

FRANCIANE ROSA MIRANDA

**EFEITOS DO FUNGICIDA DIFENOCONAZOL E DO HERBICIDA TEBUTHIURON
EM LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Miranda, Franciane Rosa, 1992-
M672e Efeitos do fungicida Difenoconazol e do herbicida
2023 Tebuthiuron em larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae). / Franciane Rosa Miranda. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.408>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Herbicidas - Toxicologia. 2. Fungicidas - Toxicologia. 3.
Aedes aegypti. I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.95

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


FRANCIANE ROSA MIRANDA

**EFEITOS DO FUNGICIDA DIFENOCONAZOL E DO HERBICIDA TEBUTHIURON
EM LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 FRANCIANE ROSA MIRANDA
Data: 21/09/2023 11:54:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Franciane Rosa Miranda
Autora

Documento assinado digitalmente
 GUSTAVO FERREIRA MARTINS
Data: 21/09/2023 07:14:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gustavo Ferreira Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV pela oportunidade, a Capes (código 001) pela bolsa de Doutorado e ao CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Gustavo Ferreira Martins, pela confiança e paciência.

Ao meu coorientador, Kenner Morais Fernandes, por estar sempre ao meu lado, me auxiliando e fazendo os trabalhos terem grande sucesso.

Aos Professores: José Eduardo Serrão, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Denilce Meneses Lopes e Cyntia Canedo da Silva por permitir a utilização dos laboratórios e dos equipamentos;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial a Beth do Programa em Celular e Estrutural, que sempre esteve à disposição quando precisei.

Aos amores da minha vida, minha família, meu pai Francisco, minha mãe Rosana e as minhas irmãs Flaviane e Fabiana, pelo amor, orações e apoio incondicional. Ao meu amor Danilo, pelo companheirismo, paciência, incentivo e por me dar o melhor título de todos, ser mãe. A você, nosso pequeno príncipe, Miguel.

Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram e torceram por mim. Ao meu amado avô, José Rosa (*in memoriam*), que sempre foi uma pessoa extraordinária, ao qual me inspiro todos os dias. A todos os meus amigos que estiveram presente em minha caminhada, ao longo desses anos. Obrigada pelos conselhos, incentivos e orações. Sem dúvidas, vocês foram essenciais na minha vida. A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Por último e não menos importante, a Deus. Obrigada meu Deus por está comigo em todos os momentos desses quatro anos. Foram anos de muita luta e provações, que nem tem como descrever em poucas palavras. Hoje só tenho a agradecer por um Deus tão maravilhoso e amoroso. Obrigada!

RESUMO

MIRANDA, Franciane Rosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Efeitos do fungicida Difenoconazol e do herbicida Tebuthiuron em larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O *Aedes aegypti* é o vetor de importantes arbovírus, são holometábolos, com ciclo de vida constituída por ovos, larvas, pupas e adultos. O intestino médio tem papel central em diferentes aspectos da biologia do mosquito, atuando em diferentes processos fisiológicos, como digestão e absorção de nutrientes. O epitélio é formado por três tipos celulares: células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas. Todo o epitélio é completamente remodelado durante a metamorfose, onde ocorrem diferentes processos celulares que culminam na proliferação, diferenciação e morte celular do epitélio intestinal, com a participação de diferentes vias, que atuam como amplificador, retransmissor e integrador de sinais de uma gama diversificada de estímulos extracelulares, controlando os diferentes processos celulares. Compostos químicos de uso comercial, como os fungicidas e os herbicidas, apresentam propriedades que causam danos potenciais ao meio ambiente e organismos não-alvos, levando a uma bioacumulação nos organismos e a uma transferência trófica subsequente para os predadores. Assim, foi demonstrado a possível toxicidade do fungicida difenoconazol e do herbicida tebutiuron, avaliando os efeitos causados pela exposição nas larvas de *A. aegypti*. A exposição ao difenoconazol (concentração de campo) levou a uma significativa mortalidade larval (80%) e afetou negativamente a atividade locomotora. Além disso, a exposição reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST) e da catalase (CAT), levando a um desequilíbrio no estado antioxidante, além da ativação da via de apoptose ativada por Caspase-3 e da autofagia das células digestivas do intestino médio. A exposição também comprometeu a diferenciação celular e a reorganização do tecido, como demonstrado pela diminuição das proteínas positivas para Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero e a redução no número de células proliferativas positivas para PH3 e das células enteroendócrinas positivas para FMRF-amida, prejudicando a manutenção do epitélio intestinal. A exposição ao tebutiuron causou 50% de mortalidade em 72h após a exposição, e estimulou a atividade locomotora em relação ao controle. A exposição ao herbicida mostrou desorganização do epitélio intestinal larval, além de diminuir a atividade enzimática da SOD e CAT, que pode estar ligado a inativação dessas enzimas pelo excesso de produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Por outro lado, a exposição ao herbicida

não levou ao aumento na detecção de Caspase-3, LC3/AB e JNK nas células digestivas, porém, houve diminuição das células positivas para ERK 1/2, Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero, afetando a diferenciação celular e reorganização do tecido e também diminuição do número de células em proliferação, positivas para PH3 e das células enteroendócrinas FMRF-positivas, indicando que pode haver comprometimento na remodelação e renovação do epitélio intestinal. Assim, o difenoconazol e o tebutiuron são produtos que causam danos importantes ao intestino médio larval, indicando que há uma toxicidade em larvas de *A. aegypti*, comprometimento sua sobrevivência e desenvolvimento, além de ser prejudicial ao meio ambiente, pois, ambos são utilizados comercialmente na agricultura, que podem afetar outras espécies, atingindo níveis tróficos superiores, que pode causar danos em todo ecossistema. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor os efeitos tóxicos em diferentes organismos não-alvos aquáticos, que embora o modo de ação de cada composto não tenha como alvo os insetos, foi demonstrado ter um efeito negativo.

Palavras-chave: Agroquímicos. Efeitos subletais. Sinalização Celular. Organismos não-alvo.

ABSTRACT

MIRANDA, Franciane Rosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Effects of the fungicide Difenoconazole and the herbicide Tebuthiuron on larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Advisor: Gustavo Ferreira Martins.

Aedes aegypti is the vector of important arboviruses, they are holometabolous, with a life cycle consisting of eggs, larvae, pupae and adults. The midgut plays a central role in different aspects of mosquito biology, acting in different physiological processes, such as digestion and absorption of nutrients. The epithelium is formed by three cell types: digestive, regenerative and enteroendocrine cells. The entire epithelium is completely remodeled during metamorphosis, where different cellular processes occur that culminate in the proliferation, differentiation and cell death of the intestinal epithelium, with the participation of different pathways, which act as an amplifier, relay and integrator of signals from a diverse range of extracellular stimuli, controlling the different cellular processes. Commercially used chemical compounds, such as fungicides and herbicides, have properties that cause potential damage to the environment and non-target organisms, leading to bioaccumulation in organisms and subsequent trophic transfer to predators. Thus, the possible toxicity of the fungicide difenoconazole and the herbicide tebuthiuron was demonstrated, evaluating the effects caused by exposure on *A. aegypti* larvae. Exposure to difenoconazole (field concentration) led to significant larval mortality (80%) and negatively affected locomotors activity. In addition, exposure reduced the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) enzymes, leading to an imbalance in antioxidant status, in addition to activation of the Caspase-3-activated apoptosis pathway, and the autophagy of midgut digestive cells. Exposure also compromised cell differentiation and tissue reorganization, as shown by the decrease in Wnt, Armadillo, Cadherin, Notch/Delta, and Prospero positive proteins and the reduction in the number of PH3-positive proliferative cells and FMRF-positive enteroendocrine cells -amide, impairing the maintenance of the intestinal epithelium. Tebuthiuron exposure caused 50% mortality within 72 hours of exposure, and stimulated locomotors activity relative to control. Exposure to the herbicide showed disorganization of the larval intestinal epithelium, in addition to decreasing the enzymatic activity of SOD and CAT, which may be linked to the inactivation of these enzymes by the excess production of reactive oxygen species (ROS). On the other hand, exposure to the herbicide did not lead to an increase in the detection of Caspase-3, LC3/AB and JNK in the digestive cells, however, there was a decrease in the number of positive cells for ERK 1/2, Wnt, Armadillo, Cadherin, Notch/Delta and Prospero, affecting cell

differentiation and tissue reorganization and also decreasing the number of proliferating cells, positive for PH3 and FMRF-positive enteroendocrine cells, indicating that there may be impairment in the remodeling and renewal of the intestinal epithelium. Thus, difenoconazole and tebuthiuron are products that cause significant damage to the larval midgut, indicating that there is toxicity in *A. aegypti* larvae, compromising their survival and development, in addition to being harmful to the environment, since both are used commercially in agriculture, which can affect other species, reaching higher trophic levels, which can cause damage to the entire ecosystem. However, more studies are needed to better understand the toxic effects on different non-target aquatic organisms, which although the mode of action of each compound does not target insects, it has been shown to have a negative effect.

Keywords: Agrochemicals. Sublethal Effects. Cell Signaling. Non-target Organisms.

SUMÁRIO

1. Revisão de literatura	10
2. Referências bibliográficas	18
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivos específicos.....	24
Capítulo 1 - Efeitos tóxicos subletais da exposição do fungicida difenoconazol em larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae).....	25
Resumo	25
1. Introdução.....	25
2. Materiais e métodos.....	28
2. 1. Inseto.....	28
2.2. Bioensaio de mortalidade	28
2.3. Bioensaio da atividade larval.....	29
2.4. Histologia do intestino médio.....	29
2.5. Análise das enzimas antioxidantes	29
2.6. Imunofluorescência.....	30
2.7. Análise estatística	31
3. Resultados.....	31
3.1. Efeitos da exposição ao difenoconazol na sobrevivência e na atividade locomotora das larvas de <i>A. aegypti</i>	31
3.2. Efeitos da exposição ao difenoconazol na morfologia do intestino médio das larvas de <i>A. aegypti</i>	33
3.3. Efeitos da exposição ao difenoconazol sobre marcadores de estresse oxidativo, morte celular e na renovação do intestino médio das larvas de <i>A. aegypti</i>	34
4. Discussão	39
5. Conclusão	43
6. Referências bibliográficas	43
Capítulo 2 - Efeitos subletais do herbicida tebutiuron em larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae).....	51
Resumo	51
1. Introdução.....	51
2. Materiais e métodos.....	54
2. 1. Inseto	54

2.2. Bioensaio de mortalidade	55
2.3. Bioensaio da atividade larval	55
2.4. Histologia do intestino médio	56
2.5. Análise das enzimas antioxidantes	56
2.6. Imunofluorescência.....	56
2.7. Análise estatística	57
3. Resultados.....	58
3.1. Efeitos da exposição ao herbicida tebutiuron na sobrevivência e na atividade locomotora das larvas das <i>A. aegypti</i>	58
3.2. Efeitos da exposição ao herbicida tebutiuron na morfologia do intestino médio das larvas das <i>A. aegypti</i>	60
3.3. Efeitos da exposição ao tebutiuron sobre marcadores de estresse oxidativo, morte celular e na renovação do intestino médio das larval das <i>A. aegypti</i>	60
4. Discussão	65
5. Conclusão	68
6. Referências bibliográficas	69
Considerações finais	76
Referências bibliográficas	78

1. Revisão de literatura

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à ordem Diptera e a família Culicidae. Essa espécie é conhecida por ser vetor de importantes arbovírus que causam doenças em humanos, como dengue, febre amarela, chikungunya e Zika (Patterson et al., 2016; Yu et al., 2019). Essas doenças causam altos níveis de mortalidade e morbidade humana, sendo cada vez mais detectada em todo mundo, devido à ampla distribuição geográfica do vetor (Jansen et al., 2010; Powell & Tabachnick, 2013; Iwamura et al., 2020).

O *A. aegypti* possui ciclo de vida constituído por quatro principais fases, iniciado pelos ovos, seguido das larvas, pupas e completando o desenvolvimento com os adultos, caracterizando assim como insetos com metamorfose completa (holometábolos) (Zettel & Kaufman, 2012; Carvalho & Moreira, 2017; Foster & Walker, 2019). Os ovos são elípticos e de coloração clara no momento da oviposição, mas em poucos minutos ficam pretos brilhantes. Possuem alta resistência à dessecação, sendo viáveis por longos períodos. Em climas quentes, os ovos podem desenvolver em menos de dois dias em condições favoráveis de umidade (Zettel & Kaufman, 2012; Carvalho & Moreira, 2017; Mundim-Pombo et al., 2021). A eclosão dos ovos dá origem à fase larval, que compreende o único estágio de alimentação dos imaturos e o único estágio de crescimento no ciclo de vida. As larvas passam por quatro instares de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4), onde ficam por um curto período nos três primeiros estágios e até três dias no último. O desenvolvimento larval depende da temperatura ambiente, onde em locais mais frios, o desenvolvimento pode ser lento, levando até uma semana para mudar de fase (Zettel & Kaufman, 2012; Carvalho & Moreira, 2017).

Ao completar o desenvolvimento larval, tem início a fase pupal, onde os indivíduos não se alimentam e em condições ótimas de temperatura, levam aproximadamente dois dias para se desenvolverem em adultos. As pupas passam por uma série de transformações internas que culminarão com a formação do indivíduo adulto, iniciando assim os processos de metamorfose do estágio larval para o adulto, onde todo o processo de desenvolvimento leva em média 10 dias em locais com temperaturas mais quentes (Zettel & Kaufman, 2012; Carvalho & Moreira, 2017).

No mosquito *A. aegypti*, o intestino médio tem papel central em diferentes aspectos da sua biologia, compondo o segundo maior órgão do inseto, sendo menor apenas do que o corpo gorduroso. É o principal local de entrada para bactérias, vírus e toxinas contidos nos alimentos. Constituído por um tubo delimitado por um epitélio simples colunar, cuja função é a síntese de enzimas digestivas e a absorção dos produtos digeridos. É circundado por uma rede de células

musculares circulares e longitudinais que dão suporte ao órgão e participa do peristaltismo (Clark et al., 2005; Franz et al., 2015; Kumar et al., 2018; Godoy et al., 2021).

Em insetos holometábolos, como o *A. aegypti*, a estrutura e a função do intestino médio varia nas diferentes fases do desenvolvimento (Hakim et al., 2010). O intestino médio larval é composto inicialmente de pelo ceco gástrico, projeções em forma sacos, e por um tubo ou ventrículo que compreende quase toda a extensão do órgão. O intestino médio é subdividido em duas regiões distintas, denominada região anterior e posterior (Clark et al., 2005; Hakim et al., 2010; Godoy, 2019). Na fase de pupa será substituído e amadurecerá formando o intestino do mosquito adulto (Hakim et al., 2010; Fernandes et al., 2014). Na fase adulta, o intestino médio é subdividido em região anterior e posterior. A região anterior é formada por um tubo simples e não participando ativamente da digestão sanguínea, e a região posterior é formada por um saco expansível com características de armazenamento, síntese, secreção e absorção de nutrientes (Billingsley, 1990; Clark et al., 2005).

No intestino médio de *A. aegypti*, o epitélio se desenvolve de duas formas básicas, através do aumento do tamanho celular e pela substituição completa das células colunares pelas células-tronco, formando uma nova população de células (Moffett & Moffett, 2005; Ray et al., 2009). No epitélio do intestino médio encontra-se três tipos celulares que compõe o órgão. Essas células são classificadas quanto a sua função, localização e distribuição, sendo denominadas como células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas (Billingsley, 1990; Fernandes et al., 2014; Godoy et al., 2021).

As células digestivas, ou colunares, são as mais numerosas no epitélio intestinal. Na região apical possuem microvilosidades e na região baso-lateral observam-se invaginações de membrana, que constituem o labirinto. São responsáveis pela produção de enzimas digestivas, absorção dos produtos digeridos da alimentação e pela formação da matriz peritrófica (Rudin & Hecker, 1979; Terra, 1990; Caccia et al., 2019). A matriz peritrófica é formada por microfibrilas de quitina e por proteínas e proteoglicanos, que tem como função a proteção mecânica do epitélio intestinal, assim como também protege contra patógenos e ataques de agentes potencialmente tóxicos (Lehane, 1997; Edwards & Jacobs-Lorena, 2000; Kato et al., 2006).

As células enteroendócrinas, ou endócrinas, estão espalhadas entre as outras células do intestino médio do mosquito (Caccia et al., 2019). Estima-se que há aproximadamente 500 células endócrinas no intestino médio de *A. aegypti*, e devido a essa abundância de células, este é caracterizado como o maior órgão endócrino do mosquito (Brown et al., 1986; Veenstra et al., 1995; Moffett & Moffett, 2005). Essas células apresentam positividade para dois hormônios

peptídicos encontrados em mamíferos, o polipeptídeo pancreático e o FMRFamida (fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina-amida) (Brown et al., 1986; Moffett & Moffett, 2005). Esses hormônios estão presentes em aproximadamente 50% das células endócrinas dos mosquitos, localizados em vesículas no interior das células, sugerindo que eles são secretados e liberados localmente, sendo eficazes em células intestinais proximais, tendo assim uma função parácrina, podendo estar envolvidas na motilidade intestinal e na secreção de enzimas digestivas (Brown et al., 1986; Veenstra et al., 1995; Moffett & Moffett, 2005).

As células regenerativas, também chamadas de células-tronco, tem como função a renovação do epitélio digestivo. Essas células são indiferenciadas, encontradas na região basal do epitélio intestinal entre as células digestivas, podendo estar isoladas ou em pares (Brown et al., 1985; Billingsley, 1990; Caccia et al., 2019). Em *A. aegypti*, as células-tronco são encontradas nos indivíduos imaturos e no início da fase adulta, nos recém-emergidos, sendo localizadas na região posterior do intestino médio em pequeno número. O intestino médio perde quase todo o epitélio larval no início da ecdise, e o processo de remodelação se dá pela proliferação das células-tronco, que inicia no último estágio larval e prolonga-se durante o estágio de pupa (Ray et al., 2009; Caccia et al., 2019; Godoy et al., 2021).

A metamorfose inicia-se no final do quarto instar larval, segue no estágio de pupa, onde essas sofrem modificações internas, emergindo no mosquito adulto (Ray et al., 2009; Hakim et al., 2010). Durante a metamorfose o intestino médio sofre modificações, sendo remodelado, onde algumas células diferenciadas sofrem morte celular e outras se diferenciam formando um novo epitélio através do processo de diferenciação e proliferação das células regenerativas (Buszczak & Segraves, 2000; Ray et al., 2009; Fernandes et al., 2014) (Fig. 1). No processo de histólise do epitélio digestivo, parte das células que formam o epitélio larval, podem ser liberadas para o lúmen ou sofrerem o processo de morte celular programada dependente de caspase (Grivicich & Rocha, 2007; Denton et al., 2009). Simultaneamente, as células regenerativas proliferam, formando o novo epitélio na pré-pupa, contendo células regenerativas e outras células diferenciadas (Hakim et al., 2010; Fernandes et al., 2014).

Os processos relacionados à morte celular, como a autofagia e a apoptose, são importantes para a homeostase do intestino médio e intervêm ativamente no processo de remodelação e formação do epitélio do intestino médio nas larvas (Lockshin & Zakeri, 2004; Franzetti et al., 2012). A autofagia é um processo em que parte do citoplasma é envolvido e digerido por vesículas através da fusão com os lisossomos, permitindo que as células eliminem partes que não tem mais função na célula (Lockshin & Zakeri, 2004; Franzetti et al., 2012). Em *Bombyx mori* (Lepidoptera) por exemplo, a autofagia é ativada na fase larval, com seu maior

nível de atividade no final do instar larval e início da fase pupal, prolongando até os adultos (Franzetti et al., 2012). A autofagia é essencial para a renovação adequada do intestino médio, e é um meio para reduzir a massa celular antes da apoptose, onde os dois processos podem ocorrer paralelamente (Lockshin & Zakeri, 2004; Denton et al., 2009).

A apoptose ou morte celular programada é um processo onde as células sofrem alterações morfológicas como a retração da célula, perda da aderência com a matriz extracelular e fragmentação do envelope nuclear (Grivicich & Rocha, 2007). A remodelação através da apoptose tem como função a remoção de pequenos grupos celulares que apresentam danos no DNA, proliferação inadequada e eliminação de células que contém algum tipo de patógenos intracelulares, auxiliando na homeostase e desenvolvimento dos tecidos adultos (Hakim et al., 2010; Franzetti et al., 2012). Esse tipo de morte celular está relacionado a fatores de ativação da via de caspase, que constituem uma família de proteases, presentes na maioria das células como zimogênios inativos, que tornam ativos com uma sequência sinal de morte, atuando como iniciadores e executores da apoptose (Grivicich & Rocha, 2007; Cooper et al., 2009). As caspases são classificadas em duas classes, as caspases iniciadoras que agem no início da cascata proteolítica e ativando as caspases executoras. As caspases executoras produz uma reação em cadeia amplificada, levando a morte controlada da célula (McIlwain et al., 2013). Entre as caspases executoras temos a Caspase-3, uma proteína citosólica, que desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular (Porter & Jänicke, 1999; Eskandari & Eaves, 2022).

Durante a remodelação do intestino médio de *A. aegypti*, ocorre diferentes processos celulares que culminam na proliferação, diferenciação e morte celular do epitélio intestinal. Esses processos são regulados por diferentes vias que atuam como amplificador, retransmissor e integrador de sinais de uma gama diversificada de estímulos extracelulares, controlando os diferentes processos celulares (Sherrin et al., 2011) (Fig. 1). As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são um grupo de proteínas quinases, que traduzem sinais de uma variedade de receptores transmembranas da superfície celular para compartimentos intracelulares (Vlahopoulos & Zoumpourlis, 2004; Laborde, 2010). Existem pelo menos três famílias de MAPKs caracterizadas como quinases N-terminais c-Jun (JNK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e p38 MAPK. Essas MAPKs são elementos de uma cascata de quinases de três camadas compostas por uma MAPK, uma MAP2K e uma MAP3K (Laborde, 2010; Sherrin et al., 2011).

As proteínas quinases N-terminais c-Jun (JNK/SAPK) são quinases ativadas por estresse, que podem ocorrer por dois mecanismos. Primeiro pelo aumento das espécies reativas

de oxigênio (ROS) intracelular correlacionando com um aumento da fosforilação e ativação da JNK e segundo, as ROS podem modificar a atividade dessas quinases através de reações químicas e enzimáticas. Essas proteínas ativadas podem regular várias funções celulares como crescimento celular, diferenciação e apoptose (Vlahopoulos & Zoumpourlis, 2004; Yu et al., 2004; Cargnello & Roux, 2011). As quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) são moléculas de sinalização intracelular das proteínas quinases, que comunicam uma sinal de um receptor na superfície da célula para o DNA no núcleo. A via é ativada por diferentes sinais de iniciação, como resposta ao estresse osmótico, sinais mitogênicos e fator de crescimento, que resulta na fosforilação de diferentes substratos. Após a ativação da via, a ERK entra no núcleo regulando a atividade do fator de transcrição e a expressão gênica, envolvidas na regulação da proliferação de células-troncos, diferenciação ou ser ativadas por danos ao DNA, promovendo a apoptose celular (Xia et al., 1995; Lu & Xu, 2006; Cargnello & Roux, 2011). As p38 MAPKs são ativadas principalmente por estresses extracelular e citocinas inflamatórias (Cargnello & Roux, 2011).

A proteína Wnt (wg) ou wingless em *Drosophila melanogaster* é membro de uma família diversa de glicoproteínas de sinalização modificada por lipídios, que ativam diferentes vias de transdução de sinal intracelular (Gordon & Nusse, 2006; Bejsovec, 2013). Regulam a proliferação celular e são necessárias para o desenvolvimento embrionário em animais e na homeostase dos tecidos adultos (Swarup & Verheyen, 2012; Bejsovec, 2013). As proteínas Wnt ligam-se a receptores transmembranas e atuam em uma cascata de genes no núcleo (Komiya & Habas 2008; Bejsovec, 2013). A sinalização de Wnt pode ocorrer em duas vias distintas. A primeira via é a não-canônica, que compreende um grupo de vias de sinalizações independentes de β -catenina e atua principalmente na regulação do citoesqueleto durante a migração e polarização celular (Komiya & Habas 2008). A segunda via na sinalização Wnt é a canônica, caracteriza pelo acúmulo citoplasmático de β -catenina e posteriormente translocação para o núcleo. Os níveis citoplasmáticos da β -catenina são mantidos por um complexo de destruição de β -catenina, formado por proteínas citoplasmáticas que fosforila a β -catenina no citosol, tornando-as ubiquitinadas e alvo de degradação de proteases. Após a ligação da proteína Wnt ao complexo receptor transmembrana, o complexo de destruição de β -catenina é inibido, levando a um bloqueio na fosforilação de β -catenina, e conseqüentemente seu acúmulo no citoplasma. A β -catenina então é translocada para o núcleo, onde regula a expressão de genes alvo por meio da ligação com a família de fatores de transcrição, que desencadeia genes específicos de Wnt, que tem como função o controle do destino celular (Gordon & Nusse, 2006; Komiya & Habas 2008; Valenta et al., 2012).

A β -catenina conhecida como Armadillo em *D. melanogaster* é uma proteína de andaime que desempenha papel crucial em diversos processos celulares, como na adesão celular, transdução de sinal e estimulação transcricional de genes (Bao et al., 2012; Valenta et al., 2012). Ela compõe uma subunidade do complexo proteico de outra proteína, a caderina, onde sua superprodução pode inibir a atividade transcricional das β -cateninas, reduzindo a transcrição genica (Gottardi & Gumbiner, 2001). A caderina pertence a uma grande família de proteínas transmembranares, que tem função essencial nos processos de sinalização extracelular e intracelular (Gooding et al., 2004; Chen et al., 2020). A caderina tem função na morfogênese dos tecidos, controlando a adesão célula-célula e na sinalização celular, além de mediar sinais que podem controlar a especificação do destino celular, a polaridade celular e a proliferação celular (Maître & Heisenberg, 2013; Chen et al., 2020). A caderina também é necessária na morfogênese das microvilosidades, mantendo sua organização e aumento do seu comprimento (Schlichting et al., 2006).

A via de sinalização celular Notch é um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares, como a diferenciação, a proliferação celular e a apoptose (Bardot et al., 2005). São proteínas transmembranas que se ligam a outras proteínas transmembranas da célula vizinha, como a Delta, ativando assim uma cascata bioquímica, compreendendo como uma via justacrina, ou seja, envolve contato direto entre as células (Hayward et al., 2008; Bocci et al., 2020). Quando ocorre a interação entre o receptor Notch e o ligante Delta há uma clivagem proteolítica no domínio citoplasmático do Notch, onde a parte clivada é translocada para o núcleo e se liga ao fator de transcrição ativando genes alvos (Bardot et al., 2005; Lasky & Wu, 2005; Hayward et al., 2008). Outra proteína que está ligada a proliferação e diferenciação celular é a proteína prospero. Essa proteína é um fator de transcrição neuronal importante na regulação da transição entre a proliferação e a diferenciação de progenitores neurais durante o desenvolvimento cerebral de *D. melanogaster* e de vertebrados (Choksi et al., 2006).

O *A. aegypti* tem sido alvo de estudo sobre os efeitos toxicológicos de diferentes agroquímicos. Agroquímicos, como os piretroides, organoclorados e organofosforados, causam efeitos tóxicos em insetos, afetando a fase larval ou adulta, causando paralisia e morte (Braga & Valle, 2007). Dentre os diferentes efeitos tóxicos subletais causados pelos agroquímicos, temos aumento na mortalidade na fase larval (Tomé et al., 2014; Fernandes et al., 2015), modificações no comportamento larval, diminuindo sua atividade locomotora, apresentando uma locomoção mais lenta e maior vulnerabilidade a predação (Tomé et al., 2014), alterações na morfologia do intestino do mosquito, provocando desorganização do epitélio, morte celular

e diminuição na proliferação celular, prejudicando seu funcionamento e desenvolvimento (Fernandes et al., 2015; 2019). Além de causar redução na reprodução das fêmeas de *A. aegypti*, alterando a produção dos ovos (Bibbs et al., 2018).

Devido ao uso crescente desses agroquímicos, tem aumentado os níveis de resistências aos mosquitos, o que gera a descobertas de novos compostos químicos. O uso crescente desses agroquímicos podem causar danos potenciais ao meio ambiente e organismos não-alvos (Mu et al., 2013; Jiang et al., 2020). Os agroquímicos, como os pesticidas e inseticidas são utilizados com grandes frequências na agricultura, com objetivo de combater pragas agrícolas, melhorando assim o rendimento dos cultivos agrícolas. Uma vez em contato com o ambiente, estes podem ser transportados pelo ar, solo e água (Mu et al., 2013).

Durante a aplicação dos agroquímicos, estes são transportados para os sistemas aquáticos, representando riscos a invertebrados e as populações de peixes (Muggelberg et al., 2017; Hartz et al., 2021). Os piretroides, por exemplo, são hidrofóbicos e persistente devido à tendência de sedimentar ao leito (Hartz et al., 2021). Estudos tem demonstrado que o uso de altas taxas de determinados agroquímicos tem levado a transferência horizontal entre espécies (Smith & Lockwood, 2003).

O uso constante de determinados agroquímicos pode levar um aumento de bioacumulação nos organismos, que podem causar a transferência trófica subsequente para os predadores (Amiard-Triquet, 2019; Derby et al., 2021; Hartz et al., 2021). Essa intoxicação secundária à contaminação de cadeias alimentares tem um grande risco ecológico, podendo chegar até a espécie humana. Algumas espécies de peixes de água doce tende a serem altamente contaminados com agroquímicos persistentes e bioacumulativos, podendo causar distúrbios no neurodesenvolvimento e mudanças no comportamento de natação dos peixes, tornando-os mais suscetíveis à predação (Muggelberg et al., 2017; Amiard-Triquet, 2019; Hartz et al., 2021). Estudo com a exposição a metais pesados, demonstra que houve uma toxicidade dose-resposta em larvas de *A. aegypti*, bem como em ninfas de libélula *Tramea cophysa*, expostas às larvas contaminadas com metal (Akhtar et al., 2021). As ninfas dessas libélulas se alimentam de micro invertebrados e de larvas de *A. aegypti* (Samanmali et al., 2018). A predação sucessiva através da cadeia trófica pode causar bioacumulação desses metais pesados entre os níveis tróficos superiores, uma vez, que esses metais não são degradados pelo metabolismo dos insetos (Akhtar et al., 2021).

Agroquímicos de uso comercial, utilizados na agricultura, como os fungicidas, podem apresentar propriedades que causam danos a diferentes espécies não-alvos. Um dos fungicidas de amplo espectro é o difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-

ilmetil) -1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter), o qual é amplamente utilizado na agricultura para controle de doenças em frutas, legumes e cereais (IUPAC, 2023). É um fungicida inibidor de esteróis, que atua impedindo a biossíntese de ergosterol, componente essencial das membranas celulares dos fungos (Lewis et al., 2016; IUPAC, 2023). Possui baixa solubilidade aquosa, porém tem potencial para transporte ligado a partículas. É ligeiramente volátil, persistente no solo e no meio aquoso, apresentando toxicidade aguda relativamente alta para diversos organismos aquáticos (Mu et al., 2013; Teng et al., 2018; IUPAC, 2023). Esse fungicida possui ação sistêmica rápida, podendo atingir diferentes atividades biológicas do organismo, como demonstrado em *Danio rerio*, onde a exposição ao difenoconazol induziu efeitos agudos, além de causar alterações nas concentrações de metabólitos, na regulação do hormônio de crescimento e na transcrição de genes relevantes aos processos vitais em estágios iniciais de vida, afetando o crescimento em ambos os sexos (Mu et al., 2013; Teng et al., 2017; 2018; Jiang et al., 2020). Já em insetos, foi demonstrado que esse composto inibiu a respiração de células musculares e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em abelhas *Bombus terrestris* (Syromyatnikov et al., 2017).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem levar ao estresse oxidativo, através do desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação, para isso as células possuem defesas enzimáticas que as protegem contra os danos oxidativos (Burton & Jauniaux, 2011). Dentre as principais enzimas, temos a superóxido dismutase (SOD) que fornece defesa celular contra as ROS, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (McCord & Fridovich, 1969). A enzima catalase (CAT), uma peroxidase encontrada nos peroxissomos, que tem como função a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A catalase neutraliza a ação tóxica do peróxido de hidrogênio e equilibra sua produção no organismo, protegendo as células (Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018). E a enzima glutathione S-transferase (GST), uma família de enzimas encontradas no citosol, envolvidas na desintoxicação celular de compostos xenobióticos. Catalisam a conjugação de glutathione reduzida (GSH) a centros eletrofílicos em uma ampla variedade de substratos, incluindo produtos do estresse oxidativo (Sheehan et al., 2001).

Outro grupo de agroquímico muito utilizado na agricultura para controle de plantas daninhas são os herbicidas. Em particular, o herbicida tebutiuron (1- (5-tert-butyl- 1,3,4-thiadiazol-2-yl) -1,3-dimethyl urea), que possui amplo espectro da classe da ureia. É absorvido pelas raízes e transportado para as folhas, atuando na inibição da fotossíntese e aumentando a formação de radicais livres, que oxidam a membrana e matam a planta (Almeida et al., 2018; Oliveira et al., 2020, NIH, 2023). Possui alta solubilidade em água, sendo considerado com um

grande potencial de contaminação aquático, além de ter alta persistência no solo (NIH, 2023). Em animais, esse composto causa desregulação da biossíntese hormonal e perda na espermatogênese em tilápia (*Oreochromis niloticus*), exibindo efeitos estrogênicos e antiandrogênicos, que combinados podem prejudicar os órgãos reprodutivos, como redução do tamanho dos testículos, comprometimento da função das células de Leyding, entre outros (Almeida et al., 2018).

Assim, o constante uso desses agroquímicos e a possibilidade da transferência horizontal em diversas espécies, leva há necessidade de estudar os mecanismos que podem causar toxicidade em determinadas espécies (Mu et al., 2013; Jiang et al., 2020). Uma vez que estes compostos causam danos aos organismos aquáticos, usaremos como modelo o *A. aegypti*, que apresenta em seu ciclo de vida fases aquáticas. Avaliaremos os efeitos do difenoconazol e do tebutiuron em larvas de *A. aegypti*, um organismo não-alvo, podendo ter ação em outras espécies de insetos aquáticos, afetando a cadeia trófica, e em último caso, atingir o homem.

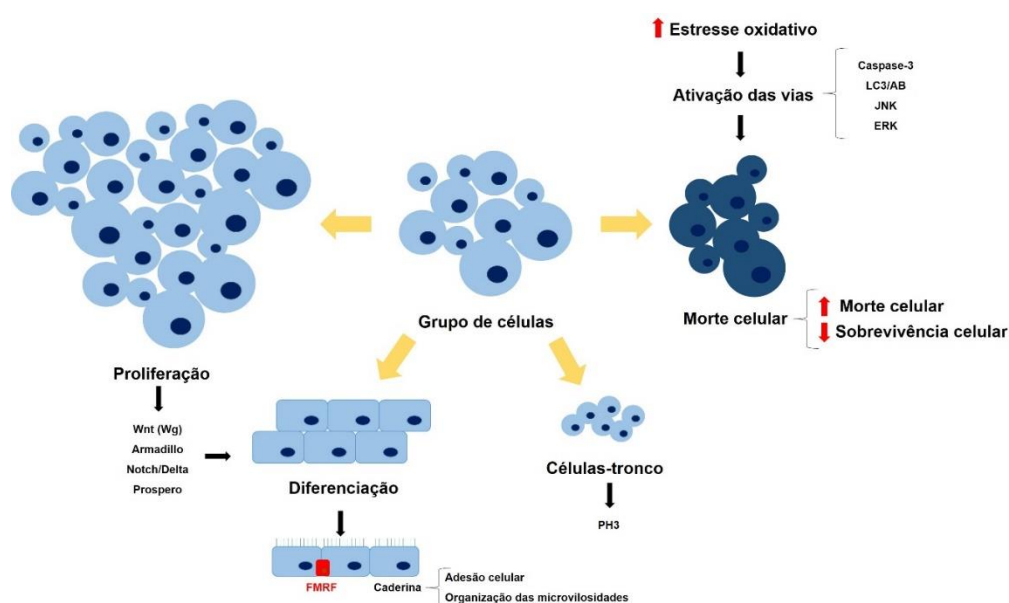


Figura 1: A: Esquema demonstrando as marcações de células presentes no intestino médio das larvas de *Aedes aegypti*, os processos de morte celular e as vias de sinalização estudadas.

2. Referências bibliográficas

Abreu, F. V. S. De, Morais, M. M., Ribeiro, S. P., & Eiras, Á. E. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 5, p. 669-676, 2015.

Amer, A., & Mehlhorn, H. The sensilla of *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes and their importance in repellency. Parasitology Research, v. 99, p. 491-499, 2006.

Amiard-Triquet, C. Pollution tolerance in aquatic animals: From fundamental biological mechanisms to ecological consequences. In: Ecotoxicology. Elsevier, p. 33-91, 2019.

Andrew, J., & Bar, A. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. Annual Research & Review in Biology, p. 52-69, 2013.

Bardot, B., Mok, L. P., Thayer, T., Ahimou, F., & Wesley, C. The Notch amino terminus regulates protein levels and Delta-induced clustering of *Drosophila* Notch receptors. Experimental Cell Research, v. 304, n. 1, p. 202-223, 2005.

Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annual Review of Entomology, v. 35, n. 1, p. 219-248, 1990.

Bocci, F., Onuchic, J. N., & Jolly, M. K. Understanding the principles of pattern formation driven by Notch signaling by integrating experiments and theoretical models. Frontiers in Physiology, v. 11, p. 929, 2020.

Brown, M. R., Crim, J. W., & Leat, A. O. FMRamide and pancreatic polypeptide like immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. Tissue and Cell, v. 18, n. 3, p. 419-428, 1986.

Brown, M. R., Raikhel, A. S., & Lea, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. Tissue and Cell, v. 17, n. 5, p. 709-721, 1985.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

Buszczak, M., & Segraves, W. A. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. Current Biology, v. 10, n. 22, p. 830-833, 2000.

Caccia, S., Casartelli, M., & Tettamanti, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. Cell and Tissue Research, v. 377, p. 505-525, 2019.

Cargnello, M., & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

Carvalho, F. D., & Moreira, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? Neotropical Entomology, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

Chapman, R. F.; Simpson, S. J. Douglas, A. E. The insects: structure and function. 5 Th edition. Publishing Company Cambridge University Press, 2013.

Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., Wit, E., Fischer, B. E., Steensel, B. V., Micklem, G. & Brand, A. H. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. Developmental Cell, v. 11, n. 6, p. 775-789, 2006.

Clark, T. M., Hutchinson, M. J., Huegel, K. L., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue and Cell*, v. 37, n. 6, p. 457-468, 2005.

Cooper, D. M., Granville, D. J., & Lowenberger, C. The insect caspases. *Apoptosis*, v. 14, n. 3, p. 247-256, 2009.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741-1746, 2009.

Derby, A. P., Fuller, N. W., Hartz, K. E. H., Segarra, A., Connon, R. E., Brander, S. M., & Lydy, M. J. Trophic transfer, bioaccumulation and transcriptomic effects of permethrin in inland silversides, *Menidia beryllina*, under future climate scenarios. *Environmental Pollution*, v. 275, p. 116545, 2021.

Edwards, M. J., & Jacobs-Lorena, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology*, v. 46, n. 9, p. 1313-1320, 2000.

Eskandari, E., & Eaves, C. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, v. 221, n. 6, p. e202201159, 2022.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506-512, 2014.

Foster, W. A., & Walker, E. D. Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology* (third ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA. p. 261-325, 2019.

Franz, A. W., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3741-3767, 2015.

Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Feng, Q., Cao, Y., & Tettamanti, G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, v. 17, n. 3, p. 305-324, 2012.

Godoy, R. S. M. Desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio de mosquitos (Diptera, Culicidae). Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 143, 2019.

Godoy, R. S., Barbosa, R. C., Procópio, T. F., Costa, B. A., Jacobs-Lorena, M., & Martins, G. F. FMRF-related peptides in *Aedes aegypti* midgut: neuromuscular connections and enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, v. 385, n. 3, p. 585-602, 2021.

Gordon, M. D., & Nusse, R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 32, p. 22429-22433, 2006.

Gottardi, C. J., & Gumbiner, B. M. Adhesion signaling: how β -catenin interacts with its partners. *Current Biology*, v. 11, n. 19, p. R792-R794, 2001.

Grivicich, I., Regner, A., & Rocha, A. B. D. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593-608, 2010.

Hartz, K. E. H., Weston, D. P., Johanif, N., Poynton, H. C., Connon, R. E., & Lydy, M. J. Pyrethroid bioaccumulation in field-collected insecticide-resistant *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology*, v. 30, n. 3, p. 514-523, 2021.

Hayward, P., Kalmar, T., & Martinez Arias, A. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development*, v. 135, n. 3, p. 411-424, 2008.

International Union of Pure and applied chemistry (IUPAC). Difenconazole (Ref: CGA 169374). International Union of Pure and Applied Chemistry, 2023. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/230.htm>. Acesso em: 20 maio de 2023.

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., & Murray, K. A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

Jansen, C. C., & Beebe, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 4, p. 272-279, 2010.

Kato, N., Mueller, C. R., Fuchs, J. F., Wessely, V., Lan, Q., & Christensen, B. M. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2006.

Komiya, Y., & Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, v. 4, n. 2, p. 68-75, 2008.

Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, PDNN, Dubey, SK, Kumar, R., Shrinet, J., & Sunil, S. Mosquito innate immunity. *Insects*, v. 9, n. 3, p. 95, 2018.

Lasky, J. L., & Wu, H. Notch signaling, brain development, and human disease. *Pediatric Research*, v. 57, n. 7, p. 104-109, 2005.

Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, v. 42, n. 1, p. 525-550, 1997.

Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016.

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 36, n. 12, p. 2405-2419, 2004.

Maître, J. L., & Heisenberg, C. P. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Current Biology*, v. 23, n. 14, p. R626-R633, 2013.

McCord, JM, & Fridovich, I. superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, p. 20, 2005.

Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., & Wang, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, v. 175, p. 147-157, 2013.

Muggelberg, L. L., Hartz, K. E. H., Nutile, S. A., Harwood, A. D., Heim, J. R., Derby, A. P., Weston, D. P. & Lydy, M. J. Do pyrethroid-resistant *Hyaella azteca* have greater bioaccumulation potential compared to non-resistant populations? Implications for bioaccumulation in fish. *Environmental Pollution*, v. 220, p. 375-382, 2017.

Mundim-Pombo, A. P. M., Carvalho, H. J. C. D., Rodrigues R. R., León, M., Maria, D. A., & Miglino, M. A. *Aedes aegypti*: egg morphology and embryonic development. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

National Library of Medicine (NIH). Tebuthiuron. National Library of Medicine, 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tebuthiuron>. Acesso em: 20 maio de 2023.

Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. Dengue, Zika, and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

Porter, A. G., & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 11-17, 2013.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. Journal of Insect Science, v. 9, n. 55, p. 1-13, 2009.

Rudin, W., & Hecker, H. Functional morphology of the midgut of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) during blood digestion. Cell and Tissue Research, v. 200, n. 2, p. 193-203, 1979.

Rudin, W., & Hecker, H. Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). Tissue and Cell, v. 8, n. 3, p. 459-470, 1976.

Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., & Dahmann, C. Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. Journal of Cell Science, v. 119, n. 6, p. 1184-1195, 2006.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

Smith, D. I., & Lockwood, J. A. Horizontal and trophic transfer of diflubenzuron and fipronil among grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) and between grasshoppers and darkling beetles (Tenebrionidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 44, p. 0377-0382, 2003.

Swarup, S., & Verheyen, E. M. Wnt/wingless signaling in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 4, n. 6, p. a007930, 2012.

Syromyatnikov, M. Y., Kokina, A. V., Lopatin, A. V., Starkov, A. A., & Popov, V. N. Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 135, p. 41-46, 2017.

Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 140, p. 5-12, 2018.

Teng, M., Zhu, W., Wang, D., Qi, S., Wang, Y., Yan, J., Dong, K., Zheng, M., & Wang, C. Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, v. 194, p. 112-120, 2018.

Terra, W. R. Evolution of digestive systems of insects. Annual Review of Entomology, v. 35, n. 1, p. 181-200, 1990.

Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *The Embo Journal*, v. 31, n. 12, p. 2714-2736, 2012.

Valzania, L., Mattee, M. T., Strand, M. R., & Brown, M. R. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. *Developmental Biology*, v. 454, n. 1, p. 85-95, 2019.

Veenstra, J. A., Lau, G.W., Agricola, H. J., & Petzel, D. H. Immunohistological localization of regulatory peptides in the midgut of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 104, n. 5, p. 337-347, 1995.

Yu, X., Zhu, Y., Xiao, X., Wang, P., & Cheng, G. Progress towards understanding the mosquito-borne virus life cycle. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 12, p. 1009-1017, 2019.

Zettel, C., & Kaufman, P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Retrieved on August, v. 22, p. 2017, 2012.

3. Objetivos

- Estudar os efeitos tóxicos subletais do fungicida difenoconazol e do herbicida tebutiuron separadamente, na mortalidade, comportamento, atividade antioxidante e as alterações morfológicas do intestino médio das larvas de *A. aegypti* submetidos a diferentes concentrações desses compostos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a mortalidade na fase larval do mosquito, submetidos às diferentes concentrações dos dois compostos;

- Avaliar o comportamento na fase larval do mosquito, submetidos às diferentes concentrações dos dois compostos;

- Avaliar as alterações na morfologia do intestino médio das larvas submetidas ao tratamento com os dois compostos;

- Avaliar a atividade enzimática das larvas submetidas ao tratamento com os dois compostos;

- Avaliar a proliferação celular e o processo de morte celular no intestino médio das larvas de quarto instar tratadas com os dois compostos.

Capítulo 1

Efeitos tóxicos subletais da exposição ao fungicida difenoconazol em larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é uma espécie da ordem Diptera, família Culicidae, os quais são amplamente distribuídos em todo mundo. Produtos químicos têm sido utilizados ao longo de décadas, causando danos ao desenvolvimento do mosquito, como também apresentando efeitos tóxicos a diversos seres vivos. Agroquímicos têm sido utilizados em grande escala na agricultura, onde podem apresentar alta toxicidade a organismos não-alvos. O fungicida difenoconazol apresenta alta toxicidade em diversos organismos aquáticos. No mosquito, o intestino médio é o local onde ocorre a digestão e está associado à infecção de patógenos, tornando-se alvo de importantes estudos. No presente trabalho, analisamos a exposição do fungicida difenoconazol sobre as larvas de quarto instar de *A. aegypti*. Avaliamos os efeitos tóxicos na sobrevivência, morfologia do intestino médio e a atividade de enzimas antioxidantes em diferentes concentrações desse composto (75; 7,5; 3,75 e 1,875 mg/mL⁻³). O difenoconazol causou alta mortalidade na fase larval e diminuiu a atividade locomotora das larvas. Casou danos às células do intestino médio, diminuição da atividade enzimática da SOD, GST e CAT e ativando a apoptose e autofagia das células digestivas. A exposição ao fungicida afetando a diferenciação celular e reorganização do tecido, pela diminuição das proteínas positivas para Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero e reduziu o número de células em proliferação positivas para PH3 e das células enteroendócrinas FMRF-positivas. Assim, o fungicida difenoconazol apresenta toxicidade em larvas de *A. aegypti*, comprometendo sua sobrevivência e desenvolvimento, além de afetar níveis tróficos superiores, uma vez que essa espécie é predada por outras espécies, além de contaminar outras espécies não-alvo que estão no ambiente aquático.

1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* é uma espécie da ordem Diptera, família Culicidae, os quais são amplamente distribuídos em todo mundo (Powell & Tabachnick, 2013; Iwamura et al., 2020). Agroquímicos têm sido utilizados ao longo de décadas, como os inseticidas do grupo dos piretroides, organoclorados e organofosforados, causando danos ao desenvolvimento do mosquito e apresentando efeitos tóxicos subletais a diversos seres vivos, os quais podem estar

ligados a alterações no desenvolvimento, comportamento e tempo de vida do indivíduo (Sanches et al., 2003; Braga & Valle, 2007; Araújo et al., 2015).

Na agricultura diversos agroquímicos têm sido utilizados em grande escala, onde tem como função o combate de doenças nas plantações. Esses produtos são lançados no ambiente, sendo dispersos no ar, no solo e na água, podendo gerar bioacumulação e levar à transferência horizontal, onde apresentam alta toxicidade a organismos não-alvos, como, por exemplo, insetos, peixe e chegar até o homem (Mu et al., 2013; Syromyatnikov et al., 2017; Figueiredo et al., 2019). Resíduos de agrotóxicos já foram detectados em ambientes aquáticos, como em água potável, estações de tratamento de esgoto e rios em todo o mundo. Além disso, muitas regiões brasileiras em que existem alta densidade populacional, não possui boas condições sanitárias, contribuindo para o aumento da contaminação com esses resíduos (Santos & Silva, 2007; Caldas et al., 2019).

Fungicidas são amplamente utilizados por apresentar ação rápida e eficaz no controle de doenças em diferentes culturas agrícolas (Mu et al., 2013; Dong et al., 2013). Um dos fungicidas muito utilizados é o difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) -1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter), que pertence à classe dos fungicidas sistêmicos, com grupamento químico triazol, atuando na inibição da biossíntese de esteróis, que leva a alterações morfológicas e funcionais na membrana celular fúngica (WHO, 2010). Apresenta uma toxicidade aguda relativamente alta para diversos organismos aquáticos e já foi detectado em amostras de água potável e em rios em uma faixa de concentração de 460 ng/L⁻¹ (Mu et al., 2013; Teng et al., 2018; Caldas et al., 2019). Em estudos realizados com peixe-zebra (*D. rerio*), demonstrou que a exposição ao difenoconazol afetou o crescimento em estágios iniciais de vida (Mu et al., 2013; Teng et al., 2017; 2018; Jiang et al., 2020). Esse composto também inibiu a respiração de células musculares e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em abelhas *B. terrestris* (Syromyatnikov et al., 2017). As ROS podem levar ao estresse oxidativo, através do desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação, no entanto, as células possuem defesas enzimáticas que protegem as células contra danos oxidativos (Burton & Jauniaux, 2011). A enzima superóxido dismutase (SOD) atua na defesa celular contra as ROS, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (McCord & Fridovich, 1969). A enzima catalase (CAT), tem como função a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018). E a enzima glutatona S-transferase (GSTs) são as principais enzimas de desintoxicação celular encontradas no citosol, que estão envolvidas na proteção contra vários xenobióticos. Elas

catalisando o ataque da forma reduzida de glutathiona (GSH) a substratos xenobióticos para fins de desintoxicação (Sheehan et al., 2001; Huber et al., 2008).

Nas larvas do mosquito *A. aegypti*, expostas aos agroquímicos de forma oral, o primeiro órgão que entra em contato é o intestino médio. Através do processo de digestão, esses produtos são absorvidos, podendo exercer efeitos negativos em outros locais, como no sistema nervoso (Denecke et al., 2018). O intestino médio do mosquito é formado por um epitélio simples colunar, composto por três tipos celulares, definidas como células digestivas, as células enteroendócrinas e as células-tronco (Billingsley, 1990; Fernandes et al., 2014; Godoy et al., 2021).

Ao logo da remodelação do intestino médio, ocorrem diferentes processos celulares que culminam na proliferação, diferenciação e morte celular do epitélio intestinal. Diferentes vias atuam como amplificadores, retransmissores e integradores de sinais de uma gama diversificada de estímulos extracelulares, controlando os diferentes processos celulares (Sherrin et al., 2011). As proteínas quinases N-terminais c-Jun (JNK/SAPK) são quinases ativadas por estresse, que podem regular várias funções celulares como crescimento celular, diferenciação e apoptose (Vlahopoulos & Zoumpourlis, 2004; Yu et al., 2004; Cargnello & Roux, 2011). As quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) são moléculas de sinalização intracelular das proteínas quinases, envolvidas na regulação da proliferação de células-troncos e em proteínas relacionadas a apoptose (Xia et al., 1995; Lu & Xu, 2006).

A proteína Wnt (*wg*) ativa diferentes vias de transdução intracelular e regulam a proliferação celular e a homeostase dos tecidos adultos (Swarup & Verheyen, 2012; Bejsovec, 2013). A β -catenina conhecida como Armadillo em *D. melanogaster* é uma proteína que desempenha papel crucial na adesão celular, transdução de sinal e estimulação transcricional de genes e compõe uma subunidade da proteína caderina (Bao et al., 2012; Valenta et al., 2012). A caderina desempenha função essencial na morfogênese dos tecidos, estando envolvidas na regulação e coordenação da adesão celular, na sinalização e proliferação celular, como também atuam na morfogênese das microvilosidades (Schlichting et al., 2006; Maître & Heisenberg, 2013; Chen et al., 2020). A via de sinalização celular Notch é um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares, como a diferenciação, a proliferação celular e a apoptose (Bardot et al., 2005). São proteínas transmembranas que se ligam a outras proteínas transmembranas da célula vizinha, como a Delta, ativando assim uma cascata bioquímica (Hayward et al., 2008; Bocci et al., 2020). A proteína prospero é um fator de transcrição neuronal importante na regulação da transição entre a proliferação e a

diferenciação de progenitores neurais durante o desenvolvimento cerebral de *D. melanogaster* e de vertebrados (Choksi et al., 2006).

A exposição do mosquito a diferentes compostos, como os inseticidas Imidacloprido e o Spinosad (Fernandes et al., 2015; 2019), o sulfato de cobre (CuSO_4) (Miranda et al., 2022), o extrato aquoso de sementes de *Moringa oleífera* (Silva et al., 2019) e da borra de café (Miranda et al., 2021), induziram efeitos subletais no desenvolvimento, alterações na morfologia do intestino médio, como desorganização do epitélio, morte celular e redução na proliferação celular. Neste trabalho, foram apresentados os principais efeitos subletais da exposição ao fungicida difenoconazol sobre a sobrevivência, a atividade locomotora, a atividade de enzimas antioxidantes, a morfologia do intestino médio e as proteínas relacionadas a morte, proliferação e diferenciação em larvas de *A. aegypti*.

2. Materiais e métodos

2.1. Insetos

Larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti* (PP-Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil) foram obtidas da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As larvas foram criadas em recipientes com água de torneira filtrada e declorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife; Alcon Pet Ltda, Camboriú, SC, Brasil). Adultos recém-emergidos de ambos os sexos foram alimentados com solução 10% de sacarose, mantidos a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h.

2.2. Bioensaio de mortalidade

A fórmula purificada do fungicida difenoconazol (Difenoconazol PestanalTM, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), foi preparada segundo orientação do fabricante e diluída em água deionizada. Para obtenção das concentrações, seguimos as orientações de formulações comerciais do difenoconazol aplicadas em campo para algumas culturas como algodão, banana e abobrinha (CCAB AGRO S.A., São Paulo-SP, Brasil). Baseados na dose aplicada em campos, obtivemos as seguintes diluições do composto purificado, divididas nas quatro concentrações, para melhor obtermos os efeitos subletais do fungicida, sendo as seguintes: 75 mg/mL^{-3} (equivalente à dose de campo – dife campo), $7,5 \text{ mg/mL}^{-3}$ (equivalente a 10 vezes menor que a dose de campo – dife 10x), $3,75 \text{ mg/mL}^{-3}$ (equivalente a 20 vezes menor que a dose de campo – dife 20x), $1,875 \text{ mg/mL}^{-3}$ (equivalente a 40 vezes menor que a dose de campo – dife 40x). As diluições foram transferidas para uma placa de acrílico, com quatro fileiras, com cinco poços por fileira, totalizando 20 poços por placa. Cada poço continha cinco larvas de quarto instar

(L4) de *A. aegypti*, somando um total de 25 indivíduos por tratamento, expostas por 24h a cada concentração do fungicida e posteriormente transferidas para água deionizada pura, onde deu sequência à avaliação da mortalidade. As larvas foram alimentadas com ração de tartaruga, sendo esta repostada quando necessário. A mortalidade foi avaliada a cada 24h, durante toda a fase larval sendo finalizado quando todas as larvas de cada tratamento atingiram a fase de pupa. Durante a avaliação da sobrevivência, os insetos incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram considerados mortos e descartados (Tomé et al., 2014).

2.3. Bioensaio da atividade larval

Para a análise da atividade larval e todas as seguintes análises, foi selecionada a concentração de campo - 75 mg/mL⁻³ (dife campo - difenoconazol), na qual apresentou efeito tóxico subletal significativo na mortalidade larval (TL₅₀) no período de 24h. A atividade larval foi avaliada 24h após a exposição ao difenoconazol, juntamente com o controle. As larvas foram filmadas em placas de Petri (6 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) durante 10 minutos para registro da atividade locomotora. Os vídeos foram realizados a 30 frames por segundo no espaço de cor RGB. Foram realizadas seis repetições em cada tratamento e cada repetição consistiu em uma placa de Petri com cinco larvas. O software Ethoflow® (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Brasil, BR 512020 000737-6) foi utilizado para analisar os vídeos e determinar a atividade locomotora como movimento espacial das larvas ao longo do tempo em Δpixels/segundo x 10⁻³ (Bernardes et al., 2021).

2.4. Histologia do intestino médio

Larvas L4 de *A. aegypti* expostas ao difenoconazol e as do controle (n = 6), foram dissecadas em solução fisiológica para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄ e 20 mM Na₂HPO₄) e transferidos para tubos de 1,5 mL com solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído a 2% contendo 15% de ácido pícrico em tampão fosfato de sódio a 0,1 M), por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, os intestinos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90, 100%) e embebidos em Histo-resina (Leica Microsystems, Heidelberg Mannheim, Alemanha). Os cortes foram obtido em micrótomo rotatório, seccionados com 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram montadas em meio Eukitt (Fluka), analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Q-Color3 (Olympus Corp., Tóquio, Japan).

2.5. Análise das enzimas antioxidantes

A análise das atividades de catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) foram realizadas com o sobrenadante obtido como a seguir: as larvas expostas ao difenoconazol por 24h e do controle (n = 6) foram homogeneizadas (homogeneizador Tissue Master 125, OMNI) em 1 mL de tampão fosfato e centrifugadas a 10000 x g a 5°C por 10 minutos. A atividade de CAT foi avaliada conforme o método de Aebi (1984) pela mensuração da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio. A atividade de GST foi estimada em espectrofotômetro (Multiskan® FC– Thermo Scientific, OY, US) pela absorção de luz com comprimento de onda de 340 nm, conforme descrito por Habig et al., 1974. A atividade da SOD foi avaliada pelo método espectrofotométrico proposto por Marklund (1974), o qual se baseia na inibição da auto-oxidação do pirogalol (1,2,3-benzeno triol). O pirogalol se auto-oxida rapidamente em solução aquosa, gerando o superóxido e assim tornando a solução com coloração amarelada. A SOD impede a formação do superóxido, catalisando a dismutação desse ânion, inibindo a degradação do pirogalol.

2.6. Imunofluorescência

Para cada teste de imunomarcção utilizamos dez intestinos médios de L4 do tratamento difenoconazol e do controle, dissecados em solução fisiológica para insetos (0.1M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄) e transferidos para solução fixadora de Zamboni por 1h à temperatura ambiente. Após a fixação, os intestinos médios foram submetidos a três lavagens de 30 min cada, em tampão fosfato contendo 1% de Triton X-100 (PBST). Dez intestinos médios por anticorpo, diluídos em PBS 0,1 M, foram incubados por 48h, a 4°C, nos seguintes anticorpos primários produzidos em coelho: anti-caspase-3 clivada (diluição 1:200) (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), anti-fosfo-histona H3 (PH3) (diluição 1:200), anti-LC3A/B (diluição 1:500), anti-Notch1 (diluição 1:200), solução de anticorpo primário p-ERK1/2 (diluição 1:200) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA) e anti-FMRFamida (diluição 1:500) (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, E.U.A). Após as amostras serem lavadas em PBS 0,1 M, os mesmos dez intestinos médios por anticorpo, diluídos em PBS 0,1 M, foram incubados por 48h, a 4°C, nos seguintes anticorpos primários produzidos em camundongo: anti-p-SAPK/JNK (diluição 1:200) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA), anti-Prospero (diluição 1:400), anti-Wingless (Wg)/WNT (diluição 1:400), anti-Armadillo (diluição 1:200), anti-Delta (diluição 1:400), anti-Caderina (diluição 1:400) (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA). Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes (10 min cada) com PBS e incubadas por 24h, a 4°C, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado IgG-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis,

MO, U.S.A) (1:500), no escuro. As amostras foram lavadas novamente em PBS e incubadas por 24h a 4°C, com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado IgG-TRITC (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, Mass. EUA; 1:500), no escuro. As amostras foram então coradas com diamidino-2-fenilindol (DAPI; Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA; 1:500) por 30 min e as lâminas foram montadas em solução de Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), analisadas e fotografadas no microscópio fluorescente Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). O número de células positivas detectadas foi contado para cada anticorpo primário em todo o intestino usando uma objetiva de 40x. Dez intestinos de cada grupo (controle + tratamento) foram preparados como descrito acima sem incubação de anticorpos primários como controles negativos (Farder-Gomes et al., 2021).

2.7. Análise estatística

A sobrevivência larval foi avaliada pelo estimador de Kaplan-Meier. A similaridade das curvas foi testada pelo Log-Rank e as comparações pareadas pelo método de Bonferroni ($p < 0,05$). Para os dados de comportamento, foram calculados a média móvel da atividade locomotora a cada 30 frames do vídeo (i.e., window size of 30 in rolling mean), para o tratamento com dife campo e para o controle, sendo utilizados 6 repetições para cada tratamento. Então, esses dados foram submetidos a testes de Kolmogorov-Smirnov de duas amostras para avaliar diferença na distribuição da atividade locomotora entre os tratamentos. A significância estatística foi acessada considerando $\alpha = 0.05$. Os dados do estresse oxidativo foram comparados pelo teste t , a 5% de significância. Os dados de imunomarcção pelos diferentes anticorpos foi analisado por modelo linear generalizado (GLMs) com distribuição binomial negativa, adequada para dados de contagem (Crawley, 2012). Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, versão 3.4.4, 2018).

3. Resultados

3.1. Efeitos da exposição ao difenoconazol na sobrevivência e na atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*.

A exposição das larvas às diferentes concentrações de difenoconazol, afetaram a sobrevivência ($\chi^2 = 93,7$, $df = 4$, $p < 0,0001$; Fig. 1). As larvas tratadas com dife campo (75 mg/mL⁻³) ($\chi^2 = 46,22$, $df = 4$, $p < 0,0001$), tiveram aproximadamente 80% de mortalidade ainda na fase larval, ocorrendo nos quatro primeiros dias após a exposição (TL₅₀ = 24h). No dife 10x (7,5 mg/mL⁻³) ($\chi^2 = 35,214$, $df = 4$, $p < 0,0001$), houve aproximadamente 60% de mortalidade na fase larval, no tempo de três dias após a exposição (TL₅₀ de 72h). No dife 20x (3,75 mg/mL⁻³)

³) ($\chi^2 = 9,894$, $df = 4$, $p = 0,00497$), a taxa de mortalidade larval foi de 30% no período de cinco dias após a exposição. E na menor concentração, dife 40x (1,875 mg/mL⁻³) ($\chi^2 = 7,857$, $df = 4$, $p = 0,01012$), a mortalidade larval foi de 20% no período de quatro dias após a exposição. Todos os tratamentos diferiram do controle, que não apresentou mortalidade e o período larval foi de aproximadamente cinco dias (Fig. 1.).

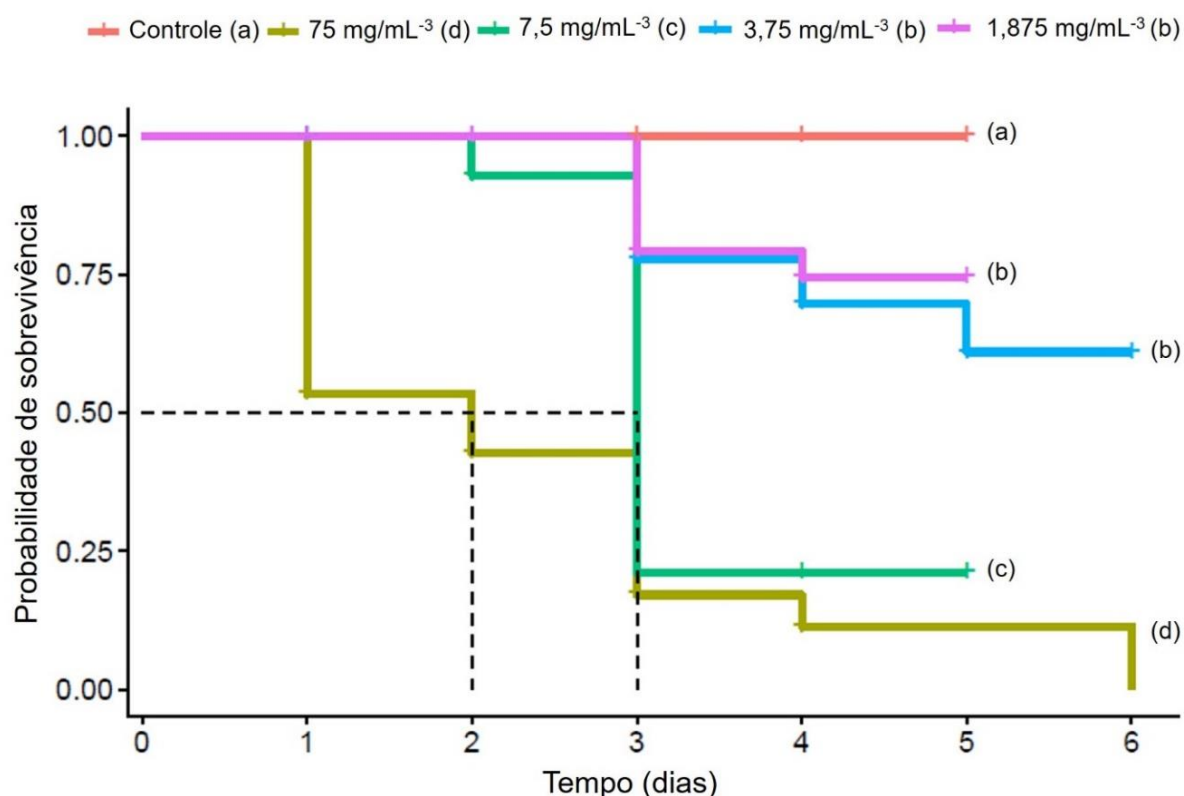


Fig. 1. Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) a diferentes concentrações do fungicida difenoconazol (dife campo (75 mg/mL⁻³), dife 10x (7,5 mg/mL⁻³), dife 20x (3,75 mg/mL⁻³) e dife 40x (1,875 mg/mL⁻³). Curvas com diferentes letras na legenda são significativamente diferentes pelo método de Holm ($p < 0.05$). A linha pontilhada mediana indica o tempo letal (LT₅₀) dos tratamentos que atingiram sobrevivência menor que 50%.

A atividade locomotora das larvas de *A. aegypti* foi significativamente diferente do controle ($D = 0,94$, $p < 0,001$; Fig. 2). As larvas tratadas com o difenoconazol exibiram menor atividade no período de 24h após a exposição em relação ao controle, ao longo do tempo analisado.

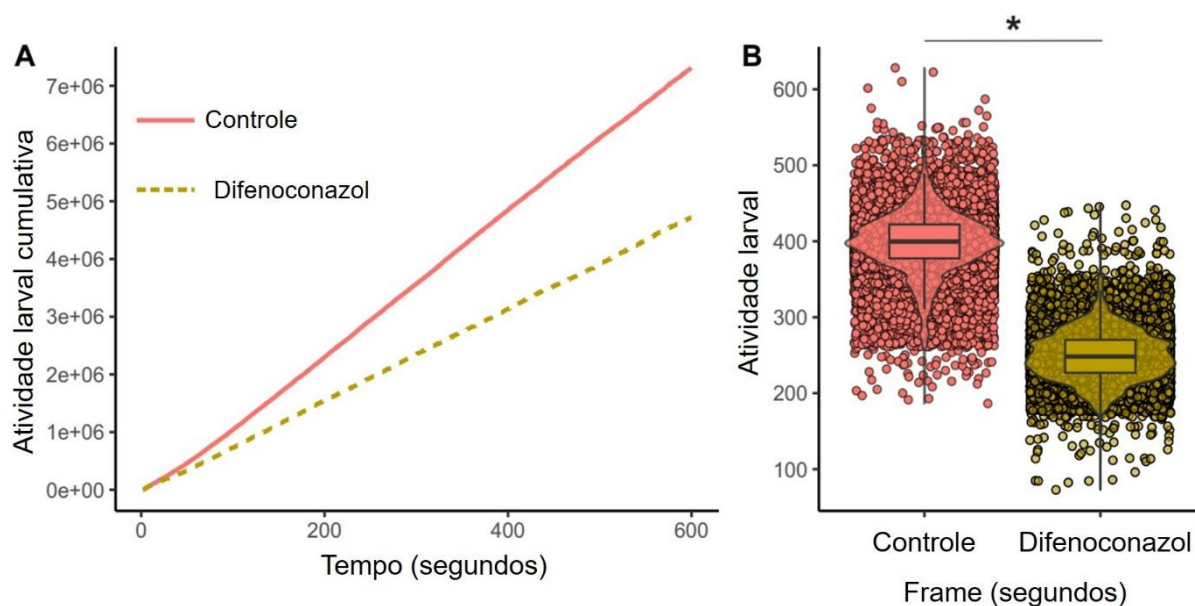


Fig. 2. Atividade locomotora (Δ pixels/segundo $\times 10^{-3}$) das larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol. **(A)** Perfil de atividade acumulada das larvas ao longo do tempo (600 segundos). **(B)** Boxplot da mediana e intervalo de dispersão (quartis inferior e superior) com pontos e violinos demonstrando a distribuição dos valores amostrados em cada frame do vídeo. Asterisco indica distribuição significativamente diferente baseado no teste Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$).

3.2. Efeito da exposição ao difenoconazol na morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*.

O intestino médio larval de *A. aegypti* é formado por um epitélio simples com células colunares, núcleos evidentes e borda estriada bem desenvolvida (Fig. 3A e C). No entanto, as larvas tratadas com difenoconazol apresentaram o epitélio intestinal com algumas alterações na estrutura da célula e a borda estriada apresenta de forma descontínua (Fig. 3B e D).

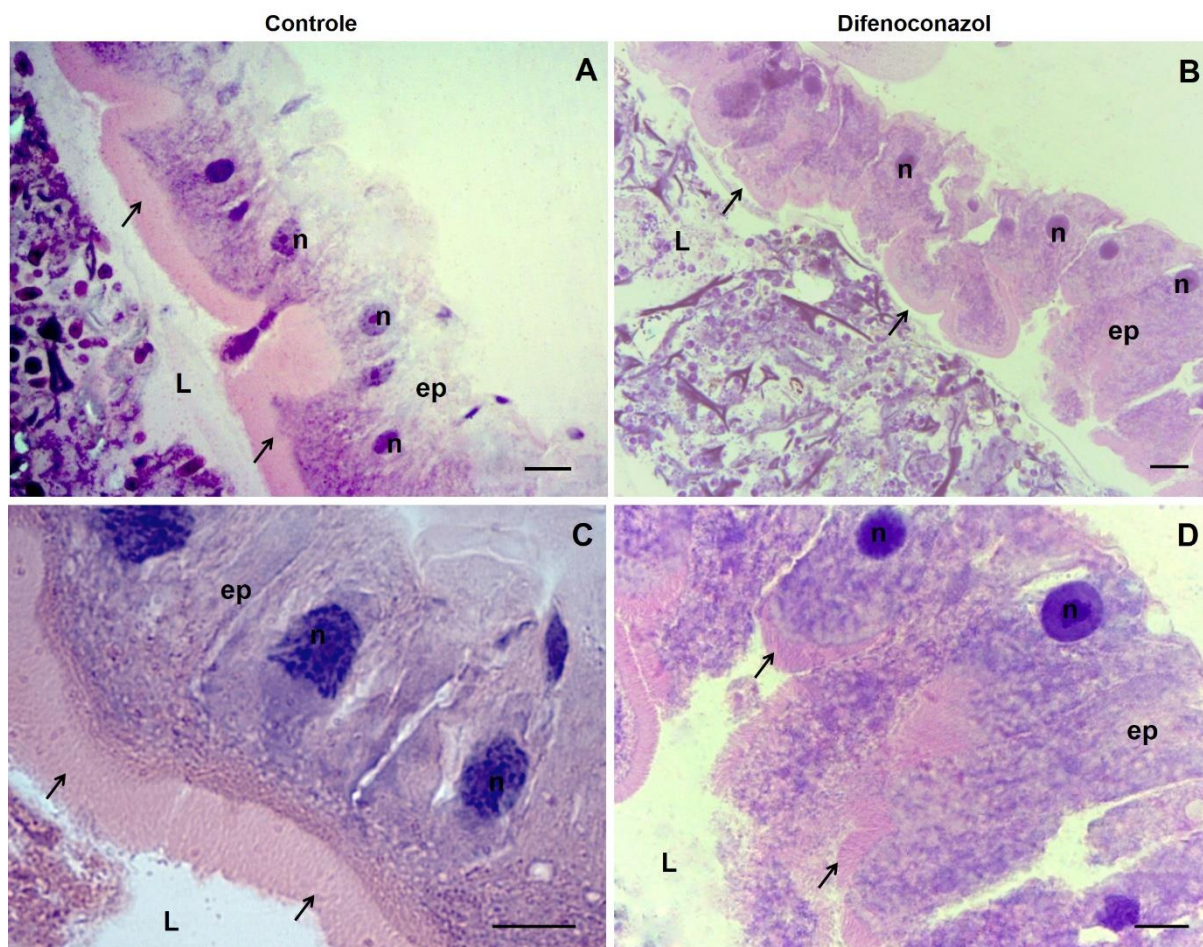


Fig. 3. Secções histológicas do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não exposta (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol por 24h. (A) e (C) Controle, (B) e (D) Tratamento com difenoconazol. **Ep:** Epitélio; **L:** Lúmen; **n:** Núcleo **Seta:** Borda estriada. Coloração por hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 20 μ m.

3.3. Efeitos da exposição ao difenoconazol sobre marcadores de estresse oxidativo, morte celular e na renovação do intestino médio das larvas de *A. aegypti*.

As atividades de SOD ($10,41 \pm 2,977$ U/mg; $t = 5,242$, $df = 8$, $p = 0,0008$), GST ($1,92 \pm 0,2568$ U/mg; $t = 3,153$, $df = 8$, $p < 0,0135$) e CAT ($2,03 \pm 0,08116$ U/mg; $t = 5,32$, $df = 8$, $p = 0,0007$) diminuíram após exposição ao difenoconazol em comparação com os controles ($92,28 \pm 15,33$; $3,676 \pm 0,2985$ e $3,93 \pm 0,5836$, respectivamente) (Fig.4).

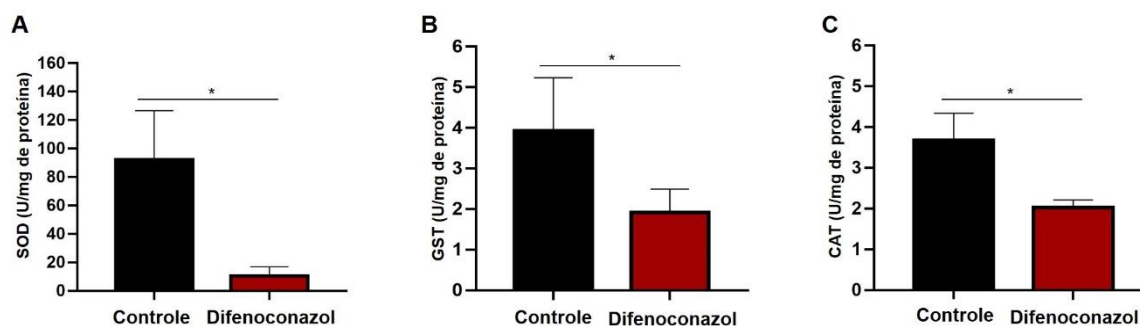


Fig. 4. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutiona S-transferase (GST) e catalase (CAT) em larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol. Os dados são apresentados como média \pm SE. Os asteriscos denotam diferenças significativas pelos testes t ($p < 0,05$).

A quantidade de células positivas para Caspase-3 ($19,4 \pm 2,619$ células; $\chi^2 = 20,417$, $df = 8$, $p < 0,001$) e LC3/AB ($12,8 \pm 1,393$ células; $\chi^2 = 24,236$, $df = 8$, $p < 0,001$) aumentaram no intestino das larvas 24 h após a exposição ao difenoconazol, comparada ao controle ($8,4 \pm 1,03$ e $4,0 \pm 0,8944$ células, respectivamente). No entanto, o número de células positivas para as proteínas JNK ($5,2 \pm 0,8602$ células; $\chi^2 = 8,8345$, $df = 8$, $p < 0,001$) e ERK 1/2 ($4,2 \pm 1,744$ células; $\chi^2 = 26,122$, $df = 8$, $p < 0,001$), diminuíram no intestino médio de larvas tratadas com difenoconazol em relação ao controle ($10,4 \pm 1,077$ e $13,6 \pm 0,9274$ células, respectivamente) (Fig. 5).

O número de células positivas para a proteína Wnt (Wg) ($4,2 \pm 0,8602$ células; $\chi^2 = 44,91$, $df = 8$, $p < 0,001$), Armadillo ($2,0 \pm 0,5477$ células; $\chi^2 = 84,274$, $df = 8$, $p < 0,001$) e Caderina ($2,0 \pm 0,7071$ células; $\chi^2 = 182,45$, $df = 8$, $p < 0,001$), foi menor no intestino médio de larvas tratadas com o difenoconazol em relação ao controle ($21,8 \pm 3,412$, $19,8 \pm 0,3742$ e $35,6 \pm 2,786$ células, respectivamente) (Fig. 6).

O número de células positivas para a proteína Notch ($18,2 \pm 2,634$ células; $\chi^2 = 84,134$, $df = 8$, $p < 0,001$), assim como para a proteína Delta ($5,6 \pm 1,208$ células; $\chi^2 = 87,8$, $df = 8$, $p < 0,001$) e para a proteína Prospero ($4,4 \pm 0,5099$ células; $\chi^2 = 72,306$, $df = 8$, $p < 0,001$) diminuíram em relação ao controle ($75,2 \pm 7,372$, $39,8 \pm 4,974$ e $23,6 \pm 2,249$ células, respectivamente) (Fig. 7). A redução do número de células positivas nas larvas tratadas também ocorreu para as células FMRF-positivas ($6 \pm 1,304$ células; $\chi^2 = 9,6236$, $df = 8$, $p = 0,001921$) e para as células PH3-positivas ($1,8 \pm 0,6633$ células; $\chi^2 = 54,626$, $df = 8$, $p < 0,001$), em relação ao controle ($11,8 \pm 1,241$ e $14,2 \pm 1,158$ células, respectivamente) (Fig. 8).

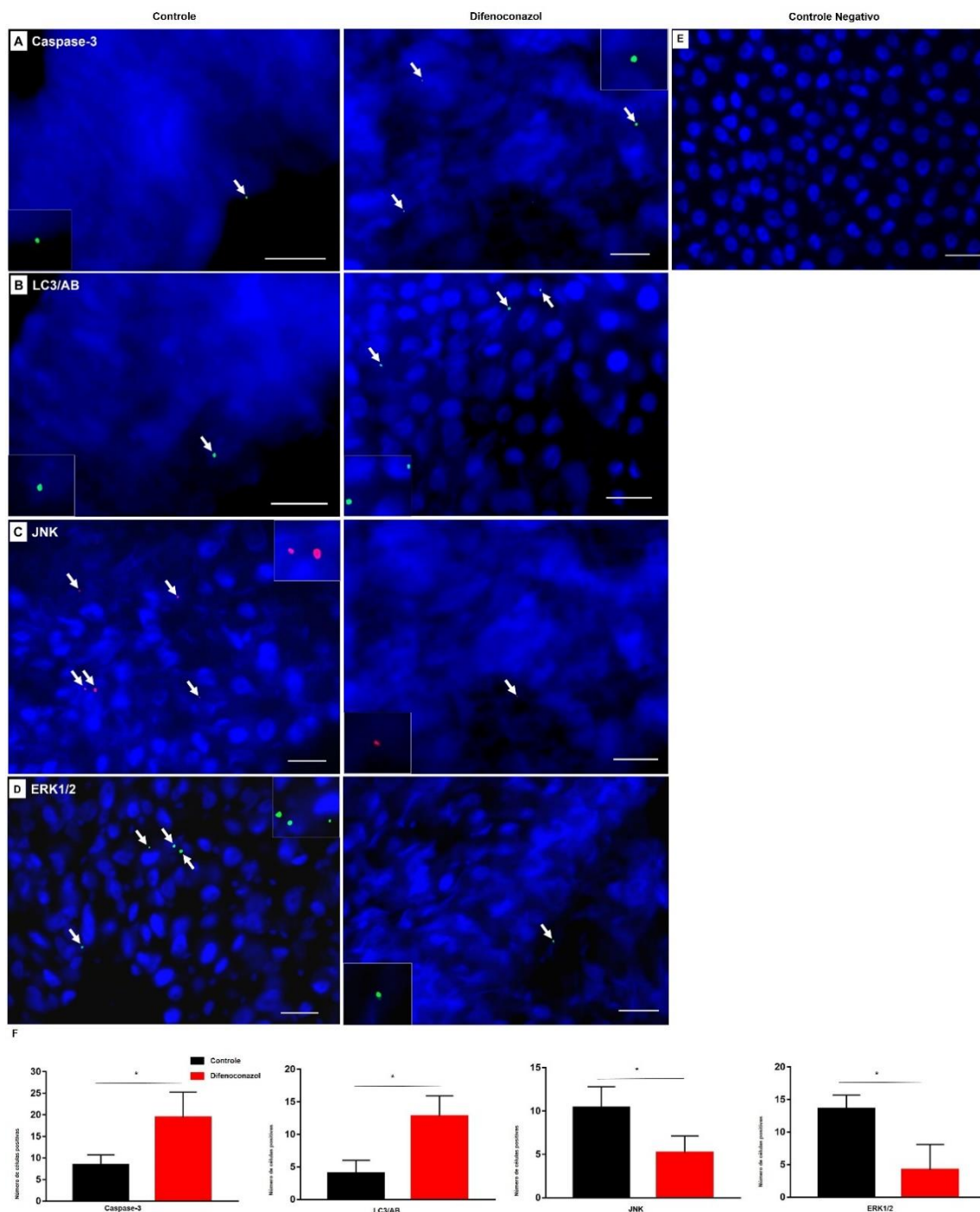


Fig. 5. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol por 24h. (A) Células Caspase-3 positivas (Verde), (B) LC3/AB (Verde), (C) JNK (Verde), (D) ERK 1/2 (Verde) e (E) Controle negativo. Azul: núcleos celulares (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Caspase-3, LC3/AB, JNK e ERK1/2. Barras de escala: 20 μm. (F) Número de células positivas para Caspase-3, LC3/AB, JNK e ERK1/2 no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao difenoconazol. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

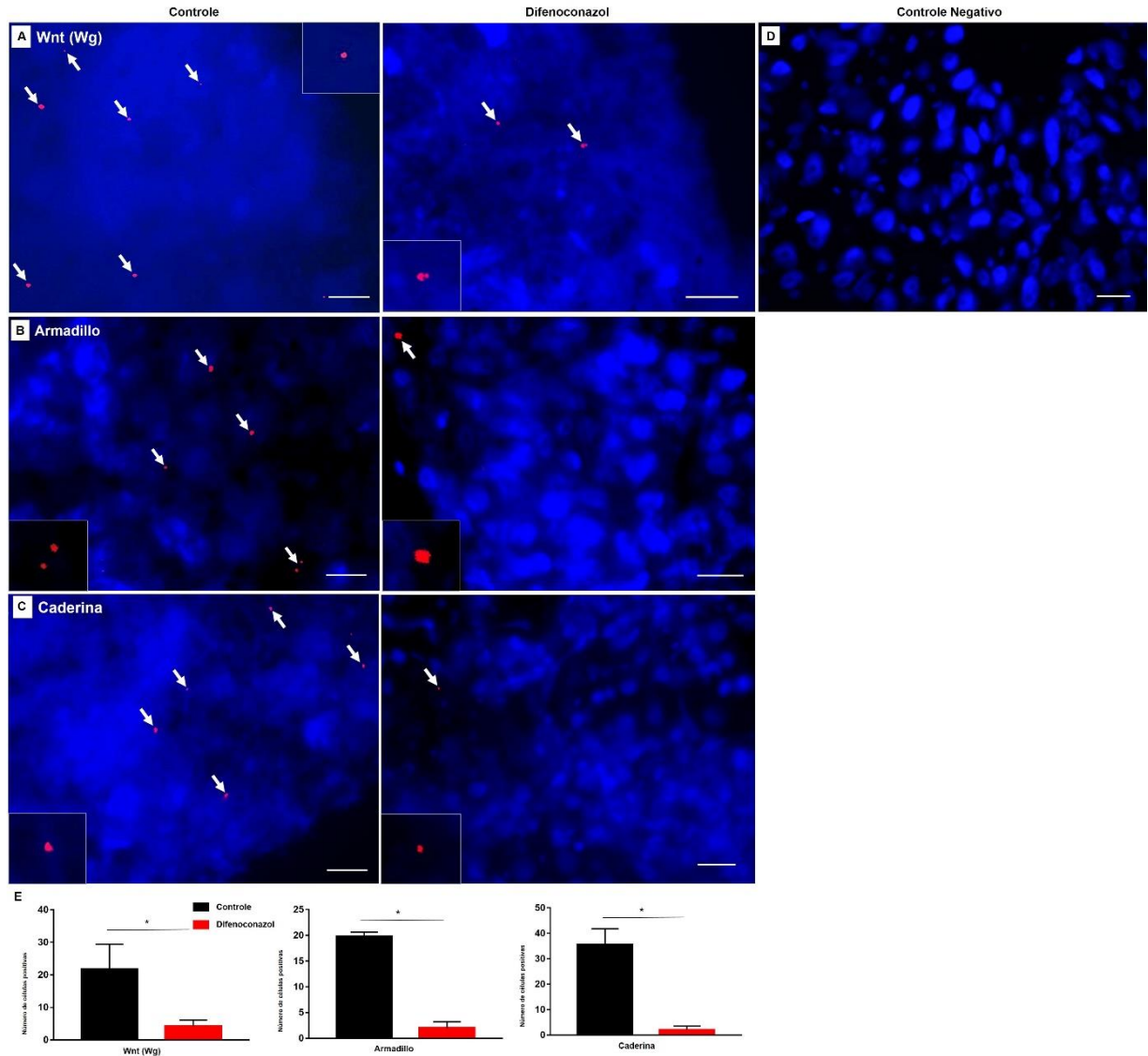


Fig. 6. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol por 24h. (A) Células positivas para Wnt (Wg) (Vermelho), (B) Armadillo (Vermelho), (C) Caderina (Vermelho) e (D) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Wnt (Wg), Armadillo e Caderina. Barras de escala: 20 μ m. (E) Número de células positivas para Wnt (Wg), Armadillo e Caderina no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao difenoconazol. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

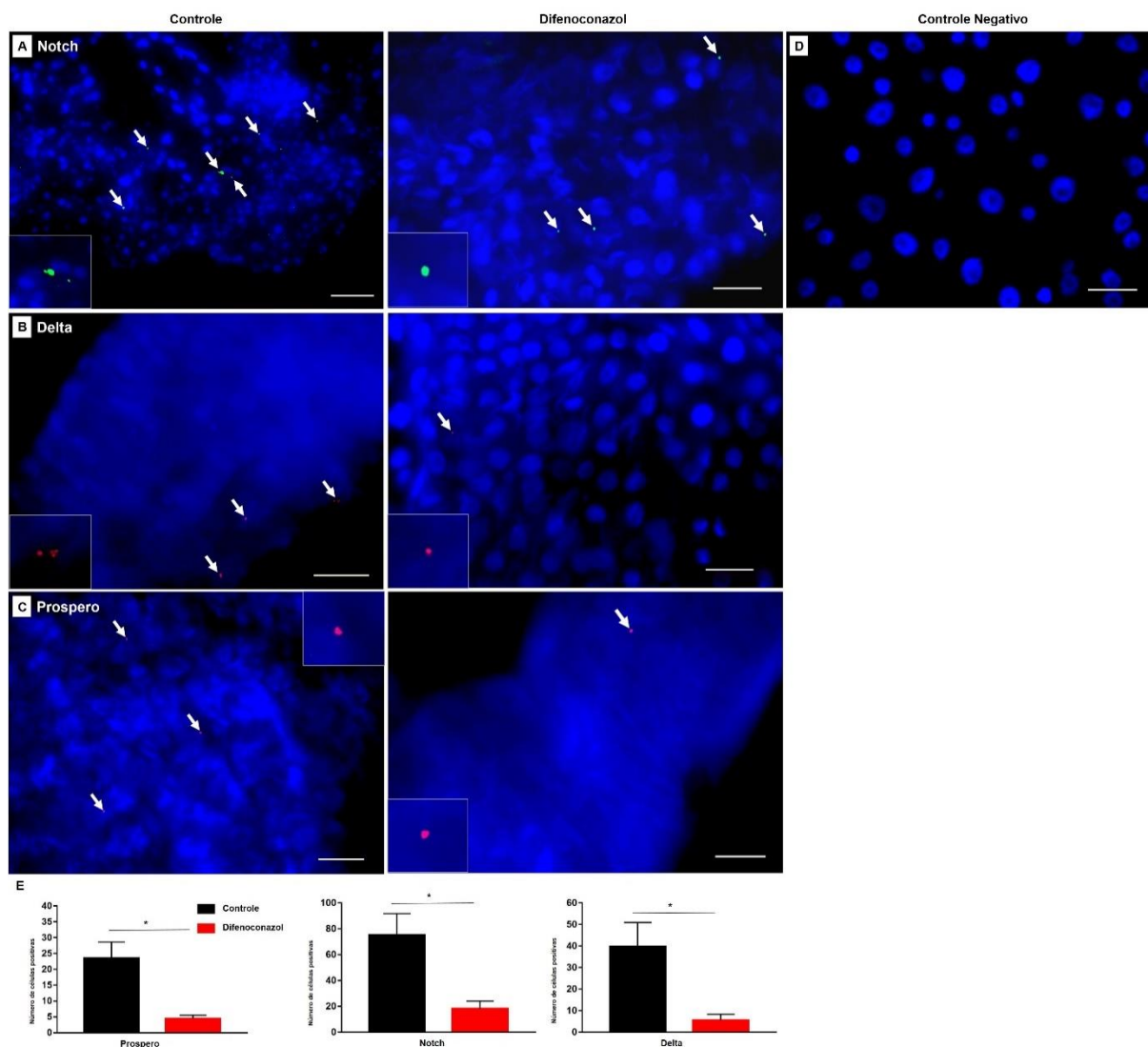


Fig. 7. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol por 24h. (A) Células positivas para as proteínas Notch (Verde), (B) Delta (Vermelho), (C) Prospero (Vermelho) e (D) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Notch, Delta, Prospero, FMFR e para fosfohistona H3 (PH3). Barras de escala: 20 μ m. (E) Número de células positivas para Notch, Delta e Prospero no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao difenoconazol. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

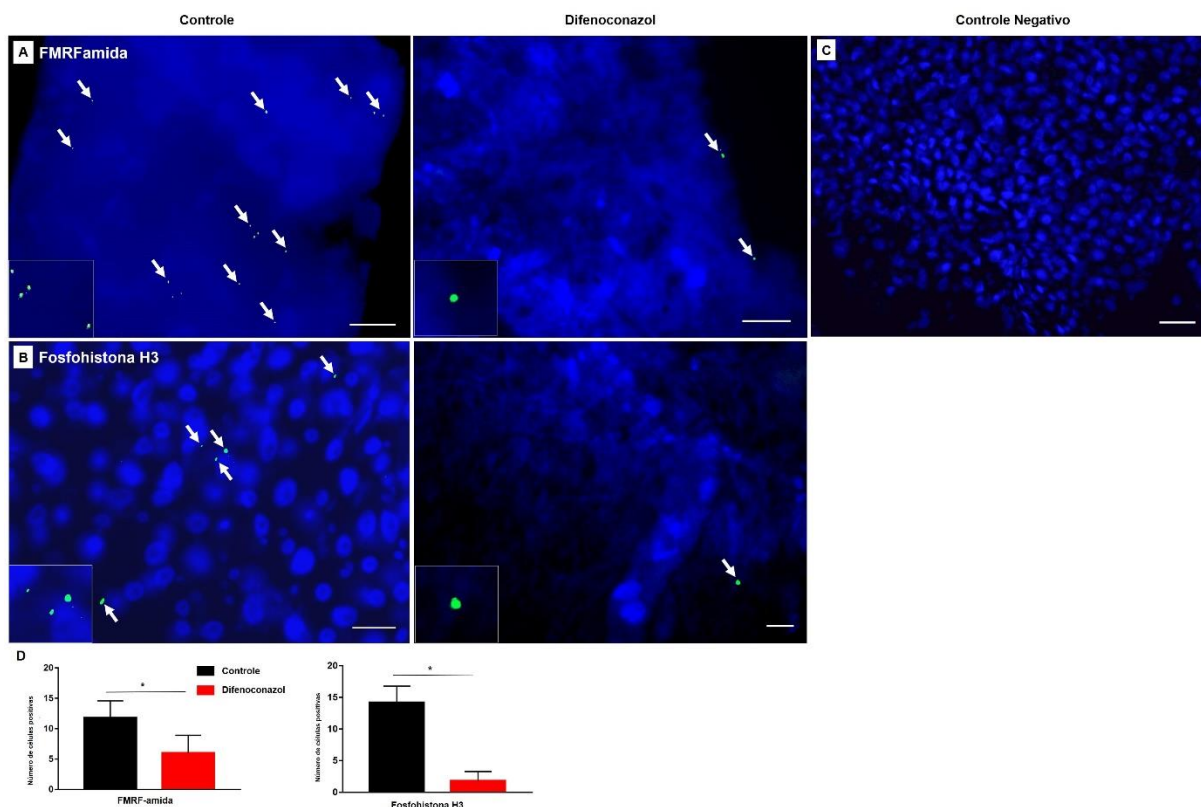


Fig. 8. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do fungicida difenoconazol por 24h. (A) Células enteroendócrinas FMRF-amida positivas (Verde), (B) Células positivas para fosfohistona H3 (PH3) (Verde) e (C) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para FMFR e fosfohistona H3 (PH3). Barras de escala: 20 μ m. (D) Número de células positivas para FMFR e fosfohistona H3 (PH3) no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao difenoconazol. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

4. Discussão

A exposição ao fungicida difenoconazol mostrou que esse agroquímico apresenta efeitos tóxicos em larvas de *A. aegypti*. A exposição ao fungicida apresenta atividade larvicida, como demonstrado na concentração relacionada à usada em campo, onde apresentou maior mortalidade larval, representando assim a TL_{50} em 24h após a exposição. A mortalidade larval pode indicar que as larvas são vulneráveis ao agroquímico, causando toxicidade. Resultados semelhantes foram observados em larvas expostas ao inseticida Imidacloprido, porém, na exposição ao difenoconazol com a dose de campo, 80% dos indivíduos já estavam mortos em quatro dias após a exposição, enquanto para o Imidacloprido levou 10 dias para ter o mesmo resultado (Tomé et al., 2014; Fernandes et al., 2015). A mortalidade relaciona à exposição ao

difenoconazol, também foi relatada em estudos com abelhas-sem-ferrão *Tetragonisca angustula*, onde a mortalidade após 96h de exposição foi de 24% para abelhas expostas ao alimento contaminado e de 58% para abelhas expostas em superfícies tratadas (Leite et al., 2022). Nas larvas de *A. aegypti* ocorre os dois tipos de exposição ao difenoconazol, a oral e a de contato, uma vez que elas estão submersas na solução com o agroquímico, podendo potencializar os efeitos tóxicos. Em estudos com embriões de peixe-zebra, mostrou que a exposição ao difenoconazol apresentou uma TL50 em 96h (Sanches et al., 2018), indicando que o composto pode apresentar efeitos tóxicos mais acentuados em larvas de *A. aegypti*, onde foi demonstrado uma TL50 em 24h.

O difenoconazol afetou a atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*, diminuindo o nado, podendo dificultar o acesso à superfície da água, afetando a respiração, realizada por aberturas de espirais no sifão, localizadas no oitavo segmento abdominal (Carvalho & Moreira, 2017). Além disso, a exposição ao difenoconazol pode inibir a respiração das células musculares, diminuindo a quantidade de energia produzida, comprometendo a locomoção, como visto em abelhas *B. terrestris* (Syromyatnikov et al., 2017). Resultados semelhantes foram vistos por Tomé et al. (2014) onde em tratamentos com os inseticidas Deltametrina e Spinosad houve uma redução na atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*. A baixa atividade das larvas pode ser observadas durante a natação, onde a locomoção é mais lenta e o movimento é mais reto (Tomé et al., 2014). Essa baixa atividade locomotora das larvas de *A. aegypti* também foi vista em tratamentos com borras de café, onde foi demonstrado a diminuição da atividade das larvas expostas aos dois tipos de borras de café descafeinada e comum (Miranda et al., 2021). Assim, a atividade locomotora diminuída pode comprometer a respiração, a alimentação e a sobrevivência larval, como pode também aumentar a predação, uma vez que essas larvas têm movimentos mais lentos.

Efeitos subletais pela exposição ao difenoconazol foi demonstrada pelas alterações na morfologia do intestino médio larval, comprometendo sua função e o desenvolvimento larval. A exposição ao fungicida levou a alterações celulares e a desorganização do epitélio, afetando a fisiologia do intestino médio, comprometendo a digestão e a absorção de nutrientes. Alterações semelhantes foram observadas nos filamentos branquiais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) corroborando com nossos resultados (Virgens et al., 2015). Essas alterações no intestino médio na fase larval, podem comprometer o desenvolvimento do inseto, originando ao final do ciclo adultos com intestinos médios malformados (Fernandes et al., 2015; Miranda et al., 2021, 2022).

A exposição larval ao difenoconazol demonstrou uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT, possivelmente pela seu consumo durante o processo de eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), protegem as células contra danos oxidativos (Burton & Jauniaux, 2011). Os níveis baixos dessas enzimas sugere um desequilíbrio do estado antioxidante, comprometendo a resposta celular, induzindo estresse oxidativo, iniciada pela produção de ROS, provocando danos na membrana plasmática, ao DNA e as proteínas (Wang et al., 2016; López et al., 2017). A diminuição na atividade da enzima GST, foi demonstrada em peixes (*Danio rerio*) expostos ao Fipronil (Wu et al., 2014), indicando um comprometimento no processo de desintoxicação das células, podendo comprometer também a sinalização celular, uma vez que a GST pode ter papel não enzimático, sendo envolvida na inibição da função das proteínas ativadas por mitógeno (MAPK) (Laborde, 2010).

A presença das células apoptóticas em maior número no intestino médio das larvas tratadas com difenoconazol mostra que as células estão em processo de morte celular por apoptose ativada por Caspase-3 e também sugere que as enzimas antioxidantes podem ter falhado em manter os níveis baixos de ROS, levando a ativação da via. Além da ativação da via apoptótica, temos também o aumento do número das células positivas para LC3, indicando que pode está acontecendo outra via de morte celular, a autofagia. Esses dados confirmam que a indução do estresse oxidativo pela produção de ROS, os quais promovem processos apoptóticos e autofágicos nas células (Wang et al., 2016), causados pelos efeitos tóxicos do difenoconazol. Foi demonstrado o aumento do número das células positivas para caspase-3 no intestino médio em estudos com Spinosad em larvas de mosquito *A. aegypti*, e com Fipronil em abelhas *P. helleri* (Fernandes et al., 2019; Farder-Gomes et al., 2021), como também em estudo com mosquitos infectados por vírus (Roekring & Smith, 2010) e pela exposição ao sulfato de cobre (CuSO₄) (Miranda et al., 2022). Assim como no processo apoptótico, demonstrou que houve um aumento das células positivas para autofagia em larvas tratadas, mostrando que a autofagia pode ocorrer paralelamente à apoptose, indicando que houve danos ao intestino médio provocando morte celular pela exposição ao fungicida (Denton et al., 2009; Araújo et al., 2021, Bernardes et al., 2022).

As MAPKs traduzem sinais de uma variedade de receptores transmembranas da superfície celular para compartimentos intracelulares (Vlahopouls & Zoumpourlis, 2004, Laborde, 2010). As quinases N-terminais c-Jun (JNK), podem ser ativadas por mais de um mecanismo, e estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, na apoptose, na diferenciação e proliferação celular (Yu et al., 2004; Sherrin et al., 2011). Quando os níveis intracelulares de ROS estão aumentados, pode desencadear a ativação da via JNK, aumentando a fosforilação e

ativação das JNK (Vlahopoulos & Zoumpourlis, 2004). A via JNK também pode ser ativada por citocinas, que são fatores-chaves na sobrevivência celular (Yu et al., 2004). Assim, a redução no número das células positivas para JNK no intestino médio das larvas tratadas indica um comprometimento na diferenciação celular, prejudicando a recuperação do epitélio intestinal (Mizutani et al., 2003; Yu et al., 2004). A ativação da via ERK 1/2 está relacionada a proporcionar a sobrevivência celular e impedir a apoptose (Xia et al., 1995; Lu & Xu 2006). A diminuição do número dessas células pode indicar que houve um comprometimento nos efeitos antiapoptóticos e na sobrevivência celular (Lu & Xu, 2006).

A proteína Wnt (wg) tem importantes papéis na homeostase, regulando a proliferação celular, a diferenciação e o destino celular (Reya & Clever, 2005; Swarup & Verheyen, 2012; Bejsovec, 2013). A proteína Armadillo está envolvida com a manutenção da adesão celular e a transdução de sinal (Cox et al., 1996; Bao et al., 2012). Ambas estão interligadas, onde na ausência de sinalização de Wnt, o agrupamento citoplasmático de Armadillo sofre degradação por proteínas quinases (Xu & Kimelman, 2007; Bejsovec, 2013). Desse modo, a diminuição do número dessas proteínas nas larvas tratadas com o difenoconazol, pode afetar a renovação celular, indicando menor regeneração epitelial do intestino médio, além da manutenção da adesão celular (Bao et al., 2012; Bejsovec, 2013). Assim como a proteína Armadillo, a Caderina pertence a uma grande família de proteínas transmembranares, que tem função essencial nos processos na adesão celular, na polaridade celular e na proliferação celular, além de ser necessária na morfogênese das microvilosidades (Schlichting et al., 2006; Maître & Heisenberg, 2013; Chen et al., 2020). A redução no número dessas proteínas no epitélio intestinal, como mostrado aqui, pode levar a perda da membrana celular, comprometendo a reorganização do tecido e a adesão celular e pode ter comprometido a formação das microvilosidades, como demonstrado pela morfologia do epitélio intestino médio, pela ausência em algumas regiões (Schlichting et al., 2006; Gooding et al., 2004; Chen et al., 2020).

As proteínas Notch e Prospero tem como função a regulação da manutenção das células-troncos, a diferenciação e a homeostase da célula (Choksi et al., 2006; Cui & Franz, 2020). O Delta é uma proteína de superfície, que se liga ao Notch, onde pode exercer diferentes funções (Bardot et al., 2005; Guo & Ohlstein, 2015; Taracena et al., 2018). O complexo Notch/Delta é um componente montante da via Notch e está envolvido na divisão e diferenciação celular, assim sua redução no epitélio intestinal pode levar a diminuição da diferenciação das células-troncos em células enteroendócrinas (Guo & Ohlstein, 2015; Taracena et al., 2018). A redução da proteína Prospero também poderia afetar a renovação do

epitélio intestinal de *A. aegypti*, uma vez que ela regula a autorenovação e a diferenciação das células-tronco (Choksi et al., 2006; Perdigoto et al., 2011; Cui & Franz, 2020).

A homeostase do intestino médio depende da capacidade de renovação das células que sofreram danos, e isso é dependente das células-troncos que estão presentes no epitélio intestinal (Taracena et al., 2018). As células enteroendócrinas positivas para FMRFamida, tem função importante na homeostase, na motilidade, secreção de enzimas digestivas e na reorganização das fibras musculares, sendo assim, a redução dessas células no epitélio do intestino médio pode interferir na homeostase intestinal, na remodelação intestinal e na reorganização das fibras musculares na transição larva-pupa (Fernandes et al., 2019; Godoy et al., 2021). As células-troncos positivas para fosfohistona-H3, tem papel fundamental na formação do epitélio intestinal durante o desenvolvimento do *A. aegypti* (Hakim et al., 2010). A redução do número dessas células pode afetar a renovação do epitélio intestinal, comprometendo assim a sua manutenção nas fases seguintes de desenvolvimento e durante a metamorfose (Ray et al., 2009; Hakim et al., 2010).

5. Conclusão

O fungicida difenoconazol é tóxico para larvas de *A. aegypti*, causando danos como a morte das larvas expostas e também comprometimento ao nível celular. O fungicida causa alta mortalidade, um comprometimento na atividade de nado das larvas e diminui a atividade das enzimas, importantes na proteção das células contra danos oxidativo. E ainda mais, a exposição causa danos na estrutura do epitélio intestinal, com ativação das vias de apoptose e autofagia das células digestivas e redução em células em diferenciação e em proliferação, como também das células enteroendócrinas. Juntos, esses dados indicam que o fungicida difenoconazol é um produto que compromete o desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. Assim, o difenoconazol pode afetar níveis tróficos superiores, uma vez que essa espécie é predada por outras espécies, além de contaminar outras espécies não-alvo que estão no ambiente aquático. E como o difenoconazol é utilizado comercialmente na agricultura, surgir a importância em ter um certo controle na utilização do mesmo, pois pode atingir espécies aquáticas, como também causar danos a todo o meio ambiente, uma vez que este é administrado na forma de pulverização foliar.

6. Referências bibliográficas

Aebi, H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol, v.105, p. 121-126, 1984.

Akhtar, Z. R., Tariq, K., Mavian, C., Ali, A., Ullah, F., Zang, L. S., Ali, F., Nazir, T., & Ali, S. Trophic transfer and toxicity of heavy metals from dengue mosquito *Aedes aegypti* to predator dragonfly *Tramea cophysa*. *Ecotoxicology*, v. 30, n. 6, p. 1108-1115, 2021.

Araújo R.S., Bernardes R.C., & Martins G.F. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. *Science of the Total Environment*, v. 763, p. 142980, 2021.

Araújo, H. R., Carvalho, D. O., Ioshino, R. S., Costa-da-Silva, A. L., & Capurro, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.

Bao, R., Fischer, T., Bolognesi, R., Brown, S. J., & Friedrich, M. Parallel duplication and partial subfunctionalization of β -catenin/armadillo during insect evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 29, n. 2, p. 647-662, 2012.

Bardot, B., Mok, L. P., Thayer, T., Ahimou, F., & Wesley, C. The Notch amino terminus regulates protein levels and Delta-induced clustering of *Drosophila* Notch receptors. *Experimental Cell Research*, v. 304, n. 1, p. 202-223, 2005.

Bejsovec, A. Wingless/Wnt signaling in *Drosophila*: the pattern and the pathway. *Molecular Reproduction and Development*, v. 80, n. 11, p. 882-894, 2013.

Bernardes, R. C., Fernandes, K. M., Bastos, D. S. S., Freire, A. F. P. A., Lopes, M. P., de Oliveira, L. L., Tavares, M. G., Araújo, R. S., & Martins, G.F. Impact of copper sulfate on survival, behavior, midgut morphology, and antioxidant activity of *Partamona helleri* (Apidae: Meliponini). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 4, p. 6294-6305, 2022.

Bernardes, R. C., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., da Silva, C. B., & Martins, G. F. Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors*, v. 21, n. 9, p. 3237, 2021.

Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219-248, 1990.

Bocci, F., Onuchic, J. N., & Jolly, M. K. Understanding the principles of pattern formation driven by Notch signaling by integrating experiments and theoretical models. *Frontiers in Physiology*, v. 11, p. 929, 2020.

Braga, I. A., & Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

Caldas, S. S., Arias, J. L. O., Rombaldi, C., Mello, L. L., Cerqueira, M. B., Martins, A. F., & Primel, E. G. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in southern Brazil: data on 4-year monitoring. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, p. 71-80, 2019.

Cargnello, M., & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

Carvalho, F. D., & Moreira, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotropical Entomology*, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

Chen, J., Aimanova, K. G., & Gill, S. S. *Aedes* cadherin receptor that mediates *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxicity is essential for mosquito development. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, p. e0007948, 2020.

Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., Steensel B. V., Micklem, G., & Brand, A. H. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, v. 11, n. 6, p. 775-789, 2006.

Cox, R. T., Kirkpatrick, C., & Peifer, M. Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*, v. 134, n. 1, p. 133-148, 1996.

Crawley, M. J. *The R Book*. Second ed, Wiley, 2012.

Cui, Y., & Franz, A. W. Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 103496, 2020.

Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 103, p. 22-35, 2018.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741-1746, 2009.

Dong, F., Li, J., Chankvetadze, B., Cheng, Y., Xu, J., Liu, X., Li, Y., Chen, X., Bertucci, C., Tedesco, D., Zanasi, R., & Zheng, R. (Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environmental Science & Technology*, v. 47, n. 7, p. 3386-3394, 2013.

Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, v. 774, p. 145679, 2021.

Fernandes, K. M., Gonzaga, W. G., Pascini, T. V., Miranda, F. R., Tomé, H. V. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 29, n. 3, p. 245-254, 2015.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506-512, 2014.

Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, v. 221, p. 464-470, 2019.

Figueiredo, L. P., Daam, M. A., Mainardi, G., Mariën, J., Espíndola, E. L., van Gestel, C. A., & Roelofs, D. The use of gene expression to unravel the single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole on survival and reproduction of the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, v. 244, p. 342-350, 2019.

Godoy, R. S., Barbosa, R. C., Procópio, T. F., Costa, B. A., Jacobs-Lorena, M., & Martins, G. F. FMRF-related peptides in *Aedes aegypti* midgut: neuromuscular connections and enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, v. 385, n. 3, p. 585-602, 2021.

Gooding, J. M., Yap, K. L., & Ikura, M. The cadherin–catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*, v. 26, n. 5, p. 497-511, 2004.

Guo, Z., & Ohlstein, B. Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science*, v. 350, n. 6263, p. aab0988, 2015.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biologic Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smaghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593-608, 2010.

Hayward, P., Kalmar, T., & Martinez Arias, A. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development*, v. 135, n. 3, p. 411-424, 2008.

Huber, P. C., Almeida, W. P., & Fátima, Â. D. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Química Nova*, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., & Murray, K. A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

Jiang, J., Chen, L., Wu, S., Lv, L., Liu, X., Wang, Q., & Zhao, X. Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114844, 2020.

Laborde, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death & Differentiation*, v. 17, n. 9, p. 1373-1380, 2010.

Leite, D. T., Sampaio, R. B., Chambó, E. D., Aguiar, C. M. L., de Godoy, M. S., & de Carvalho, C. A. L. (2022). Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, v. 42, n. 1, p. 435-443, 2022.

López, O., Hernández, A. F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Parrón, T., Villanueva, E. & Pla, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, v. 171, n. 3, p. 146-153, 2007.

Lu, Z., & Xu, S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, v. 58, n. 11, p. 621-631, 2006.

Maître, J. L., & Heisenberg, C. P. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Current Biology*, v. 23, n. 14, p. R626-R633, 2013.

Marklund, S., & Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

McCord, JM, & Fridovich, I. uperoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., & Martins, G. F. Biological, histological and immunohistochemical studies on the toxicity of spent coffee grounds and caffeine on the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Environmental Pollution*, v. 271, p. 116307, 2021.

Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Farder-Gomes, C. F., Bernardes, R. C., de Oliveira, A. H., de Castro, M. B. A., Dourado, L. A., Oliveira, L. L., Martins, G. F., & Serrão, J.

E. Exposure to copper sulfate impairs survival, post-embryonic midgut development and reproduction in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 97, p. 105185, 2022.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura, T., & Takashima, I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 5, p. 491-499, 2003.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2005.

Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., & Wang, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, v. 175, p. 147-157, 2013.

Perdigoto, C. N., Schweisguth, F., & Bardin, A. J. Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*, v. 138, n. 21, p. 4585-4595, 2011.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 11-17, 2013.

R Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.4.4. R Foundation for Statistical Computing, 2018. Vienna. <http://www.R-project.org/>.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1-13, 2009.

Reya, T., & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, v. 434, n. 7035, p. 843-850, 2005.

Roekring, S., & Smith, D. R. Duncan R. Induction of apoptosis in densovirus infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 104, n. 3, p. 239-241, 2010.

Samanmali, C., Udayanga, L., Ranathunge, T., Perera, S. J., Hapugoda, M., & Weliwitiya, C. Larvicidal potential of five selected dragonfly nymphs in Sri Lanka over *Aedes aegypti* (Linnaeus) larvae under laboratory settings. *BioMed Research International*, v. 2018, 2018.

Sanches, A. L. M., Daam, M. A., Freitas, E. C., Godoy, A. A., Meireles, G., Almeida, A. R., Domingues, I., & Espíndola, E. L. G. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and

difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. *Chemosphere*, v. 210, p. 531-538, 2018.

Sanches, S. M., DE Campos, S. X., & Vieira, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 54, 2003.

Santos, J. R., & da Silva, J. M. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., & Dahmann, C. Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 6, p. 1184-1195, 2006.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

Sherrin, T., Blank, T., & Todorovic, C. c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Neuroscience*, v. 22, n. 4, p. 403-410, 2011.

Silva, L. L.S., Fernandes, K. M., Miranda, F. R., Silva, S. C. C., Coelho, L. C. B. B., Navarro, D. M. D. A. F., Napoleão, T. H. N., Martins, G. F., & Paiva, P. M. G. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 183, p. 109583, 2019.

Swarup, S., & Verheyen, E. M. Wnt/wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 6, p. a007930, 2012.

Syromyatnikov, M. Y., Kokina, A. V., Lopatin, A. V., Starkov, A. A., & Popov, V. N. Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 135, p. 41-46, 2017.

Taracena, M. L., Bottino-Rojas, V., Talyuli, O. A., Walter-Nuno, A. B., Oliveira, J. H. M., Angleró-Rodríguez, Y. I., Wells, M. B., Dimopoulos, G., Oliveira, P. L., & Paiva-Silva, G. O. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 5, p. e0006498, 2018.

Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 140, p. 5-12, 2018.

Teng, M., Qi, S., Zhu, W., Wang, Y., Wang, D., Yang, Y., Li, H., Li, C., Dong, K., & Wang, C. Sex-specific effects of difenoconazole on the growth hormone endocrine axis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 144, p. 402-408, 2017.

Teng, M., Zhu, W., Wang, D., Qi, S., Wang, Y., Yan, J., Dong, K., Zheng, M., & Wang, C. Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 194, p. 112-120, 2018.

Tomé, H. V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2014.

Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO Journal*, v. 31, n. 12, p. 2714-2736, 2012.

Virgens, A. C., Castro, R. L., & Cruz, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida. *Natureza on Line*, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

Vlahopoulos, S., & Zoumpourlis, V. C. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry*, v. 69, p. 844-854, 2004.

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martinez-Larranaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 46, n. 10, p. 876-899, 2016.

World Health Organization. *Pesticide Residues in Food 2007: Toxicological Evaluations*. World Health Organization, 2010.

Wu, H., Gao, C., Guo, Y., Zhang, Y., Zhang, J., & Ma, E. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 115, p. 9-14, 2014.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., & Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.

Xu, W., & Kimelman, D. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *Journal of Cell Science*, v. 120, n. 19, p. 3337-3344, 2007.

Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J., & Lin, A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell*, v. 13, n. 3, p. 329-340, 2004.

Capítulo 2

Efeitos subletais do herbicida tebutiuron em larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) é amplamente distribuído em todo mundo. Apresentam grande atividade reprodutiva, com ciclo dividido em quatro fases, ovos, larvas, pupas e adultos. As larvas em destaque, passam por quatro instares de desenvolvimento. As larvas e as pupas completam seu desenvolvem em água, podendo entrar em contato com os agroquímicos de forma oral e pelo contato. Diferentes agroquímicos têm sido utilizados no controle do *A. aegypti*, causando danos a esses mosquitos, como também tem mostrado serem tóxicos a diferentes espécies não-alvos. Agroquímicos são usados constantemente na agricultura, dispersos no meio ambiente, atingindo o solo e a água, causam danos aos organismos aquáticos, podendo ser tóxicos a diferentes espécies não-alvo. O tebutiuron é um composto amplamente utilizado na agricultura e seus resíduos tem sido detectado em água superficial em concentrações relativamente altas. Efeitos tóxicos desse herbicida ainda não foi estudado em *A. aegypti*, assim, o objetivo nosso trabalho foi avaliar a exposição do tebutiuron sobre as larvas de quarto instar de *A. aegypti* na sobrevivência, morfologia do intestino médio e na atividade de enzimas antioxidantes em diferentes concentrações do tebutiuron (28,5 e 0,715 mg/mL). A exposição ao tebutiuron causou mortalidade na fase larval, aumento da atividade locomotora, modificações do epitélio do intestino médio larval, diminuição da atividade enzimática da SOD e CAT. A exposição ao herbicida não levou a ativação das células positivas para caspase-3, LC3/AB e JNK. No entanto, houve diminuição das células positivas para ERK 1/2, Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero, afetando a diferenciação celular e reorganização do tecido e também redução do número de células em proliferação positivas para PH3 e das células enteroendócrinas FMRF-positivas. Assim, o tebutiuron apresenta danos importantes ao intestino médio larval, indicando que há uma toxicidade ao *A. aegypti*, comprometimento sua sobrevivência e desenvolvimento. Os dados indicam que além de comprometer a fase larval e interferir no desenvolvimento do mosquito, o herbicida pode afetar outras espécies, o que é necessário mais estudos.

1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) é amplamente distribuído em todo mundo, habitando regiões cada vez mais atípicas para espécies (Powell & Tabachnick, 2013; Iwamura et al., 2020). O *A. aegypti* apresenta grande atividade reprodutiva, associado ao ciclo de vida

curto, desenvolvendo por metamorfose completa (holometábolos), sendo dividido em diferentes fases, caracterizadas pelos ovos, larvas, pupas e adultos (Zettel & Kaufman, 2012; Ranson & Lissenden, 2016). Em destaque, a fase larval possui quatro instares, denominados L1, L2, L3 e L4, que se diferenciam pelo tamanho e possuem um canal alimentar quase reto. As larvas se desenvolvem formando as pupas, ambos estádios completam seu desenvolvimento em água, podendo entrar em contato com os agroquímicos de forma oral e pelo contato (Carvalho & Moreira, 2017; Denecke et al., 2018; Foster & Walker, 2019).

Ao longo dos anos diferentes agroquímicos tem sido desenvolvidos, levando a diferentes danos a diversos organismos não-alvos (Almeida et al., 2018; Jiang et al., 2020). Agroquímicos de uso agrícola são utilizados em grande escala por apresentar ação rápida no combate a doenças em plantas. Esses produtos comerciais, são dispersos no meio ambiente e assim podem ser transportados de diversas maneiras, principalmente pela água, ar e solo, podendo ser tóxicas as diferentes espécies não-alvo, como os mamíferos, peixes e em insetos (Almeida et al., 2018; Bibbs et al., 2018; Oliveira et al., 2020). O uso constante de determinados agroquímicos podem levar a bioacumulação e chegar a contaminar outros organismos não-alvos, como os peixes, insetos e até mesmo o homem, através da contaminação dos ambientes aquáticos (Amiard-Triquet, 2019; Derby et al., 2021; Hartz et al., 2021). Alguns resíduos de agroquímicos, incluindo o tebutiuron, tem sido detectados em ambientes aquáticos. O tebutiuron foi detectado em água superficial em concentrações relativamente altas (até 460 ng L⁻¹), o que pode ser explicado pelo seu amplo espectro de ação sistêmica, sendo utilizado na pulverização foliar ou tratamento de sementes em diversas culturas (Caldas et al., 2019). A presença dessas substâncias nos ecossistemas aquáticos gera descargas constantes de poluentes, que podem causar efeitos crônicos aos organismos e atingir organismos de diferentes níveis tróficos (Américo et al., 2015; Caldas et al., 2019).

O tebutiuron (1-(5-tert-butyl-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl)-one, 3-dimethyl urea) é um dos agroquímicos utilizados no controle de plantas daninhas. Herbicida seletivo, de ação sistêmica, do grupo químico da ureia, cujo mecanismo de ação consiste em inibir a fotossíntese e aumentando a formação de radicais livres (Almeida et al., 2018; Oliveira et al., 2020). Esse composto foi testado em *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo), demonstrando que o herbicida causou desregulação da biossíntese hormonal e perda na espermatogênese, afetando assim as gônadas dos indivíduos (Almeida et al., 2018). Nos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, mostrou que houve redução na reprodução das fêmeas, levando a uma redução na postura dos ovos (Bibbs et al., 2018).

As larvas do mosquito *A. aegypti*, quando em contato com compostos químicos presentes na água, podem ingerir determinadas partículas, e o intestino médio é o primeiro tecido que entra em contato com essas substâncias (Denecke et al., 2018). O intestino médio do *A. aegypti* tem papel fundamental em diversos aspectos da sua biologia, formado por um epitélio simples colunar e duas camadas musculares, sendo o principal local de digestão e absorção de nutrientes (Hecker, 1977; Billingsley, 1990; Park & Shahabuddin, 2000). O epitélio é formado por três tipos celulares, denominadas células digestivas, que tem como função produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos da alimentação; células regenerativas, ou células-troncos, indiferenciadas, fundamentais durante a renovação do epitélio intestinal; e as células enteroendócrinas que secretam hormônios, podendo estar envolvido na motilidade intestinal, na secreção de enzimas digestivas e na maturação dos ovócitos (Moffett & Moffett, 2005; Ray et al., 2009; Godoy et al., 2021; 2023).

Os efeitos subletais de diferentes compostos químicos e de origem vegetal tem sido estudado nos mosquitos *A. aegypti*. A exposição ao inseticida Spinosad em *A. aegypti*, induziu estresse oxidativo, via de apoptose e danos nas células do intestino médio em todas as fases de desenvolvimento do mosquito (Fernandes et al., 2019). Tratamentos com borras de café, mostrou que esses compostos reduziram a sobrevivência larval, a atividade locomotora e retardou o desenvolvimento, além de causar danos ao intestino médio, como alterações na morfologia epitelial, aumento de células positivas para peroxidase e caspase 3, e diminuição do número de células enteroendócrinas e de células em divisão (Miranda et al., 2021). A exposição ao sulfato de cobre (CuSO_4) afetou o desenvolvimento do mosquito e levou a um aumento de células positivas para caspase 3 e redução de células em proliferação (Miranda et al., 2022).

No presente trabalho, foram demonstrados os principais efeitos subletais da exposição ao herbicida tebutiuron sobre a sobrevivência, o comportamento e a atividade de enzimas antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (McCord & Fridovich, 1969). A enzima catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protege as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018). E a enzima glutatona S-transferase (GST), principal enzima de desintoxicação, protege contra vários xenobióticos (Sheehan et al., 2001).

O estudo demonstrou também os efeitos subletais do tebutiuron na morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*, demonstrando as alterações nas diferentes vias relacionados ao processo de proliferação, diferenciação e morte celular, como as vias das

MAPKS (proteínas quinases ativadas por mitogênio), dentre elas as proteínas quinases N-terminais c-Jun (JNK/SAPK), quinases ativadas por estresse, que regulam várias funções celulares como crescimento celular, diferenciação e apoptose (Vlahopoulos & Zoumpoulis, 2004; Yu et al., 2004; Cargnello & Roux, 2011), e as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), envolvidas na regulação da proliferação de células-troncos e em proteínas relacionadas a apoptose (Xia et al., 1995; Lu & Xu, 2006). Também foi demonstrado que a proteína Wnt (wg), que tem como função a regulação da proliferação celular e são necessárias para o desenvolvimento embrionário em animais (Swarup & Verheyen, 2012; Bejsovec, 2013). A proteína β -catenina conhecida como Armadillo em *D. melanogaster*, que tem ligação com a via canônica da Wnt e tem como função a adesão celular, transdução de sinal e estimulação transcricional de genes (Bao et al., 2012; Valenta et al., 2012). Além disso, a β -catenina compõe uma subunidade da proteína caderina, na qual essa proteína tem função essencial na regulação e coordenação da adesão celular, na polaridade e proliferação celular e na morfogênese das microvilosidades (Gooding et al., 2004; Schlichting et al., 2006; Maître & Heisenberg, 2013; Chen et al., 2020). Foi investigada no intestino médio das larvas de *A. aegypti*, a via de sinalização celular Notch que governa e coordena as atividades e funções celulares, como a diferenciação e a proliferação celular e a apoptose (Bardot et al., 2005). As proteínas Notch se ligam a outras proteínas transmembranas da célula vizinha, como a Delta, ativando assim uma cascata bioquímica (Bocci et al., 2020). A presença da proteína Prospero também foi investigada no intestino médio. A Prospero um fator de transcrição neuronal que regula a transição entre a proliferação e a diferenciação de progenitores neurais durante o desenvolvimento cerebral de *D. melanogaster* (Choksi et al., 2006). Assim, o objetivo nosso trabalho foi avaliar a exposição do herbicida tebutiuron sobre as larvas de quarto instar de *A. aegypti* na sobrevivência, na atividade de enzimas antioxidantes e na morfologia do intestino médio em diferentes concentrações do herbicida tebutiuron.

2. Materiais e métodos

2.1. Insetos

Larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti* (PP-Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil) foram obtidas da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As larvas foram criadas em recipientes com água de torneira filtrada e declorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife; Alcon Pet Ltda, Camboriú, SC, Brasil). Adultos recém-emergidos de ambos os sexos foram alimentados com solução 10% de sacarose, mantidos a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h.

2.2. Bioensaio de mortalidade

A fórmula purificada do herbicida tebutiuron (Tebuthiuron PestanalTM, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), foi preparada segundo orientação do fabricante e posteriormente diluída em água deionizada. Para obtenção das concentrações, seguimos a orientação de formulações comerciais do tebutiuron aplicadas em campo para controle de algumas plantas daninhas, utilizado principalmente nas culturas de cana-de-açúcar (Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda, Porto Alegre - RS, Brasil). Baseados na dose aplicada em campo, obtivemos as seguintes diluições do composto purificado, divididas nas duas concentrações, para melhor obtermos os efeitos subletais do herbicida, sendo as seguintes: 28,5 mg/mL (equivalente à dose de campo – tebu campo) e 0,715 mg/mL (equivalente a 40 vezes menor que a dose de campo – tebu 40x). As diluições foram transferidas para uma placa de acrílico, com quatro fileiras, com cinco poços por fileira, totalizando 20 poços por placa. Cada poço continha cinco larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti*, somando um total de 25 indivíduos por tratamento, expostas por 24h a cada concentração do herbicida e posteriormente transferidas para água de torneira filtrada e declorada, onde deu sequência à avaliação da mortalidade. As larvas foram alimentadas com ração de tartaruga, sendo esta repostada quando necessário. A mortalidade foi avaliada a cada 24h, durante toda a fase larval, sendo finalizado quando todas as larvas de cada tratamento atingiram a fase de pupa. Durante a avaliação da sobrevivência, os insetos incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram considerados mortos e descartados (Tomé et al., 2014).

2.3. Bioensaio da atividade larval

Para a análise da atividade larval e todas as seguintes, foi selecionada a concentração de campo - 28,5 mg/mL (tebu campo - tebutiuron), na qual apresentou efeito tóxico subletal significativo na mortalidade larval (TL₅₀) no período de 24h. A atividade larval foi avaliada 24h após a exposição ao tebutiuron e o controle. As larvas foram filmadas em placas de Petri (6 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) durante 10 minutos para registro da atividade locomotora. Os vídeos foram realizados a 30 frames por segundo no espaço de cor RGB. Foram realizadas seis repetições em cada tratamento e cada repetição consistiu em uma placa de Petri com cinco larvas. O software Ethoflow® (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Brasil, BR 512020 000737-6) foi utilizado para analisar os vídeos e determinar a atividade locomotora como movimento espacial das larvas ao longo do tempo em $\Delta\text{pixels}/\text{segundo} \times 10^{-3}$ (Bernardes et al., 2021).

2.4. Histologia do intestino médio

Larvas L4 de *A. aegypti* expostas ao tebutiuron e as do controle ($n = 6$), foram dissecadas em solução fisiológica para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 e 20 mM Na_2HPO_4) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído a 2% contendo 15% de ácido pícrico em tampão fosfato de sódio há 0,1 M), por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, os intestinos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90, 100%) e embebidos em Histoiresina (Leica Microsystems, Heidelberg Mannheim, Alemanha). Os cortes foram obtido em micrótomo rotatório, seccionados com 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram montadas em meio Eukitt (Fluka), analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Q-Color3 (Olympus Corp., Tóquio, Japan).

2.5. Análise das enzimas antioxidantes

A análise das atividades de catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) foram realizadas com o sobrenadante obtido como a seguir: as larvas expostas ao tebutiuron por 24h e do controle ($n=6$) foram homogeneizadas (homogeneizador Tissue Master 125, OMNI) em 1 mL de tampão fosfato e centrifugadas a 10000 x g a 5°C por 10 minutos. A atividade de CAT foi avaliada conforme o método de Aebi (1984) pela mensuração da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio. A atividade de GST foi estimada em espectrofotômetro (Multiskan® FC– Thermo Scientific, OY, US) pela absorção de luz com comprimento de onda de 340 nm, conforme descrito por Habig et al., 1974. A atividade da SOD foi avaliada pelo método espectrofotométrico proposto por Marklund (1974), o qual se baseia na inibição da auto-oxidação do pirogalol (1,2,3-benzeno triol). O pirogalol se auto-oxida rapidamente em solução aquosa, gerando o superóxido e assim tornando a solução com coloração amarelada. A SOD impede a formação do superóxido, catalisando a dismutação desse ânion, inibindo a degradação do pirogalol.

2.6. Imunofluorescência

Para cada teste de imunomarcção utilizamos dez intestinos médios de L4 do tratamento tebutiuron e do controle, dissecados em solução fisiológica para insetos (0.1M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4) e transferidos para solução fixadora de Zamboni por 1h à temperatura ambiente. Após a fixação, os intestinos médios foram submetidos a três lavagens de 30 min cada, em tampão fosfato contendo 1% de Triton X-100 (PBST). Dez intestinos médios por anticorpo, diluídos em PBS 0,1 M, foram incubados por 48h, a 4°C, nos seguintes

anticorpos primários produzidos em coelho: anti-caspase-3 clivada (diluição 1:200) (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA), anti-fosfo-histona H3 (PH3) (diluição 1:200), anti-LC3A/B (diluição 1:500), anti-Notch1 (diluição 1:200), solução de anticorpo primário p-ERK1/2 (diluição 1:200) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA) e anti-FMRFamida (diluição 1:500) (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, E.U.A). Após as amostras serem lavadas em PBS 0,1 M, os mesmos dez intestinos médios por anticorpo, diluídos em PBS 0,1 M, foram incubados por 48h, a 4°C, nos seguintes anticorpos primários produzidos em camundongo: anti-p-SAPK/JNK (diluição 1:200) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA), anti-Prospero (diluição 1:400), anti-Wingless (Wg)/WNT (diluição 1:400), anti-Armadillo (diluição 1:200), anti-Delta (diluição 1:400), anti-Caderina (diluição 1:400) (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, EUA). Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes (10 min cada) com PBS e incubadas por 24h, a 4°C, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado IgG-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, U.S.A) (1:500), no escuro. As amostras foram lavadas novamente em PBS e incubadas por 24h a 4°C, com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado IgG-TRITC (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, Mass. EUA; 1:500), no escuro. As amostras foram então coradas com diamidino-2-fenilindol (DAPI; Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA; 1:500) por 30 min e as lâminas foram montadas em solução de Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), analisadas e fotografadas no microscópio fluorescente Evos M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). O número de células positivas detectadas foi contado para cada anticorpo primário em todo o intestino usando uma objetiva de 40x. Dez intestinos de cada grupo (controle + tratamento) foram preparados como descrito acima sem incubação de anticorpos primários como controles negativos (Farder-Gomes et al., 2021).

2.7. Análise estatística

A sobrevivência larval foi avaliada pelo estimador de Kaplan-Meier. A similaridade das curvas foi testada pelo Log-Rank e as comparações pareadas pelo método de Bonferroni ($p < 0,05$). Para os dados de comportamento, foram calculados a média móvel da atividade locomotora a cada 30 frames do vídeo (i.e., window size of 30 in rolling mean), para o tratamento com tebu campo e para o controle, sendo utilizados 6 repetições para cada tratamento. Então, esses dados foram submetidos a testes de Kolmogorov-Smirnov de duas amostras para avaliar diferença na distribuição da atividade locomotora entre os tratamentos. A significância estatística foi acessada considerando $\alpha = 0.05$. Os dados do estresse oxidativo foram comparados pelo teste t , a 5% de significância. Os dados de imunocoloração pelos

diferentes anticorpos, foi analisado por modelo linear generalizado (GLMs) com distribuição binomial negativa, adequada para dados de contagem (Crawley, 2012). Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, versão 3.4.4, 2018).

3. Resultados

3.1. Efeitos da exposição ao herbicida tebutiuron na sobrevivência e na atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*.

A exposição das larvas ao herbicida tebutiuron, na concentração de tebu campo (28,5 mg/mL) e tebu 40x (0,715 mg/mL), afetou a sobrevivência das larvas de *A. aegypti* ($\chi^2 = 36,6$, $df = 2$, $p < 0,0001$; Fig. 1). A concentração de tebu campo (28,5 mg/mL) ($\chi^2 = 22,558$, $df = 2$, $p < 0,0001$), teve 50% das larvas mortas no período de três dias após a exposição (CL₅₀ de 72h). No tratamento com tebu 40x (0,715 mg/mL) ($\chi^2 = 1$, $df = 2$, $p = 0,32$), a mortalidade foi inferior, onde teve apenas 3% de morte na fase larval, ocorrendo no terceiro dia após a exposição. Ambos tratamentos diferiram do controle, no qual não apresentou mortalidade larval (Fig. 1.).

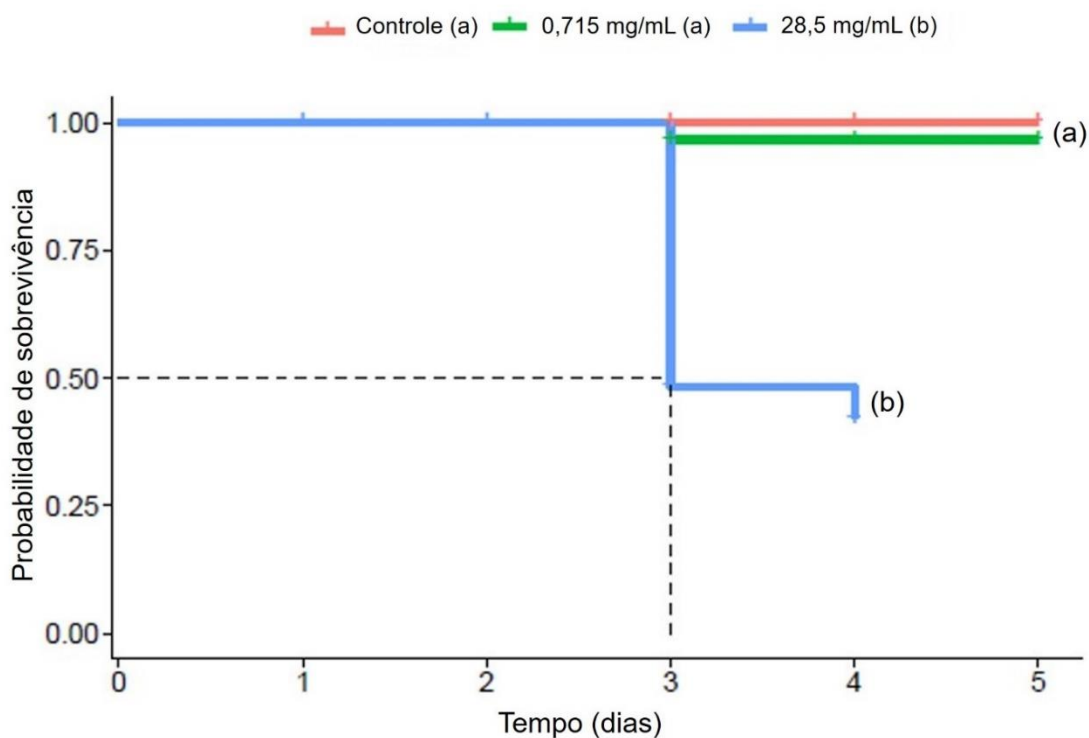


Fig. 1. Sobrevivência das larvas de *Aedes aegypti* expostas e não exposta (controle) a diferentes concentrações do herbicida tebutiuron (tebu campo (28,5 mg/mL) e tebu 40x (0,715 mg/mL). Curvas com diferentes letras na legenda são significativamente diferentes pelo método de Holm ($p < 0,05$). A linha pontilhada mediana indica o tempo letal (LT₅₀) dos tratamentos que atingiram sobrevivência menor que 50%.

A atividade locomotora das larvas de *A. aegypti* foi significativamente diferente do controle ($D = 0,59$, $p < 0,001$; Fig. 2). As larvas expostas ao herbicida tebutiuron exibiram maior atividade locomotora no período de 24h após a exposição em relação ao controle, ao longo do tempo analisado.

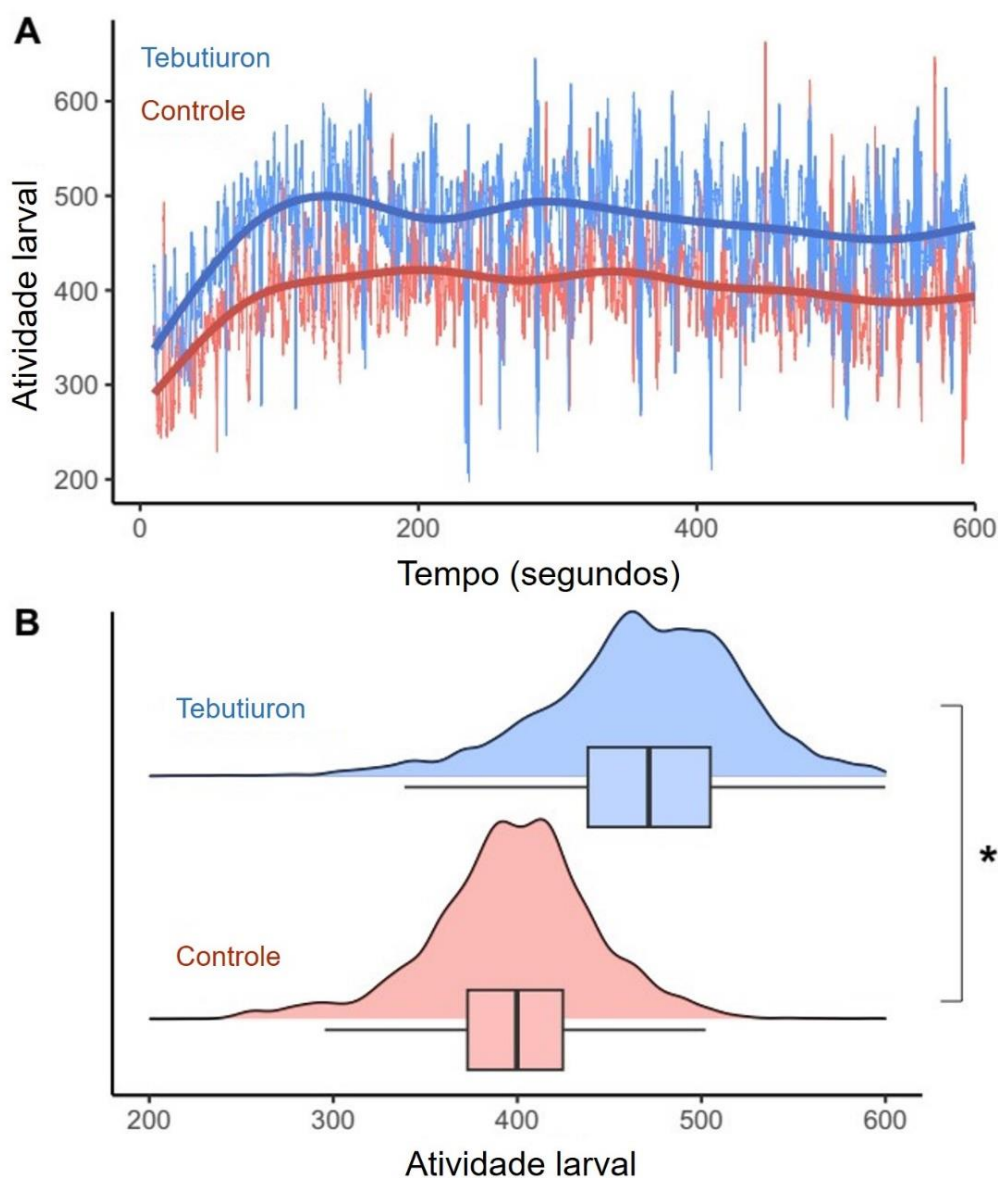


Fig. 2. Atividade locomotora (Δ pixels/segundo $\times 10^{-3}$) de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron. (A) Perfil de atividade instantânea das larvas ao longo do tempo (600 segundos). (B) Distribuição do nível de atividade atingida pelas larvas em cada tratamento com boxplot indicando mediana, intervalo de dispersão (quartis inferior e superior) dos valores amostrados em cada frame do vídeo. Asterisco indica distribuição significativamente diferente baseado no teste Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$).

3.2. Efeitos da exposição ao herbicida tebutiuron na morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*.

O intestino médio das larvas controles apresentaram epitélio simples colunar, núcleo evidente e borda estriada bem desenvolvida (Fig. 3A e C). Nas larvas tratadas com o herbicida tebutiuron nota-se que o epitélio intestinal apresenta de forma desorganizada, sem borda estriada e com formação de vacúolos, liberados pelas células (Fig. 3B e D).

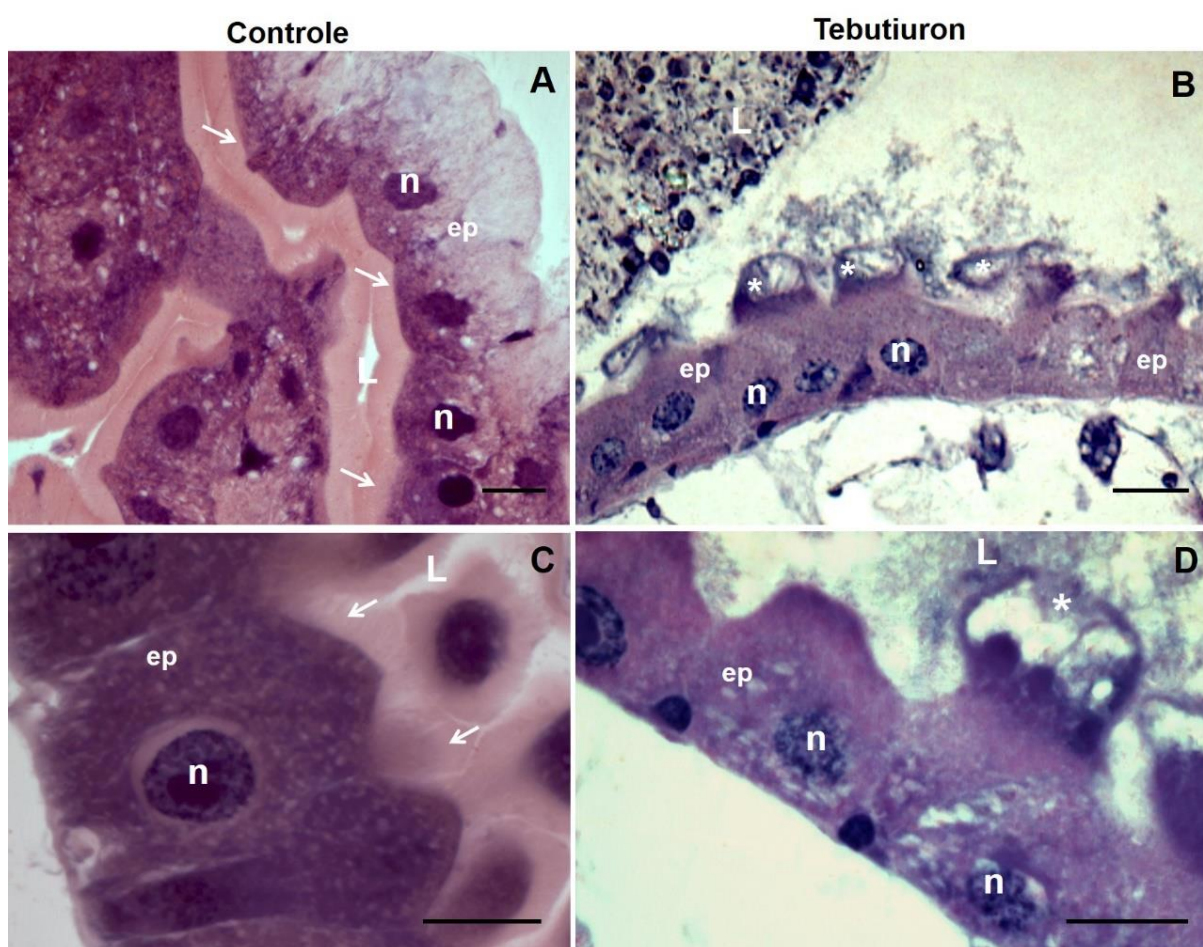


Fig. 3. Cortes histológicas do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração do herbicida tebutiuron por 24h. (A) e (C) Controle, (B) e (D) Tratamento com tebutiuron. **Ep:** Epitélio; **L:** Lúmen; **n:** Núcleo **Seta:** Borda estriada; e *: secreções apócrinas. Coloração por hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: 20 μ m.

3.3. Efeitos da exposição ao tebutiuron sobre marcadores de estresse oxidativo, morte celular e na renovação do intestino médio das larval de *A. aegypti*.

As atividades das enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT foram avaliadas. A atividade de SOD ($25,01 \pm 6,583$ U/mg; $t = 4,031$, $df = 8$, $p = 0,0038$), CAT ($1,984 \pm 0,3315$

U/mg; $t = 3,792$, $df = 8$, $p = 0,0053$) diminuíram, enquanto a GST ($2,467 \pm 0,3185$ U/mg; $t = 2,201$, $df = 8$, $p < 0,0589$) não teve diferença significativa em relação ao controle ($92,28 \pm 15,33$; $3,676 \pm 0,2985$ e $3,93 \pm 0,5836$, respectivamente) (Fig.4).

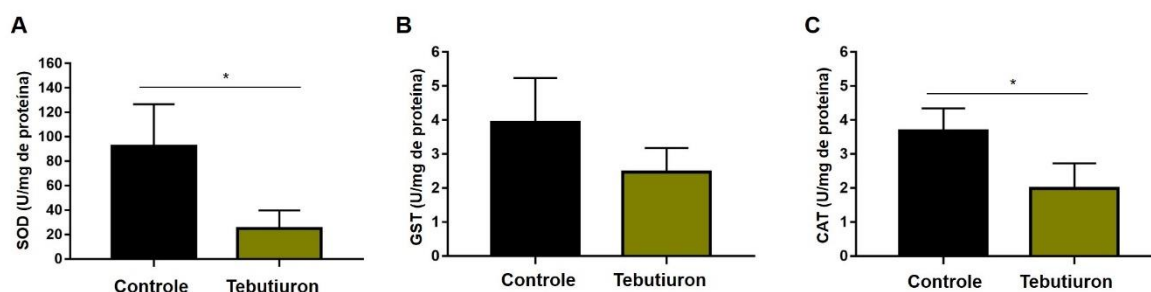


Fig. 4. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa S-transferase (GST) e catalase (CAT) em larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron. Os dados são apresentados como média \pm SE. Os asteriscos denotam diferenças significativas pelos testes t ($p < 0,05$).

As células positivas para Caspase-3 ($9,6,2 \pm 0,6782$ células; $\chi^2 = 0,29093$, $df = 8$, $p = 0,3430$), LC3/AB ($4,6 \pm 0,9798$ células; $\chi^2 = 0,20946$, $df = 8$, $p = 0,6472$) e JNK ($7,6 \pm 1,03$ células; $\chi^2 = 2,1866$, $df = 8$, $p = 0,1392$), não diferiram em relação ao controle ($8,4 \pm 1,03$, $4,0 \pm 0,8944$ e $10,4 \pm 1,077$ células, respectivamente). No entanto, na via de sinalização ERK 1/2 ($0,4 \pm 0,2449$ células; $\chi^2 = 78,869$, $df = 8$, $p < 0,001$), as células positivas diminuíram em relação ao controle ($13,6 \pm 0,9274$ células) (Fig. 5).

O número de células positivas para a proteína Wnt (Wg) ($1,0 \pm 0,3162$ células; $\chi^2 = 84,453$, $df = 8$, $p < 0,001$), Armadillo ($2,0 \pm 0,4472$ células; $\chi^2 = 84,275$, $df = 8$, $p < 0,001$) e Caderina ($0,8 \pm 0,3742$ células; $\chi^2 = 213,8$, $df = 8$, $p < 0,001$), reduziram em relação ao controle ($21,8 \pm 3,412$, $19,8 \pm 0,3742$ e $35,6 \pm 2,786$ células, respectivamente) (Fig. 6).

O número de células positivas para Notch ($11,4 \pm 1,327$ células; $\chi^2 = 144,84$, $df = 8$, $p < 0,001$) assim como para Delta ($4,2 \pm 0,8602$ células; $\chi^2 = 106,44$, $df = 8$, $p < 0,001$) e Prospero ($3,0 \pm 0,4472$ células; $\chi^2 = 90,663$, $df = 8$, $p < 0,001$), diminuiu em relação ao controle ($75,2 \pm 7,372$, $39,8 \pm 4,974$ e $23,6 \pm 2,249$ células, respectivamente) (Fig. 7). A redução do número das células positivas também ocorreu para as células FMRF-positivas ($2,6 \pm 0,5099$ células; $\chi^2 = 31,81$, $df = 8$, $p < 0,001$) e para as células endócrinas PH3-positivas ($0,4 \pm 0,2449$ células; $\chi^2 = 82,856$, $df = 8$, $p < 0,001$), em relação ao controle ($11,8 \pm 1,241$ e $14,2 \pm 1,158$ células, respectivamente) (Fig. 8).

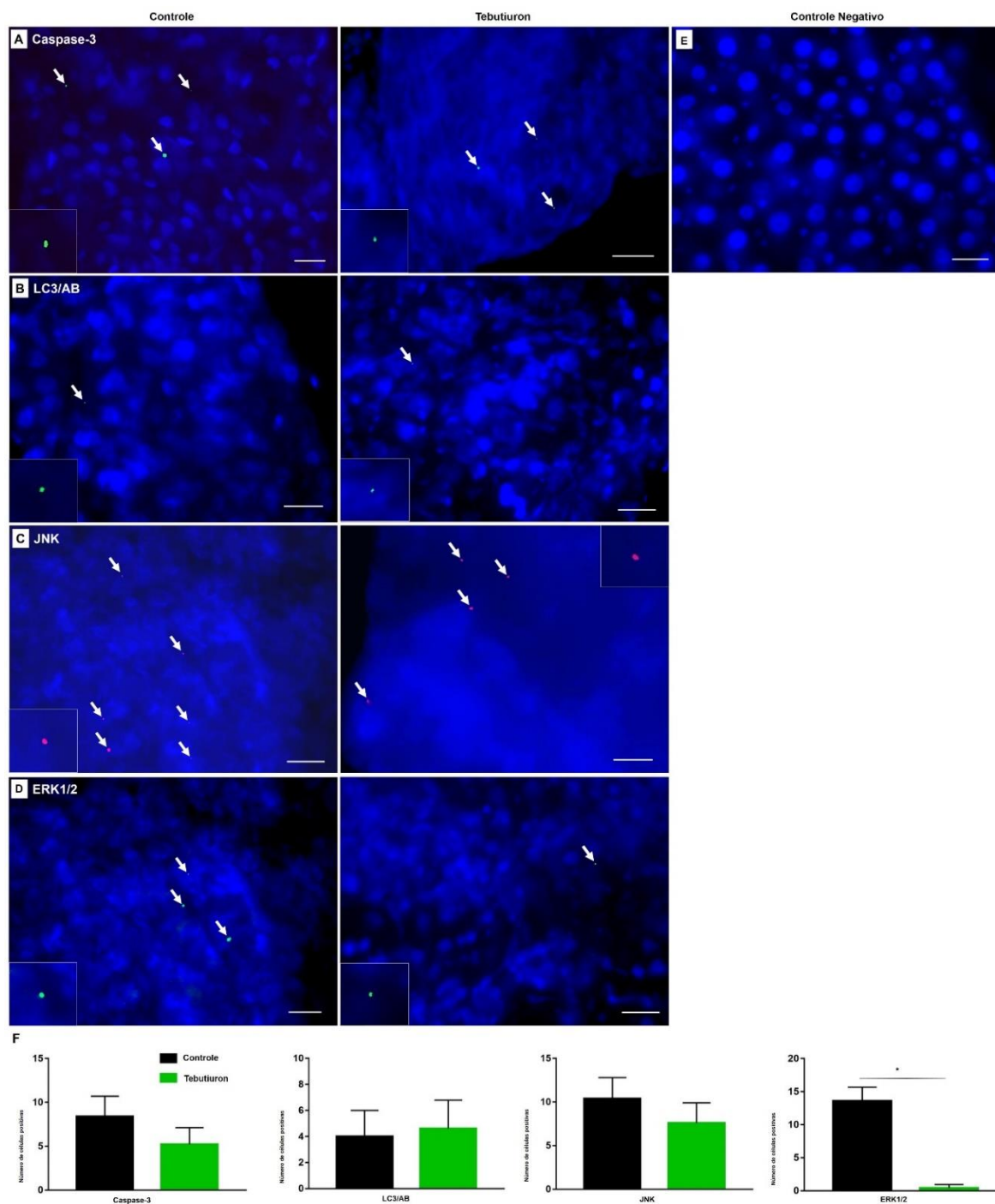


Fig. 5. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron por 24h. (A) Células Caspase-3 positivas (Verde), (B) LC3/AB (Verde), (C) JNK (Verde), (D) ERK 1/2 (Verde) e (E) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Caspase-3, LC3/AB, JNK e ERK1/2. Barras de escala: 20 μm. (F) Número de células positivas para Caspase-3, LC3/AB, JNK e ERK1/2 no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao tebutiuron. Barras verticais representam o desvio padrão (± SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

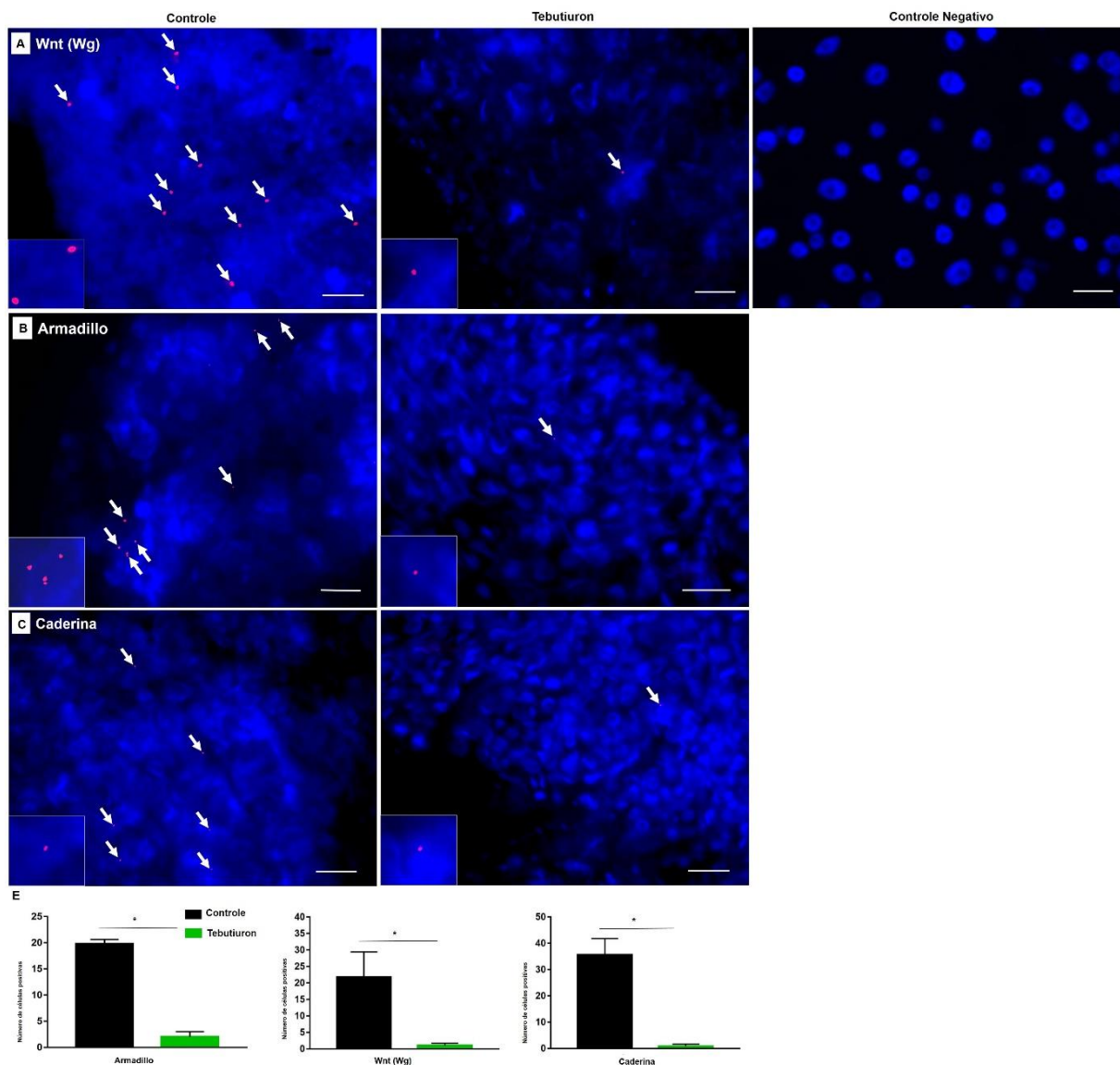


Fig. 6. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron por 24h. (A) Células positivas para Wnt (Wg) (Vermelho), (B) Armadillo (Vermelho), (C) Caderina (Vermelho) e (D) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Wnt (Wg), Armadillo e Caderina. Barras de escala: 20 μ m. (E) Número de células positivas para Wnt (Wg), Armadillo e Caderina no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao tebutiuron. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

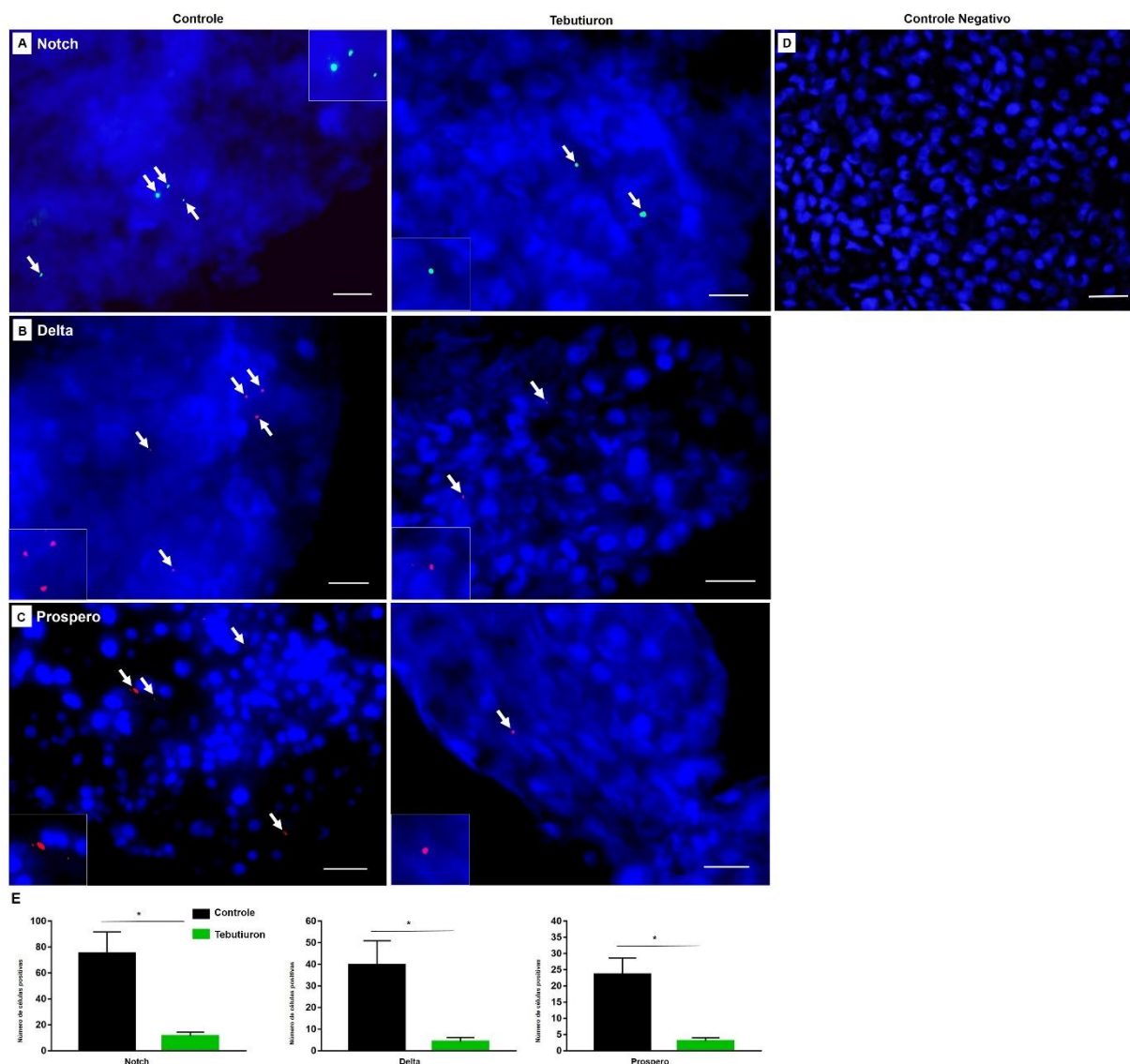


Fig. 7. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron por 24h. (A) Células positivas para as proteínas Notch (Verde), (B) Delta (Vermelho), (C) Prospero (Vermelho) e (D) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para Notch, Delta, Prospero, FMFR e para fosfohistona H3 (PH3). Barras de escala: 20 μm. (E) Número de células positivas para Notch, Delta e Prospero no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao tebutiuron. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

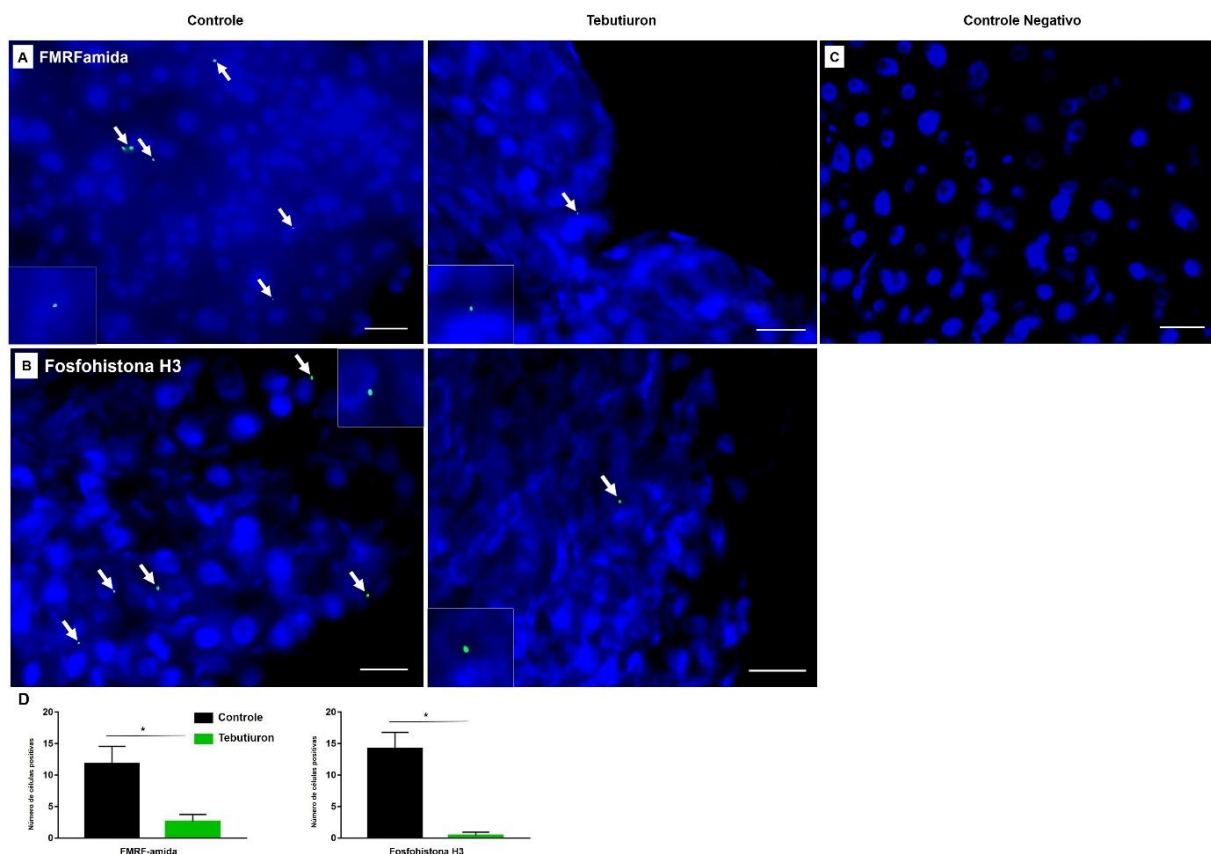


Fig. 8. Montagem total do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas e não expostas (controle) à concentração de campo do herbicida tebutiuron por 24h. (A) Células enteroendócrinas FMRF-amida positivas (Verde), (B) Células positivas para fosfohistona H3 (PH3) (Verde) e (C) Controle negativo. Azul: núcleos (DNA) corados com DAPI. **Setas:** marcações das células positivas para FMFR e fosfohistona H3 (PH3). Barras de escala: 20 μ m. (D) Número de células positivas para FMFR e fosfohistona H3 (PH3) no intestino médio de larvas expostas e não expostas (controle) ao tebutiuron. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). O asterisco indica diferenças significativas em $p < 0,05$.

4. Discussão

O tratamento com o herbicida tebutiuron demonstrou que esse agroquímico apresenta efeitos tóxicos em larvas de *A. aegypti*. O tratamento com o herbicida mostrou exercer alguma atividade larvicida, uma vez que apresentou taxas de mortalidade igual a 50% até o terceiro dia após a exposição ao tebutiuron, o que pode indicar que tal composto apresenta toxicidade as larvas. Dados semelhantes foram vistos por Santana et al., 2019, com extrato aquoso de sementes de *Moringa oleifera*, onde a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 50% no mesmo período. Efeitos na sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, também foram demonstrados em estudos com diferentes óleos essenciais, dentre eles, o óleo de *Vanillosmopsis arborea* teve

o maior potencial larvicida, apresentando mortalidade com CL_{50} de 15,9 mg/ml e CL_{90} de 28,5 mg/ml em 24h (Furtado et al., 2005), e o extrato clorofórmico do fungo *Diplodia pinea*, que apresentou atividade larval significativa com CL_{50} de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Moura et al., 2021). O efeito na sobrevivência em tratamentos com o tebutiuron de formulação comercial, foi visto em tilápias jovens (*Oreochromis niloticus*), resultando em alta mortalidade (Bernardes et al., 2014), e em girinos de *Lithobates catesbeianus*, onde dificultou o desenvolvimento (Grott et al., 2022).

O herbicida causou um aumento da atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*, indicando que o tebutiuron pode ter interagido com o sistema nervoso das larvas, provocando maior atividade. Dados semelhantes foram vistos em tratamentos com cafeína (Miranda et al., 2021) e com o inseticida Spinosad (Hertlein et al., 2010), onde apresentou um aumento na atividade larval após exposição. Esses compostos, assim como o tebutiuron, podem estar interagido com receptores nicotínicos, afetando o sistema nervoso, agindo como antagonista da acetilcolina e do ácido gama-aminobutírico (GABA) nos receptores nicotínicos. Os inseticidas interferem na transmissão dos sinais nervosos dos insetos perturbando as funções elétricas, atuando nos neurotransmissores para transmitir impulsos nervosos, produzindo rapidamente sinais de intoxicação, como perda do movimento coordenado, atividade convulsiva e paralisia final (Soderlund & Bloomquist, 1989). Assim, a atividade locomotora aumentada nas larvas pode está indicando uma resposta instantânea e de curto prazo, onde posteriormente está atividade pode ser reduzida e apresentar sinais de intoxicação.

Modificações na morfologia do intestino médio em larvas expostas ao tebutiuron foram demonstradas através das alterações no epitélio intestinal, podendo assim, afetar os processos de digestão e absorção de nutrientes pelo intestino. Danos a morfologia do intestino pode explicar o número de larvas mortas nos tratamento, sendo este um órgão importante para o funcionamento e desenvolvimento das larvas de *A. aegypti*. Essas modificações do epitélio do intestino médio larval também foram vistas em outros trabalhos, como nos tratamentos com o inseticida Imidacloprido (Fernandes et al., 2015), com compostos naturais como a borra de café (Miranda et al., 2021) e o extrato aquoso de sementes de *Moringa oleífera* (Santana et al., 2019). Em estudo com machos de *O. niloticus* expostos a concentrações do tebutiuron encontradas em ambientes naturais (100 e 200 ng/L), já demonstrado na literatura científica, apresentou alterações morfológicas nas gônadas, comprometendo sua função (Almeida et al., 2018).

Nas larvas expostas ao tebutiuron a diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT pode estar ligada a inativação dessas enzimas pelo excesso de produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). A diminuição da atividade da enzima SOD, pode resultar em um aumento

dos radicais superóxido, que podem inibir grupo tiol das enzimas CAT, diminuindo também sua atividade (López et al., 2007; Bernardes et al., 2014; Staroň et al., 2017; Farder-Gomes et al., 2021). A diminuição da enzima CAT expõe a célula ao acúmulo do peróxido de hidrogênio que pode inibir a SOD (Staroň et al., 2017; Farder-Gomes et al., 2021). A enzima GST está ligada ao processo de desintoxicação de xenobióticos e na proteção contra o estresse oxidativo, catalisando a reação de H₂O₂ em oxigênio e água (Wang et al., 2016). A atividade dessa enzima em níveis significativamente semelhante ao controle mostra que a enzima está atuando para manter resposta protetora, na tentativa de neutralizar os efeitos do estresse oxidativo causados pela diminuição das enzimas SOD e CAT, e pelos danos na morfologia do intestino médio (López et al., 2017; Bagnyukova et al., 2006). Assim, alterações na atividade dessas enzimas nas larvas tratadas com tebutiuron, podem causar danos nas membranas das mitocôndrias e levar a apoptose (López et al., 2007; Bernardes et al., 2014; Staroň et al., 2017).

A exposição ao tebutiuron não causou aumento das células apoptóticas e nem autofágicas. Resultados semelhantes foram vistos em larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de sementes de *Moringa oleífera* e com sulfato de cobre, indicando que não houve mortes significativas por apoptose (Santana et al., 2019; Miranda et al., 2022). Sabe-se que a autofagia é um processo que pode apresentar papéis específicos no tecido, podendo promover a sobrevivência ou a morte celular, e ocorrer jusante na ativação da caspase ou desencadeando a apoptose (Denton et al., 2009). Assim, o baixo número de células positivas para autofagia, pode indicar que as larvas expostas ao tebutiuron não sofrem mortes autofágicas nem apoptóticas significativas, porém pode estar sendo ativadas outras vias que desencadeiam morte celular.

As quinases N-terminais (JNK), são ativadas por diferentes mecanismos, e estão relacionadas a processos importantes nas células, como a apoptose, diferenciação e proliferação celular (Yu et al., 2004; Sherrin et al., 2011). O número das células positivas para JNK não apresentaram diferenças significativas, indicando que o processo de morte celular apoptótica não foi significativo, correlacionado aos dados da caspase-3. A renovação celular também pode ser comprometida, uma vez que essas proteínas também participam do processo de diferenciação e proliferação celular (Mizutani et al., 2003; Yu et al., 2004). Em relação às células positivas para ERK 1/2, houve uma diminuição no número dessas células no epitélio do intestino médio, indicando que não teve morte celular por apoptose em número considerável, como também pode comprometer a sobrevivência celular relacionada a ativação das ERK 1/2 (Xia et al., 1995; Lu & Xu, 2006).

As proteínas Wnt e Armadilho estão interligadas, onde quando não expressa a Wnt, o agrupamento citoplasmático de Armadillo é degradado por proteínas quinases, assim o número reduzido dessas proteínas pode interferir na regulação da autorenovação e diferenciação de células-troncos (Choksi et al., 2006; Bejsovec, 2013; Farder-Gomes et al., 2021). A diminuição da proteína Caderina pode estar ligada a danos no intestino médio pela exposição ao tebutiuron, dificultando a reorganização do tecido e na adesão celular, importante na formação de junções aderentes e na comunicação extracelular e intracelular, como também na formação da bordas estriada, como demonstrado na microscopia de luz a degradação das microvilosidades (Gooding et al., 2004; Schlichting et al., 2006).

O tratamento com tebutiuron afetou significativamente a detecção de células positivas para as proteínas Notch/Delta e juntamente com a diminuição das proteínas Prospero pode interferir na regulação da autorenovação e diferenciação de células-troncos (Choksi et al., 2006; Bejsovec, 2013; Guo & Ohlstein, 2015). A redução no número dessas células positivas para Notch/Delta pode interferir na diferenciação das células-troncos em células digestivas ou na formação prematura de células enteroendócrinas (Guo & Ohlstein, 2015). A redução no número das células positivas para Prospero pode comprometer o processo de regulação da mudança da autorenovação das células-troncos para a diferenciação. Células em diferenciação reverterem o processo e expressam marcadores para a autorenovação, falhando na diferenciação celular pela ausência de Prospero, como demonstrado em *D. melanogaster* (Choksi et al., 2006). A diminuição das células FMRF e PH3 positivas também indicam que a remodelação e renovação epitélio do intestino médio das larvas expostas estão sendo prejudicadas, corroborando com as outras proteínas presentes nesse estudo, e como outros trabalhos que tiveram resultados semelhante a esse, como no tratamento com borras de café, Spinosad e Imidacloprido (Fernandes et al. 2015; 2019; Miranda et al., 2021). Assim, diferentes danos ao intestino médio das larvas de *A. aegypti*, podem acarretar uma série de problemas no seu desenvolvimento, uma vez que esse órgão exerce importantes funções durante todo o ciclo de vida do vetor, como demonstrado pela baixa sobrevivência larval após a exposição ao herbicida (Billingsley, 1990; Hakim et al., 2010).

5. Conclusão

O presente trabalho mostrou que o herbicida tebutiuron apresenta toxicidade para as larvas do mosquito *A. aegypti*. O tebutiuron causou mortalidade na fase larval, alteração no comportamento, modificações do epitélio do intestino médio, diminuição da atividade enzimática das enzimas SOD e CAT, responsáveis pela defesa celular contra danos oxidativos,

além de causar danos celulares ao intestino médio. A exposição ao tebutiuron mostrou uma diminuição das células positivas para ERK 1/2, Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero afetando a diferenciação celular e reorganização do tecido e também redução do número de células em proliferação positivas para PH3 e das células enteroendócrinas FMRF-positivas. Assim, esses dados mostram que o tebutiuron é um produto que pode comprometer a fase larval e interferir no desenvolvimento do mosquito, além de ser prejudicial ao meio ambiente, pode afetar outras espécies e atingir níveis tróficos superiores, causando danos em todo ecossistema.

6. Referências bibliográficas

- Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, v.105, p. 121-126, 1984.
- Almeida, M. D., Pereira, T. S. B., Batlouni, S. R., Boscolo, C. N. P., & de Almeida, E. A. Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebutiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, v. 194, p. 86-93, 2018.
- Américo, J. H. P., de Oliveira Manoel, L., Torres, N. H., & Ferreira, L. F. R. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. *Revista Científica ANAP Brasil*, v. 8, n. 13, 2015.
- Amiard-Triquet, C. Pollution tolerance in aquatic animals: From fundamental biological mechanisms to ecological consequences. In: *Ecotoxicology*, p. 33-91, 2019.
- Araújo, H. R., Carvalho, D. O., Ioshino, R. S., Costa-da-Silva, A. L., & Capurro, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, v. 78, n. 4, p. 325-331, 2006.
- Bao, R., Fischer, T., Bolognesi, R., Brown, S. J., & Friedrich, M. Parallel duplication and partial subfunctionalization of β -catenin/armadillo during insect evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 29, n. 2, p. 647-662, 2012.
- Bardot, B., Mok, L. P., Thayer, T., Ahimou, F., & Wesley, C. The Notch amino terminus regulates protein levels and Delta-induced clustering of *Drosophila* Notch receptors. *Experimental Cell Research*, v. 304, n. 1, p. 202-223, 2005.
- Bejsovec, A. Wingless/Wnt signaling in *Drosophila*: the pattern and the pathway. *Molecular Reproduction and Development*, v. 80, n. 11, p. 882-894, 2013.

Bernardes, M. F. F., Maschio, L. R., Oliveira, M. T. V., & Almeida, E. A. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, p. 59-67, 2014.

Bernardes, R. C., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., da Silva, C. B., & Martins, G. F. Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors*, v. 21, n. 9, p. 3237, 2021.

Bibbs, C. S., Hahn, D. A., Kaufman, P. E., & Xue, R. D. Sublethal effects of a vapour-active pyrethroid, transfluthrin, on *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* (Diptera: Culicidae) fecundity and oviposition behaviour. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.

Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219-248, 1990.

Bocci, F., Onuchic, J. N., & Jolly, M. K. Understanding the principles of pattern formation driven by Notch signaling by integrating experiments and theoretical models. *Frontiers in Physiology*, v. 11, p. 929, 2020.

Caldas, S. S., Arias, J. L. O., Rombaldi, C., Mello, L. L., Cerqueira, M. B., Martins, A. F., & Primel, E. G. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in southern Brazil: data on 4-year monitoring. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, p. 71-80, 2019.

Cargnello, M., & Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

Carvalho, F. D., & Moreira, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotropical Entomology*, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

Chen, J., Aimanova, K. G., & Gill, S. S. *Aedes* cadherin receptor that mediates *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxicity is essential for mosquito development. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, p. e0007948, 2020.

Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., Steensel B. V., Micklem, G., & Brand, A. H. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, v. 11, n. 6, p. 775-789, 2006.

Crawley, M. J. *The R Book*. Second ed, Wiley, 2012.

Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 103, p. 22-35, 2018.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741-1746, 2009.

Derby, A. P., Fuller, N. W., Hartz, K. E. H., Segarra, A., Connon, R. E., Brander, S. M., & Lydy, M. J. Trophic transfer, bioaccumulation and transcriptomic effects of permethrin in inland silversides, *Menidia beryllina*, under future climate scenarios. *Environmental Pollution*, v. 275, p. 116545, 2021.

Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, v. 774, p. 145679, 2021.

Fernandes, K. M., Gonzaga, W. G., Pascini, T. V., Miranda, F. R., Tomé, H. V. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 29, n. 3, p. 245-254, 2015.

Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, v. 221, p. 464-470, 2019.

Foster, W. A., & Walker, E. D. Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology* (third ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA. p. 261-325, 2019.

Furtado, R. F., de Lima, M. G., Andrade Neto, M., Bezerra, J. N., & Silva, M. G. D. V. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 843-847, 2005.

Godoy, R. S. M., Barbosa, R. C., Huang, W., Secundino, N. F. C., Pimenta, P. F. P., Jacobs-Lorena, M., & Martins, G. F. The larval midgut of *Anopheles*, *Aedes*, and *Toxorhynchites* mosquitoes (Diptera, Culicidae): a comparative approach in morphophysiology and evolution. *Cell and Tissue Research*, p. 1-24, 2023.

Godoy, R. S., Barbosa, R. C., Procópio, T. F., Costa, B. A., Jacobs-Lorena, M., & Martins, G. F. FMRF-related peptides in *Aedes aegypti* midgut: neuromuscular connections and enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, v. 385, n. 3, p. 585-602, 2021.

Gooding, J. M., Yap, K. L., & Ikura, M. The cadherin–catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*, v. 26, n. 5, p. 497-511, 2004.

Grott, S. C., Israel, N., Lima, D., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, T. C., Silva, E. B., Albuquerque, C. A. C., Mattos, J. J., Bairy, A. C. D., & de Almeida, E. A. Influence of temperature on growth, development and thyroid metabolism of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide tebuthiuron. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 94, p. 103910, 2022.

Guo, Z., & Ohlstein, B. Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science*, v. 350, n. 6263, p. aab0988, 2015.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biologic Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smaghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593-608, 2010.

Hartz, K. E. H., Weston, D. P., Johanif, N., Poynton, H. C., Connon, R. E., & Lydy, M. J. Pyrethroid bioaccumulation in field-collected insecticide-resistant *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology*, v. 30, n. 3, p. 514-523, 2021.

Hecker, H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell and Tissue Research*, v. 184, n. 3, p. 321-341, 1977.

Hertlein, M. B., Mavrotas, C., Jousseume, C., Lysandrou, M., Thompson, G. D., Jany, W., & Ritchie, S. A. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 26, n. 1, p. 67-87, 2010.

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., & Murray, K. A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

Jiang, J., Chen, L., Wu, S., Lv, L., Liu, X., Wang, Q., & Zhao, X. Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114844, 2020.

López, O., Hernández, A. F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Parrón, T., Villanueva, E. & Pla, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, v. 171, n. 3, p. 146-153, 2007.

Lu, Z., & Xu, S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, v. 58, n. 11, p. 621-631, 2006.

Maître, J. L., & Heisenberg, C. P. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Current Biology*, v. 23, n. 14, p. R626-R633, 2013.

Marklund, S., & Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

McCord, JM, & Fridovich, I. superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., & Martins, G. F. Biological, histological and immunohistochemical studies on the toxicity of spent coffee grounds and caffeine on the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Environmental Pollution*, v. 271, p. 116307, 2021.

Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Fardes-Gomes, C. F., Bernardes, R. C., de Oliveira, A. H., de Castro, M. B. A., Dourado, L. A., Oliveira, L. L., Martins, G. F., & Serrão, J. E. Exposure to copper sulfate impairs survival, post-embryonic midgut development and reproduction in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 97, p. 105185, 2022.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura, T., & Takashima, I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 5, p. 491-499, 2003.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2005.

Moura, P. F., Betim, F. C. M., Oliveira, C. F., Dias, J. D. F. G., Montrucchio, D. P., Miguel, O. G., Auer, C. G., & Miguel, M. D. Atividade larvica de extratos de *Diplodia pinea* frente a *Aedes aegypti*. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 10, n. 2, pág. e6710212295-e6710212295, 2021.

Oliveira, B., Pereira, L. C., Pazin, M., Franco-Bernardes, M. F., & Dorta, D. J. Do trifluralin and tebutiuron impair isolated rat liver mitochondria? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 163, p. 175-184, 2020.

Park, S. S., & Shahabuddin, M. Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Journal of Structural Biology*, v. 129, n. 1, p. 30-37, 2000.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 11-17, 2013.

R Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.4.4. R Foundation for Statistical Computing, 2018. Vienna. <http://www.R-project.org/>.

Ranson, H., & Lissenden, N. Insecticide resistance in African Anopheles mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 3, p. 187-196, 2016.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1-13, 2009.

Santana, L. L. S., Fernandes, K. M., Miranda, F. R., Silva, S. C. C., Coelho, L. C. B. B., Navarro, D. M. D. A. F., Napoleão, T. H., Martins, G. F., & Paiva, P. M. G. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 183, p. 109583, 2019.

Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., & Dahmann, C. Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 6, p. 1184-1195, 2006.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

Sherrin, T., Blank, T., & Todorovic, C. c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Neuroscience*, v. 22, n. 4, p. 403-410, 2011.

Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, v. 34, n. 1, p. 77-96, 1989.

Staroň, M., Sabo, R., Sobekova, A., Sabova, L., Legath, J., Lohajova, L., Javorský, P. Formetanate toxicity and changes in antioxidant enzyme system of *Apis mellifera* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 16, p. 14060-14070, 2017.

Swarup, S., & Verheyen, E. M. Wnt/wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 6, p. a007930, 2012.

Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 140, p. 5-12, 2018.

Tomé, H. V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2014.

Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO Journal*, v. 31, n. 12, p. 2714-2736, 2012.

Vlahopoulos, S., & Zoumpourlis, V. C. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry*, v. 69, p. 844-854, 2004.

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larranaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 46, n. 10, p. 876-899, 2016.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., & Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.

Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J., & Lin, A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell*, v. 13, n. 3, p. 329-340, 2004.

Zettel, C., & Kaufman, P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Retrieved on August, v. 22, p. 2017, 2012.

Considerações finais

Agroquímicos de uso comercial, como os fungicidas e os herbicidas, são utilizados em grande escala na agricultura. O uso constante desses Agroquímicos podem causar danos a diversos organismos, principalmente aquáticos, como também a possibilidade de transferência horizontal em diversas espécies (Mu et al., 2013; Jiang et al., 2020).

O fungicida difenoconazol mostrou afetar a sobrevivência das larvas de quarto instar do mosquito *A. aegypti*. Os tratamentos com diferentes concentrações do composto levaram à mortalidade significativa, com 80% de morte das larvas expostas à concentração de campo, aproximadamente 60% de mortalidade na fase larval, no tempo de 72h após a exposição para a concentração equivalente a 10 vezes menor que a dose de campo. E a duas menores concentrações, a equivalente a 20 vezes menor que a dose de campo e a equivalente a 40 vezes menor que a dose de campo, a taxa de mortalidade foi de 30% e de 20% no período de cinco dias, respectivamente.

A atividade locomotora foi afetada pela exposição das larvas a dose de campo do difenoconazol, diminuindo sua atividade. As larvas tratadas apresentaram alterações na estrutura celular e na borda estriada, que apresenta de forma descontínua, podendo comprometer a função intestinal e o desenvolvimento do mosquito (Fernandes et al., 2015). A exposição levou a uma diminuição das principais enzimas que protegem as células contra danos oxidativos, dentre elas, a SOD, GST e CAT. Essa diminuição sugere um desequilíbrio do estado antioxidante, comprometendo a resposta celular e induzindo estresse oxidativo (Wang et al., 2016; López et al., 2017).

As larvas tratadas com difenoconazol, apresentaram maior número de células positivas para Caspase-3 no intestino médio, assim como para as células positivas para LC3/AB, indicando que as células estão em processo de morte celular por apoptose ativada por Caspase-3 e pela via de autofagia associada ao LC3 (Wang et al., 2016). Já para as MAPKs, as JNK e as ERK, o número de células positivas diminuíram. A diminuição das JNK pode indicar um comprometimento na diferenciação celular, prejudicando a recuperação do epitélio intestinal e a diminuição das ERK pode levar inibição dos efeitos antiapoptóticos e na sobrevivência celular (Mizutani et al., 2003; Yu et al., 2004; Lu & Xu, 2006).

O número de células positivas para a proteína Wnt, Armadillo e Caderina foi menor no intestino médio das larvas tratadas com o difenoconazol em relação ao controle. A diminuição das células positivas para Wnt e Armadillo podem afetar a renovação celular, indicando menor capacidade de regeneração epitelial do intestino médio, além da manutenção da adesão celular (Bao et al., 2012; Bejsovec, 2013). A diminuição das células positivas para

Caderina pode levar à perda da membrana celular, comprometendo a reorganização do tecido e a adesão celular (Gooding et al., 2004; Chen et al., 2020). Outros tipos de proteínas também diminuíram no intestino médio das larvas tratadas, como as células positivas para Notch, Delta, Prospero, FMRFamida e PH3. A redução das células positivas para Notch e Delta pode comprometer a diferenciação das células-troncos em células enteroendócrinas (Guo & Ohlstein, 2015; Taracena et al., 2018) e a redução da proteína Prospero também pode afetar a renovação do epitélio intestinal de *A. aegypti*, uma vez que ela regula a auto-renovação e a diferenciação das células-tronco (Choksi et al., 2006; Perdigoto et al., 2011; Cui & Franz, 2020). A redução das células positivas para FMRFamida no intestino médio pode interferir na homeostase e na remodelação intestinal, como também na reorganização das fibras musculares na transição larva-pupa (Fernandes et al., 2019; Godoy et al., 2021). A diminuição das células positivas para PH3 pode comprometer a renovação do epitélio intestinal, prejudicando a formação do epitélio intestinal durante todo o desenvolvimento (Ray et al., 2009; Hakim et al., 2010). Assim foi demonstrado que o difenoconazol é tóxico para larvas de *A. aegypti*, causando danos nas larvas e comprometendo o desenvolvimento do mosquito.

O herbicida tebutiuron afetou a sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, apresentando mortalidade larval de 50% no período de três dias após a exposição a dose de campo do tebutiuron. Em menor concentração, equivalente a 40 vezes menos a dose de campo, a mortalidade foi menos, com apenas 3% de morte até o terceiro dia após a exposição. As larvas tratadas com a concentração de campo, exibiram maior atividade locomotora, o que pode indicar uma interação com o sistema nervoso (Hertlein et al., 2010; Miranda et al., 2021).

A exposição ao tebutiuron levou a alterações na morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*. As larvas tratadas apresentaram o epitélio intestinal desorganizado, sem borda estriada e com formação de vacúolos. A atividade enzimática da SOD e CAT diminuiu, enquanto a GST não teve diferença significativa em relação ao controle. A diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT pode estar ligado à inativação dessas enzimas pelo excesso de produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto a atividade da GST mostra que essa enzima pode estar executando sua atividade na manutenção da resposta protetora, de forma a neutralizar os efeitos do estresse oxidativo (López et al., 2017; Bagnyukova et al., 2006).

Larvas tratadas com o tebutiuron não apresentaram ativação das células positivas para caspase-3 e nem para LC3/AB, indicando que as células intestinais não sofrem mortes autofágicas nem apoptóticas significativas. As células positivas para JNK também não apresentaram diferenças significativas, indicando que o processo de morte celular apoptótica não foi significativo, correlacionado aos dados da caspase-3. Porém, houve diminuição das

células positivas para ERK 1/2 confirmando que não teve morte celular por apoptose em número considerável, porém, essa redução pode comprometer a sobrevivência celular relacionada a ativação das ERK 1/2 (Lu & Xu, 2006). As células positivas para Wnt, Armadillo, Caderina, Notch/Delta e Prospero diminuíram, afetando a diferenciação e a auto-renovação das células-troncos, reorganização do tecido e na adesão celular (Choksi et al., 2006; Gooding et al., 2004). Houve também a redução do número de células em proliferação, positivas para PH3 e das células enteroendócrinas FMRF-positivas, prejudicando a remodelação e a renovação do epitélio do intestino médio das larvas tratadas com tebutiuron. Assim, o tebutiuron apresenta toxicidade para as larvas do mosquito *A. aegypti*, sendo um produto que pode comprometer a fase larval e interferir no desenvolvimento do mosquito, além de ser prejudicial ao meio ambiente.

Ambos compostos químicos apresentaram toxicidade as larvas de *A. aegypti*, causando mortalidade larval e comprometimento ao nível celular. A exposição ao fungicida difenoconazol causou um comprometimento na atividade de nado das larvas e diminui a atividade das enzimas, além da ativação das vias de apoptose e autofagia das células digestivas e redução em células em diferenciação e em proliferação, como também das células enteroendócrinas. A exposição ao herbicida tebutiuron levou a maior atividade locomotora, diminuição das enzimas SOD e CAT e comprometimento da diferenciação celular e reorganização do tecido e também redução do número de células em proliferação e das células enteroendócrinas. Assim, esses compostos podem comprometer o desenvolvimento do mosquito, além de ser prejudicial ao meio ambiente pelo uso constante e contaminar outras espécies não-alvo, afetando níveis tróficos superiores, uma vez que essa espécie é predada por outras espécies.

Referências bibliográficas

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, v. 78, n. 4, p. 325-331, 2006.

Bao, R., Fischer, T., Bolognesi, R., Brown, S. J., & Friedrich, M. Parallel duplication and partial subfunctionalization of β -catenin/armadillo during insect evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 29, n. 2, p. 647-662, 2012.

Bejsovec, A. Wingless/Wnt signaling in *Drosophila*: the pattern and the pathway. *Molecular Reproduction and Development*, v. 80, n. 11, p. 882-894, 2013.

Chen, J., Aimanova, K. G., & Gill, S. S. *Aedes* cadherin receptor that mediates *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxicity is essential for mosquito development. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, p. e0007948, 2020.

Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., Steensel B. V., Micklem, G., & Brand, A. H. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, v. 11, n. 6, p. 775-789, 2006.

Cui, Y., & Franz, A. W. Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, p. 103496, 2020.

Fernandes, K. M., Gonzaga, W. G., Pascini, T. V., Miranda, F. R., Tomé, H. V. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 29, n. 3, p. 245-254, 2015.

Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, v. 221, p. 464-470, 2019.

Godoy, R. S., Barbosa, R. C., Procópio, T. F., Costa, B. A., Jacobs-Lorena, M., & Martins, G. F. FMRF-related peptides in *Aedes aegypti* midgut: neuromuscular connections and enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, v. 385, n. 3, p. 585-602, 2021.

Gooding, J. M., Yap, K. L., & Ikura, M. The cadherin–catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*, v. 26, n. 5, p. 497-511, 2004.

Guo, Z., & Ohlstein, B. Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science*, v. 350, n. 6263, p. aab0988, 2015.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593-608, 2010.

Hertlein, M. B., Mavrotas, C., Jousseume, C., Lysandrou, M., Thompson, G. D., Jany, W., & Ritchie, S. A. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 26, n. 1, p. 67-87, 2010.

Jiang, J., Chen, L., Wu, S., Lv, L., Liu, X., Wang, Q., & Zhao, X. Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114844, 2020.

López, O., Hernández, A. F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Parrón, T., Villanueva, E. & Pla, A. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, v. 171, n. 3, p. 146-153, 2007.

Lu, Z., & Xu, S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, v. 58, n. 11, p. 621-631, 2006.

Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., & Martins, G. F. Biological, histological and immunohistochemical studies on the toxicity of spent coffee grounds and caffeine on the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Environmental Pollution*, v. 271, p. 116307, 2021.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura, T., & Takashima, I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 5, p. 491-499, 2003.

Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., & Wang, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, v. 175, p. 147-157, 2013.

Perdigoto, C. N., Schweisguth, F., & Bardin, A. J. Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*, v. 138, n. 21, p. 4585-4595, 2011.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1-13, 2009.

Taracena, M. L., Bottino-Rojas, V., Talyuli, O. A., Walter-Nuno, A. B., Oliveira, J. H. M., Angleró-Rodríguez, Y. I., Wells, M. B., Dimopoulos, G., Oliveira, P. L., & Paiva-Silva, G. O. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 5, p. e0006498, 2018.

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larranaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 46, n. 10, p. 876-899, 2016.

Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J., & Lin, A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell*, v. 13, n. 3, p. 329-340, 2004.