citomorfologia, toxicologia de inseticidas, neonicotinoide, glândulas salivares

## Abstract

The neotropical brown stinkbug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) is an important pest of soybean fields in Brazil. Control measures of these insects are based on the use of pesticides, among them the systemic insecticide imidaclopride is of great importance. Despite the target site of imidacloprid is the nicotinic acetylcholine receptors (distributed in the central nervous system of the insect), secondary target may also be affected and influence the toxicity of this compound. The salivary glands are the principal source of digestive enzymes for extra-oral digestion, moreover can participate of detoxification of insecticides. Thus, the aiming of the study was evaluate the citomorphologic alterations of salivary glands of *E. heros* exposed to different concentrations of imidacloprid (by contact and ingestion). Initially, we determined concentration-mortality curve in adults exposed to imidacloprid by contact and ingestion. Subsequently, adults males were treated with three concentrations: LC<sub>5</sub> (3,75 mg a.i./L), LC<sub>50</sub> (112,5 mg a.i./L) and LC<sub>75</sub> (375 mg a.i./L) (distilled water used as a control). Salivary glands were removed and processed for morphological analyses using light microscopy. In the cells of principal salivary glands of insects treated with imidacloprid were observed severe morphologic alterations indicative of cell death by necrosis, like irregular form, cytoplasm vacuolization, nuclear dilatation, chromatin condensation and rupture of the cytoplasm membrane. The cells of the accessory salivary glands from exposed insects showed slight morphological changes characteristic of the initial phase of cell death by apoptosis, like cytoplasm vacuolization and chromatin condensation. The cell degeneration intensity was greater in lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>75</sub>), showing a gradual increment of cellular alterations proportional to concentration increment. As conclusion, the acute exposure of *E. heros* to lethal concentrations of imidacloprid can induce necrosis in the principal salivary glands and apoptosis in the salivary accessory glands.

**Key words:** cytomorphology, insecticide toxicology, neonicotinoids, salivary glands

## 1. Introdução

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, com uma área de 31,6 milhões de hectares, uma produção de 95,1 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Essa vasta extensão de área cultivada disponibiliza alimento para diversos organismos e pode ser colonizada por insetos-praga (Sosa-Gómez & Omoto, 2012). Dentre dessas pragas, destaca-se o percevejo-marrom *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), que é hoje uma das pragas sugadoras mais importantes e abundantes da cultura da soja no Brasil, particularmente nas regiões mais quentes, que vão desde o Centro-Oeste Brasileiro ao norte do estado do Paraná (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012).

As ninfas e adultos de *E. heros* regurgitam saliva que contém enzimas digestivas danificando os tecidos das sementes e tornando-as chochas e enrugadas (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012). As lesões causadas por esse inseto resultam em detenção do crescimento, atrofiamento dos grãos e vagens e perda de biomassa (Corrêa-Ferreira & Azevedo, 2002; Silva et al., 2012). Dessa forma, o percevejo afeta a produção e qualidade dos grãos (Panizzi et al., 2012; Silva et al., 2012). Além disso, as perfurações causadas pelos percevejos facilitam a entrada e contaminação dos grãos por patógenos e podem ainda causar distúrbios fisiológicos como retenção foliar (Azambuja et al., 2013; Nunes & Corrêa-Ferreira, 2002).

O principal método de controle para *E. heros* é o uso de pesticidas. Os inseticidas mais utilizados desde 1960 até 2010 para o controle desse inseto correspondem ao grupo dos organofosforados e o ciclodieno Endosulfan (Sosa-Gómez & Omoto, 2012). Porém, a utilização indiscriminada desses produtos em uma mesma safra e por vários anos consecutivos favorecem o surgimento de populações resistentes (Sosa-Gomez et al., 2001; Sosa-Gómez & Silva, 2010). Por tanto, esses inseticidas foram substituídos por piretróides e neonicotinoides, sendo o neonicotinoide imidaclopride um dos inseticidas mais amplamente usados atualmente no controle de *E. heros* (Santos et al., 2015; Sosa-Gómez & Silva, 2010; Sosa-Gómez et al., 2009).

O imidaclopride é um inseticida sintético com ação sistêmica, que interfere na transmissão de impulsos nervosos, pela ligação irreversível e específica aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Tomizawa & Casida, 2005). A ligação específica causa a abertura do canal e despolarização contínua dos neurônios pós-sinápticos, resultando em paralisia e morte (Hatjina et al., 2013; Kalajdžić et al., 2013).

Apesar do sítio de ação do imidaclopride ser o sistema nervoso, alvos secundários também podem ser alterados por esse inseticida (Catae et al., 2014). principalmente os tecidos que são atingidos via alimentos contaminados como as glândulas salivares (Ferreira et al., 2013; Gregorc & Ellis, 2011).

O percevejo *E. heros* como outros hemípteros se alimenta por digestão extra-oral (Boyd, 2003; Silva et al., 2012; Vinokurov et al., 2014). O inseto insere inicialmente o aparelho bucal nas vagens, lacerando o tecido enquanto injeta enzimas digestivas produzidas nas glândulas salivares para liquefazer o tecido vegetal antes da ingestão; o alimento rico em nutrientes é seletivamente sugado pelo inseto e posteriormente digerido no intestino médio (Hori, 2000; Panizzi et al., 2012; Peiffer & Felton, 2014).

As glândulas salivares são a principal fonte de enzimas envolvidas na digestão extra oral, detoxificação, e proteção contra a ação de microrganismos (Azevedo et al., 2007; Castro et al., 2013; Peiffer & Felton, 2014). Isso torna esses órgãos interessantes do ponto de vista toxicológico para avaliar alterações morfológicas e celulares produzidas pelos inseticidas (Pereira et al., 2009). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças celulares nas glândulas salivares de *E. heros* expostas por contato e ingestão a concentrações crescente de imidaclopride.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos**

Adultos de *E. heros* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos a  $27 \pm 2$  °C,  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa, e fotoperíodo de 14:10 h luz:escuro.

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros*

Os insetos foram alimentados *ad libitum* com vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos de soja, amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Fabaceae) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (Asteraceae) (Borges et al., 2006).

## **2.2. Bioensaios concentração-mortalidade**

Os bioensaios de concentração-mortalidade do inseticida foram adaptados de estudos toxicológicos de *E. heros* realizados com frascos de vidro combinando efeitos por contato e ingestão (Santos et al., 2015; Snodgrass et al., 2005; Willrich et al., 2003). O inseticida neonicotinoide imidaclopride (grânulos com 700 g de ingrediente ativo (i.a.)/kg; Bayer, São Paulo, SP, Brasil) foi dissolvido em água (destilada e deionizada) para formar uma solução estoque, preparando uma série de oito concentrações que variaram entre 0,003 a 3 vezes a dose de campo (1,13; 11,25; 18,75; 37,5; 75; 112,5; 375 [dose de campo] e 1125 mg i.a./L). No tratamento controle foi utilizada água destilada e deionizada. A superfície interna dos frascos de vidro transparentes de 250 mL foi coberta com o inseticida, pipetando 2 mL da concentração do inseticida dentro dos frascos, posteriormente os frascos foram secos utilizando um rotor (Rota-Torque modelo 7637, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). O efeito da ingestão do inseticida foi simulado com pedaços de vagem de feijão de 5 cm, lavados com detergente e imersos por três segundos em frascos de vidro com diferentes concentrações de imidaclopride, em seguida foram secos em uma capela. No interior do frasco foi colocado um pedaço de vagem tratada. Doze repetições foram feitas para cada concentração, cada uma com 5 adultos recém emergidos (menos de 24 h) com jejum de 24 h. A parte superior interna de cada frasco foi coberta com teflon PTFE (DuPont, Wilmington, DE, USA) e fechado com tecido voil e um elástico para evitar a fuga dos insetos. Após uma hora de exposição, os insetos foram contados como mortos quando não foram capazes de caminhar a distância de seu corpo depois de estimulados com um pincel fino.

## **2.3. Efeitos do imidaclopride nas células das glândulas salivares**

As concentrações utilizadas para avaliar as alterações morfológicas foram baseadas na

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros*

curva de concentração-mortalidade. Foram utilizadas as concentrações correspondentes a CL<sub>5</sub> (3,75 mg i.a./L), CL<sub>50</sub> (112,50 mg i.a./L) e CL<sub>75</sub> (375,00 mg i.a./L). O grupo controle foi exposto unicamente a água destilada e deionizada. Foram realizadas quatro repetições de cada concentração, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente (bioensaios concentração-mortalidade). Dos insetos sobreviventes a cada tratamento foram selecionados quatro indivíduos para dissecação das glândulas salivares.

Adultos de *E. heros* expostos à água (controle) e às concentrações CL<sub>5</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub> foram crioanestesiados a -4 ° C, e as glândulas salivares dissecadas em solução salina para insetos. As glândulas salivares foram divididas em glândula principal e glândula acessória. Posteriormente, os tecidos foram transferidos para a solução fixadora de Zamboni por 24 h a 5 °C. A seguir, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 95°), embebidas em historresina JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA), seccionados a 3 µm de espessura, obtidas como navalha de vidro em micrótomo Leica RM2255. Em seguida, as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina por 8 minutos e 40 segundos respectivamente e analisadas em microscópio de luz Leica DMLS.

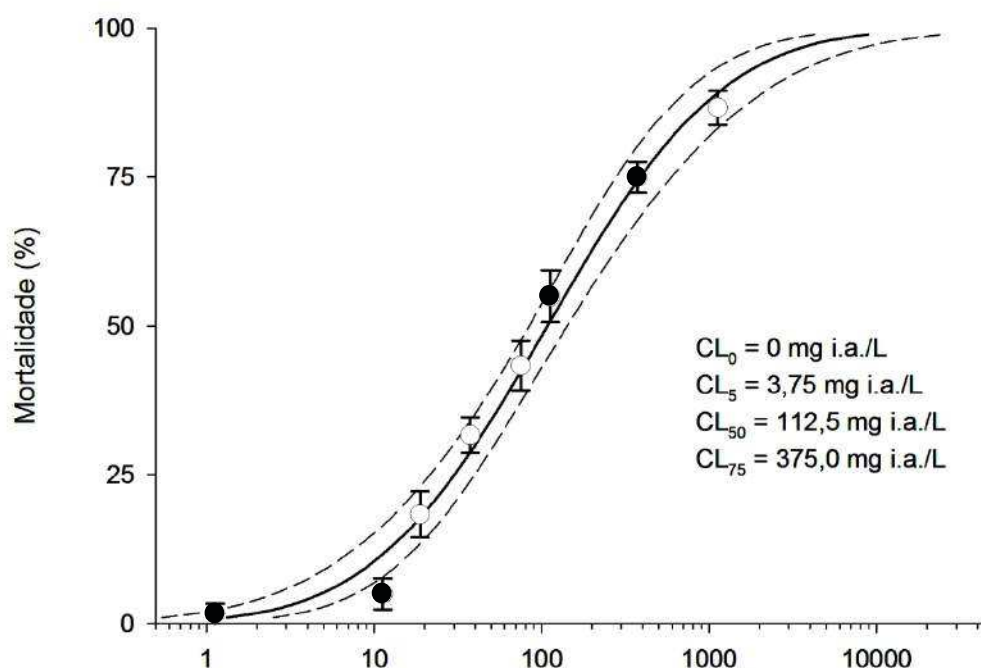
#### **2.4. Análise estatística**

A curva concentração-mortalidade foi estimada pelo modelo de regressão probit usando o procedimento PROC PROBIT do programa SAS User (SAS Institute 2008). O gráfico foi construído usando o programa SigmaPlot 12.0.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Curva concentração-mortalidade**

O modelo de Probit mostrado na Fig. 1 foi ajustado para dados da concentração-mortalidade [declive ( $\pm$ EP) = 1,22 $\pm$ 0,11; n = 480, gl =6,  $\chi^2$  = 4.23, P =0.645] uma vez que o teste de adequação de ajuste chi quadrado forneceu valores altos de P (>0,05).



**Figura 1** Toxicidade de imidaclopride por contato e ingestão ao percevejo-marrom *Euschistus heros*. Os valores da concentração letal (CL) foram estimados baseados nos ensaios de concentração-mortalidade usando análises de probit [ $CL_{50} = 108,1$  (84,1–141,9) mg a.i./L, declive ( $\pm EP$ ) =  $1,22 \pm 0,11$ ;  $n = 480$ ,  $gl = 6$ ,  $\chi^2 = 4.23$ ,  $P > 0.645$ ]. Linhas pontilhadas denotam intervalos de confiança de 95 %. Pontos pretos representam as concentrações selecionadas para avaliar as alterações morfológicas ( $CL_0$ ,  $CL_5$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{75}$ ).

As três concentrações utilizadas para avaliar as alterações celulares foram  $CL_5$  4,80 mg i.a./L (2,53-7,69),  $CL_{50}$  108,13 mg i.a./L (84,05-141,85), e  $CL_{75}$  387,80 mg i.a./L (278,15-595,66) (Tabela 1). A  $CL_{75}$  está dentro do espectro de concentração da dose recomendada para aplicações de campo (375,0 mg i.a./L). Nas maiores concentrações (112,5, 375 e 1125 mg i.a./L) os percevejos apresentaram sintomas de intoxicação como diminuição do caminamento, tremores rítmicos nos apêndices (pernas, antenas, estilete) e salivação.

**Tabela 1** Toxicidade de imidaclopride por contato e ingestão ao percevejo-marrom *Euschistus heros* (n=480,  $\chi^2= 4.23$ , P=0.645). Os valores das concentrações letais (CL) foram estimados baseados nos bioensaios concentração-mortalidade usando análise de probit. IC denota intervalo de confiança. Concentrações estão expressadas em mg i.a./L.

<b>Declive <math>\pm</math>EP</b>	<b>CL<sub>5</sub> (95% IC)</b>	<b>CI<sub>50</sub> (95% IC)</b>	<b>CI<sub>75</sub> (95% IC)</b>
1,22 $\pm$ 0,11	4,80 (2,53-7,69)	108,13 (84,05-141,85)	387,80 (278,15-595,66)

### 3.2. Efeitos de imidaclopride nas células das glândulas salivares

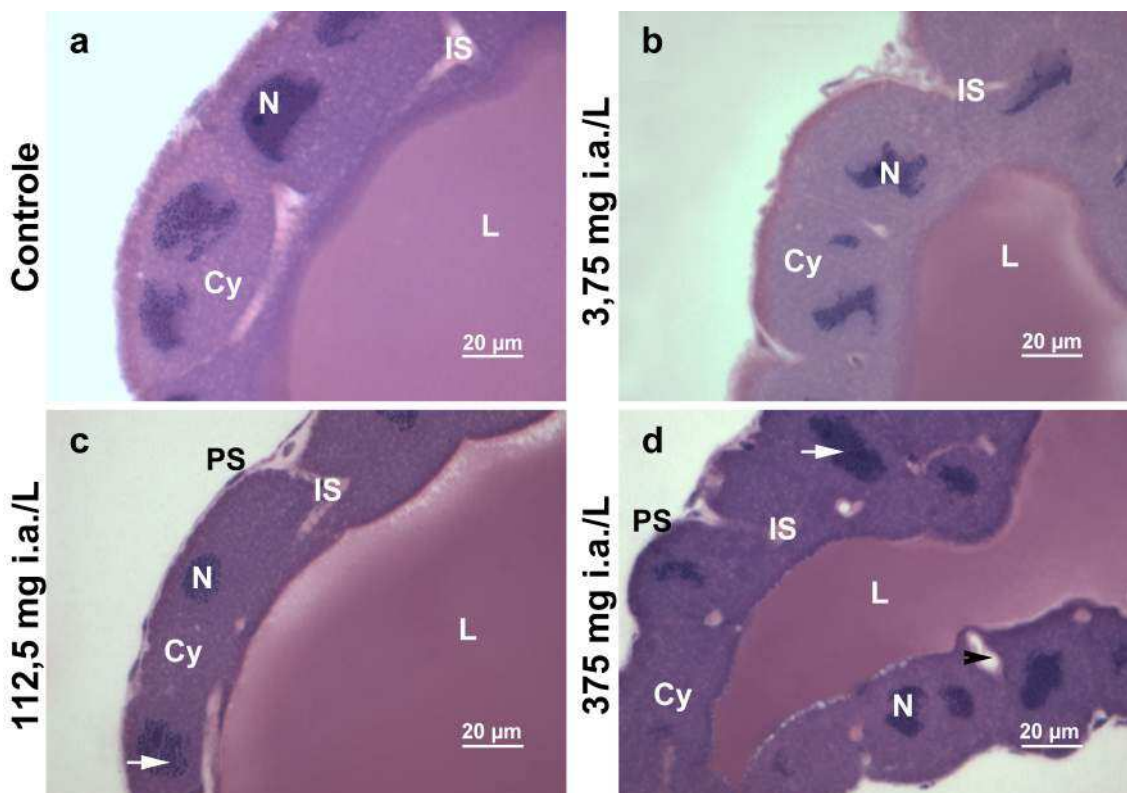
#### 3.2.1. Lobo anterior da glândula salivar principal

O lobo anterior das glândulas salivares principais de *E. heros* não expostos ao inseticida mostraram características típicas de células intactas. O epitélio do lobo anterior foi formado por uma camada simples de células cúbicas, com núcleos irregulares com predomínio de cromatina descondensada e nucléolo evidente, e citoplasma com algumas vesículas pequenas (Fig 2a).

O lobo anterior de insetos expostos a 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>) não mostrou alterações morfológicas em comparação com os indivíduos não expostos (Fig. 2b). Embora nos insetos expostos às concentrações maiores (112,50 e 375 mg i.a./L) o lobo anterior exibiu alterações morfológicas relacionadas ao processo de degeneração.

Nos insetos tratados com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>) as células do lobo anterior mostraram alterações na morfologia do núcleo, especialmente na condensação de cromatina (Fig. 2c).

De forma similar ao tratamento anterior, as células do lobo anterior de indivíduos expostos a 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>, dose de campo) exibiram forma irregular, condensação de cromatina e alargamento do espaço intercelular (Fig. 2d). Adicionalmente, foram observadas mudanças na anatomia geral do lobo anterior, incluindo forma irregular e clareamento do conteúdo do lúmen especialmente nas regiões próximas ao epitélio (Fig. 2d).



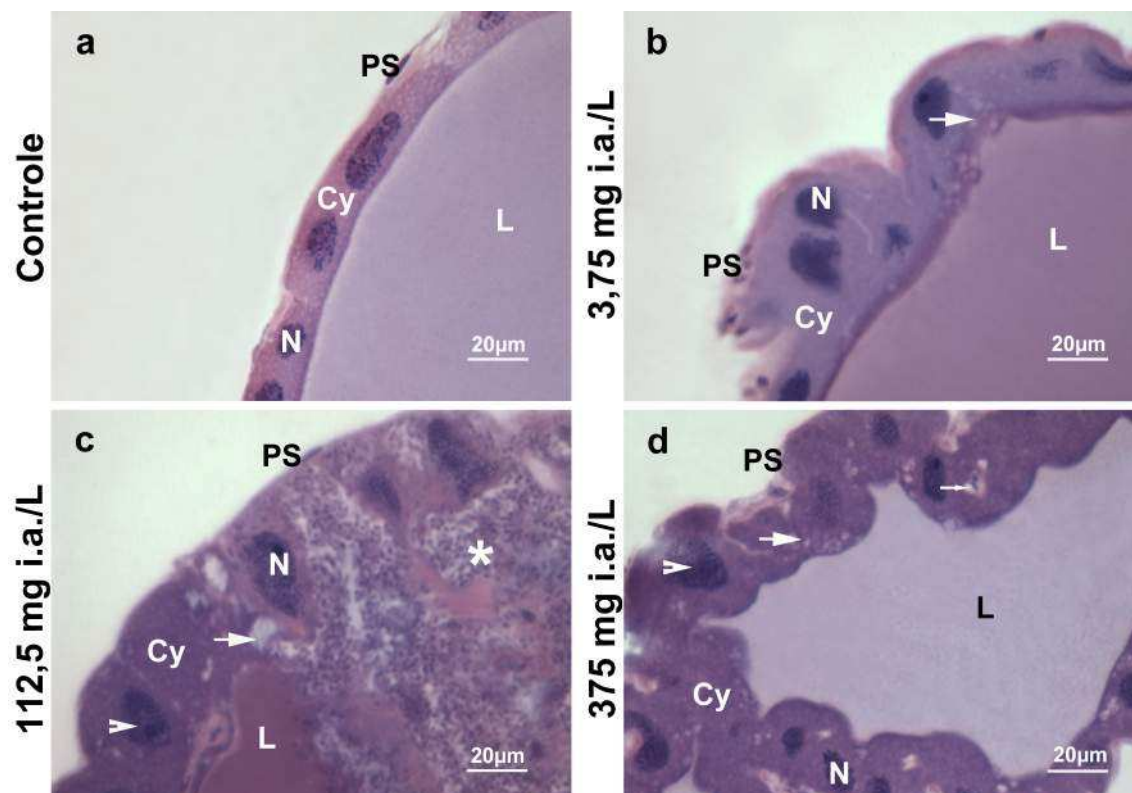
**Figura 2** Lobo anterior da glândula salivar principal de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** Lobo anterior de indivíduos não expostos mostrando morfologia típica, com o lúmen basófilo amplo (L) envolvido por epitélio secretor formado por células cúbicas que possuem citoplasma (Cy) com múltiplas vesículas e dois núcleos ameboides (N). Entre as células pode-se observar o espaço intercelular (IS). **b)** Lobo anterior de indivíduos tratados com 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>), apresentando morfologia similar aos indivíduos não expostos. **c)** Lobo anterior de indivíduos tratados com 112,5 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>), mostrando alguns núcleos dilatados (N) com cromatina condensada (seta). **d)** Lobo anterior de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), mostrando as células do epitélio com forma irregular, núcleos dilatados (N) com cromatina condensada (seta), e alargamento do espaço intracelular (ponta da seta). O tamanho do lobo anterior foi menor, e o conteúdo do lúmen estava mais claro (L) em relação ao lúmen dos indivíduos não expostos.

### 3.2.2. Lobo posterior da glândula salivar principal

O lobo posterior das glândulas salivares principais de *E. heros* não expostas ao inseticida possuía morfologia típica de células intactas. O lobo posterior foi constituído por um epitélio simples de células achatadas com dois núcleos alongados cada um com dois nucléolos e contendo cromatina pouco condensada, e o citoplasma com pequenas vesículas (Fig. 3a).

Em geral, os insetos expostos a 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à  $CL_5$ ) não mostraram alterações morfológicas no lobo posterior, em comparação com o controle (Fig. 3b). No entanto, a região apical de algumas células exibiu início da vacuolização citoplasmática (Fig. 3b). O lobo posterior dos insetos tratados com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à  $CL_{50}$ ) apresentou mudanças histológicas severas. As células do lobo posterior exibiram vacuolização citoplasmática caracterizada por numerosos vacúolos grandes. Em alguns indivíduos, as células além da vacuolização mostraram forma irregular, núcleos dilatados, condensação de cromatina e alargamento do espaço intercelular característicos de processos de degeneração celular (Fig. 3c).

O incremento da vacuolização eventualmente levou à ruptura da membrana plasmática apical, liberando o conteúdo celular, incluindo a secreção, diretamente no lúmen da glândula (Fig. 3c). Embora não tenha ocorrido ruptura da membrana celular, as células do lobo posterior de indivíduos expostos a 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à  $CL_{75}$ , dose de campo) continuaram exibindo sinais de degeneração celular como vacuolização citoplasmática intensa, forma irregular, núcleos dilatados, condensação de cromatina e alargamento dos espaços intercelulares (Fig. 3d). Anatomicamente, o lobo posterior apresentou forma irregular e o conteúdo do lúmen estava mais claro e menos homogêneo especialmente nas regiões próximas ao epitélio (Fig. 3d).



**Figura 3** Lobo posterior da glândula salivar principal de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** Lobo posterior de indivíduos não expostos apresentando a morfologia típica, com o epitélio formado por células achatadas, com dois núcleos alongados (N), e citoplasma (Cy) com múltiplas vesículas. O epitélio envolve um lúmen amplo ligeiramente basófilo (L). O epitélio está envolvido pela bainha peritoneal (PS) formada por células achatadas. **b)** Lobo posterior de indivíduos tratados com 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>), mostrando o início da vacuolização citoplasmática (seta). **c)** Lobo posterior de indivíduos tratados com 112,5 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>), apresentando núcleos dilatados (N) com cromatina condensada (seta), vacuolização citoplasmática intensa (ponta da seta), ruptura da membrana plasmática apical e liberação do conteúdo celular no lúmen da glândula (asterisco). **d)** Lobo posterior de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), mostrando células com forma irregular, vacuolização citoplasmática intensa (seta), núcleos dilatados (N) com cromatina condensada (ponta da seta), e alargamento do espaço intracelular (seta fina). O tamanho do lobo posterior foi menor, e o conteúdo do lúmen estava mais claro (L) em comparação ao lúmen dos indivíduos não expostos.

### 3.2.3. Glândula salivar acessória

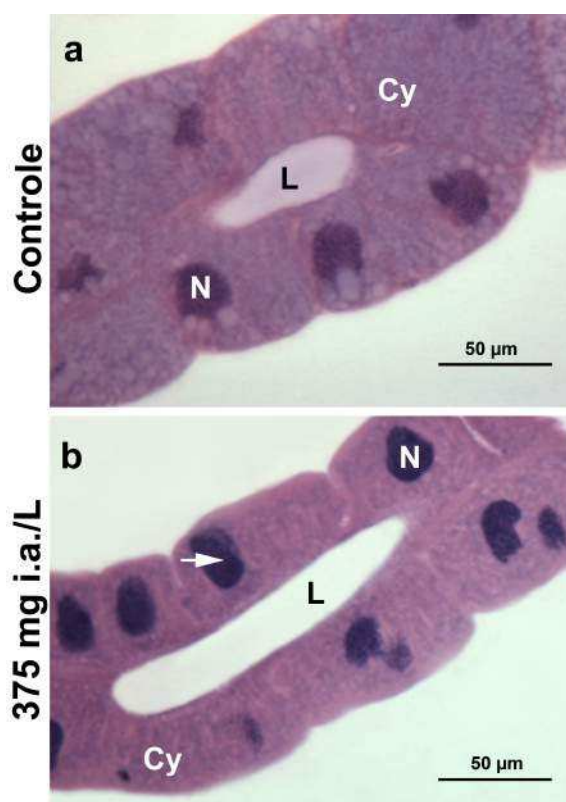
As glândulas salivares acessórias, também apresentaram a camada de células cúbicas sem alterações, o citoplasma com vacúolos de diferentes tamanhos, maiores na região basal e

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros*

um núcleo irregular com cromatina condensada (Fig. 4a).

As glândulas salivares acessórias de insetos expostos a 3,75 e 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub> e CL<sub>50</sub> respectivamente) não mostraram alterações morfológicas.

No entanto, as glândulas acessórias de alguns indivíduos expostos a 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>, dose de campo) mostraram células com citoplasma mais acidófilo e com menor número de vacúolos, núcleos dilatados e com maior condensação da cromatina (Fig. 4b). Em adição, o lúmen não foi corado com hematoxilina e eosina em contraste do lúmen do controle.



**Figura 4** Glândulas salivares acessórias de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** Glândula acessória de indivíduos não expostos mostrando morfologia típica, com o lúmen estreito (L) envolvido por epitélio secretor formado por células cúbicas que possuem citoplasma (Cy) com múltiplos vacúolos e núcleo basal (N). **b)** Glândula acessória de indivíduos com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), mostrando núcleos dilatados (N) com cromatina condensada (seta), e citoplasma mais acidófilo em comparação com os indivíduos não expostos. O lúmen não foi corado com hematoxilina e eosina (L).

## **4. Discussão**

A exposição por contato e ingestão a concentrações crescentes de imidaclopride causa mudanças celulares nas glândulas salivares do percevejo marrom da soja *E. heros*. As mudanças celulares induzidas por imidaclopride são características de processos de degeneração celular, tais como vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina, alargamento do espaço intercelular e do espaço entre o epitélio e a membrana basal. A degeneração celular foi mais intensa nas células secretoras das glândulas salivares principais que nas glândulas acessórias. Adicionalmente, as alterações celulares em termos de características degenerativas foram dependentes da concentração de imidaclopride.

### **Curva concentração mortalidade**

O percevejo *E. heros* é sensível a exposição por uma hora a imidaclopride por contato e ingestão, confirmando os resultados de Santos et al. (2015) que expuseram por contato os adultos por 48 horas. Após a exposição ao inseticida, os adultos apresentam sintomas de intoxicação como diminuição do caminhar, tremores rítmicos nos apêndices. Sintomas similares foram observados em outros insetos como *Ctenocephalides felis* Bouché (Siphonaptera: Pulicidae) e *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Martínez et al., 2014b; Mehlhorn et al., 2001; Mehlhorn et al., 1999). Os efeitos visíveis foram causados possivelmente pelo mecanismo de ação do imidaclopride que bloqueia os receptores nicotínicos de acetilcolina localizados na membrana pós-sináptica, alterando o funcionamento normal dos nervos (Hatjina et al., 2013; Lees et al., 2014; Pan et al., 2015).

Alguns insetos expostos às maiores concentrações de imidaclopride apresentaram salivação, como ocorre no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) durante a exposição ao fipronil (Pereira et al., 2009). A salivação pode ser causada pela hiperatividade do sistema nervoso central, induzida por inseticidas neurotóxicos como o imidaclopride (Singh & Orchard, 1982), pois a secreção das glândulas salivares é controlada neuralmente via inervação direta do gânglio subesofágico e do sistema nervoso estomacal (Kumar & Sahayaraaj, 2012; Moreno et al., 2011; Vinokurov et al., 2014). Outra hipótese que pode explicar a salivação durante a exposição ao inseticida é a participação

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros* da glândula salivar em processos de detoxificação (Peiffer & Felton, 2014; Pereira et al., 2009; Vinokurov et al., 2014).

### **Morfofisiologia de ação do imidaclopride nas glândulas salivares**

O imidaclopride induziu mudanças estruturais nas glândulas salivares principais e acessórias de *E. heros* nas concentrações testadas. Em geral, as células do epitélio da glândula principal apresentam forma irregular, vacuolização citoplasmática, núcleos dilatados, condensação de cromatina e alargamento do espaço intercelular. Estas características degenerativas induzidas por imidaclopride nas glândulas salivares também foram descritas em *Apis mellifera* (Gregorc & Ellis, 2011; Hatjina et al., 2013; Heylen et al., 2010; Škerl & Gregorc, 2010). Danos similares no epitélio das glândulas salivares também têm sido relatados por exposição aguda a outros neurotóxicos como o coumafos, fenoxicarbe, fluvinate, indoxicarbe e fipronil (Gregorc & Ellis, 2011; Heylen et al., 2010; Pereira et al., 2009; Škerl & Gregorc, 2010).

A intensidade da degeneração celular da glândula salivar é dependente da concentração do imidaclopride, mostrando um incremento gradual das mudanças celulares proporcionais ao incremento da concentração deste composto. Estes resultados sugerem que os mecanismos intracelulares que resultam em dano celular nas glândulas salivares precisam de altas concentrações de imidaclopride (Benzidane et al., 2011).

Na concentração correspondente à CL<sub>5</sub>, as modificações celulares foram leves ou ausentes. Apenas algumas células do lobo posterior da glândula principal mostram o início da vacuolização citoplasmática na região apical. A vacuolização citoplasmática sugere que a célula está sofrendo a fase inicial da degradação autofágica dos componentes celulares danificados em resposta ao estresse químico (Clarke, 1990; Lockshin & Zakeri, 2004; Remedio et al., 2014). A autofagia não necessariamente culmina em morte celular, pois é um processo fisiológico normal de reciclagem de proteínas e organelas (Ferreira et al., 2013; Rossi et al., 2013a; Yoshimori, 2004). Porém, se a situação de estresse prevalece, a célula pode ser completamente degenerada por este processo ou desencadear apoptose (Lockshin & Zakeri, 2004; Rossi et al., 2013b).

Na concentração correspondente à CL<sub>50</sub> as mudanças celulares foram mais evidentes. As células do lobo anterior apresentam modificações nucleares como condensação de cromatina e as células do lobo posterior mostraram vacuolização citoplasmática, forma irregular, núcleos dilatados, condensação de cromatina e alargamento do espaço intercelular. A condensação da cromatina pode indicar que as células têm uma baixa atividade transcricional, que ocorre durante as fases avançadas de morte celular (Cruz et al., 2010; Häcker, 2000; Silva-Zacarin et al., 2008). Alternativamente, a condensação da cromatina pode refletir a presença de células autofágicas ou apoptóticas, nas quais as endonucleases não causam fragmentação do DNA (Rossi et al., 2013a). Estas alterações nucleares indicam que o epitélio das glândulas salivares sofre um dano que compromete a produção de proteínas, e deste modo altera a fisiologia das células incluindo a secreção de saliva (Catae et al., 2014).

Adicionalmente, a CL<sub>50</sub> de imidaclopride produziu o aumento da vacuolização, que eventualmente conduziu à ruptura da membrana plasmática apical das células do lobo posterior da glândula salivar, liberando o conteúdo celular, incluindo a secreção, diretamente no lúmen da glândula. A ruptura da membrana plasmática é um sintoma típico de células que estão em necrose (Benzidane et al., 2011; Bowen et al., 1996; Gregorc & Ellis, 2011). A membrana plasmática das células necróticas perde sua permeabilidade seletiva como consequência da diminuição do ATP, produzindo a dilatação autocatalítica da célula que resulta no rompimento da membrana celular (Bowen et al., 1996).

Na concentração correspondente à CL<sub>75</sub>, as alterações celulares foram ligeiramente mais severas que na CL<sub>50</sub>. No lobo anterior, além da condensação de cromatina, induz forma irregular e alargamento do espaço intercelular. Similarmente, as células do lobo posterior mostraram vacuolização citoplasmática, forma irregular, núcleos dilatados, condensação de cromatina e alargamento do espaço intercelular.

Além disso, os lobos anterior e posterior da glândula salivar de *E. heros* expostos à CL<sub>75</sub> de imidaclopride exibiram menor tamanho e forma irregular em comparação com o controle. Como o tamanho dos lobos da glândula salivar está correlacionado com a atividade das glândulas (Deseyn & Billen, 2005; Hatjina et al., 2013), podemos inferir que o menor tamanho das glândulas do percevejo pode influenciar a síntese de substâncias nas glândulas, e conseqüentemente produzir saliva em menor quantidade e/ou qualidade

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros* (Hatjina et al., 2013). Outra hipótese alternativa para a diminuição do tamanho dos lobos é a salivação observada nos indivíduos expostos à CL<sub>75</sub> de imidaclopride, indicando possivelmente que foi afetada a recirculação de água da hemolinfa nas glândulas salivares que assegura o fluxo constante de saliva (Kumar & Sahayaraj, 2012; Roma et al., 2003).

Alterações morfológicas nas glândulas acessórias de *E. heros* apenas foram encontradas nos insetos tratados com a CL<sub>75</sub>. Estas alterações incluem aumento da coloração, condensação de cromatina do núcleo e menor quantidade de vacúolos. O aumento da coloração com hematoxilina-eosina indica a presença de células condensadas (Oliveira et al., 2014; Rossi et al., 2013a), o que pode sugerir a ocorrência de morte celular por apoptose (Bowen et al., 1996; Rossi et al., 2013a).

O imidaclopride induz maiores alterações celulares no lobo posterior em todas as concentrações testadas, possivelmente porque os lobos da glândula principal de *E. heros* diferem na função, atividade e composição bioquímica (Azevedo et al., 2007; Castro et al., 2013; Haridass & Ananthkrishnan, 1981). O lobo anterior produz a saliva gel que participa da formação da bainha salivar, um revestimento endurecido de saliva que sela o tecido vegetal em torno dos estiletes e evitar a perda de fluidos da planta (Alhaddad et al., 2011; Peiffer & Felton, 2014; Will et al., 2012). O lobo posterior produz a saliva aguada, que está envolvida na digestão dos tecidos vegetais e contém enzimas digestivas entre outros componentes proteicos (Kumar & Sahayaraj, 2012; Moreno et al., 2011; Ramzi et al., 2009). Portanto, os resultados sugerem que o imidaclopride pode danificar principalmente a produção de enzimas digestivas, e desta maneira pode prejudicar a digestão extra-oral e o processo de alimentação em geral.

As alterações celulares observadas nas glândulas salivares principais de *E. heros* sugerem que os efeitos tóxicos do imidaclopride podem levar à morte celular através de mecanismos necróticos (Benzidane et al., 2011; Gregorc & Bowen, 2000). A necrose é uma forma de morte celular induzida por influências externas com mudanças celulares evidentes como condensação de cromatina, dilatação das organelas e ruptura da membrana (Benzidane et al., 2011; Gregorc & Bowen, 2000; Gregorc & Ellis, 2011). Por outra parte, a apoptose apresenta sintomas morfológicos incluindo encolhimento da célula, marginalização da cromatina na periferia do núcleo, seguido pela fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos (Benzidane et al., 2011; Gregorc & Bowen, 2000; Gregorc & Ellis, 2011).

Alterações morfológicas nas glândulas acessórias de *E. heros* sugerem a que o imidaclopride pode induzir morte celular por apoptose (Bowen et al., 1996; Rossi et al., 2013a). A morte celular do epitélio da glândula acessória pode danificar a sua função, que pode estar relacionada à produção de secreções ou com funções osmorregulatórias contribuindo com a porção aguada da saliva (Martínez et al., 2014a; Nunes & Camargo-Mathias, 2006; Roma et al., 2003).

Em conclusão, a exposição aguda de *E. heros* a concentrações letais de imidaclopride pode induzir necrose nas glândulas principais e por apoptose nas glândulas principais. O nível de degeneração celular foi mais pronunciado nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcional ao incremento da concentração.

## 5. Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## 6. Bibliografia

**Alhaddad H, Coudron TA, Backus EA & Schreiber F** (2011) Comparative behavioral and protein study of salivary secretions in *Homalodisca* spp. sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). *Annals of the Entomological Society of America* 104: 543-552.

**Azambuja R, Degrande P & Pereira F** (2013) Comparative biology of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. *Neotropical entomology* 42: 359-365.

**Azevedo DO, Zanuncio JC, Zanuncio Jr JS, Martins GF, Marques-Silva S, Sossai MF & Serrão JE** (2007) Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 469-477.

**Benzidane Y, Lapied B & Thany SH** (2011) Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 191-197.

**Borges M, Laumann R, Silva C, Moraes M, Santos H & Ribeiro D** (2006) Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos.

**Bowen ID, Mullarkey K & Morgan S** (1996) Programmed cell death during metamorphosis in the blow-fly *Calliphora vomitoria*. *Microscopy research and technique* 34: 202-217.

**Boyd DW** (2003) Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigrifulus* (Uhler)(Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. *Annals of the Entomological Society of America* 96: 667-671.

**Castro AA, Canevari GD, Pikart TG, Ribeiro RC, Serrão JE, Zanuncio TV & Zanuncio JC** (2013) Salivary gland histology of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 106: 273-277.

**Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Ferreira Nocelli RC & Malaspina O** (2014) Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy research and technique* 77: 274-281.

**Clarke PG** (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology* 181: 195-213.

**Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB** (2015) Acompanhamento da safra brasileira: grãos - Oitavo Levantamento Maio/2015. *SAFRA 2014/15* 2: 1-118.

**Corrêa-Ferreira BS & Azevedo J** (2002) Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agricultural and Forest Entomology* 4: 145-150.

**Cruz SA, Silva-Zacarin EC, Bueno OC & Malaspina O** (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell biology and toxicology* 26: 165-176.

**Deseyn J & Billen J** (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36: 49-57.

**Ferreira RAC, Zacarin ECMS, Malaspina O, Bueno OC, Tomotake MEM & Pereira AM** (2013) Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron* 46: 57-65.

**Gregorc A & Bowen ID** (2000) Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, amitraz and oxytetracycline. *Cell biology international* 24: 319-324.

**Gregorc A & Ellis JD** (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 200-207. **Häcker G** (2000) The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301: 5-17.

**Haridass E & Ananthakrishnan T** (1981) Functional morphology of the salivary system in some Reduviidae (Insecta-Heteroptera), Vol. 90: Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Animal Sciences (ed. Indian Academy of Sciences, pp. 145-160.

**Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C & Arnold G** (2013) Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44: 467-480.

**Heylen K, Gobin B, Arckens L, Huybrechts R & Billen J** (2010) The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*.

**Hori K** (2000) Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. *Heteroptera of economic importance*: 11-36.

**Kalajdžić P, Oehler S, Markaki M & Savakis C** (2013) Toxicology and cytogenetic analysis of a *Drosophila melanogaster* mutant resistant to Imidacloprid and DDT. *Genetika* 45: 929-938.

**Kumar SM & Sahayaraj K** (2012) Gross morphology and histology of head and salivary apparatus of the predatory bug, *Rhynocoris marginatus*. *Journal of Insect Science* 12: 19.

**Lees K, Jones AK, Matsuda K, Akamatsu M, Sattelle DB, Woods DJ & Bowman AS** (2014) Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *International journal for parasitology* 44: 75-81.

**Lockshin RA & Zakeri Z** (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36: 2405-2419.

**Martínez LC, Fialho MCQ, Zanuncio JC & Serrão JE** (2014a) Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535-543.

**Martínez LC, Plata-Rueda A, Zanuncio JC & Serrao JE** (2014b) Comparative Toxicity of Six Insecticides on the Rhinoceros Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Florida Entomologist* 97: 1056-1062.

**Mehlhorn H, Hansen O & Mencke N** (2001) Comparative study on the effects of three insecticides (fipronil, imidacloprid, selamectin) on developmental stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouche 1835): a light and electron microscopic analysis of in vivo and in vitro experiments. *Parasitology research* 87: 198-207.

**Mehlhorn H, Mencke N & Hansen O** (1999) Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light-and electron-microscopy study. *Parasitology research* 85: 625-637.

**Moreno A, Garzo E, Fernandez-Mata G, Kassem M, Aranda M & Fereres A** (2011) Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139: 145-153.

**Nunes MC & Corrêa-Ferreira BS** (2002) Desempenho alimentar e sobrevivência de *Euschistus heros* parasitado por *Hexacladia smithii* em sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1219-1223.

**Nunes PH & Camargo-Mathias MI** (2006) Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Euhemiptera: Cercopidae). *Micron* 37: 57-66.

**Oliveira EE, Pippow A, Salgado VL, Büschges A, Schmidt J & Kloppenburg P** (2010) Cholinergic currents in leg motoneurons of *Carausius morosus*. *Journal of neurophysiology* 103: 2770-2782.

**Oliveira EE, Schleicher S, Büschges A, Schmidt J, Kloppenburg P & Salgado VL** (2011) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system neurons of the stick insect (*Carausius morosus*) by imidacloprid and sulfoximine insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology* 41: 872-880.

**Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM & Malaspina O** (2014) Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental toxicology* 29: 1122-1133.

**Pan Y, Peng T, Gao X, Zhang L, Yang C, Xi J, Xin X, Bi R & Shang Q** (2015) Transcriptomic comparison of thiamethoxam-resistance adaptation in resistant and susceptible strains of *Aphis gossypii* Glover. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 13: 10-15.

**Panizzi A, Bueno A & Silva F** (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. Hoffman-Campo, CB; et al. Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas. Brasília: EMBRAPA: 335-420.

**Peiffer M & Felton GW** (2014) Insights into the saliva of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *PloS one* 9: e88483.

**Pereira C, Oliveira P, Furquim K, Bechara GH & Camargo-Mathias M** (2009) Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology* 166: 124-130.

**Ramzi S, Bandani AR, Zibae A & Kwon O** (2009) Comparison of glutathione S-transferase and general esterase in two bugs, *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera:

- Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de Euschistus heros* Scutelleridae) and *Brachynema germari* Kolenati (Heteroptera: Pentatomidae). Entomological Research 39: 225-232.
- Remedio R, Nunes P, Anholetto L & Camargo-Mathias M** (2014) Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). Microscopy research and technique 77: 989-998.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, Arrigoni EB & Marin-Morales MA** (2003) Little Cicada of Sugarcane *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae). A Brazilian Agricultural Pest. Morpho-histological Study of Salivary Glands. Cytologia 68: 101-114.
- Rossi AC, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P & Malaspina O** (2013a) Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. Archives of environmental contamination and toxicology 65: 234-243.
- Rossi CA, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P & Malaspina O** (2013b) Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Microscopy research and technique 76: 552-558.
- Santos M, Santos R, Tomé H, Barbosa W, Martins G, Guedes R & Oliveira E** (2015) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. Journal of Pest Science: 1-10.
- Silva-Zacarin E, Taboga S & de Moraes RS** (2008) Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Micron 39: 117-127.
- Silva F, Silva J, Depieri R & Panizzi AR** (2012) Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical entomology 41: 386-390.
- Singh GJP & Orchard I** (1982) Is insecticide-induced release of insect neurohormones a secondary effect of hyperactivity of the central nervous system? Pesticide Biochemistry and Physiology 17: 232-242.
- Škerl MIS & Gregorc A** (2010) Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. Apidologie 41: 73-86.
- Snodgrass G, Adamczyk J & Gore J** (2005) Toxicity of insecticides in a glass-vial bioassay to adult brown, green, and southern green stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Journal of economic entomology 98: 177-181.
- Sosa-Gomez DR, Corso IC & Morales L** (2001) Insecticide resistance to Endosulfan, Monocrotophos and Metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). Neotropical entomology 30: 317-320.

**Sosa-Gómez DR & Omoto C** (2012) Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. Hoffman-Campo, CB; et al. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Embrapa.

**Sosa-Gómez DR & Silva JJ** (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 767-769. **Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Lopes ION, Corso IC, Almeida AM, Moraes**

**GCP & Baur ME** (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. Journal of economic entomology 102: 1209-1216.

**Tomizawa M & Casida JE** (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 247-268.

**Vinokurov K, Bednářová A, Tomčala A, Stašková T, Krishnan N & Kodrík D** (2014) Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire bug *Pyrrhocoris apterus* L.(Heteroptera) as a model species. Journal of insect physiology 60: 58-67.

**Will T, Steckbauer K, Hardt M & van Bel AJ** (2012) Aphid gel saliva: sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu. PloS one 7: e46903.

**Willrich M, Leonard B & Cook D** (2003) Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Journal of cotton science.

**Yoshimori T** (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochemical and biophysical research communications 313: 453-458.

**Alterações celulares mediadas por  
imidaclopride no intestino médio de  
*Euschistus heros***

## **Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**

### **Resumo**

O intestino médio dos insetos desempenha um papel importante na digestão de alimento, defesa contra patógenos e substâncias químicas como inseticidas e moléculas de defesa de plantas. Por tanto, alterações celulares no intestino médio são um indicador apropriado do estresse ambiental causado por inseticidas, ainda que o intestino médio não seja o alvo principal destes compostos. O imidaclopride é um inseticida neurotóxico com ação sistêmica, amplamente utilizado no controle do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *E. heros* é hoje uma das pragas sugadoras mais importantes e abundantes da cultura da soja no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças celulares no intestino médio de *E. heros* expostos a concentrações crescentes de imidaclopride, e descrever a anatomia do intestino médio de *E. heros*. Para a descrição anatômica e morfológica, foi dissecado o intestino médio, e analisado por microscopia de luz. Com base nos resultados histológicos obtidos, o intestino médio é um órgão tubular que consiste de quatro regiões anatômicas: primeiro (V1), segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículo (V4), com as regiões V1 e V3 dilatadas e a V4 rodeada com quatro filas de cecos densamente empacotados onde são armazenadas bactérias simbióticas. O epitélio digestivo do intestino médio mostra uma camada simples de células colunares que apresentam núcleos polimórficos e borda estriada bem desenvolvida na superfície apical. Para observar as possíveis alterações morfológicas, machos adultos foram tratados concentrações de imidaclopride correspondentes a CL<sub>5</sub> (3,75 mg i.a./L), CL<sub>50</sub> (112,5 mg i.a./L) e CL<sub>75</sub> (375 mg i.a./L) (água destilada foi usada como controle). O intestino médio desses machos foram dissecados e processados para análises morfológicas por microscopia de luz. As células do intestino médio de insetos tratados apresentaram mudanças morfológicas leves características de células na fase inicial de morte celular por apoptose, como vacuolização citoplasmática e condensação de cromatina. O nível de degeneração celular foi mais

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

pronunciado nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcionais ao incremento da concentração. Adicionalmente, os ventrículos anteriores (V2 e V3) mostraram danos celulares mais severos que os ventrículos posteriores (V4 e cecos gástricos). Conclui-se que a exposição aguda de *E. heros* a concentrações letais de imidaclopride pode induzir morte celular por apoptose no intestino médio.

**Palavras chave:** citomorfologia, toxicologia de inseticidas, neonicotinoide, intestino médio

## Abstract

The insect's midgut plays essential roles in food digestion, defense against pathogens and chemical substances as insecticides and plant defense molecules. Thus, cellular alterations in the midgut are appropriate indicators of environmental stress caused by insecticides, even though these tissues are not the main insecticide targets. Imidacloprid is a neurotoxic insecticide with systemic action, widely used in the control of the neotropical brown stink-bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *E. heros* is actually the most important and abundant sucking pest of soybean fields in Brazil. The objective of this study was evaluate the cytomorphologic alterations of the midgut exposed to different concentrations of imidacloprid (by contact and ingestion), and describe the anatomy and morphology of the midgut of *E. heros*. For the anatomic and morphologic descriptions, the midgut was dissected and analyzed by light microscopy. Based on the histological results, the midgut is a tubular organ that consist of four principal regions: the first ventriculus (V1), the second ventriculus (V2), the third ventriculus (V3) and the fourth ventriculus (V4). The V1 and V3 regions are dilated, and V4 is surrounded with four rows of caeca densely packed storing symbiotic bacteria. The digestive epithelium of the midgut show a single layer of columnar cells presenting polymorphic nucleus and a well-developed brush border in the apical surface. In order to observe the possible morphologic alterations, adults males were treated with three concentrations: LC<sub>5</sub> (3,75 mg a.i./L), LC<sub>50</sub> (112,5 mg a.i./L) and LC<sub>50</sub> (375 mg a.i./L) (distilled water used as a control). The midguts of these males were removed and processed for morphological analyses using light microscopy. The cells

of the midgut from exposed insect showed slight morphological changes characteristic of the initial phase of cell death by apoptosis, like cytoplasm vacuolization and chromatin condensation. The cell degeneration intensity was greater in lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>75</sub>), showing a gradual increment of cellular alterations proportional to concentration increment. In addition, the intensity of cell degeneration were related with the region of the midgut, the anterior ventricles (V2 and V3) show more severe cell damage while the posterior ventricles (V4 and gastric caeca) show slight cell alterations. Therefore, the acute exposure to lethal concentrations of imidacloprid can induce cell death by apoptose in the midgut of *E. heros*.

**Key words:** cytomorphology, insecticide toxicology, neonicotinoids, midgut

## 1. Introdução

O trato digestivo dos insetos é dividido em intestino anterior, médio e posterior (Guedes et al., 2007). O intestino médio dos insetos é funcionalmente a parte mais importante do trato digestivo, participando ativamente da digestão final dos alimentos e absorção de nutrientes (Habes et al., 2006; Habibi et al., 2008; Zhu et al., 2011). No intestino médio são produzidas e secretadas grande parte das enzimas digestivas, incluindo amilases, carboxilases, invertases, lipases, maltases e proteases (Zhu et al., 2011).

O trato digestivo dos insetos representa a entrada de alimento, mas também microrganismos patogênicos e substâncias químicas como inseticidas ou toxinas de plantas podem entrar por este órgão (Pauchet et al., 2010; Salvador et al., 2014; Xu et al., 2014). Como forma de proteção contra alimentos contaminados, o intestino médio também produz grande variedade de enzimas detoxificativas (Salvador et al., 2014; Zhu et al., 2011). A degradação metabólica de inseticidas no intestino médio e a penetração reduzida de inseticidas através da parede do intestino médio podem ser razões para a toxicidade diferencial e resistência a inseticidas (Zhu et al., 2011). Por tanto, alterações celulares no intestino médio são um indicador apropriado do estresse ambiental causado por inseticidas (Wu et al., 2009).

O imidaclopride é um dos inseticidas amplamente utilizados no mercado mundial e no

Brasil desde sua introdução ao mercado em 1991, por sua alta eficácia contra grande variedade de insetos-praga e moderada toxicidade a vertebrados (Benzidane et al., 2011; Pan et al., 2015; Rossi et al., 2013). O imidaclopride é um inseticida com ação sistêmica, que interfere com a transmissão de impulsos nervosos em insetos, pela ligação irreversível e específica aos receptores nicotínicos de acetilcolina (Lees et al., 2014; Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Tomizawa & Casida, 2005). A ligação específica causa a abertura do canal e despolarização contínua dos neurônios pós-sinápticos, resultando em paralisia e morte (Hatjina et al., 2013; Kalajdžić et al., 2013). Neonicotinoides, por exemplo, são atualmente os inseticidas mais comumente utilizados no controle do percevejo-marrom *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) (Santos et al., 2005; Sosa-Gómez & Silva, 2010; Sosa-Gómez et al., 2009). *E. heros* é hoje uma das pragas sugadoras mais importantes e abundantes da cultura da soja no Brasil, particularmente nas regiões mais quentes, que vão desde o Centro-Oeste Brasileiro ao norte do estado do Paraná (Azambuja et al., 2013; Panizzi et al., 2012).

Em vista dos fatos acima delineados, o objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças celulares no intestino médio de *E. heros* expostos a concentrações crescentes de imidaclopride. Adicionalmente, descrever a anatomia do intestino médio de *E. heros*.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos**

Adultos de *E. heros* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), mantidos a  $27 \pm 2$  °C,  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa, e fotoperíodo de 14:10 h luz:escuro. Os insetos foram alimentados *ad libitum* com vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos de soja, amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Fabaceae) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (Asteraceae) (Borges et al., 2006).

## **2.2. Anatomia e morfologia do intestino médio**

Adultos de *E. heros* foram crioanestesiados a  $-4^{\circ}\text{C}$  e o intestino médio dissecado em solução salina para insetos e transferido para a solução fixadora de Zamboni por 24 h à  $5^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram posteriormente desidratadas em séries crescentes de etanol ( $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $90^{\circ}$  e  $95^{\circ}$ ) e embebidas em historresina JB4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Seções de  $3\ \mu\text{m}$  de espessura, obtidas com navalha de vidro em micrótomo Leica RM2255, foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio de luz Leica DMLS.

## **2.3. Efeitos do imidaclopride nas células do intestino médio**

As concentrações utilizadas para avaliar as alterações morfológicas, foram baseadas na curva de concentração-mortalidade do capítulo “Alterações celulares mediadas por imidaclopride nas glândulas salivares de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)”. Sendo utilizadas as concentrações correspondentes a  $\text{CL}_5$  (3,75 mg i.a./L),  $\text{CL}_{50}$  (112,50 mg i.a./L) e  $\text{CL}_{75}$  (375,00 mg i.a./L).

A exposição ao inseticida foi adaptada de estudos toxicológicos de *E. heros* realizados com frascos de vidro combinando efeitos por contato e ingestão (Santos et al., 2015; Snodgrass et al., 2005; Willrich et al., 2003). O inseticida neonicotinoide imidaclopride (grânulos com 700 g de ingrediente ativo (i.a.)/kg; Bayer, São Paulo, SP, Brasil) foi dissolvido em água (destilada e deionizada) para formar uma solução estoque, preparando as três concentrações escolhidas (3,75, 112,5 e 375 mg i.a./L). No tratamento controle foi utilizada água destilada e deionizada. A superfície interna dos frascos de vidro transparentes de 250 mL foi coberta com o inseticida, pipetando 2 mL da concentração do inseticida dentro dos frascos, posteriormente os frascos foram secos utilizando um rotor (Rota-Torque modelo 7637, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). O efeito da ingestão do inseticida foi simulado com pedaços de vagem de feijão de 5 cm, lavados com detergente e imersos por três segundos em frascos de vidro com diferentes concentrações de imidaclopride, em seguida foram secos em uma capela. No interior do frasco foi colocado um pedaço de vagem tratada. Oito repetições foram feitas para cada concentração, cada uma com 5

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros* adultos recém emergidos (menos de 24 h) com jejum de 24 h. A parte superior interna de cada frasco foi coberta com teflon PTFE (DuPont, Wilmington, DE, USA) e fechado com tecido voil e um elástico para evitar a fuga dos insetos. Dos insetos sobreviventes de cada tratamento foram selecionados quatro indivíduos para dissecação do intestino médio.

Adultos de *E. heros* expostos à água (controle) e às concentrações CL<sub>5</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub> foram crioadestesiados a -4 ° C, e o intestino médio dissecado em solução salina para insetos. O intestino médio foi dividido em três regiões anatômicas que podem ser identificadas: segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículo (V4). Posteriormente, os tecidos foram processados para microscopia de luz utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente (Anatomia e morfologia do intestino médio).

### **3. Resultados**

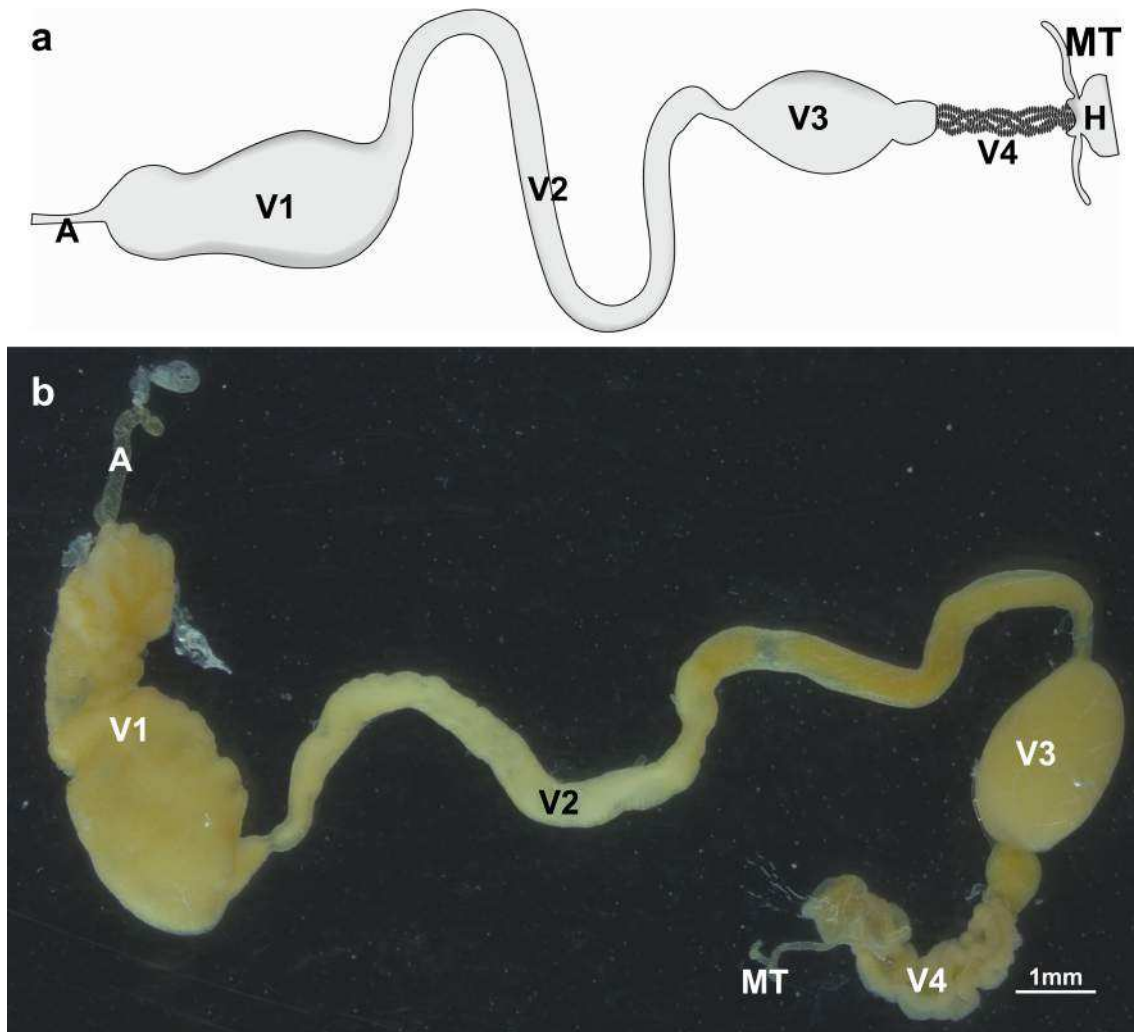
#### **3.1. Anatomia e morfologia do intestino médio**

Anatomicamente, o intestino médio de *E. heros* apresenta quatro regiões anatômicas: primeiro (V1), segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículo (V4) (Fig. 1a 1b). A região V1 é a maior parte do canal alimentar de *E. heros*, com forma de saco, ocupando grande parte do abdômen e com grande capacidade de distensão durante a alimentação. A região V2 apresenta-se como um tubo fino, contorcido e relativamente longo. A região V4 é dilatada, assumindo uma estrutura em forma de saco mais dilatada e curta que V2. A região V4 do intestino médio é a mais curta e está formada por quatro linhas longitudinais fundidas em forma de fita enrolada. O limite entre o intestino médio e o intestino posterior é identificado pela inserção dos túbulos de Malpighi (Fig. 1b).

A parede do intestino médio das regiões V2, V3 e V4 é formada por um epitélio simples sobre uma membrana basal fina, revestida externamente por células musculares organizadas em uma túnica circular interna e outra longitudinal externa (Fig. 2a, 3a, 4a).

Os principais tipos celulares observados no epitélio do intestino médio foram as células digestivas e regenerativas. As células digestivas eram colunares, com borda estriada bem desenvolvida, núcleo localizado na porção mediana com cromatina em diferentes graus de condensação (Fig. 2a, 3a, 4a). As células regenerativas estão organizadas em ninhos

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*  
espalhados entre a base das células digestivas e são caracterizadas por citoplasma escasso e núcleo bem desenvolvido (Fig. 3a).



**Figura 1** Intestino médio de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae): **a)** Desenho esquemático do trato digestivo evidenciando suas divisões. Intestino anterior (A), ventrículo 1 do intestino médio (V1), ventrículo 2 do intestino médio (V2), ventrículo 3 do intestino médio (V3), ventrículo 4 do intestino médio (V4), intestino posterior (H) e túbulos de Malpighi (MT). desenho fora de escala. **b)** Micrografia da visão geral do intestino médio.

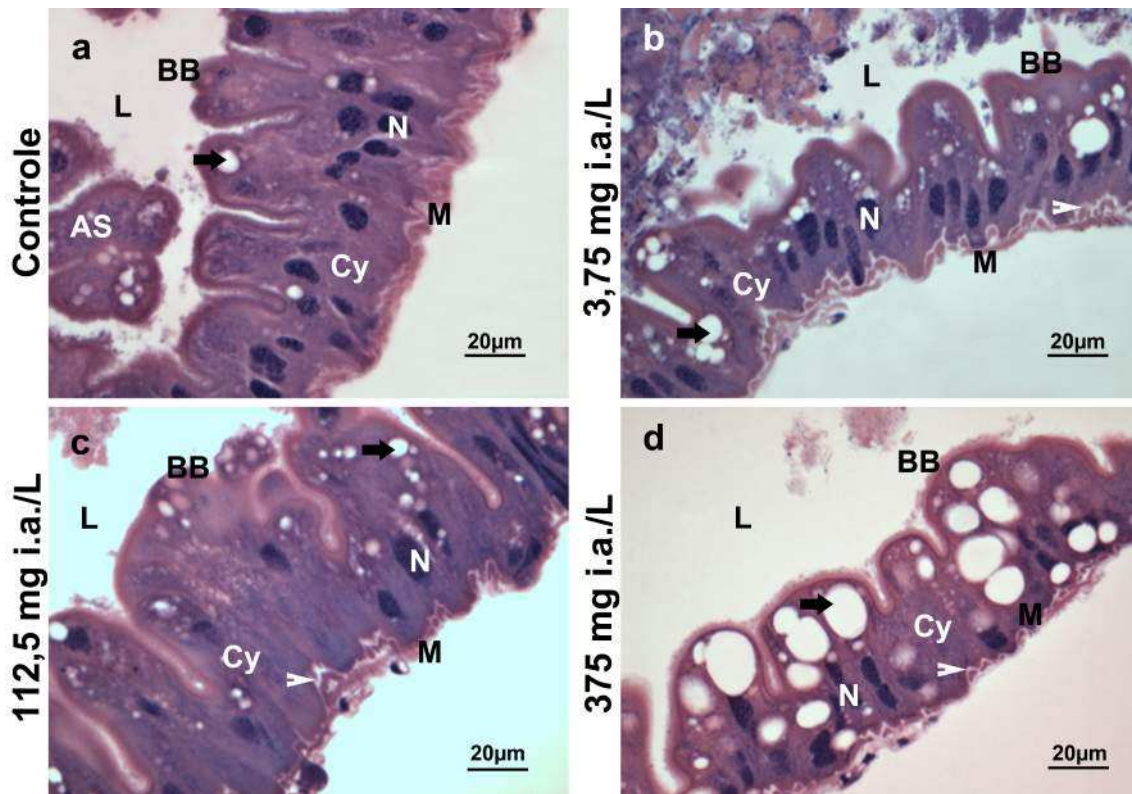
### **3.2. Efeitos de imidaclopride nas células do intestino médio**

#### **3.2.1. Ventrículo 2 do intestino médio**

O epitélio digestivo do V2 do intestino médio de *E. heros* não tratado com imidaclopride foi pregueado, com células colunares altas que apresentaram porção apical com borda

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

estriada e citoplasma vacuolizado, com muitas vesículas pouco coradas e pequenos grânulos corados (Fig. 2a). O núcleo variou de esférico a ligeiramente alongado, ocupando a porção mediano-basal das células, com cromatina predominantemente descondensada. Em alguns pontos, a superfície apical foi irregular, com projeções do citoplasma em direção ao lúmen e com secreção apócrina.



**Figura 2** Região V2 do intestino médio de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** V2 de indivíduos não expostos mostrando a morfologia típica, o epitélio colunar e o lúmen (L). As células digestivas possuem núcleos esféricos na porção mediana-basal (N). A porção apical do citoplasma (Cy) com a porção apical com borda estriada (BB), grande quantidade de vesículas (seta) e secreção apócrina (AS). O epitélio está revestido externamente por células musculares (M). **b)** Em V2 de indivíduos tratados com 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>), o epitélio apresentou um incremento do número e tamanho das vesículas citoplasmáticas (seta), e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal (ponta da seta). **c)** V2 de indivíduos tratados com 112,5 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>), mostrando vacuolização citoplasmática (seta), e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal (seta). **d)** V2 de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), apresentando vacuolização citoplasmática intensa (seta) e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal (ponta da seta).

As células digestivas do V2 de indivíduos de *E. heros* expostos a 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>) exibiram maior quantidade e tamanho de vacúolos

### *Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

na porção apical e aumento do espaço entre o epitélio e a membrana basal (Fig. 2b).

Alterações similares, porém mais intensas, foram observadas nas células digestivas do V2 de insetos tratados com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>) e 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>, dose de campo) (Fig. 2c e 2d). Na CL<sub>75</sub> a vacuolização citoplasmática foi severa, caracterizada por vacúolos grandes que ocupam grande parte do volume celular (Fig. 2d).

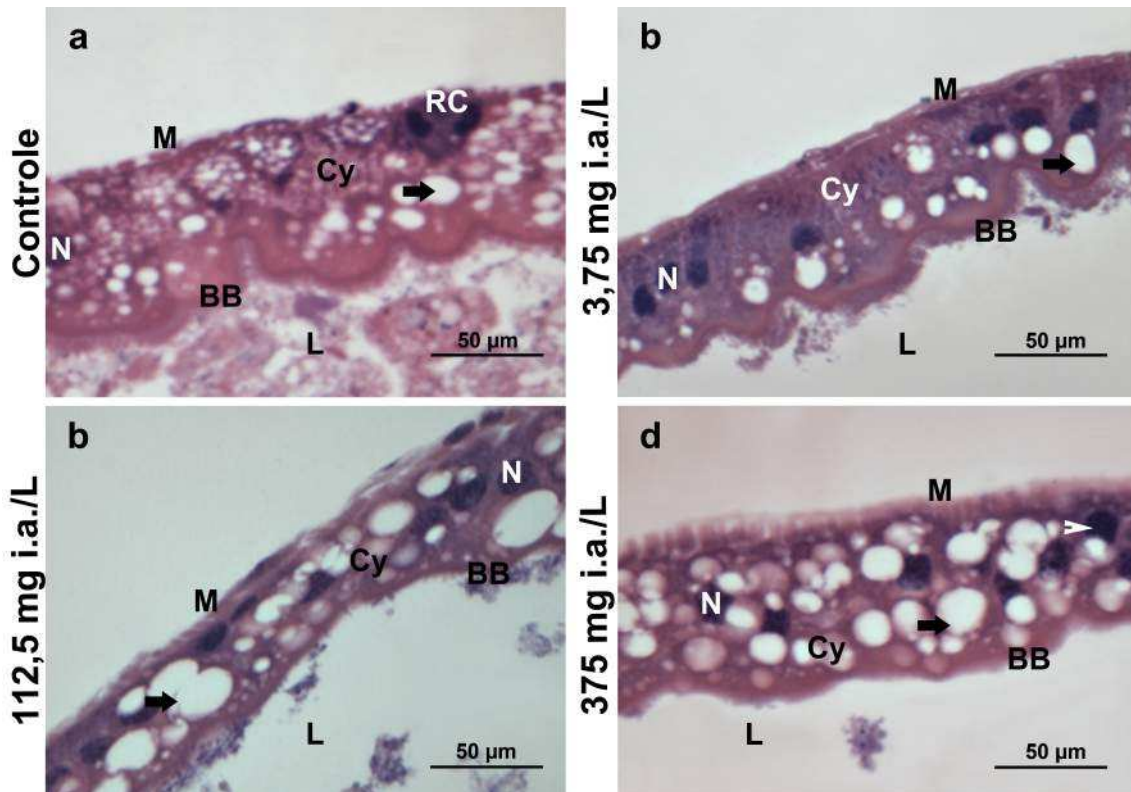
#### **3.2.2. Ventrículo 3 do intestino médio**

As células da região V3 do intestino médio mostraram citoplasma com vacúolos de coloração clara e tamanho de pequeno a mediano (Fig. 3a). A forma da célula variou de cúbica a colunar, de acordo com a distensão do epitélio. A superfície apical foi mais regular que nas células do V2 e com borda estriada. O núcleo foi esférico na porção mediana da célula e com cromatina descondensada.

Os indivíduos de *E. heros* expostos a 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>) mostraram células digestivas do V3 com coloração mais basófila (Fig. 3b) e vacuolização citoplasmática na porção apical.

De forma similar ao tratamento anterior, nos insetos tratados com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>) as células apresentaram coloração mais basófila e vacuolização citoplasmática na porção apical (Fig. 3c).

Efeitos parecidos foram observados no V3 de insetos tratados com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>) (Fig. 3d). Adicionalmente, a CL<sub>75</sub> induz compactação da cromatina e porções irregulares no núcleo.



**Figura 3** Região V3 do intestino médio de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** V3 de indivíduos não expostos mostrando a morfologia típica, o epitélio colunar e o lúmen (L). As células digestivas possuem núcleos esféricos na porção mediana (N). A porção apical do citoplasma (Cy) com borda estriada (BB) e grande quantidade de vesículas (seta). O epitélio está revestido externamente por células musculares (M). Células regenerativas organizadas em ninhos (RC). **b)** V3 de indivíduos tratados com 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>), o epitélio apresentou um incremento do tamanho das vesículas citoplasmáticas (seta), e coloração do citoplasma mais intensa em relação aos indivíduos não tratados. **c)** V3 de indivíduos tratados com 112,5 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>), mostrando vacuolização citoplasmática na porção apical e basal (seta), e coloração do citoplasma mais intensa em comparação com os indivíduos não tratados. **d)** V3 de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), apresentando vacuolização citoplasmática intensa (seta), compactação da cromatina nuclear (ponta da seta) e regiões irregulares no núcleo (N).

### 3.2.3. Ventrículo 4 do intestino médio

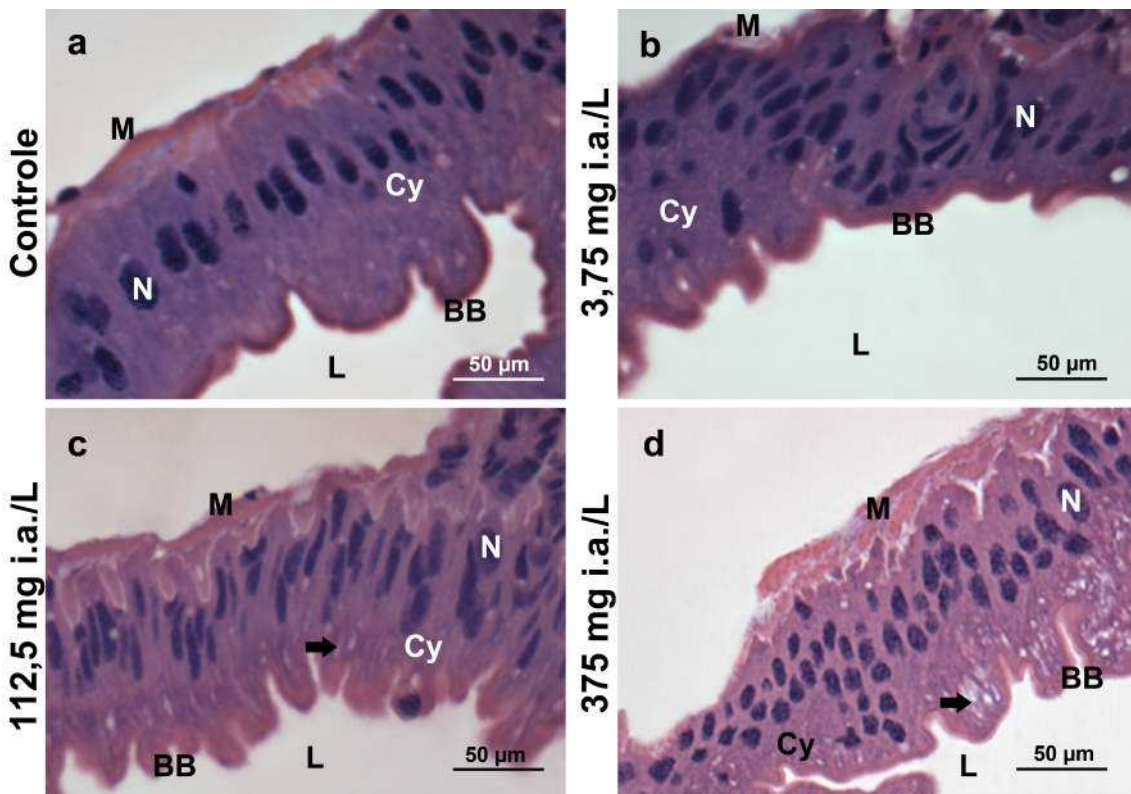
O epitélio da região V4 do intestino médio é muito pregueado, com células colunares altas, com citoplasma denso e pouco vacuolizado (Fig. 4a). A porção apical é irregular, com projeções do citoplasma em direção ao lúmen, com grânulos claros e borda estriada. O núcleo varia de esférico a ligeiramente alongado, com cromatina pouco condensada.

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

As células digestivas do V4 do intestino médio de indivíduos expostos a 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>) não mostraram modificações morfológicas comparadas com indivíduos não expostos (Fig. 4b).

Porém, as células digestivas do V4 do intestino médio quando tratadas com 112,50 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>) exibiram um aumento do número dos vacúolos da região apical (Fig. 4c).

A vacuolização citoplasmática foi mais evidente em indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), evidenciada por um incremento do número de vacúolos (Fig. 4d).

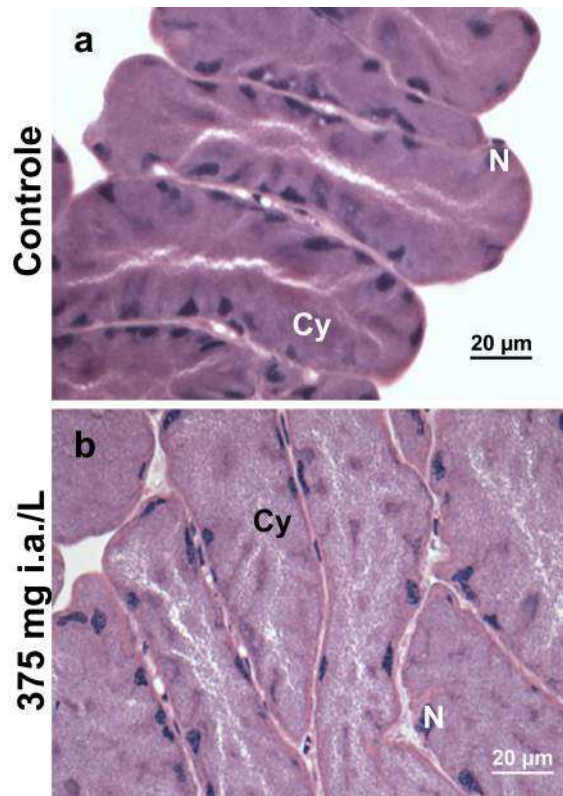


**Figura 4** Região V4 do intestino médio de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** V4 de indivíduos não expostos mostrando a morfologia típica, o epitélio colunar e o lúmen (L). As células digestivas possuem núcleos esféricos ou ligeiramente alongado na porção mediana (N). A porção apical do citoplasma (Cy) com borda estriada (BB) e pouco vacuolizado. O epitélio está revestido externamente por células musculares (M). **b)** V4 de indivíduos tratados com 3,75 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>5</sub>), apresentando morfologia similar aos indivíduos não expostos. **c)** V4 de indivíduos tratados com 112,5 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>50</sub>), mostrando o início da vacuolização citoplasmática na porção apical (seta). **d)** V4 de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), apresentando vacuolização citoplasmática (seta).

#### 3.2.4. Cecos gástricos do intestino médio

O epitélio do V4 do intestino médio mostrou múltiplos sacos tubulares curtos formando cecos gástricos, dispostos perpendicularmente ao lúmen. As células do ceco foram cúbicas, com citoplasma rico grânulos bem corados, núcleo basal e achatado com cromatina pouco condensada (Fig. 5a). Além disso, o lúmen do ceco estava conectado com o lúmen principal do V4 por uma camada simples de células cúbicas, com citoplasma pouco abundante e núcleo esférico com cromatina condensada.

As células dos cecos gástricos não mostraram alterações morfológicas em nenhuma das concentrações testadas [CL<sub>5</sub> (3,75 mg i.a./L), CL<sub>50</sub> (112,5 mg i.a./L) e CL<sub>75</sub> (375 mg i.a./L)] (Fig. 5b).



**Figura 5** Cecos gástricos do V4 do intestino médio de *Euschistus heros* após a exposição de uma hora a imidaclopride por contato e ingestão. **a)** Cecos gástricos do V4 de indivíduos não expostos mostrando a morfologia típica, citoplasma com numerosos grânulos bem corados (Cy) e núcleo achatado na região basal (N). **b)** Cecos gástricos do V4 de indivíduos tratados com 375 mg i.a./L de imidaclopride (correspondente à CL<sub>75</sub>), apresentando morfologia similar aos indivíduos não expostos.

## 4. Discussão

A exposição por contato e ingestão a concentrações crescentes de imidaclopride causa mudanças celulares no intestino médio do percevejo marrom da soja *E. heros*. As mudanças celulares induzidas por imidaclopride são características de processos de degeneração celular, tais como vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina, condensação citoplasmática, e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal. A degeneração celular foi mais intensa na região anterior do intestino médio (V2 e V3) que na região posterior (V4 e cecos gástricos). Adicionalmente, as alterações celulares em termos de características degenerativas foram dependentes da concentração de imidaclopride.

### **Anatomia e morfologia do intestino médio**

O intestino médio de *E. heros* é um órgão tubular que consiste de quatro regiões anatômicas: primeiro (V1), segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículo (V4), com as regiões V1 e V3 dilatadas e a V4 rodeada com quatro filas de cecos densamente empacotados. Essa organização do intestino médio é similar a outros pentatomídeos fitófagos das subfamílias Pentatominae, Edessinae e Discocephalinae (Bistolas et al., 2014; Glasgow, 1914). Como por exemplo, *Halyomorpha halys* Stål (Bansal et al., 2014), *Nezara viridula* Linnaeus (Hirose et al., 2006; Tada et al., 2011), *Eurydema rugosa* Motschulsky e *Eurydema dominulus* Scopoli (Kikuchi et al., 2012b). Entretanto, há diversidade morfológica dentre os Pentatomidae, provavelmente pelos diferentes hábitos alimentares como fitófagos, zoófagos, zoofitófagos, fitozoófagos (Martínez et al., 2014; Miles, 1972). Os pentatomídeos predadores da subfamília Asopinae como *Podisus nigrispinus* Dallas (Cunha et al., 2012; Fialho et al., 2012), *Podisus maculiventris* Say (Glasgow, 1914) e *Brontocoris tabidus* Signoret (Fialho et al., 2009; Guedes et al., 2007) possuem V4 muito reduzido e não apresentam os cecos gástricos associados.

Os cecos do V4 do intestino médio dos Pentatomidae sugadores de plantas contêm uma densa população de bactérias simbióticas específicas (Bistolas et al., 2014; Hirose et al., 2006; Zucchi et al., 2012). Bactérias dos gêneros *Erwinia* e *Pantoea* foram associadas com outras espécies do gênero *Euschistus* (Bistolas et al., 2014; Prado & Almeida, 2009).

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

Embora, a posição filogenética e o possível papel das bactérias nos cecos gástricos de *E. heros* ainda não foram elucidados.

Por outro lado, a histologia do intestino médio de *E. heros* de camada simples de células colunares que apresentam núcleos polimórficos e borda estriada bem desenvolvida na superfície apical, é similar a outros Pentatomorpha, como *P. nigrispinus* (Cunha et al., 2012; Fialho et al., 2012), *B. tabidus* (Fialho et al., 2009; Guedes et al., 2007), *Dysdercus peruvianus* Guerin-meneville (Pyrrhocoridae) (Damasceno-Sá & Silva, 2007; Silva et al., 1995), *Eurygaster integriceps* Puton (Scutelleridae) (Mehrabadi et al., 2012) e *Mezira granulata* Say (Aradidae) (Nardi et al., 2009).

### **Morfofisiologia de ação do imidaclopride no intestino médio**

O imidaclopride induz mudanças estruturais no V2, V3 e V4 do intestino médio de *E. heros* nas diferentes concentrações testadas. Em geral, as células do epitélio digestivo do intestino médio apresentam vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina e do citoplasma, e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal. Estas características degenerativas no intestino médio foram também descritas em *Apis mellifera* em resposta à exposição a imidaclopride ou outros neonicotinoides (Catae et al., 2014; Forkpah et al., 2014; Gregorc & Ellis, 2011; Oliveira et al., 2014). Adicionalmente, danos similares no epitélio do intestino médio têm sido reportados por exposição aguda a outros neurotóxicos como ácido bórico, clorpirifos, fluvalinate, coumafos, fipronil, malathion, deltametrina, fenitrothion (Cruz et al., 2010; Forkpah et al., 2014; Gregorc & Ellis, 2011; Habes et al., 2006; Klotz et al., 2002; Ouali-N'goran et al., 2013).

O nível de degeneração celular no intestino médio foi dependente da concentração do imidaclopride, com aumento gradual das mudanças celulares proporcionais ao incremento da concentração deste composto. Possivelmente, os mecanismos intracelulares que conduzem ao dano celular no intestino requerem concentrações altas de imidaclopride (Benzidane et al., 2011).

Na concentração correspondente à CL<sub>5</sub>, as modificações celulares foram leves ou ausentes. As células do V2 mostraram o início da vacuolização citoplasmática, alargamento do

espaço entre o epitélio e a membrana basal. No V3 foi observado o início da vacuolização citoplasmática e coloração por hematoxilina e eosina mais intensa. A vacuolização citoplasmática e o alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal observados no intestino médio de *E. heros* sugere que a célula está na fase inicial de morte celular em resposta ao estresse químico (Häcker, 2000; Lockshin & Zakeri, 2004; Silva-Zacarin et al., 2008), que inclui processos como degradação autofágica dos componentes celulares danificados (Clarke, 1990; Lockshin & Zakeri, 2004; Remedio et al., 2014). A coloração mais intensa pode indicar a presença de células condensadas e a ocorrência de morte celular por apoptose (Bowen et al., 1996; Oliveira et al., 2014; Rossi et al., 2013), ou ainda pode ocorrer em decorrência da acumulação de substâncias no citoplasma da célula.

Nas concentrações correspondentes CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub> as mudanças celulares foram mais evidentes. De forma similar à CL<sub>5</sub>, as maiores concentrações (CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>) induziram vacuolização citoplasmática e alargamento do espaço entre o epitélio e a membrana basal no V2, e vacuolização e condensação citoplasmática no V3. No V4, a CL<sub>50</sub> provocou o início da vacuolização citoplasmática, que se intensificou com a CL<sub>75</sub>. Adicionalmente, no V3 a CL<sub>75</sub> induz compactação da cromatina e porções irregulares no núcleo. Estes fenômenos nucleares podem indicar que as células têm uma baixa atividade transcricional, que ocorre durante as fases avançadas de morte celular (Cruz et al., 2010; Häcker, 2000; Silva-Zacarin et al., 2008). Alternativamente, a condensação da cromatina pode refletir a presença de células autofágicas ou apoptóticas, nas quais as endonucleases não causam fragmentação do DNA (Rossi et al., 2013). Estas alterações em conjunto indicam que o epitélio do intestino médio sofre danos que comprometem a produção de proteínas, e deste modo altera a fisiologia das células (Catae et al., 2014).

As diferenças nas respostas celulares causadas por imidaclopride nas diferentes regiões do intestino médio estão influenciadas principalmente pela localização no canal alimentar. As regiões mais próximas (V2 e V3) mostraram danos celulares mais severos provavelmente porque entram em contato com o alimento contaminado nas primeiras etapas da digestão (Catae et al., 2014; Mansour et al., 2012; Oliveira et al., 2014). Adicionalmente, os diferentes ventrículos do intestino médio possuem diferenças histológicas relacionadas com processos digestivos, de absorção e secreção distintos (Damasceno-Sá & Silva, 2007; Fialho et al., 2009; Silva-Olivares et al., 2003). O V2 está encarregado da absorção de

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros* aminoácidos, lipídios e alguns íons, o V3 possui funções similares às de V2 e no V4 ocorre a secreção de enzimas digestivas (Azevedo et al., 2009; Damasceno-Sá & Silva, 2007; Fialho et al., 2009). Consequentemente, o imidaclopride altera principalmente a absorção dos principais nutrientes.

As menores alterações no V4 podem ser atribuídas à secreção de enzimas nesta região (Fialho et al., 2009). Pois o intestino médio produz uma variedade de enzimas detoxificativas que desempenham um papel importante na metabolização de pesticidas (Enayati et al., 2005; Yang et al., 2006; Zhu et al., 2011).

Os cecos gástricos não mostram alterações morfológicas em resposta à exposição ao imidaclopride, possivelmente porque são estruturas frouxamente conectadas com o canal digestivo central (Bansal et al., 2014; Bistolas et al., 2014; Kuechler et al., 2011). Além disso, as bactérias no interior dos cecos gástricos podem produzir enzimas que metabolizam o inseticida (Kikuchi et al., 2012a; Werren, 2012; Xia et al., 2013).

Danos aos tecidos do intestino médio *E. heros* sugerem que o imidaclopride causa morte celular por apoptose. Visto que não foram observadas alterações celulares típicas da necrose como dilatação das organelas e ruptura da membrana plasmática (Bowen et al., 1996; Benzidiane et al., 2011; Gregorc & Ellis, 2011). Esta hipótese é suportada pelo fato de que abelhas tratadas com imidaclopride mostram elevadas taxas de morte celular por apoptose no intestino médio (Gregorc & Ellis, 2011; Forkpah et al., 2014).

Em conclusão, exposição aguda de *E. heros* a doses letais de imidaclopride pode induzir morte celular por apoptose no intestino médio, principalmente nas regiões anteriores (V2 e V3). O nível de degeneração celular foi mais pronunciado nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcionais ao incremento da concentração.

## 5. Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Núcleo de Microscopia e

## 6. Bibliografia

- Azambuja R, Degrande P & Pereira F** (2013) Comparative biology of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. *Neotropical entomology* 42: 359-365.
- Azevedo DO, Neves CA, dos Santos Mallet JR, Gonçalves TCM, Zanuncio JC & Serrão JE** (2009) Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology* 46: 435-441.
- Bansal R, Michel AP & Sabree ZL** (2014) The crypt-dwelling primary bacterial symbiont of the polyphagous pentatomid pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental entomology* 43: 617-625.
- Benzidane Y, Lapied B & Thany SH** (2011) Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 191-197.
- Bistolas KS, Sakamoto RI, Fernandes JA & Goffredi SK** (2014) Symbiont polyphyly, co-evolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. *Frontiers in microbiology* 5.
- Borges M, Laumann R, Silva C, Moraes M, Santos H & Ribeiro D** (2006) Metodologias de criação e manejo de colônias de percevejos da soja (Hemiptera-pentatomidae) para estudos de comportamento e ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos.
- Bowen ID, Mullarkey K & Morgan S** (1996) Programmed cell death during metamorphosis in the blow-fly *Calliphora vomitoria*. *Microscopy research and technique* 34: 202-217.
- Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Ferreira Nocelli RC & Malaspina O** (2014) Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy research and technique* 77: 274-281.
- Clarke PG** (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology* 181: 195-213.
- Cruz SA, Silva-Zacarin EC, Bueno OC & Malaspina O** (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell biology and toxicology* 26: 165-176.

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

**Cunha FM, Caetano FH, Wanderley-Teixeira V, Torres JB, Teixeira ÁA & Alves LC** (2012) Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on bt-cotton. *Micron* 43: 245-250.

**Damasceno-Sá J & Silva J** (2007) Evolução e aspectos do sistema digestório em Hemiptera. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 32-40.

**Enayati AA, Ranson H & Hemingway J** (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect molecular biology* 14: 3-8.

**Fialho MC, Moreira NR, Zanuncio JC, Ribeiro AF, Terra WR & Serrão JE** (2012) Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of insect physiology* 58: 850-856.

**Fialho MdCQ, Zanuncio JC, Neves CA, Ramalho FS & Serrão JE** (2009) Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Annals of the Entomological Society of America* 102: 119-127.

**Forkpah C, Dixon LR, Fahrbach SE & Rueppell O** (2014) Xenobiotic effects on intestinal stem cell proliferation in adult honey bee (*Apis mellifera* L) workers. *PloS one* 9: e91180.

**Glasgow H** (1914) The gastric caeca and the caecal bacteria of the Heteroptera. *The Biological Bulletin* 26: 101-[170]-101.

**Gregorc A & Ellis JD** (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 200-207.

**Guedes BA, Zanuncio JC, Ramalho FS & Serrão JE** (2007) Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863)(Heteroptera: Pentatomidae). *The Pan-Pacific Entomologist* 83: 66-74.

**Habes D, Morakchi S, Aribi N, Farine J-P & Soltani N** (2006) Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84: 17-24.

**Habibi J, Coudron T, Backus E, Brandt S, Wagner R, Wright M & Huesing J** (2008) Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae). *Annals of the Entomological Society of America* 101: 159-171.

**Häcker G** (2000) The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301: 5-17.

**Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C & Arnold G** (2013) Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44: 467-480.

- Hirose E, Panizzi AR, De Souza JT, Cattelan AJ & Aldrich JR** (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 99: 91-95.
- Kalajdžić P, Oehler S, Markaki M & Savakis C** (2013) Toxicology and cytogenetic analysis of a *Drosophila melanogaster* mutant resistant to Imidacloprid and DDT. *Genetika* 45: 929-938.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K & Fukatsu T** (2012a) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 8618-8622.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N & Fukatsu T** (2012b) Gut symbiotic bacteria in the cabbage bugs *Eurydema rugosa* and *Eurydema dominulus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied entomology and zoology* 47: 1-8.
- Klotz JH, Amrhein C, McDaniel S, Rust MK & Reiersen DA** (2002) Assimilation and toxicity of boron in the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Entomological Science* 37: 193-199.
- Kuechler SM, Dettner K & Kehl S** (2011) Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). *Applied and environmental microbiology* 77: 2869-2876.
- Lees K, Jones AK, Matsuda K, Akamatsu M, Sattelle DB, Woods DJ & Bowman AS** (2014) Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *International journal for parasitology* 44: 75-81.
- Lockshin RA & Zakeri Z** (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36: 2405-2419.
- Mansour EE, Mi F, Zhang G, Jiugao X, Wang Y & Kargbo A** (2012) Effect of allylisothiocyanate on *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum* and *Plodia interpunctella*: Toxicity and effect on insect mitochondria. *Crop Protection* 33: 40-51.
- Martínez LC, Fialho MCQ, Zanuncio JC & Serrão JE** (2014) Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma* 251: 535-543.
- Mehrabadi M, Bandani AR, Allahyari M & Serrão JE** (2012) The Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) digestive tract: Histology, ultrastructure and its physiological significance. *Micron* 43: 631-637.
- Miles PW** (1972) Saliva of Hemiptera. *Advances in insect physiology* 9: 183-255.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA & Taylor SJ** (2009) Distinctive features of the alimentary canal of a fungus-feeding hemipteran, *Mezira granulata* (Heteroptera: Aradidae). *Arthropod structure & development* 38: 206-215.

- Oliveira EE, Pippow A, Salgado VL, Büschges A, Schmidt J & Kloppenburg P** (2010) Cholinergic currents in leg motoneurons of *Carausius morosus*. *Journal of neurophysiology* 103: 2770-2782.
- Oliveira EE, Schleicher S, Büschges A, Schmidt J, Kloppenburg P & Salgado VL** (2011) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system neurons of the stick insect (*Carausius morosus*) by imidacloprid and sulfoximine insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology* 41: 872-880.
- Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM & Malaspina O** (2014) Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental toxicology* 29: 1122-1133.
- Ouali-N'goran S-WM, Koua KH, Tano Y & Glitho AI** (2013) Effects of sub-lethal doses of fenitrothion on the microscopic structure of the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775; Orthoptera, Acrididae). *Journal of Biological and Food Science Research* 2: 79-84.
- Pan Y, Peng T, Gao X, Zhang L, Yang C, Xi J, Xin X, Bi R & Shang Q** (2015) Transcriptomic comparison of thiamethoxam-resistance adaptation in resistant and susceptible strains of *Aphis gossypii* Glover. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 13: 10-15.
- Panizzi A, Bueno A & Silva F** (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. Hoffman-Campo, CB; et al. Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas. Brasília: EMBRAPA: 335-420.
- Pauchet Y, Wilkinson P, Vogel H, Nelson D, Reynolds S, Heckel DG & Ffrench-Constant R** (2010) Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect molecular biology* 19: 61-75.
- Prado SS & Almeida RP** (2009) Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts. *Current microbiology* 58: 64-69.
- Remedio R, Nunes P, Anholetto L & Camargo-Mathias M** (2014) Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). *Microscopy research and technique* 77: 989-998.
- Rossi AC, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P & Malaspina O** (2013) Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. *Archives of environmental contamination and toxicology* 65: 234-243.
- Salvador R, Príncipi D, Berretta M, Fernández P, Paniego N, Sciocco-Cap A & Hopp E** (2014) Transcriptomic Survey of the Midgut of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Science* 14: 219.

**Santos CA, Costa-Leonardo AM & Serrao JE** (2005) Morphology of the head and frontal gland in Neotropical Nasutitermitinae (Isoptera, Termitidae). *Sociobiology* 46: 579-593.

**Santos M, Santos R, Tomé H, Barbosa W, Martins G, Guedes R & Oliveira E** (2015) Imidacloprid-mediated effects on survival and fertility of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *Journal of Pest Science*: 1-10.

**Silva-Olivares A, Díaz E, Shibayama M, Tsutsumi V, Cisneros R & Zúñiga G** (2003) Ultrastructural study of the midgut and hindgut in eight species of the genus *Dendroctonus Erichson* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society of America* 96: 883-900.

**Silva-Zacarin E, Taboga S & de Moraes RS** (2008) Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Micron* 39: 117-127.

**Silva CP, Ribeiro AF, Gulbenkian S & Terra WR** (1995) Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of insect physiology* 41: 1093-1103.

**Snodgrass G, Adamczyk J & Gore J** (2005) Toxicity of insecticides in a glass-vial bioassay to adult brown, green, and southern green stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of economic entomology* 98: 177-181.

**Sosa-Gómez DR & Silva JJ** (2010) Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 767-769.

**Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Lopes ION, Corso IC, Almeida AM, Moraes GCP & Baur ME** (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of economic entomology* 102: 1209-1216.

**Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, Musolin DL, Fujisaki K & Fukatsu T** (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied entomology and zoology* 46: 483-488.

**Tomizawa M & Casida JE** (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 247-268. Werren JH (2012) Symbionts provide pesticide detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 8364-8365.

**Willrich M, Leonard B & Cook D** (2003) Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of cotton science*.

*Alterações celulares mediadas por imidaclopride no intestino médio de Euschistus heros*

**Wu G-X, Gao X, Ye G-Y, Li K, Hu C & Cheng J-A** (2009) Ultrastructural alterations in midgut and Malpighian tubules of *Boettcherisca peregrina* exposure to cadmium and copper. *Ecotoxicology and environmental safety* 72: 1137-1147.

**Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W & You M** (2013) DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PloS one* 8: e68852.

**Xu ZB, Zou XP, Zhang N, Feng QL & Zheng SC** (2014) Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect science*.

**Yang Z, Zhang F, Zhu L & He G** (2006) Identification of differentially expressed genes in brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) responding to host plant resistance. *Bulletin of entomological research* 96: 53-59.

**Zhu YC, Guo Z, Chen M-S, Zhu KY, Liu XF & Scheffler B** (2011) Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of invertebrate pathology* 106: 296-307.

**Zucchi TD, Prado SS & Cônsoli FL** (2012) The gastric caeca of pentatomids as a house for actinomycetes. *BMC microbiology* 12: 101.

## Conclusões finais

O sistema salivar de *E. heros* consiste de um par de glândulas salivares principais bilobadas encarregadas da secreção de proteínas, e um par de glândulas acessórias tubulares que participam do transporte de água ou produção de outras substâncias. Pela primeira vez é relatada a presença de músculos no hilo da glândula salivar principal.

O intestino médio de *E. heros* é um órgão tubular que consiste de quatro regiões anatómicas: primeiro (V1), segundo (V2), terceiro (V3) e quarto ventrículo (V4). Com as regiões V1 e V3 dilatadas e a V4 rodeada com quatro filas de cecos densamente empacotados onde são armazenadas bactérias simbióticas. O epitélio digestivo do intestino médio mostra uma camada simples de células colunares que apresentam núcleos polimórficos e borda estriada bem desenvolvida na superfície apical.

A exposição aguda a concentrações letais de imidaclopride induz morte celular nas glândulas salivares e no intestino médio de *E. heros*. Nas células das glândulas salivares principais insetos expostos a imidaclopride foram observadas alterações morfológicas severas indicativas de morte celular por necrose, como forma irregular, vacuolização citoplasmática, núcleos dilatados, condensação de cromatina e ruptura da membrana citoplasmática. As células do intestino médio e das glândulas salivares acessórias de insetos tratados apresentaram mudanças morfológicas leves características de células na fase inicial de morte celular por apoptose, como vacuolização citoplasmática e condensação de cromatina. No intestino médio, os ventrículos anteriores (V2 e V3) mostraram danos celulares mais severos que os ventrículos posteriores (V4 e cecos gástricos). Interessantemente, o nível de degeneração celular foi mais pronunciado nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>75</sub>), mostrando um incremento gradual nas alterações celulares proporcional ao incremento da concentração.