
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**ANATOMIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO DO DIPLÓPODO
Gymnostreptus olivaceus (SPIROSTREPTIDA, SPIROSTREPTIDAE) E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INSETICIDA DELTAMETRINA NESTE
SISTEMA**

ANNELISE FRANCISCO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular.

Março - 2015

ANNELISE FRANCISCO

ANATOMIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO DO DIPLÓPODO
Gymnostreptus olivaceus (SPIROSTREPTIDA, SPIROSTREPTIDAE) E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INSETICIDA DELTAMETRINA NESTE
SISTEMA

Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Co-orientadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular.

RIO CLARO

2015

595.61 Francisco, Annelise
F818a Anatomia e morfologia do sistema nervoso do diplópodo
Gymnostreptus olivaceus (Spirostreptida, Spirostreptidae) e
avaliação dos efeitos do inseticida deltametrina neste sistema /
Annelise Francisco. - Rio Claro, 2015
119 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Coorientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Milipede. 2. Sinapsina. 3. Histologia. 4. Microscopia
confocal. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Anatomia e morfologia do sistema nervoso do diplópodo *Gymnostreptus olivaceus* (Spirostreptida, Spirostreptidae) e avaliação dos efeitos do inseticida deltametrina neste sistema.

AUTORA: ANELISE FRANCISCO

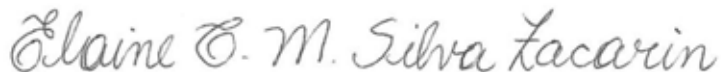
ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

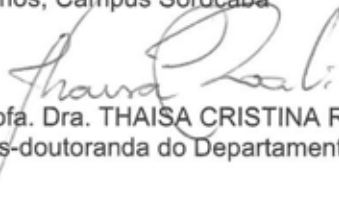
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biotecnologias de Rio Claro



Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade, UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba



Profa. Dra. THAISA CRISTINA ROAT
Pós-doutoranda do Departamento de Biologia, UNESP - Instituto de Biotecnologias, Rio Claro/SP

Data da realização: 25 de fevereiro de 2015.

Dans la vie, il n'y a pas de solutions. Il y a des forces en
marche: il faut les créer, et les solutions suivent.

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Durante a trajetória para a realização desse trabalho, pude contar com a colaboração e atenção de várias pessoas, as quais merecem meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valéria e Marcelo, por me apoiarem e incentivarem desde sempre e aos também aos meus familiares pela atenção e interesse.

Ao Diego pela companhia e incentivo nesses últimos anos e também pela ajuda.

À Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti pela orientação, por tolerar as desgraças e pela amizade...sentirei saudade.

À Profa. Dra. Roberta C. F. Nocelli também pela orientação, pela dedicação e carinho.

Ao Prof. Dr. Pablo H. Nunes pela parceria e dedicação. Sem você, esse trabalho não teria sido possível.

Aos colegas do grupo de pesquisa – Cristina Moreira de Sousa, Cintya Ap. Christofolletti, Ana Claudia de Castro Marcato, Raphael Baston de Souza, Vinicius Daguano Gastaldi, Jorge Evangelista Correia, Cleiton Souza, Thays Guedes, Yadira Ansoar Rodríguez, Maria Paula Mancini Coelho, Luiza Sardinha e Camila Garcia – pela convivência e apoio.

À Amanda M. Picelli, Danilo Barêa Delgado, Fellipe Chaves Nominato, Mariana Frachia, Raissa Scopinho, Rebeca M. S. Alves e Tauana Campos pela amizade, pelas conversas, pelas risadas, independente de estarem longe ou perto.

Aos colegas do centro de estudos de insetos sociais (CEIS) pela convivência, e especialmente à Profa. Dra. Thaisa Roat por disponibilizar o uso dos equipamentos.

À Cristiane M. Mileo, Gerson Melo Souza e Monika Iamonte pelo apoio técnico e também à todos os professores do Departamento de Biologia, especialmente a Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo pelo estágio de docência e pela convivência.

Agradeço a UNESP por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento do meu trabalho e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (processo 2012/24562-5).

RESUMO

Os diplópodos configuram-se como organismos do solo ecologicamente importantes, mas também como espécies economicamente ameaçadoras em áreas rurais e urbanas quando ocorrem explosões populacionais; assim tais organismos configuram-se ora como alvo ora como vítima da ação de agroquímicos. Nesse sentido, alguns inseticidas, tal como a deltametrina, têm sido aplicados com o intuito de controlar a invasão de diplópodos nas residências. Tal inseticida é genericamente caracterizado por ter ação no sistema nervoso, no entanto, os efeitos deste sobre diplópodos ainda não foram analisados. Adicionalmente, existem poucos estudos sobre a morfologia e estrutura do sistema nervoso de diplópodos. Sendo assim, o presente trabalho objetivou primeiramente elucidar a anatomia e morfologia do sistema nervoso da espécie *Gymnastreptus olivaceus* por meio da observação durante a dissecação em estereomicroscópio e de análise histológica, histoquímica e citoquímica. Observou-se que o sistema nervoso dessa espécie é composto por um cérebro e um cordão nervoso, envolvidos por perineuro, lamela neural e mais externamente por um envoltório celular externo que foi descrito pela primeira vez em Diplopoda. Foram descritos os detalhes histológicos observados em cada estrutura que compõe o sistema nervoso da espécie. Além disso, uma formulação comercial do inseticida deltametrina foi aplicada com o intuito de avaliar a efetividade da utilização popular de tal inseticida no combate a infestações de diplópodos. Para a observação de efeitos neurotóxicos causados pelo inseticida foi utilizada a marcação de sinapsina avaliada por microscopia confocal. Foram aplicadas topicamente em indivíduos da espécie *G. olivaceus*, quatro concentrações de deltametrina; a menor concentração baseou-se nas recomendações do fabricante para o combate de outros artrópodes, enquanto as demais concentrações corresponderam a um quinto da DL_{50} estabelecida previamente para a espécie, a própria DL_{50} , e o dobro da DL_{50} . Foi avaliado número de mortes e os níveis de sinapsina presentes no cérebro dos indivíduos coletados 12, 24 e 48 horas após o contato com o inseticida. O inseticida foi letal na DL_{50} e no dobro da DL_{50} , as maiores concentrações empregadas, não sendo observada alteração na neurotransmissão nestes dois grupos. Em contraste, a concentração de campo não causou mortalidade, mas provocou alterações significativas nos níveis de sinapsina. Os resultados levam a questionar sobre a viabilidade do controle químico de diplópodos com tal inseticida, bem como sugerem que diplópodos podem ser utilizados para avaliação de efeitos neurológicos de contaminantes, porém a sinapsina não deve ser utilizada isoladamente para a avaliação de tais efeitos.

Palavras-chave: Diplopoda, milípedes, sistema nervoso, sinapsina, histologia, microscopia confocal.

ABSTRACT

Diplopods are ecologically important soil organisms that may also act as economically damaging species in urban and rural areas when their populations undergo outbreaks. They are, therefore, sometimes targeted for agrochemicals action. Thus, some insecticides (e.g., deltamethrin) have been applied in order to control diplopods home invasions and crop attacks. Deltamethrin is characterized by its action on the nervous system; however, its effects on diplopods have yet to be analyzed. Additionally, there are few studies on the morphology and structure of the nervous system of diplopods. The present study aimed to elucidate the anatomy and morphology of the nervous system of the species *Gymnostreptus olivaceus* through direct observation during dissection under a stereomicroscope and by histological, histochemical, and cytochemical analyses. It was observed that the nervous system of the species consists of a brain and ventral nerve cord that are both wrapped by a perineurium, a neural lamella, and, more externally, by an external cell sheath that was first described in Diplopoda. Histological details were described for each of this species' nervous system structures. Furthermore, a commercial formulation of deltamethrin was applied to evaluate the effectiveness of the popular use of this insecticide to combat diplopods infestations. In order to observe neurotoxic effects caused by the insecticide, a synapsin labeling was used and assessed by confocal microscopy. Four concentrations of deltamethrin were applied topically to *G. olivaceus* individuals; the lowest concentration was based on the manufacturer's recommendations for controlling other arthropods, while the other concentrations correspond to one fifth of the LD₅₀ previously established for the species, the LD₅₀ itself, and twice the LD₅₀. Death numbers were evaluated and synapsin levels were assessed in the brain at 12, 24 and 48 hours after insecticide treatment. The insecticide was lethal only at the two higher concentrations employed, in which no change was observed in neurotransmission. On the other hand, the field concentration caused no mortality, but did produce significant changes in synapsin levels. These findings cast doubt on the viability of this chemical control approach against diplopods and suggest that millipedes may be employed for contaminants neurotoxicity assessment, however synapsin should not be used alone in the evaluation of such effects.

Keywords: Diplopoda, millipedes, nervous system, synapsin, histology, confocal microscopy.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	08
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1 O sistema nervoso em Arthropoda.....	13
2.2 O sistema nervoso em Diplopoda.....	18
2.3 Mecanismos de toxicidade dos piretróides e da deltametrina.....	23
2.4 Diplópodos e agroquímicos.....	28
Artigo 1.....	29
3. Objetivos.....	52
4. Material e métodos.....	53
4.1 Anatomia e Histologia.....	53
4.2 Histoquímica.....	54
4.3 Técnica citoquímica - Impregnação argêntica dos neurônios e células da glia.....	54
4.4 Bioensaios com deltametrina e <i>G. olivaceus</i>	55
4.5 Microscopia confocal.....	56
5. Resultados.....	58
Artigo 2.....	59
Artigo 3.....	82
6. Conclusões Gerais.....	101
7. Referências Bibliográficas.....	102

1. INTRODUÇÃO

Os Myriapoda compreendem os táxons traqueados Chilopoda, Symphyla, Pauropoda e Diplopoda. De forma geral, esses animais possuem um corpo constituído por uma cabeça dotada de um par de antenas e olhos laterais simples e um tronco alongado composto por muitos segmentos portadores de pernas (RUPPERT et al., 2005).

Dentro desse grupo, destaca-se a classe Diplopoda, a qual se configura como a terceira maior classe de artrópodes terrestres, com 11.000 espécies descritas e uma estimativa de 80.000 espécies viventes, sendo que a maior parte dessa diversidade estimada está contida em países tropicais (RUPPERT et al., 2005; GOLOVATCH; KIME, 2009). Tais animais são denominados diplópodos ou milípedes, devido ao grande número de pernas que possuem, mas também recebem designações regionais como “piolhos-de-cobra”, “embuás” e “gongolôs”.

Os diplópodos podem ser encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida, e em todos os ambientes terrestres recentes. Em sua maioria, caracterizam-se pela fototaxia negativa, possuindo hábitos noturnos e modo de vida predominantemente estratobionte, vivendo em meio ao solo, embaixo de folhas, cascas de árvores, troncos e também em cavernas (HOPKIN; READ, 1992; GOLOVATCH; KIME, 2009). Caracterizam-se assim como ágeis colonizadores das diversas camadas do solo, madeira em decomposição, e outros ambientes que possam fornecer-lhes nutrientes e umidade, uma vez que não são tão adaptados ao ambiente terrestre quanto os insetos, possuindo epicutícula relativamente permeável e perda de água constante pelo sistema de traquéias, durante a respiração (RUPPERT et al., 2005; GOLOVATCH; KIME, 2009).

Quanto ao hábito alimentar, os diplópodos são majoritariamente saprófagos, se alimentando de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo (HOPKIN; READ, 1992). Sendo assim, são importantes animais da macrofauna do solo, pois ocupam o nível trófico de decompositores, participando da ciclagem e disposição de nutrientes presentes na matéria orgânica em decomposição, auxiliando no processo de humificação do solo (PETERSEN; LUXTON, 1982). Por meio de suas fezes, eles promovem a mineralização, uma vez que secretam amônia e ácido úrico, que quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (SCHUBART, 1942; GODOY; FONTANETTI, 2010). Desse modo, estimulam o metabolismo microbiano, essencial para a ciclagem de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, além de promoverem a aeração ativa do solo (HOPKIN; READ, 1992). Algumas espécies ainda acumulam grandes quantidades de excrementos moldados pelas válvulas anais e interrompem

a decomposição iniciada pelos fungos, provocando uma mistura de húmus com a parte mineral do solo (ROMELL, 1935; FONTANETTI, 1989).

Normalmente tais animais não apresentam população numerosa, no entanto podem ocorrer explosões populacionais provocadas por desequilíbrios no meio ambiente, mudanças climáticas e pela eliminação de possíveis competidores pelo uso de pesticidas. Apesar de raras, migrações e explosões populacionais de milípedes têm sido relatadas por pesquisadores em várias partes do mundo (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1949; NIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 2002, FONTANETTI et al., 2010a).

Explosões populacionais dessa natureza foram relatadas por Boccardo et al. (2002), por ocasião de uma expansão populacional do diplópodo *Plusioporus setiger* (Spirostreptidae) em plantações de café localizadas na região do Alto Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. Kania e Tracz (2005) relataram a ocorrência de migração em massa de diplópodos da espécie *Ommatoiulus sabulosus* (Julidae) na Polônia, uma espécie tratada como praga na região por invadir as casas e jardins durante a primavera. Outro exemplo são os diplópodos da espécie *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae), descrita em 2006 por Pierozzi e Fontanetti, amplamente distribuída por todo o estado de São Paulo. Pouco tempo depois de sua descrição, foi relatada a invasão de grande número de indivíduos desta espécie em um bairro da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil, durante as estações de primavera e verão entre os anos de 2005 e 2009, causando transtornos aos moradores do local (FONTANETTI et al., 2010a); a mesma espécie já havia sido registrada em explosão populacional na cidade de Paulínia, São Paulo, Brasil (BOCCARDO, 1998).

Quando, durante a estação chuvosa, esses animais adentram as áreas urbanas, ocorre grande desconforto por parte da população humana, pois tais animais causam repulsa e ainda, podem ocorrer acidentes decorrentes do contato da pele humana e de animais domésticos com as secreções defensivas produzidas por suas glândulas repugnatórias (ARAB et al., 2003; RUPPERT et al., 2005). As secreções defensivas podem provocar reações variadas na pele (FITZPATRICK et al., 1993), no entanto, não há indícios que essa exposição possa ser fatal, mesmo em crianças (GIRARDIN; STEVESON, 2002). Sendo assim, métodos de controle destes animais dentro do ambiente urbano têm sido solicitados.

Em áreas rurais de várias partes do mundo, espécies de milípedes são consideradas pragas, uma vez que atacam plantações, danificando plântulas recém-germinadas, raízes e frutos (LORDELLO, 1954; WINDER et al., 1993; WIGHTMAN; WIGHTMAN, 1994; EBREGT et al., 2004a; 2004b).

Nesse sentido, estudos preliminares de toxicidade realizados por Fontanetti et al. (2010a) apontaram para elevada eficiência do inseticida bendiocarbe, do grupo dos carbamatos, em eliminar tais animais que apresentam resistência a vários inseticidas. Tal inseticida foi testado pelos autores por ser previamente utilizado pelos moradores da região infestada. Devido a sua grande afinidade com a acetilcolinesterase (SCHARF, 2003) e elevada toxicidade (EPA, 1999a), tal inseticida teve seu registro cancelado nos EUA, não podendo mais ser comercializado naquele país desde 2001 (NPIC, 2002). No Brasil, seu uso ainda é permitido por entidades especializadas, desde que não esteja associado à qualquer outra substância inseticida, raticida ou sinergista (BRASIL, 2005).

O inseticida deltametrina, por sua vez, tem sido informalmente recomendado entre indivíduos da população em geral, como uma solução contra a infestação domiciliar de diplópodos, tendo sido testado sob condições laboratoriais por Boccardo et al. (2001). Os autores estabeleceram a DL_{50} deste produto para as espécies *Gymnostreptus olivaceus* (Spirostreptidae) e *P. setiger* aplicando-o topicamente na superfície dorsal dos animais.

A deltametrina é um piretróide sintético do tipo II (CHEN et al., 2007), classe de toxicidade caracterizada por determinar efeitos que se originam no sistema nervoso central dos organismos (LARINI, 1999). É utilizada para o controle populacional de pragas de insetos em plantações (CASTILHOS et al., 2011) e recomendado para o controle de insetos vetores próximo a populações humanas, devido ao seu poder de repelência e segurança para humanos e mamíferos em geral (WHO, 1999), é inclusive o princípio ativo do Escabin®, utilizado topicamente em humanos para a eliminação de ectoparasitos (ESCABIN, 2011). Tal produto afeta os canais de sódio, causando ativação em limiares mais baixos e inativação tardia em relação ao que ocorreria em condições normais, isso resulta em um prolongado fluxo de sódio nos neurônios e disfunção neuronal devido à neuro-excitação excessiva (SCHARF, 2003).

Existe grande variedade de estudos acerca da biologia dos diplópodos, alguns dos quais tiveram como foco a descrição de diferentes órgãos e sistemas, como o sistema reprodutor masculino e feminino (FREITAS et al., 2003; FREITAS; FONTANETTI, 2008; FONTANETTI et al., 2010c, 2012a; PINHEIRO et al., 2013), tubo digestório (FANTAZZINI et al., 2002, 2004; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011; MOREIRA-DE-SOUSA; FONTANETTI, 2012), túbulos de Malpighi (SOUZA, 2012) e corpo gorduroso (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000; FONTANETTI et al., 2004). No entanto, pouco é conhecido acerca da estrutura do sistema nervoso dos milípedes. Nos poucos estudos onde a estrutura dos nervos desse táxon foi examinada, foi caracterizada como sendo similar

aquela exibida por outros artrópodes terrestres (HOPKIN; READ, 1992). Tais estudos ainda caracterizam-se por utilizar espécies norte-americanas e europeias (DESCAMPS, LASSALLE, 1983; DUY-JACQUEMIN; ARNOLD, 1991; DOVE; STOLLEWERK, 2003), sendo o sistema nervoso de espécies neotropicais ainda pouco estudado.

Genericamente, o sistema nervoso dos diplópodos é descrito como sendo composto por um cérebro composto por três pares de gânglios mais um gânglio subesofágico e um cordão nervoso ventral com gânglios. O cordão subesofágico compreende os segmentos do tubo neural das mandíbulas e do gnatoquilário. O cordão nervoso ventral é longo e não encefalizado, irradiando um par de gânglios nos quatro primeiros segmentos e dois pares para cada diplossegmento subsequente (RUPPERT et al., 2005).

Tendo em vista que a função cerebral é fortemente dependente da arquitetura neural (EVERS et al., 2005), o presente trabalho pretendeu elucidar mais detalhadamente a morfologia do sistema nervoso dos diplópodos, utilizando-se para tal, o diplópodo *G. olivaceus*.

Embora métodos eletrofisiológicos e comportamentais tenham dado contribuições importantes, técnicas neuro-anatômicas clássicas de coloração e rastreamento de processos sob microscopia de luz ainda são o padrão para revelar a estrutura dos circuitos cerebrais (DOUGLAS; MARTIN, 2011). A coloração histológica convencional com hematoxilina e eosina tem ampla utilização em estudos com sistema nervoso de artrópodes (CRUZ-LANDIM, 2009).

A microscopia confocal é uma ferramenta útil para uma ampla gama de investigações de ciências médicas e biológicas, pois permite obter imagens tridimensionais por meio da junção computacional de secções ópticas independentes, que são obtidas em várias alturas da célula não seccionada ou amostra de tecido biológico espesso (KAUFMAN et al., 1995; CLAXTON et al., 2006). Zantke et al. (2008) utilizaram microscopia confocal para reconstruir tridimensionalmente o sistema nervoso central do tardígrado *Macrobotus hufelandi*, obtendo informações surpreendentes que lhes permitiram questionar a posição filogenética no clado. Dentre os vários compostos que podem ser marcados no cérebro de artrópodes, destaca-se a sinapsina, uma proteína cerebral associada às vesículas sinápticas envolvidas na regulação de curto prazo da liberação de neurotransmissores (CHI et al., 2003); dentro desse contexto, pode-se supor que a análise desse composto pode ser útil para avaliar alterações na neurotransmissão.

Assim, o presente trabalho descreve morfologicamente o sistema nervoso de um representante do grupo Diplopoda, por meio de análise histológica convencional, utilizando

como modelo a espécie *G. olivaceus* , abundante no estado de São Paulo. Além disso, foi feita a avaliação da neurotoxicidade do inseticida deltametrina por meio de microscopia confocal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O sistema nervoso em Arthropoda

Assim como em quase todos os metazoários, exceto esponjas e placozoários, o sistema nervoso dos artrópodes é uma rede de comunicações formada principalmente por neurônios e células gliais, os quais formam circuitos interligados que se distribuem pelo organismo. Tais circuitos são responsáveis pelo processamento de informações provenientes tanto do ambiente externo como interno, coordenando as funções dos vários órgãos presentes nos metazoários, como também pelo processamento das informações geradas pelo próprio sistema nervoso (BICKER; MENZEL, 1989; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LENT, 2010, RICHTER et al., 2010). Embriologicamente, tal sistema deriva-se da ectoderme (SNODGRASS, 1935; ALBERTS et al., 2010; GILBERT, 2010).

Os neurônios atuam na recepção, transmissão e processamento de estímulos, além de influenciar nas diversas atividades do organismo e liberarem neurotransmissores e outras moléculas informacionais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). São constituídos por um corpo celular, no qual está localizado o núcleo, bem como grande quantidade de organelas tais como mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso. A partir do corpo celular ou soma, partem uma ou mais projeções citoplasmáticas cuja função é fazer contato com outros neurônios ou com órgãos sensoriais e efetores. Tais projeções ou processos são denominados dendritos e axônios, estando envolvidos com a recepção e transmissão da informação, respectivamente (CHAPMAN, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A região de contato entre dois neurônios é denominada sinapse; em Arthropoda os contatos sinápticos são majoritariamente axo-axônicos e limitados à neurópila (TAUC, 1967). Na sinapse química, o impulso nervoso do neurônio pré-sináptico é transformado em um sinal químico que atua sobre a célula pós-sináptica (CHAPMAN, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008); na sinapse elétrica, a corrente a partir da membrana pré-sináptica é suficiente para excitar a membrana pós-sináptica; ambos os tipos de sinapses estão presentes em Arthropoda (RICHTER et al., 2010).

As dimensões e a forma do corpo celular dos neurônios, bem como a disposição dos prolongamentos são muito variáveis, permitindo que os neurônios sejam classificados em diferentes tipos morfológicos (CHAPMAN, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LENT, 2010). Em Arthropoda, a maioria dos neurônios do sistema nervoso central é do tipo monopolar, tendo somente uma projeção a partir do soma, que o conecta à dendritos e

axônios. Já no sistema nervoso periférico destes, existem gânglios cujos neurônios costumam ser bipolares, contendo um dendrito distal não ramificado que recebe estímulos ambientais e um axônio proximal. Neurônios multipolares são caracterizados por possuírem um axônio e muitas ramificações dendríticas que se projetam diretamente a partir do soma, e ocorrem em pequena quantidade em Arthropoda, sendo descritos normalmente associados a receptores de estiramento (TAUC, 1967; CHAPMAN, 1998; RICHTER et al., 2010; BUCHER; GOAILLARD, 2011).

Motoneurônios apresentam um soma grande, estando simetricamente disposto e presentes em pequena quantidade por gânglio e são caracterizados por atingirem músculos. Rotas monossinápticas são improváveis de ocorrer, já que tal arranjo possibilita uma pequena variabilidade de resposta. Sendo assim, a maior parte dos neurônios do sistema nervoso central corresponde a interneurônios, que são neurônios que se ligam a outros neurônios. Os interneurônios podem ainda ser denominados extrínsecos, quando conectam neurônios de neurópilas diferentes, ou intrínsecos, quando estão confinados a neurópilas específicas (CHAPMAN, 1998; RICHTER et al., 2010).

Segundo Wiersma (1952), os artrópodes possuem um pequeno número de neurônios se comparado aos vertebrados, mas a morte de um neurônio individual é compensada pela amplitude de tarefas que muitos dos neurônios de Arthropoda desempenham.

Associado aos neurônios, existe um grande número e variedade de células gliais, que desempenham importante papel na nutrição, desenvolvimento, proteção e reparo do sistema nervoso, uma vez que propiciam uma estrutura de suporte e criam um ambiente fechado e protegido no qual os neurônios podem realizar suas funções (CARLSON, 1987; CHAPMAN, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ALBERTS et al., 2010). O corpo celular de tais células é geralmente pequeno, sendo em grande parte ocupado pelo núcleo e uma quantidade diminuta de citoplasma. A partir do corpo celular, há a emissão de grande quantidade de processos citoplasmáticos que se ramificam e enovelam, se estendendo por distâncias consideráveis (LANE, 1981; LENT, 2010).

Células gliais também atuam absorvendo ativamente os neurotransmissores liberados durante a transmissão sináptica, evitando a dessensibilização do receptor e mantendo uma alta relação sinal-ruído, o que ajuda o neurônio a definir o tempo de atividade sincrônica; além disso, atuam na detecção e modulação da transmissão sináptica (BACCI et al., 1999).

Uma vez que a atividade nervosa depende do movimento de íons, é essencial que o ambiente externo dos neurônios seja mantido ionicamente constante e, portanto, isolado da diferença de concentração iônica da hemolinfa. Nesse sentido, o sistema nervoso da maioria

dos artrópodes é envolvido externamente por uma camada de células gliais ou de processo gliais, denominada perineurium ou perineuro e uma camada amorfa de mucopolissacarídeos, mucoproteínas e colágeno, denominada lamela neural, que é secretada pelas células do perineuro. Tal estrutura representa uma importante barreira entre a hemolinfa e os elementos nervosos, sendo por isso chamada de barreira hemato-nervosa dos artrópodes (BACCETTI; LAZZERONI, 1969; LANE, 1981; TREHERNE; SCHOFIELD, 1981; JOLY; DESCAMPS, 1987; CHAPMAN, 1998).

Além das células gliais envolvidas com a formação do perineuro, outros tipos de células gliais foram distinguidas em artrópodes com base em características como morfologia, componentes, topologia e relação com os neurônios.

Trujillo-Cenóz (1962) distinguiu três tipos de células gliais no gânglio nervoso de artrópodes: as células subcapsulares são achatadas e formam o perineuro; as células satélite de neurônios se localizam próximas aos corpos celulares dos neurônios e os envolvem com uma camada única ou dupla de prolongamentos celulares; e as células satélite de fibras nervosas embainham as fibras nervosas por meio de seus prolongamentos.

Radajcic e Pentreath (1979) também identificaram três tipos semelhantes de células gliais em artrópodes, mas as denominaram como perineurais, plasmáticas e semelhantes às células de Schwann, respectivamente. Segundo tais autores, as células gliais perineurais relacionam-se com a elaboração da lamela neural durante a neurogênese e metamorfose em insetos, com o armazenamento de nutrientes e regulam a entrada de íons via bomba de sódio e potássio, zônulas de oclusão ou por suas vastas interdigitações; as plasmáticas podem ter função trófica e reguladora de íons e as células gliais semelhantes às células de Schwann contribuem para a manutenção do ambiente extracelular neuronal, regulando a concentração de íons e nutrientes, agem na remoção e quebra de neurotransmissores e também estão envolvidas com o encurtamento conjuntivo durante a metamorfose dos insetos.

Uma classificação bastante distinta foi retratada por Hartenstein (2011) em sua revisão sobre células gliais de *Drosophila*. Tal autor categorizou as células gliais em glia superficial, que se estende em processos semelhantes a membranas para envolver todo o cérebro; glia cortical que encapsula a somata neuronal e neuroblastos do córtex do sistema nervoso central; e glia neuropilar que está localizada na interface entre o córtex e a neurópila. A glia superficial pode ainda ser subdividida em uma camada perineural externa e uma camada subperineural interna. Analogamente, as células gliais neuropilares compreendem uma classe de células que permanece na superfície da neurópila (*ensheathing glia*), uma segunda classe que forma processos lamelares profusos em torno das fibras nervosas dentro da neurópila (glia

reticular ou semelhante à astrócito). Em *Drosophila*, células gliais também envolvem os nervos periféricos e órgãos sensoriais, nos quais é possível identificar glia perineural e subperineural, além de um terceiro tipo chamado glia de embrulho, correspondente à *ensheathing glia* do sistema nervoso central (HARTENSTEIN, 2011).

O gânglio nervoso é estruturalmente formado por um córtex ou somata, a qual se encontra periféricamente agrupada e é constituída por neurônios motores, neurônios associativos, células da glia e células-tronco neurais, e centralmente preenchido por uma massa de fibras correspondente às arborizações terminais dos axônios sensoriais, arborizações dendríticas dos neurônios motores e axônios e arborizações de interneurônios, denominada neurópila, na qual não ocorre somata neuronal (RICHTER et al., 2010).

O sistema nervoso dos artrópodes pode ser dividido em sistema nervoso central, composto pelo cérebro, constituintes neurais do sistema fotorreceptor e o cordão nervoso ventral, e sistema nervoso periférico que consiste nos nervos que partem para os órgãos locomotores e sensoriais (SOMBKE et al., 2011a). O cérebro recebe a informação proveniente dos órgãos sensoriais da cabeça e também dos gânglios posteriores via interneurônios ascendentes. O cérebro dos artrópodes é composto basicamente por três pares de gânglios: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro (SNODGRASS, 1935; CHAPMAN, 1998).

O protocérebro é a parte maior e mais anterior do cérebro, sendo bilobulado e lateralmente contínuo com os lobos ópticos em ambos os lados. Os lobos ópticos são constituídos por neurópilas laminares unidas entre si por fibras retas. O número de neurópilas constituintes dos lobos ópticos varia dentro de Arthropoda; na maioria das classes é relatada a existência de somente duas neurópilas, as quais são denominadas lamina e medula, enquanto em Hexapoda e Malacostraca, ocorre também uma terceira neurópila denominada lóbula; em alguns táxons dentro desses grupos ainda pode ser identificada uma quarta neurópila denominada *lobula plate* (FAHRBACH, 2004; HARZSCH, 2006; STRAUSFELD, 2009).

Entre as duas projeções laterais protocerebrais, pode haver um grupo de neurópilas denominado neurópila média não pareada, responsável pela integração de informação entre os lados direito e esquerdo (CHAPMAN, 1998). Trata-se de uma massa de neurópila mediana, que serve como centro de excitação dos gânglios subesofágico e torácico, afetando assim o comportamento locomotor e acústico, além disso, atua no controle do ritmo circadiano e modulação da capacidade de resposta total (LOESEL et al., 2002, SOMBKE et al., 2011a; 2012). Tal estrutura recebe ainda nomenclaturas específicas em grupos de artrópodes, como *arcuate body* em Chelicerata e complexo central em Hexapoda e Crustacea, sendo que nestes

últimos, tal estrutura pode ter subunidades como *fan-shaped body* e *ellipsoid body* (LOESEL et al., 2002; STRAUSFELD et al., 2006).

Simetricamente em ambas as projeções do protocérebro, também se localizam os corpos cogumelares ou corpos pedunculados, que são neurópilas lobadas formadas por axônios longos e paralelos originados de grupos de diminutas células basofílicas, denominadas *globuli cells* ou células de Kenyon, em Hexapoda. Funcionalmente, os corpos cogumelares estão relacionados ao aprendizado olfatório e visual, memória, organização do *output* motor, orientação espacial e à regulação de comportamentos complexos, sendo mais desenvolvido em insetos sociais (KENYON, 1896; GUPTA, 1995; STRAUSFELD et al., 1995; STRAUSFELD et al., 1998; HEISENBERG, 2003). Em Crustacea, tal estrutura está morfológicamente modificada, correspondendo aos corpos hemielipsóides (STRAUSFELD et al., 1995; STRAUSFELD et al., 1998).

O deutocérebro contém as neurópilas olfatórias e neurópilas mecanossensoriais, ambas pareadas e bilateralmente simétricas. A presença de tais estruturas é considerada uma apomorfia em Mandibulata e a ausência de neurópilas olfatórias em alguns grupos de crustáceos e insetos (Odonata, alguns Hemiptera e Coleoptera) e de neurópilas mecanossensoriais em Cephalocarida (Crustacea) são consideradas redução (SCHACHTNER et al., 2005; SOMBKE et al., 2012).

As neurópilas olfatórias ou glomérulos olfatórios são formados por agrupamentos de estruturas esféricas, ovóides ou alongadas, denominadas glomérulo, podendo ainda ser rodeadas por uma camada de células da glia. Tais estruturas recebem aferentes provenientes do primeiro par de antenas e são responsáveis pelo processamento da informação olfatória (DUY-JACQUEMIN; ARNOLD, 1991; STRAUSFELD, 2009; RICHTER et al., 2010; SOMBKE et al., 2011a; MIBBACH et al., 2011). Em Hexapoda, tal estrutura é designada lobo antenal e é formada por um grupo de glomérulos esféricos, enquanto em Crustacea recebe o nome de lobo olfatório e é composta por subunidades colunares alongadas, ao passo que em Chilopoda os lobos olfatórios podem ser compostos por glomérulos esféricos ou alongados (GALIZIA et al., 1999; STRAUSFELD; HILDEBRAND, 1999; SCHACHTNER et al., 2005; SOMBKE et al., 2011a; 2011b; 2012).

As neurópilas mecanossensoriais são regiões de neurópila pobremente definidas que contém a arborização terminal dos neurônios mecanossensoriais da base da antena e do pedicelo, estando, portanto, relacionadas ao processamento de informações mecanossensoriais (CHAPMAN, 1998; SOMBKE et al., 2011a). Essas neurópilas também recebem denominações diversas entre os diferentes grupos; lobo dorsal ou centro motor e

mecanossensorial da antena (AMMC) em Hexapoda, *corpus lamellosum* em Chilopoda e neurópila antenular lateral (MAN) e neurópila antenular mediana (MAN) em Crustacea e Remipedia (SCHACHTNER et al., 2005; SOMBKE et al., 2012). Enquanto em Chilopoda, o *corpus lamellosum* é descrito como uma neurópila estruturada composta por oito lamelas paralelas, em outros grupos, tal como insetos da ordem Archaeognatha, a neurópila mecanossensorial não possui qualquer região claramente identificável ou subestruturas discerníveis (MIßBACH et al., 2011; SOMBKE et al., 2012)

O tritocérebro consiste em um par de lobos abaixo do deutocérebro interconectados por uma comissura. A partir dele, os conectivos circum-esofágicos passam para o gânglio subesofágico (CHAPMAN, 1998). Em Myriapoda e Hexapoda, nos quais o segundo par de antenas desapareceu, o gânglio tritocerebral tem tamanho reduzido e é a menor parte do cérebro, mas retém uma ou duas comissuras subesofágicas (BISTCH; BISTCH, 2010). O tritocérebro é uma neurópila integrativa que contém conexões para as regiões dorsal e lateral do cérebro, cordão nervoso ventral, glândulas cerebrais, sistema nervoso estomogástrico e músculos do intestino anterior; são axônios sensoriais, motoneurônios que se projetam de dentro dos conectivos frontais e inervam os músculos do intestino anterior via sistema nervoso estomogástrico e interneurônios, que interligam várias regiões do sistema nervoso (AUBELE; KLEMM, 1977; BISTCH; BISTCH, 2010).

Os gânglios tritocerebrais estão conectados com a cadeia nervosa estomogástrica, que está disposta acima do intestino anterior, por um ou dois pares de tratos nervosos chamados nervos estomodeais que envolvem o esôfago. O sistema nervoso estomodeal consiste em um complexo de gânglios e nervos que suprem o intestino anterior e também a região do clípeo e do labro, na cabeça (BOLELI et al., 1998; BISTCH; BISTCH, 2010).

2.2 O sistema nervoso em Diplopoda

O cérebro dos miriápodes é composto por três pares de gânglios fundidos, os quais correspondem ao protocérebro, deutocérebro e tritocérebro, sendo as partes internas, córtex e neurópila, envolvidos pelo perineuro e lamela neural. O protocérebro é a parte mais proeminente, contendo os lobos ópticos e corpos cogumelares, o deutocérebro é um pouco reduzido e contém os lobos antenais e o tritocérebro é pequeno (WARBURG; ROSENBERG, 1983).

O cordão nervoso e seus prolongamentos, incluindo as fibras terminais, são envolvidos por uma lâmina nucleada, chamada neurilema (SNODGRASS, 1935). O neurilema é bastante

fino, sendo composto por uma parte mais externa acelular chamada lamela neural e uma parte interna chamada perineuro, formada por vários tipos celulares, um dos quais é comparável à células da glia com processos citoplasmáticos modificados (JOLY; DESCAMPS, 1987).

O córtex é constituído por neurônios motores, neurônios associativos, células da glia e células-tronco neurais. Os neurônios são principalmente do tipo unipolar e, possivelmente, existem neurônios multipolares na parte posterior mediana do protocérebro (JOLY; DESCAMPS, 1987). Histologicamente, a região cortical apresenta milhares de pequenos corpos celulares, sendo identificáveis poucos corpos celulares grandes (STRAUSFELD et al. 1995). Algumas regiões corticais são diferenciadas, possuindo grupos de neurônios pequenos unipolares, que juntamente com as fibras emitidas por ele, formam os corpos cogumelares, localizado no protocérebro em Myriapoda (JOLY; DESCAMPS, 1987). Entretanto, segundo Gupta (1987), em Diplopoda, os corpos centrais são pequenos, enquanto os corpos cogumelares estão ausentes, estabelecendo-se assim um ponto de incongruência na literatura.

Gupta (1987) também é contestado por Loesel et al. (2002); segundo os autores, a neurópila média não pareada, denominada corpo central em alguns clados, estaria ausente em diplópodos. Utilizando as espécies de diplópodo *Orthoporus ornatus* (Spirostreptidae) e *Archispirostreptus gigas* (Spirostreptidae), estes autores verificaram que algumas poucas fibras nervosas cruzam a linha média do cérebro, mas sem formar uma neurópila. Segundo os autores, o uso de colorações que não proporcionam boa resolução de neurópilas pode ter induzido Gupta (1987) ao erro.

O protocérebro dos diplópodos é dividido ao meio por um sulco mediano; o cérebro médio é composto por neurópilas que se prolongam lateralmente para lados opostos, cruzando o cérebro (LOESEL et al., 2002). Os neurônios suprimindo essas neurópilas não estão agrupados, mas arranjados em camadas na superfície do cérebro. Uma ilhota proeminente de células de pequeno diâmetro e pequena quantidade de citoplasma, denominadas *globuli cells* (RICHTER et al., 2010), emite axônios para uma neurópila densa e alongada, formando um pedúnculo espesso e não ramificado que se estende lateralmente, dividindo-se em vários lóbulos paralelos. A região do pedúnculo logo abaixo das *globuli cells* é abastecida por um trato proeminente de axônios provenientes de uma neurópila glomerular separada, que recebe aferentes do nervo antenal (STRAUSFELD et al., 1995). Estendem-se lateralmente dois lobos ópticos bem desenvolvidos e constituídos somente pela medula e pela lamina, as quais consistem em neurópilas enfileiradas que se arranjam em colunas (JOLY; DESCAMPS, 1987; STRAUSFELD et al., 1995).

A região mediana póstero-dorsal é pobremente diferenciada e corresponde à *pars intercerebralis* dos insetos, sendo composto por células neurosecretoras. Tais células são distinguidas por possuírem inclusões que se coram distintamente e variam em tamanho e em número. Os grânulos coloidais da *pars intercerebralis* lembram, em tamanho e afinidade à coloração, aqueles descritos previamente nas células neurosecretoras do gânglio subesofágico. Em insetos, tal órgão estaria envolvido com a produção de hormônios de crescimento e diferenciação, juntamente com a *corpora cardiaca*, podendo-se supor uma função análoga em diplópodos (SCHARRER; SCHARRER, 1944).

Ainda no protocérebro, Heithier e Melzer (2005), descreveram um par de olhos laterais acessórios localizados ventralmente aos lobos ópticos, dentro da camada de corpo celular do protocérebro da espécie *Cylindroiulus truncorum* (Julidae). Tal estrutura é constituída por quatro células *cap*, seis retínulas radialmente arranjadas formando um rabdômero e várias camadas de células semelhantes à glia revestindo a estrutura como um todo. Embora tal estrutura não apresente aparato cuticular de lente e sequer tenha contato com a parede do corpo, segundo os autores, a formação de vilosidades rabdoméricas e axônios próprios evidenciam se tratar de células fotossensíveis típicas de Arthropoda.

O deutocérebro, composto de dois lobos antenais, funde-se diretamente no tritocérebro. Os dois lobos tritocerebrais, por sua vez, são unidos por duas comissuras horizontais denominadas ponte estomogástrica e comissura tritocerebral, as quais estão localizadas acima e abaixo do esôfago, respectivamente (JOLY; DESCAMPS, 1987). Segundo Bistch e Bistch (2010), em diplópodos, os gânglios frontais e seus conectivos se arranjam de modo a formar uma ponte estomodeal que se localiza frontalmente ou fica incluída dentro do cérebro.

Cinco tipos de células neurosecretoras foram observados na massa cerebral do diplópodo *Archispirostreptus syriacus* (Spirostreptidae). Tais tipos celulares, descritos como raros e dispersos no cérebro, foram encontradas em três regiões periféricas da massa cerebral e distinguidas entre si primariamente pelo tamanho e pela afinidade histoquímica dos colóides presentes em seu citoplasma, e adicionalmente, pela forma e localização do núcleo, eletrondensidade dos grânulos de secreção, bem como disposição, quantidade e morfologia das mitocôndrias (WARBURG; ROSENBERG, 1983).

Além do cérebro e do cordão nervoso ventral, glândulas cerebrais e corpos conectivos também são conhecidos por estarem envolvidos com a neurosecreção em diplópodos. As glândulas cerebrais e corpos conectivos são comparáveis em vários aspectos ao órgão-X dos crustáceos, *corpora cardiaca* e *corpora allata* dos insetos e também ao lobo posterior da

hipófise dos vertebrados (PRABHU, 1961; SCHARRER; SCHARRER, 1944). Tais estruturas são consideradas órgãos neuro-hemais, os quais consistem principalmente de terminações axonais eferentes de células neuro-endócrinas e estruturas de produção e estocagem de neuro-hormônios, que possuem estreita relação espacial com cavidades do corpo ou paredes de vasos sanguíneos, no caso dos vertebrados (CARLISLE; KNOWLES, 1953).

Os corpos conectivos são pequenas estruturas ovais que se encontram ligadas no conectivo circum-esofágico, logo acima da comissura pós-oral, cujas células são preenchidas por grandes massas de colóides. Sua função é armazenar as substâncias produzidas nas células secretoras do gânglio tritocerebral e liberá-las para um sino sanguíneo adjacente (PRABHU, 1959; 1961).

As glândulas cerebrais também possuem função de armazenamento e liberação de neurosecreção, uma vez que as células observadas nesse órgão são similares às células de Schwann que circundam as fibras nervosas dos vertebrados, de forma que segundo Prabhu (1961), não parecem ser secretórias, embora Gabe (1952) afirme que elas elaboram um produto acidófilo diferente daquele secretado pelas células neurosecretoras do protocérebro. Trata-se de um par de estruturas triangulares, cada qual localizada em um lado do cérebro, sendo conectadas a ele por dois nervos distintos. Externamente, são constituídas por um córtex espesso, preenchido por colóides e internamente há uma medula composta por fibras nervosas (PRABHU, 1961).

As células parenquimatosas das glândulas cerebrais estão condicionadas a um ciclo secretor, demarcado por alterações ultraestruturais das organelas celulares, especialmente na atividade do complexo de Golgi. Tal ciclo possui uma defasagem de 10 a 15 dias em relação ao ciclo de mudas, que corresponderia ao lapso de tempo necessário para que o hormônio seja liberado e possa exercer ação eficiente (JOLY, 1970).

Gabe (1954) estudou oito espécies de diplópodos das ordens Glomerida, Polydesmida, Julida e Chordeumatida, tendo observado células neurosecretoras na vizinhança do *globuli* e dos corpos cogumelares, organizadas em um par bilateralmente simétrico. Tais células eram piriformes, preenchidas por grânulos acidófilos arredondados, cujas afinidades histoquímicas eram as mesmas das neurosecreções observadas em outros artrópodes. Segundo o autor, o produto de neurosecreção produzido por essas células é translocado por via axonal até as glândulas cerebrais, onde não só essa neurosecreção se acumula, como também há a elaboração de um produto de neurosecreção próprio, semelhante ao que ocorre em estruturas similares de outros artrópodes. Resultado similar foi encontrado em espécies de quilópodos (GABE, 1952).

Tanto os corpos conectivos como as glândulas cerebrais são referidos por Sahli e Petit (1975) como formações neuro-hemais do tipo II (GABE, 1967 apud SAHLI; PETIT, 1975), por elaborarem um produto de secreção próprio além daquele que acumulam.

Formações neuro-hemais anatomicamente não individualizadas em órgãos extracerebrais foram descritas no cérebro de indivíduos da ordem Julida por Sahli e Petit (1975). Tais formações, denominadas *plages paracomissurales* ou áreas paracomissurais, foram localizadas como um par simétrico na vizinhança da comissura transversa. São constituídas de ao menos dois tipos de terminações axonais, células gliais e traquéias, apresentando gotas e gotículas de secreção que são liberadas, ao menos parcialmente, por exocitose. Trata-se, segundo os autores, de uma formação neuro-hemal do tipo I (Gabe, 1967 apud SAHLI; PETIT, 1975), constituída essencialmente por terminações axonais neurosecretoras.

Duy-Jacquemin e Arnold (1991) estudaram em detalhes a topografia da rota antenal aferente no diplópodo *Cylindroiulus punctatus* (Julidae), cujo deutocérebro compreende duas neurópilas, sendo a ventral não estruturada e a dorsal organizada em glomérulos, tendo distinguido três principais grupos na entrada lateral do nervo antenal sensorial dentro do deutocérebro e dois grupos de glomérulos no lobo antenal, sendo um ventral composto por três glomérulos e um dorsal com 15 ou 16 glomérulos; essa organização glomerular foi invariante entre os indivíduos estudados.

Heathcote (1887), durante suas observações acerca do desenvolvimento pós-embrionário do diplópodo *Julus terrestris* (Julidae), relatou que o cordão nervoso ventral inicialmente é composto por duas cordas separadas, unidas por uma parte mediana fina, mas passa por um processo de junção, resultando em uma corda simples. Ainda segundo tal autor, nos estágios iniciais de desenvolvimento, há a presença de uma cavidade em cada gânglio, a qual desaparece logo, sendo que apenas dois gânglios são desenvolvidos para cada diplossegmento.

Na fase adulta, a somata do cordão nervoso ventral encontra-se organizada em gânglios arranjados em um padrão segmentarmente repetido, de dois pares de gânglios pouco delimitados por segmento (DEMANGE, 1981). Segundo as observações de Harzch (2004), embora a primeira vista tal tecido pareça ser um cordão único e homogêneo, a análise histológica revela que ele é formado pela fusão de dois cordões ao longo dos quais existem gânglios metamericamente arranjados e bilateralmente simétricos. Ensaios com imunoreatividade à serotonina permitiram observar ainda que as raízes segmentares que

partem da corda para a periferia, também são metamericamente organizadas (HARZCH, 2004).

Dove e Stollewerk (2003) analisaram a neurogênese do diplópodo *Glomeris marginata* (Glomeridae), tendo relatado que grupos de precursores neurais invaginam-se a partir da neuroectoderme ventral, surgindo sequencialmente grupos de células em posições estereotipadas na neuroectoderme, de maneira similar ao que acontece nas aranhas. Com base nisso, tais autores discutem que neurofilogeneticamente os diplópodos poderiam estar mais próximos dos quelicerados do que dos hexápodos e crustáceos, hipótese discutida também por Harzsch (2006) e Harzsch et al. (2007). Whittington (1996) também constatou diferenças substanciais entre insetos e miriápodes no padrão da axonogênese precoce, de forma que, estes estariam mais distantes de Insecta do que de Crustacea.

2.3 Mecanismos de toxicidade dos piretróides e da deltametrina

Inseticidas piretróides derivam estruturalmente das piretrinas naturais, seis componentes inseticidas presentes nas flores de três espécies de *Chrysanthemum* (Asteraceae). Tais substâncias possuem ampla aplicação agrícola e no controle de vetores devido as suas fortes propriedades inseticidas (ELLIOT; JANES, 1978; SODERLUND et al., 2002). A permetrina, resultante de uma modificação na piretrina I, foi o primeiro piretróide sintético com fotoestabilidade suficiente para ser utilizado na agricultura. Posteriormente, foi feita a inclusão do substituinte α -ciano no 3-fenoxibenzil da metade álcool da permetrina, resultando na molécula da deltametrina (Figura 1), que se destaca por possuir um poder inseticida muito maior, mas com fotoestabilidade similar (SODERLUND et al., 2002).

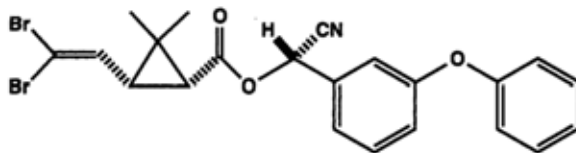


Figura 1 – Estrutura molecular da deltametrina (ELLIOT et al., 1974)

Geralmente os piretróides são classificados nos tipos I e II, com base em sua sintomatologia em mamíferos e insetos e efeitos observados em ensaios de neurofisiologia. Os compostos do tipo I são um grupo estruturalmente diversificado caracterizado por induzir tremores de corpo inteiro semelhantes aos produzidos por DDT, ou síndrome T. Os compostos do tipo II, classe que inclui a deltametrina, são predominantemente ésteres α -

cyano-3-phenoxybenzyl distinguidos por induzir salivação abundante e coreoatetose, uma desordem nervosa caracterizada por movimentos involuntários de contorção corpórea e contrações corporais irregulares, denominada síndrome CS (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; SODERLUND et al., 2002).

Já no relato da síntese da deltametrina por Elliot et al. (1974), tal composto foi descrito como sendo muito mais eficiente do que outros inseticidas disponíveis na época, em testes realizados com moscas domésticas. A grande toxicidade para insetos, no entanto, é acompanhada por uma atividade atípica em mamíferos, sendo seus efeitos de origem principalmente central, com pouco ou nenhum dos componentes periféricos observados para outros piretróides.

Atualmente, uma grande variedade de formulações comerciais para controle de pragas urbanas, agrícolas e ectoparasitos de animais, tem a deltametrina como princípio ativo, uma vez que esta é toxicologicamente classificada na classe III, sendo considerada ainda de elevado coeficiente de segurança e baixa toxicidade para mamíferos (ANVISA, 2003; SAVOY, 2011).

Uma série de estudos foi feita em diferentes organismos, no sentido de elucidar os efeitos, mecanismos de ação e alvos da deltametrina. Nos primeiros experimentos realizados com ratos albinos fêmeas, foram observados como sinais do envenenamento por deltametrina a salivação excessiva sem lacrimejamento, seguido por movimentos contínuos e irregulares das pernas, progredindo para convulsões (BARNES; VERSCHOYLE, 1974).

A deltametrina foi testada no controle populacional de artrópodes em um estudo realizado em uma vila situada na República da Gâmbia, a respeito do controle de anofelíneos e outros mosquitos que constituem um problema para a saúde pública local, sendo aplicada nas redes contra insetos presentes nas residências. Em tal estudo, a deltametrina apresentou elevada eficiência inseticida, provocando a mortalidade de 90% dos vetores, logo após a aplicação, persistindo mais que 70% após cinco meses, tanto para a formulação líquida quanto para o tablete (JAWARA et al., 2001).

A deltametrina foi classificada como levemente nociva para *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) tendo causado mortalidade de 35,5% após 120 dias de exposição ao resíduo seco do inseticida (CASTILHOS et al., 2011). Em contrapartida, foi considerado como um bom inseticida para o controle da broca do milho europeia *Ostrinia nubilali* (BAZÖC et al., 2009).

Em abelhas *Apis mellifera*, a deltametrina oferecida em soluções de açúcar na concentração 500 µg.kg⁻¹, teve efeito letal nas operárias; tal contaminação do xarope induziu

ainda a diminuição na atividade de forrageamento na fonte de alimento e na atividade na entrada da colméia (DECOURTYE et al., 2004).

Os canais de sódio voltagem-dependentes em membranas excitáveis são apontados como os principais alvos da ação de inseticidas do tipo piretróide em invertebrados (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; SCHARF, 2003). Esse local de ação também é importante em mamíferos, mas estes possuem canais de sódio com diferentes isoformas, que variam em sua sensibilidade a piretróides (SODERLUND et al., 2002).

Piretróides, assim como piretrinas e o DDT, são conhecidos por alterar a cinética de ativação e inativação dos canais de sódio voltagem-dependentes por meio de modificação alostérica, fazendo com que a ativação dos canais ocorra em limiares menores e a inativação do canal ocorra mais tarde do que deveria, provocando fluxo prolongado de sódio nos neurônios, o que resulta em disfunção neuronal devido à neuroexcitação excessiva (SODERLUND, BLOOMQUIST, 1989; SCHARF, 2003).

No entanto, enquanto baixas concentrações de piretróides do tipo I induzem descargas repetitivas, altas concentrações reduzem a amplitude do potencial de ação, bloqueando a condução nervosa (NARAHASHI, 1962; SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989). Em contrapartida, os piretróides do tipo II induzem a uma supressão nas alturas de pico do potencial de ação, que progride conforme aumenta o número de estímulos consecutivos, provocando bloqueio do potencial de ação e despolarização do potencial de repouso, além de causar liberação de neuro-hormônios (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; SODERLUND, 2002). Sendo assim, as atividades inseticidas dos piretróides do tipo II, não estariam relacionadas à excitação nervosa, uma vez que estes não induzem a excitação imediata ou descargas repetitivas (NISHIMURA; NARAHASHI, 1978).

McCavera e Soderlund (2012) avaliaram os efeitos da deltametrina nos canais de sódio voltagem-dependentes de insetos expressos em ovócitos de rãs *Xenopus*, tendo relatado que a modificação induzida pela deltametrina requer ativação repetida do canal, de forma que este composto se liga preferencialmente a canais de sódio abertos. Segundo eles, a deltametrina causou uma pequena modificação do canal de sódio, seguida por uma despolarização rápida (10 ms), mas despolarizações prolongadas (maiores que 150 ms) causaram uma modificação progressiva, que foi mensurada como um aumento na condutividade da corrente de sódio induzida pelo piretróide.

Em estudo realizado por Zhou et al. (2011) foi encontrado que os piretróides exercem um efeito inibidor sobre a excitabilidade de neurônios do cérebro de abelhas, tanto *in vivo* como *in vitro*, como revelado pelo aumento de corrente injetada e redução da corrente de pico

de sódio. Dessa forma, a alteração na condutividade dos canais de sódio diminuiu a excitabilidade neuronal e causou despolarização das membranas, bloqueando impulsos nervosos. Zhou et al. (2011) ainda relataram em seu estudo, que dentre os piretróides testados por eles, a deltametrina causou a maior inibição da ativação dos canais de sódio, mas induziu o mínimo deslocamento para a esquerda da curva de inativação.

Embora sejam reconhecidos por agir primariamente nos canais de sódio voltagem-dependentes, existem vários alvos secundários da ação dos piretróides, tais como ATPases, canais de cálcio e de cloro voltagem-dependentes, receptores GABA e proteínas envolvidas na transdução de sinais (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; SYMINGTON et al., 2011).

Piretróides são relacionados à inibição das ATPases dependentes de cálcio, classe de enzimas envolvidas na captação de cálcio dependente de ATP, regulando a concentração de cátion cálcio intracelular. Enquanto os piretróides naturais inibem a Ca-ATPase, os piretróides sintéticos inibem também a Ca+Mg-ATPase, conhecida pelo bombeamento do cátion cálcio contra o gradiente de concentração no retículo sarcoplasmático. A inibição de tais ATPases leva a um aumento do cálcio livre intracelular, desencadeando um aumento na liberação de neurotransmissor (CLARCK; MATSUMURA, 1982). Segundo Desai et al. (1975), as ATPases dos músculos sofrem menos inibição que as ATPases do tecido nervoso. O piretróide decametrina em concentrações subletais aumentou a neurosecreção no cérebro do hemíptero *Rhodnius prolixus*, evidenciado pelo aumento da atividade elétrica nas células neurosecretórias, o que estaria relacionado ao forte componente de cálcio envolvido na fase de crescimento do potencial de ação nessas células (ORCHARD, 1980).

Há evidências de que canais de cálcio voltagem-dependentes também podem ser afetados por piretróides (WAKELING et al., 2012). Em experimentos com sinaptossomos realizados por Symington et al. (2007), a deltametrina aumentou a liberação de neurotransmissores dependente de cálcio de uma maneira estereoespecífica, dependente de concentração e estimulada por despolarização. Segundo os autores, a relação entre canais de cálcio voltagem-dependentes e deltametrina é consistente com o início dos sintomas da síndrome CS, induzida por tal piretróide.

Piretróides também podem atuar nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), resultando na inibição ou aumento do fluxo de íons cloro dependente de GABA nos neurônios. Os antagonistas de canais GABA classicamente provocam neuroexcitação, pois há um bloqueio da ação inibitória das correntes de cloro. Já os agonistas são caracterizados por aumentar o fluxo de cloro, levando a hiperpolarização e, em última instância, a neuroinibição pelo cancelamento dos impulsos excitatórios realizados pelas correntes de sódio (SCHARF,

2003). Concentrações elevadas de piretróides do tipo II estariam relacionados à inibição dos receptores GABA em mamíferos, de forma que as convulsões observadas na síndrome CS relacionam-se a ação destes no complexo receptor-ionoporo GABA (LAWRENCE; CASIDA, 1983; SODERLUND et al., 2002; BRADBERRY et al., 2005). Em insetos, inseticidas do tipo piretróide também diminuíram as correntes evocadas pelo GABA (BERMUDEZ et al., 1991). Canais de cloro voltagem-dependentes também podem ser alvos da ação de tais inseticidas (SODERLUND et al., 2002).

Os estudos de Wu e Liu (2000a) com ratos, indicaram que a deltametrina provocou a degeneração e apoptose no cérebro destes, tanto 24 horas quanto em 48 horas após a exposição. Tal efeito se deu pela indução de morte celular apoptótica tardia, evidenciada pelo aumento na expressão de mRNA de p53 e bax, bem como diminuição da expressão de mRNA da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (WU; LIU, 2000b).

Em estudos *in vitro* com o sangue de peixes das espécies *Oncorhynchus mykiss* e *Cyprinus carpio carpio*, a deltametrina foi caracterizada como um inibidor efetivo da anidrase carbônica, enzima que tem papel crucial na excreção de CO₂ metabólico em todos os vertebrados, incluindo peixes (DOĞAN, 2006).

Chen et al. (2007) investigaram os efeitos da deltametrina na rota de apoptose mediada pela mitocôndria, no cérebro de ratos, tendo encontrado que tal substância induziu uma diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias, aumentou a permeabilidade de tal membrana, reduziu a expressão de citocromo C e diminuiu a atividade da citocromo C oxidase. Os autores concluíram que a deltametrina pode estar associada à rota apoptótica mediada por mitocôndrias no córtex, uma vez que nessa região, houve liberação de citocromo C a partir das mitocôndrias.

Em estudos *in vivo* com abelhas *Apis mellifera*, foi constatado que a deltametrina na dosagem correspondente a DL₅₀ para a espécie e a metade dessa dose, reduziu em, respectivamente, 20 e 22% a atividade da acetilcolinesterase nas abelhas que não sobreviveram, enquanto aumentou em 250 e 270% para as abelhas que sobreviveram a aplicação do inseticida. No entanto, *in vitro*, foi constatado que não há interação direta entre a deltametrina e a acetilcolinesterase, sugerindo que tal ação se dá indiretamente. Os autores concluíram que a acetilcolinesterase pode ser usada como um biomarcador de neurotoxicidade e exposição à deltametrina em abelhas (BADIOU et al., 2008; BADIOU; BELZUNCES, 2008).

Tais dados demonstram a complexidade e amplitude da ação da deltametrina e dos demais inseticidas do tipo piretróide.

2.4 Diplópodos e Agroquímicos

Foi elaborado um artigo de revisão sobre este tema, o qual se encontra a seguir.

ARTIGO 1. Diplopods and agrochemicals: a review

Annelise Francisco, Carmem S. Fontanetti

Publicado na revista *Water, Air and Soil Pollution*, v. 226, p. 53, 2015.

DOI: 0.1007/s11270-015-2346-1

ARTIGO 1

Diplópodos e agroquímicos: uma revisão

Resumo

Diplópodos desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes e aeração do solo, mantendo assim o solo saudável e produtivo, integrando uma macrofauna benéfica que pode estar sujeita a ação de agroquímicos aplicados para controlar e eliminar outros organismos, considerados nocivos aos cultivos agrícolas. No entanto, diplópodos também podem se tornar o alvo desses agroquímicos quando ocorrem em grandes contingentes populacionais, que invadem áreas urbanas e danificam hortas caseiras e plantações comerciais. Diante do tênue limite que faz com que diplópodos sejam considerados ecologicamente benéficos ou economicamente incômodos, o presente estudo busca revisar a ação de diferentes agroquímicos sobre estes organismos, tanto quando eles são meras vítimas quanto quando eles são os vilões. Diante de tais dados, é discutido por fim, a viabilidade do uso de métodos químicos de controle.

Palavras-chave: Fungicida, herbicida, inseticida, milípede, fauna edáfica.

ARTIGO 1

Diplopods and Agrochemicals – A Review

Annelise Francisco^a, Carmem S Fontanetti^{a*}

^aDepartment of Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Phone: +55 19 35264139; Fax: +55 19 35264136. E-mail: fontanet@rc.unesp.br

ABSTRACT

Diplopods play an important role in the nutrients cycling and soil aeration, keeping the soil healthy and productive, integrating a beneficial macrofauna that may be liable to the action of chemicals applied in order to control and eliminate other organisms considered harmful to crops. However, diplopods can also become the target of these pesticides when they occur in large populations that invade urban areas and damage home gardens and commercial plantations. Given the fine line that makes diplopods be considered ecologically beneficial or economically troublesome, this study aims to review the action of different pesticides on these organisms, both when they are mere scapegoats and when they are the villains. Given these data, it is lastly discussed the feasibility of using chemical control methods.

Keywords: fungicide, herbicide, insecticide, millipede, edaphic fauna.

1. INTRODUCTION

The terms agrochemical, pesticide or agricultural defensive refer to a class of natural or synthetic substances, with biological action whose purpose is to prevent, combat and control pests, defending the species of interest against some agent, considered harmful. Acaricides, fungicides, herbicides, insecticides, molluscicides and rodenticides are therefore included in this definition (Velasco and Capanema 2006). The application of these substances for their respective purposes, besides affecting the target organisms, can also cause several effects on non-target organisms that inhabit adjacent environmental compartments and are susceptible to contamination by such products.

The arthropods characterized by having a body composed of a head with a pair of antennae and simple lateral eyes, and an elongated body comprising many segments with two pairs of legs each are designated diplopods or millipedes (Ruppert et al. 2005). These

organisms belong to the Diplopoda class, which is estimated to have 80,000 living species of which only about 11,000 have been described, being the third largest class of terrestrial arthropods (Ruppert et al. 2005; Golovatch and Kime 2009).

The diplopods are mostly characterized by negative phototaxis, having therefore nocturnal and edaphic habits, living under leaves, barks, stems and also in caves. Concerning the feeding habits, these are mostly saprophages invertebrates, feeding on detritus, organic matter in decomposing process, fruits, mosses and a relative amount of mineral matter of the soil (Hopkin and Read 1992). They are still stamped as agile settlers of the various soil layers and decomposing wood, becoming important animals of soil macrofauna as well as occupying the decomposers trophic level (Petersen and Luxton, 1982; Ruppert et al. 2005).

As they participate in cycling and nutrients disposal in the decomposing organic matter, they aid in the soil humification process. Through their feces, they promote mineralization, since they secrete ammonia and uric acid, which when degraded enrich the soil with nitrates (Schubart 1942; Godoy and Fontanetti, 2010). Thereby they stimulate the microbial metabolism, essential for cycling of nutrients such as carbon, nitrogen and phosphorus, as well as promoting active soil aeration (Hopkin and Read 1992). Some species also accumulate large amounts of excrements shaped by anal valves, which stop decomposition initiated by fungi, causing blend of humus with the mineral fraction of the soil (Romell 1935; Fontanetti 1989).

Because of their large contact with the substratum, such organisms are susceptible to the effects of a myriad of substances that may be present in such environment, among which stands out the pesticides. Thus, millipedes can be affected by the action of herbicides, insecticides and fungicides used on crops, in order to reach other organisms or pests. These compounds can reach the soil surface during the application or subsequently are washed by rain and/or irrigation and are available in the soil, affecting non-target organisms present there.

Normally diplopods do not show large population, however, it may happen population explosions caused by environment imbalances, climate changes and by eliminating potential competitors through the use of pesticides (Cloudslaey-Thompson 1949).

When, during the rainy season, these animals step into urban areas in large amounts, they can cause significant domestic disturbance because such animals cause repulse. Accidents can still occur resulting from the contact of human skin and pets with defensive secretions produced by their repugnatory glands (Ruppert et al 2005; Arab et al. 2003). The defensive secretions can cause different reactions on the skin (Fitzpatrick et al. 1993) however

there is no evidence that this exposure can be deadly, even in children (Girardin and Stevesons 2002).

Additionally, some diplopods species are considered pests in home gardens and agricultural crops in several parts of the world (Winder et al. 1993; Wightman and Wightman 1994; Ebregt et al. 2004a; 2004b). The action of them on crops is mainly the consumption of fruits and roots and damage of newly germinated seedlings. Under these circumstances, methods for controlling these animals within the urban and rural environment have been incited.

In this sense, this review aims to compile data on the toxicity and action of different pesticides on diplopods (Table 1), being them reached them as non-target organisms or intending their elimination as pests.

2. DIPLOPODS AS NON-TARGET ORGANISMS

A number of agrochemicals with several purposes may come into contact with the soil during its application, hitting it during the manual, mechanized (dusters) and air pulverization, or by the product dripping from plants (Souza et al 2010) and also thereafter the application, since the rain and irrigation can wash the agrochemical deposited on the leaves and stems of crops, leading it to the ground (Oliveira et al. 2011). Klinger et al. (1992) associate a decrease in the abundance of diplopods species in the soil of fields cultivated with sugar beet and cereals to the agrochemicals application on these. In the conventional crops, where agrochemicals were used, the abundance of such soil macroinvertebrates was lower than those fields where it was adopted an alternative way of cultivation, not based on pesticides use.

Foster et al. (2006) tested the effects of the fungicide carbendazim and the insecticide lambda-cyhalothrin in soil fauna of tropical environments of high temperature and humidity. Carbendazim is a systemic fungicide of wide spectrum, whose mechanism of action on its target is based on the inhibition of germ tubes, formation of accessories and mycelial growth (Nortox 2011). The insecticide lambda-cyhalothrin is a type II synthetic pyrethroid, which acts by contact and stomachally and does not act systemically, and it has long residual activity and repellent properties (NPIC 2001). The authors have found out, by means of a terrestrial model ecosystem test, that the millipede *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847) (Trigoniulidae) has a high susceptibility to both chemicals, as evidenced by the high mortality obtained.

The hydramethylnon-based baits can be highly toxic to insects when ingested, and they are used with greater efficiency against ants (Larini 1999). Lawrence et al. (2011) dieted

diplopods species *Sechelleptus seychellarrum* (Desjardins, 1834) (Spirostreptidae), endemic of Cousine Island, Seychelles, with the same bait used against pest ants in the region. It was noticed a weight reduction in the animals during the diet only with bait, though, according to the authors, the animals preferred the bait to litter as food resource; the bait was readily eaten when available. After the diet, the animals regained weight. No change in physical activity rates was observed in animals that were fed by the bait, whilst in insects the hydramethylnon is characterized by inhibiting the mitochondrial transport causing decreased physical activity and breathing.

The organosynthetic insecticides of the benzoylureic class have its action based on the chitin synthesis inhibition, the main constituent of arthropods exoskeleton. Therefore, they are widely used to control holometabolous insects, since the malformed cuticle of the new instar incapacitates the animal to release the exuviae, leading to death of the larvae (Larini 1999; Andrei 2005). Rieske and Buss (2001) reported that the application of the diflubenzuron insecticide for controlling the gypsy moth population in central timber forests of Cumberland Plateau region, USA, have had obvious effects on diplopods, and this population was recorded significantly lower one year after implementation.

Herbicides applied to combat weeds may also affect the soil fauna. Fox (1964) reported that applications of dalapon and trichloroacetic acid (TCA) in field increased the number of millipedes in the soil. TCA is an acetanilidic compound with herbicidal activity which can be absorbed by the animal respiratory, dermal and intragastric paths (Larini 1999). The activity of the herbicide dalapon is based on the reduction of seed production and growth of abnormal seedlings from produced seeds (Fawcett and Slife 1978). It presents a very low acute oral toxicity for mammals (Larini 1999).

Fox (1964) also related that application of monuron decreased millipede numbers, while the 2,4-D had no population effect within at least two years after its use. Monuron is a urea herbicide endowed with pre- and post-emergent action, being easily absorbed by the gastrointestinal and respiratory tract of animals. It can also be degraded in the soil by the peroxidase produced by microorganisms, originating acetanilidic compounds. 2,4 D, in turn, is a fenoxiacid hormonal herbicide with two chlorine atoms, with post-emergent application, considered extremely toxic and is also teratogenic and embryotoxic for animals (Larini 1999; Andrei 2005).

Glyphosate is a nonselective systemic herbicide glycine-derived; its action is described as post-emergent, with low acute oral toxicity to mammals (Larini 1999; Andrei 2005). In studies done in field by Lindsay and French (2004), the application of the herbicide

glyphosate in the manufacturer-indicated concentration had no significant effects on the population of diplopods.

Wardle et al. (1999) reached similar results after monitoring diplopods populations of fields planted with corn and asparagus that have been submitted to annual applications of the herbicides bromacil and terbumeton at the concentrations recommended by manufacturers to control weeds. The bromacil, a derivative of uracil, is considered one of the most persistent herbicides in the soil, its phytotoxicity is maintained for up to 24 months (Andrei 2005). In experiments with fish, it was noticed a reduction in the growth of these as a result of exposure to bromacil (Call et al. 1987).

A resembling result was also reported by French and Buckley (2008) in another field study using the herbicide metsulfuron-methyl, also applied as recommended by the manufacturer. However, in a study by Sabatini (1979), diplopods were observed in the sampled area only before application of the herbicide atrazine. Metsulfuron-methyl, atrazine and terbumeton are triazine herbicides of selective action whose application can be pre- or post-emergent (Larini 1999; Andrei 2005). They are considered moderately persistent in the environment and they are likely to be absorbed through the respiratory, dermal and gastrointestinal tract. Although such compounds generally exhibit low acute toxicity in mammals, it has been evidenced through a test with *Salmonella typhimurium* that atrazine has mutagenic activity (Larini 1999).

All these authors have reached similar conclusions, relating the population effects caused in diplopods with the herbicides indirect influence, once such compounds alter the vegetal composition of the sites of application, which would affect the environment and food available for diplopods. Thus, the variations of diplopods population, when observed, were not attributed to the direct action of herbicides.

On other hand, the laboratory tests performed by Hoy (1985) with adults diplopods of the species *Scytonotus simplex* Chamberlin (Polydesmidae) indicated the existence of a direct toxicity of the herbicide 2,4-D in these organisms. The highest mortality was recorded on the substrate completely treated with the insecticide, experiencing a lower death rate when they had been exposed only to contaminated food, and even smaller when they were exposed to a heterogeneous substrate, whereof only a half was treated with the double of the dose present in the fully treated substrate. In contrast to the controls, the mortality in the fully treated substrate began on the first day and exceeded 50% at the seventh day.

In addition, Merlini et al. (2012) evaluated the effects of the herbicide trifluralin on the midgut of the diplopod species *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Rhinocricidae) which

were laboratory exposed in acute and subchronic ways to concentrations related to the herbicide dosage applied in the field. Such expositions have caused a wide range of changes such as the accumulation of calcium granules in liver cells, increased epithelial renewal rate, increased release of secretory vesicles, epithelium disruption, high incidence of hemocytes between liver cells, sites of cytoplasmatic vacuolization and intracellular space dilation, as well as the death of the animals subchronically exposed to the herbicide at the dosages corresponding to a quarter and a half of the field dose. The authors concluded that even in residual doses, such herbicide led to the death of animals and significant changes indicative of noticeable toxicity at the dose recommended by the manufacturer for agricultural use.

It is highlighted that trifluralin is a dinitrobenzamine herbicide considered selective. This herbicide class has moderate persistence in the soil and high stability, being poorly absorbed by oral and dermal paths and it is therefore slightly toxic to mammals in terms of acute effects (Larini 1999). However, such compounds are considered genotoxic (Könen and Çavaş 2008; Fernandes et al. 2009), mutagenic (Fernandes et al. 2007) and have carcinogenic potential (EPA, 1999), and also bioaccumulate in aquatic organisms (Andrei 2005).

Faced with such a variety of results on the herbicides effects on diplopods, it is interesting to note that the changes caused by the presence of xenobiotics occur in increasing levels of biological organization, ranging from the molecular or biochemical level, through the physiological level or individual level to the population and ecosystem level (Stegeman et al. 1992). Accordingly, techniques that show responses at lower levels of biological organization are considered more preventive (Nascimento et al. 2008; Fontanetti et al. 2011).

Thus, it can be said that the effects of herbicides on diplopods may not be evident at the population level, as shown in the studies by Fox (1964), Sabatini (1979), Wardle et al. (1999), Lindsay and French (2004) and French and Buckley (2008), however, at the individual and cellular level, it was observed that the herbicides caused effects, as reported by Hoy (1985) and Merlini et al. (2012), with few studies on the effects of herbicides on diplopods at lower levels of biological organization.

3. DIPLOPODS AS TARGET ORGANISMS

Although diplopods have an important role in organic matter breaking down in the soil, such animals are considered pests in several crops around the world. In Uganda, for example, diplopods are known by tunnels that punch the storage roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*). Such attack occurs especially when the harvest is delayed, causing decreased production and causing damage to farmers (Ebregt et al. 2004a). In this country, it

was still recorded the diplopods attack to crops of cassava, corn, groundnuts and beans (Ebregt et al. 2004b). It was reported that millipedes attack developing pods in peanut plantations in South Africa, being present in relatively high densities in Malawi and in the river silts of the Luangwa Valley, Zambia (Wightman and Wightman 1994).

Troubles with diplopods have also been reported in potato fields in the state of New York, USA, where these animals were related to injured tubers (MacLeod 1939). In the United Kingdom, the diplopods *Brachydesmus superus* Latzel, 1884 (Polydesmidae) and *Blaniulus guttulatus* (Bosc, 1792) (Blaniulidae) were described as pests in sugar-beet crops, being responsible for damaging newly germinated seedlings of such cultivation (Winder et al. 1993).

Besides the damage caused to crops, diplopods can also cause inconvenience to the general human population, when events of migration and population explosion of some species occur, as has been reported by researchers in various parts of the world.

Nijjima (1984) reported a population outbreak of adult diplopods of the species *Parafontaria laminata armigera* Verhoeff, 1936 (Xystodesmidae) from autumn 1980 to early summer 1981, in a natural beech forest in Japan. Moreover, such species and its relative ones are known in Japan by interrupting railroad traffic during population explosion events that occur in autumn at 7 or 8 year intervals (Nijjima and Shinohara 1988; Shinohara 1989; Nijjima 1998). It was also related by Nijjima and Shinohara (1988) that the outbreak population was usually formed mainly of adults or semi-adults of the 7th instar.

A population expansion of the millipede *Plusioporus setiger* (Brölemann, 1901) (Spirostreptidae) in coffee plantations located at Alto Parnaíba, Minas Gerais, Brazil, was reported by Boccardo et al. (2002). Kania and Tracz (2005) reported the occurrence of diplopods mass migration of the species *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Julidae) in Poland, a species treated as a pest in the region owing to its invasion of homes and gardens during the spring. The species *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), was reported in population explosion at state of São Paulo, Brazil, on two occasions, causing trouble to the raided regions' dwellers (Boccardo 1998; Fontanetti et al. 2010).

Diplopods of the species *Ommatoiulus moreletii* (Lucas, 1860) (Julidae) caused great disorder in southern and southwestern Australia, where this species was introduced in the 80's and since then, often reaches high population levels in autumn and spring (Kassebaum 1985; Widmer 2006). Such kind of millipede is one of the few that is attracted by light at night, which is one of the likely explanations about why they invade homes, causing significant

domestic disturbance. It is noteworthy that this species does not procreate inside homes, but can occasionally damage plants in home gardens, like melons, strawberries, tomatoes and potatoes (Widmer 2006).

Their impacts are also considered negative for the native millipedes species, since invasive species may be favored by increasing toxicity of pesticides applied on farms, either directly by a higher tolerance level, or indirectly by reducing potential predators. Unlike endemic diplopods that have an important role as scavengers, *O. moreletii* is herbivorous and can threaten native flora and also crops (Nash et al. 2010).

In a study by Nash et al. (2010), the *O. moreletii* species responded positively to higher cumulative pesticide metric scores related to increased pesticides application in Australian vineyards, where there was also a reduction in beneficial arthropods abundance as a result of high rates of pesticides accumulation. The observed effects were attributed mainly to the use of the insecticide Indoxacarb, an oxidiazine which has activity against insects of the order Lepidoptera (Wing et al. 2000), and also to the use of sulfur as a fungicide.

Kassebaum (1985) conducted a series of tests with *O. moreletii* in which individuals were exposed to glass filter treated with known amounts of insecticides in disposable Petri dishes. The diplopods susceptibility was evaluated based on the average time of knockdown and the average time of moribundity, once that in the latter, individuals that could not walk straight and remain upright were considered moribund.

Based on this, the most effective agents against *O. moreletii*, considering the active constituents concentration were the synthetic pyrethroid formulations Decis® 25CE, Grenade® 200CE, Ripcord ® 200CE, and Baythroid ® H, which correspond respectively to deltamethrin, cyhalothrin, cypermethrin and cyfluthrin (Kassebaum 1985). All these commercial products are described as insecticides of contact and ingestion, highly dangerous to the environment and moderately toxic (Andrei 2005). Within the pyrethroids, such compounds are further classified as class II, because they determine effects which are originated in the central nervous system of organisms, such as excessive salivation, irregular movements of the limbs, convulsions and increased sensitivity to external stimuli (Larini 1999).

Considering the treatment charges as a basis of comparison, Kassebaum (1985) considered the carbamates X18 Carbaryl®, Baygon® 80WP, Baygon® 200 and Ficam® W as more effective. The active ingredients of these commercial formulations are respectively carbaryl, propoxur and bendiocarb (Andrei 2005). Carbamates are characterized by having neurotoxic action, binding themselves to acetylcholinesterase. This enzyme participates in

synaptic shutdown, enzymatically degrading the neurotransmitter acetylcholine, which is unfolded into choline and acetate (Lent 2005). When acetylcholinesterase activity is inhibited, there is a prolonged acetylcholine binding to its postsynaptic receptor and so, synaptic shutdown does not occur, leading to the death of the organism from prolonged neuroexcitation (Scharf 2003). Biotransformations suffered by the carbamate insecticides are also of great toxicological importance once they comprise a number of hydrolysis and hydroxylations that can generate acetylcholinesterase inhibitors compounds more toxic than their precursors (Larini 1999).

Organophosphorus compounds were also tested by Kassebaum (1985), who used the commercial formulations Lorsban® 50EC and Lorsban® 25WP, which have been effective only in terms of moribundity, performing poorly as knockdown agents. Both formulations have chlorpyrifos as active ingredient, which is a non-systemic organophosphorous insecticide that acts by contact. It is considered highly toxic to aquatic organisms and is also highly bio-concentrative, mainly due to its great liposolubility, a characteristic that also allows such insecticide to be absorbed by all possible means (Larini 1999; Andrei 2005). The organophosphorous action mainly results in abnormalities in the neuromuscular transmission, since they inhibit the acetylcholinesterase esteratic center by binding themselves to it, forming a stable complex. Thus, acetylcholinesterase is unable to perform the conversion of acetylcholine into choline and acetic acid (Larini 1999).

The diazinon, another organophosphorous compound, caused a 50% reduction in the diplopods population of uncultivated fields and plowed pastures when it was applied at concentrations between 2 and 4 kg/ha (Ingham 1985). An important issue about such insecticide is that it has a manufacturing impurity called Sulfopepp, which has a high toxicity, and still can undergo oxidation and engender an even more toxic compound called Tepp (Larini 1999).

Some organochlorine compounds were also tested in diplopods. This class of insecticides is characterized by lipophilicity and high resistance to biological systems decomposition mechanisms and are therefore, highly persistent in the environment (Larini 1999). The organochlorine aldrin caused no effects on diplopods population of uncultivated fields and plowed pastures when applied at a concentration 4-5 kg/ha (Ingham 1985), although it was toxic to *Oxidus gracilis*, causing reduction in diplopods population when used at a concentration of 4 lb/A, which is a higher concentration (Brown 1978). DDT applications also do not cause remarkable population effects after a single administration, but

annual applications of 0.7 lb/A of this insecticide induced a progressive decrease of the diplopods population after three years (Brown 1978).

According to Wildmer (2006) they are registered in Australia for employment against millipedes the carbamate insecticides bendiocarb, carbaryl and propoxur, which should be applied on suitable areas for these animals' breeding, such as external walls and flowerbeds, working as a chemical barrier. According to the author, it is also listed the pyrethroid cyfluthrin, which should be applied directly over the diplopods. However, aside from the manufacturers' recommendation, there are no studies concerning the action and effectiveness of all these agrochemicals in diplopods controlling.

Toxicity studies made by Fontanetti et al. (2010) indicated a high efficiency of the bendiocarb insecticide, from the carbamates group, in eliminating individuals of the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae) species. The animals of the group exposed to the insecticide at the concentration recommended by the manufacturer started to contract their bodies and expel repugnant secretion, and all animals came to death after 24 hours of exposure.

The acute toxicity of an agrochemical is expressed by the amount of product needed to cause the death of 50% in a lot of animals subjected to it by oral and dermal (LD₅₀) or respiratory (LC₅₀) route (Larini 1999). The acute toxicity of the methiocarb insecticide for diplopods was established through the LD₅₀ by Boccoardo and Fernandes (2000) with the *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptidae) and *Plusioporus setiger* (Brölemann, 1901) (Spirostreptidae) species. The authors established this product's LD₅₀ by topically applying its solutions, diluted in acetone, on the dorsal surface of the animal. Thus, they found high LD₅₀ values at 24, 48, 72 and 98 hours, indicating low compound toxicity to animals, which were attributed to the difficulty of product penetration in the exoskeleton. Methiocarb is a carbamate used as an insecticide, acaricide and molluscicide. Despite the low toxicity found by the authors this agrochemical is neurotoxic like a carbamate, acting as an inhibitor of cholinesterase and it is registered by the EPA as a pesticide for restricted use, and may not be applied to food crops (EPA 1994).

The acute toxicity of deltamethrin was also evaluated in the *G. olivaceus* and *P. setiger* species by topical application of acetone-diluted solutions on the animal dorsal surface (Boccoardo et al. 2001). Likely methiocarb, high LD₅₀ values were found, which was attributed to the association between the application form and the exoskeleton impermeability. For the insecticide cypermethrin, the LD₅₀ has been established for the *Orthomorpha gracilis* (Koch,

1847) (Paradoxosomatidae) species also by means of topical application on the dorsal surface (Gromysz-Kalkowska and Szubartowska 1994).

The evaluation of the insecticides effect on living organism metabolism can be made seeing the oxygen consumption, measured through respirometers. Boccardo et al. (2004) evaluated the action of deltamethrin in the *G. olivaceus* and *P. setiger* species by Warburg respirometer while Gromysz-Kalkowska and Szubartowska (1994) evaluated the effects of cypermethrin on *Cylindroiulus burzenlandicus* Verhoeff 1907 (Julidae), *O. gracilis* and *O. sabulosus* species by volumetric Drastich respirometer.

In all cases, respiratory rate increased just after the insecticide administration and it was followed by a reduction thereof. This decrease was described as gradual, except for *O. gracilis* whose oxygen consumption fall was oscillating. In experiments with cypermethrin, the fall in oxygen uptake resulted in lower values than those recorded for the control. The authors attributed the results to the metabolic cost of detoxification processes induced by insecticides, inferring that the pyrethroid was being metabolized. The differences in insecticide metabolism rate observed between species would be conditioned by different levels of enzymes participating in metabolism of insecticides (Gromysz-Kalkowska and Szubartowska 1994; Boccardo et al. 2004). Gromysz-Kalkowska and Szubartowska (1994) also assigned the results to nervous system hyperexcitation, typically triggered by pyrethroid insecticides, once symptoms of excessive excitation were visible specially in *O. gracilis*, whose representatives exhibited a vertical torsion posture, while others showed uncoordinated swinging or serpentine movements. In every individual of all species, the applied dose caused inability to perform linear locomotory movements.

4. FINAL CONSIDERATIONS

Although agrochemicals appear to be an easy alternative for pest control both in urban environment and in plantations, it is outstanding that the vast majority of agrochemicals raised in this review have some kind of restriction on their use, as shown in Table 2. Such restrictions though often punctual, show the danger of those pesticides for the environment and human populations.

Likewise, it should be highlighted that in the analyzed studies, agrochemicals often unleashed a reduction of the population and diversity of endemic and beneficial organisms (Klinger 1992; Rieske and Buss 2001; Föster et al. 2006) and triggered an increase in the population of invasive and noxious species (Kassebaum 1985). Thus, agrochemicals

application causes an imbalance in the ecosystem which may be worse than the presence of the pest species itself.

The results of some of the reviewed studies also suggests the need of a better understanding regarding the action mode of agrochemicals on diplopods in order to suit their application and avoid environmental contamination risks, especially considering that topic application does not seem to be efficient in these animals with calcified and rigid exoskeleton (Boccardo and Fernandes 2000; Boccardo et al. 2001). In this context, the survey highlights the lack of studies not only about the relationship of diplopods with different agrochemicals, as well as concerning the biological aspects of these animals, which would contribute to the development of control strategies.

Thus, it is clear that alternative control techniques, which do not use pesticides, should be preconized and tested in both urban and rural environment. In residential areas invaded by diplopods, physical barriers that prevent these animals' entrance at homes can be installed, since diplopods have difficulty overpassing smooth, rounded and vertical surfaces. The area covered by organic matter such as composting and leaf accumulation near residential areas can also be reduced, once it contributes to diplopods control through the decreased availability of food and shelter areas (Widmer 2006; Fontanetti et al 2007).

At rural areas, it is sometimes possible manual pest control, such as the one held at the sweet potatoes crops in Uganda (Bashaasha et al. 1995). However, it ought to take into account that they are small producers who serve only the domestic market demand, so that this strategy could not be feasible in more extensive and mechanized plantations.

In this sense, biological control is also a viable alternative. In South Australia, some attempts at biological control of the millipede *O. moreletti* have been done using the parasite nematode *Rhadbitis necromena*, which specifically attacks diplopods. In 1988, this parasite was released in more than 2000 locations. After this action, the population of such diplopods declined in many areas, however the results of this practice are only noticed in a long term (Widmer 2006).

Thus, it is highlighted the importance of the parsimonious use of agrochemicals, seeking, whenever possible, non-chemical alternatives to pest population management.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) process 2012/24562-5 and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support.

5. REFERENCES

- Andrei, E. (2005). *Compêndio de Defensivos Agrícolas*. São Paulo: Editora Andrei.
- Arab, A., Zacarin, G. G., Fontanetti, C. S., Camargo-Mathias, M. I., Santos, M. G. & Cabrera, A. C. (2003). Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, 18 (2), 79-82.
- Bashaasha, B., Mwanga, R. O. M., Ocitti P'obwoya, C. & Ewell, P. T. (1995). Sweetpotato in the farming and food systems of Uganda: A farm survey report. Uganda: National Agricultural Research Organization
- Boccardo, L. & Fernandes, M. N. (2000). Toxicidade do carbamato methiocard para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 13 (2), 29-33.
- Boccardo, L. (1998). Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia- SP. In XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, Congresso Brasileiro de Zoologia – Resumos (pp. 36-36). Recife.
- Boccardo, L., Fernandes, M. N. & Penteadó, C. H. S. (2001). Toxicity of deltamethrin pyrethroid on neotropical millipedes, *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. *Journal of Advanced Zoology*, 22 (1), 1- 4.
- Boccardo, L., Fernandes, M. N., Penteadó, C. H. S. & Jucá-Chagas, R. (2004). Effects of deltamethrin pyrethroid on the respiratory metabolism of the neotropical spirostreptid millipedes *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 17(2), 25-28.
- Boccardo, L., Jucá-Chagas, R. & Penteadó, C. H. S. (2002). Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. *Holos Environment*, 2, 20-223.
- Brown, A. W. A. (1978). Effects of insecticides on soil macroarthropods. In Brown A. W. A. (Ed.) *Ecology of pesticides* (pp.63-92). New York: John Wiley & Sons.
- Call, D. J., Brooke, L. T., Kent, R. J., Knuth, M. L., Poirier, S. H., Huot, J. M. & Lima AR (1987). Bromacil and diuron herbicides: toxicity, uptake and elimination in freshwater fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16, 607-613.
- Cloudslaey-Thompson, J. L. (1949). Significance of migration in myriapods. *Annals and Magazine of Natural History*, 2, 947-62.

- Ebregt, E., Struik, P. C., Abidin, P. E. & Odongo, B. (2004a). Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda II. Pest incidence and indigenous control strategies. *Wageningen Journal of Life Sciences*, 54 (1), 70-84.
- Ebregt, E., Struik, P. C., Abidin, P. E. & Odongo, B. (2004b). Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. *Wageningen Journal of Life Sciences*, 52 (1), 47-68.
- EPA (1994) Methiocarb, Reregistration Eligibility Decision Facts, pp.1-8. <http://www.epa.gov>. Accessed 22 April 2013.
- EPA (1999). Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Science Information. Management Branch Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, US EPA. <http://www.epa.gov>. Accessed 22 April 2013.
- EPA (2013). Pesticides: Regulating pesticides. <http://www.epa.gov/pesticides/regulating/restricted.htm#restricted>. Accessed 25 April 2013.
- European Commission (2013). EU Pesticide database. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection. Accessed 24 April 2013.
- Fawcett, R. S. & Slife, F. W. (1978). Effects of 2,4-D and dalapon on weed seed production and dormancy. *Weed Science*, 26 (6), 534-547.
- Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C. & Marin-Morales, M. A. (2009). Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1680-1686.
- Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C. & Marin-Morales, M. A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88 (3), 252-259.
- Fitzpatrick, T., Einsen, A., Wolff, K., Freedberg, I. & Austen, K. F. (1993) *Dermatology in general medicine*, New York: McGraw-Hill.
- Fontanetti, C. S. (1989). Moulting behaviour in Chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). *Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro*, 49 (4), 1053-1055.
- Fontanetti, C. S., Calligaris, I. B. & Souza, T. S. (2007). Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades. <http://www.baraoemfoco.com.br/barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>. Accessed 6 June 2013.
- Fontanetti, C. S., Calligaris, I. B. & Souza, T. S. (2010). A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide

- Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fonatnetti, 2006. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 77 (1), 165-166.
- Fontanetti, C. S., Nogarol, L. R., Souza, R. B., Perez, D. G. & Mazivieiro, G. T. (2011). Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In Pascucci, S. (Ed.) *Soil contamination* (pp.143-168). Rijeka: InTech Europe.
- Föster, B., Garcia, M., Francimari, O. & Römbke, J. (2006). Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazonia, Brazil). *European Journal of Soil Biology*, 42, S171-S179.
- Fox, C. J. S. (1964). The effects of five herbicides on the numbers of certain invertebrate animals in grassland soil. *Canadian Journal of Plant Science*, 44, 405-409.
- French, K. & Buckley, S. (2008). The effects of the herbicide metsulfon-methyl on litter invertebrate communities in a coastal dune invaded by *Chrysanthemoides monilifera* spp. rotundata. *Weed Research*, 48, 266-272.
- Girardin, B. W. & Stevesons, S. (2002). *Millipedes – Health consequences*. *Journal of Emergency Nursing*, 28 (2), 107-110.
- Godoy, J. A. P & Fontanetti, C. S. (2010). Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. *Water, Air, Soil Pollution*, 210, 389-398.
- Golovatch, S. I. & Kime, D. (2009). Millipede (Diplopoda) distributions: A review. *Soil Organisms*, 81 (3), 565-597.
- Gromysz-Kalkowska, K. & Szubartowska, E. (1994). Respiratory metabolism of millipedes after poisoning with cypermethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 765-770.
- Hopkin, S. P. & Read, H. J. (1992). *The Biology of Millipedes*. New York: Oxford University Press.
- Hoy, J. B. (1985). Toxicity of 2,4-D to millipedes (Polydesmidae: Diplopoda) food contamination an residue distribution as factors. *Journal of Economic Entomology*, 78 (2), 302-304.
- Ingham, E. R. (1985). Review of the effects of 12 selected biocides on target and non-target soil organisms. *Crop Protection*, 4 (1), 3-32.
- Kania, G. & Tracz, H. (2005). Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. *Peckiana*, 4, 57-66.

- Kassebaum, B. J. (1985). *Susceptibility of the black Portuguese millipede, Ommatoilus moreletii Lucas (Diplopoda: Julidae) to insecticides*. Adelaide: University of Adelaide, South Australian Department of Agriculture
- Klinger, K. (1992). Diplopods and Chilopods of conventional and alternative (Biodynamic) Fields in Hesse (FRG). *Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*, 10, 243 – 250.
- Könen, S. & Çavaş, T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan® using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 434-438.
- Larini, L. (1999). *Toxicologia dos praguicidas*. São Paulo: Editora Manole Ltda.
- Lawrence, J. M., Samways, M. J., Henwood, J. & Kelly, J. (2011). Effect of an invasive ant and its chemical control on a threatened endemic Seychelles millipede. *Ecotoxicology*, 20, 731-738.
- Lent, R. (2005). As unidades do sistema nervoso. In Lent, R. (Ed.) *Cem bilhões de neurônios - Conceitos fundamentais de neurociência* (pp. 65 – 96). São Paulo: Editora Atheneu.
- Lindsay, E. A. & French, K. (2004). The impact of the herbicide glyphosate on leaf litter invertebrates within Bitou bush *Chrysanthemoides monilifera spp. rotundata*, infestations. *Pest Management Science*, 60, 1205-1212.
- MacLeod, G. F. (1939). A review of the potato insect problems in New York State. *The American Potato Journal*, 16, 232-236.
- Merlini V. V., Nogarol, L. R., Marin-Morales, M. A. & Fontanetti, C. S. (2012). Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Microscopy Research and Technique*, 75, 1361-1369.
- Nascimento, I. A., Pereira, A. S. & Leite, M. B. N. L. (2008). Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In Zagatto, P. A. & Betoletti, E. (Ed.) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações* (pp. 413-432). São Carlos: RiMA.
- Nash, M. A., Hoffmann, A. A. & Thomon, L. J. (2010). Identifying signature of chemical applications on indigenous and invasive nontarget arthropod communities in vineyards. *Ecological Applications*, 20 (6), 1693-1703.
- Nijjima, K. & Shinohara, K. (1988). Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda: Xystodesmidae). *Japanese Journal of Ecology*, 38, 257-268.
- Nijjima, K. (1984). The outbreak of *Parafontaria laminata armigera* VERHOEFF. *Japanese Journal of Forest Environment*, 26, 25-32.

- Nijjima, K. (1998). Effects of outbreak of the train millipede *Parafontaria laminata armigera* (Diplopoda: Xystodesmidae) on litter decomposition in natural beech forest in Central Japan. 1. Density and biomass on soil invertebrates. *Ecological Research*, 13, 41-53.
- Nortox (2011). *Carbendazim*: Suspensão concentrada, Araçongas: Nortox S. A.
- NPIC (2001). Lambda-cyhalothrin. NPTN General Fact Sheets. <http://npic.orst.edu/ingred/aifact.html>. Accessed 23April 2013.
- Oliveira, M. A. P., Antuniassi, U. R. & Velini, E. D. (2011). Rain remotion of different drug formulations applicate in soybean, with or no addition of mineral oil. *Energia na Agricultura*, 26 (3), 80-97.
- Petersen, H. & Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos*, 39 (3), 291–357.
- Rieske, L. K. & Buss, L. J. (2001). Effects of gypsy moth suppression tatics on litter- and ground-dwelling arthropods in the central hardwood forests of Cumberland Plateau. *Forest Ecology and Management*, 149, 181-195.
- Romell, L. G. (1935). An example of myriapods as mull formers. *Ecology*, 16 (1), 67-71.
- Rotterdam Convention (1998). Châtelaine: Secretariat of the Rotterdam Convention. <http://www.pic.int/>. Accessed 23April 2013.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S. & Barnes, R. D. (2005). *Zoologia dos invertebrados – Uma abordagem funcional-evolutiva*. São Paulo: Editora Roca Ltda.
- Sabatini, M. A., Pederzoli, A., Fratello, B. & Bertolani, R. (1979). Microarthropod communities in soil treated with atrazine. *Italian Journal of Zoology*, 46 (4), 333-341.
- Scharf, M. E. (2003). Neurological Effects of Insecticides. In Pimentel D. (Ed.) *Encyclopedia of Pest Management* (pp. 395-399). Boca Raton: CRC Press.
- Schubart, O. (1942). Os Myriapodes e suas relações com a agricultura. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 2 (16), 205-234.
- Shinohara, K. (1989). Synonymy of *Parafontaria laminata* and its relative species (Diplopoda: Xylodesmidae). *Proceeding of The Japanese Society of Systematic Zoology*, 40, 43-48.
- Souza, A., Lourenzani, W. L. & Queiroz, T. R. (2010). Análise da evolução da tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários. São Carlos: *XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção*.
- Stegeman, J. J., Brouwer, M., Digiulio, R. T., Forlin, L., Fowler, B. M., Sanders, B. M. & Van Veld, P. (1992). Molecular responses to environmental contaminations: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect. In Hugget, R. J.,

- Kimierie, R. A., Mehrle, P. M. & Bergman, H. L. (Ed.), *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Stockholm Convention (2001). Châtelaine: Secretariat of the Stockholm Convention. <http://chm.pops.int>. Accessed 23 April 2013.
- Velasco, L. O. M. & Capanema, L. X. L. (2006). O setor de agroquímicos. *BNDES Setorial Rio de Janeiro*, 24, 69-96.
- Wardle, D. A., Nicholson, K. S., Bonner, K. I. & Yeates, G. W. (1999). Effects of agricultural intensification on soil-associated arthropod population dynamics, community structure, diversity and temporal variability over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1691-1706.
- Widmer, M. (2006). Portuguese millipedes (*Ommatoiulus moreletii*), *Department of Agriculture Gardennote*, 2.
- Wightman, J. A. & Wightman, A. S. (1994). An insect and sociological survey of groundnut fields in southern Africa. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 51, 311-331.
- Winder, G. H., Dewar, A. M. & Dunning, R. A. (1993). Comparisons of granular pesticides for the control of soil-inhabiting arthropod pests of sugar beet. *Crop Protection*, 12, 148-154.
- Wing, K. D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M. & Schnee, M. (2000). Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop protection*, 19, 537-545.

Table 1 – Synopsis of the population or individual effects of reviewed agrochemicals in diplopods

FUNGICIDES

Agrochemical	Species	Application rate	System	Effect	Reference
Carbendazim	<i>T. corallinus</i>	4.2 kg/ha (monthly) 41.7 kg/ha (single application)	Tropical terrestrial model ecosystem	Significant mortality after 4 weeks	Foster et al. (2006)
Sulphur	<i>O. moreletii</i>	3200 g ac/ha	Commercial vines	Population increase of the invasive species	Nash et al. (2010)
HERBICIDES					
Agrochemical	Species	Application rate	System	Effect	Reference
2,4-D	- <i>S. simplex</i>	3 pt/acre 0.34 mg ai/cm ² (substrate) 1.34 mg (food)	Grassy land Bioassay	No population effects Significative mortality	Fox (1964) Hoy (1975)
Atrazine	-	2-6 kg/ha	Field cultivated with corn, wheat and sugar beet	Escape, disappearing after application	Sabatini (1979)
Bromacil	-	1.6 Kg ai/ha	Field cultivated with corn and asparagus	No population effects	Wardle et al. (1999)
Dalapon	-	40 lb/acre	Grassy land	Increased population	Fox (1964)
Glyphosate	-	3-4 l/ha of aqueous at 1:100 v/v	Dunes	No population effects	Lindsay and French (2004)
Metsulfuron-methyl	-	9 g/ha	Coastal dune	No population effects	French and Buckley (2008)
Monuron	-	10 lb/acre	Grassy land	Decreased population	Fox (1964)

TCA	-	8 lb/acre	Grassy land	Increased population	Fox (1964)
Terbumeton	-	5 kg ai/ha	Field cultivated with corn and asparagus	No population effects	Wardle et al. (1999)
Trifluralin	<i>R. padbergi</i>	0.1068, 0.0534, 0.0267 e 0.0133 g/m ²	Bioassay	Mortality and tissue effects	Merlini et al. (2012)
INSECTICIDES					
Agrochemical	Species	Application rate	System	Effect	Reference
Aldrin	<i>O. gracilis</i>	4 lb/acre	Arable field	Decreased population	Brown (1978)
	-	4-5 kg/ha	Fallow fields and ploughed pasture	No population effects	Ingham (1985)
Bendiocarb	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
	<i>U. atrobrunneus</i>	150 g/L	Bioassay	Death of all individuals after 24 hours	Fontanetti et al. (2010)
Carbaryl	<i>O. moreletii</i>	1375.4 mg/m ²	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
Cyhalothrin	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
Cyfluthrin	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
Cypermethrin	<i>O. gracilis</i> , <i>C. burzenlandicus</i> and <i>O. sabulosus</i>	2.2 µg/g	Bioassay	Increased respiratory rate	Gromysz-Kalkowska; Szubartowska (1994)
Chlorpirifos	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of moribundity	Kassebaum

					(1985)
DDT	<i>O. gracilis</i>	10 lb/acre	Arable field	No population effects	Brown (1978)
	<i>O. gracilis</i>	0.7 lb/acre (multiple annual application)	Arable field	Population reduction after 3 years	Brown (1978)
	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)
	<i>G. olivaceus</i> and <i>P. setiger</i>	-	Bioassay	Low toxicity, evidenced by a high LD ₅₀	Boccardo et al. (2001)
Deltamethrin	<i>G. olivaceus</i>	20 mg/g (LD ₅₀ /2)	Bioassay	Increased respiratory rate	Boccardo et al. (2004)
	<i>P. setiger</i>	80 mg/g (LD ₅₀ /2)	Bioassay	Increased respiratory rate	Boccardo et al. (2004)
Diazinon	-	2-4 kg/ha	Fallow fields and ploughed pasture	50% reduction in the population	Ingham (1985)
Diffubenzuron	-	70 g ai/ha	Mesophilic forest	Population reduction after 1 year	Rieske and Buss (2001)
Hydramethylnon	<i>S. seychellarrum</i>	1-2 lb/acre	Native tropical forest	Decrease in the animals' body weight	Lawrence et al. (2011)
Indoxacarb	<i>O. moreletii</i>	3200 g ai/ha	Commercial vines	Population increase of the invasive species	Nash et al. (2010)
		0.2 kg/ha (monthly)	Tropical terrestrial ecosystem	Significative mortality after 4 weeks	Foster et al. (2006)
Lambda-cyhalothrin	<i>T. corallinus</i>	1.7 kg/ha (single application)			
Methiocarb	<i>G. olivaceus</i> and <i>P. setiger</i>	-	Bioassay	Low toxicity, evidenced by a high LD ₅₀	Boccardo and Fernandes (2000)
Propoxur	<i>O. moreletii</i>	-	Bioassay	Effective agent of knockdown and moribundity	Kassebaum (1985)

Table 2 – Agrochemicals of restricted or prohibited use under different regulations

Active ingredient	EPA ^a	EU ^b	PIC ^c	“Dirty dozen” ^d
Fungicides				
Carbendazim				
Sulphur				
Herbicides				
2,4-D	X			
Atrazine	X	X		
Bromacil		X		
Dalapon		X		
Glyphosate	X			
Metsulfuron-methyl				
Monuron		X		
TCA		X		
Terbumeton		X		
Trifluralin		X		
Insecticides				
Aldrin	Canceled	X	X	X
Bendiocarb	Canceled	X		
Carbaryl	X	X		
Chlorpyrifos	X			
Cyfluthrin	X			
Cyhalothrin		X		
Cypermethrin	X			
DDT	Canceled	X	X	X
Deltamethrin	X			
Diazinon	X	X		
Diflubenzuron	X			
Hydramethylnon		X		
Indoxacarb				
Lambda-cyhalothrin	X			
Methiocarb	X			
Propoxur	X	X		

^a List of pesticides of restricted use according to the US Environmental Protection Agency (EPA) (2013); ^b Pesticides banned in the European Union as a result of the application of Directive 79/117/EEC, Council Regulation 805/2004/EC and Directive 91 / 414/EEC (2013); ^c Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade (1998); ^dList of 12 pesticides that should be banned based on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2001)

3. OBJETIVOS

Em face da escassez de dados acerca da morfologia do sistema nervoso de diplópodos, os objetivos desse trabalho foram:

a) Analisar e descrever a anatomia e morfologia do sistema nervoso da espécie *G. olivaceus*, por meio de técnica histológica convencional, histoquímica e citoquímica.

b) Avaliar os efeitos da deltametrina para o sistema nervoso de diplópodos, utilizando como modelo a espécie *G. olivaceus*, por meio de microscopia confocal e marcação de sinapsina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos da espécie *G. olivaceus* foram coletados nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil (22°24'36" S e 47°33'36" W Gr.). Os animais foram mantidos em terrário contendo terra, folhas e lascas de madeira, umedecidos periodicamente, a temperatura de 24° C. O método de dissecação e processamento do material variou conforme a técnica realizada. Os métodos consistiram em:

4.1 Anatomia e Histologia

4.1.1 Dissecação dos animais

Os indivíduos foram anestesiados com auxílio de clorofórmio. Os tecidos nervosos foram obtidos por dissecação dos espécimes realizada em placas de dissecação contendo solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5%, Na₂PO₄ 2,38% e KH₂PO₄ 2,72%).

Após a dissecação, o sistema nervoso foi fotografado em estereomicroscópio antes de sua retirada para elucidação de sua anatomia. Em seguida, o material foi retirado e fixado de acordo com as técnicas empregadas; posteriormente, foi transferido para solução tampão fosfato de sódio salino (pH 7.4, 0,1M) e mantido em geladeira a 5°C para análise morfológica.

4.1.2 Processamento do material

O material fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (pH 7.4, 0,1M), foi desidratado de forma lenta sob refrigeração para melhor preservação do tecido nervoso em soluções de etanol 50, 60, 70, 80, 90 e 95%, por um período de 2 horas cada banho (SILVA-ZACARIN et al., 2012), sendo então, transferido para uma solução de resina de embebição Leica, durante 24 horas em geladeira.

Após esse processo, o material foi colocado em moldes contendo resina de inclusão, com catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio do micrótomo Leica. Os cortes obtidos foram hidratados e recolhidos em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), conforme rotina histológica, para posterior observação e análise morfológica. Os resultados obtidos foram fotografados em fotomicroscópio Olympus BX-51, fazendo-se uso de programa próprio para captura das imagens.

4.2 Histoquímica

Os testes histoquímicos foram utilizados para detectar os seguintes elementos:

a. Proteínas Totais

- Técnica do azul de bromofenol (segundo PEARSE, 1985).

Fixação do material em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas; as lâminas foram hidratadas por 5 minutos e imersas no respectivo corante, por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente, secas e montadas com bálsamo do Canadá.

b. Polissacarídeos Neutros

- Técnica do Ácido periódico de Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação do material em solução Bouin; oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%; exposição ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; passagem em água sulfurosa por 9 minutos; lavagem por 30 minutos em água corrente.

c. Lipídios

- Método de sudan black B (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação do material em formolcálcio; coloração em sudan black B por 30 minutos; lavagem em água e montagem das lâminas em glicerina gélida.

d. Colágeno

- Fucsina ácida (BEHMER et al., 1976)

Fixação do material em paraformaldeído 4%; as lâminas foram hidratadas por 5 minutos, coradas com Hematoxilina de Harris por 15 minutos; lavadas em água corrente e coradas pela fucsina-pícrica por 30 minutos, lavadas rapidamente e secas.

Todas as lâminas obtidas foram montadas com bálsamo do Canadá.

4.3 Técnica citoquímica - Impregnação argêntica dos neurônios e células da glia

- Variante Strong do Método de Golgi (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação dos tecidos nervosos em formol-bicromato por três dias. Após esse período o material foi lavado em água destilada e submetido por dois dias à solução de nitrato de prata 1%. O material foi lavado, congelado a -15°C com uso do meio de congelamento *Jung Tissue Freezing Medium*, da Leica, e cortado em criostato Leica CM1860 a uma espessura de 55µm.

As secções foram montadas em lâminas albuminizadas, desidratadas em soluções de etanol de 60, 70, 80, 90, 95 e 100%, por um período de 5 minutos em cada banho. As lâminas assim obtidas foram clareadas e montadas com balsamo do Canadá.

4.4 Bioensaios com deltametrina e *G. olivaceus*

Para a montagem dos bioensaios, foram utilizados potes plásticos com capacidade de 530 mL, forrados com papel filtro umedecido e disponibilidade de batata (*Solanum tuberosum*) como alimento *ad libitum*. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no escuro à uma temperatura constante de 24°C. À cada pote previamente preparado, foi adicionado um indivíduo adulto da espécie com massa entre 1,5 e 3,5 g ao qual aplicou-se topicamente 35µL de solução feita a partir de diluições em água de uma formulação comercial de deltametrina do tipo concentrado emulsionável, a qual contém 25 g/l de deltametrina e 886 g/l de ingredientes inertes. A aplicação foi realizada na superfície dorsal dos animais com o auxílio de uma micropipeta para dosagem precisa da substância testada. Um total de 120 animais, 24 por grupo experimental, alocados em potes individuais foram mantidos a 24°C e no escuro durante todo o bioensaio.

As soluções da formulação comercial foram calculadas e preparadas com base nas seguintes concentrações de princípio ativo:

- Um quinto da DL₅₀ estabelecida por Boccardo et al. (2001), que equivale a 30,8µg.g⁻¹ de princípio ativo (C1);
- A DL₅₀ de deltametrina, cujo valor é 154µg.g⁻¹ (C2);
- Duas vezes a DL₅₀ estabelecida para a deltametrina na espécie, correspondendo a 308µg.g⁻¹ de princípio ativo (C3);
- Uma concentração de campo (Cf) preparada com base nas recomendações do fabricante para combate de infestações de outros artrópodes como *Ceratitis captata* (mosca da fruta) e *Agotis ipsilon* (lagarta rosca), resultando em uma aplicação de princípio ativo de 0,17 µg.g⁻¹.

O grupo controle recebeu aplicação tópica de 35µL de água. Foram coletados indivíduos após 12, 24 e 48 horas de exposição, para a avaliação dos efeitos do composto testado, sendo que, para cada concentração e tempo analisados, foram coletadas três réplicas.

4.5 Microscopia confocal

4.5.1 Dissecção dos animais e preparo do material

Os indivíduos foram decaptados após anestesia por refrigeração e as cabeças inteiras foram fixadas em paraformoldeído 4% em tampão fosfato (pH 7.4, 0,1M) por 72 horas, para total penetração do fixador no material. Após esse período, o material foi transferido para o tampão PBS (tampão fosfato salino, pH 7.4) e armazenado por até 30 dias em geladeira até ser seccionado em criostato. Nessa etapa, cada cabeça foi rapidamente congelada a -15°C , com uso do meio de congelamento Jung Tissue Freezing Medium, da Leica. Utilizando-se um criostato Leica CM1860, foram retirados aproximadamente $250\mu\text{m}$ a partir do fronte os quais foram descartados de forma que a parte do cérebro a ser analisada ficasse exposta. Após tal preparo, o material foi armazenado em geladeira em tampão PBS.

4.5.2 Marcação de Sinapsina

Foi efetuada a marcação de sinapsina em bloco em tubos de microteste. O material foi lavado duas vezes em PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4) sendo então permeabilizado em solução contendo triton-x100 0.3% e BSA 5% (albumina de soro bovino) por 1 hora a 20°C , novamente, lavados duas vezes em PBS. Após esse procedimento, o material foi incubado por 4 dias a 4°C no anticorpo monoclonal contra a proteína associada à vesícula sináptica de *Drosophila* sinapsina 1 (1:50; SYNORF1) diluído em PBS com 0,2% de Triton X100 e 5% de NGS (soro normal de cabra) e lavado seis vezes em PBS. As preparações marcadas foram incubadas no anticorpo secundário Alexa Fluor 546 cabra anti-rato (1:250 em PBS com 1% de NGS) por 1 hora em temperatura ambiente, de acordo com os procedimentos descritos por Hoyer et al. (2005). Por fim, as preparações marcadas também foram incubadas por 30 minutos em RNase e 40 minutos na coloração fluorescente para ácido nucleicos Syto11 a $5\mu\text{M}$, para marcação dos núcleos. Alternativamente, foi feita também a marcação para f-actina com solução de Alexa Fluor 488 Faloidina por 40 minutos, e incubação em solução contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 10 minutos. O material foi montado em lâmina com superfície tratada para uso em microscopia de alta resolução e invertida, utilizando meio de montagem ProLong® Gold reagent.

4.5.3 Análise do material por microscopia confocal

As imagens foram capturadas por microscópio confocal Leica CTS ST52 alocado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências

da UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) de Rio Claro, São Paulo. O material foi escaneado em alta resolução através de uma profundidade de 10 μm em intervalos de 0,17 μm (40x, zoom digital 2x) em microscópio confocal Leica CTS ST52 com excitação feita por laser de argônio e filtro HFT em comprimentos de onda de acordo com os fluoróforos utilizados para marcação de núcleo, f-actina e sinapsina. Para quantificação adequada da sinapsina, parâmetros adicionais foram fixados para o canal correspondente, como o ganho (1100), *offset* (-20), intensidade do laser (10%), emissão (entre 635 nm e 750 nm), *line average* (8) e *frame average* (1). As imagens foram processadas e quantificadas utilizando-se o software Leica Application Suite AF 2.6.0.

Para quantificação da sinapsina, foram efetuadas três medições não coincidentes na região selecionada, em cada metade cerebral, de forma a obter um valor médio por indivíduo, sendo analisados três indivíduos por concentração, em cada um dos tempos analisados. Os dados assim obtidos foram organizados em grupos formados pela intersecção das variáveis independentes tempo e concentração e estatisticamente avaliados por meio do *software* SPSS Statistics (v.22 IBM SPSS, Chicago, IL), sendo submetidos inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de homogeneidade de Levene. Com a validação do pressuposto na normalidade ($p > 0,1$ em todos os grupos), mas não da homocedasticidade, os dados foram avaliados por meio de ANOVA unidirecional com teste robusto de igualdade de médias F de Brown-Forsythe, seguida do teste Post-hoc Games-Howell, apropriados para variâncias iguais não presumidas, de acordo com os procedimentos descritos em Marôco (2014). Considerou-se um nível de significância (α) de 0,05.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta dissertação resultaram na produção de dois artigos, dos quais um já foi enviado para publicação e o outro está em fase de preparação para envio à revista especializada.

ARTIGO 2. Anatomy and morphology of the nervous system of the neotropical millipede *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae) and a description of an unusual structure

Annelise Francisco, Roberta C. F. Nocelli, Carmem S. Fontanetti

Submetido para publicação na *Arthropod Structure & Development*.

ARTIGO 3. Alterações nos níveis de sinapsina no cérebro do milípede *Gymnostreptus olivaceus* exposto a diferentes concentrações de deltametrina

Annelise Francisco, Pablo H. Nunes, Roberta C. F. Nocelli, Carmem S. Fontanetti

Em preparação para submissão.

ARTIGO 2

Anatomia e morfologia do sistema nervoso do milípede neotropical *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae) e descrição de uma estrutura incomum

Resumo

O presente estudo apresenta uma descrição morfológica do sistema nervoso central do diplópodo neotropical *Gymnostreptus olivaceus* e o primeiro relato de uma bainha celular externa envolvendo o sistema nervoso em Diplopoda. Os resultados mostram que o sistema nervoso dessa espécie é composto por um cérebro, formado pela fusão de proto- deuto- e tritocérebro, e um cordão nervoso ventral, com gânglios metamericamente arranjados, que se estende por toda a extensão do corpo do animal. Foram localizados e descritos os corpos cogumelares, lobos ópticos e glomérulos olfatórios da espécie. Semelhantemente ao que foi relatado em outros diplópodos, o sistema nervoso de *G. olivaceus* é constituído por uma camada cortical perifericamente arranjada, onde puderam ser identificados três tipos de neurônios, e uma região interna de neurópila, os quais encontram-se envolvidos e protegidos por um perineuro e uma lamela neural. No entanto, mais externamente à lamela neural, foi identificada uma bainha celular externa descontínua e irregular, dotada de células características, cuja função parece estar ligada a nutrição e proteção dos neurônios.

Palavras-chave: Barreira hemato-nervosa, cérebro, cordão nervoso e diplópodo.

ARTIGO 2

Anatomy and morphology of the nervous system of the neotropical millipede *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae) and a description of an unusual structure

Annelise Francisco¹, Roberta F. C. Nocelli², Carmem S. Fontanetti¹

1 Departamento de Biologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Bela Vista, 13.500-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

2 Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação UFSCar, Via Anhanguera, Km 174, Araras, São Paulo, Brazil.

Abstract

This study presents a morphological description of the central nervous system of the neotropical millipede *Gymnostreptus olivaceus* and the first report of an outer cell layer surrounding the nervous system in Diplopoda. The nervous system of this species consists of a brain formed by the fusion of proto-, deuto- and tritocerebrum, as well as a ventral nerve cord with metamERICALLY arranged ganglia that extends through the entire length of the animal's body. In the present study, the optic lobes, mushroom bodies and olfactory glomeruli of this species were located and described. As has been reported for other millipedes, the nervous system of *G. olivaceus* comprises a cortical layer in which three types of neurons could be identified and an inner region of neuropil, both of which are wrapped and protected by a perineurium and a neural lamella. However, more externally to the neural lamella, there is a discontinuous and irregular outer cell sheath layer containing distinctive cells whose function appears to be linked to the nutrition and protection of neurons.

Keywords: blood-nerve barrier, brain, nerve cord, diplopod

1. Introduction

The terrestrial arthropods of the class Diplopoda are known as millipedes, and they can be found in all types of terrestrial environments and on all continents except Antarctica, although most of the diversity, estimated at a total of 80,000 species, is located in the inter-tropical zone (Sierwald and Bond, 2007 and Golovatch and Kime, 2009).

To date, morphological studies of neotropical millipedes have focused primarily on the male and female reproductive systems (Freitas et al., 2003, Freitas and Fontanetti, 2008, Fontanetti et al., 2010, 2012 and Pinheiro et al., 2013), the digestive tract (Fantazzini et al.,

2002, 2004, Camargo-Mathias et al., 2011 and Moreira-De-Sousa and Fontanetti, 2012), the Malpighian tubes (Souza, 2012) and the fat body (Camargo-Mathias and Fontanetti, 2000 and Fontanetti et al., 2004). However, there are few studies on the nervous system of this group of animals, and the available literature is restricted to Palearctic and Nearctic species (Heathcote, 1887, Demange, 1981, Warburg and Rosenberg, 1983, Joly and Descamps, 1987, Gupta, 1987, Duy-Jacquemin. and Arnold, 1991, Hopkin and Read, 1992, Strausfeld et al., 1995, Loesel et al., 2002, Dove and Stollewerk, 2003 and Harzsch, 2004).

Thus, the present study describes the morphology of the central nervous system of the millipede *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae), a species found in Brazil, distributed through regions of the state of São Paulo, the Pantanal and in the Paraná river basin (Golovatch et al., 2005). The results were obtained by histological and histochemical analysis, correlating the information obtained with physiological and taxonomic data available in the literature, contributing to the knowledge of the biology and morphology of this species.

2. Materials and methods

Individuals of the species *G. olivaceus* were collected around Rio Claro, São Paulo, Brazil (22°24'36 "S and 47°33'36" W Gr.), from March 2013 to February 2014.

Five specimens were anesthetized by freezing and dissected in saline solution (NaCl 7,5%, Na₂PO₄ 2,38% e KH₂PO₄ 2,72%) to remove the brain and the ventral nerve cord. The materials were fixed for 48 hours in 4% paraformaldehyde, formal calcium or Bouin's solution, depending on the technique used, and then kept in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5). Subsequently, the materials were dehydrated in an ethanol series from 50 to 95% (Silva-Zacarin et al., 2012) and embedded in Leica historesin, initially at 4°C to prevent pre-polymerization, and after four days, the polymerization was transferred to 37°C and allowed to complete. Sections (6 µm thick) were mounted on glass slides and then stained with hematoxylin-eosin for general morphological assessment or subjected to histochemical tests.

Bromophenol blue staining (Pearse, 1985) was used to detect total protein, periodic acid-Schiff (PAS) (Junqueira and Junqueira, 1983) was used to detect neutral polysaccharides, acid fuchsin (Behmer et al., 1976) was used to detect collagen, and Sudan black B (Junqueira and Junqueira, 1983) was used to detect lipids.

Additionally, a portion of the dissected material was fixed in formal dichromate and stained by the Strong variant of the Golgi method (Junqueira and Junqueira, 1983). After staining, the material was cut using a Leica cryostat at a thickness of 55 µm, and the sections

were mounted on albumin-coated glass slides and dehydrated in alcohol series from 60 to 100%.

The slides were mounted in Canada balsam, and the images were examined and captured using a light microscope (Olympus BX 51).

3. Results

The nervous system of the millipede *G. olivaceus* comprises a brain and a ventral nerve cord that is surrounded by its lateral branches and tracheal trunks (Figure 1).

The head part is arranged as shown in Figure 2. The most anterior part of the brain is composed of two lateral projections corresponding to the protocerebrum, interconnected by a protocerebral bridge (Figure 3A). The protocerebrum consists of a cortical layer or somata, where the neurons are located, which is organized around a dense neuropil formed by neuronal projections (Figures 3A-C). The protocerebrum extends laterally within the animal's head, and two aligned neuropils interconnected by straight fibers are observable, corresponding to the lamina and the medulla (Figures 2, 3B), which are part of the structure of the optical lobe.

Distinguishable groups of neurons (Figures 3D-F), with typical morphology and organization, suggest functional specificities. The highlighted groups of cells with condensed nucleus and little cytoplasm (Figure 3D) were identified as globuli cells, mainly located at the frontal part of the cortical layer, distally on each side of protocerebrum, where they are arranged around parallel beams of neurites, forming mushroom bodies (3A-C). A smaller group of globuli cells without obvious organization was observed more posteriorly in the cortical layer; adjacent to these, larger cells are visible, identified as unipolar neurons whose neurites are directed to the neuropil region (Figure 3E).

Neurosecretory cells are discernible in some regions of the somata; they are isolated neurons or in small clusters, are slightly larger than the other types of neurons observed, and have a bulky and heterogeneous cytoplasm (Figure 3F).

In some regions, the neuropil appears dense, forming differentiated dense figures (Figures 4A, B), wherein the rounded shapes (Figure 4A) could be identified as olfactory glomeruli, located in a more proximal position to the mushroom body in both sides of protocerebrum. The olfactory glomeruli are located near a cortical layer with unipolar neurons that appear to be connected to them (Figure 3F).

A second region extends itself to the back of the protocerebrum, consisting of a neuropil and a somata formed by neurons and glia cells, with apparently no organized region;

this corresponds to the deutocerebrum (Figure 4C), divided into two symmetrical halves that extend around the animal's esophagus. A relatively thin cord of nerve branches extends from one side to the other, forming a connection between the two sides; more caudally, these two sides merge just below the esophagus, in the part that corresponds to tritocerebrum (Figure 4D). In this region, there is also the extension of a large number of neurites that form a thick beam, innervating the muscles of the clypeus and labrum. Then, the fusion of the two sides of the tritocerebrum in a single neural lamella marks the beginning of the ventral nerve cord (Figures 2, 4E, F).

The ventral nerve cord is long, branches laterally and runs through the animal's entire body length (Figures 1, 5A). As with the head portion, the ventral nerve cord has an internally located neuropil, around which there are cell bodies of neurons and glial cells, forming the cortical layer. The neurons of the cortical layer are arranged in small, delimited ganglia formed by groups of few cells (Figure 5B). Such ganglia occur throughout the ventral nerve cord, arranged in a metameric pattern of two pairs per body diplosegment.

Throughout the entire nervous system, there are cells with smaller or elongated nuclei, chromatin condensation and located through the fibers comprising the neuropil (Figures 3D, 4A, B) or in the middle of somata (Figures 3F, 4C); these cells are identified as glial cells. The Golgi method allowed the observation of the morphologies of some of these glial cells (Figure 6), and they could be clustered into three groups; those located near the external envelope (Figure 6A and B), branching cells next to the cell bodies of neurons (Figure 6C and D) and extensively branched cells located in the neuropil (Figure 6E and F).

The whole nervous system is externally enfolded by a layer called the neural lamella (Figures 3C, D, 4C, 5A, C, E), where cells or nuclei were not observed. Instead, this layer contained one matrix that stained positively for neutral polysaccharides (Figure 7A) and collagen (Figure 7C) but weakly for proteins (Figure 7B) and lipids (Figure 7D). Just below this layer, there were some fusiform nuclei belonging to the glial cells interposed between the neural lamella and neurons, forming the perineurium (Figures 3D, 5C-E).

More externally, the nervous system is still wrapped by an outer cell layer, a sheath composed of a matrix and a few cells (Figures 3A-D, 4B-F, 5B-F), some of which have cytoplasm filled with granules (Figure 5F). This layer varies in thickness between different parts of the nervous system, and along the ventral nerve cord some sections did not show this layer (Figure 5A). Thus, the outer cell layer of the *G. olivaceus* nervous system is discontinuous and irregular.

Histochemically, the matrix of the outer cell layer was stained strongly with PAS (Figure 7A), and weakly with bromophenol blue (Figure 7B) and acid fuchsin (Figure 7C), showing that it is composed mainly of polysaccharides and to a lesser extent of protein. The granules of the cells in this layer are predominantly basophilic and are strongly stained by eosin, although a granulation stained by hematoxylin is also present; furthermore, they stain with bromophenol blue dye. This wrapping layer is not stained by Sudan black B (Figure 7D), suggesting the absence of lipids in this structure.

4. Discussion

The nervous system of the millipede *G. olivaceus* is quite consistent with the literature available on other species of millipedes (Heathcote, 1887, Joly and Descamps, 1987, Duy-Jacquemin and Arnold, 1991 and Strausfeld et al., 1995), except for the presence of an external cell layer, which is reported here for the first time in the Diplopoda, as will be discussed later. It was observed that the three pairs of ganglia (protocerebrum, deutocerebrum and tritocerebrum), with their internal regions, somata and neuropil, were coated by with a perineurium, a neural lamella and an outer cell sheath.

The protocerebrum of the millipedes is divided into two parts, each with two well-developed lateral extensions, in which differentiable cortical regions and neuropils were observed.

Although the two protocerebral lobes are interconnected by a protocerebral bridge in *G. olivaceus*, this connection is formed by a uniform mass of neurites without the formation of a distinct midline neuropil as occurs in other arthropods (Loesel et al., 2002 and Strausfeld et al., 2006).

Two aligned neuropils are located distally in the protocerebrum, corresponding to the medulla and the lamina of the optic lobe, where the first is most proximal and the second the most distal, similar to that observed in other species of millipedes (Strausfeld et al., 1995 and Harzsch, 2004). The lateral eyes of millipedes are composed of several similar optical units called ocellar ommatidia (Harzsch et al., 2007), which are innervated by a number of straight neurite bundles from the lamina; this type of structure was described as a pseudo-compound eye by Paulus (2000). The ocellar ommatidia were removed in this work because the tegument attached to the dioptic apparatus was removed during the dissection.

According to Joly and Descamps (1987), the mushroom bodies of millipedes are located in the protocerebrum, being formed by groups of small unipolar neurons called globuli cells and their neurites, forming lobed neuropils made of parallel axons (Kenyon,

1896 and Strausfeld et al, 1998). According to Strausfeld et al. (1998), the peduncles of mushroom bodies are massive stalks that split into several parallel medial lobes in Diplopoda. This structure was observed in *G. olivaceus*, reaffirming the presence of mushroom bodies Diplopoda, in contrast to Gupta (1987), who reported the absence of such structures in this group.

The mushroom bodies are known as centers of learning, memory and spatial orientation, in addition to being recognized as centers of sensorimotor integration (Kenyon, 1896, Strausfeld et al., 1995, Chapman, 1999, Roman and Davis, 2001 and Heisenberg, 2003). The mushroom bodies receive olfactory, visual and tactile afferents and thus correspond directly to the olfactory glomeruli in both Mandibulata and Chelicerata (Strausfeld et al., 1998). In Onychophora, relay neurons from the olfactory glomerulus extend themselves into the ipsilateral mushroom body, located distally (Strausfeld et al, 2006), and the same process appears to occur in *G. olivaceus*.

The olfactory glomeruli, responsible for chemosensory processing, consist of several neuropils, which may be elongated or spherical (Harzsch, 2006 and Sombke et al, 2011b); spherical neuropils were observed in *G. olivaceus*. These appear to be related to the adjacent cortical layer with unipolar neurons and are surrounded by glial cells, thus differing from that described in the millipede *Cylindroiulus punctatus* (Julidae), in which a cortical layer was not observed in this region (Duy-Jacquemin and Arnold, 1991). In Mandibulata, the first-order olfactory neuropils are located in the deutocerebrum, which receives the afferents of the first pair of antennae (Chapman et al, 1999, Schachtler et al., 2005, Harzsch, 2006, Strausfeld et al, 2008 and Sombke et al, 2012). In *C. punctatus*, two neuropilar areas in the deutocerebrum were identified: a dorsal neuropil organized in glomeruli and an unstructured ventral neuropil (Duy-Jacquemin and Arnold, 1991). In *G. olivaceus*, the olfactory glomeruli were in a region adjacent to the mushroom bodies, a reminder of the functional relationship between the two structures, as also reported by Strausfeld et al. (1995). However, this positioning of the olfactory glomeruli suggests that they are located more anteriorly in *G. olivaceus*.

According to Harzsch (2006), glomeruli may be present in any area of the arthropods' central nervous system that receives neurosensory inputs. In Onychophora, the olfactory glomeruli are protocerebral because this brain segment is supplied by afferents from the frontal appendages (Strausfeld et al., 2006). Strausfeld et al. (1998) proposed that Onychophora would be a basal group to the Arthropoda, with Diplopoda as a sister group, and that these two groups would be closer to each other than Diplopoda and Chilopoda, although some works keep the Diplopoda within the Mandibulata, along with Insecta and Crustacea

(Sombke et al., 2011b and 2012). Like the case in chilopods (Sombke et al., 2011a), there is not a clear separation between the protocerebrum and the deutocerebrum in millipedes (Duy-Jacquemin and Arnold, 1991), and this can also lead to confusion.

The present study found that sensory axons from antenna bind to the anterodorsal brain in a position that corresponds to the protocerebrum in Diplopoda, such that the olfactory glomeruli would be protocerebral, as in Onychophora. In the posteroventral region that corresponds to the deutocerebrum, differentiated neuropil regions were not observed; Duy-Jacquemin and Arnold (1991) made similar observations regarding the ventral part of the deutocerebrum of *C. punctatus*.

The deutocerebrum merges directly into the tritocerebrum, but the two horizontal commissures described by Joly and Descamps (1987) in this region were not observed. Only one horizontal commissure was found, and given that it is located below the esophagus, it was identified as the tritocerebral commissure. The other commissure may have been damaged during the dissection because it is fragile and delicate, or it might instead be included within the brain as suggested by Bistch and Bistch (2010).

In this area, the extension of a large number of neurites innervating the muscles of the head was also observed. The innervation of the clypeus and the labrum is a fundamental structure of the head, which is part of the basic body plan of Arthropoda (Bistch and Bistch, 2010). According to Harzsch (2006), the innervation of the labrum is mainly tritocerebral in origin but may also have deutocerebral components in Insecta and Chilopoda; the location of this innervation in *G. olivaceus* between these two brain segments suggests that this is the same structure in this species.

The ventral nerve cord of *G. olivaceus* has an arrangement quite similar to that described in the literature. In studies on the post-embryonic development of *Julus terrestris* (Julidae), Heathcote (1887) noted that initially the ventral nervous system consists of two distinct cords united only by a thin median part, but this structure undergoes a process of concentration that results in a single cord, with only slight traces of its former double condition. Such traces were observed in this study and also by Harzsch (2004), who reported that the ventral nerve cord appears to be a single homogeneous structure at first sight, but it is actually formed by the fusion of two cords along which there are metamericly arranged and bilaterally symmetrical ganglia. Such ganglia are formed by neurons and glial cells, but the cell types are not clearly segregated, as was also reported by Demange (1981).

Neurons with different characteristics were observed in the cortical layer of the nervous system of *G. olivaceus*. According to Sombke et al. (2011a), the neurons of chilopods

can be divided into three types. The first type has small somata (10 to 15 μm in diameter), a large, round nucleus and limited cytoplasm. The second type is characterized by large somata (approximately 20 μm in diameter), with occasionally lobate nuclei and voluminous cytoplasm. The third type comprises large neurosecretory cells filled with granules; these cells are located in paired symmetrical groups in the anterolateral area of the frontal lobes and in the ventral nerve cord of the chilopods, although in millipedes they seem to be more sparse and present in a wider region, quite similar to the description by Warburg and Rosenberg (1983) of the millipede *Archispirostreptus syriacus* (Spirostreptidae). The neurons observed in the brain of *G. olivaceus* also match these descriptions and thus can be grouped in the same way.

Associated with the neurons, there are a variety of glial cells, which are present in the central nervous system in equal or greater numbers compared with neurons, and they may be associated with the somata or be on the surface of the neuropil, giving rise to processes that involve neurites (Chapman, 1999). Thus, they have a very great morphological variability (Carlson, 1987), possessing some cytological and arrangement features that have allowed them to be classified in invertebrates by several authors, such as subcapsular cells, neuron satellite cells and nerve-fiber satellite cells according to Trujillo-Cenòz (1962) or as plasmatic glia, fibrous glia, and perineurium and Schwann-like glia according to Radojčić and Pentreath (1979).

According to Junqueira and Carneiro (2008), visualizing glial cells requires specific staining techniques because on slides stained with hematoxylin and eosin, only their nuclei are visible. It is likely that in the material stained with hematoxylin-eosin, the elongated nuclei observed among the neurites and the small round nuclei between cortical neurons belong to glial cells. However, other non-neural elements such as connective tissue, mesenchymal cells and granulocytes can also be found in the nervous system, making it difficult to distinguish glial cells (Lane, 1981). Thus, the Golgi technique was employed to show the glial cells of *G. olivaceus*. This allowed the observation of three morphological types of glial cells similar to those described by Trujillo-Cenòz (1962), which are concerned with distinct functions according to its morphology and localization: the glial cells located next to the cell bodies of neurons are likely involved in their nutrition and protection, the ones located into the neuropil are likely to wrap the neuron branches, while those near the external envelope contribute to the formation of the external wraps.

As is the case for other arthropods, neurons in Diplopoda require an ionically constant environment for their normal activity (Chapman, 1998). Thus, the millipedes' nervous system

is kept isolated from the outside by a wrapper formed by the neural lamella and the perineurium, whose function is comparable to the vertebrate blood-nerve barrier (Lane and Abbott, 1975, Lane, 1991, Chapman, 1998 and Richter et al., 2010). The blood-nerve barriers of invertebrates differ from those of mammals because they are associated with glial cells rather than vascular elements (Maddrell and Treherne, 1967). The selectivity of such structures is mainly due to the intercellular junctions between the glial cells that make up these barriers, such as tight junctions, desmosomes and gap junctions (Maddrell and Treherne, 1967, Lane and Abbot, 1975, Treherne and Schofield, 1981 and Lane, 1991).

As is typical in Arthropoda and was reported in Diplopoda by Joly and Descamps (1987), the nervous system of *G. olivaceus* is surrounded by an acellular neural lamella. The presence of some glial cells just below this layer suggests that it is not in direct contact with the nerve elements and corresponds to the perineurium. In the synganglion of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae), Roma et al. (2012) observed a perineurium that was difficult to view under light microscope, formed of glial cells with elongated nuclei that were therefore morphologically similar to the cells that constitute the perineurium of *G. olivaceus*. An equivalent structure was observed by Baccetti and Lazzeroni (1969) in the ganglia of pseudoscorpions and scorpions; ultrastructural analysis allowed those authors to visualize a continuous layer of entire glial cells or glial cytoplasmic processes below the neural lamella. Trujillo-Cenòz (1962) stated that in Chilopoda (Myriapoda) there is not a layer of specialized glial cells under the neural lamella, which would be separated from the somata only by thin cytoplasmic processes originating from glial cells located near the cell bodies of neurons. By contrast, Sombke et al. (2011a) stated that in Chilopoda, the perineurium is a discontinuous layer formed of glial cells that would then be responsible for producing the neural lamella.

In the present work, the cells observed under the neural lamella appear to be involved in composing the perineurium between the neural lamella and cortical neurons, but their flattened morphology suggests that they are not involved in secretion of the substances that form the neural lamella. According to Joly and Descamps (1987) and Chapman (1998), the neural lamella contains mucopolysaccharides, collagen and mucoproteins; glial cells with somata located more internally could be involved in the secretion of these substances, but its extensions towards the neural lamella have not been seen under light microscopy.

Nevertheless, another layer called the outer cell layer was observed in *G. olivaceus*. Such structure was not reported in former studies on other species of Diplopoda (Heathcote, 1887, Joly and Descamps, 1987, Duy-Jacquemin and Arnold, 1991 and Strausfeld et al., 1995), but the absence of photographs in these works leaves it unclear whether such a

structure is in fact non-existent in the species or was simply not described by the authors. However, Baccetti and Lazzeroni (1969) describe the existence of an outer cell layer formed by uninucleate cells surrounded by processes of the neural lamella encompassing the entire nervous system in pseudoscorpions and scorpions. The authors also reported that cells of this tissue are rich in vesicles and polysaccharides and glycogen inclusions with the typical appearance of a storage tissue, which may also function as an additional filter, protecting the nervous system. The thoracic ganglion of the grasshopper *Melanoplus differentialis* (Acrididae) is wrapped unevenly and discontinuously by an outer layer of cells with pigment granules, located externally to the neural lamella (Lane, 1968). Meanwhile, in other insects, such as *Periplaneta americana* (Blattidae) and *Carausius morosus* (Phasmidae), a fat-body layer was reported around the brain externally to the neural lamella (Arhhurst, 1961 and Maddrell and Treherne, 1967).

Because there is no movement of hemolymph within the ganglion (Maddrell and Treherne, 1967, Lane, 1968, Radajcic and Pentreath, 1979 and Treherne and Schofield, 1981), periganglionic sheaths possess a trophic function and are involved with the nutrition of neurons. The presence of a layer of differentiated tissue with this function, as reported in scorpions, pseudoscorpions, some orders of Insecta and now in one species of Diplopoda, suggests that this would be a plesiomorphic feature in Arthropoda, as also suggested Baccetti and Lazzeroni (1969). It is possible to infer that the outer cell sheath undergoes a gradual reduction among taxa, in which it is first observed throughout the nervous system, then becomes discontinuous or restricted to a region, and eventually disappears and is functionally replaced by a layer of fat bodies in some orders of Insecta.

The data obtained in this study will certainly contribute to enriching the understanding of the biology and phylogeny of millipedes. We emphasize the need for more studies addressing the mismatch between the great diversity in Diplopoda and the lack of work on the group, as well as the need for further studies to clarify the physiological and morphological details of the structures observed in its nervous system.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (process n° 2012/24562-5) and CNPq. We thank Cristiane Mileo and Gerson Mello de Souza for technical support and Cristina Moreira de Sousa for helping with the millipedes.

5. References

- Arhhurst, D. E., 1961. A histochemical study of the connective-tissue sheath of the nervous system of *Periplaneta Americana*. *Q J Microsc Sci* 102, 455-461.
- Bacetti, B. and Lazzeroni, G., 1969. The envelopes of the nervous system of pseudoscorpions and scorpions. *Tissue Cell* 1, 417-424.
- Behmer, O. A., Tolosa, E. M. C. and Freitas-Neto, A. G., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, Ed. Da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bitsch, J. and Bitsch, C., 2010. The tritocerebrum and the clypeolabrum in mandibulate arthropods: segmental interpretations. *Acta Zool -Stockholm* 91, 249-266.
- Camargo-Mathias, M. I., Fantazzini, E. R., Fontanetti, C. S. and Calligaris, I. B., 2011. 3D Reconstruction and Scanning Electron Microscopy of salivary glands of the millipede *Rhinocricus padbergi* (Verhoeff, 1938) (Diplopoda: Spirobolida). *Micron* 42, 271-274.
- Camargo-Mathias, M. I. and Fontanetti, C. S., 2000. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). *Biocell* 24, 1-12.
- Carlson, S. D., 1987. Ultrastructure of the arthropod neuroglia and neuropil. In: Gupta, A. P. (Ed), *Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 135-157.
- Chapman, R. F., 1998. *The insects: Structure and function*. 4th edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Demange, J., 1981. *Les Mille-Pattes, Myriapodes: Généralités, Morphologie, Écologie, Éthologie, Détermination des Espèces de France*. Société Nouvelle des Éditions Boubée, Paris.
- Dove, H. and Stollewerk, A., 2003. Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development* 130, 2161-2171.
- Duy-Jacquemin, M. N. and Arnold, G., 1991. Spatial organization of the antennal lobe in *Cylindroiulus punctatus* (leach) (Myriapoda: Diplopoda). *Int J Insect Morphol* 20, 204-214.
- Fantazzini, E., Fontanetti, C.S. and Camargo-Mathias, M. I., 2002. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. *Arthropoda Sel* 11, 135-142.
- Fantazzini, E. R., Camargo-Mathias, M. I. and Fontanetti, C.S., 2004. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas* 21, 65-71.

- Fontanetti, C. S., Calligaris, I. B., Souza, T. S. and Iamonte, M., 2012. Ultrastructure of oocytes of the *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptida, Spirostreptidae) a potential urban centers plague. *Microsc Res Techniq* 75, 1486-1491.
- Fontanetti, C. S., Camargo-Mathias, M. I. and Tiritan, B. M. S., 2004. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). *Iheringia, Série Zoologia* 94, 351-355.
- Fontanetti, C. S., Souza, T. S., Calligaris, I. B. and Bozzatto, V., 2010. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. *Anim Biol* 60, 467-478.
- Freitas, V. C., Zironi, M. C. and Fontanetti, C.S., 2003. Ovarian morphology in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda, Arthropoda). *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas* 20, 153-156.
- Freitas, V. C. and Fontanetti, C.S., 2008. Ultrastructure of the mature testicular vesicle of *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 (Diplopoda, Pseudonannolenidae). *Micron* 39, 362-366.
- Golovatch, S. I., Hoffman, J. A., Marques, J., Raizer, F. H. O., Ribeiro, R. A. K., Silva, J. L. and Pinheiro, T. G., 2005. Millipedes (Diplopoda) of brazilian pantanal. *Amazoniana XVIII*, 273-288.
- Golovatch, S. I. and Kime, R. D., 2009. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. *Soil Organisms* 81, 565-597.
- Gupta, A.P., 1987. Evolutionary trends in the central and mushroom bodies of the arthropod brain, In: Gupta, A.P. (Ed) *Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 27-41.
- Harzsch, S., 2004. Phylogenetic comparison of serotonin-immunoreactive neurons in representatives of the Chilopoda, Diplopoda, and Chelicerata: Implications for arthropod relationships. *J Morphol* 259, 198-213.
- Harzsch, S., 2006. Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integr Comp Biol* 46,162-194.
- Harzsch, S., Melzer, R. R. and Müller, C. H. G., 2007. Mecanismos of eye development and evolution of the arthropod visual system: The lateral eyes of myriapoda are not modified insect ommatidia. *Org Divers Evol* 7, 20-32.
- Heathcote, F. G., 1887. The post-embryonic development of *Julus terrestris*. *P R Soc London* 43, 243-245.
- Heisenberg, M., 2003. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4, 266-276.

- Hopkin, S. P. and Read, H. J., 1992. *The Biology of Millipedes*. 1st edition.: Oxford University Press, New York.
- Joly, R. and Descamps, M., 1987. Histology and ultrastructure of the myriapod brain. In: Gupta, A. P. (Ed), *Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 135-157.
- Junqueira, L. C. U. and Junqueira, M. M. S., 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Livraria Editora Santos, São Paulo.
- Junqueira, L.C. U. and Carneiro, J., 2008. Tecido nervoso. In: Junqueira, L.C. U., Carneiro, J. (Eds), *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 153-181.
- Kenyon, F. C., 1896. The meaning and structure of the so-called “mushroom bodies” of the hexapod brain. *Amer Nat* 30, 643-650.
- Lane, N. J., 1968. The thoracic ganglia of the grasshopper *Melanoplus differentialis*: Fine structure af the perineurium and neuroglia with special reference to the intracellular distribution of phosphatases. *Z Zellforsch Mik Ana* 86, 293-312.
- Lane, N. J., 1981. Invertebrate neuroglia-junctional structure and development. *J Exp Biol* 95, 7-33.
- Lane, N. J., 1991. Morphology of glial blood-brain barriers. *Ann Ny Acad Sci* 633, 348-62.
- Lane, N. J. and Abbott, N. J., 1975. The organization of the nervous system in the crayfish *Procambarus clarkii*, with emphasis on the blood-brain interface. *Cell Tissue Res* 156, 173-187.
- Loesel, R., Nässel, D. R. and Strausfeld, N. J., 2002. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods. *Arthropod Struct Dev* 31, 77-91.
- Maddrell, S. H. P. and Treherne, J. E., 1967. The ultrastructure of the perineurium in two species, *Carausius morosus* and *Periplaneta Americana*. *J Cell Sci* 2, 119-138.
- Moreira-De-Sousa, C. and Fontanetti, C.S., 2012. Structure and function of the foregut and salivar glands of the synanthropic diplopod *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae). *Anim Biol* 62, 493-504.
- Paulus, H. F., 2000. Phylogeny of the Myriapoda – Crustacea – Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. *J Zool Syst Evol Res* 38, 189-208.
- Pearse, A. G. E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Apllied*, vol.2. 4th edition. J&A. Churchill, London.
- Pinheiro, T. G., Marques, M.I. and Fontanetti, C.S., 2013. Comparative study of the ovarian morphology in the order Polydesmida (Diplopoda) and description of unusual structures in the female reproductive system. *Braz J Biol* 73, 895-901.

- Radajcic, T. and Pentreath, V. W., 1979. Invertebrate glia. *Prog Neurobiol* 12, 115-179.
- Richter, S., Loesel, R., Purschke, G., Schmidt-Rhaesa, A., Scholtz, G., Stach, T., Vogt, L., Wanninger, A., Brenneis, G., Döring, C., Faller, S., Fritsch, M., Grobe, P., Heuer, C. M., Kaul, S., Møller, O. S., Müller, C. H. G., Rieger, V., Rothe, B. H., Stegner, M. E. J. and Harzsch, S., 2010. Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Front Zool* 7, 1-49.
- Roma, G. C., Nunes, P. H., Remédio, R. N. and Camargo-Mathias, M. I., 2012. Synganglion histology in diferente stages of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 110, 2455-2463.
- Roman, G. and Davis, R. L., 2001. Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *BioEssays* 23, 571-581.
- Schachtner, J., Schmidt, M. and Homberg, U., 2005. Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+Hexapoda). *Arthropod Struct Dev* 34, 257-299.
- Sierwald, P. and Bond, J. E., 2007. Current status of the Myriapod class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic diversity and phylogeny. *Annu Rev Entomol* 20, 401- 420.
- Silva-Zacarin, E. C. M., Chauzat, M. P.; Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Faucon, J. P., Malaspina, O. and Engler, J. A., 2012. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: Méndez-Vilas, A. (Ed), *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 696- 703.
- Sombke, A., Rosenberg, J. and Hilken, G., 2011a. Chilopoda – The nervous system. In: Minelli, A. (Ed), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda*, vol. 1. Koninklijke Brill NV, Leiden, pp. 217-234.
- Sombke, A., Harzsch, S. and Hansson, B. S., 2011b. Organization of deutocerebral neuropils and olfactory behavior in the centipede *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Myriapoda: Chilopoda). *Chem Senses* 36, 43-61.
- Sombke, A., Lipke, E., Kenning, M., Müller, C. H. G., Hansson, B. S. and Harzsch, S., 2012. Comparative analysis of the deutocerebral neuropils in Chilopoda (Myriapoda): Implications for the evolution of the arthropod olfactory system and support for the Mandibulata concept. *Neuroscience* 12, 1-17.
- Souza, R. B., 2012. Aspectos morfológicos, histoquímicos e ultra-estruturais do túbulo de Malpighi do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

- Strausfeld, N. J., Buschbeck, E. K. and Gomez R. S., 1995. The arthropod mushroom body: Its functional roles, evolutionary enigmas and mistaken identities. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Eds), *The nervous systems of invertebrates: An evolutionary and comparative approach*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 349- 382.
- Strausfeld, N. J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R. S. and Ito, K., 1998. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Memory* 5, 11-37.
- Strausfeld, N.J, Strausfeld, C. M., Loesel, R., Rowell, D. and Stowe, S., 2006. Onychophoran brain organization suggests an archaic relationship with a chelicerate stem lineage. *Proc Biol Sci* 273, 1857-1866.
- Treherne, J. E. and Schofield, P. K., 1981. Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. *J Exp Biol* 95, 61-73.
- Trujillo-Cénoz, O., 1962. Some aspects of the structural organization of the arthropod ganglia. *Z Zellforsch Mik Ana* 56, 649-682.
- Warburg, M. R. and Rosenberg, M., 1983. Cerebral neurosecretory cells in the millipede, *Archispirostreptus syriacus* de Saussure (Diplopoda, Spirostreptidae). *Acta Zool-Stockholm* 64, 107-115.

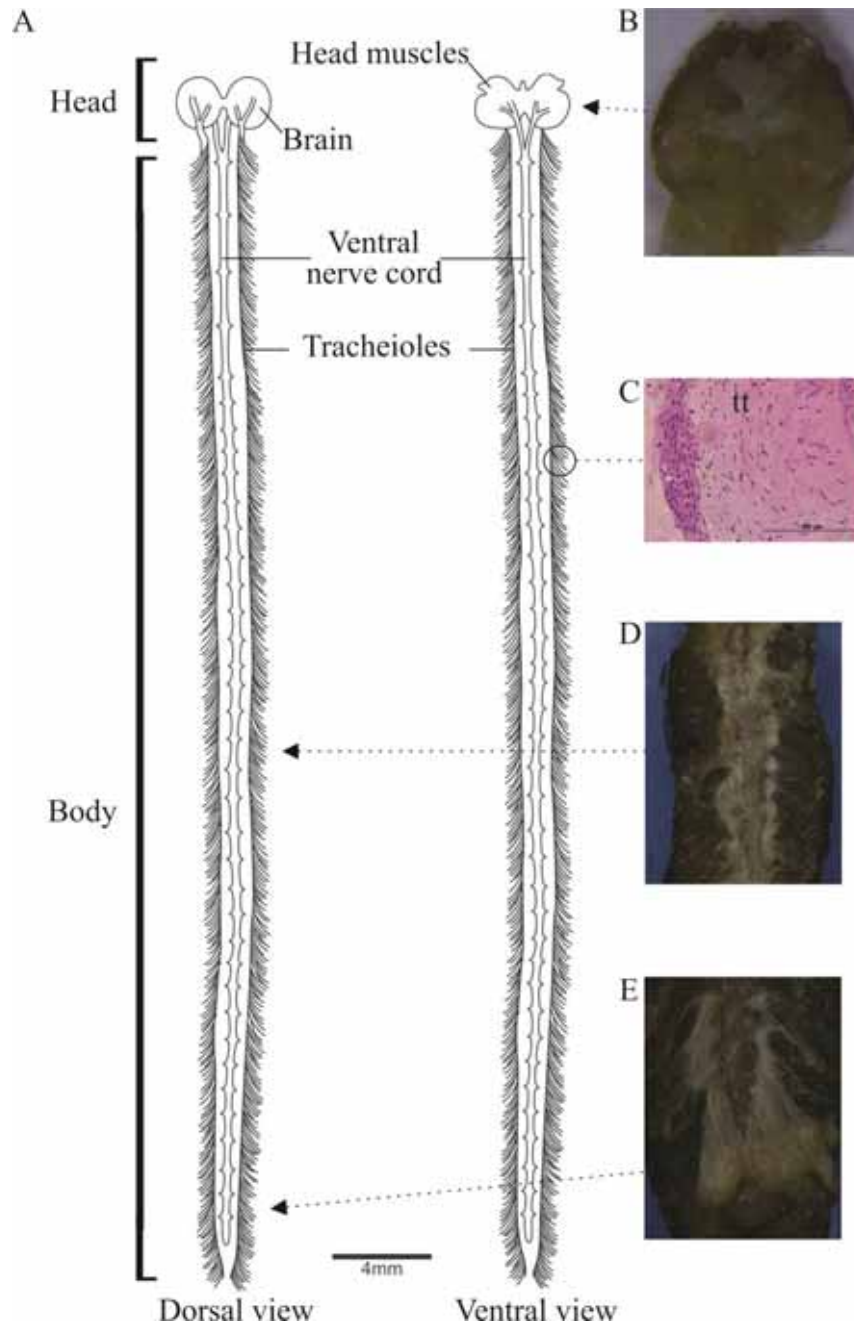


Figure 1 – A. General organization and localization of the nervous system in the millipede *G. olivaceus*; B, D and E. Photographs of the nervous system obtained by stereomicroscopic analysis; C. Micrograph of histological section stained by hematoxylin-eosin. tt = tracheal trunk

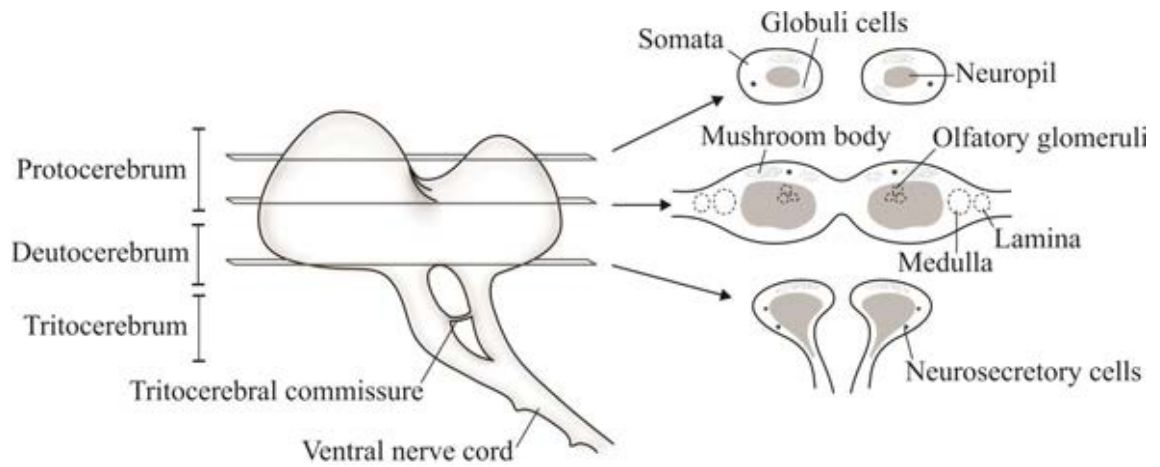


Figure 2 – Scheme of the cephalic region of the central nervous system of the millipede *G. olivaceus* with schematic sections showing different structures and their respective locations. The nerves and neurohemal organs are not shown.

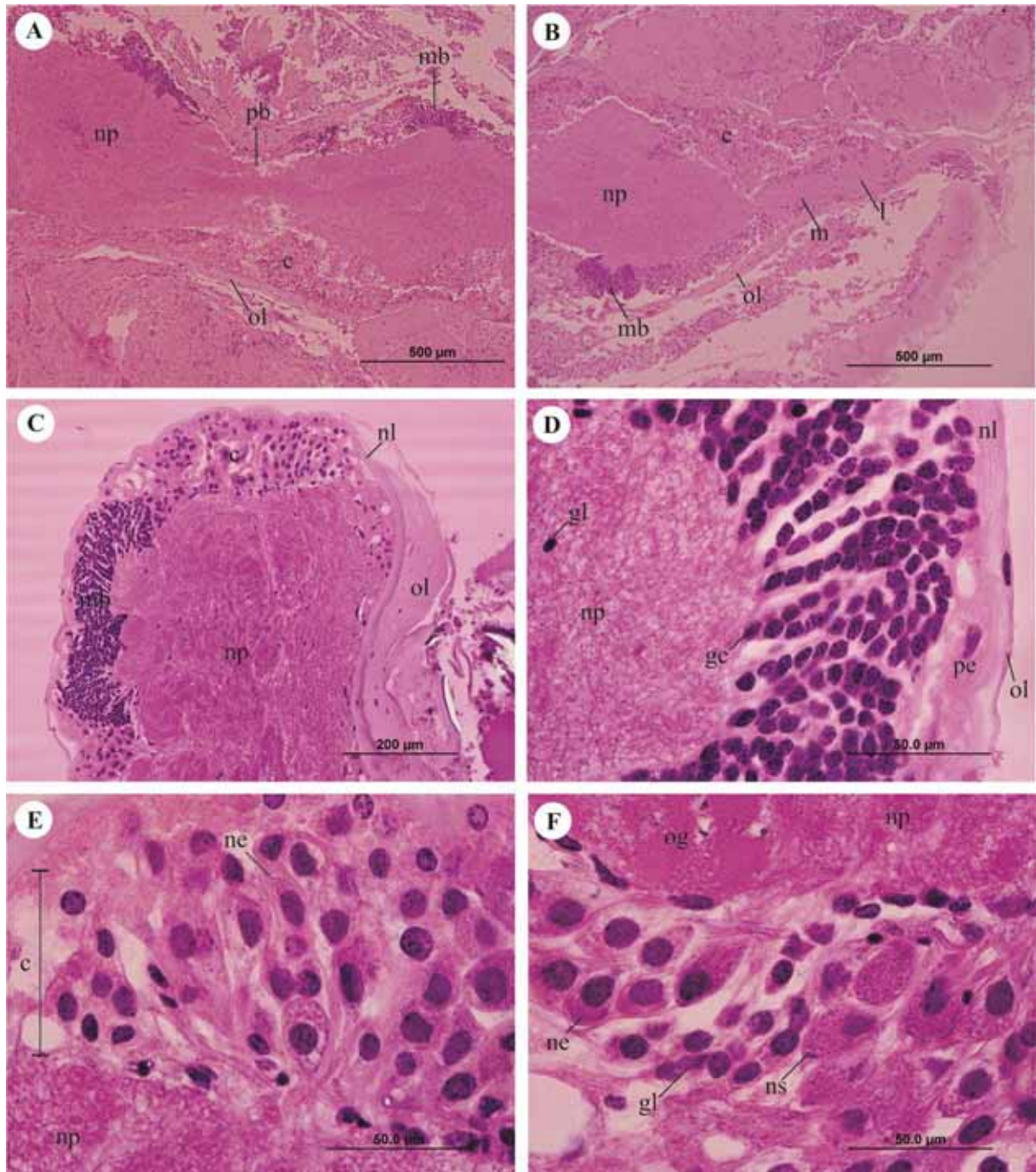


Figure 3 – Micrographs of the protocerebrum of *G. olivaceus* stained by hematoxylin-eosin.

A. Overview of the region between the two halves of the protocerebrum; **B.** Overview of the half protocerebrum; **C.** Mushroom bodies and adjacent regions; **D.** Cortical region formed by globuli cells; **E.** Cortical region formed by cells of voluminous cytoplasm; **F.** Cortical region with neurosecretory cells.

c = cortex; gc = globuli cells; gl = glial cell nucleus; l = lamina; m = medulla; mb = mushroom body; ne = neuron; nl = neural lamella; np = neuropil; ns = neurosecretory cell; ol = outer cell layer; og = olfactory glomeruli; pb = protocerebral bridge; pe = perineurium

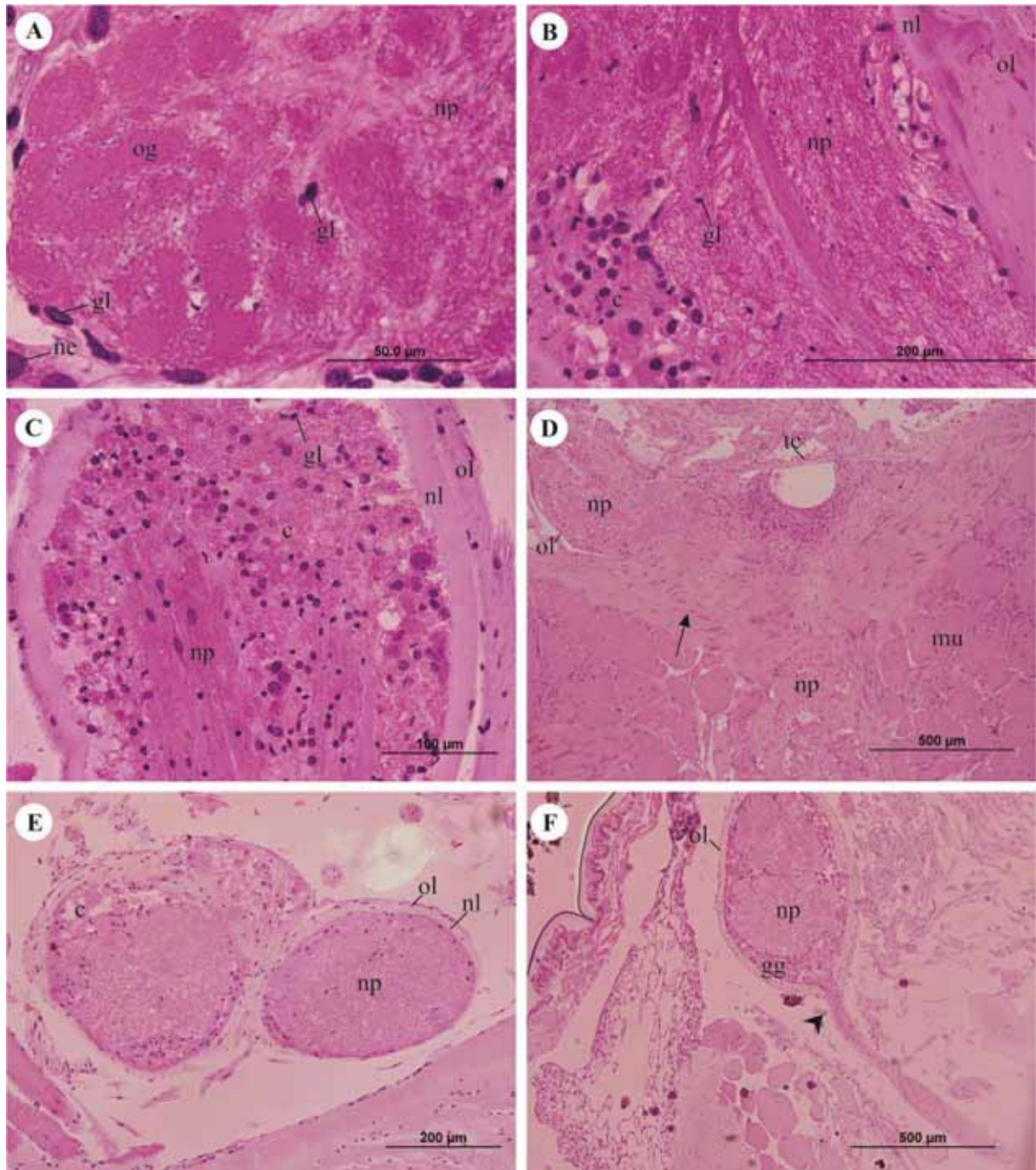


Figure 4 – Micrographs of the nervous system of *G. olivaceus* stained by hematoxylin-eosin. **A.** Neuropil formed by several adjacent glomeruli; **B.** Neuropil region of elongated shape; **C.** Deutocerebrum; **D.** Tritocerebrum; **E.** Formation of a single ventral nerve cord from the fusion of two distinct parts; **F.** Branch of the ventral nerve cord in cross-section, the first segment.

c = cortex; gl = glial cell nucleus; gg = ganglion; mu = skeletal muscle; ne = neuron; nl = neural lamella; np = neuropil; ol = outer cell layer; og = olfactory glomeruli; tc = tritocerebral commissure; arrowhead = lateral branch of the ventral nerve cord; arrow = neurite bundle that innervate the head muscles

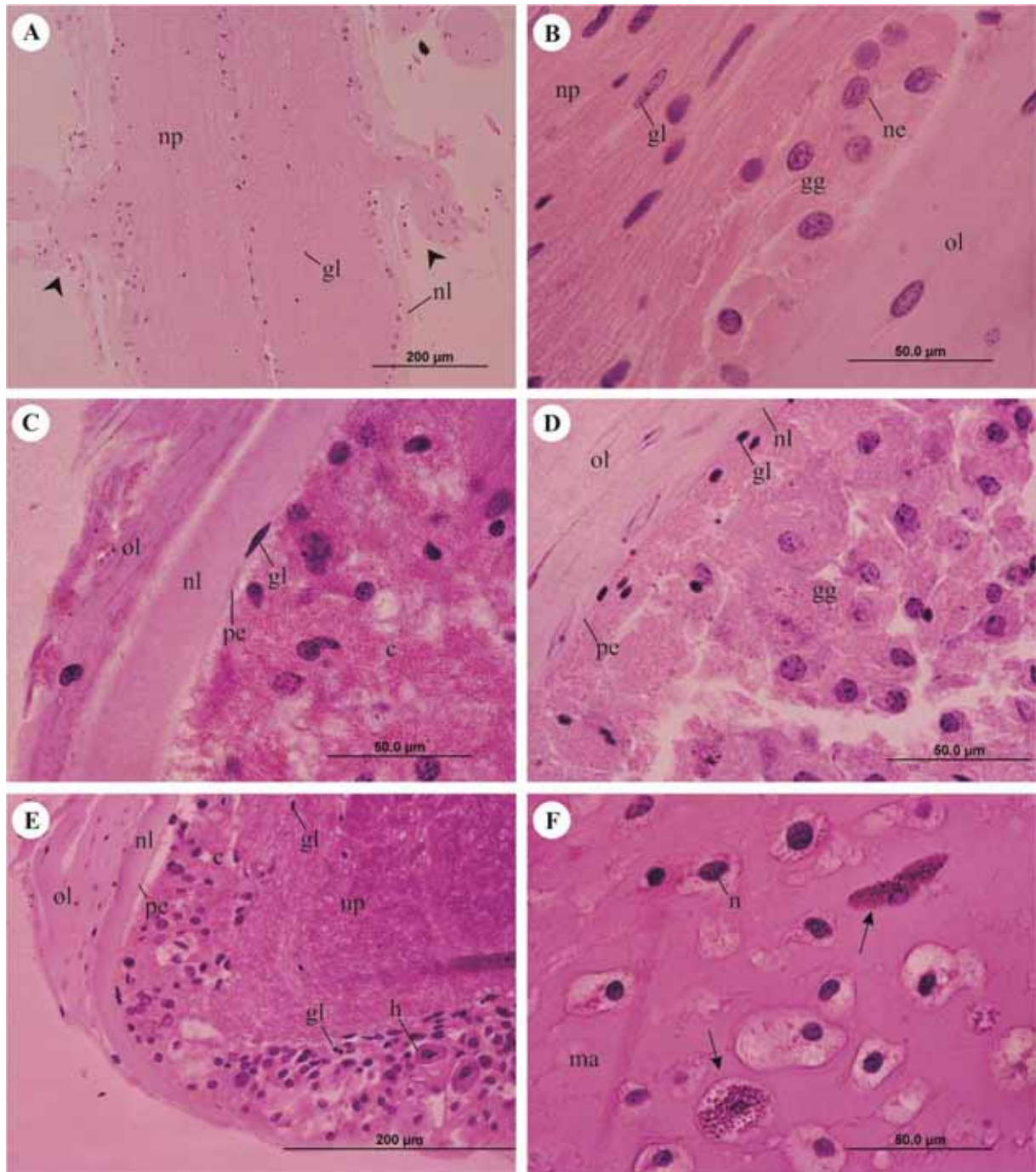


Figure 5 – Micrographs of the nervous system of *G. olivaceus* stained by hematoxylin-eosin. **A.** Longitudinal section of the ventral nerve cord branches; **B.** Ganglion of the ventral nerve cord; **C.** Outer wrap of the ventral nerve cord; **D.** Outer wrap of brain; **E.** Section of the brain showing neuropil, cortex and the outer wrap; **F.** Cells of the outer cell layer, with granular cytoplasm.

c = cortex; gg = ganglion; gl = glial cell; h = hemocyte; ma = extracellular matrix; n = nucleus; ne = neuron; nl = neural lamella; np = neuropil; ol = outer cell layer; pe = perineurium; arrowhead = lateral branch of the ventral nerve cord; arrow = cell with granular cytoplasm

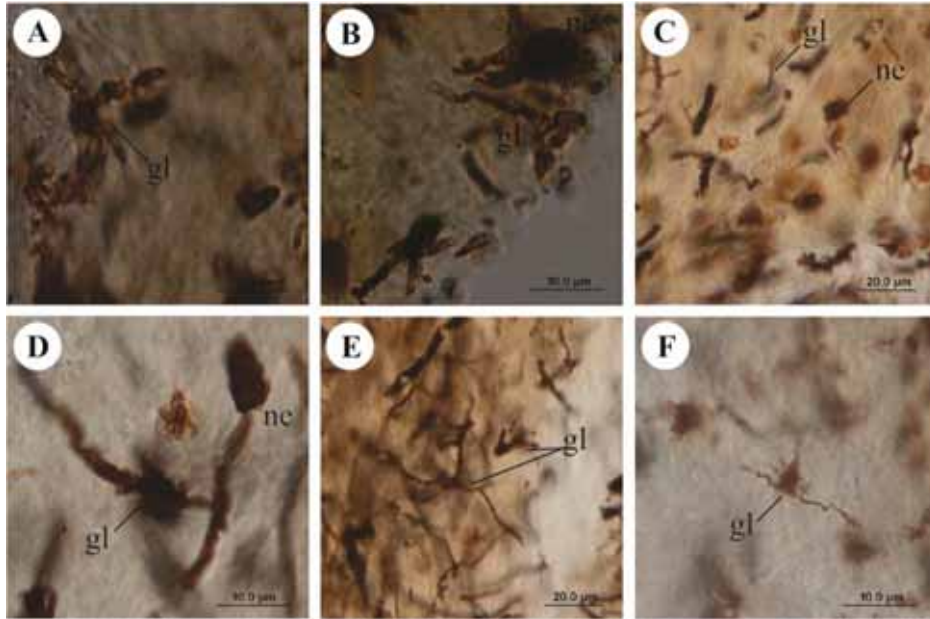


Figure 6 – Micrographs of the brain of *G. olivaceus*, stained by the Strong variant of the Golgi method, showing unipolar neurons and multiple types of glial cells.

gl = glial cell; ne = neuron

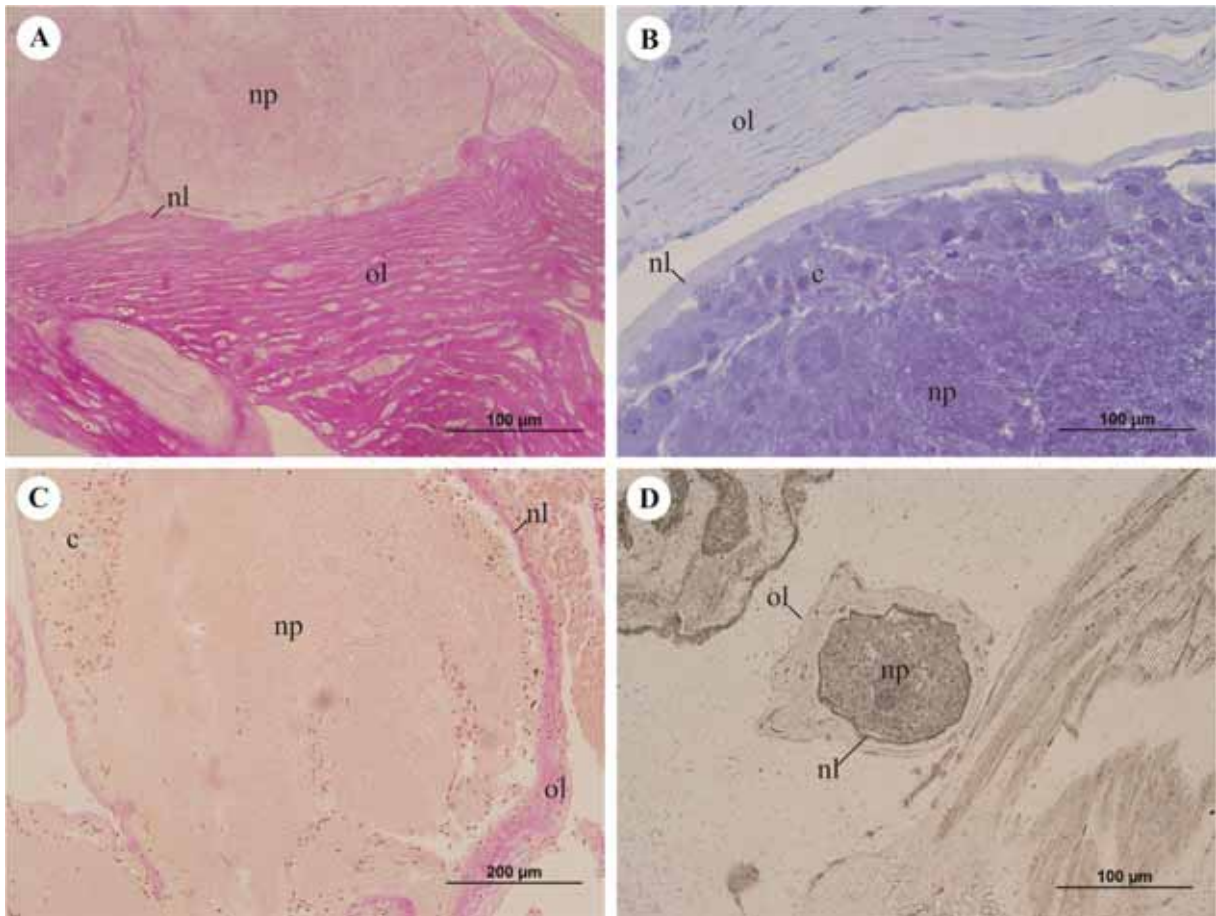


Figure 7 – Outer cell layer of the brain of *G. olivaceus* stained by P.A.S. (**A**); Bromophenol blue (**B**); Acid fuchsin (**C**); Sudan black B (**D**).

c = cortex; nl = neural lamella; np = neuropil; ol = outer cell layer

ARTIGO 3

Alterações nos níveis de sinapsina no cérebro do milípede *Gymnostreptus olivaceus* exposto a diferentes concentrações de deltametrina

Annelise Francisco, Pablo H. Nunes; Roberta F. C. Nocelli, Carmem S. Fontanetti

Resumo

Os milípedes configuram-se como organismos do solo ecologicamente importantes mas também como espécies economicamente impactantes em áreas rurais e urbanas quando ocorrem explosões populacionais, assim tais organismos configuram-se ora como alvo ora como vítima da ação de agroquímicos. Nesse sentido, uma formulação comercial do inseticida deltametrina foi aplicada na espécie *Gymnostreptus olivaceus* (Spirostreptidae), com o intuito de avaliar a efetividade da utilização popular de tal inseticida no combate a infestações de milípedes, bem como os efeitos neurotóxicos induzidos, utilizando marcação de sinapsina e microscopia confocal. Concentrações relacionadas à DL₅₀ do princípio ativo para a espécie e uma concentração de campo foram aplicadas topicamente nos indivíduos, sendo avaliada a mortalidade e os níveis de sinapsina presentes no cérebro dos indivíduos expostos ao inseticida por 12, 24 e 48 horas. O inseticida foi letal apenas nas maiores concentrações empregadas, nas quais não foi observada alteração na neurotransmissão, em contraste com a concentração de campo que não causou mortalidade, mas provocou alterações significativas nos níveis de sinapsina. Os resultados levam a questionar sobre a viabilidade do controle químico de milípedes com tal inseticida. Além disso, a marcação de sinapsina teve alterações significativas apenas na menor concentração testada; os resultados obtidos a partir de tal marcação propiciaram várias interpretações, sugerindo que o uso isolado desta ferramenta não é recomendável em estudos nos quais a avaliação dos efeitos desencadeados deve ser precisa.

Palavras-chave: Piretróide, diplópodo, microscopia confocal

1. Introdução

Os artrópodes terrestres da classe Diplopoda, da qual fazem parte os milípedes, possuem em sua maioria modo de vida estratobionte, caracterizando-se assim como habitantes das camadas superiores de solo e do *litter* (HOPKIN; READ, 1992; GOLOVATCH; KIME, 2009). Majoritariamente saprófagos, se alimentam de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo (HOPKIN; READ, 1992).

Ecologicamente, os milípedes ocupam o nível trófico de decompositores, uma vez que atuam na ciclagem e disposição de nutrientes presentes na matéria orgânica em decomposição, humificando o solo com suas fezes ricas em amônia, carbono, nitratos e fósforo (SCHUBART, 1942; PETERSEN; LUXTON, 1982; HOPKIN; READ, 1992). Além disso, aeram o solo ativamente e misturam o húmus com a parte mineral do solo, promovendo melhora física do mesmo (ROMELL, 1935; FONTANETTI, 1989). Apesar de seu potencial benéfico para a fertilidade do solo, desequilíbrios ambientais e alterações climáticas podem desencadear explosões populacionais, transformando-os em pragas agrícolas e urbanas. Em áreas rurais de várias partes do mundo, espécies de milípedes são consideradas pragas, uma vez que atacam plantações, danificando plântulas recém-germinadas, raízes e frutos (LORDELLO, 1954; WINDER et al., 1993; WIGHTMAN; WIGHTMAN, 1994; EBREGT et al., 2004a; 2004b).

Migrações e explosões populacionais de milípedes em áreas urbanas foram relatadas em várias partes do mundo (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1949; NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 2002, FONTANETTI et al., 2010). Embora tais organismos não representem prejuízo econômico no ambiente urbano, sua presença é motivo de grande transtorno devido a sua aparência considerada repulsiva e a possibilidade de reações decorrentes do contato com as secreções defensivas produzidas por suas glândulas repugnatórias (ARAB et al., 2003; RUPPERT et al., 2005), embora tais secreções não sejam fatais, mesmo em crianças (GIRARDIN; STEVESON, 2002). Nesse cenário, há elevada procura de meios rápidos e efetivos no combate de tais organismos. O inseticida deltametrina tem sido popularmente empregado com esta finalidade, embora não haja qualquer indicação dos fabricantes contra milípedes. A deltametrina é um piretróide sintético do tipo II (CHEN et al., 2007), classe de toxicidade caracterizada por determinar efeitos que se originam no sistema nervoso central dos organismos (LARINI, 1999).

Atualmente, grande variedade de formulações comerciais para controle de pragas urbanas, agrícolas e ectoparasitos de animais tem a deltametrina como princípio ativo. A deltametrina é indicada para o controle de elevada variedade de artrópodes, com alta eficiência no controle da broca do milho *Ostrinia nubilali* (Lepidoptera) (BAZÖC et al., 2009) e no controle de anofelíneos e outros mosquitos, com eficácia imediata de 90% quando aplicado em redes contra insetos residenciais e de 70% após 5 meses (JAWARA et al., 2001). Toxicologicamente, a deltametrina é classificada na classe III, sendo considerada de elevado coeficiente de segurança e baixa toxicidade para mamíferos (ANVISA, 2003; SAVOY, 2011).

O presente trabalho buscou avaliar a efetividade da utilização da deltametrina no controle de diplópodos em condições experimentais, bem como avaliar os possíveis efeitos desse composto sobre a quantidade de sinapsina, uma proteína cerebral associada às vesículas sinápticas envolvidas na regulação de curto prazo da liberação de neurotransmissores (CHI et al., 2003), no cérebro de milípedes, como uma forma de inferir efeitos neurotóxicos em tais organismos.

2. Material e métodos

Indivíduos da espécie *Gymnostreptus olivaceus* (Spirostreptidae) foram coletados nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil (22°24'36" S e 47°33'36" W Gr.), no período de março de 2013 a fevereiro de 2014 e foram mantidos em terrário contendo terra, folhas e lascas de madeira, umedecidos periodicamente, a temperatura de 21° C.

Para a montagem dos bioensaios, foram utilizados potes plásticos com capacidade de 530 mL, forrados com papel filtro umedecido e disponibilidade de batata como alimento *ad libitum*. A cada pote previamente preparado, foi adicionado um indivíduo adulto da espécie com peso entre 1,5 e 3,5 g ao qual aplicou-se topicamente 35 µL de solução feita a partir de diluições em água de uma formulação comercial de deltametrina tipo concentrado emulsional, a qual contém 25 g/l de deltametrina e 886 g/l de ingredientes inertes. A aplicação foi realizada na superfície dorsal dos animais com o auxílio de uma micropipeta para dosagem precisa da substância testada. Um total de 120 animais, 24 por grupo experimental, alocados em potes individuais foram mantidos a 21°C e no escuro durante todo o bioensaio.

As soluções foram preparadas nas concentrações correspondentes a um quinto da DL₅₀ estabelecida por Boccardo et al. (2001), que equivale a 30,8µg.g⁻¹ de princípio ativo (C₁); a própria DL₅₀, cujo valor é 154 µg.g⁻¹(C₂); e uma concentração correspondente a duas vezes a DL₅₀ estabelecida para a deltametrina na espécie, correspondendo a 308 µg.g⁻¹ de princípio

ativo (C_3). Além destas, também foi utilizada uma concentração de campo (C_f) preparada com base nas recomendações do fabricante para combate de infestações de outros artrópodes como *Ceratitis capitata* (mosca da fruta) e *Agotis ipsilon* (lagarta rosca), resultando em uma aplicação de 0,17 μg de princípio ativo por grama de massa do animal, o que equivale a 0,11% da DL_{50} supracitada. O grupo controle (C_0) recebeu aplicação tópica de 35 μL de água. Foram coletados indivíduos após 12, 24 e 48 horas de exposição, para a avaliação dos efeitos de tal composto, sendo que, para cada concentração e tempo analisados, foram coletadas três réplicas.

Os indivíduos foram anestesiados por congelamento e decapitados; as cabeças foram fixadas inteiras em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio por 72 horas, sendo transferidas para o tampão PBS (tampão fosfato, pH 7.4) após esse período. Cada cabeça foi rapidamente congelada a -15°C e foram removidos aproximadamente 250 μm a partir do fronte, utilizando-se um criostato Leica CM1860, de forma a expor a parte do cérebro a ser analisada. Após tal preparo, o material foi descongelado em temperatura ambiente e armazenado em PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4, 0,1 M).

A marcação da sinapsina foi realizada em bloco, em tubos de microteste nos quais o material foi permeabilizado com solução contendo triton-x100 0.3% e BSA 5% (albumina de soro bovino) por 1 hora, lavado duas vezes em PBS e incubado por 4 dias a 4°C no anticorpo monoclonal contra a proteína associada à vesícula sináptica de *Drosophila* sinapsina 1 (1:50; SYNORF1) diluído em PBS com 0,2% de Triton X100 e 5% de NGS (soro normal de cabra). O anticorpo SYNORF1 foi obtido do *Developmental Studies Hybridoma Bank*, desenvolvido sob o patrocínio do *Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) e mantido pela Universidade de Iowa, Departamento de Biologia, Iowa, IA 52242.

Posteriormente, o material foi incubado no anticorpo secundário Alexa Fluor 546 cabra anti-rato (1:250 em PBS com 1% de NGS) por 1 hora em temperatura ambiente, de acordo com os procedimentos descritos por Hoyer et al. (2005). Tais preparações também foram marcadas para f-actina com solução de Alexa Fluor 488 Faloidina por 40 minutos, e incubação em solução contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 10 minutos para visualização dos núcleos. Por fim, o material foi montado em lâmina com superfície tratada para uso em microscopia de alta resolução e invertida, utilizando meio de montagem ProLong® Gold reagent.

O material foi escaneado em alta resolução através de uma profundidade de 10 μm em intervalos de 0,17 μm (40x, zoom digital 2x) em microscópio confocal Leica CTS ST52 com

excitação feita por laser de argônio e filtro HFT em comprimentos de onda de acordo com os fluoróforos utilizados. As imagens foram processadas e quantificadas utilizando-se o software Leica Application Suite AF 2.6.0.

Para quantificação da sinapsina, foram efetuadas três medições não coincidentes, de áreas de 1008330 pixels, na região selecionada, em cada metade cerebral, de forma a obter um valor médio por indivíduo. Para cada concentração de inseticida e tempo de exposição foram analisados três indivíduos, os quais consistiam em réplicas verdadeiras. Os dados assim obtidos foram organizados em grupos formados pela intersecção das variáveis independentes tempo e concentração e estatisticamente avaliados por meio do *software* SPSS Statistics (v.22 IBM SPSS, Chicago, IL), sendo submetidos inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de homogeneidade de Levene. Com a validação do pressuposto na normalidade ($p > 0.1$ em todos os grupos), mas não da homocedasticidade, os dados foram avaliados por meio de ANOVA unidirecional com teste robusto de igualdade de médias F de Brown-Forsythe, seguida do teste *Post-hoc* Games-Howell, apropriados para variâncias iguais não presumidas, de acordo com os procedimentos descritos em Marôco (2014). Considerou-se um nível de significância (α) de 0,05.

3. Resultados

3.1 Bioensaio com *G. olivaceus* e deltametrina

Os indivíduos utilizados no bioensaio possuíam uma massa corpórea média $2,51 \pm 0,48$, não havendo diferença na média das massas entre os grupos ($F_{4,115} = 0,581$, $P = 0,677$). Durante o bioensaio, os indivíduos do grupo controle foram observados enrolados sob o alimento ou sob o papel filtro, sendo ainda constatado o consumo de alimento em todas as réplicas. Não houve morte no grupo controle.

Um comportamento semelhante foi observado no grupo exposto à concentração de campo (C_f), exceto pela liberação de secreção defensiva e eversão dos gonopódios em um indivíduo e maior agitação dos indivíduos em relação aos do grupo controle nas primeiras 24 horas. Não foram observadas mortes em indivíduos expostos a C_f , mesmo cinco dias após a exposição.

Nas demais concentrações testadas, todos os indivíduos liberaram secreção defensiva na primeira hora de experimento. Logo após o contato com o inseticida, todos os indivíduos dos grupos C_2 e C_3 apresentaram movimentos corporais oscilatórios. Após 12 horas do início do experimento, 75% dos indivíduos do grupo C_1 apresentavam movimentação oscilatória e lenta da cabeça e não se enrolavam; tais indivíduos permaneceram esticados sobre o papel

filtro e algumas vezes encontravam-se torcidos, expondo a parte ventral do corpo, movimentando lentamente as pernas (Figura 1A). Nas concentrações maiores e após 24 horas, tal comportamento também foi observado, mas 80% dos indivíduos encontravam-se enrolados, reagindo sutilmente quando estimulados por um palito. Após 48 horas, foi observada exteriorização dos gonopódios em 60% dos machos coletados na C₁ e em 25% dos machos coletados na C₂, enquanto o tegumento se tornou quebradiço em todos os indivíduos da C₂ e C₃, sendo observadas rupturas por onde vazava hemolinfa em três indivíduos da C₂ (Figura 1B). O inseticida foi capaz de causar mortalidade em diplópodos apenas nas maiores concentrações aplicadas, sendo que a concentração C₃ induziu o maior número de mortes no período avaliado (Figura 2).

3.2 Sinapsina

Em cortes transversais medianos do protocérebro de *G. olivaceus*, foi observada a marcação de sinapsina na região cortical, conforme mostra a figura 3. Dentre as diferentes regiões de somata marcadas, a região ântero-proximal foi selecionada para análise tendo em vista que está associada à região neuropilar dos glomérulos olfatórios (Figura 3A). Ainda foi possível observar que tal marcação encontrava-se na somata dos neurônios, apresentando uma granulosidade característica (Figura 3B).

A partir da marcação e quantificação da sinapsina em tal região, o F de Brown-Forsythe mostrou haver diferença significativa na concentração média de sinapsina entre os grupos ($F_{14, 13,095}=3,034$, $p=0,026$). O teste de Games-Howell mostrou que houve diferença significativa em relação ao grupo controle somente em C_f e C₁, as menores concentrações de inseticida testadas (Figuras 3C-D, Figura 4, Tabela 1).

4. Discussão

No presente estudo, foi observado que a deltametrina teve ação evidente sobre o sistema nervoso do milípede nas concentrações C₁, C₂ e C₃, uma vez que provocou alterações comportamentais drásticas e distúrbios de movimento. Nessas concentrações o inseticida também teve efeito sobre o tegumento do animal. Embora a mortalidade nas primeiras 48 horas não tenha sido muito pronunciada, pode-se considerar que a moribundidade foi elevada, pois em condições naturais tais animais estariam totalmente vulneráveis à predação e à infecções.

A partir dos dados obtidos com o bioensaio, poderia-se concluir que as concentrações correspondentes a DL₅₀ e a um quinto dela, seriam as mínimas recomendadas caso se

desejasse fazer o controle químico de diplópodos utilizando o inseticida deltametrina. No entanto, tais concentrações são muito superiores às recomendadas pelos fabricantes das formulações comerciais e da concentração de campo adotada no presente estudo, a qual não provocou mortalidade ou moribundidade em diplópodos mesmo após 5 dias.

Desse modo, pode-se afirmar que embora o controle químico de milípedes por meio da deltametrina seja uma prática popular, esta não é recomendável, uma vez que somente uma concentração muito elevada do composto foi necessária para causar mortalidade (o dobro da DL_{50} determinada para *G. olivaceus*). Tal concentração elevada pode atingir organismos não alvos como, por exemplo, as abelhas. Decourtye et al. (2004) verificaram que uma concentração de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ por ingestão de xarope contaminado com deltametrina teve efeito letal em operárias de *Apis mellifera*. Tal contaminação do xarope induziu ainda a diminuição na atividade de forrageamento na fonte de alimento e na atividade na entrada da colméia. É importante salientar que tal concentração é inferior àquela que seria disponibilizada no ambiente pela aplicação de um quinto da DL_{50} de *G. olivaceus*.

Além disso, deve-se ressaltar que embora a deltametrina seja considerada segura para mamíferos, estudos com ratos mostraram que a mesma é capaz de causar efeitos nocivos como diminuição na densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos no córtex cerebral de animais expostos a ela durante o desenvolvimento (ERIKSSON; FREDRIKSSON, 1991) e degeneração cerebral e apoptose em animais adultos expostos (WU; LIU, 2000a; 2000b; CHEN et al., 2007). Tais resultados sugerem cautela no uso deste químico.

Quando os cérebros dos milípedes expostos a deltametrina foram avaliados por meio da marcação de sinapsina, obteve-se alterações significativas nos níveis de sinapsina somente na concentração de campo e na concentração correspondente a um quinto da DL_{50} após 12 horas da exposição.

Os canais de sódio voltagem-dependentes são apontados como os principais alvos da ação de inseticidas do tipo piretróide em invertebrados (SCHARF, 2003; ZHOU et al., 2011; McCAVERA; SODERLUND, 2012), embora existam vários alvos secundários da ação da deltametrina (SODERLUND et al., 2002). Estudos em abelhas *A. mellifera* constataram um aumento da atividade da acetilcolinesterase em indivíduos expostos a doses relacionadas a DL_{50} da deltametrina para a espécie (BADIOU et al., 2008; BADIOU; BELZUNCES, 2008). Nesse âmbito, o presente trabalho propôs avaliar a os possíveis efeitos da deltametrina sobre a sinapsina em milípedes, como uma forma de inferir efeitos neurotóxicos nos mesmos.

As sinapsinas são uma família de fosfoproteínas específicas de neurônios evolucionariamente conservadas em vertebrados e invertebrados (HUTTNER et al., 1983;

BENFENATI, 2011); em invertebrados tais proteínas são codificadas por apenas um gene que origina cinco isoformas distintas por *splicing* alternativo (HUMEAU et al., 2011; DIEGELMANN et al., 2013).

As sinapsinas localizam-se nos terminais pré-sinápticos dos neurônios, onde se encontram associadas de forma reversível às vesículas sinápticas quando o neurônio está em repouso, mantendo-as ancoradas ao citoesqueleto de actina e longe da membrana plasmática, formando o conjunto reserva de vesículas sinápticas (HIFIKER et al., 1999; GROH et al., 2014). Quando ocorre a excitação do neurônio, uma cascata de eventos desencadeia a fosforilação das sinapsinas, alteração que diminui sua afinidade com as vesículas sinápticas e com a actina, resultando na liberação das vesículas sinápticas para exocitose enquanto as sinapsinas fosforiladas ficam dispersas no citoplasma (HUTTNER et al., 1983; CHI et al., 2003; LEITINGER et al., 2004; BENFENATTI, 2011; DIEGELMANN et al., 2013).

Anticorpos anti-sinapsina marcam os botões centrais de complexos sinápticos individuais (GROH et al., 2014). Na maioria dos invertebrados, a imunomarcação de sinapsina evidencia a presença de tal proteína nas regiões de neurópila, onde ocorre o contato sináptico dos neurônios (OTT, 2008; SOMBKE et al., 2011). Em *G. olivaceus*, por sua vez, a marcação de sinapsina foi observada em regiões corticais, nos corpos celulares dos neurônios. Tal característica é sugestiva de que nessas regiões haja contato sináptico axossomático ou axodendrítico.

Funcionalmente, as sinapsinas são responsáveis pela manutenção de um conjunto reserva de vesículas sinápticas que não tem disponibilidade de liberação imediata e pela manutenção do equilíbrio dinâmico entre o conjunto reserva, o conjunto prontamente liberável e o conjunto de vesículas participantes do ciclo exo-endocítico (DIEGELMANN et al., 2013). Dessa forma, a sinapsina estabelece o tamanho do conjunto reserva de vesículas sinápticas e conseqüentemente determina a disponibilidade de vesículas para exocitose para os ciclos subsequentes (HIFIKER et al., 1999).

Apesar disso, a presença de sinapsinas não é essencial para que a transmissão sináptica ocorra, embora sejam proteínas importantes para o ajuste fino da formação de sinapses, plasticidade e remodelação (BENFENATI, 2011; HUMEAU et al., 2011). Adicionalmente, sinapsinas estão envolvidas na regulação da liberação de neurotransmissores (HIFIKER et al., 1999) e podem ser necessárias para a realização de funções associativas adequadas (DIEGELMANN et al., 2013).

Os níveis de sinapsina observados após a exposição dos indivíduos da espécie *G. olivaceus* à deltametrina indicam um aumento na quantidade de sinapsina na menor

concentração usada, que se manteve nos três tempos analisados. Tal observação pode originar duas hipóteses. Pode-se supor que a concentração de campo provocou um aumento da quantidade de vesículas do conjunto reserva de vesículas sinápticas, não havendo interrupção da função da sinapsina mas ao contrário, um estímulo à função desta. Fisiologicamente, a ação da sinapsina ancorando as vesículas sinápticas ao citoesqueleto garante que os neurotransmissores presentes nelas sejam liberados nos ciclos subsequentes de excitação, de forma que grande quantidade de sinapsina ancorando vesículas sinápticas significa que abundância de vesículas disponíveis, o que resultaria em maior atividade sináptica. Alternativamente, pode-se supor que o aumento da quantidade de sinapsina significa que houve um deslocamento no equilíbrio dinâmico entre os diferentes conjuntos de vesículas, resultando no menor número de vesículas disponíveis para a liberação e, portanto, menor atividade sináptica.

O efeito da deltametrina sobre a sinapsina pode ser resultado da inibição das ATPases dependentes de cálcio, efeito descrito previamente tanto para deltametrina, quanto para outros piretróides do tipo II (ORCHARD, 1980; CLARK; MATSUMURA, 1982). A inibição da ATPase leva a um aumento dos níveis intracelulares de cálcio; o cálcio por sua vez é requerido na fosforilação da sinapsina, condição necessária para que as vesículas sinápticas do conjunto de reserva sejam mobilizadas e entrem no ciclo exocítico. Tal mecanismo corrobora com o aumento da liberação de neurotransmissores causada pela deltametrina (ORCHARD, 1980; CLARK; MATSUMURA, 1982; SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; SODERLUND et al., 2002) e pode ser relacionado a maior agitação dos diplópodos da C_f, onde também foi observada maior marcação de sinapsina. Sendo assim, pode-se inferir que inicialmente a deltametrina provocou aumento da síntese da proteína sinapsina e aumento dos níveis intracelulares de cálcio, causando fosforilação da sinapsina e propiciando liberação elevada de neurotransmissores, com conseqüente agitação dos indivíduos.

Tal efeito se manteve até 12 horas na C₁, a segunda menor concentração aplicada, que corresponde a um quinto da DL₅₀ da espécie; após esse período observa-se o retorno da sinapsina à níveis comparáveis aos mensurados no grupo controle. Nesse caso, após a sinapsina ser fosforilada pela alta quantidade de cálcio, que está relacionada a elevada concentração de deltametrina, as sinapsinas encontravam-se fosforiladas e dispersas no citoplasma; pode ter ocorrido também interrupção funcional da sinapsina e diminuição de sua síntese, fazendo com que a quantidade de sinapsina detectável diminua. Espera-se que uma ruptura da função da sinapsina aumente a liberação de neurotransmissores, pelo aumento do número de vesículas disponíveis para liberação. Contudo, se essas vesículas soltas não são

mantidas no lugar, mas em vez disso se difundem para longe do conjunto de vesículas e se dissipam no citoplasma, pode ocorrer uma inibição da liberação de neurotransmissores (HIFIKER et al., 1999). Em larvas de *Drosophila* mutantes sem sinapsina, as vesículas sinápticas encontram-se distribuídas por áreas maiores do citoplasma e não fazem parte do conjunto reserva de vesículas (DIEGELMANN et al., 2013).

Nas maiores concentrações, os níveis de sinapsina detectados também foram similares àqueles encontrados nos controles. Deve-se ressaltar que tais concentrações, embora pouco letais para diplópodos, são extremamente elevadas, de forma que a ausência de mudança nos níveis de sinapsina pode ser explicada por outras alterações fisiológicas induzidas pelo inseticida, que podem ter contrabalanceado o estímulo à síntese de sinapsina. A falta de ATP, por exemplo, pode diminuir a quantidade de sinapsina livre (HUTTNER et al., 1983).

Diante de tais observações, é possível afirmar que a deltametrina induziu alterações fisiológicas mensuráveis no cérebro de milípedes, o que abre caminho para que diplópodos possam ser empregadas para avaliar a neurotoxicidade de contaminantes, uma vez que tais organismos estão disponíveis em quase todos os ambientes terrestres e apresentam alterações em decorrência do contato com substâncias neurotóxicas (FONTANETTI et al., 2012). A sinapsina, por sua vez, mostrou alterações apenas para baixas concentrações de inseticida e propiciou grande variedade de interpretações dos resultados. Dessa forma, a sinapsina não é precisa quanto aos efeitos desencadeados, não sendo viável seu uso isolado. Ressalta-se que os níveis de sinapsina não foram avaliados em exposições crônicas ao inseticida, sendo as observações aqui realizadas válidas apenas para exposições agudas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2012/24562-5) pelo apoio financeiro, a Thaisa Roat por disponibilizar o criostato e à Marcelo Francisco, Cristina Moreira de Souza, Diego Simões, Ana Claudia de Castro Marcato, Cleiton Souza e Raphael Baston de Souza pela ajuda no experimento.

5. Referências

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 35, de 22 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ano CXL, n. 99, 26 maio 2003. Seção I, p.59. ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SANTOS, M. G.; CABRERA, A. C. Composition of the defensive secretion of the

- Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, v.18, n. 2, p. 79-82, 2003.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – A biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p. 246-253, 2008.
- BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 406-409, 2008.
- BAZÖC, R.; BARÈLÆ, J. I.; KOS, T.; ÈULJAK, T. G.; ŠILOVIÆ, M.; JELOVÈAN, S.; KOZINA, A. Monitoring and efficacy of selected insecticides for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hubn., Lepidoptera: Crambidae) control. **Journal of Pesticide Science**, v. 82, p.311-319, 2009.
- BENFENATI, F. Synapsins – Molecular function, development and disease. **Seminars in Cell& Developmental Biology**, v.22, p. 377, 2011.
- BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N.; PENTEADO; C. H. S. Toxicity of deltamethrin pyrethroid on neotropical millipedes, *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. **Journal of Advanced Zoology**, v. 22, n.1, p. 1-4, 2001.
- BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C.H.S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.20-223, 2002.
- CHEN, D.; HUANG, X.; LIU, L.; SHI, N. Deltamethrin induces mitochondrial membrane permeability and altered expression of cytochrome C in rat brain. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, p. 368-372, 2007.
- CHI, P.; GREENGARD, P.; RYAN, T. A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. **Neuron**, v. 38, p. 69-78, 2003.
- CLARK, J. M.; MATSUMURA, F. Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca- and Ca+ Mg- ATPase activity in the squid, *Loligo pealei*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 18, p. 180-190, 1982.
- CLOUDSLAEY-THOMPSON, J. L. Significance of migration in myriapods. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 2, p.947-62, 1949.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELÈGUE, M. Effects of imadacloprid and deltamethrin on associative learning in

- honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p. 410-419, 2004.
- DIEGELMANN, S.; KLAGGES, B.; MICHELS, B.; SCHLEYER, M.; GERBER, B. Maggot learning and synapsin function. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p.939-951, 2013.
- EBREGT, E.; STRUIK, P. C.; ABIDIN, P. E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. **Wageningen Journal of Life Sciences**, vol. 52, n. 1, p. 47–68, 2004a.
- EBREGT, E.; STRUIK, P. C.; ABIDIN, P. E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda II. Pest incidence and indigenous control strategies. **Wageningen Journal of Life Sciences**, vol. 54, n.1, p.70-84, 2004b.
- ERIKSSON, P.; FREDRIKSSON, A. Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 108, p.78-85, 1991.
- FONTANETTI, C. S. Moulting behaviour in Chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 1053-1055, 1989.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S.A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fonatnetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p. 165-166, 2010.
- FONTANETTI, C. S.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; MARCATO, A. C. C.; MOREIRA-DE-SOUSA, C. Electron microscopy and the responses of terrestrial invertebrates against contaminants of soil In: A. MÉNDEZ-VILAS (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Sciences and Technology**. Badajoz: Formatex. Vol. 1, p.335-342, 2012.
- GIRARDIN, B. W.; STEVESONS. Millipedes – Health consequences. **Journal of Emergency Nursing**, v.28, n.2, p.107-110. 2002
- GOLOVATCH, S. I.; KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. **Soil Organisms**, vol. 81, n.3, p. 565-597, 2009.
- GROH, C.; KELBER, C.; GRÜBEL, K.; RÖSSLER, W. Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 1-9, 2014.

- HIFIKER, S.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A. J.; KAO, H.; AUGUSTINE, G. J.; GREENGARD, P. Synapsin as regulators of neurotransmitter release. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 354, p.269-279, 1999.
- HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1992.
- HOYER, S. C.; LIEBIG, J.; RÖSSLER, W. Biogenic amines in the ponerine ant *Harpegnathos saltator* serotonin and dopamine immunoreactivity in the brain. **Arthropod Structure & Development**, v. 34, p. 429-440, 2005.
- HUMEAU, Y.; CANDIANI, S.; GHIRARDI, M.; POULAIN, B.; MONTAROLO, P. Functional roles of synapsins: Lessons from invertebrates. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, p. 425-433, 2011.
- HUTTNER, W. B.; SCHIEBLER, W.; GREENGARD, P.; DE CAMILLI, P. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. **The Journal of Cell Biology**, v. 96, p.1374-1388, 1983.
- JAWARA, M.; PINDER, M.; CHAM, B.; WALRAVEN, G.; ROWLEY, J. Comparison of deltamethrin tablet formulation with liquid deltamethrin and permethrin for bednet treatment in The Gambia. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n.4, p.309-316, 2001.
- LARINI, L. Inseticidas Organossintéticos. In:____. **Toxicologia dos praguicidas**. 1 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. Cap. 3, p.19-91, 1999.
- LEITINGER G.; PABST, M. A.; RIND, F. C.; SIMMONS, P. J. Differential expression of synapsin in visual neurons of the locust *Schistocerca gregaria*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.480, p. 89-100, 2004.
- LORDELLO, L. G. E. Observações sobre alguns diplópodos de interesse agrícola. **Anais da E. S. A. “Luiz de Queiroz”** p. 69-79, 1954
- MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. 6 ed. Pêro Pinheiro: Gráfica Manuel Barbosa & Filhos, 2014.
- McCAVERA, S. J.; SODERLUND, D. M. Differential state-dependent modification of inactivation-deficient Nav1.6 sodium channels by the pyrethroid insecticides S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin. **NeuroToxicology**, v. 33.p. 384-390, 2012.
- NIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda: Xystodesmidae). **Japanese Journal of Ecology**, v.38, p. 257-268, 1988.

- ORCHARD, I. The effects of pyrethroids on the electrical activity of neurosecretory cells from the brain on *Rhodnius prolixus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 13, p. 220-226, 1980.
- OTT, S. R. Confocal microscopy in large insect brains: Zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, p.220-230, 2008.
- PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. **Oikos**, v. 39, n.3, p. 291–357, 1982.
- ROMELL, L. G. An example of myriapods as mull formers. **Ecology**, v.16, n.1, p. 67-71, 1935.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Myriapoda.In:____. **Zoologia dos invertebrados** – Uma abordagem funcional-evolutiva. 4ªed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2005. Cap. 20, p. 819-842.
- SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, 2011.
- SCHARF, M. E. Neurological Effects of Insecticides. In: PIMENTEL, D. **Encyclopedia of Pest Management**.1ed. Boca Raton: CRC Press. V. 2, p. 395-399, 2003.
- SCHUBART, O. Os Myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mecanismos of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.
- SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 77-96, 1989.
- SOMBKE, A.; HARZSCH, S.; HANSSON, B. S. Organization of deutocerebral neuropils and olfactory behavior in the centipede *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Myriapoda: Chilopoda). **Chemical Senses**, v. 36, p. 43-61, 2011.
- WIGHTMAN, J. A.; WIGHTMAN, A. S. An insect and sociological survey of groundnut fields in southern Africa. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, vol.51, p. 311-331, 1994.
- WINDER, G. H.; DEWAR, A. M.; DUNNING, R. A. Comparisons of granular pesticides for the control of soil-inhabiting arthropod pests of sugar beet. **Crop Protection**, vol.12, p. 148-154, 1993.

WU, A.; LIU, Y. Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. **Neuroscience Letters**, vol. 279, n.2, p.85-88, 2000a.

WU, A.; LIU, Y. Deltamethrin induces delayed apoptosis and altered expression of p53 and bax in rat brain. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 183-189, 2000b.

ZHOU, T.; ZHOU, W.; WANG, Q.; DAI, P.; LIU, F.; ZHANG, Y. SUN, J. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 35-40, 2011.

Tabela 1 – Concentração média de sinapsina para as diferentes concentrações de deltametrina e tempos de exposição, com análise estatística. As concentrações são apresentadas como média \pm desvio padrão

		Tempo de exposição		
		12hs	24hs	48hs
Concentração média de sinapsina	C ₀	19,92 \pm 1,74	20,36 \pm 3,13	20,40 \pm 1,19
	C _f	36,28 \pm 4,37	33,21 \pm 4,25	33,80 \pm 3,67
	C ₁	33,54 \pm 5,63	28,05 \pm 8,67	18,75 \pm 2,46
	C ₂	23,38 \pm 4,20	18,06 \pm 0,79	23,43 \pm 1,81
	C ₃	22,82 \pm 3,48	18,10 \pm 0,89	19,26 \pm 0,62
Teste <i>post-hoc</i> (Games-Howell)	C _f vs. C ₀	0,000*	0,000*	0,000*
	C ₁ vs. C ₀	0,001*	0,656	1,000
	C ₂ vs. C ₀	0,876	0,966	0,727
	C ₃ vs. C ₀	0,822	0,938	1,000

*estatisticamente significativo a 0,05.



Figura 1 – Indivíduos expostos à deltametrina. **A.** Indivíduo exposto a C_1 por 12 horas, torcendo-se de modo a expor a parte ventral do corpo. **B.** Indivíduo exposto a C_2 por 48 horas, seta= ruptura no tegumento

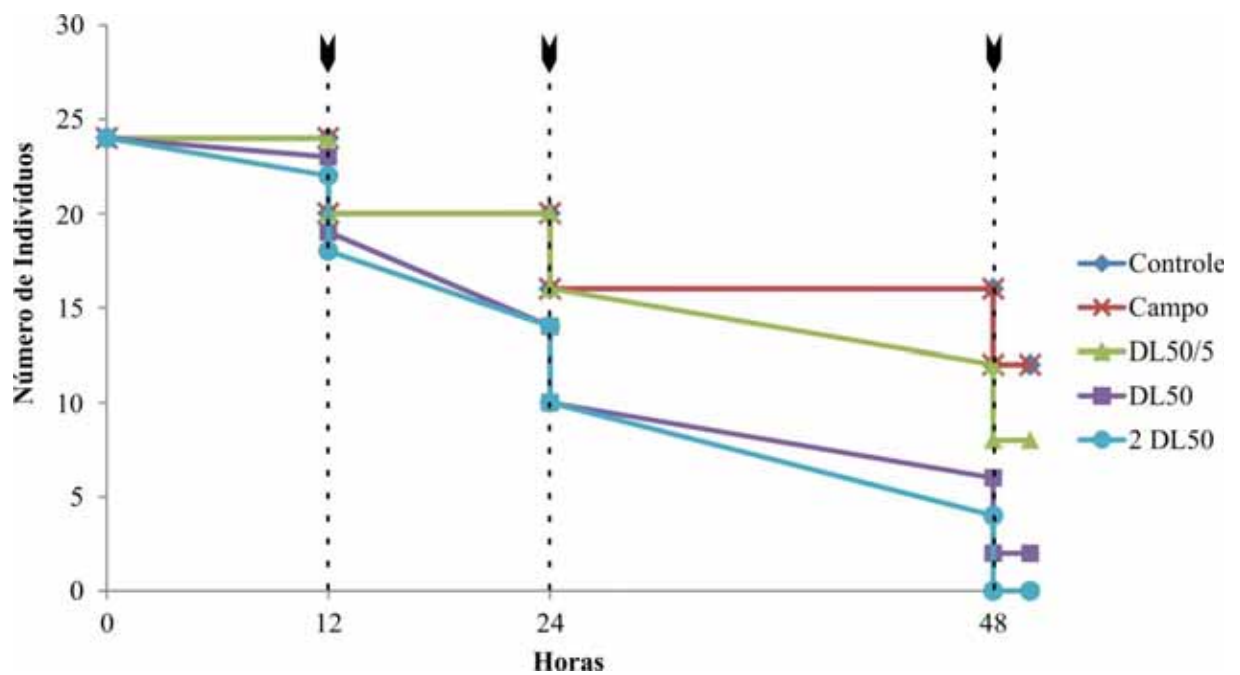


Figura 2 – Número de indivíduos nos grupos submetidos a diferentes concentrações de deltametrina, ao longo do bioensaio. As linhas pontilhadas indicam os momentos em que foi feita a coleta de animais para análise.

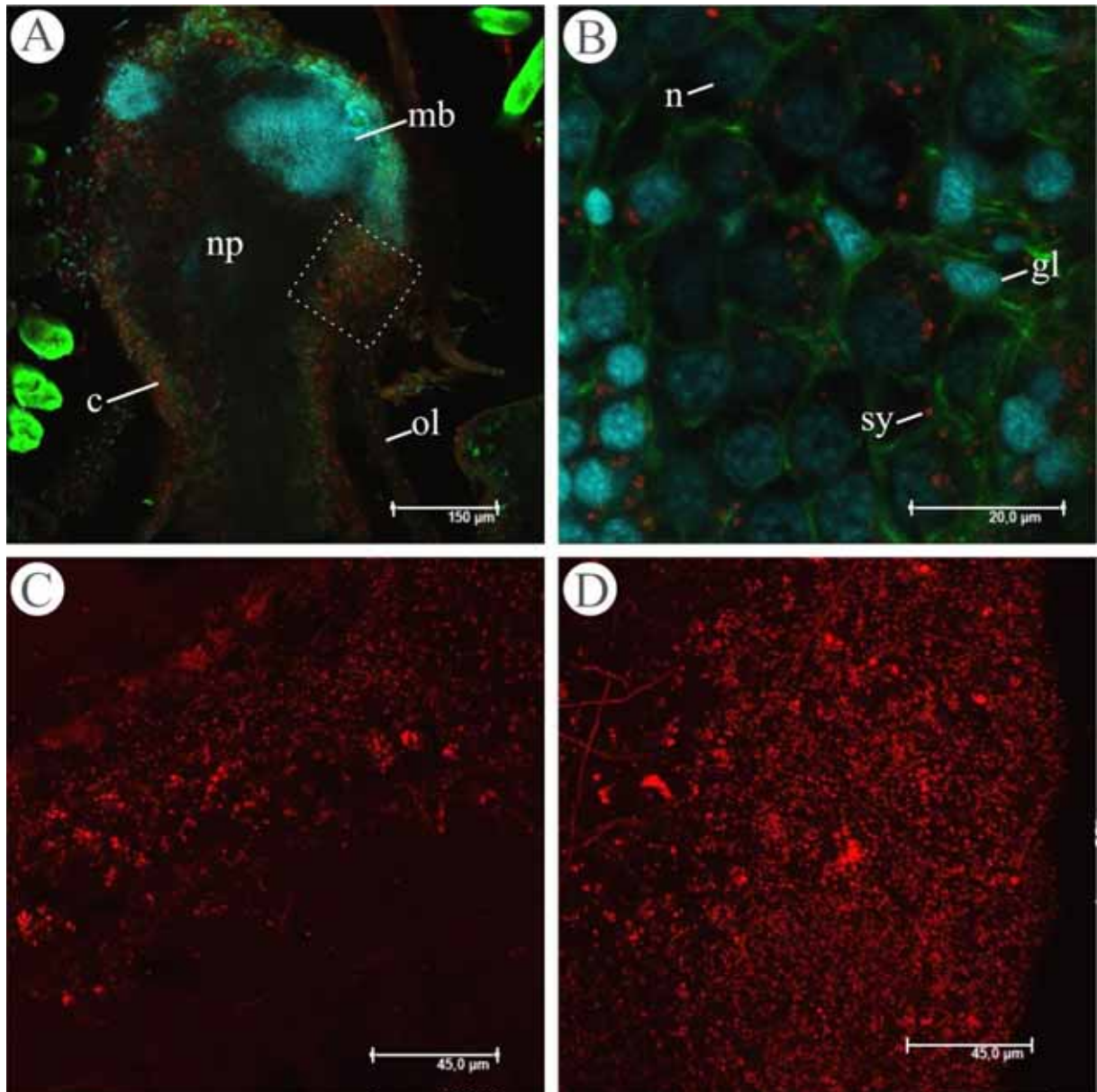


Figura 3 – Imagens de microscopia confocal marcadas com sinapsina em vermelho, faloidina (actina) em verde e núcleos em ciano. A. Corte óptico transversal de um dos lados do protocérebro, a área circundada indica a região escolhida para análise. B. Marcação de sinapsina nas células do córtex no cérebro de *G. olivaceus*. C. Marcação de sinapsina no grupo controle. D. Marcação de sinapsina na concentração de campo.

c = córtex; gl = núcleo de célula glial; mb = *mushroom body*; n = núcleo; np = neurópila; ol = envoltório externo; sy = imunomarcção de sinapsina

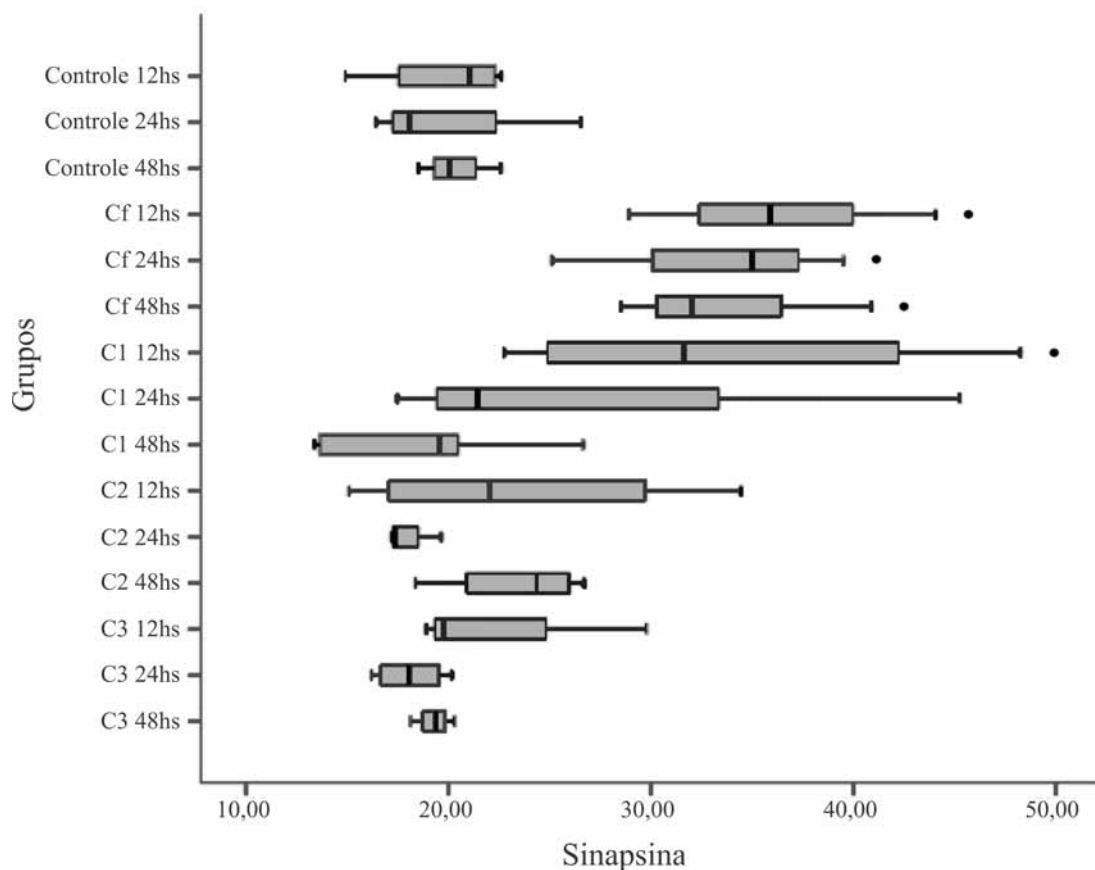


Figura 4 – Box plot mostrando a amplitude das médias com desvios padrões das concentrações de sinapsina medidas nos diferentes grupos. Os pontos indicam as comparações *post hoc* significativas calculadas usando teste Games-Howell ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Diante das análises realizadas no sistema nervoso do diplópodo *G. olivaceus*, pode-se concluir que:

- O sistema nervoso dos diplópodos é constituído por um cérebro e um cordão nervoso ventral, ambos constituídos de uma estrutura básica que compreende uma neurópila central e uma camada cortical, envolvidas pelo perineuro, lamela neural e mais externamente por uma membrana celular externa.

- A membrana celular externa é semelhante à observada anteriormente em outros grupos de artrópodes e foi descrita pela primeira vez em Diplopoda no presente trabalho.

- No sistema nervoso dos diplópodos é possível distinguir três tipos morfológica e funcionalmente distintos de neurônios e três tipos morfológica e funcionalmente distintos de células da glia, semelhante ao que foi relatado em outros grupos de artrópodes.

- Somente uma concentração elevada de deltametrina, de $308 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, provocou mortalidade expressiva na população de *G. olivaceus*. Os dados de mortalidade apontam para a inviabilidade do uso de tal inseticida para o controle de diplópodos dessa espécie, conforme tem sido feito pela população em geral.

- Ao contrário do esperado, a sinapsina encontra-se distribuída pelas regiões corticais do cérebro de *G. olivaceus*, no corpo celular dos neurônios, indicando que nessa espécie há grande quantidade de contato sináptico axo-somático.

- Foram observadas alterações significativas na quantidade de sinapsina apenas nos grupos expostos às menores concentrações de deltametrina. Tal alteração ainda foi sugestiva de um aumento da liberação de vesículas sinápticas desencadeado por alterações no influxo de cálcio, classicamente descritas dentre os mecanismos de toxicidade da deltametrina.

- A sinapsina propicia uma grande variedade de interpretações dos resultados obtidos, de forma que não é recomendável o uso desta isoladamente em estudos nos quais é necessário ter precisão dos efeitos desencadeados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Desenvolvimento de organismos multicelulares. In:____. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 22, p.1305-1416, 2010.
- ANDREI, E. **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. 7ed. São Paulo: Editora Andrei. 1141pp., 2005.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 35, de 22 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ano CXL, n. 99, 26 maio 2003. Seção I, p.59.
- ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SANTOS, M. G.; CABRERA, A. C. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, v.18, n. 2, p. 79-82, 2003.
- ARRHURST, D. E. A histochemical study of the connective-tissue sheath of the nervous system of *Periplaneta Americana*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.102, p.455-461, 1961.
- AUBELE, E.; KLEMM, N. Origin, destination and mapping of tritocerebral neurons of locust. **Cell and Tissue Research**, v.179, p 178-219, 1977.
- BACCETTI, B.; LAZZERONI, G. The envelopes of the nervous system of pseudoscorpions and scorpions. **Tissue and Cell**, v.1, n.3, p. 417-424, 1969.
- BACCI, A.; VERDERIO, C.; PRAVETTONI, E.; MATTEOLI M. The role of glial cells in synaptic function. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 354, n. 1381, p. 403-409, 1999.
- BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 406-409, 2008.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – A biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p. 246-253, 2008.
- BARNES, J. M.; VERSCHOYLE, R. D. Toxicity of new pyrethroid insecticide. **Nature**, v. 248, p.711, 1974.

- BASHAASHA, B.; MWANGA, R. O. M.; OCITTI P'OBWOYA, C.; EWELL, P. T. **Sweetpotato in the farming and food systems of Uganda: A farm survey report.** Uganda: National Agricultural Research Organization, 1995.
- BAZŮC, R.; BARÈLÆ, J. I.; KOS, T.; ÈULJAK, T. G.; ŠILOVIÆ, M.; JELOVÈAN, S.; KOZINA, A. Monitoring and efficacy of selected insecticides for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hubn., Lepidoptera: Crambidae) control. **Journal of Pesticide Science**, v. 82, p.311-319, 2009.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo: EDART, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1976.
- BENFENATI, F. Synapsins – Molecular function, development and disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, p. 377, 2011.
- BERMUDEZ, I.; HAWKINS, C.A.; TAYLOR, A. M.; BEADLE, D.J. Actions of insecticides on the insect GABA receptor complex. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 11, n.1-4, p.221-232, 1991.
- BICKER, G.; MENZEL, R. Chemical codes for the control of behavior in arthropods. **Nature**, v.337, n. 6202, p. 33-39, 1989.
- BITSCH, J.; BITSCH, C. The tritocerebrum and the clypeolabrum in mandibulate arthropods: segmental interpretations. **Acta Zoologica** (Stockholm), v. 91, p.249-266, 2010.
- BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia- SP. In: **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**, 1998, Recife, PE. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia - Resumos, p. 36-36, 1998.
- BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N. Toxicidade do carbamato methiocard para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.
- BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N.; PENTEADO, C. H. S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Effects of deltamethrin pyrethroid on the respiratory metabolism of the neotropical spirostreptid millipedes *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, vol.17, n.2, p. 25-28, 2004.
- BOCCARDO, L.; FERNANDES, M. N.; PENTEADO; C. H. S. Toxicity of deltamethrin pyrethroid on neotropical millipedes, *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. **Journal of Advanced Zoology**, v. 22, n.1, p. 1-4, 2001.

- BOCCARDO, L.; JUCÁ-CHAGAS, R.; PENTEADO, C.H.S. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.20-223, 2002.
- BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. P.; HARTFELDER, K. The stomogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. **Journal of Morphology**, v. 236, p. 139-149, 1998.
- BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2005.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias autorizadas: Bendiocarbe**. 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/469e838047458afe948ed43fbc4c6735/b19.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 13 de fevereiro de 2014.
- BROWN, A. W. A. Effects of insecticides on soil macroarthropods. In: Brown A. W. A. (Ed.) **Ecology of pesticides**. New York: John Wiley & Sons, 1978, p. 63-92.
- BUCHER, D.; GOAILLARD, J. M. Beyond faithful conduction: Short-term dynamics, neuromodulation and long-term regulation of spike propagation in the axon. **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 307-346, 2011.
- CALL, D. J.; BROOKE, L. T.; KENT, R. J.; KNUTH, M. L.; POIRIER, S. H.; HUOT, J. M.; LIMA, A. R. Bromacil and diuron herbicides: toxicity, uptake and elimination in freshwater fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.16, p. 607-613, 1987.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B. 3D Reconstruction and Scanning Electron Microscopy of salivary glands of the millipede *Rhinocricus padbergi* (Verhoeff, 1938) (Diplopoda: Spirobolida). **Micron** (Oxford. 1993), v. 42, p. 271-274, 2011.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell, Argentina**, v. 24, n.1, p. 1-12, 2000.
- CARLISLE, D. B.; KNOWLES, F. G. W. Neurohaemal organs in crustaceans. **Nature**, v.172, n.4374, p.405-406, 1953.
- CARLSON, S. D. Ultrastructure of the arthropod neuroglia and neuropil. In: GUPTA, A. P. (ed). **Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions**. New York: John Wiley & Sons. Cap.7, p. 135-157, 1987.

- CASTILHOS, R. V.; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; ZOTTI, M. J.; SIQUEIRA, P. R. B. Seletividade de agrotóxicos utilizados em pomares de pêssego a adultos do predador *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1. p. 73-80, 2011.
- CHAPMAN, R.F. **The insects: Structure and function**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 769pp., 1998.
- CHEN, D.; HUANG, X.; LIU, L.; SHI, N. Deltamethrin induces mitochondrial membrane permeability and altered expression of cytochrome C in rat brain. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, p. 368-372, 2007.
- CHI, P.; GREENGARD, P.; RYAN, T. A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. **Neuron**, v. 38, p. 69-78, 2003.
- CLARCK, J. M.; MATSUMURA, F. Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca- and Ca+Mg- ATPase activity in the squid, *Loligo pealei*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 18, p. 180-190, 1982.
- CLAXTON, N.S.; FELLERS, T.J.; AND DAVIDSON, M.W. **Laser scanning confocal microscopy**. Olympus, 2006. Disponível em: <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>. Acessado em 25 de julho de 2012.
- CLOUDSLAEY-THOMPSON, J. L. Significance of migration in myriapods. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 2, p.947-62, 1949.
- CRUZ-LANDIM, C. Sistema nervoso e órgãos dos sentidos. In:____. **Abelhas – Morfologia e função se sistemas**. 1 ed. São Paulo: Editora UNESP. Cap 15, p.339-358, 2009.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELÈGUE, M. Effects of imadacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p. 410-419, 2004.
- DEMANGE, J. **Les Mille-Pattes, Myriapodes: Généralités, Morphologie, Écologie, Éthologie, Détermination des Espèces de France**. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée, 284pp, 1981.
- DESAIAH, D.; CUTKOMP, L. K.; VEA, E. V.; KOCH, R. B. The effect of three pyrethroids on ATPases of insects and fish. **General Pharmacology**, v.6, p.31-34, 1975.
- DESCAMPS, M.; LASSALLE, B. Influence of putative neurotransmitters on brain electrical activity in *Lithobius forficatus* L.(Myriapoda, Chilopoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76C, n.2, p.237-240, 1983.

- DIEGELMANN, S.; KLAGGES, B.; MICHELS, B.; SCHLEYER, M.; GERBER, B. Maggot learning and synapsin function. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p.939-951, 2013.
- DOĞAN, S. The in vitro effects of some pesticides on carbonic anhydrase activity of *Oncorhynchus mykiss* and *Cyprinus carpio carpio* fish. **Journal of Hazardous Materials A132**, p. 171-175, 2006.
- DOUGLAS, R. J.; MARTIN, K. A. C. What's black and white about the grey matter? **Neuroinformatics**, v.9, p. 167-179, 2011.
- DOVE, H.; STOLLEWERK, A. Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. **Development**, v. 130, p.2161-2171, 2003.
- DUY-JACQUEMIN, M. N.; ARNOLD, G. Spatial organization of the antennal lobe in *Cylindroiulus punctatus* (leach) (Myriapoda: Diplopoda). **Internacional Journal of Morphology and Embryology**, v.20, n. 4/5, p. 204-214, 1991.
- EBREGT, E.; STRUIK, P. C.; ABIDIN, P. E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. **Wageningen Journal of Life Sciences**, vol. 52, n. 1, p. 47-68, 2004a.
- EBREGT, E.; STRUIK, P. C.; ABIDIN, P. E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda II. Pest incidence and indigenous control strategies. **Wageningen Journal of Life Sciences**, vol. 54, n.1, p.70-84, 2004b.
- ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAN, P. H.; PULMAN, D. A. Synthetic insecticide with a new order of activity. **Nature**, v. 248, p.710, 1974.
- ELLIOTT, M.; JANES, N. F. Syntetic Pyrethroids – A new class of insecticide. **Chemical Society Reviews**, v. 4, p.473-505, 1978.
- EPA (United States Environmental Protection Agency). **Prevention, pesticides and toxic substances: Bendiocarb**. EPA 738-F-99-010, 1999a.
- EPA. **Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Science Information**. Management Branch Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, US EPA, 1999b.
- EPA. Methiocarb. **Reregistration Eligibility Decision Facts**. p.1-8, 1994.
- EPA. **Pesticides: Regulating pesticides**, 2013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/regulating/restricted.htm#restricted>>. Acessado em 24 abr. 2013.

ERIKSSON, P.; FREDRIKSSON, A. Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 108, p.78-85, 1991.

ESCABIN: loção. Responsável técnico: Carlos Takashi Maki. Barueri: Indústria e Comércio Zambon Bernardi Ltda, 2011. 1 bula de remédio.

EUROPEAN COMMISSION. EU **Pesticide database**, 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection>.

Acessado em 24 abr. 2013.

EVERS, J. F.; SCHMITT, S.; SIBILA, M.; DUCH, C. Progress in functional neuroanatomy: precise automatic geometric reconstruction of neuronal morphology from confocal image stacks. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, p. 2331-2342, 2005.

FAHRBACH, S. E. What Arthropod Brains Say about Arthropod Phylogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3723-3724, 2004.

FANTAZZINI, E. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, Campinas-SP, v. 21, n.2, p. 65-71, 2004.

FANTAZZINI, E.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n.2, p. 135-142, 2002.

FAWCETT, R. S.; SLIFE, F. W. Effects of 2,4-D and dalapon on weed seed production and dormancy. **Weed Science**, vol.26, n.6, p. 534-547, 1978.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol.88, n.3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 72, p. 1680–1686, 2009.

FITZPATRICK, T.; EINSEN, A.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.; AUSTEN, K. F. **Dermatology in general medicine**. 4ed. New York: Mcgraw-Hill,v.2. 1993.

FONTANETTI, C. S. Moulting behaviour in Chelodesmid species (Diplopoda, Polydesmida). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 1053-1055, 1989.

- FONTANETTI, C. S.; SOUZA, T. S.; CALLIGARIS, I. B.; BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. **Animal Biology**, v. 60, p. 467-478, 2010c.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p. 165-166, 2010a.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. **Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades**, 2007. Disponível em: <<http://www.baraoemfoco.com.br/barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>>. Acessado em 6 de junho de 2013.
- FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TIRITAN, B. M. S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). **Iheringia**, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 94, n. 4, p. 351-355, 2004.
- FONTANETTI, C. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, T. S.; PEDRO-ESCHER, J. Microscopy as a tool in toxicological evaluations. In: MÉNDEZ-VILAS, A; DÍAS, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010b. v. 3, p 1001- 1007.
- FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIEIRO, G. T. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In: PASCUCCI, S. (ed.) **Soil contamination**. Rijeka: InTech Europe, 2011. Volume único, cap.8 , p. 143-168
- FONTANETTI, C. S.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; MARCATO, A. C. C.; MOREIRA-DE-SOUSA, C. Electron microscopy and the responses of terrestrial invertebrates against contaminants of soil In: A. MÉNDEZ-VILAS (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Sciences and Technology**. Badajoz: Formatex. Vol. 1, p.335-342, 2012b.
- FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. ; IAMONTE, M. . Ultrastructure of oocytes of the *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptida, Spirostreptidae) a potential urban centers plague. **Microscopy Research and Technique** (Print), v. 75, p. 1486-1491, 2012a.
- FÖSTER, B.; GARCIA, M.; FRANCIMARI, O.; RÖMBKE, J. Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazonia, Brazil). **European Journal of Soil Biology**, vol. 42, p. S171-S179, 2006.

- FOX, C. J. S. The effects of five herbicides on the numbers of certain invertebrate animals in grassland soil. **Canadian Journal of Plant Science**, vol.44, p.405-409, 1964.
- FREITAS, V. C.; ZIRONDI, M. C.; FONTANETTI, C.S. Ovarian morphology in two species of *Pseudonannolene* (Diplopoda, Arthropoda). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v. 20, n.2, p. 153-156, 2003.
- FREITAS, V. C.; FONTANETTI, C.S. . Ultrastructure of the mature testicular vesicle of *Pseudonannolene tocaiensis* Fontanetti, 1996 (Diplopoda, Pseudonannolenidae). **Micron** (Oxford. 1993), v. 39, p. 362-366, 2008.
- FRENCH, K.; BUCKLEY, S. The effects of the herbicide metsulfon-methyl on litter invertebrate communities in a coastal dune invaded by *Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*. **Weed Research**, vol.48, p. 266-272, 2008.
- GABE, M. Emplacement et connexions des cellules neurosécrétices chez quelques Diplopedes. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**. Série D, Sciences naturelles, v. 239, p.828-830, 1954.
- GABE, M. Sur l'emplacement et les connexions des cellules neurosécrétices dans les ganglions cérébroïdes de quelques Chilopodes. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**. Série D, Sciences naturelles, v. 235, p.1430-1432, 1952.
- GALIZIA, C. G.; MCILWRATH, S. L.; MENZEL R. A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. **Cell and Tissue Research**, v. 295, p. 383-394, 1999.
- GILBERT, S. F. *Developmental Biology*. 9 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010.
- GIRARDIN, B. W.; STEVESONS. Millipedes – Health consequences. **Journal of Emergency Nursing**, v.28, n.2, p.107-110. 2002
- GODOY, J. A. P.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 389-398, 2010.
- GOLOVATCH, S. I.; HOFFMAN, J. A.; MARQUES, J.; RAIZER, F. H. O.; RIBEIRO, R. A. K.; SILVA, J. L.; PINHEIRO, T. G. Millipedes (Diplopoda) of brazilian pantanal. **Amazoniana**, v. XVIII, p. 273-288, 2005.
- GOLOVATCH, S. I.; KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. **Soil Organisms**, vol. 81, n.3, p. 565-597, 2009.

- GROH, C.; KELBER, C.; GRÜBEL, K.; RÖSSLER, W. Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 1-9, 2014.
- GROMYSZ-KALKOWSKA, K.; SZUBARTOWSKA, E. Respiratory metabolism of millipedes after poisoning with cypermethrin. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 53, p. 765-770, 1994.
- GUPTA, A.P. Evolutionary trends in the central and mushroom bodies of the arthropod brain, In: _____. **Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions**. New York: John Wiley & Sons. Cap.2, p. 27-41, 1987.
- HARTENSTEIN, V. Morphological Diversity and Development of Glia in *Drosophila*. *Glia*, v. 59, n. 9, p.1237-1252, 2011.
- HARZSCH, S. Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. **Integrative and Comparative Biology**, v.46. n. 2, p.162-194, 2006.
- HARZSCH, S. Phylogenetic comparison of serotonin-immunoreactive neurons in representatives of the Chilopoda, Diplopoda, and Chelicerata: Implications for arthropod relationships. **Journal of morphology**, v. 259, p. 198-213, 2004.
- HARZSCH, S.; MELZER, R. R.; MÜLLER, C. H. G. Mechanisms of eye development and evolution of the arthropod visual system: The lateral eyes of myriapoda are not modified insect ommatidia. **Organisms, Diversity & Evolution**, v.7, p. 20-32, 2007.
- HEATHCOTE, F. G. The post-embryonic development of *Julus terrestris*. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.43, p. 243-245, 1887.
- HEISENBERG, M. Mushroom body memoir: From maps to models. **Nature Reviews**, v. 4, p. 266-275, 2003.
- HEITHIER, N.; MELZER, R. R. The accessory lateral eye of a diplopodl *Cylindroiulus truncorum* (Silvestri, 1896) (Diplopoda : Julidae). **Zoologischen Anzeiger**, v. 244, p. 73-78, 2005.
- HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1992.
- HOY, J. B. Toxicity of 2,4-D to millipeds (Polydesmidae: Diplopoda) food contamination and residue distribution as factors. **Journal of Economic Entomology**, vol.78, n.2, p. 302-304, 1985.
- HOYER, S. C.; LIEBIG, J.; RÖSSLER, W. Biogenic amines in the ponerine ant *Harpegnathos saltator* serotonin and dopamine immunoreactivity in the brain. **Arthropod Structure & Development**, v. 34, p. 429-440, 2005.

- HUMEAU, Y.; CANDIANI, S.; GHIRARDI, M.; POULAIN, B.; MONTAROLO, P. Functional roles of synapsins: Lessons from invertebrates. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, p. 425-433, 2011.
- HUTTNER, W. B.; SCHIEBLER, W.; GREENGARD, P.; DE CAMILLI, P. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. **The Journal of Cell Biology**, v. 96, p.1374-1388, 1983.
- INGHAM, E. R. Review of the effects of 12 selected biocides on target and non-target soil organisms. **Crop Protection**, vol.4, n.1, p. 3-32, 1985.
- JAWARA, M.; PINDER, M.; CHAM, B.; WALRAVEN, G.; ROWLEY, J. Comparison of deltamethrin tablet formulation with liquid deltamethrin and permethrin for bednet treatment in The Gambia. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n.4, p.309-316, 2001.
- JOLY, R. Evolution cyclique des glandes cérébrales au cours de l'intermue chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). **Zeitschrift für Zellforschung**, v.110, p.85-96, 1970.
- JOLY, R.; DESCAMPS, M. Histology and ultrastructure of the myriapod brain. In: GUPTA, A. P. (ed). **Arthropod Brain: Its evolution, development, structure and functions**. New York: John Wiley & Sons. Cap.7, p. 135-157, 1987.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. In: __. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.9, p. 153-181, 2008.
- KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v. 4, p.57-66, 2005.
- KASSEBAUM, B. J. **Susceptibility of the black Portuguese millipede, Ommatoilus moreletii Lucas (Diplopoda: Julidae) to insecticides**. South Australian Department of Agriculture, Faculty of Agricultural Science, Universidade de Adelaide, 1985. Mestre em Ciências Agrícolas.
- KAUFMAN, P. B.; WU, W.; KIM, D.; CSEKE, L. J. Microscopy: light, scanning electron, transmission electron, and confocal. In: __. **Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine**. Boca Raton: CRC Press. Cap.19, p. 409-434, 1995.
- KENYON, F. C. The meaning and structure of the so-called "mushroom bodies" of the hexapod brain. **The American Naturalist**, v.30, n. 356, p. 643-650, 1896.

KLINGER, K. Diplopods and Chilopods of conventional and alternative (Biodynamic) Fields in Hesse (FRG). **Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck**, vol. 10, p. 243 – 250, 1992.

KÖNEN, S.; ÇAVAŞ, T. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan® using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, vol. 49, p. 434-438, 2008.

LANE, N. J. The thoracic ganglia of the grasshopper *Melanoplus differentialis*: Fine structure of the perineurium and neuroglia with special reference to the intracellular distribution of phosphatases. **Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie**, v.86, p.293-312, 1968.

LANE, N. J. Invertebrate neuroglia-junctional structure and development. **Journal of Experimental Biology**, v.95, p.7-33, 1981.

LANE, N. J. Morphology of glial blood-brain barriers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 633, p.348-62, 1991.

LANE, N. J.; ABBOTT, N. J. The organization of the nervous system in the crayfish *Procambarus clarkii*, with emphasis on the blood-brain interface. **Cell and Tissue Research**, v. 156, p. 173-187, 1975.

LARINI, L. Inseticidas Organossintéticos. In:____. **Toxicologia dos praguicidas**. 1 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda. Cap. 3, p.19-91, 1999.

LAWRENCE, J. M.; SAMWAYS, M. J.; HENWOOD, J.; KELLY, J. Effect of an invasive ant and its chemical control on a threatened endemic Seychelles millipede. **Ecotoxicology**, vol.20, p. 731-738, 2011.

LAWRENCE, L. J.; CASIDA, J. E. Stereospecific action of pyrethroid insectide on the γ -aminobutyric acid receptor-ionopore complex. **Science**, v. 221, n.4618, p.1399-1401, 1983.

LEITINGER G.; PABST, M. A.; RIND, F. C.; SIMMONS, P. J. Differential expression of synapsin in visual neurons of the locust *Schistocerca gregaria*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.480, p. 89-100, 2004.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios?** Conceitos Fundamentais em Neurociência. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 765pp, 2010.

LINDSAY, E. A.; FRENCH, K. The impact of the herbicide glyphosate on leaf litter invertebrates within Bitou bush *Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*, infestations. **Pest Management Science**, vol.60, p.1205-1212, 2004.

- LOESEL, R.; NÄSSEL, D. R.; STRAUSFELD, N. J. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods. **Arthropod Structure & Development**, v. 31, n.1, p. 77-91, 2002.
- LORDELLO, L. G. E. Observações sobre alguns diplópodos de interesse agrícola. **Anais da E. S. A. “Luiz de Queiroz”** p. 69-79, 1954.
- MACLEOD, G. F. A review of the potato insect problems in New York State. **The American Potato Journal**, vol 16, p. 232-236, 1939.
- MADDRELL, S. H. P.; TREHERNE, J. E. The ultrastructure of the perineurium in two species, *Carausius morosus* and *Periplaneta americana*. **Journal of Cell Science**, v. 2, p. 119-138, 1967.
- MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. 6 ed. Pêro Pinheiro: Gráfica Manuel Barbosa & Filhos, 2014.
- McCAVERA, S. J.; SODERLUND, D. M. Differential state-dependent modification of inactivation-deficient Nav1.6 sodium channels by the pyrethroid insecticides S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin. **NeuroToxicology**, v. 33.p. 384-390, 2012.
- MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus pdebergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, vol.75, p. 1361-1369, 2012.
- MIBBACH, C.; HARZSCH, S.; HANSSON, B. S. New insights into an ancient insect nose: The olfactory pathway of *Lepismachilis y-signata* (Archaeognatha: Machilidae). **Arthropod Structure and Development**, v.40, p. 317-333, 2011.
- MOREIRA-DE-SOUSA, C.; M.; FONTANETTI, C.S. Structure and function of the foregut and salivar glands of the synanthropic diplopod *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae). **Animal Biology**, v.62, p. 493-504, 2012.
- MÜLLER, C. H. G.; SOMBKE, A.; ROSEMBERG, J. The fine structure of the eyes of some bristly millipedes (Penicilatta, Diplopoda): Additional support for the homology of mandibulate ommatidia. **Arthropod Structure and Development**, v.36, p.436-476, 2007.
- NARAHASHI, T. Effect of the insecticide allethrin on membrane potentials of cockroach giant axons. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, n. 1, p.61–65, 1962.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. (2008). Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P. A.; BETOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2008. Volume único, cap. 14, p. 413-432.

- NASH, M. A.; HOFFMANN, A. A.; THOMON, L. J. Identifying signature of chemical applications on indigenous and invasive nontarget arthropod communities in vineyards. **Ecological Applications**, n.6, vol.20, p. 1693-1703, 2010.
- NIIJIMA, K. Effects of outbreak of the train millipede *Parafontaria laminata armigera* (Diplopoda: Xystodesmidae) on litter decomposition in natural beech forest in Central Japan. 1. Density and biomass on soil invertebrates. **Ecological Research**, v. 13, p.41-53, 1998.
- NIIJIMA, K. The outbreak of *Parafontaria laminata armigera* VERHOEFF. **Japanese Journal of Forest Environment**, v. 26, p. 25-32, 1984.
- NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda: Xystodesmidae). **Japanese Journal of Ecology**, v.38, p. 257-268, 1988.
- NISHIMURA, K.; NARAHASHI, T. Structure-activity relationships of pyrethroids based on direct action on nerve. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.8, p.53-64, 1978.
- NORTOX. **Carbendazim**: Suspensão concentrada. Arapongas: Nortox S. A., 2011. 1 bula de fungicida.
- NPIC (National Pesticide Information Centre). **Bendiocarb**: Technical fact sheet.2002.
- NPIC. Lambda-cyhalothrin. **NPTN General Fact Sheets**, 2001. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/ingred/aifact.html>>. Acessado em 23 abr. 2013.
- OLIVEIRA, M. A. P.; ANTUNIASSI, U. R.; VELINI, E. D. Rain remotion of different drug formulations applicate in soybean, with or no addition of mineral oil. **Energia na Agricultura**, v.26, n.3, p.80-97, 2011.
- ORCHARD, I. The effects of pyrethroids on the electrical activity of neurosecretory cells from the brain of *Rhodnius prolixus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.13, p.220-226, 1980.
- OTT, S. R. Confocal microscopy in large insect brains: Zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, p.220-230, 2008.
- PAULUS, H. F. Phylogeny of the Myriapoda – Crustacea – Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.38, p.189-208, 2000.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4th ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985.
- PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. **Oikos**, v. 39, n.3, p. 291–357, 1982.

- PIEROZZI, P. H.; FONTANETTI, C.S. A new species of *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptidae): description and chromosome number. **Iheringia, série Zoologia**, v. 96, n.2, p.209-212, 2006.
- PINHEIRO, T. G.; MARQUES, M.I.; FONTANETTI, C.S. Comparative study of the ovarian morphology in the order Polydesmida (Diplopoda) and description of unusual structures in the female reproductive system. **Brazilian Journal of Biology** (Impresso), v. 73, p. 895-901, 2013.
- PRABHU, V.K.K. Note on the cerebral glands and a hitherto unknown connective body in *Jonespeltis splendidus* Verhoeff (Myriapoda, Diplopoda). **Current Science**, v.28, n.8, p.330-331, 1959.
- PRABHU, V.K.K. The structure of the cerebral glands and connective bodies of *Jonespeltis splendidus* Verhoeff (Myriapoda: Diplopoda). **Zeitschrift für Zellforschung**, v.54, p717-733, 1961.
- RADOJCIC, T.; PENTREATH, V. W. Invertebrate glia. **Progress in Neurobiology**, v. 12, p. 115-179, 1979.
- RICHTER, S.; LOESEL, R.; PURSCHKE, G.; SCHIMIDT-RHAESA, A.; SCHOLTZ, G.; STACH, T.; VOGT, L.; WANNINGER, A.; BRENNEIS, G.; DÖRING, C.; FALLER, S.; FRITSCH, M.; GROBE, P.; HEUER, C. M.; KAUL, S.; MØLLER, O. S.; MÜLLER, C. H. G.; RIEGER, V.; ROTHE, B. H.; STEGNER, M. E. J.; HARZSCH, S. Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. **Frontiers in Zoology**, v.7 n. 29, 2010.
- RIESKE, L. K.; BUSS, L. J. Effects of gypsy moth suppression tactics on litter- and ground-dwelling arthropods in the central hardwood forests of Cumberland Plateau. **Forest Ecology and Management**, vol.149, p. 181-195, 2001.
- ROMA, G. C.; NUNES, P. H.; REMÉDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Synganglion histology in diferente stages of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.110, p.2455-2463, 2012.
- ROMAN, G.; DAVIS, R. L. Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. **BioEssays**, v.23, p.571-581, 2001.
- ROMELL, L. G. An example of myriapods as mull formers. **Ecology**, v.16, n.1, p. 67-71, 1935.
- ROTTERDAM CONVENTION. **Rotterdam Convention**. Châtelaine: Secretariat of the Rotterdam Convention, 2010. Disponível em: < <http://www.pic.int/> >. Acesso em: 23 abr. 2013.

- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Myriapoda. In: ____. **Zoologia dos invertebrados** – Uma abordagem funcional-evolutiva. 4ªed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2005. Cap. 20, p. 819-842.
- SABATINI, M. A.; PEDERZOLI, A.; FRATELLO, B.; BERTOLANI, R. Microarthropod communities in soil treated with atrazine. **Italian Journal of Zoology**, vol. 46, n.4, p. 33-341, 1979.
- SAHLI, F.; PETIT, J. Les plages paracomissurales (formations neurohémales céphaliques) des Diplopodes. Note préliminaire. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**. Série D, Sciences naturelles, v. 280, p. 2001-2004, 1975.
- SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, 2011.
- SCHACHTNER, J.; SCHMIDT M.; HOMBERG, U. Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+Hexapoda). **Arthropod Structure and Development**, v. 34, p. 257–299, 2005.
- SCHARF, M. E. Neurological Effects of Insecticides. In: PIMENTEL, D. **Encyclopedia of Pest Management**. 1ed. Boca Raton: CRC Press. V. 2, p. 395-399, 2003.
- SCHARRER, B.; SCHARRER, E. Neurosecretion VI. A comparison between the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insects and the hypothalamo-hypophyseal system of the vertebrates. **Biological Bulletin**, v. 87, n. 3, p. 242-251, 1944.
- SCHUBART, O. Os Myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 2, n. 16, p. 205-234, 1942.
- SIERWALD, P.; BOND, J. E. Current status of the Myriapod class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic diversity and phylogeny. **Annual Review of Entomology**, v. 20, p.401- 420, 2007.
- SHINOHARA, K. Synonymy of *Parafontaria laminata* and its relative species (Diplopoda: Xylodesmidae). **Proceeding of The Japanese Society of Systematic Zoology**, v. 40, p. 43-48, 1989.
- SNODGRASS, R.E. **Principles of insect morphology**. New York: McGraw-Hill Book Company, 667pp, 1935.
- SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.34, p. 77-96, 1989.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mecanismos de pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.

- SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.) **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz: Formatex Research Center, v. 1, p. 696- 703, 2012.
- SOMBKE, A.; HARZSCH, S.; HANSSON, B. S. Organization of deutocerebral neuropils and olfactory behavior in the centipede *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Myriapoda: Chilopoda). **Chemical Senses**, v. 36, p. 43-61, 2011b.
- SOMBKE, A.; LIPKE, E.; KENNING, M.; MÜLLER, C. H. G.; HANSSON, B. S.; HARZSCH, S. Comparative analysis of the deutocerebral neuropils in Chilopoda (Myriapoda): Implications for the evolution of the arthropod olfactory system and support for the Mandibulata concept. **Neuroscience**, v. 12, n. 1, p.1-17, 2012.
- SOMBKE, A.; ROSENBERG, J.; HILKEN, G. Chilopoda – The nervous system. In: MINELLI, A. **Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. V. 1**, cap. 11, p. 217-234, 2011a. Leiden: Koninklijke Brill NV
- SOUZA, A.; LOURENZANI, W. L.; QUEIROZ, T. R. Análise da evolução da tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários. **XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. São Carlos, 12 a 15 de outubro de 2010.
- SOUZA, R. B. **Aspectos morfológicos, histoquímicos e ultra-estruturais do túbulo de Malpighi do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006**. 2012. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. M.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contaminations: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect. In: HUGGET, R. J.; KIMIERIE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992
- STOCKHOLM CONVENTION. **Stockholm Convention**. Châtelaine: Secretariat of the Stockholm Convention, 2008. Disponível em: <<http://chm.pops.int>>. Acesso em: 23 abr. 2013.
- STRAUSFELD, N.J. Brain organization and the origin of insects: an assessment. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, p. 1929–1937, 2009.

- STRAUSFELD, N.J.; BUSCHBECK, E.K.; GOMEZ R.S. The arthropod mushroom body: Its functional roles, evolutionary enigmas and mistaken identities. In: BREIDBACH, O.; KUTSCH, W. **The nervous systems of invertebrates: An evolutionary and comparative approach**. P. 349- 382, 1995. Basel: Birkhäuser Verlag.
- STRAUSFELD, N.J.; HANSEN, L.; LI, Y.; GOMEZ, R. S.; ITO, K. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. **Learning and Memory**, v. 5, p. 11-37, 1998.
- STRAUSFELD, N.J.; HILDEBRAND, J. G. Olfactory systems: common design, uncommon origins? **Current Opinion in Neurobiology**, v.9, n.5, p.634-639, 1999.
- STRAUSFELD, N.J.; STRAUSFELD, C. M.; LOESEL, R.; ROWELL, D.; STOWE, S. Onychophoran brain organization suggests an archaic relationship with a chelicerate stem lineage. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1596, p. 1857-1866, 2006.
- SYMINGTON, S. B.; FRISBIE, R. K.; LU, K. D.; CLARK, J. M. Action of cismethrin and deltamethrin on functional attributes of isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, p.172–181, 2007.
- SYMINGTON, S. B.; HODGDON, H. E.; FRISBIE, R. K.; CLARK, J. M. Binary mixtures of pyrethroids produce differential effects on Ca²⁺ influx and glutamate release at isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 131–139, 2011.
- TAUC, L. Transmission in invertebrate and vertebrate ganglia. **Physiological Reviews**, v.47, n.3, p.521-593, 1967.
- TREHERNE, J. E.; SCHOFIELD, P. K. Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. **Journal of Experimental Biology**, v. 95, p. 61-73, 1981.
- TRUJILLO-CÉNOZ, O. Some aspects of the structural organization of the arthropod ganglia. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 56, p. 649-682, 1962.
- VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 69-96, 2006.
- WAKELING, E. N.; NEAL, A. P.; ATCHISON, W. D. Pyrethroids and their effects on ion channels. In: SOUNDARARAJAN, R. P. (Ed.) **Pesticides – Advances in Chemical and Botanical Pesticides**. Intech, 2012. Cap. 3, p. 36-66.
- WARBURG, M. R.; ROSENBERG, M. Cerebral neurosecretory cells in the millipede, *Archispirostreptus syriacus*, de Saussure (Diplopoda, Spirostreptiadae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 64, n. 2/3, p.107- 115, 1983.

- WARDLE, D. A.; NICHOLSON, K. S.; BONNER, K. I.; YEATES, G. W. Effects of agricultural intensification on soil-associated arthropod population dynamics, community structure, diversity and temporal variability over a seven-year period. **Soil Biology and Biochemistry**, vol.31, p.1691-1706, 1999.
- WHITINGTON, P. M. Evolution of neural development in the arthropods. **Cell and Developmental Biology**, v.7, p. 605-614, 1996.
- WHO (World Health Organization). **Safety of pirethroid treated mosquito nets**. Fact sheet, 1999.
- WIDMER, M. Portuguese millipedes (*Ommatoiulus moreletii*). **Department of Agriculture Gardennote**, n.2, 2006.
- WIERSMA, C. A. G. The neuron soma. Neurons of Arthropods. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.17, p. 155-163, 1952.
- WIGHTMAN, J. A.; WIGHTMAN, A. S. An insect and sociological survey of groundnut fields in southern Africa. **Agriculture, Ecosystem and environment**, vol.51, p. 311-331, 1994.
- WINDER, G. H.; DEWAR, A. M.; DUNNING, R. A. Comparisons of granular pesticides for the control of soil-inhabiting arthropod pests of sugar beet. **Crop Protection**, vol.12, p. 148-154, 1993.
- WING, K. D.; SACHER, M.; KAGAYA, Y.; TSURUBUCHI, Y.; MULDERIG, L.; CONNAIR, M.; SCHNEE, M. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. **Crop protection**, vol.19, p.537-545, 2000.
- WU, A.; LIU, Y. Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. **Neuroscience Letters**, vol. 279, n.2, p.85-88, 2000a.
- WU, A.; LIU, Y. Deltamethrin induces delayed apoptosis and altered expression of p53 and bax in rat brain. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 183-189, 2000b.
- ZANTKE, J.; WOLFF, C.; SCHOLTZ, G. Three-dimensional reconstruction of the central nervous system of *Macrobotus hufelandi* (Eutardigrada, Parachela): implications for the phylogenetic position of Tardigrada. **Zoomorphology**, v. 127, p. 21-36, 2008.
- ZHOU, T.; ZHOU, W.; WANG, Q.; DAI, P.; LIU, F.; ZHANG, Y. SUN, J. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 35-40, 2011.