UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Programa de Pós-graduação em Entomologia

Dissertação

Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae)

Jucelio Peter Duarte

Pelotas, 2015

Jucelio Peter Duarte

Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Paulo Bretanha Ribeiro
Coorientadores: Carlos Eugênio Silva e Eduardo Bernardi

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D812i Duarte, Jucelio Peter

Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) / Jucelio Peter Duarte. – 65f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador Paulo Bretanha Ribeiro ; coorientadores Carlos Eugênio Silva e Eduardo Bernardi.

1.Entomologia. 2.*Periplaneta americana*. 3.Barata. 4.Desidratação. 5.Fome. 6.Hemócitos. 7.Massa corporal. I.Ribeiro, Paulo Bretanha. II.Silva, Carlos Eugênio. III.Bernardi, Eduardo. IV.Título.

CDD: 595.728

Jucelio Peter Duarte

Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Entomologia, Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27 de abril de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Bretanha Ribeiro (Orientador)
Doutor em Ciências (Entomologia) pela Universidade Federal do Paraná

Profª. Drª. Élvia Elena Silveira Vianna
Doutora em Zoologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Mauro Silveira Garcia
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Prof. Drª. Onilda Santos da Silva
Doutora em Ciências Naturais (Parasitologia) pela Eberhard Karls Universität Tübingen (Alemanha)

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente aos meus maravilhosos pais, Euclides e Leci, que sempre me deram carinho e amor, além de educação, incentivo e apoio para seguir estudando. Devo grande parte a eles. Amo vocês, obrigado!

À minhas lindas irmãs, Cliciana e Leciane, as quais me alfabetizaram e me instruíram a ser a pessoa que eu sou hoje. Pessoas em que sempre me espelhei e que sempre me orgulharam e me inspiraram.

Agradeço a meu orientador, Bretanha, o qual me passou parte de seus conhecimentos que vou levar pra vida toda, além de que sempre esteve à disposição pra discutir qualquer assunto em que pudesse ajudar. Agradeço também ao Marcial, o meu mestre, amigo, colega e colaborador que sem ele esse trabalho não estaria concluído, me ajudou, ensinou e orientou a ser tanto um profissional como uma pessoa melhor.

Um agradecimento especial à Élvia, minha outra orientadora, que sempre pôs os alunos na frente dela e nunca os deixou na mão. No momento da reforma do laboratório, foi ela quem se esforçou ao máximo para conseguir um lugar para não atrapalhar o desenvolvimento de nossos projetos. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Carlos Eugênio Silva, pela sua paciência, recepção e ajuda na delimitação e execução do projeto. Foi extremamente atencioso e disponível para me receber e passar parte de seus conhecimentos de biologia e imunologia de insetos os quais foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Fran, Kath, Paulino, Leandro, Franzinha, Cibele e Márcio; e aos agregados: Gladis, Eduardo, Helena, Bia, Fernandinho e Robledo que tornaram meus dias no laboratório muito mais divertidos e produtivos. Agradeço a todos os meus outros amigos que de alguma forma me ajudaram a chegar aonde cheguei.

Aos professores que repassaram seus conhecimentos, informações valiosas que certamente contribuirão para minha vida profissional.

E por fim, agradeço a Universidade Federal de Pelotas e a FAPERGS que me forneceu toda a estrutura e financiamento necessário para que esse trabalho se realizasse.

Resumo

DUARTE, Jucelio Peter. **Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae)**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Periplaneta americana tem grande importância médica, pois pode atuar como vetor de diversos patógenos. Sabe-se que populações dessa espécie desenvolveram características para resistir à escassez de alimento e água. Estresse em insetos pode ser causado por múltiplos fatores, como a fome e a desidratação, podendo causar consequências na sua biologia. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do estresse alimentar, hídrico e hídrico/alimentar no peso, número total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos de adultos de *P. americana*. Foram utilizados adultos de *P. americana* com três a dez dias após a emergência. Foram estabelecidos grupos de tratamentos compostos por oito casais cada, onde cada espécime foi isolado em frascos de vidro contendo ou não alimento e/ou água. Para a avaliação da perda de peso, os espécimes foram pesados no momento em que foram isolados, e novamente a cada 10 dias, num total de quatro pesagens (0, 10, 20 e 30 dias). Nos grupos reidratados, os insetos receberam água por 24h após o período de estresse ter terminado e então eram novamente pesados. Para as análises imunológicas, após a pesagem final, os insetos foram imobilizados para a coleta de hemolinfa para realizar a contagem dos hemócitos. Os estresses alimentar, hídrico e hídrico/alimentar reduziram o peso dos indivíduos, sendo o estresse hídrico/alimentar o que causou a maior redução. As fêmeas do grupo controle ganharam peso, enquanto que os machos tiveram seu peso inalterado. Adultos submetidos aos estresses perderam mais peso no primeiro decêndio, sendo o estresse hídrico/alimentar o que causou o maior impacto nos primeiros dez dias. Quanto maior o tempo privado de água e alimento, maior foi o peso adquirido por adultos em 24 horas de reidratação, sendo os machos os que ganharam mais peso durante esse período. Os estresses e o tempo de estresse não influenciaram no número total de hemócitos. Houve variações na porcentagem dos tipos celulares quando os insetos foram privados de alimento e de água e alimento. Geralmente essas alterações consistiram no aumento de pró-hemócitos e redução de plasmatócitos. Esse estudo pode servir como base para estudos posteriores de bioecologia, comportamento e a capacidade de resistência a inseticidas químicos e biológicos, bem como servir como modelo para estudos em outras espécies de insetos.

Palavras-chave: barata; desidratação; fome; hemócitos; massa corporal.

Abstract

DUARTE, Jucelio Peter. **Impact of different stresses on weight and imunological status in *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae)**. 2015. 65f. Dissertation (Master degree in Entomology) – Programa de Pós-graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Periplaneta americana has great medical importance because it can act as a vector of several pathogens. It is known that populations of this species have developed characteristics to withstand the shortage of food and water. Stress in insects can be caused by multiple factors, i.e. starvation and dehydration, which may have consequences on the its biology. This study aimed to evaluate the influence of food, water and water/food stress on weight, total and differential haemocyte count of *P. americana* adults. We used *P. americana* adults with three to ten days after emergence. Treatment groups were established comprised of eight couples each, in which each specimen was isolated in glass flasks with or without food and/or water. To evaluate the weight loss, the specimens were weighed in the moment they were isolated and again every ten days for a total of four weighings (0, 10, 20 and 30 days). In the rehydrated groups, the insects received water for 24h after the finishing of stress period, and then they were weighed again. To the immunological analysis, after the final weighing, the insects were immobilized for collecting haemolymph to perform the haemocyte count. The food, water and water/food stress decreased the weight of individuals, and water/food stress caused the greatest decrease. Females of control group have gained weight, while the males had their weight with no change. Adults subjected to the stresses have lost more weight on the first ten days, and water/food stress caused the greatest impact in this period. The longer the time deprived of food and water, the greater the weight acquired by adults in 24 hours of rehydration, being the males those that have gained more weight. The stresses and the stress period did not influence on total haemocyte count. There were changes in the percentages of cell types when the insects were deprived of food and water/food. Usually these changes consisted of an increase in prohaemocytes and decrease in plasmatocytes. This study may serve as a basis for further studies of bioecology, behavior and the ability of resistance to chemical and biological insecticides, as well as to serve as a model for studies in other species of insects.

Key-words: body mass; cockroach; dehydration; haemocytes; starvation.

Lista de Figuras

Figura 1 Hemócitos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) em microscopia óptica fixados e corados com Panótico Rápido (aumento 1.600x) 33

Figura 2 Variação do peso absoluto (mg) e relativo (%) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em diferentes períodos 36

Figura 3 Taxa de variação do peso (mg/dia) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em diferentes decêndios . 38

Figura 4 Ganho de peso de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) em 24h de reidratação após a submissão em diferentes períodos de estresse hídrico/alimentar 39

Figura 5 Número total de hemócitos (células x 10^3/mm^3) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em três diferentes períodos 41

Lista de Tabelas

Tabela 1 Contagem diferencial de hemócitos (% ± erro padrão) de fêmeas de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresses em diferentes períodos 44

Tabela 2 Contagem diferencial de hemócitos (% ± erro padrão) de machos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresses em diferentes períodos 45

Lista de Abreviaturas e Siglas

AD	Adipohemócito
ANOVA	Análise de variância
CY	Cistócito
EP	Erro padrão da média
GR	Granulócito
NTH	Número total de hemócitos
PL	Plasmatócito
PR	Pró-hemócito
SP	Esferulócito

Sumário

1 Introdução 11
2 Revisão de Literatura 13
2.1 Ordem Blattaria 13
2.1.1 *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) 14
2.2 Imunologia de insetos 15
2.2.1 Reação imunológica celular 16
2.2.1.1 Hemócitos 16
2.2.1.1.1 Caracterização dos hemócitos 17
2.2.1.1.2 Número total de hemócitos (NTH) 19
2.2.1.2 Fagocitose 20
2.2.1.3 Nodulação 20
2.2.1.4 Encapsulamento 21
2.2.2 Reação imunológica humoral 22
2.2.2.1 Produção de peptídeos antimicrobianos 22
2.2.2.2 Coagulação 23
2.2.2.3 Fenoloxidase e melanização 24
2.3 Estresse 24
2.3.1 Efeitos do estresse hídrico em insetos 25
2.3.2 Efeitos do estresse alimentar em insetos 26
3 Material e Métodos 30
3.1 Manutenção das colônias de *Periplaneta americana* 30
3.2 Avaliação de diferentes estresses na variação do peso de adultos de *Periplaneta americana* 30
3.3 Avaliação do peso adquirido após a reidratação em adultos de *Periplaneta americana* 31
3.4 Avaliação do impacto de diferentes estresses no número total e na contagem diferencial de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana* 31
3.5 Análise de dados 33
4 Resultados 35

4.1 Avaliação de diferentes estresses na variação do peso de adultos de *Periplaneta americana* 35
4.2 Avaliação do peso adquirido após a reidratação em adultos de *Periplaneta americana* 39
4.3 Avaliação do impacto de diferentes estresses no número total e na contagem diferencial de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana* 40
5 Discussão 46
6 Conclusões 52
Referências 53

1 Introdução

Periplaneta americana (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae), também conhecida por barata-dos-esgotos, tem grande importância médica, uma vez que ela frequenta latrinas, fossas sépticas, esgotos e estações de tratamento onde pode adquirir agentes causadores de doenças para humanos e outros animais (COCHRAN, 1999). Esses insetos atingem grandes populações em ambientes urbanos e podem atuar como vetores de diversos patógenos (BAUMHOLTZ et al., 1997; PAI; KO; CHEN, 2003; PRADO et al., 2002; RIVAULT; CLOAREC; LE GUYADER, 1993; THYSSEN et al., 2004), causando grandes problemas à saúde humana e de animais domésticos.

Apesar de, geralmente, haver abundância de alimento e água nos ambientes onde esse inseto vive, as populações dessa espécie podem ter desenvolvido características que as tornam capazes de resistir, por algum tempo, à escassez desses recursos (WILLIS; LEWIS, 1957).

Estresses em insetos podem ser causados por múltiplos fatores bióticos e abióticos, como superpopulação, infecção patogênica/parasitária, temperaturas extremas, metamorfose, danos mecânicos, intoxicação química, fome e outros (BREY, 1994). Fome e desidratação podem causar consequências na biologia dos insetos, afetando seu crescimento, sobrevivência, longevidade, reprodução, movimentos, hábitos gregários e também podem reduzir a produção de energia para manter essas funções (CHAPMAN, 2012; PANIZZI; PARRA, 2009).

Além disso, já foi relatado que a ausência desses recursos também podem deprimir o sistema imune (FEDER et al., 1997), seja no número de hemócitos (BLOCK; STOKS, 2008; RICHARDS; EDWARDS, 1999; SUJATHA; DUTTA-GUPTA, 1991) ou na atividade da cadeia da profenoloxidase (BLOCK; STOKS, 2008; SIVA-JOTHY; THOMPSON, 2002). Esse impacto sobre o sistema imune torna o inseto mais susceptível a infecções por micro-organismos e ao desenvolvimento de doenças (FEDER et al., 1997; FURLONG; GRODEN, 2003; LORD, 2010).

Apesar da existência de um estudo avaliando as características do sistema imune de *P. americana* sob condições de estresse (MORE; SONAWANE, 1987) os resultados obtidos ainda são incipientes. Visto isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do estresse hídrico, alimentar e hídrico/alimentar no peso, número total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana*.

2 Revisão de Literatura

2.1 Ordem Blattaria

Baratas pertencem a ordem Blattaria, grupo onde se encontra cerca de 4.000 espécies no mundo, porém, somente 664 espécies ocorrem no Brasil (PELLENS; GRANDCOLAS, 2008). Apesar da maioria das espécies ser silvestre e não diretamente associada aos humanos, algumas tem se adaptado ao ambiente domiciliar e/ou peridomiciliar (BRENNER, 2002).

A ordem é dividida em cinco famílias: Polyphagidae, Cryptocercidae, Blattidae, Blattellidae e Blaberidae, sendo as três últimas compostas por espécies que atingem altas populações (BRENNER, 2002).

A oviposição nesses insetos ocorre por estojos em forma de cápsulas, chamadas de ootecas (BRENNER, 2002; TRIPLEHORN; JONNSON, 2011) que contém entre cinco a 40 embriões, dependendo da espécie (BRENNER, 2002).

São insetos hemimetábolos, onde o imaturo é, na maioria das vezes, morfologicamente semelhante a um adulto, exceto pela ausência de asas verdadeiras e pelo fato de os órgãos sexuais não estarem desenvolvidos (BRENNER, 2002). Brenner (2002) também relatou que algumas espécies desses insetos podem fazer partenogênese, mas a maioria delas se reproduz de forma sexuada.

Muitas espécies vivem na natureza e são importantes na cadeia ecológica, servindo de alimento a outros seres e também ajudando na incorporação de nutrientes ao meio ambiente silvestre (ZORZENON, 2002). Porém, algumas espécies conseguiram se adaptar ao ambiente modificado pelo homem, devido à alimentação onívora, ao grande potencial reprodutivo e aos hábitos abscônditos, que as protegem da detecção e destruição (GUIMARÃES, 1984).

As baratas sinantrópicas podem ser vetores de diversos organismos patogênicos, como vírus, bactérias, protozoários, fungos e ovos de helmintos,

que podem tanto prejudicar a saúde humana quanto a de outros animais vertebrados (COCHRAN, 1999; THYSSEN et al., 2004; ZORZENON, 2002).

A alternância de habitat destes insetos durante o dia e a noite, lhes confere condições verdadeiramente excelentes como contaminadores (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001). Durante o dia repousam em ambientes escuros, úmidos e quentes como tubulações de esgotos, fossas sépticas e latrinas e a noite invadem habitações, como armazéns, restaurantes, cozinhas e hospitais, podendo, nestes últimos, serem responsáveis pela disseminação de patógenos entre os pacientes (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001).

As espécies com maior importância em saúde humana e de animais domésticos são: *P. americana*, *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) (Blattaria, Blattellidae), *Blatta orientalis* Linnaeus, 1758 (Blattaria, Blattidae) e *Periplaneta autralasiae* (Fabricius, 1775) (Blattaria, Blattidae) (ZORZENON, 2002).

2.1.1 *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758)

Periplaneta americana, também conhecida como barata-dos-esgotos, barata americana, barata voadora ou barata doméstica (RAFAEL; SILVA; DIAS, 2008), mede de 34 a 55mm de comprimento e apresenta uma coloração avermelhada, com variação na coloração de padrões claros e escuros no pronoto (BRENNER, 2002).

Esses insetos geralmente depositam suas ootecas em locais escondidos e próximos à fontes de alimentos, como rodapés, ralos, rachaduras, frestas e caixas de gordura, que devem ser inspecionados regularmente para que se avalie o grau de infestação das mesmas (MIRANDA; SILVA, 2008). As ootecas dessa espécie contêm entre 7 a 16 ovos, porém a maioria delas apresenta entre 13 a 16 ovos (VIANNA et al., 2000).

Rafael, Silva e Dias (2008) relataram que *P. americana* foi a espécie mais comum nas residências, hotéis e restaurantes da zona urbana de Manaus, ocorrendo em 83% dos locais visitados e, segundo Mariconi (1999), essa espécie ocorre em todas as cidades, vilas e povoados do Brasil.

Esse inseto frequenta latrinas, fossas, esgotos e cadáveres de animais, onde pode adquirir agentes causadores de doenças ao homem e aos animais domésticos (MARICONI, 1999). Com relação às condições de vetor e/ou

reservatório de agentes patogênicos, já foram identificadas várias espécies de vírus (BAUMHOLTZ et al., 1997), bactérias (PRADO et al., 2002; RIVAULT; CLOAREC; LE GUYADER, 1993), fungos (PRADO et al., 2002), protozoários (BAUMHOLTZ et al., 1997; PAI; KO; CHEN, 2003) e pelo menos doze espécies de helmintos (BAUMHOLTZ et al., 1997; THYSSEN et al., 2004).

Além de ser vetor de diversos patógenos, esse inseto pode chegar ao rosto de pessoas adormecidas para comer detritos alimentares que ficaram impregnados na mucosa bucal, podendo roer os lábios e ocasionar o que é conhecido como *herpes blattae* (PRADO et al., 2002). Wirtz (1984) afirmou que esses insetos podem também causar reações alérgicas como dermatite, rinite, bronquite, asma e até choque anafilático.

Segundo Vianna et al. (2000), o potencial reprodutivo de *P. americana* é reduzido ou cessa quando esses estão sob temperatura inferior a 13ºC. Os mesmos autores relatam que a faixa ótima para a reprodução desses insetos está entre 20 e 24ºC.

Essa espécie é consideravelmente longeva quando comparada a outras espécies de insetos, pois, mantida a 30°C e umidade relativa superior a 80%, sobrevive, em média, 404 dias (machos) e 473 dias (fêmeas) (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001).

2.2 Imunologia de insetos

O sistema imune é geralmente dividido em dois grandes ramos, um chamado de imunidade inata ou natural e o outro de imunidade adaptativa ou adquirida (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Este último está ausente nos insetos (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; KLOWDEN, 2008; LAVINE; STRAND, 2002).

Em contrapartida, neste grupo, a imunidade inata é extremamente desenvolvida (LAVINE; STRAND, 2002), e é comumente dividida em resposta imunológica celular e resposta imunológica humoral (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; LAVINE; STRAND, 2002). Enquanto que a resposta humoral inclui a produção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, e um complexo enzimático em cascata que regulam a coagulação ou melanização da hemolinfa; a resposta celular refere-se à

resposta mediada por hemócitos como a fagocitose, nodulação e encapsulamento (LAVINE; STRAND, 2002).

A imunidade inata é uma antiga forma de mecanismos de defesa que apareceu no início da evolução dos organismos multicelulares, enquanto que a imunidade adaptativa é mais recente em sua origem aparecendo em cerca de 500 milhões de anos atrás nos ancestrais dos peixes cartilaginosos, como os tubarões (KIMBRELL; BEUTLER, 2001).

Anteriormente acreditava-se que a imunidade inata era uma resposta imune inespecífica caracterizada pela fagocitose, porém mais tarde mostrou-se ter considerável especificidade e ser capaz de distinguir entre o próprio e o não próprio (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; KLOWDEN, 2008). Além disso, Little, Hultmark e Read (2005) relataram que alguns estudos mostraram que a exposição primária a determinado patógeno pode ser profilática, proporcionando ao hospedeiro certa proteção a um segundo encontro do mesmo agente patogênico.

A primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e pelo mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos patógenos (GALLO et al., 2002). Quando essa falha, reações imunológicas começam a ser desencadeadas (FERNANDES, 2010), bem como um conjunto de diferentes hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002).

2.2.1 Reação imunológica celular

A reação imunológica celular são as respostas mediadas pelos hemócitos, que basicamente incluem a fagocitose, nodulação e encapsulamento, os quais ocorrem em combinação com as defesas humorais (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; SILVA, 2002 apud FERNANDES, 2010).

2.2.1.1 Hemócitos

A resposta celular é mediada por hemócitos, os quais são responsáveis por reconhecer um corpo estranho tanto pela interação direta dos receptores

de superfície dos hemócitos com as moléculas no organismo invasor, como indiretamente, pelo reconhecimento dos receptores humorais que se prendem e opsonizam a superfície do invasor (LAVINE; STRAND, 2002).

Os hemócitos são derivados do mesoderma embrionário, e posteriormente, essas células são produzidas por mitose pelos hemócitos circulantes já existentes, ou a partir de células indiferenciadas em estruturas conhecidas como órgãos hematopoiéticos (CHAPMAN, 2012). Este autor complementa que nos adultos de insetos holometábolos, que não apresentam órgãos hematopoiéticos, novos hemócitos só podem ser produzidos por mitose. Em contrapartida, naqueles insetos onde esses órgãos persistem no indivíduo adulto, como nas ordens Blattodea e Orthoptera, a divisão de hemócitos é relativamente rara e no restante dos insetos, a divisão de hemócitos tem a responsabilidade de complementar a produção por órgãos hematopoiéticos (CHAPMAN, 2012).

2.2.1.1.1 Caracterização dos hemócitos

Insetos produzem vários tipos de hemócitos que são tradicionalmente identificados usando características morfológicas, histoquímicas e funcionais (LAVINE; STRAND, 2002). Os tipos de hemócitos mais comuns relatados na literatura são pró-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenocitoides (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; LAVINE; STRAND, 2002; RATCLIFFE; PRICE, 1974). Esses hemócitos foram descritos em espécies de diversos grupos que incluem Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera e Collembola (LAVINE; STRAND, 2002). Além disso, Ratcliffe e Price (1974) relataram que em espécies de Blattaria também foi detectado a presença de cistócitos.

Pró-hemócitos são células bem caracterizadas, pequenas e esféricas ou ovais que contem um núcleo bastante volumoso, ocupando quase todo o citoplasma e com região com grande quantidade de heterocromatina (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; RATCLIFFE; PRICE, 1974). São consideradas as células-tronco que embrionicamente dão origem aos outros tipos e não estão envolvidos na fagocitose (KLOWDEN, 2008; LAVINE; STRAND, 2002).

Plasmatócitos são maiores, pleiomórficas, podendo ser ameboides, esféricos, ovais ou alongados, sendo esta última a forma predominante (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; RATCLIFFE; PRICE, 1974). É possível observar prolongamentos citoplasmáticos nessas células (CUNHA, 2007). O núcleo se apresenta volumoso com poucas áreas heterocromáticas e o citoplasma grande contendo numerosas vesículas (CUNHA, 2007). São geralmente entre os mais abundantes dos hemócitos e são frequentemente envolvidos na fagocitose, na formação de cápsulas e nódulos (KLOWDEN, 2008; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

Granulócitos são compactos e apresentam forma esférica ou oval (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; RATCLIFFE; PRICE, 1974). No seu citoplasma são visualizados grânulos pequenos e abundantes, basófilos e geralmente esféricos, os quais encobrem o núcleo tornando difícil a sua visualização (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; RATCLIFFE; PRICE, 1974). Analisando ultraestruturalmente verifica-se que os grânulos são bastante eletrodensos e o núcleo apresenta morfologia irregular (CUNHA, 2007). São responsáveis principalmente pela fagocitose, além de que são as primeiras células a entrar em contato, em pequenas quantidades, com um corpo estranho (KLOWDEN, 2008; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006). Quando isso ocorre, eles liberam seu conteúdo granular (material semelhante à opsonina), que por sua vez, são responsáveis por atrair plasmatócitos ou pelo menos ajudar os plasmatócitos a construir a cápsula ou nódulo (RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

Esferulócitos são células não-móveis, esféricas, com núcleo central, e se caracterizam por apresentarem no seu citoplasma várias vesículas claras, grandes e uniformemente distribuídas, que podem obscurecer o aparecimento do pequeno núcleo (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008; RATCLIFFE; PRICE, 1974). A ultraestrutura revela que essas vesículas são pouco eletrodensas e que o núcleo apresenta grande área de eucromatina (CUNHA, 2007). Apresentam função desconhecida (RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006). Ratcliffe e Price (1974) afirmam que estes hemócitos são comuns em espécies de Blattaria, porém são menos frequentes em *B. germanica* e *P. americana*.

Oenocitóides são células imóveis, de fácil identificação por serem os maiores hemócitos e apresentam morfologia esférica ou ovoide, bastante uniforme, núcleo central e pequeno em relação ao tamanho da célula e um

grande e complexo citoplasma (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008). No citoplasma os ribossomos livres são os mais abundantes, sendo observadas ainda várias vesículas e alguns grânulos (CUNHA, 2007). Os oenocitóides carregam uma das fenoloxidases que são responsáveis pelo escurecimento da hemolinfa (síntese de melanina), tal fenoloxidase é sintetizada no citoplasma dessas células e são liberados no plasma quando estas sofrem lise celular (RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

Cistócitos foram abundantes em todas as espécies de Blattaria analisadas por Ratcliffe e Price (1974). São células arredondadas, com alta relação núcleo-citoplasma comparado ao dos pró-hemócitos (RATCLIFFE; PRICE, 1974). Os mesmos autores complementam que os grânulos dos cistócitos, que são frequentemente grandes, estão confinados na fina borda do citoplasma, já que eles não costumam sobrepor o núcleo, como acontece nos esferulócitos, e sim, empurram a membrana plasmática para fora, dando a essas células um perfil irregular. Segundo Gupta (2009), os cistócitos também são chamados na literatura por coagulócitos.

Beaulaton (1979 apud LAVINE; STRAND, 2002) propõe que os pró-hemócitos de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Bombycidae) nos órgãos hematopoiéticos diferenciam-se em plasmatócitos, e estes são liberados para a circulação, onde se diferenciam nas demais células citadas. Em contrapartida, Yamashita (2001 apud LAVINE; STRAND, 2002) sugere que os pró-hemócitos da mesma espécie são capazes de se diferenciar tanto em plasmatócitos quanto em outros hemócitos.

Em *P. americana* foi relatado somente cinco tipos celulares: pro-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e cistócitos (MORE; SONAWANE, 1987; PRICE; RATCLIFFE, 1974; RATCLIFFE; PRICE, 1974).

2.2.1.1.2 Número total de hemócitos (NTH)

Chapman (2012) relatou que em insetos hemimetábolos, o NTH é geralmente similar entre os insetos imaturos e adultos, mas em espécies holometábolas é comum as larvas terem um maior NTH que os adultos, onde nesses insetos, o NTH tende a aumentar ao longo do desenvolvimento larval, mas com certa variação dentro de cada estágio de desenvolvimento.

O NTH é alterado quando o inseto é infectado com algum patógeno, pois já foi relatado que espécies de insetos contaminadas com *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae) tem um aumento significativo em relação ao controle, nos primeiros dias pós-inoculação (CHOUVENC; SU; ROBERT, 2009; GILLESPIE; BURNETT; CHARNLEY, 2000). O declínio do NTH nos últimos estágios da infecção pode ser o resultado da agregação dos hemócitos (formação de nódulos), induzida por componentes da parede solúvel liberada pelos fungos circulantes (CHOUVENC; SU; ROBERT, 2009; GILLESPIE; BURNETT; CHARNLEY, 2000).

2.2.1.2 Fagocitose

O processo, primeiramente, envolve o reconhecimento de agentes estranhos pelos receptores de ligação à partícula-alvo (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; KLOWDEN, 2008) ou por moléculas semelhantes à opsoninas que marcam a partícula para ser fagocitada (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Tal reconhecimento é seguido pela formação de pseudópodos e a ingestão de partículas estranhas para dentro de um fagossomo ligado a membrana (KLOWDEN, 2008). Após o movimento do fagossomo para o interior da célula, ele se funde com o lisossoma onde o agente estranho é digerido e destruído pelos compostos que são liberados (KLOWDEN, 2008). O mesmo autor afirma que os plasmatócitos e granulócitos são os principais hemócitos responsáveis por esse mecanismo de defesa.

2.2.1.3 Nodulação

Nodulação refere-se a múltiplos hemócitos se prendendo a agregações de micro-organismos (LAVINE; STRAND, 2002). Formações de nódulos e cápsulas aparentam ser semelhantes ao nível estrutural, o que se sugere que é essencialmente o mesmo processo, embora contra diferentes alvos (RATCLIFFE; GAGEN, 1977 apud LAVINE; STRAND, 2002).

Nas defesas celulares, após a invasão de microrganismos os hemócitos migram rapidamente para o local de invasão e eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (FERNANDES, 2010). Quando ocorre da população de patógenos ser muito elevadas, tornando difícil de ser fagocitada, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e removê-los da circulação (FERNANDES, 2010; KLOWDEN, 2008).

O número de nódulos na hemolinfa é aumentado quando o inseto está infectado com algum patógeno, pois Gillespie, Burnett e Charnley (2000) observaram que o número de nódulos em espécimes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae) infectados por *M. anisopliae* foi significativamente maior quando comparados àqueles saudáveis (não infectados), apesar de nesse grupo ter sido observado a ocorrência de nódulos em menor quantidade.

2.2.1.4 Encapsulamento

O sistema imune do inseto se defende formando cápsulas, contra larvas e ovos de endoparasitoides que são depositados na hemocele e não podem ser fagocitados e nem isolados em nódulos (STRAND; PECH, 1995). Durante o encapsulamento, múltiplas camadas de hemócitos formam uma parede contra o agente estranho, prevenindo que ele tenha contato com as outras células do inseto e acesso a fontes de oxigênio e nutrição (KLOWDEN, 2008).

São também os plasmatócitos e os granulócitos os envolvidos nesse mecanismo de defesa, começando com o reconhecimento do agente estranho (KLOWDEN, 2008). Uma vez reconhecido, o invasor desencadeia a liberação de fatores quimiotáticos de agregação advindo dos granulócitos, o que atrai plasmatócitos para o local (FERNANDES, 2010; KLOWDEN, 2008). Os mesmo autores ainda afirmam que esses hemócitos se tornam achatados e rodeiam o corpo estranho, podendo atingir uma camada de 50 células ou mais. O recrutamento cessa quando a cápsula formada é revestida por glicosaminoglicanas, semelhantes as da membrana basal que cobre todas as superfícies dos tecidos da hemocele (KLOWDEN, 2008). Os plasmatócitos ainda sintetizam melanina, revestindo a cápsula, tornando-a mais resistente

(FERNANDES, 2010; KLOWDEN, 2008). Durante a síntese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas e inativam ou destroem grande parte dos microrganismos (FERNANDES, 2010).

Os plamatócitos e granulócitos são incapazes de realizar o processo de encapsulamento de forma independente (PECH; STRAND, 1996).

2.2.2 Reação imunológica humoral

A reação imunológica humoral é responsável pela produção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, e a complexa cascata enzimática que regula a coagulação ou a melanização da hemolinfa; todas elas ocorrendo sem a participação direta dos hemócitos (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; VILMOS; KURUCZ, 1998).

2.2.2.1 Produção de peptídeos antimicrobianos

A resposta é bastante específica, onde uma infecção fúngica, por exemplo, irá resultar na indução de um peptídeo antifúngico e não de um peptídeo antibacteriano (KLOWDEN, 2008). O autor ainda afirma que o sistema imunológico de abelhas está preparado após uma exposição inicial de bactérias, pois quando reinfectados várias semanas mais tarde após a infecção inicial ter sido superada, o sistema responde com uma alta especificidade e maior proteção contra essa espécie bacteriana. Algumas dessas respostas antimicrobianas são induzidas inclusive na ausência que antígenos, somente por um trauma, como por exemplo, durante um ferimento; infere-se que isso seja uma resposta profilática do inseto (MORET; SIVA-JOTHY, 2003).

Os peptídeos antimicrobianos aparecem duas a quatro horas após uma infecção e pode ser sintetizada em uma taxa que é três vezes maior que a taxa de reprodução de bactérias (KLOWDEN, 2008). O mesmo autor relata que os insetos podem produzir de 10 a 15 diferentes tipos de peptídeos antimicrobianos, cada um apresentando um espectro diferente.

Além disso, o reconhecimento da parede celular de micro-organismos induz a produção de peptídeos antifúngicos ou antibacterianos pelos corpos

gordurosos, os quais são secretados na hemolinfa (KLOWDEN, 2008; MORET; SIVA-JOTHY, 2003).

Larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera, Tenebrionidae) tratados com uma pré-inoculação de uma substância rica em lipopolissacarídeo, mostrou maior sobrevivência quando infectadas com *M. anisopliae* quatro ou sete dias depois (MORET; SIVA-JOTHY, 2003). O autor explica que a maior resistência foi correlacionada com a elevada atividade antimicrobiana na hemolinfa, o que pode ser devido a uma síntese contínua de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa.

Alguns insetos, como os membros da ordem Blattaria e Orthoptera, não sintetizam essas substâncias (DA SILVA, 2002). O autor afirma que na hemolinfa desses insetos a atividade antimicrobiana é realizada principalmente pelas lisozimas que estão presentes na hemolinfa de todas as espécies de insetos. Elas dissolvem certas bactérias hidrolisando as cadeias glicídicas da camada de peptideoglicana da parede celular, provocando a ruptura da parede celular e, consequentemente, a morte das bactérias (DA SILVA, 2002).

2.2.2.2 Coagulação

Após a lesão, os invertebrados têm mecanismos eficientes que rapidamente evitam a perda de hemolinfa e também ajudam e impedir que micro-organismos entrem e se espalhem pela hemocele (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). A formação do coágulo é intensamente estudada em Lepidoptera, onde dois tipos de hemócitos estão envolvidos: os granulócitos e os plasmatócitos (THEOPOLD et al., 2004).

Theopold et al. (2004) afirmaram que a coagulação pode ser dividida em quatro etapas: primeiro, a degranulação de hemócitos leva ao estabelecimento de agregados extracelulares que selam o ferimento, etapa chamada de coágulo primário ou macio; segundo, a ativação da cascata da profenoloxidase, que leva a reticulação do coágulo, etapa chamada de coágulo rígido; terceiro, plasmatócitos são atraídos e espalhados por todo o coágulo, selando a hemocele, etapa chamada de formação da crosta; e por último, ocorre a regeneração da epiderme, crescendo em toda a região do ferimento, substituindo a crosta.

Gupta (2009) relatou que os cistócitos ou coagulócitos possuem papel importante na coagulação da hemolinfa e que essas células apresentam fenoloxidases que podem ser extravasadas no processo de coagulação.

2.2.2.3 Fenoloxidase e melanização

A enzima fenoloxidase, que é responsável pela cascata profenoloxidase, catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos para produzir melanina (DA SILVA, 2002). Da Silva (2002) afirma que esse composto participa de três processos fisiológicos importantes: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesa imunológica.

A fenoloxidase se encontra na forma de uma proenzima, denominada profenoloxidase, a qual é ativada proteoliticamente por uma ou duas serino-protease em resposta às infecções por bactérias, fungos, lipopolissacarídeos (presente na parede celular de gram-negativas), peptideoglicanas (presente na parede celular de gram-positivas), *beta*-1,3 glicanas (presente na parede celular de fungos e algas), enzimas proteolíticas de parasitoides (tripsina e quimotripsina) (DA SILVA, 2002; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006) e injúrias nos tecidos (DA SILVA, 2002). Essa proenzima está presente na hemolinfa (no plasma ou em hemócitos), ou em alguns casos, em ambos, dependendo da espécie do inseto (GILLESPIE; KANOST, 1997).

Fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os micro-organismos invasores como para o próprio inseto, por isso sua ativação é limitada ao local de infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o inseto (DA SILVA, 2002).

2.3 Estresse

Estresse pode ser definido como “qualquer fator ambiental que age reduzindo o desempenho de um organismo” (RION; KAWECKI, 2007). Estresse em insetos pode ser causado por múltiplos fatores bióticos e abióticos como superpopulação, infecção patogênica/parasitária, temperaturas extremas,

metamorfose, danos mecânicos, intoxicação química, fome, entre outros (BREY, 1994). Esses fatores podem alterar o crescimento, a sobrevivência, a longevidade, a reprodução, os movimentos e os hábitos gregários dos insetos (PANIZZI; PARRA, 2009).

2.3.1 Efeitos do estresse hídrico em insetos

A quantidade de água nas diferentes espécies de insetos, geralmente, varia de cerca de 60 a 80% do peso corporal, embora valores baixos como 40% já foram registrados (CHAPMAN, 2012). A perda de água ocorre nos insetos em várias vias paralelas: a cutícula, superfícies respiratórias e aberturas oral e anal (COOPER, 1983 apud APPEL; REIERSON; RUST, 1986). Para compensar a perda de água, esta é obtida por fontes externas, Chapman (2012) afirma que a maior parte da água, na maioria dos insetos, é adquirida a partir dos alimentos, mas se foram privados de alimento, bebem a água disponível.

Tem sido relatado por vários autores que quando insetos estão sujeitos à baixa umidade relativa ou estão num ambiente sem disponibilidade de água há redução de peso em representantes de diversas ordens de insetos: Orthoptera (ALBAGHDADI, 1987; DJAJAKUSUMAH; MILES, 1966; PUNZO, 1989), Phasmatodea (NICOLSON et al., 1974), Blattaria (EDNEY; 1968; HYATT; MARSHALL, 1977; TUCKER, 1977a; TUCKER, 1977b; WALL, 1970) e Coleoptera (GEHRKEN; SOMME, 1994; NAIDU, 2001; PEDERSEN; ZACHARIASSEN, 2002). Muitos deles afirmam que após pouco tempo de reidratação, esses insetos recuperam parcialmente ou completamente o peso perdido (ALBAGHDADI, 1987; DJAJAKUSUMAH; MILES, 1966; NAIDU, 2001; TUCKER, 1977b; WALL, 1970).

O estresse hídrico também pode interferir na performance reprodutiva das fêmeas, já que segundo Punzo e Huff (1989), o número de ovos postos pelas fêmeas de *Tenebrio obscurus* Fabricius, 1792 (Coleoptera, Tenebrionidae) foi, aproximadamente, 80% menor quando expostas à baixa umidade (12%) do que aquelas expostas à umidade mais alta (73%).

O volume da hemolinfa é reduzido quando os insetos estão em um ambiente sem disponibilidade de água ou com baixa umidade, já sido relatado

por vários autores em diferentes ordens de insetos: Zygentoma (OKASHA, 1973), Orthoptera (ALBAGHDADI, 1987; DJAJAKUSUMAH; MILES, 1966) Phasmatodea (NICOLSON et al., 1974), Blattaria (HYATT; MARSHALL, 1977; WALL, 1970) e Coleoptera (COHEN, 1984; COHEN; MARCH; PINTO, 1986; NAIDU, 2001). Muitos deles afirmam que após pouco tempo de reidratação, esses insetos recuperam parcialmente ou completamente o volume inicial da hemolinfa (COHEN; MARCH; PINTO, 1986; DJAJAKUSUMAH; MILES, 1966; NAIDU, 2001; OKASHA, 1973; WALL, 1970).

Alguns autores relataram que a osmolaridade não teve diferença significativa quando o inseto é privado de água em relação ao valor inicial (COHEN; MARCH; PINTO, 1986; NAIDU, 2001; NICOLSON et al., 1974). Entretanto, Bjerke e Zachariassen (1997) e Cohen (1984) observaram um aumento na osmolaridade da hemolinfa quando, respectivamente, *Cypholoba* sp. de Chaudoir 1850 (Coleoptera, Carabidae) e *Megetra cancellata* (Brandt & Erichson, 1832) (Coleoptera, Meloidae) foram privados de água.

Djajakusumah e Miles (1966) e Hyatt e Marshall (1977) relataram que embora a hemolinfa tenha diminuído de volume, só são observados ligeiros aumentos na pressão osmótica. Porém, Cohen (1984) e Edney (1968) observaram um aumento significativo na pressão osmótica quando, respectivamente, *M. cancellata* e *P. americana* foram privados de água.

A desidratação também pode aumentar a susceptibilidade à infecção por entomopatógenos. Lord (2007) relatou que adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera, Tenebrionidae) se tonaram mais susceptíveis à infecção por *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales, Clavicipitaceae) nessas condições.

2.3.2 Efeitos do estresse alimentar em insetos

A quantidade e a qualidade do alimento consumido na fase imatura afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, o peso do corpo, a sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, a longevidade, a movimentação e a capacidade de competição de adultos (PANIZZI; PARRA, 2009).

Alguns autores relataram que a ausência de alimento causa aumento significativo na perda de peso em uma diversidade de insetos das mais diversas ordens: Orthoptera (HILL; GOLDSWORTHY, 1970; LIM; LEE, 1981; LUDWIG, 1950), Blattaria (DUARTE, 2013), Coleoptera (AUERSWALD; GADE, 2000; DUNKEL; BOUSH, 1969; LAPARIE et al., 2012; NEWTON, 1954; SCHWALBE; BAKER, 1976), Lepidoptera (CHEN; GU, 2006; IWAO, 1967; NIJHOUT, 1975; RICHARDS; EDWARDS, 1999; SATAKE; KAWABE; MIZOGUCHI, 2000; SHAPIRO, 1969) e Hymenoptera (ISHAY, 1975).

O tempo de sobrevivência dos insetos submetidos ao estresse alimentar é diretamente correlacionado com a quantidade de gordura estocada antes de se iniciar a fome (FAST, 1964 apud IWAO, 1967). Quando privados de alimento, a sobrevivência é reduzida em inúmeras ordens de insetos, já relatados por diversos autores: Blattaria (DUARTE, 2013; PARK; PARK; TAKEDA, 2013; WILLIS; LEWIS, 1957), Isoptera (HU; SONG; GAO, 2011), Coleoptera (ARMSTRONG; NEWTON, 1985; DAGLISH, 2006) Lepidoptera (CHEN; GU, 2006; IWAO, 1967; MORITA; TOJO, 1985), Diptera (SINGH; BALA, 2009) e Hymenoptera (ISHAY, 1975).

Quando larvas de *B. mori* foram privadas de alimento, o comportamento errante e a consequente pupariação ocorreu um dia mais cedo do que o grupo controle (CHEN; GU, 2006). Os autores ainda explicaram que essa aceleração do desenvolvimento pode ser devido à concentração de ecdisesteroides na hemolinfa ser maior do que o dobro em relação à do grupo controle.

Alguns autores já relataram que larvas privadas de alimento por algum período aumentam a chance de aparecimento de um ínstar supranumerário (CONNAT et al., 1991; CYMBOROWSKI et al., 1982; LEONARD, 1970; MORITA; TOJO, 1985). A porcentagem de larvas que tiveram um ínstar supranumerário também é aumentada quando elas são criadas em densidades elevadas devido à deficiência alimentar (MORITA; TOJO, 1985). O desenvolvimento larval e pupal de *T. castaneum* são aumentados quando as larvas são privadas de alimento por oito dias (ARMSTRONG; NEWTON, 1985).

Pupas de Calliphoridae formadas por larvas privadas de alimento pesaram menos do que aquelas do grupo controle (SHAAYA; LEVENBOOK, 1982; SINGH; BALA, 2009). Segundo Hill e Goldsworthy (1970), fêmeas de

quinto instar de *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera, Acrididae) privadas de alimento por dois dias imediatamente param de crescer.

Reisenman et al. (2013) relataram que *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) quando submetidos à fome prolongada, são mais atraídos por feromônios de agregação (fezes). Esses autores explicam que, na ausência de alimento, esses insetos optam por se abrigar e aguardar uma nova fonte segura de alimento.

Com o aumento do período sem alimento, menos machos e fêmeas de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Coleoptera, Bostrichidae) foram capazes de localizar a fonte de alimento (NGUYEN, 2008). Após cinco dias sem alimento, nenhum inseto conseguiu localizar esta fonte e no decorrer do período, os insetos também se tornam mais lentos.

Após cinco dias privados de alimento, a atividade de voo de *Oncopeltus fasciatus* (Dallas, 1852) (Hemiptera, Lygaeidae) foi significativamente maior (RANKIN; RIDDIFORD, 1977). Entretanto, após 15 dias de fome, tiveram uma redução na atividade do voo.

Segundo Leonard (1970), assim que o alimento foi retirado não há diferença na atividade das larvas *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Lymantriidae), mas ao final do segundo dia demonstram um comportamento errante característico associado à fome. O autor explica que quando as larvas dessa espécie eclodem, dificilmente encontrarão uma fonte de alimento se não dispersarem. Portanto, conforme ficam com fome, alcançam um estado ativo que aumenta suas possibilidades de dispersão.

Da mesma forma, machos de *B. germanica* aumentam a velocidade de locomoção, distância percorrida e porcentagem do tempo em movimento quando estão com fome (BARCAY; BENNETT, 1991). Esses autores explicam que essa mudança na atividade locomotora é uma vantagem adaptativa, aumentando a probabilidade de encontrar alimento.

Alguns autores já relataram que insetos submetidos a estresse alimentar, deprimem o sistema imune (FEDER et al., 1997), seja no número de hemócitos (BLOCK; STOKS, 2008; RICHARDS; EDWARDS, 1999; SUJATHA; DUTTA-GUPTA, 1991) ou na atividade da cadeia da profenoloxidase (BLOCK; STOKS, 2008; SIVA-JOTHY; THOMPSON, 2002). Larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Pyralidae) privadas de alimento

tiveram redução do número de adipohemócitos, de células em divisão e aumento do número de células em degeneração (SHAPIRO, 1968).

Esse prejuízo ao sistema imune torna o inseto mais susceptível às infecções por micro-organismos e ao desenvolvimento de doenças, aumentando as chances de o patógeno causar morte ao inseto (FEDER et al., 1997; FURLONG; GRODEN, 2003; LORD, 2010). Algumas espécies de insetos privados de alimentos aumentam a probabilidade de morte quando infectados com entomopatógenos (BANVILLE; BROWNE; KAVANAGH, 2012; FEDER et al., 1997; FURLONG; GRODEN, 2003).

Alguns autores já relataram que quando insetos são submetidos à privação de alimento, assim como a desidratação, também causa redução no volume da hemolinfa (CYMBOROWSKI et al., 1982; RICHARDS; EDWARDS, 1999; SHAPIRO, 1969). Gehrken e Somme (1994) relataram que a fome também influencia na osmolaridade da hemolinfa.

A privação de alimento em fêmeas de algumas espécies de Orthoptera reduz o comprimento dos oócitos (HIGHNAM; HILL; MORDUE, 1966; TOBE; CHAPMAN, 1979) e também aumenta o número de oócitos reabsorvidos (HIGHNAM; HILL; MORDUE, 1966; LIM; LEE, 1981; TOBE; CHAPMAN, 1979).

O crescimento dos oócitos em *P. americana* foi reduzido após poucos dias de fome (WEAVER; PRATT, 1981). Os autores também relataram que fêmeas privadas de alimento têm um retardamento na oviposição.

Bell (1971) relatou que fêmeas de *P. americana* produziam de duas a três ootecas após a privação de alimento. O autor ainda relatou que quando produziam a terceira ooteca, esta frequentemente continha ovos menores.

Daglish (2006) observou que adultos de *T. castaneum* privados de alimento por 28 dias tem uma redução de, aproximadamente, 96% da sua progênie. O mesmo autor também relatou que a redução na progênie é semelhante em adultos de *R. dominica* quando privados de alimento por apenas quatro dias.

3 Materiais e Métodos

3.1 Manutenção das colônias de *Periplaneta americana*

Adultos de *P. americana* foram coletados nas dependências do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (31°48'S; 52°25'O), sendo criados a mais de cinco gerações em laboratório, antes do início do experimento.

As colônias foram mantidas no Laboratório de Entomologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas), conforme a metodologia adotada por Vianna, Berne e Ribeiro (2001), apenas diferindo na ração utilizada, onde, no presente trabalho, foi utilizada ração composta por farinha de carne e açúcar, na proporção de 1:1.

Durante todo o período de experimentação, os indivíduos de *P. americana*, tanto de manutenção quanto de experimentação, permaneceram em câmara climatizada, com temperatura de 26° ± 2°C, umidade relativa do ar a 70% ± 10% e fotofase de 12 horas.

3.2 Avaliação de diferentes estresses na variação do peso de adultos de *Periplaneta americana*

Foram utilizados adultos de *P. americana* com três a dez dias após a emergência. O peso inicial dos adultos foi padronizado, só sendo utilizados machos pesando de 0,8 a 1,1g e fêmeas com peso de 0,9 a 1,2g. O intervalo dos pesos foi estipulado levando em consideração a faixa de peso que se encontrava o maior número de adultos recém-emergidos da colônia. Foram estabelecidos quatro grupos de tratamentos, cada um composto por oito casais cada: a) com alimento e água *ad libitum* (grupo controle); b) sem alimento e com água (estresse alimentar); c) com alimento e sem água (estresse hídrico); e d) sem alimento e água (estresse hídrico/alimentar).

Cada espécime foi isolado em frascos de vidro (para evitar o canibalismo) (16cm de altura e 8cm de diâmetro) cobertos por tecido organza. Conforme o grupo,

a dieta e a água foram oferecidas em recipientes plásticos (1cm de altura e 2,5cm de diâmetro) e repostas a cada três dias. Para disponibilizar água, foi colocado algodão embebido em água nos recipientes para evitar a perda excessiva por evaporação.

Os espécimes foram pesados em balanças de precisão no momento em que foram isolados, e novamente a cada 10 dias, num total de quatro pesagens (0, 10, 20 e 30 dias).

3.3 Avaliação do peso adquirido após a reidratação em adultos de *Periplaneta americana*

Os espécimes utilizados obedeceram ao mesmo período pós-emergência e peso supracitados. Oito machos e oito fêmeas foram submetidos ao estresse hídrico/alimentar por três diferentes períodos (10, 20 e 30 dias) cada.

Cada espécime foi isolado em frascos de vidro e sujeitos às mesmas condições que o bioensaio anterior. Eles foram pesados em balanças de precisão para se registrar seu peso inicial (antes de terem sido isolados) e final (após o período de experimentação ter terminado). Após esse período, os insetos receberam água por 24h, e então foram pesados novamente para se registrar o peso reidratado.

3.4 Avaliação do impacto de diferentes estresses no número total e na contagem diferencial de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana*

Os espécimes utilizados obedeceram ao mesmo período pós-emergência e peso supracitados. Foram estabelecidos cinco grupos de tratamentos: a) com alimento e água *ad libitum* (grupo controle); b) sem alimento e com água (estresse alimentar); c) com alimento e sem água (estresse hídrico); d) sem alimento e água (estresse hídrico/alimentar) e e) sem alimento e água pelo período determinado, e após foi reidratado por 24h (estresse hídrico/alimentar reidratado). Para cada um dos cinco grupos, oito machos e oito fêmeas foram submetidos a essas condições para cada um dos três diferentes períodos (10, 20 e 30 dias).

Cada espécime foi isolado em frascos de vidro e sujeitos às mesmas condições que o bioensaio anterior. Eles foram pesados em balanças de precisão para se registrar seu peso inicial (antes de terem sido isolados) e final (após o

período de experimentação ter terminado). Os insetos do grupo reidratado foram pesados da forma já descrita para os outros grupos e após 24h de reidratação.

Após a pesagem final, os insetos foram imobilizados mecanicamente para a retirada de hemolinfa. Com o inseto imobilizado, a metacoxa direita foi cortada e, com um micropipetador automático, foram retirados 5µl de hemolinfa extravasada. O material coletado foi diluído em 15µl de anticoagulante (CHALK; SULIAMAN, 1998) (respeitando um fator de diluição igual a 4) e colocado em uma Câmara de Neubauer para contagem do número total de hemócitos.

Para a contagem diferencial de hemócitos, foram retirados 10µl de hemolinfa do mesmo corte e a partir deste volume foi realizado um esfregaço. As lâminas foram coradas utilizando um kit de coloração Panótico Rápido Laborclin. Duzentas células foram contadas para se estimar a frequência relativa dos tipos celulares. Os tipos celulares foram caracterizados conforme mostrado na Figura 1.

Após a retirada da hemolinfa para as análises imunológicas, os insetos eram imediatamente sacrificados e descartados.

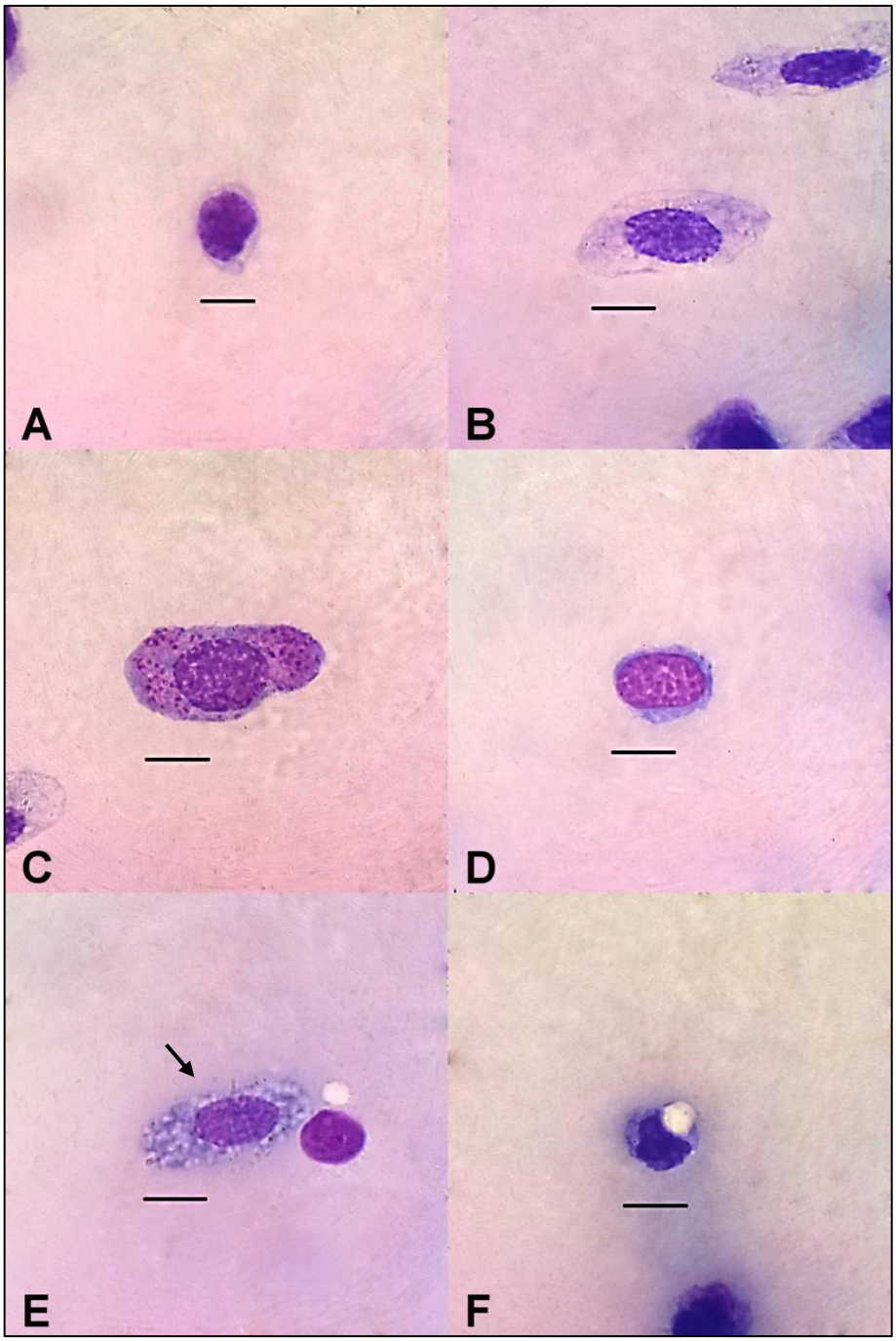

Figura 1 – Hemócitos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) em microscopia óptica fixados e corados com Panótico Rápido (aumento 1.600x). A: pró-hemócito (PR); B: plasmatócito (PL); C: granulócito (GR); D: cistócito (CY); E: esferulócito (SP); F: adipohemócito (AD). Barras horizontais (A-F) equivalem a 5µm.

3.5 Análise de dados

O peso dos insetos foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores, sendo estes: tratamento e o período. Para a comparação das médias dos diferentes tratamentos e períodos foi utilizado o teste de Tukey.

A taxa de variação de peso dos insetos nos diferentes decêndios foi calculada pela razão entre a variação do peso e o número de dias. A taxa foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores, onde estes foram o tratamento e o período. Para a comparação das médias dos diferentes tratamentos e períodos foi utilizado o teste de Tukey.

O ganho de peso dos insetos em 24h de reidratação também foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores, onde estes foram o período de estresse e o sexo. Para a comparação das médias dos diferentes períodos e sexos foi utilizado o teste de Tukey.

Para a avaliação da influência do tempo de estresse ou do tratamento no número total de hemócitos, os dados foram transformados pela raiz quadrada para tornar a distribuição normal (VIEIRA, 2006). Após a transformação, os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA).

Antes de avaliar a influência dos estresses na contagem diferencial, os dados foram transformados pela raiz quadrada de x+0,5 (VIEIRA, 2006). Após a transformação, os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA).

Para todos os testes, foi considerado nível de significância de 95% e foi utilizado o programa estatístico IBM® SPSS® Statistics Version 22 (2013).

4 Resultados

4.1 Avaliação de diferentes estresses na variação do peso de adultos de *Periplaneta americana*

O peso das fêmeas foi influenciado significativamente pelo tipo de estresse que elas foram submetidas (F=140,04; GL=3; p<0,001), porém, não foi influenciado pelo tempo de estresse (F=2,40; GL=2; p=0,097) nem pela interação entre esses dois fatores (F=1,10; GL=6; p=0,369) (Fig. 2).

No estresse hídrico/alimentar as fêmeas perderam, em média, 214mg (21,02%) nos primeiros 10 dias enquanto que no final dos 30 dias de estresse, alcançaram um peso perdido acumulado de, aproximadamente, 329mg (32,47%) (Fig. 2). Fêmeas privadas somente de água perderam, em média, 116mg (10,82%) em 10 dias, e ao término do período de experimentação, haviam perdido peso acumulado em torno de 171mg (15,98%) (Fig. 2). Já quando elas foram privadas somente de alimento, perderam, em média, apenas 76mg (7,50%) no início do estresse e após 30 dias de privação, perderam peso acumulado em torno de 99mg (9,64%) (Fig. 2).

As fêmeas do grupo controle ganharam, em média, 163mg (16,22%) nos primeiros dez dias, alcançando um aumento acumulado de 184mg (18,12%) ao final do período de observação (Fig. 2).

Já dentre os machos, o peso foi influenciado significativamente pelo tipo de estresse (F=77,88; GL=3; p<0,001), pelo tempo em que os insetos foram submetidos (F=9,16; GL=2; p<0,001) e pela interação entre esses dois fatores (F=3,96; GL=6; p<0,005) (Fig. 2).

Os machos do estresse hídrico/alimentar perderam, em média, 158mg (16,36%) nos primeiros 10 dias, e até o final do período de experimentação, haviam perdido peso acumulado de, aproximadamente, 273mg (28,26%) (Fig. 2). Aqueles privados somente de água perderam, em média, 129mg (13,48%) em 10 dias enquanto que no final dos 30 dias de estresse, alcançaram um peso perdido acumulado em torno de 238mg (25,02%) (Fig. 2). Porém quando

eles foram privados somente de alimento, perderam, em média, 88mg (9,23%) nos primeiros 10 dias e após 30 dias de privação, perderam cerca de 131mg (13,76%) (Fig. 2).

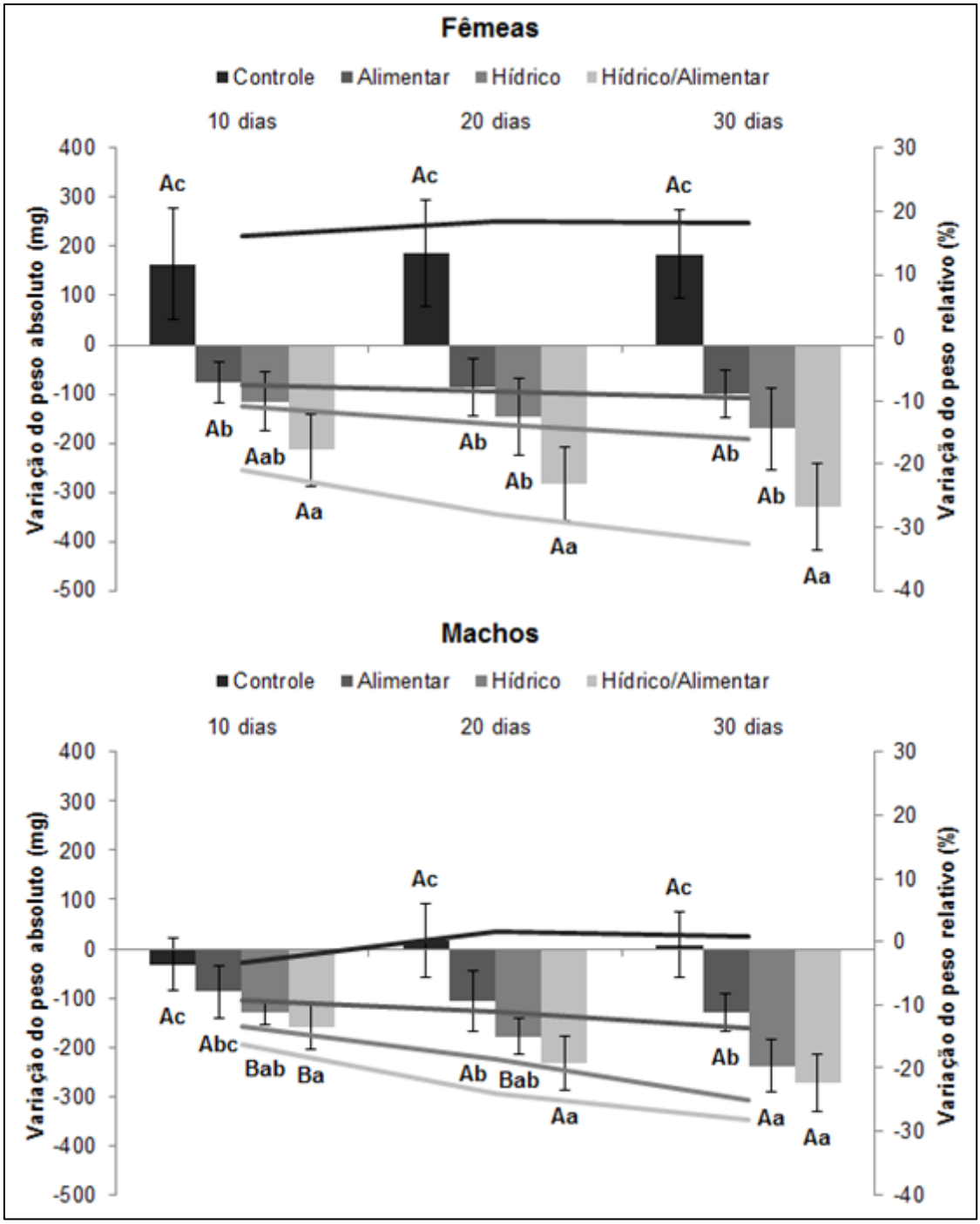

Figura 2 – Variação do peso absoluto (mg) e peso relativo (%) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em diferentes períodos. Barras representam o desvio padrão da média. Linhas estão relacionadas ao eixo vertical secundário. Letras maiúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os períodos, enquanto que letras minúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os estresses (teste de Tukey $p<0,05$).

Machos do grupo controle perderam, em média, 32mg (3,23%) nos primeiros 10 dias de isolamento e ganharam aproximadamente apenas 8mg (0,87%) ao final dos 30 dias de estresse (Fig. 2).

As taxas de variação dos pesos das fêmeas e dos machos foram influenciadas significativamente pelo tipo de estresse que os insetos foram submetidas (fêmeas: F=47,66; GL=3; p<0,001; machos: F=28,58; DF=3; p<0,001), pelo tempo de estresse (fêmeas: F=6,26; GL=2; p<0,005; machos: F=38,91; GL=2; p<0,001) e pela interação entre esses dois fatores (fêmeas: F=18,82; GL=6; p<0,001; machos: F=2,61; GL=6; p<0,05) (Fig. 3).

No estresse hídrico/alimentar as fêmeas perderam, em média, 21,4mg/dia (2,10%/dia) nos primeiros 10 dias enquanto que nos últimos 10 dias de estresse, perderam, aproximadamente, 4,7mg/dia (0,46%/dia) (Fig. 3). Fêmeas privadas somente de água perderam, em média, 11,6mg/dia (1,08%/dia) em 10 dias, e no último decêndio de estresse, perderam em torno de 2,5mg/dia (0,24%/dia) (Fig. 3). Contudo quando elas foram privadas somente de alimento, perderam, em média, apenas 7,6mg/dia (0,75%/dia) no início do estresse e no segundo decêndio, a perda de peso foi em torno de 0,9mg/dia (0,10%/dia) (Fig. 3).

Entretanto, fêmeas do grupo controle ganharam, em média, 16,4mg/dia (1,62%/dia) nos primeiros dez dias e nos últimos dez dias, perderam cerca de 0,2mg/dia (0,04%/dia) (Fig. 3).

Os machos do estresse hídrico/alimentar perderam, em média, 15,8mg/dia (1,64%/dia) nos primeiros 10 dias e nos últimos 10 dias de estresse perderam em torno de 4,0mg/dia (0,42%/dia) (Fig. 3). Aqueles privados somente de água perderam, em média, 12,9mg/dia (1,35%/dia) em 10 dias enquanto que no segundo decêndio de estresse perderam, aproximadamente, 4,9mg/dia (0,52%/dia) (Fig. 3). Já quando eles foram privados somente de alimento, perderam, em média, 8,8mg/dia (0,92%/dia) nos primeiros 10 dias e no segundo decêndio perderam cerca de 1,8mg/dia (0,19%/dia) (Fig. 3).

Os machos do grupo controle perderam, em média, 3,2mg/dia (0,32%/dia) nos primeiros 10 dias de isolamento e ganharam aproximadamente 4,7mg/dia (0,49%/dia) no segundo decêndio, enquanto que no último decêndio, perderam em torno de 0,8mg/dia (0,08%/dia) (Fig. 3).

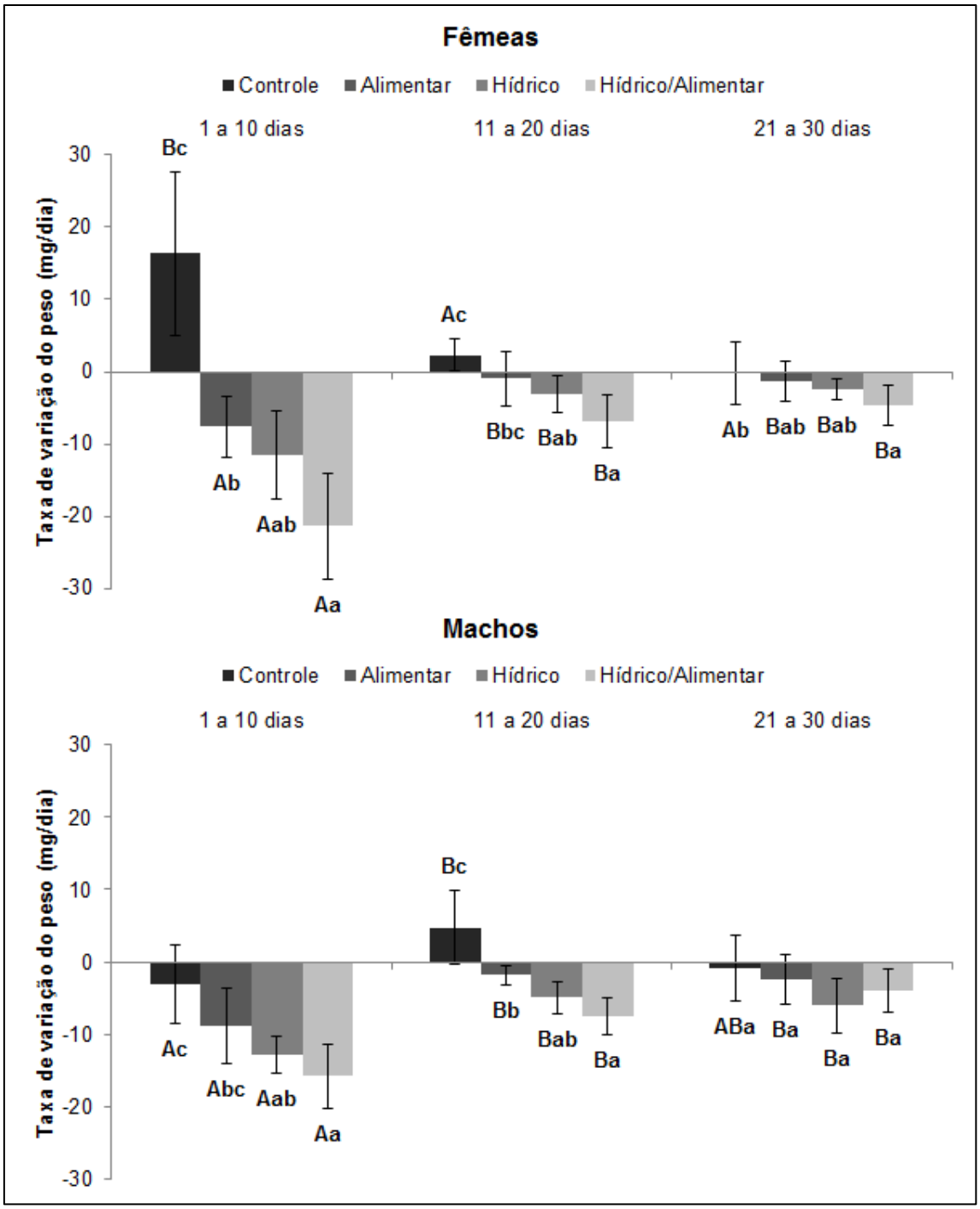

Figura 3 – Taxa de variação do peso (mg/dia) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em diferentes decêndios. Barras representam o desvio padrão da média. Letras maiúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os períodos, enquanto que letras minúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os estresses (teste de Tukey $p<0,05$).

4.2 Avaliação do peso adquirido após a reidratação em adultos de *Periplaneta americana*

O peso ganho em 24 horas de reidratação após diferentes períodos de estresse foi influenciado pelo sexo dos insetos (F=13,33; GL=1; p=0,001) e pelo período em que os insetos foram submetidos a estresse (F=30,06; GL=2; p<0,001), mas não foi influenciado pela interação entre esses dois fatores (F=0,61; GL=2; p=0,548) (Fig. 4).

Fêmeas privadas de água e alimento por 10, 20 e 30 dias adquiriram, em média, 63mg, 131mg e 212mg, respectivamente, após 24 horas de reidratação (Fig. 4). Já os machos, reidratados por 24 horas, adquiriram, em média, 101mg, 215mg e 279mg quando privados de água e alimento por 10, 20 e 30 dias, respectivamente (Fig. 4).

Os machos foram capazes de recuperar, em 24 horas de reidratação, o peso perdido em 30 dias de privação, mas não conseguiram recuperar o peso com 10 dias de privação. As fêmeas não foram capazes de recuperar todo o peso perdido, independente do tempo em que foram submetidas ao estresse.

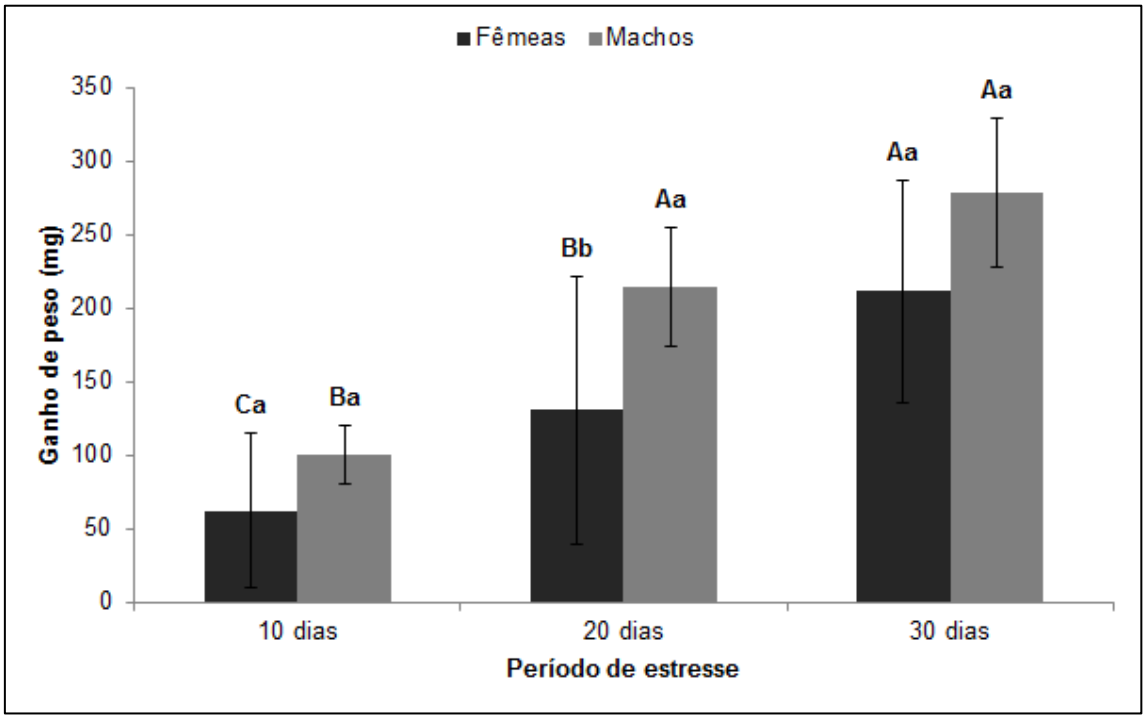

Figura 4 – Ganho de peso de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) em 24h de reidratação após a submissão em diferentes períodos de estresse hídrico/alimentar. Barras representam o desvio padrão da média. Letras maiúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os períodos, enquanto que letras minúsculas iguais representam não haver diferença significativa entre os sexos (teste de Tukey p<0,05).

4.3 Avaliação do impacto de diferentes estresses no número total e na contagem diferencial de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana*

Não foi possível retirar a hemolinfa daqueles insetos privados de água (hídrico e hídrico/alimentar) por 30 dias, por esse motivo, esses grupos foram retirados dessas análises.

O NTH das fêmeas não foi influenciado pelos tratamentos a que foram submetidas em 10 ($F=2,01$; $GL=4$; $p=0,115$), 20 ($F=2,56$; $GL=4$; $p=0,055$) e 30 dias ($F=0,82$; $GL=2$; $p=0,454$) (Fig. 5). Só houve redução significativa no NTH em função do tempo nas fêmeas do grupo controle ($F=11,18$; $GL=2$; $p<0,001$) (Fig. 5). Nos demais grupos testados, o tempo não influenciou no NTH das fêmeas (alimentar: $F=0,59$; $GL=2$; $p=0,564$; hídrico: $F=0,987$; $GL=1$; $p=0,337$; hídrico/alimentar: $F=0,326$; $GL=1$; $p=0,577$; hídrico/alimentar reidratado: $F=2,30$; $GL=2$; $p=0,125$) (Fig. 5).

O NTH dos machos não teve diferença significativa quando comparado entre os tratamentos em 10 ($F=0,66$; $GL=4$; $p=0,622$), 20 ($F=2,56$; $GL=4$; $p=0,056$) e 30 dias ($F=0,32$; $GL=2$; $p=0,731$) (Fig. 5). Também não houve influência do tempo sobre o NTH dos grupos testados (controle: $F=2,16$; $GL=2$; $p=0,140$; alimentar: $F=1,03$; $GL=2$; $p=0,373$; hídrico: $F=4,12$; $GL=1$; $p=0,062$; hídrico/alimentar: $F=1,19$; $GL=1$; $p=0,294$; hídrico/alimentar reidratado: $F=1,37$; $GL=2$; $p=0,277$) (Fig. 5).

O NTH das fêmeas variou, em média, de 17.569 a 39.619 células/mm³ no grupo controle e de 20.150 a 38.006 células/mm³ nos grupos estressados (Fig. 5). Já nos machos, o NTH variou, em média, de 18.540 a 28.590 células/mm³ no grupo controle e de 12.893 a 22.914 células/mm³ nos grupos estressados (Fig. 5).

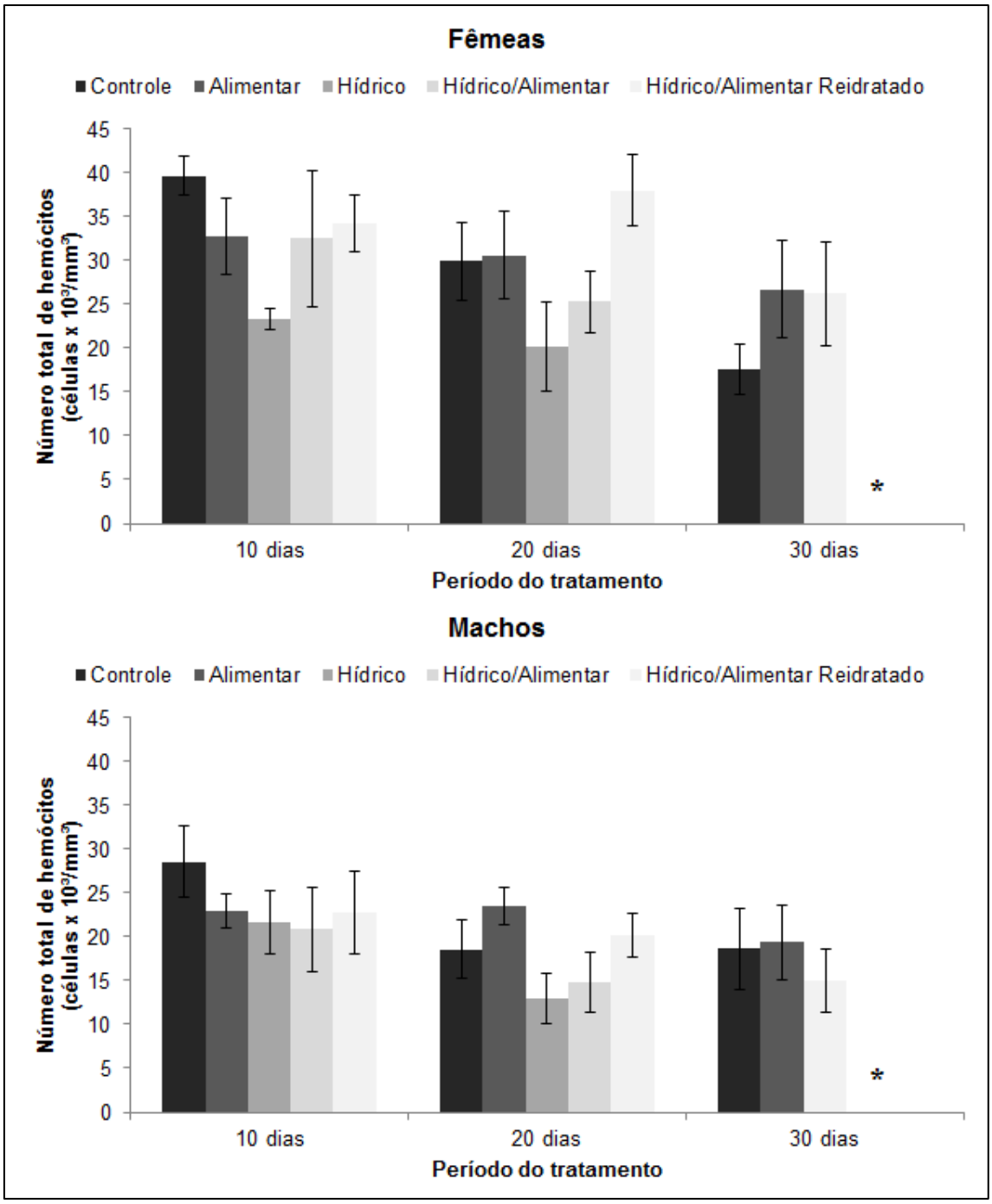

Figura 5 – Número total de hemócitos (células x 10³/mm³) de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse em três diferentes períodos. Barras representam o erro padrão da média. * Não foi possível avaliar o número total de hemócitos para o hídrico e hídrico/alimentar de 30 dias.

Para o grupo controle de ambos os sexos, houve pequenas variações na porcentagem dos tipos celulares nos diferentes períodos, sendo que em média, os pró-hemócitos variaram de 7 a 13%, os plasmatócitos de 44 a 55%, os granulócitos de 16 a 33%, os cistócitos de 7 a 25%, os esferulócitos de 2 a 3%, e os adipohemócitos de 0 a 1% (Tab. 1 e 2).

Não foi possível calcular a diferença estatística entre os estresses na proporção dos adipohemócitos, pois o número de células encontradas de tipo foi muito baixa.

Nas fêmeas do estresse alimentar, foi observado uma redução significativa no número de plasmatócitos ao 10º dia de estresse ($F=11,27$; $GL=1$; $p<0,01$), e uma redução no número de granulócitos em 20 dias de privação ($F=6,80$; $GL=1$; $p<0,05$) (Tab. 1).

Nas fêmeas privadas somente de água, não foi observado alterações na proporção dos tipos celulares quando comparadas com o grupo controle pelo mesmo período (Tab. 1).

No estresse hídrico/alimentar, houve uma redução significativa no número de plasmatócitos das fêmeas ($F=7,11$; $GL=1$; $p<0,05$), e um aumento no número de cistócitos ($F=4,95$; $GL=1$; $p<0,05$) e esferulócitos ao 10º dia de privação ($F=18,99$; $GL=1$; $p<0,01$) (Tab 1.).

O número de esferulócitos aumentou significativamente em 10 dias nas fêmeas privadas de água e alimento e reidratadas ($F=5,00$; $GL=1$; $p<0,05$) (Tab. 1). Neste mesmo estresse, foi possível observar aumento no número de pró-hemócitos em 20 e 30 dias (20 dias: $F=13,11$; $GL=1$; $p<0,01$; 30 dias: $F=12,23$; $GL=1$; $p<0,01$), enquanto que houve uma redução no número de plasmatócitos nesses mesmos períodos de estresse (20 dias: $F=5,33$; $GL=1$; $p<0,05$; 30 dias: $F=8,28$; $GL=1$; $p<0,05$) (Tab. 1). Os granulócitos também reduziram em 20 dias para o mesmo tratamento ($F=8,97$; $GL=1$; $p<0,01$) e os cistócitos aumentaram significativamente em relação ao grupo controle aos 30 dias de privação ($F=19,47$; $GL=1$; $p<0,01$) (Tab. 1).

Nos machos do estresse alimentar, foi observado um aumento no número de pró-hemócitos ($F=10,18$; $GL=1$; $p<0,01$) e cistócitos ao 10º dia ($F=5,07$; $GL=1$; $p<0,05$), enquanto que nesse mesmo período reduziu significativamente o número de plasmatócitos ($F=9,43$; $GL=1$; $p<0,01$) (Tab. 2).

Nos machos privados de água (hídrico e hídrico/alimentar) só foi observado alterações nas proporções dos tipos celulares ao 20º dia com redução no número de cistócitos (hídrico: $F=4,86$; $GL=1$; $p<0,05$; hídrico/alimentar: $F=5,16$; $GL=1$; $p<0,05$) (Tab. 2).

Foi observado um aumento do número de pró-hemócitos em 20 dias nos machos privados de água e alimento e reidratados ($F=5,76$; $GL=1$; $p<0,05$) (Tab. 2).

Tabela 1 – Contagem diferencial de hemócitos (% ± erro padrão) de fêmeas de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresses em diferentes períodos.

Período	Hemócito	Tratamento (% ± EP)				
		Controle	Alimentar	Hídrico	Hídrico/Alimentar	Hídrico/Alimentar Reidratado
10 dias	PR	11,6 ± 2,8	24,2 ± 6,9	6,6 ± 1,8	17,8 ± 2,1	14,4 ± 5,4
	PL	45,9 ± 5,8	19,4 ± 5,9 **	54,4 ± 5,5	28,1 ± 3,2 *	37,1 ± 5,9
	GR	25,9 ± 3,3	24,4 ± 5,4	25,0 ± 4,0	19,5 ± 3,7	25,6 ± 1,2
	CY	15,2 ± 4,5	30,4 ± 5,0	11,2 ± 3,2	29,6 ± 4,1 *	20,4 ± 4,1
	SP	1,1 ± 0,4	1,6 ± 0,4	2,3 ± 0,6	4,9 ± 0,9 **	2,4 ± 0,5 *
	AD	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
20 dias	PR	8,1 ± 3,6	17,6 ± 7,9	-	9,7 ± 2,7	34,8 ± 6,8 **
	PL	46,5 ± 5,4	44,1 ± 10,4	-	43,3 ± 9,2	26,1 ± 7,8 *
	GR	33,2 ± 3,9	19,4 ± 3,9 *	-	28,6 ± 5,2	18,3 ± 2,7 **
	CY	10,2 ± 1,9	14,9 ± 4,3	-	14,9 ± 4,2	17,9 ± 4,3
	SP	1,5 ± 0,3	2,3 ± 0,6	-	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,8
	AD	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,6	-	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1
30 dias	PR	7,4 ± 3,1	7,2 ± 3,1	-	-	23,1 ± 3,7 **
	PL	50,0 ± 5,2	37,8 ± 5,1	-	-	30,8 ± 4,2 *
	GR	33,0 ± 5,2	42,9 ± 3,2	-	-	24,0 ± 2,9
	CY	6,8 ± 1,9	8,9 ± 2,4	-	-	19,1 ± 1,9 **
	SP	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,5	-	-	2,4 ± 0,9
	AD	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4	-	-	0,6 ± 0,4

PR: pró-hemócitos; PL: plasmatócitos; GR: granulócitos; CY: cistócitos; SP: esferulócitos; AD: adipohemócitos.
Valores significativamente diferentes aos do grupo controle do mesmo período foram mostrados com (*) (ANOVA): * $p<0,05$ e ** $p<0,01$. Não foi possível calcular a diferença estatística entre os estresses na proporção dos adipohemócitos.
(-) Não foi possível avaliar a contagem diferencial de hemócitos para o hídrico (20 e 30 dias) e hídrico/alimentar de 30 dias.

Tabela 2 – Contagem diferencial de hemócitos (% ± erro padrão) de machos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresses em diferentes períodos.

Período	Hemócito	Tratamento (%± EP)				
		Controle	Alimentar	Hídrico	Hídrico/Alimentar	Hídrico/Alimentar Reidratado
10 dias	PR	9,9 ± 1,9	18,6 ± 2,0 **	13,9 ± 2,5	5,9 ± 2,1	11,3 ± 2,3
	PL	54,6 ± 8,4	24,3 ± 2,4 **	36,4 ± 5,0	57,4 ± 5,6	38,8 ± 5,1
	GR	15,6 ± 2,9	25,1 ± 3,6	20,5 ± 4,4	22,6 ± 4,1	19,9 ± 3,1
	CY	17,6 ± 5,2	29,9 ± 2,4 *	26,0 ± 5,3	12,5 ± 2,1	26,1 ± 6,4
	SP	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,3	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,3	3,6 ± 0,8
	AD	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2
20 dias	PR	8,2 ± 2,3	11,5 ± 4,0	17,3 ± 5,5	16,5 ± 6,8	23,1 ± 6,3 *
	PL	46,9 ± 6,0	51,8 ± 11,4	46,8 ± 7,1	53,1 ± 7,9	41,5 ± 7,4
	GR	18,1 ± 2,7	18,9 ± 3,4	23,5 ± 2,8	17,5 ± 2,8	19,3 ± 2,4
	CY	24,5 ± 5,3	15,1 ± 5,7	9,1 ± 2,8 *	8,8 ± 2,1 *	14,9 ± 4,2
	SP	2,3 ± 0,7	2,6 ± 0,6	2,4 ± 0,5	3,1 ± 1,1	0,9 ± 0,2
	AD	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,3	0,4 ± 0,2
30 dias	PR	13,1 ± 5,5	9,7 ± 2,4	-	-	-
	PL	44,3 ± 6,0	51,9 ± 6,7	-	-	-
	GR	21,5 ± 3,1	18,4 ± 3,7	-	-	-
	CY	17,5 ± 3,8	17,6 ± 5,5	-	-	-
	SP	3,5 ± 0,7	2,4 ± 0,7	-	-	-
	AD	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	-	-	-

PR: pró-hemócitos; PL: plasmatócitos; GR: granulócitos; CY: cistócitos; SP: esferulócitos; AD: adipohemócitos.
Valores significativamente diferentes aos do grupo controle do mesmo período foram mostrados com (*) (ANOVA): * $p<0,05$ e ** $p<0,01$. Não foi possível calcular a diferença estatística entre os estresses na proporção dos adipohemócitos.
(-) Não foi possível avaliar a contagem diferencial de hemócitos para o hídrico (20 e 30 dias) e hídrico/alimentar de 30 dias.

5 Discussão

Os valores de perda de peso dos machos foram menores que os observados por outros autores nos primeiros 10 dias para todos os estresses. Segundo Hyatt e Marshal (1977) e Wall (1970), machos de *P. americana* privados de água por oito dias perdem em torno de 26% do seu peso inicial, já Tucker (1977a; 1977b) relatou que essa espécie perde em torno de 30% quando privados de água e alimento por 12 dias. A diferença encontrada por esses autores pode ser explicada pela alimentação oferecida aos insetos antes de serem submetidos aos estresses, pois segundo Tucker (1977a) a redução do peso durante o estresse depende da dieta oferecida antes da privação.

As perdas de peso mais acentuadas foram observadas nas fêmeas e machos dos estresses hídrico/alimentar e hídrico. Esses resultados sugerem que a grande parte do peso perdido nesses grupos foi referente à água, já que foi relatado que *P. americana* perde em torno de 50% de sua água corporal quando privada apenas de água por oito dias (HYATT; MARSHALL, 1977).

A perda de peso encontrada nas fêmeas privadas de água e alimento por 30 dias poderia comprometer sua capacidade reprodutiva. Segundo Kunkel (1966), fêmeas dessa espécie param de ovipor quando perdem em torno de 25% do seu peso. Além disso, insetos com perda de peso podem ter alterações na sua atividade locomotória (BARCAY; BENNETT, 1991; REYNIERSE; MANNING; CAFFERTY, 1972) e aumento na susceptibilidade a patógenos (FURLONG; GRODEN, 2003; BANVILLE; BROWNE; KAVANAGH, 2012) e inseticidas químicos (LEE; HENG, 2000).

Os insetos privados de alimento também tiveram uma tendência à redução do peso ao longo dos dias, apesar de ser menos acentuada em relação aos outros estresses. Isso se deve, provavelmente, à gordura corporal perdida, já que segundo Xian (1996), ninfas de último instar de *Periplaneta fuliginosa* (Serville, 1839) (Blattaria, Blattidae) têm seus corpos gordurosos reduzidos em 52% em 32 dias na ausência de alimento sendo que 16% são perdidos apenas nos quatro primeiros dias.

Apesar da tendência já mencionada, não foi observado diferença significativa entre os estresses alimentar e hídrico em até 30 dias. Isso, provavelmente, está relacionado ao período em que os insetos foram estressados, uma vez que Duarte (2013) relatou, para mesma espécie, que há diferença significativa no peso dos insetos desses dois estresses após sua morte, a qual ocorre, geralmente, em um período superior a 48 dias.

Além disso, os insetos do estresse hídrico podem ter retirado pequena quantidade de água da própria dieta que foi oferecida, uma vez que a dieta continha açúcar, e como tem propriedade higroscópica, pode ter absorvido umidade do ambiente (a qual no presente estudo foi em torno de 70%). A umidade foi estabelecida para estar de acordo com a comumente encontrada no habitat desses insetos (JOSEPH et al., 2012).

O ganho de peso das fêmeas do grupo controle foi, provavelmente, devido ao acúmulo de nutrientes nos corpos gordurosos para a produção de ootecas, pois segundo Arrese e Soulages (2010), a maioria dos lipídios acumulados nos oócitos é originada dos corpos gordurosos das fêmeas. Em contrapartida, machos do grupo controle mantiveram seu peso inalterado ou com pequena variação ao longo do tempo, provavelmente porque não precisam estocar gorduras para essa finalidade.

Foi observada a taxa de peso perdido dos insetos privados de água semelhante ao encontrado por Wall (1970) no primeiro decêndio, o qual relatou que esses insetos perdem em torno de 10 a 12mg por dia nos oito primeiros dias de estresse. Porém, Hyatt e Marshall (1977) relataram, nas mesmas condições, que esse inseto perde 26mg por dia. Isso pode ser explicado pelo fato de, apesar de serem da mesma espécie, as populações são diferentes, uma vez que a colônia desses autores foi obtida da Austrália.

A maior taxa de perda de peso no primeiro decêndio para todos os estresses está de acordo com o observado por Wall (1970). Segundo este autor, machos de *P. americana* privados de água apresentam uma grande queda no peso nos primeiros três dias. Provavelmente os insetos se mantêm mais ativos no início do estresse, porém após certo período os insetos entram em um estado de hipobiose para reduzir o gasto de energia. Esse comportamento foi descrito por Grodzicki e Walentynowicz (2011) que em resposta a impactos extremos, os insetos podem reagir aumentando a taxa de

atividade para buscar um nicho mais confortável ou reduzindo o metabolismo, levando ao hipometabolismo.

O fato de esses insetos perderem mais peso (em virtude, provavelmente, da redução dos corpos gordurosos) nos primeiros dez dias é de suma importância em se tratando do controle populacional dessa espécie. Munson e Gottlieb (1953) relataram que uma maior quantidade de lipídios confere maior resistência a alguns inseticidas químicos. Além disso, Arrese e Soulages (2010) relataram que os corpos gordurosos são responsáveis, não só pelas reservas energéticas, mas também para síntese de proteínas, produção de peptídeos antimicrobianos e desintoxicação de compostos nitrogenados.

No grupo controle, as fêmeas tiveram uma taxa de ganho de peso mais elevada nos primeiros 10 dias. Infere-se que logo após a emergência as fêmeas acumulem a maior quantidade possível de nutrientes nos corpos gordurosos para produção de ootecas. Como não estão cumprindo sua função reprodutiva atingem o peso máximo para seu tamanho no primeiro decêndio, reduzindo/cessando o ganho de peso nos demais períodos.

A diferença entre as taxas de peso nos decêndios dos machos do grupo controle só foi possível ser observada devido aos insetos terem sido pesados a cada dez dias, uma vez que o peso dos machos de *P. americana* flutua ao longo dos dias se houver a presença de água e alimento (WALL, 1970).

O peso ganho na reidratação está de acordo com Wall (1970), pois este autor afirmou que baratas quando estão desidratas, são capazes de beber de 100 a 200mg por 15 a 30 minutos e não irão beber novamente em alguns dias. O mesmo autor complementa que a água ingerida pode ser suficiente por duas a três semanas, dependendo da umidade ambiental.

A relação positiva entre o aumento de peso adquirido por reidratação e o tempo de estresse provavelmente se deve ao consumo dos corpos gordurosos, proporcionando um maior espaço livre na hemocele do inseto. Nos machos, após 20 dias de estresse, não houve diferença significativa entre o peso adquirido, provavelmente devido os seus corpos gordurosos estarem praticamente esgotados por possuírem menos corpos gordurosos do que as fêmeas (TAYLOR; FRECKLETON JR., 1969).

O NTH das fêmeas encontrados no presente estudo está de acordo com Wheeler (1963), o qual relatou que fêmeas de *P. americana* com idade

randômica variam de 23.000 a 127.000 células/mm³. Porém, ao se comparar com o NTH dos machos, o autor encontrou números mais elevados, variando de 70.000 a 208.000 células/mm³.

Somente o número de hemócitos encontrados nas fêmeas do estresse alimentar foi semelhante ao encontrado por More e Sonawane (1987) quando avaliaram o NTH de *P. americana* submetidos a esses tipos de estresses. Esses autores não padronizaram o peso, sexo e idade dos insetos usados, tornando difícil a comparação desses resultados.

Apesar de já ter sido relatado, em diferentes espécies de insetos, que o NTH aumenta (ROSENBERGER, 1960) ou reduz (SHAPIRO, 1967) na ausência de alimento, no presente estudo não se observou alterações significativas. O tempo de estresse pode não ter sido o suficiente para reduzir ou aumentar o número de hemócitos, já que segundo Duarte (2013), adultos de *P. americana* geralmente sobrevivem mais do que 48 dias sem água e alimento, e podem sobreviver ainda mais se um desses recursos estiver presente.

A não variação do NTH sob condições de estresse pode ser um mecanismo dessa espécie para sobrevivência em seus hábitats. Essa espécie vive em latrinas, esgotos, estações de tratamento, carcaças de animais e fossas sépticas (COCHRAN, 1999; MARICONI, 1999), locais com grande diversidade e abundância de patógenos e parasitos que podem causar patogenias em insetos com déficit imunológico.

Apesar de não ter havido diferença na concentração dos hemócitos nos diferentes grupos, podem ter reduzido o número de hemócitos circulantes naqueles grupos privados de água, uma vez que Hyatt e Marshal (1977) relataram que nessas condições, essa espécie pode reduzir em 50% o seu volume da hemolinfa. Rosenberger (1960) afirma que o aumento no NTH em *Spodoptera eridania* Stoll, 1781 (Lepidoptera, Noctuidae) quando em condições de estresse pode estar relacionado à redução no volume da hemolinfa, e que, na verdade, o número de células circulantes permanece o mesmo, mas com a redução do volume da hemolinfa, aumenta a concentração desses hemócitos.

Mesmo que não haja diferença na concentração dos hemócitos quando esses insetos são submetidos ao estresse, o fato de não ser possível retirar a hemolinfa naqueles insetos privados de água por 30 dias demonstra um grande

impacto sobre a biologia desses insetos, uma vez que segundo Klowden (2008) a hemolinfa é o principal meio de transporte para troca de material entre as células, como hormônios, resíduos e nutrientes.

Em todos os tratamentos, incluindo o controle, foi observada uma tendência à redução no NTH em decorrência do tempo, o que provavelmente seja uma característica relacionada à idade dos insetos, pois Schmid et al. (2008) relataram que operários de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) têm redução no número de hemócitos em função da idade.

É difícil fazer a comparação da proporção dos hemócitos do grupo controle com More e Sonawane (1987) porque esses autores utilizaram uma classificação diferente da que foi utilizada no presente estudo. Porém, a proporção dos plasmatócitos foi o único tipo celular que mostrou proporções próximas à encontrada por aqueles autores, ou seja, em torno de 53%.

A redução no número de plasmatócitos nos indivíduos de ambos os sexos privados de alimento por 10 dias também foi observada por More e Sonawane (1987) para essa mesma espécie, o qual relata que os plasmatócitos reduziram para 30% da contagem total.

Os mesmos autores também relataram que os insetos privados somente de água não tiveram alterações na contagem diferencial dos hemócitos até o 8º dia, o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

A redução no número de plasmatócitos nos estresse alimentar (machos e fêmeas), hídrico/alimentar e hídrico/alimentar reidratado pode causar um impacto na sobrevivência dos insetos submetidos a esses estresses, uma vez que os plasmatócitos são uma das principais células de defesa dos insetos que estão envolvidas na fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos e parasitos, bem como possuem papel na coagulação de ferimentos (KLOWDEN, 2008; LAVINE; STRAND, 2002; RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

O aumento no número de pró-hemócitos encontrados em insetos submetidas ao estresse hídrico/alimentar reidratado por mais de 20 dias pode ser uma resposta dos insetos ao estresse a fim de tentar recompor o perfil de hemócitos após a reidratação, já que os pró-hemócitos são as células envolvidas na diferenciação dos outros hemócitos (KLOWDEN, 2008; LAVINE;

STRAND, 2002) e são as células que mais frequentemente são encontradas nos órgãos hematopoiéticos e em mitose na hemolinfa (GUPTA, 2009).

Esse estudo auxilia a compreensão da capacidade de resistência dessa espécie quando submetidas às adversidades, podendo servir como base para estudos posteriores de bioecologia, comportamento e a capacidade de resistência a inseticidas químicos e biológicos. Além disso, pode ser importante como modelo para estudos do impacto da ausência de água e alimento na biologia e imunologia de outras espécies de insetos.

6 Conclusões

Os estresses alimentar, hídrico e hídrico/alimentar reduzem o peso em adultos de *Periplaneta americana*, sendo o estresse hídrico/alimentar o que causa a maior redução;

As fêmeas de *Periplaneta americana* ganham peso quando isoladas em frascos contendo água e alimento, enquanto que os machos mantêm seu peso inalterado nessas condições;

Adultos de *Periplaneta americana* submetidos ao estresse alimentar, hídrico e hídrico/alimentar perdem mais peso no primeiro decêndio, sendo o estresse hídrico/alimentar o que causa o maior impacto nos primeiros dez dias;

Quanto maior o tempo privado de água e alimento, maior é o peso adquirido por adultos de *Periplaneta americana* em 24 horas de reidratação, sendo os machos os que ganham mais peso durante período;

Os estresses alimentar, hídrico e hídrico/alimentar, bem como o tempo de estresse o qual os insetos são submetidos não influenciam no número total de hemócitos de adultos de *Periplaneta americana*;

O estresse alimentar reduz o número de plasmatócitos e granulócitos de fêmeas de *Periplaneta americana.* Em machos, o estresse aumenta o número de pró-hemócitos e cistócitos e reduz o número de plasmatócitos;

Adultos de *Periplaneta americana* privados de água por 10 dias não apresentam alterações na proporção dos tipos celulares. O estresse hídrico reduz o número de cistócitos de machos dessa espécie ao 20º dia de estresse;

O estresse hídrico/alimentar reduz o número de plasmatócitos e aumenta o número de cistócitos e esferulócitos de fêmeas de *Periplaneta americana*. Em machos dessa espécie, o estresse reduz o número de cistócitos;

O estresse hídrico/alimentar reidratado aumenta o número de esferulócitos, pró-hemócitos e cistócitos e reduz o número de plasmatócitos e granulócitos de fêmeas de *Periplaneta americana*. Em machos dessa espécie, o estresse aumenta o número de pró-hemócitos.

Referências

ALBAGHDADI, L. F. Effect of starvation and dehydration on ionic balance in *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, v.33, n.4, p.269-277, 1987.

APPEL, A. G.; REIERSON, D. A.; RUST, M. K. Cuticular water loss in the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, n.7, p.623-628, 1986.

ARMSTRONG, E.; NEWTON, P. B. The influence of starvation on mortality, development, and protein content in parasitized and unparasitized *Tribolium castaneum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.46, p.103-108, 1985.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.207-225, 2010.

AUERSWALD, L.; GADE, G. Metabolic changes in the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*, during starvation. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.343-351, 2000.

BANVILLE, N.; BROWNE, N.; KAVANAGH, K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Virulence**, v.3, n.6, p.497-503, 2012.

BARCAY, S. J.; BENNETT, G. W. Influence of starvation and lighting on the movement behavior of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.84, p.1520-1524, 1991.

BAUMHOLTZ, M. A.; PARISH, L. C.; WITKOWSKI, J. A.; NUTTING, W. B. The medical importance of cockroaches. **International Journal of Dermatology**, v.36, p.90-96, 1997.

BELL, W. J. Starvation-induced oocyte resorption and yolk protein salvage in *Periplaneta americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.17, p.1099-1111, 1971.

BJERKE, R.; ZACHARIASSEN, K. E. Effects of dehydration on water content, metabolism, and body fluid solutes of a carabid beetle from dry savanna in East

Africa. **Comparative Biochemistry Physiology, Part A**, v.118, n.3, p.779-787, 1997.

BLOCK, M.; STOKS, R. Short-term larval food stress and associated compensatory growth reduce adult immune function in a damselfly. **Ecological Entomology**, v.33, p.796-801, 2008.

BRENNER, R. J. Cockroaches (Blattaria). In: Medical and veterinary entomology. San Diego: Academic Press, 2002. p.29-44.

BREY, P. T. The impact of stress on insect immunity. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.92, p.101-118, 1994.

CHALK, R; SULIAMAN, W. Y. Antimicrobial peptides from small insects. In: Techniques in insect immunology. Fair Haven: SOS Publications, 1998. p.109-124.

CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 5.ed. New York: Cambridge University Press, 2012. 968p.

CHEN, C.; GU, S. Stage-dependent effects of starvation on the growth, metamorphosis, and ecdysteroidogenesis by the prothoracic glands during the last larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.968-974, 2006.

CHOUVENC, T.; SU, N.; ROBERT, A. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, p.234-241, 2009.

COCHRAN, D. G. **Cockroaches**: their biology, distribution and control. World Health Organization, 1999. 83p.

COHEN, A. C. Effects of water stress on hemolymph volume, osmotic potential and chemical composition in *Megetra cancellata*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.74, n.4, p.547-549, 1984.

COHEN, A. C.; MARCH, R. B.; PINTO, J. D. Effects of water stress and rehydration on hemolymph volume and amino acid content in the Blister Beetle,

Cysteodemus armatus. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.85, n.4, p.143-146, 1986.

CONNAT, J. L.; DELBECQUE, J. P.; GLITHO, I.; DELACHAMBRE, J. The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated and starved conditions. **Journal of Insect Physiology**, v.37, n.9, p.653-662, 1991.

CUNHA, F. M. **Aspectos imunológicos e morfologia do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae)**. 2007. 44f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CYMBOROWSKI, B.; BOGUST, M.; BECKAGE, N. E.; WILLIAMS, C. M.; RIDDIFORD, L. M. Juvenile hormone titres and metabolism during starvation-induced supernumerary larval moulting of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta* L.. **Journal of Insect Physiology**, v.28, n.2, p.129-135, 1982.

DA SILVA, C. C. A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.24, p.68-72, 2002.

DAGLISH, G. J. Survival and reproduction of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.) following periods of starvation. **Journal of Stored Products Research**, v.42, p.328-338, 2006.

DJAJAKUSUMAH, T.; MILES, P. W. Changes in the relative amounts of soluble protein and amino acid in the haemolymph of the locust, *Chortoicetes terminifera* Walker (Orthoptera: Acrididae), in relation to dehydration and subsequent hydration. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.19, p.1081-1094, 1966.

DUARTE, J. P. **Sobrevivência de adultos de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria, Blattidae) submetidos a diferentes condições de estresse.** 2013. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DUNKEL, F. V.; BOUSH, G. M. Effect of starvation on the Black Carpet Beetle, *Attagenus megatoma*, infected with the eugregarine *Pyxinia frenzeli*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.14, p.49-52, 1969.

EDNEY, E. B. The effect of water loss on the haemolymph of *Arenivaga* sp. and *Periplaneta americana*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.25, p.149-158, 1968.

FEDER, D.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Immune responses in *Rhodnius prolixus*: influence of nutrition and ecdysone. **Journal of Insect Physiology**, v.43, n.6, p.513-519, 1997.

FERNANDES, E. G. **Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico**. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FURLONG, M. J.; GRODEN, E. Starvation induced stress and the susceptibility of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to infection by *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.83, p.127-138, 2003.

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

GEHRKEN, U.; SOMME, L. Tolerance of desiccation in Beetles from the High Atlas Montains. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.109, n.4, p.913-922, 1994.

GILLESPIE, J. P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A. K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Insect Physiology**, v.46, p.429-437, 2000.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v.42, p.611-643, 1997.

GRODZICKI, P.; WALENTYNOWICZ, K. Hypometabolism in insects. In: **Hypometabolism**: strategies of survival in vertebrates and invertebrates. Kerala: Research Signpost, 2011. p.19-37.

GUIMARÃES, J. H. Baratas: manejo integrado em áreas urbanas. **Agroquímica, Ciba-Geigy**, v.25, 1984.

GUPTA, A. P. **Insect hemocytes**: development, forms, functions and techniques. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p.628.

HIGHNAM, K. C.; HILL, L.; MORDUE, W. The endocrine system and oocyte growth in *Schistocerca gregaria* in relation to starvation and frontal ganglionectomy. **Journal of Insect Physiology**, v.12, p.977-994, 1966.

HILL, L.; GOLDSWORTHY, J. The utilization of reserves during starvation of larvae of the migratory locust. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.36, p.61-70, 1970.

HU, X. P.; SONG, D.; GAO, X. Biological changes in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera, Rhinotermitidae) and its protozoa profile following starvation. **Insect Sociaux**, v.58, p.39-45, 2011.

HYATT, A. D.; MARSHALL, A. T. Sequestration of haemolymph sodium and potassium by fat body in the water-stressed cockroach *Periplaneta americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.23, p.1437-1441, 1977.

ISHAY, J. Glucose levels in *Vespa orientalis*: the effect of starvation. **Comparative Biochemistry Physiology, Part A**, v.52, p.91-96, 1975.

IWAO, S. Resistance to starvation of pale and black larvae of the armyworm, *Leucania separata* Walker (Lepidoptera : Noctuidae). **Botyu-Kagaku**, v.32, p.44-46, 1967.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, malanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p.213-236, 2006.

JOSEPH, A. P.; KELLER, J.; BUSTAMANTE, H.; BOND, P. L. Surface neutralization and H_2S oxidation at early stages of sewer corrosion: influence of temperature, relative humidity and H_2S concentration. **Water Research**, v.46, n.13, p.4235-4245, 2012.

KIMBRELL, D. A.; BEUTLER, B. The evolution and genetics of innate immunity. **Macmillan Magazines Ltd**, v.2, p.256-267, 2001.

KLOWDEN, M. J. Circulatory systems. In: Physiological systems in insects. San Diego, California: Academic Press, 2008. p.357-401.

KUNKEL, J. G. Development and the availability of food in the German cockrach, *Blattella germanica* (L.). **Journal of Insect Physiology**, v.12, n.2, p.227-235, 1966.

LAPARIE, M.; LARVOR, V.; FRENOT, Y.; RENAULT, D. Starvation resistance and effects of diet on energy reserves in a predatory ground beetle (*Merizodus soledadinus*; Carabidae) invading the Kerguelen Islands. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.161, p.122-129, 2012.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

LEE, C. Y.; HENG, C. Y. Effects of food and water deprivation on nymphal development, adult fecundity and insecticide susceptibility in German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). **Tropical Biomedicine**, v.17, n.1, p.27-34, 2000.

LEONARD, D. E. Effects of starvation on behavior, number of larval instars, and developmental rate of *Porthetria dispar*. **Journal of Insect Physiology**, v.16, p.25-31, 1970.

LIM, S. J.; LEE, S. S. The effect of starvation on haemolymph metabolites, fat body and ovarian development in *Oxya japonica* (Acrididae: Orthoptera). **Journal of Insect Physiology**, v.27, p.93-96, 1981.

LITTLE, T. J.; HULTMARK, D.; READ, A. F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. **Nature Immunology**, v.6, n.7, p.651-654, 2005.

LORD, J. C. Enhanced efficacy of *Beauveria bassiana* for Red Fluor Beetle with reduced moisture. **Journal of Economic Entomology**, v.100, n.4, p.1071-1074, 2007.

LORD, J. C. Dietary stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology**, v.103, n.5, p.1542-1546, 2010.

LUDWIG, D. The metabolism of starved nymphs of the grasshopper, *Chortophaga viridifasciata* De Geer. **Physiological Zoology**, v.23, n.1, p.41-47, 1950.

MARICONI, F. A. M. **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 460p.

MIRANDA, R. A.; SILVA, J. P. Enterobactérias isoladas de *Periplaneta americana* capturadas em um ambiente hospitalar. **Ciência et Praxis**, v.1, n.1, p.21-24, 2008.

MORE, N. K.; SONAWANE, Y. S. Stress induced alterations in the hemocyte population of *Periplaneta americana* (L.). **Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Animal Sciences**, v.96, n.6, p.689-693, 1987.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptative innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society**, v.270, p.2475-2480, 2003.

MORITA, M.; TOJO, S. Relationship between starvation and supernumerary ecdysis and recognition of the penultimate-larval instar in the Common Cutworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v.31, n.4, p.307-313, 1985.

MUNSON, S. C.; GOTTLIEB, M. I. The differences between male and female American roaches in total lipid content and in susceptibility to DDT. **Journal of Economic Entomology**, v.46, n.5, p.798-802, 1953.

NAIDU, S. G. Water balance and osmoregulation in *Stenocara gracilipes*, a wax-blooming tenebrionid beetle from the Namib Desert. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.1429-1440, 2001.

NEWTON, C. J. Effects of starvation on composition of Japanese Beetle larvae (*Popillia japonica* Newman). **Physiological Zoology**, v.27, n.3, p.248-258, 1954.

NGUYEN, D. T. Effects of starvation period on the locomotory response of *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.100-102, 2008.

NICOLSON, S.; HORSFIELD, P. M.; GARDINER, B. O. C.; MADDRELL, S. H. P. Effects of starvation and dehydration on osmotic and ionic balance in *Carasius morosus*. **Journal of Insect Physiology**, v.20, p.2061-2069, 1974.

NIJHOUT, H. F. A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). **The Biological Bulletin**, v.149, p.214-255, 1975.

OKASHA, A. Y. K. Water relations in an insect, *Thermobia domestica* – III. Effects of desiccation and rehydration on the haemolymph. **The Journal of Experimental Biology**, v.58, p.285-400, 1973.

PAI, H.; KO, Y. C.; CHEN, E. R. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. **Acta Tropica**, v.87, p.355-359, 2003.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Introdução à bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. In: **Bioecologia e nutrição de insetos**: base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.21-35.

PARK, M. S.; PARK, P.; TAKEDA, M. Roles of fat body trophocytes, mycetocytes and urocytes in the Americana cockroach, *Periplaneta americana* under starvation conditions: an ultrastructural study. **Arthropod Structure and Development**, v.42, p.287-295, 2013.

PECH, L. L.; STRAND, M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insects haemocytes. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2053-2060, 1996.

PEDERSEN, S. A.; ZACHARIASSEN, K. E. Sodium regulation during dehydration of a herbivorous and a carnivorous beetle from African dry savannah. **Journal of Insect Physiology**, v.48, p.925-932, 2002.

PELLENS, R.; GRANDCOLAS, P. **Catalogue of Blattaria (Insecta) from Brazil**. Auckland: Magnolia Press, 2008. 109p.

PRADO, M. A.; PIMENTA, F. C.; HAYASHID, M.; SOUZA, P. R.; PEREIRA, M. S.; GIR, E. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*)

capturadas em um hospital brasileiro. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.11, n.2, p.93-98, 2002.

PRICE, C. D.; RATCLIFFE, N. A. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v.147, n.4, p.537-549, 1974.

PUNZO, F. Comparative temperature and water relations and hemolymph osmoregulation in the desert insects, *Taeniopoda eques* and *Schistocerca vaga* (Orthoptera, Acrididae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.93, n.4, p.751-755, 1989.

PUNZO, F.; HUFF, G. Comparative temperature and water relations and the effects of thermal acclimation on *Tenebrio molitor* and *Tenebrio obscurus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.93, n.3, p.527-533, 1989.

RAFAEL, J. A.; SILVA, N. M.; DIAS, R. M. N. S. Baratas (Insecta, Blattaria) sinantrópicas na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.38, n.1, p.173-178, 2008.

RANKIN, M. A.; RIDDIFORD, L. M. Hormonal control of migratory flight in *Oncopeltus fasciatus*: the effects of the Corpus Cardiacum, Corpus Allatum, and starvation on migration and reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v.33, p.309-321, 1977.

RATCLIFFE, N. A.; PRICE, C. D. Correlation of light and electron microscopic hemocyte structure in the Dictyoptera. **Journal of Morphology**, v.144, n.4, p.485-497, 1974.

REISENMAN, C. E.; LEE, Y.; GREGORY, T.; GUERENSTEIN, P. G. Effects of starvation on the olfactory responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v.59, p.717-721, 2013.

REYNIERSE, J. H.; MANNING, A.; CAFFERTY, D. The effects of hunger and thirst on body weight and activity in the cockroach (*Nauphoeta cinerea*). **Animal Behaviour**, v.20, n.4, p.751-757, 1972.

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: what type of cell is that?. **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.417-429, 2006.

RICHARDS, E. H.; EDWARDS, J. P. Parasitization of *Lacania oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasite wasp, *Eulophus pennicornis* – Effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes. **Journal of Insect Physiology**, v.45, p.1073-1083, 1999.

RION, S.; KAWECKI, T. J. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, v.20, p.1655-1664, 2007.

RIVAULT, C.; CLOAREC, A.; LE GUYADER, A. Bacterial load of cockroaches in relation to urban environment. **Epidemiology and Infection**, v.110, p.317-325, 1993.

ROSENBERGER, C. R. Studies on total blood cell counts of the Southern Armyworm larva, *Prodenia eridania* (Lepidoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v.53, n.3, p.351-355, 1960.

SATAKE, S.; KAWABE, Y.; MIZOGUCHI, A. Carbohydrate metabolism during starvation in the Silkworm *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.44, p.90-98, 2000.

SCHMID, M. R.; BROCKMANN, A.; PIRK, C. W. W.; STANLEY, D. W.; TAUTZ, J. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. **Journal of Insect Physiology**, v.54, n.2, p.439-444, 2008.

SCHWALBE, C. P.; BAKER, J. E. Nutrient reserves in starving Black Carpet Beetle larvae infected with the eugregarine *Pyxinia frenzeli*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.28, p.11-15, 1976.

SHAAYA, E.; LEVENBOOK, L. The effects of starvation and 10-hydroxy-ecdysone on feeding and pupariation of early 3rd-instar *Calliphora vicina* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.28, n.8, p.683-688, 1982.

SHAPIRO, M. Pathologic changes in the blood of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*, during the course of nucleopolyhedrosis and starvation – I. Total hemocyte count. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.9, p.19-25, 1967.

SHAPIRO, M. Pathologic changes in the blood of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*, during the course of nucleopolyhedrosis and starvation – II. Diferencial hemocyte count. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.10, p.230-234, 1968.

SHAPIRO, M. Changes in hemolymph total solids and blood volume of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*, during the course of starvation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, p.63-67, 1969.

SINGH, D.; BALA, M. The effect of starvation on the larval behavior of two forensically important species of blow flies (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International**, v.193, p.181-121, 2009.

SIVA-JOTHY, M. T.; THOMPSON, J. J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. **Physiological Entomology**, v.27, p.206-212, 2002.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, v.40, p.31-56, 1995.

SUJATHA, P. S.; DUTTA-GUPTA, A. Feeding and 20-hydroxyecdysone treatment reverse the effect of starvation on total haemocyte count in larval forms of *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera). **Journal of Stored Products Research**, v.27, n.4, p.245-247, 1991.

TAYLOR, R. L.; FRECKLETON JR., W. C. Sex differences in longevity of starved cockroaches (*Leucophaea maderae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, n.1, p.68-73, 1969.

THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M. S. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. **Trends in Immunology**, v.25, n.6, p.289-294, 2004.

THYSSEN, P. J.; MORETTI, T. C.; UETA, M. T.; RIBEIRO, O. B. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.4, p.1096-1102, 2004.

TOBE, S. S.; CHAPMAN, C. S. The effects of starvation and subsequent feeding on juvenile hormone synthesis and oocyte growth in *Schistocerca americana gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, v.25, p.701-708, 1979.

TRIPLEHORN, C. A.; JONNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809p.

TUCKER, L. E. The influence of age, diet and lipid content on survival, water balance and Na+ and K+ regulation in dehydrating cockroaches. **The Journal of Experimental Biology**, v.71, p.81-93, 1977a.

TUCKER, L. E. Effect of dehydration and rehydration on the water content and Na+ and K+ balance in adult male *Periplaneta americana*. **The Journal of Experimental Biology**, v.71, p.49-66, 1977b.

VIANNA, E. E. S.; BERNE, M. E. A.; CHERNAKI, A. M.; SILVEIRA JR., P.; RIBEIRO, P. B. Performance reprodutiva de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, n.1, 2000.

VIANNA, E. E. S.; BERNE, M. E. A.; RIBEIRO, P. B. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.2, p.111-115, 2001.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. São Paulo: Editora Atlas, 2006. 204p.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**, v.62, p.59-66, 1998.

WALL, B. J. Effects of dehydration and rehydration on *Periplaneta americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.16, p.1027-1042, 1970.

WEAVER, R. J.; PRATT, G. E. Effects of starvation and feeding upon Corpus Allatum activity and oocyte growth in adult female *Periplaneta americana*. **Journal of Insect Physiology**, v.27, p.75-83, 1981.

WHEELER, R. E. Studies on the total haemocyte count and hamolymph volume in *Periplaneta americana* (L.) with special reference to the last moulting cycle. **Journal of Insect Physiology**, v.9, p.223-235, 1963.

WILLIS, E. R.; LEWIS, N. The longevity of starved cockroaches. **Journal of Economic Entomology**, v.50, n.4, p.438-440, 1957.

WIRTZ, R. A. Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.29, p.47-69, 1984.

XIAN, X. Changes in hemolymph volume, blood sugar titer, fat body and content of glycogen in fat body of smoky brown cockroach (*Periplaneta fuliginosa* S.) during fast. **The Japan Society of Medical Entomology and Zoology**, v.47, n.1, 1996.

ZORZENON, F. J. Noções sobre as principais pragas urbanas. **Biológico**, v.64, n.2, p.231-234, 2002.