

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/06/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Botucatu/Rio Claro
Seção Técnica de Pós-Graduação



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL (INTERUNIDADES)

VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA, AUTOFAGIA E AUTOCITOTOXICIDADE EM CANAIS SECRETORES DE *Anacardium humile* A. ST.-HIL. (ANACARDIACEAE)

SHELLY FAVORITO DE CARVALHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de (Botucatu), UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências do câmpus de Rio Claro.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Botucatu/Rio Claro
Seção Técnica de Pós-Graduação



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL (INTERUNIDADES)

VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA, AUTOFAGIA E AUTOCITOTOXICIDADE EM CANAIS SECRETORES DE *Anacardium humile* A. ST.-HIL. (ANACARDIACEAE)

SHELLY FAVORITO DE CARVALHO

PROF. DR. SILVIA RODRIGUES MACHADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de (Botucatu), UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências do câmpus de Rio Claro.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Carvalho, Shelly Favorito de.

Variação intraespecífica, autofagia e autocitotoxicidade
em canais secretores de *Anacardium humile* A. ST.-HIL.
(*Anacardiaceae*) / Shelly Favorito de Carvalho. - Botucatu,
2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Silvia Rodrigues Machado
Capes: 20300000

1. *Anacardiaceae*. 2. Autofagia. 3. Células epiteliais.
4. Citotoxicidade. 5. Citologia. 6. Botânica.

Palavras-chave: *Anacardium humile*; Autofagia; Canais
secretores; Citotoxicidade; Variação intraespecífica.

*Dedico
À minha mãe (in memoriam) que dedicou
sua vida para que fôssemos felizes.*

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro desse estudo (Proc. FAPESP 2019/19916-1).

À Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado, a quem devo toda minha vida profissional. Me ensinou não só o entusiasmo e o amor à pesquisa, mas também a levar a vida com leveza e com pessoas do bem ao seu lado.

À Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, que me permitiu concluir esse doutorado. Sempre doce, humana e com muita empatia, me apoiou em tudo que precisei. Obrigada pelas contribuições nesse estudo.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler, pela parceria, pelos muitos ensinamentos e ajuda nesse trabalho.

Às professoras Simone de Pádua Teixeira, Tatiane Maria Rodrigues e Yve Canaveze pelas importantes considerações no exame de qualificação.

Às professoras Simone de Pádua Teixeira, Elza Maria Guimarães Santos e Yve Canaveze e ao professor Luiz Ricardo dos Santos Tozin pelas contribuições na defesa dessa tese.

À Luciana, amiga que o CME me deu, que me incentivou a começar o doutorado.

Aos meus amigos do CME, Claudetinha, Maria Helena e Tiago, pelas conversas, conselhos, e inúmeras vezes que me apoiaram, seja cortando e cortando novamente minhas amostras até dar certo, seja por fazerem meu trabalho para que eu pudesse terminar o doutorado. Sou imensamente grata pelo apoio.

À Hannelise, menina doce e parceira, pelas conversas e conselhos.

Aos colegas Yve, Thunder, Fernanda, Tayeme, Juan, Stefany, Karla, Zoraide, Karise e Paulo pela ajuda em diferentes etapas desse trabalho.

À minha amiga-irmã Mari, que mesmo distante, foi meu ouvido para minhas aflições durante esse processo, sempre me incentivando.

Ao meu companheiro, Márcio, que não mediu esforços para que eu terminasse esse projeto. Muito obrigada por tudo o que faz por mim. Te amo.

Aos meus filhos, Gabriel e Pedro, que são a força que me movem.

À minha família (pai, irmãs, cunhados, cunhadas, sogra e sobrinhos) que sempre me incentivam em minhas conquistas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
OBJETIVOS.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	15
CAPÍTULO 1 - Intraspecific variation in ultrastructure and secretion of the resin-secreting canals in <i>Anacardium humile</i> (Anacardiaceae).....	16
CAPÍTULO 2 - Identification and characterization of autophagy in resin secretory canals.....	32
CAPÍTULO 3 - Evidências ultraestruturais e imunohistoquímicas de autocitotoxicidade em canais secretores de resina.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72

RESUMO: Por meio da combinação de diversos métodos em botânica estrutural e biologia celular, neste estudo analisamos comparativamente os canais secretores no caule em sua porção aérea e subterrânea de *Anacardium humile* A. St-Hil. a fim de acessar variações intraindividuais relacionadas ao ambiente aéreo e subterrâneo; investigar a ocorrência de autofagia e seus tipos, bem como, a ocorrência de autocitotoxicidade e de mecanismos citoprotetores em células epiteliais secretoras de resina. Os resultados mostraram diferenças significativas na distribuição, histoquímica e ultraestrutura das células epiteliais dos canais secretores no caule em sua porção aérea e subterrânea. As células epiteliais dos canais na porção aérea, no pico da secreção, apresentaram formatos e tamanhos variáveis, com núcleo volumoso e citoplasma denso com ribossomos livres, polirribossomos, mitocôndrias com cristas desenvolvidas e plastídios elipsóides com inclusões elétron-opacas circundados por retículo periplastidial. Já na porção subterrânea, as células epiteliais no pico da secreção apresentaram formato e tamanho regulares, um grande vacúolo central, citoplasma reduzido a uma fina camada na periferia da célula e população reduzida de organelas. Dois mecanismos de autofagia foram detectados nas células epiteliais, sendo a macroautofagia encontrada em células ativas em secreção e a microautofagia em células em estágio final de secreção. As mudanças observadas na morfologia das células epiteliais durante o ciclo secretor tais como dilatação acentuada do retículo endoplasmático liso, degradação das cristas mitocondriais e a formação de corpos multilamelares na matriz mitocondrial são fortes indícios de autocitotoxicidade da secreção, enquanto que a presença de HSP70 (*heat shock proteins*) e o aparecimento de figuras típicas de processo autofágico (fagóforos, autofagossomos e vacúolos autofágicos) foram associadas com mecanismos citoprotetores em resposta aos danos causados pela presença de substâncias tóxicas. O padrão de danos celulares e respostas citotóxicas das células epiteliais dos canais secretores é comum a outras estruturas secretoras de terpenos. A combinação de métodos imunohistoquímicos com análises convencionais e ultracitoquímicas em microscopia eletrônica de transmissão foi eficiente para mostrar que nesta espécie o ambiente abaixo e acima do solo exerce certa influência na organização subcelular e no funcionamento dos canais secretores; que os canais secretores apresentam tipos distintos de autofagia durante o ciclo secretor; que os componentes da secreções terpênicas são tóxicas às próprias células que os produzem, as quais, em resposta aos danos desenvolvem mecanismos citoprotetores. Os resultados obtidos neste estudo incentivam a aplicação de diferentes técnicas de microscopia de luz e eletrônica, incluindo imunolocalização e citoquímica ultraestrutural na área da botânica estrutural e abrem novas perspectivas no estudo da célula secretora em espécies nativas.

ABSTRACT: Through the combination of several methods in structural botany and cell biology, in this study we comparatively analyze the secretory canals in the stem in its above- and belowground portions of *Anacardium humile* A. St-Hil. in order to access intra-individual variations related to the above- and belowground environment; to investigate the occurrence of autophagy and its types, as well as the occurrence of autocytotoxicity and cytoprotective changes in resin-secreting epithelial cells. The results of the differentiation in the distribution, histochemistry and ultrastructure of the epithelial cells of the secretory canals in the stem in its above- and belowground portion. The epithelial cells of the canals in the aboveground portion, at the peak of secretion, reached variable formats and patterns, with a voluminous nucleus and dense cytoplasm with free ribosomes, polyribosomes, mitochondria with developed cristae and ellipsoid plastids with electron-opaque inclusions surrounded by periplastid reticulum. In the belowground portion, the epithelial cells at the apex showed regular shape and size, a large central vacuole, cytoplasm reduced to a thin layer at the periphery of the cell, and suppression of organelles. Two mechanisms of autophagy were detected in epithelial cells, macroautophagy being found in active cells in secretion and microautophagy in cells in the final stage of secretion. The changes observed in the morphology of epithelial cells during the secretory cycle such as marked dilation of the smooth endoplasmic reticulum, degradation of mitochondrial crests and the formation of multilamellar bodies in the mitochondrial matrix are strong indications of autocytotoxicity of secretion, while the presence of HSP70 (heat shock proteins) and the appearance of typical figures of autophagic process (phagophores, autophagosomes and autophagic vacuoles) were associated with cytoprotective mechanisms in response to the damage caused by the presence of toxic substances. The pattern of cellular damage and cytotoxic responses of the epithelial cells of the secretory canals is common to other terpene-secreting structures. The combination of immunohistochemical methods with conventional and ultracytochemical analyses in transmission electron microscopy was efficient to show that in this species the environment below and above ground exerts a certain influence on the subcellular organization and functioning of the secretory canals; that secretory canals have distinct types of autophagy during the secretory cycle; that the components of terpene secretions are toxic to the very cells that produce them, which, in response to damage, develop cytoprotective mechanisms. The results obtained in this study encourage the application of different techniques of light and electron microscopy, including immunolocalization and ultrastructural cytochemistry in the area of structural botany and open new perspectives in the study of the secretory cell in native species.

Introdução Geral

Anacardiaceae é uma família de angiospermas lenhosas distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Pell et al. 2011; Royo et al. 2015). No Brasil, Anacardiaceae é representada por 55 espécies distribuídas em 14 gêneros, sendo *Schinus* L. e *Anacardium* L. os mais diversos (BFG 2015).

A ocorrência de canais secretores de resina é uma característica marcante da família. Várias espécies de Anacardiaceae são exploradas *in loco* ou cultivadas devido à produção de frutos comestíveis (manga, caju, pistache e outros), madeiras de boa qualidade e resinas com importância medicinal, industrial e alergênica (Pickel 2008). A composição química da secreção produzida em Anacardiaceae é diversa, podendo conter goma, uma mistura de goma e resina ou apenas resina (Tolke et al. 2021). Terpenos e compostos fenólicos são compostos predominantes na secreção de Anacardiaceae, (Carmello et al. 1995; Pinto et al. 2000; Langenheim 2003; Martínez et al. 2003, 2008; Sant'Anna-Santos et al. 2006; Tolke et al. 2017; Prado e Demarco 2018; Tolke et al. 2021), porém estudos mais detalhados são necessários para identificar variações entre órgãos e espécies (Tolke et al. 2021).

Canal secretor é um tipo de estrutura secretora interna constituída por um epitélio de células especializadas organizadas ao redor de um espaço intercelular denominado lúmen, onde a secreção produzida por essas células fica armazenada e só atinge o meio externo em caso de injúrias mecânicas (Fahn 1979). A secreção produzida pelos canais secretores tem natureza química diversa e inclui óleos essenciais, resinas, gomas e mucilagens, compostos fenólicos, dentre outros, cuja importância na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, na manutenção do potencial hídrico de tecidos adjacentes, na dispersão de frutos e sementes, além de reconhecida importância econômica e medicinal tem sido destacada (Fahn 1979; Langenheim 2003; Evert 2006).

Estudos microscópicos das últimas décadas têm contribuído consideravelmente para o conhecimento do modo de formação, desenvolvimento e funcionamento dos canais/cavidades resiníferos em espécies de Anacardiaceae. O modo de formação dos canais secretores nos representantes desta família pode variar entre indivíduos da mesma espécie e até mesmo entre órgãos do mesmo indivíduo, sendo reportados os mecanismos esquizógeno, lisígeno e esquizo-lisígeno (Fahn 1979). Os estudos citológicos dos canais resiníferos de espécies de Anacardiaceae são limitados, em sua maioria, aos estágios iniciais da formação do lúmen (Fahn e Evert 1974; Nair et al. 1983; Machado e Carmello Guerreiro 2001; Lacchia e Carmello Guerreiro 2009), sendo que muitos aspectos dos

canais secretores de resina tais como variação intraespecífica, ocorrência de autofagia e autocitotoxicidade da secreção ainda são pouco explorados. Pesquisas com este foco são imprescindíveis para alavancar a compreensão das bases celulares da secreção em plantas e explorar a versatilidade funcional das células secretoras.

A espécie objeto de estudo

Anacardium humile A.St.-Hil., conhecida popularmente como cajuzinho-do-cerrado, cajuí e cajuzinho-do-campo é um subarbusto nativo do Cerrado brasileiro pertencente à família Anacardiaceae (Almeida et al. 1998). Pode atingir cerca de 80cm de altura e se caracteriza por apresentar vários ramos aéreos eretos e um caule subterrâneo muito desenvolvido (Cota et al. 2017).



Figura 1. Espécimes de *Anacardium humile* vegetando na região de Botucatu – SP.

A alta variabilidade morfológica de *A. humile* tem sido ressaltada em diversos estudos, e devido ao seu potencial comercial, esta espécie tem sido objeto de estudos em programas de melhoramento visando à determinação da variabilidade genética, buscando identificar procedências ou ambientes que apresentam acessos com divergências de alta magnitude (Carvalho et al. 2012). A relevância ecológica desta espécie no Cerrado tem sido enfatizada (Carvalho 2020) devido a importância de seus frutos e sementes como fonte de alimentos para a fauna, principalmente as aves e também mamíferos como a raposa (*Lycalopex vetulus*), que atuam como agentes dispersores das sementes. Os pequenos frutos quando fermentados, fornecem uma espécie de aguardente conhecida

pelos indígenas como cauim. As nozes são ricas em vitaminas B1 e B2, proteínas, lipídios, niacina, fósforo e ferro. Todos os órgãos de *A. humile* são usados na medicina popular. A infusão de suas folhas e da casca do caule subterrâneo é usada medicinalmente para curar a diarreia. O óleo encontrado nas nozes tem efeito antisséptico e cicatrizante, sendo também utilizado na indústria para a produção de plásticos, revestimentos e materiais isolantes. O pedúnculo de *A. humile* é rico em vitamina C, fibras e antioxidantes. Esta composição biológica está associada à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes. A infusão das flores é usada para combater a tosse e baixar o nível de glicose em diabéticos (Carvalho 2020). É uma espécie suscetível à intensa exploração pelo homem e à ação do fogo, e está competindo com outras espécies pelo título de espécie ameaçada de extinção (Carvalho 2020).

A ampla distribuição desta espécie em áreas de cerrado *sensu stricto* da região centro-oeste paulista, a presença de um caule aéreo e caule subterrâneo e de canais secretores de resina fazem desta espécie um bom modelo para os propósitos deste estudo.

O ambiente abaixo e acima do solo e sua provável influência no funcionamento das estruturas secretoras

Estruturas secretoras são características constitutivas e, devido a isso, são utilizadas como um caráter taxonômico em diferentes grupos de plantas (Evert 2006). No entanto, alguns aspectos das estruturas secretoras são passíveis de influência do ambiente, com relatos de variações no grau de desenvolvimento, composição da secreção e na organização ultraestrutural das células secretoras.

Estudando plântulas de *Copaifera langsdorffii* cultivadas em diferentes condições de luz e temperatura, Rodrigues et al. (2014) demonstraram que canais e cavidades secretores de óleo-resina foram mais abundantes e com características ultraestruturais de células ativas em secreção quando expostas a 25°C enquanto que se apresentaram reduzidos e com danos celulares quando expostas a 15 e 35°C.

As características ultraestruturais e a composição da secreção de coléteres mostraram-se variáveis em espécies de Rubiaceae crescendo em floresta e cerrado demonstrando a plasticidade associada ao ambiente nas células secretoras dos coléteres (Tresmondi et al. 2015, 2017). Enquanto que nas espécies de floresta a secreção era predominantemente hidrofílica, nas espécies de cerrado a secreção era lipofílica ou mista (Tresmondi et al. 2015). Esses autores atribuíram as diferenças na secreção às diferenças nas taxas de radiação solar, que foram mais elevadas no cerrado. A morfologia ultraestrutural das células secretoras foi condizente com o tipo de secreção (Tresmondi et

Referências bibliográficas

Arıt-Arışsa S, Porcher JM, Arrigo AP, Lambre C. 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145: 147 – 157.

Almeida S P, Proença C E B, Sano S M, Ribeiro J F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis.

Alvarez-Martínez FJ, Barrajon-Catal E, Herranz-Lopez M, Micol V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* 90. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.

Alvin-Wittenberg T. 2019. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environ.* 42:1045–1053.

An Q, van Bel AJE; Hückelhoven R. 2007. Do Plant Cells Secrete Exosomes Derived from Multivesicular Bodies? *Plant Signaling & Behavior* 2 (1): 4-7.

Aziz N, Paiva NL, May GD, Dixon RA. 2005. Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* 221:28–38.

Besser K, Harper A, Welsby N, Schauvinhold I, Slocombe S, Li Y, Dixon RA, Broun P. 2009. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiol* 149:499–514.

Buvat R. 1989. Ontogeny, cell differentiation, and structure of vascular plants. Springer Verlag, Berlin.

Canaveze Y, Scudeler EL, Machado SR. 2021. Neem secretory cells: developmental cytology and indications of cell autotoxicity. *Protoplasma*. doi: <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01580-3>.

Carmello SM, Machado SR, Gregório EA. 1995 Ultrastructural aspects of the secretory duct development in *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.(Anacardiaceae). Revista Brasileira de Botânica 18(1): 95-103.

Carvalho SF, Scudeler EL, Santos DC, Machado SR. 2022. Intraspecific variation in ultrastructure and secretion of the resin canals in *Anacardium humile* Anacardiaceae). Protoplasma. doi: <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01823-5>.

Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Nocelli RCF, Malaspina O. 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxan in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Microsc Res Tech 77:274–281.

Cheville NF. 2009. Response to cellular injury. In: Cheville NF (ed) Ultrastructural pathology, the comparative cellular basis of disease. Willey-Blackwell, Ames, pp 3–31.

Cota LG, Moreira PA, Brandão MM, Royo VA, Melo Junior AF, Menezes EV, Oliveira DA. 2017. Structure and genetic diversity of *Anacardium humile* (Anacardiaceae): a tropical shrub. Genet. mol. res. (Online) 16 (3): gmr16039778.

Fahn A.1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.

Gou W, Li X, Guo S, Liu Y, Li F, Xie Q. 2019. Autophagy in Plant: A New Orchestrator in the Regulation of the Phytohormones Homeostasis. Int. J. Mol. Sci. doi:10.3390/ijms20122900.

Hanson PI and Cashikar A. 2012. Multivesicular Body Morphogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 28:337–62.

Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai W, Zhang H, Wei A, Gong Z. 2019. Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic stresses. International Journal of Molecular Sciences. doi:10.3390/ijms20215321.

Huang AC, Osbourn A. 2019. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection; a mini-review. *Pest Manag Sci* 75:2368–2377. doi: DOI 10.1002/ps.5410.

Isah T. 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res* 52:39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.

Junqueira LCU, Junqueira LMMS. 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora, Santos, São Paulo.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 1A-149A.

Langenheim JH. 2003. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. Oregon, US: Timber Press.

Magen S, Seybold H, Laloum D, Avin-Wittenberg T. 2022. Metabolism and autophagy in plants - a perfect match. *FEBS Letters* doi:10.1002/1873-3468.14359.

Martínez M, Pinto GL, Sanabria L, Beltrán O, Igartuburu JM, Bahsas A. 2003. Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). *Carbohydrate Research* 338: 619-624.

Martínez M, Pinto GL, Gonzáles MB, Herrera J, Oulyadic H, Guilhaudis L. 2008. New structural features of *Spondias purpurea* gum exudate. *Food Hydrocolloids* 22:1310-1314.

Pinto GL, Martínez M, Beltrán O, Rincón F, Igartuburu JM, Luis FR. 2000. Structural investigation of the ploysaccharide of *Spondias mombin* gum. *Carbohydrate polymers* 43: 105-112.

Perveen S. 2018. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. In: Perveen S, Al-Taweel A. Terpens and terpenoids BoD – Books on Demand, 152 páginas.

Prado E, Demarco D. 2018. Laticifers and secretory ducts: similarities and differences. In: Hufnagel, L. (Ed.), Ecosystem Services and Global Ecology, IntechOpen, London, pp. 103-123.

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.

Roshchina VV, RoshchinaVD. 1993. The excretory function of higher plants. Springer, Berlin.

Sant’Anna-Santos BF, Thadeo M, Meira RMSA, Ascensão L. 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst.F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore* 30: 481-489.

Scudeler EL, Garcia ASG, Padovani CR, Pinheiro PFF, Santos DC. 2016. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*. *Micron* 80:96–111.

Scudeler EL, Garcia ASG, Padovani CR, Santos DC. 2019. Pest and natural enemy: how the fat bodies of both the southern armyworm *Spodoptera eridania* and the predator *Ceraeochrysa claveri* react to azadirachtin exposure. *Protoplasma* 256:839–856. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01347-5>.

Scudeler EL, Santos DC. 2014. Side effects of neem oil on the midgut endocrine cells of the green lacewing *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera:Chrysopidae). *Neotrop Entomol* 43:154–160.

Tolke ED, Lacchia APS, Demarco D, Carmello-Guerreiro SM. 2017. Pericarp ontogeny of *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) reveals a secretory endocarp in young stage. *Acta Botanica Brasilica* 31: 319-329.

Tolke ED, Lacchia APS, Lima EA, Demarco D, Ascensão L, Carmello-Guerreiro SM. 2021. Secretory ducts in Anacardiaceae revisited: Updated concepts and new findings based on histochemical evidence. *South African Journal of Botany* 138: 394-405. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.012>

Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Bio.* 42:579-620.

Waters ER, Lee GJ, Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47 (296): 325-338.

Zhao C, Kim YK, Zeng Y, Wang MLX, Hu C, Gorman C, Dai SY, Ding S-Y, Yuan JS. 2018. Co-compartmentation of terpene biosynthesis and storage via synthetic droplet. *ACS Synth Biol* 7:774–781.

Considerações finais

Nesse estudo, o uso de métodos imunohistoquímicos combinados com análises convencionais e ultracitoquímicas em microscopia eletrônica de transmissão permitiu acessar variações no aparato celular e na dinâmica de secreção de resina em canais secretores presentes no caule em suas porções aérea e subterrânea de plantas de *Anacardium humile*. A combinação desses métodos foi eficiente para responder as questões apresentadas nos objetivos da tese.

Os resultados obtidos mostraram que há variações intraindividuais nos canais secretores do caule em *A. humile* na porção aérea e subterrânea apresentando diferenças na estrutura subcelular e na dinâmica de secreção de acordo com o ambiente em que se encontravam. Os canais do caule na porção aérea apresentam células epiteliais com características de alta atividade enquanto que os canais do caule na porção subterrânea apresentam características de baixa atividade.

Comprovamos a ocorrência e identificamos dois tipos de autofagia - macroautofagia e microautofagia - durante o ciclo secretor de resina, mostrando que a autofagia em plantas também está associada a processos de manutenção do metabolismo em condições normais de desenvolvimento. Nas células epiteliais dos canais secretores de resina, a autofagia é responsável pela reciclagem de componentes celulares e organelas danificadas, pelo transporte vesicular e biogênese dos vacúolos, desempenhando um papel fundamental no metabolismo da secreção.

Ainda, os resultados desse estudo confirmam que a resina produzida pelos canais secretores corticais de *A. humile* é citotóxica para as células que a produz, ao mesmo tempo que as células epiteliais apresentam mecanismos citoprotetores que mantêm a célula viva durante o processo secretor.

Durante o processo de obtenção dos resultados encontramos algumas dificuldades técnicas provavelmente relacionadas aos componentes da secreção. A fixação e a pós-fixação do material para as técnicas de MET e a aplicação das técnicas de imunolocalização requereram um delineamento experimental rigoroso e a adaptação das técnicas usuais em célula animal e plantas modelo para plantas nativas. Nas amostras de imunolocalização em MET, a pós-fixação com tetróxido de ósmio não foi realizada, facilitando os cortes ultrafinos e assim obtendo melhores resultados. As imagens em MET foram feitas em diferentes aumentos, salientando a necessidade de grandes aumentos para se observar claramente os resultados dos testes citoquímicos.

Nosso trabalho gera perspectivas e incentivo para aplicação de diferentes técnicas de microscopia de luz e eletrônica, incluindo imunolocalização e citoquímica ultraestrutural em estudos de célula vegetal em espécies nativas

Como próximo passo, estamos finalizando análises imunohistoquímicas e ultraestruturais de canais secretores medulares produtores de substâncias hidrofílicas (proteínas e polissacarídeos) com o objetivo de compará-los aos canais corticais produtores de substâncias lipofílicas, especialmente terpenos, e avaliar as modificações morfológicas durante o ciclo secretor.