

ELTON LUIZ SCUDELER

**EFEITO DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss)
NO INTESTINO MÉDIO DE *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911)
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE): ESTUDO CITOQUÍMICO,
IMUNOCITOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração:
Zoologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Carvalho dos Santos

BOTUCATU - SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss)
NO INTESTINO MÉDIO DE *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911)
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE): ESTUDO CITOQUÍMICO,
IMUNOCITOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL

ELTON LUIZ SCUDELER

Orientadora Prof^a Dr^a Daniela Carvalho dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Zoologia.

BOTUCATU - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Scudeler, Elton Luiz.

Efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural / Elton Luiz Scudeler. – Botucatu: [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Daniela Carvalho dos Santos

Capes: 20400004

1. Intestinos. 2. Inseto – Intestino médio. 3. Ultraestrutura (Biologia)

Palavras-chave: *Ceraeochrysa claveri*; Crisopídeo; Intestino médio; Morfologia; Óleo de nim.

Dedicatória

Dedico este trabalho para:

- ✓ Meus pais, **Eloi** e **Maria Luiza**, meu irmão **Eduardo** e a minha família por apoiar e estarem presentes durante todo este tempo, para que este trabalho fosse realizado. Amo vocês...

- ✓ **Profa. Daniela**, amigona, orientadora, quem me ensinou muito do que sei hoje, possibilitando um grande crescimento pessoal e profissional. Obrigado pelos ensinamentos e orientações durante esta pequena caminhada na minha formação, pois levarei comigo todos os ensinamentos passados com muito carinho!

Agradecimientos

Agradeço...

- ✓ A Deus, por dar força, sabedoria e conforto durante esta caminhada... Muito obrigado senhor.
- ✓ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 2010/03606-9).
- ✓ A Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, minha orientadora, a qual admiro muito, que sempre me apoiou em todos os momentos. Muito obrigado!
- ✓ Ao Prof. Dr. Hélio Conte e Profa. Dra. Satiko Nanya, meus primeiros orientadores, amigos que muito puderam contribuir para minha formação acadêmica, incentivando e apoiando sempre. Meu eterno agradecimento, reconhecimento e admiração. Faltam palavras para agradecer tudo que aprendi com vocês! É com muito orgulho que tenho vocês como meus primeiros orientadores, o que foi primordial para chegar aonde cheguei!
- ✓ A Profa. Dra. Daniela Oliveira Pinheiro, agradeço a amizade e dicas. Tenho profunda admiração de sua garra e competência.
- ✓ A Profa. Dra. Edy de Lello Montenegro, a qual admiro muito sua competência, profissionalismo e amizade. Agradeço nossos rápidos comentários e dicas para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Marino e Regiane do laboratório CETMA - Comércio de Agentes para Controle Biológico Ltda., Lençóis Paulista-SP, pela amizade, atenção e fornecimento das mariposas de *Diatraea saccharalis* utilizadas neste trabalho. Muito obrigado!

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica - CME/IBB:

- ✓ Ligia Barbosa Costa, nossa querida assessora, agradeço pela sincera amizade, palavras de apoio e incentivo durante estes anos. Obrigado pelo apoio nesse período!

- ✓ Claudete dos Santos Tardivo, agradeço pelo apoio e auxílio técnico, ensinamentos, companherismo e amizade. Muito obrigado!
- ✓ Tiago dos Santos Tardivo, obrigado pelo apoio e auxílio técnico, ensinamentos e amizade.
- ✓ Maria Helena Moreno, pelo apoio, auxílio, ensinamentos e sincera amizade conquistada neste período.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Morfologia do IBB:

- ✓ A Profa. Dra. Irani Quagio-Grassiotto, agradeço pela amizade e disponibilidade do uso do laboratório para confecção do material utilizado para análise em microscopia de luz. Muito obrigado.
- ✓ Aos técnicos Antônio Vicente Salvador e José Eduardo Bozano pelos ensinamentos, auxílio e apoio técnico nos processamentos e inclusão em historresina e parafina, além da amizade, muito obrigado!
- ✓ A Luciana, Dna. Têra, Dna. Iolanda, pelos serviços prestados e grande amizade construída nestes anos.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Anatomia do IBB:

- ✓ A Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, agradeço pela receptividade e disponibilidade em me ajudar durante a realização da técnica de imunocitoquímica, pela amizade e inúmeros favores prestados.
- ✓ Ao técnico Gelson Rodrigues, agradeço pela grande amizade, auxílio, apoio técnico e ensinamentos.
- ✓ As funcionárias da limpeza Edna e Dominique, agradeço a amizade construída nestes anos e inúmeros serviços prestados.
- ✓ Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do IBB, agradeço pela atenção, serviços prestados e amizade construída.

- ✓ Aos funcionários da Biblioteca, especialmente do ponto de apoio da Fapesp, Malu, Marluci e Rosângela pela ajuda nos imprevistos durante a realização deste trabalho, as quais sempre estavam disponíveis em me ajudar. Muito obrigado!
- ✓ Aos amigos e colegas construídos durante estes anos, desde a graduação até os dias atuais: Aryane, Gisele, Josiane, Joaquim, Andressa, Suzana, Júlio, Talita, Clarianna, Rinaldo, Bia, Bruno, Monique e Ana Silvia... só tenho agradecer a amizade e apoio.
- ✓ Aos amigos e inesquecíveis vizinhos Mayra, Lucas, Amanda, Ana Luisa, Renata e Giovana... fico feliz de ter tido vocês lado a lado neste período, bons momentos passamos juntos... na maioria comendo e dando risada... obrigado pelo apoio, amizade e companherismo em todos os momentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
3.2. INSTALAÇÃO DOS BIOENSAIOS.....	13
3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO INTESTINO MÉDIO.....	14
3.3.1. Técnicas para análise em Microscopia de Luz.....	14
3.3.1.1. Análise citoquímica.....	15
3.3.1.2. Análise imunocitoquímica.....	16
3.3.2. Técnicas para análise Ultraestrutural.....	17
3.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	17
3.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	17
3.3.2.2.1. <i>Preparação convencional</i>	18
3.3.2.2.2. <i>Citoquímica ultraestrutural</i>	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EPITÉLIO INTESTINAL.....	21
4.2. ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DO EPITÉLIO INTESTINAL.....	28
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: MICROSCOPIA DE LUZ.....	30
4.3. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE EPITELIAL DO INTESTINO MÉDIO.....	57
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	64

4.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EPITELIAIS	
DO INTESTINO MÉDIO.....	87
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: MICROSCOPIA ELETRÔNICA	
DE TRANSMISSÃO.....	103
5. DISCUSSÃO.....	164
6. CONCLUSÕES.....	185
7. REFERÊNCIAS.....	187
8. ANEXO.....	207

SCUDELER, E.L. Efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural. Botucatu, 2012. 228p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Ceraeochrysa claveri, popularmente conhecido como bicho lixeiro, é um inseto predador de ovos e larvas de insetos pragas encontrados em diferentes ecossistemas agrícolas. O bicho lixeiro se destaca por apresentar potencial para ser utilizado em programas de Controle Biológico, uma vez que é predador na fase de larva, apresenta curto tempo de desenvolvimento, fácil criação massal e alto potencial reprodutivo na fase adulta. Com o propósito de aprofundar o conhecimento na morfologia e ultraestrutura do intestino médio de *C. claveri*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar histológica e ultraestruturalmente o intestino médio de *C. claveri* no terceiro ínstar de larva, pupa e adulto. Objetivamos, ainda, avaliar o efeito da ingestão do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae) sobre as células epiteliais do intestino médio de larva de terceiro ínstar, pupa e adulto de *C. claveri*. Ovos de *Diatraea saccharalis* foram tratados com óleo de nim em três diferentes concentrações (0,5; 1 e 2%) e oferecidos como alimento a larvas de *C. claveri* durante todo período larval. Após coleta e fixação do intestino médio de larva, pupa e adulto (grupos controle e tratados com óleo de nim), as regiões do mesêntero (anterior, média e posterior) foram processadas para análise histológica (citoquímica e imunocitoquímica) e para análise ultraestrutural. Nossos resultados mostraram que o intestino médio de *C. claveri*, para as três fases do ciclo de vida, é do tipo pseudoestratificado, composto por células colunares, regenerativas e endócrinas; diferenças morfológicas e ultraestruturais no epitélio permitem caracterizar duas regiões, anterior e posterior, atuando respectivamente na secreção e absorção; região média apresenta características intermediárias, sendo considerada área de transição. A ingestão do óleo de nim na fase larval de *C. claveri* mostrou-se tóxica a este predador, ocasionando alterações ultraestruturais em células colunares, regenerativas, endócrinas e musculares, sendo prejudicial à integridade do epitélio intestinal. As principais lesões observadas foram células dilatadas, alterações nas microvilosidades, formação de protusões citoplasmáticas, alterações no retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, desenvolvimento de retículo endoplasmático liso, aumento do espaço extracelular do labirinto basal, formação figuras de mielina, espaços intercelulares e lise. A técnica do TUNEL não evidenciou a indução de morte celular do tipo apoptótica nos insetos tratados com óleo de nim, confirmando a ocorrência de necrose nas células epiteliais. Nossos resultados sugerem que a ingestão do óleo de nim na fase de larva induz a ocorrência de alterações celulares no epitélio do intestino médio nas três fases do ciclo de vida de *C. claveri*.

Palavras-chave: crisopídeo; *Ceraeochrysa claveri*; morfologia; intestino médio; óleo de nim

SCUDELER, E.L. Effect of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the midgut of *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): cytochemistry, immunocytochemistry and ultrastructural study. Botucatu, 2012. 228p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Ceraeochrysa claveri, popularly known as trash-carriers is a predator insect of eggs and larvae of insect pests found in different agroecosystems. The trash-carriers stands out because it has the potential to be used in biological control programs, once it is a predator in the larval stage; it has short developmental times, easy mass-rearing and high reproductive potential in adult stage. In order to deepen the knowledge on the morphology and ultrastructure of the midgut of *C. claveri*, the aim of this study was to characterize histological and ultrastructurally the midgut of *C. claveri* in the third instar larva, pupa and adult. We also evaluate the effect of ingestion of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae) on the midgut epithelial cells of third instar larva, pupa and adult of *C. claveri*. *Diatraea saccharalis* eggs were treated with neem oil at three different concentrations (0.5, 1 and 2%) and provided as food to larvae of *C. claveri* throughout the larval period. After collected and fixed the midgut of larva, pupa and adult (control and treated groups with neem oil), the midgut regions (anterior, middle and posterior) were processed for histological (cytochemistry and immunocytochemistry) and for ultrastructural analysis. Our results showed that the midgut of *C. claveri* for the three phases of the life cycle is of pseudostratified type, consisting of columnar cells, regenerative cells, and endocrine cells, morphological and ultrastructural differences in the epithelium allowed to characterize two regions, the anterior and posterior, they working mainly in the secretion and absorption respectively; the middle region has intermediate characteristics, and it is considered a transitional area. The ingestion of neem oil in the larval stage of *C. claveri* showed to be toxic to this predator, causing ultrastructural alterations on columnar cells, regenerative cells, endocrine cells and muscle cells, being detrimental to the integrity of the intestinal epithelium. The main lesions observed were swollen cells, changes in the microvilli, formation of cytoplasmic protrusions, changes in rough endoplasmic reticulum, mitochondria, development of smooth endoplasmic reticulum, increase of the extracellular space of the basal labyrinth, formation of myelin figures, intercellular spaces and lysis. The TUNEL technique did not show induction of apoptotic cell death in insects treated with neem oil, confirming the occurrence of necrosis in the midgut epithelial cells. Our results suggest that ingestion of neem oil in the larval stage induces cellular changes that occur on the midgut epithelium in the three stages of the life cycle of *C. claveri*.

Keywords: Green lacewing; *Ceraeochrysa claveri*; morphology; midgut; neem oil

1. INTRODUÇÃO

A ordem Neuroptera possui cerca de 6000 espécies distribuídas em 17 famílias, a qual exibe uma ampla diversidade morfológica e biológica. A família Chrysopidae destaca-se por ser a maior desta ordem, com aproximadamente 75 gêneros e 11 subgêneros, englobando aproximadamente 1200 espécies, além de ser a mais importante economicamente, por isso amplamente pesquisada em estudos entomológicos aplicados (ADAMS; PENNY, 1985; FREITAS, 2001; ALBUQUERQUE, 2009; PAPPAS; BROUFAS; KOVEOS, 2011).

De acordo com Albuquerque *et al.* (2001), a fauna Neotropical dessa família é uma das mais ricas do mundo, com 21 gêneros e mais de 300 espécies descritas. Esta se destaca por apresentar espécies cujos indivíduos possuem potencial para serem utilizados em programas de Controle Biológico, uma vez que são predadores na fase de larva com ampla variedade de presas, apresentam curto tempo de desenvolvimento, fácil criação massal e alto potencial reprodutivo na fase adulta (PRINCIPI; CANARD, 1984; FREITAS; PENNY, 2001; FREITAS, 2002; PAPPAS; BROUFAS; KOVEOS, 2011; HASSANPOUR *et al.*, 2011).

Por serem insetos holometábolos possuem metamorfose completa, diferindo os adultos dos hábitos e aparência das formas larvais, tendo em vista que larvas e adultos exploram diferentes nichos ecológicos. Estes insetos possuem três ínstares larvais, cuja duração depende da temperatura e do alimento consumido por estes (SANTA-CECÍLIA; SOUZA; CARVALHO, 1997; BIAGIONI; FREITAS, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Os insetos dessa família são comumente conhecidos no Brasil como crisopídeos ou bichos-lixeiros, devido ao comportamento que as larvas de muitas espécies apresentam de carregar detritos em seu dorso. Esses detritos incluem exoesqueleto de suas presas, exúvias de artrópodes, insetos mortos, fibras de origem vegetal e animal e muitos outros. Este comportamento presente em algumas espécies protege as larvas contra o ataque de inimigos naturais por meio de camuflagem ou barreira física. Detritos são mantidos presos pela ação de cerdas com pontas em forma de gancho na região dorsal do abdômen e tubérculos torácicos alongados com cerdas alongadas (GEPP, 1984; ALBUQUERQUE, 2009).

A larva é do tipo campodeiforme, possuindo corpo fusiforme com pernas ambulatórias, o que lhe confere agilidade nos movimentos e capacidade de busca por alimento. A cabeça é achatada dorsoventralmente e quitinizada, apresentando um aparelho bucal sugador mandibular. As mandíbulas e maxilas são desenvolvidas em

estruturas filiformes convergentemente curvadas e pontiagudas, tendo a mandíbula um sulco na superfície ventral que se associa com o sulco da superfície dorsal da maxila, formando um canal por onde passa o alimento (GEPP, 1984; FREITAS, 2002; ALBUQUERQUE, 2009).

Quando a larva introduz seu aparelho bucal na presa, enzimas são liberadas, ocorrendo digestão extra-oral dos tecidos da presa, que posteriormente é liquefeito e sugado para dentro da cavidade oral pela ação de uma bomba muscular. O esôfago se dilata no protórax para formar o papo, que ocupa grande parte do meso e metatórax. Papo se comunica pela válvula estomodeal com o intestino médio, que ocupa grande parte do abdômen. É no intestino médio que ocorre a maior parte da digestão e absorção de nutrientes (GEPP, 1984; FREITAS, 2002; ALBUQUERQUE, 2009).

O canal alimentar nas larvas é funcionalmente fechado entre o intestino médio e posterior, ou seja, o intestino posterior não é funcional, por isso, a larva não elimina resíduos metabólicos através do ânus e sim como mecônio dentro do casulo pupal na emergência do adulto. Em decorrência dos hábitos alimentares da larva, poucos resíduos sólidos se acumulam ao longo de seu desenvolvimento (GEPP, 1984; FREITAS, 2002; CHEN *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE, 2009).

Após o terceiro ínstar, a larva tece um casulo esférico, onde empupa. Depois de alguns dias, a pupa móvel ou farato rompe o casulo por meio de um orifício circular, fixa-se em um substrato e passa pela última ecdise, surgindo o adulto (GEPP, 1984; CANARD; PRINCIPI, 1984).

Os adultos de crisopídeos são insetos pequenos, com corpo delicado de coloração esverdeada podendo também ocorrer de coloração marrom, asas membranosas reticuladas e pernas ambulatórias normais (BARNARD, 1984; FREITAS, 2002). O tubo digestivo também apresenta adaptações no divertículo do papo, sendo este grande e altamente convoluto, associado com desenvolvidos troncos traqueais, que servem para fornecer oxigênio para o metabolismo de leveduras e bactérias simbiotes mutualísticas que se proliferam no interior desse divertículo e no restante do canal alimentar (WOOLFOLK; COHEN; INGLIS, 2004; WOOLFOLK; INGLIS, 2004; CHEN *et al.*, 2006).

Os hábitos alimentares dos adultos são variáveis, podendo algumas espécies se alimentar de pólen, exsudados açucarados de plantas, “*honeydew*”, néctar; outras podem ser predadoras (PRINCIPI; CANARD, 1984; FREITAS, 2002). Em condições laboratoriais, ovos de insetos como de *Sitotroga cerealella*, *Anagasta kuehniella*,

Diatraea saccharalis, facilmente criados em laboratório, são utilizados na maioria das vezes como alimento alternativo para as larvas de crisopídeos. Já para os adultos, uma dieta a base de mel e levedura de cerveja (1:1) é utilizada habitualmente como alimento (BIAGIONI; FREITAS, 2001; FREITAS, 2002; MANTOANELLI; ALBUQUERQUE, 2007).

A presença de crisopídeos é relatada em diferentes ecossistemas naturais e implantados. Dentre os gêneros que ocorrem no Brasil, *Ceraeochrysa* Adams (Neuroptera: Chrysopidae) contém espécies com atributos que podem torná-las predadoras importantes em vários ecossistemas agrícolas. *Ceraeochrysa* é um dos gêneros de Chrysopidae mais diversos, com 56 espécies descritas no mundo. Sua distribuição estende-se do Canadá até o norte da Argentina, mas a ampla maioria das espécies ocorre na região Neotropical (ADAMS; PENNY, 1985; FREITAS; PENNY, 2001; OSWALD, 2011). Em ecossistemas agrícolas brasileiros Freitas e Penny (2001) coletaram 15 espécies de *Ceraeochrysa*, dentre estas *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911). Atualmente, poucas pesquisas têm sido realizadas com esta espécie, as quais são concentradas nos aspectos biológicos da espécie, havendo carência de estudos morfológicos com este grupo (LAMBERT; ALBUQUERQUE, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Por serem predadores polípagos encontrados em muitas culturas de interesse econômico, os crisopídeos exercem importante papel no controle biológico, reduzindo a densidade populacional de diversos artrópodes praga. A preservação dos crisopídeos nos ecossistemas agrícolas deve ser considerada ao se estabelecer um programa de manejo de pragas. Isso dependerá da compatibilidade com outros métodos de controle, especialmente aqueles relacionados ao uso de inseticidas, por isso a necessidade de buscar e utilizar produtos seletivos a esta população de inimigo natural (CARVALHO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; BARROS *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2009; PAPPAS; BROUFAS; KOVEOS, 2011).

Uma alternativa para a substituição do uso de agrotóxicos no controle de insetos e ácaros pragas seria através da utilização de derivados de plantas com bioatividade contra artrópodes (VIEGAS Jr, 2003). Inseticidas botânicos podem servir como uma alternativa para os inseticidas sintéticos, pois eles são relativamente seguros, rapidamente degradados e bem aceitos em muitas áreas do mundo (ALMEHMADI, 2011).

Os inseticidas naturais mais avaliados são os compostos secundários da árvore nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), sendo os principais componentes biologicamente ativos do nim a azadiractina, meliantriol, limoneno, odoratone e outros triterpenoides, entre os mais de 150 compostos já isolados, que podem apresentar ação sinérgica potencializando a ação inseticida (SCHMUTTERER, 1990; SIDIQI *et al.*, 2003; MORGAN, 2009). A azadiractina, principal componente do óleo de nim, é um tetranortriterpenoide limonoide que vem sendo usado com sucesso no controle integrado de pragas nos trópicos e zonas temperadas (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002; SAITO, 2004).

Estudos realizados com o óleo de nim demonstraram que este produto pode ser eficaz para o controle de um grande número de insetos e ácaros, o qual provoca efeito antialimentar, redução do crescimento, inibição da ecdise, redução da fecundidade, anormalidades morfológicas, mortalidade e repelência, além de possuir baixíssima toxicidade ao homem e animais domésticos. A azadiractina foi um dos primeiros componentes ativos a serem isolados do nim, e já provou ser o principal ingrediente no combate aos insetos, atuando por contato ou ingestão (REMBOLD, 1989; SCHMUTTERER, 1990; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; RAIZADA *et al.*, 2001; MARTINEZ, 2002; MEDINA *et al.*, 2003; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; NDIONE *et al.*, 2007; MORGAN, 2009).

Compostos do nim como azadiractina, salanina, nimbina e 6-desacetilnimbina afetam a biosíntese de ecdisteroides, afetando de modo dose dependente a inibição da atividade da ecdisona 20-monooxigenase, enzima responsável pela conversão do hormônio ecdisônio para sua forma mais ativa fisiologicamente, 20-hidroxiecdisona (MITCHELL *et al.*, 1997). A azadiractina de modo geral interfere na função endócrina e neuroendócrina, afetando tanto a biosíntese do hormônio ecdisônio quanto do hormônio juvenil, acarretando alterações no desenvolvimento pós embrionário e no ciclo reprodutivo nos insetos (MALCZEWSKA; GELMAN; CYMBOROWSKI, 1988; REMBOLD, 1989; MEURANT; SERNIA; REMBOLD, 1994; SAYAH, 2002).

De modo geral, os inseticidas botânicos afetam de muitas formas diferentes a fisiologia dos insetos, e muitos outros modos de ação ainda precisam ser descobertos (NATHAN; CHUNG; MURUGAN, 2004). Mudanças histopatológicas causadas pela ação tóxica destes inseticidas botânicos podem ser uma alternativa para o controle de

insetos (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; AL-MEHMADI; AL-KHALAF, 2010; ROEL *et al.*, 2010).

Pesquisas vêm apontando a ação direta e indireta do nim e de seus compostos sobre espécies de insetos não alvos como crisopídeos e a outras espécies de inimigos naturais, refutando a idéia de que compostos naturais sejam mais seguros que compostos sintéticos sobre os inimigos naturais (QI; GORDON; GIMME, 2001; AHMAD; OßIEWATSCH; BASEDOW, 2003; AGGARWAL; BRAR, 2006; VENZON *et al.*, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2010)

O canal alimentar dos insetos é um tubo contínuo entre a boca e o ânus e compreende três regiões principais: o intestino anterior ou estomodeo onde o alimento pode ser armazenado, filtrado e parcialmente digerido; o intestino médio ou mesêntero onde realiza a digestão e absorção de nutrientes e o intestino posterior ou proctodeo onde pode ocorrer absorção de água, sais e formação das fezes (WIGGLESWORTH, 1965; SNODGRASS, 1993; CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2002). Em larvas de Neuroptera, o canal alimentar é fechado entre o intestino médio e posterior (GEPP, 1984; CHAPMAN, 1998).

O intestino médio, segundo maior órgão do corpo dos insetos, tem como função a produção e secreção de enzimas digestivas, absorção de água, nutrientes e manutenção da homeostase. Possui origem endodérmica, sendo um tubo de diâmetro variável formado por um epitélio simples ou pseudoestratificado, apoiado sobre uma membrana basal, em torno da qual dispõem uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais (WIGGLESWORTH, 1965; SNODGRASS, 1993; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

Na maioria dos insetos, o intestino médio apresenta uma membrana acelular chamada de matriz ou membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (no interior da membrana) e o espaço ectoperitrófico (entre a membrana e o epitélio). A membrana peritrófica é uma rede fibrosa composta principalmente por quitina, glicosaminoglicanos e proteínas (WIGGLESWORTH, 1965; TELLAM, 1996; CHAPMAN, 1998).

Várias funções são atribuídas á membrana peritrófica, tais como proteção do epitélio contra danos mecânicos e químicos provocados pelo alimento, barreira física conta microorganismos, toxinas e compartimentalização da digestão

(WIGGLESWORTH, 1965; TERRA, 1990; SNODGRASS, 1993; TELLAM, 1996; CHAPMAN, 1998).

O epitélio do intestino médio típico nos insetos é constituído, principalmente por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996). Em Lepidoptera ocorrem estes quatro tipos celulares como descrito em *Diatraea saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera exiqua* respectivamente (PINHEIRO *et al.*, 2003; LEVY *et al.*, 2004; ROST-ROSZKOWSKA *et al.*, 2008).

As células colunares, também descritas como enterócitos, células digestivas ou principais, são as mais abundantes, consideradas responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e da membrana peritrófica, além de atuarem na absorção dos produtos da digestão (SNODGRASS, 1993; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; MARANA *et al.*, 1997; CHAPMAN, 1998; KLOWDEN, 2002). Estas células normalmente apresentam núcleo alongado, superfície apical com inúmeras microvilosidades e projeções citoplasmáticas (TERRA; COSTA; FERREIRA, 2006). Ao longo do intestino médio as células colunares podem apresentar variações ultraestruturais, caracterizando regiões morfofuncionais distintas como descrito em *D. saccharalis* por Pinheiro, Quaggio-Grassiotto e Gregório (2008); em *A. gemmatalis* por Levy *et al.* (2004) e em *Brontocoris tabidus* por Fialho *et al.* (2009).

As células caliciformes recebem esta denominação por possuírem invaginação da membrana plasmática apical formando uma cavidade semelhante a um cálice, sendo esta cavidade margeada internamente por projeções citoplasmáticas semelhantes a microvilosidades, contendo mitocôndrias. Estas células estão envolvidas no processo de homeostasia iônica e absorção de metabólitos, auxiliando as células colunares desta função (SNODGRASS, 1993; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMAN, 1998).

As células regenerativas, também chamadas de “*stem cells*” são observadas isoladas, em pares ou formando grupos de regeneração (nidi), localizados na base do epitélio, tendo função de reposição de células epiteliais, devido sua capacidade massiva de proliferação, diferenciação, crescimento e desenvolvimento do intestino médio (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; HAKIM; BALDWIN; LOEB, 2001; CORLEY; LAVINE, 2006).

As células endócrinas estão localizadas na base do epitélio, sendo caracterizadas por apresentarem grande quantidade de grânulos citoplasmáticos. Algumas de suas funções estariam relacionadas com o controle hormonal dos movimentos peristálticos, regulação da síntese enzimática e secreção, controle da proliferação e diferenciação das

células regenerativas. Existem dois tipos de células endócrinas: as abertas, as quais a membrana apical forma várias microvilosidades que estão em contato com o lúmen do intestino médio e as células fechadas, as quais a membrana apical não formam microvilosidades, não estando em contato com o lúmen do intestino médio (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; SEHNAL; ZETNAN, 1996; GÜL *et al.*, 2001; ROST-ROSZKOWSKA *et al.*, 2008a).

Após o último ínstar larval, os insetos entram em metamorfose, nesta condição, células regenerativas proliferam e diferenciam em um simples epitélio cuboidal, e este epitélio pré-pupal separa do resto do epitélio larval. Uma vez no lúmen, o epitélio larval remanescente, também chamado de “*yellow body*” sofre apoptose e autofagia, permitindo a recaptura de nutrientes que estavam nele armazenados por atividade enzimática do novo epitélio pupal (UWO; UI-TEI; TAKEDA, 2002; TETTAMANTI *et al.*, 2007; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

A apoptose ou morte celular programada é definido como uma importante função celular, essencial para a morfogênese, desenvolvimento e diferenciação. Este processo é regulado geneticamente e com expressão morfológica específica, no qual células que já desempenharam suas funções têm a habilidade de se auto destruírem, por ativação de um programa suicida celular. A apoptose de células epiteliais de intestino médio em insetos pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo inibidores de síntese de RNA e proteína (PALLI *et al.*, 1996), infecção viral (GARCIA *et al.*, 2001), bacteriana (GREGORC; BOWEN, 1999), ingestão de inseticidas (GREGORC; ELLIS, 2011) e extratos vegetais como o óleo de nim (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; NDIONE *et al.*, 2007).

Foi constatado que a azadiractina presente no óleo de nim causa a vacuolização de células, danos as microvilosidades, hipertrofização de organelas e células, despolarização da actina levando a alterações no citoesqueleto e posterior apoptose (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; ANURADHA; ANNADURAI; SHASHIDHARA, 2007).

Com o crescente interesse pela sustentabilidade da agricultura, conscientização da importância de alimentos produzidos com o uso mínimo de inseticidas que são prejudiciais à saúde e o crescimento do uso da agricultura orgânica e familiar no país, conseqüentemente teremos um maior uso de inimigos naturais para o controle biológico de pragas.

A fim de respeitar e proteger estes inimigos naturais que já ocorrem em diferentes culturas comerciais, os extratos vegetais vem se mostrando ser seletivos a grande maioria destes. No entanto a ação por contato e a ingestão indireta do óleo de nim mostrou-se ser prejudicial a alguns espécimes da família Chrysopidae, entretanto, tais estudos não descrevem resultados sobre o efeito do óleo de nim na morfologia interna dos insetos que foram afetados (QI; GORDON; GIMME, 2001; AHMAD; OBIWATSCH; BASEDOW, 2003; AGGARWAL; BRAR, 2006).

Considerando a importância econômica de *C. claveri* na agricultura face aos benefícios causados por este predador nos agroecossistemas; a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito da biologia deste inseto, visando colaborar com estudos científicos direcionados a ampliar o desenvolvimento de novas metodologias de uso do controle biológico; o potencial do uso do óleo de nim no controle e repelência de insetos pragas e a inexistência de estudos sobre a morfologia e ultraestrutura do intestino médio deste inseto, pretendemos avaliar o efeito da ingestão do óleo de nim nas células epiteliais do intestino médio de *C. claveri*, já que este é o principal órgão que se relaciona direta e indiretamente com o extrato vegetal ingerido.

2. OBJETIVOS

Com objetivo de aprofundar o conhecimento na morfologia e ultraestrutura de *C. claveri* e ao mesmo tempo avaliar o efeito do óleo de nim sobre este inseto, este trabalho tem por objetivo:

- Descrever a histologia e ultraestrutura do intestino médio de larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos de *Ceraeochrysa claveri*;
- Avaliar o efeito do óleo de nim nas células epiteliais do intestino médio de larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos de *Ceraeochrysa claveri* alimentados na fase larval com ovos de *Diatraea saccharalis* tratados com óleo de nim.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

A criação de *C. claveri* foi realizada no Laboratório de Insetos, no Departamento de Morfologia do IBB, UNESP, onde foram mantidos à temperatura controlada $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 12hL:12E de fotoperíodo. As larvas foram alimentadas com ovos de *D. saccharalis*, enquanto os adultos tiveram dieta à base de levedura de cerveja e mel (1:1).

Os adultos foram criados em gaiolas transparente de polietileno, com 18 cm de diâmetro e 9 cm de altura. A superfície superior foi revestida internamente com papel sulfite branco servindo como substrato para postura dos ovos e fixação da dieta. A limpeza das gaiolas, troca da dieta e coleta de ovos eram realizadas a cada três dias. Os foram posteriormente acondicionados em caixas plásticas de 18x11x5 cm até a emergência das larvas.

Após a eclosão dos ovos, larvas eram individualizadas em potes plásticos de 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura, sendo alimentadas com ovos de *D. saccharalis*. As pupas foram mantidas no mesmo pote em que já estavam na fase larval, uma vez que os casulos ficavam aderidos à superfície do pote. Com a emergência dos adultos, estes eram retirados e colocados nas gaiolas formando casais, para manutenção da criação.

Para obtenção dos ovos de *D. saccharalis*, mariposas foram fornecidas da criação massal do laboratório do CETMA - Comércio de Agentes para Controle Biológico Ltda., Lençóis Paulista-SP. No Laboratório de Insetos, casais das mariposas eram acondicionados no interior de tubos de garrafa pet revestidos internamente com papel sulfite a fim de se obter cópula e oviposição das fêmeas em temperatura ambiente.

3.2. INSTALAÇÃO DOS BIOENSAIOS

Larvas de *C. claveri* recém emergidas foram individualizadas em potes plásticos de 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura e alimentadas durante todo o seu período larval com ovos de *D. saccharalis* de um dia, tratados em 3 diferentes concentrações do óleo de nim emulsionável (formulação comercial Natuneem[®]): 0,5%, 1,0% e 2,0% diluído em água destilada. Os ovos foram tratados através da técnica de imersão (5 s), secos a temperatura ambiente (1h) (CORREIA *et al.*, 2009) e colocados nos potes que continham as larvas. Ovos tratados foram fornecidos em abundância a larvas, sendo

que, caso após quatro dias ainda restasse ovos não predados no pote, estes eram substituídos por outros ovos tratados de um dia, uma vez que o efeito residual do óleo de nim é de cinco à sete dias (SCHMUTTERER, 1990). O controle foi realizado com larvas alimentadas com ovos de *D. saccharalis* de um dia, imersos em água destilada (5s) e secos a temperatura ambiente (1h).

3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO INTESTINO MÉDIO

Para a coleta e processamento do intestino médio foram utilizadas larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos obtidos do controle e dos três tratamentos com o óleo de nim. As larvas foram dissecadas três dias após sofrerem a ecdise para o terceiro ínstar. As pupas foram dissecadas cinco dias após o dia da pupação. Já os adultos provenientes do grupo controle e dos grupos tratados foram dissecados 1 dia após a sua emergência, sendo que, até o período da dissecação, estes adultos foram alimentados com levedura de cerveja e mel (1:1).

Os espécimes eram inicialmente resfriados para imobilização e presos com alfinetes entomológicos; com auxílio de tesoura oftalmológica foi realizado a dissecação pela região dorsal, fazendo uso de solução salina para insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) sob microscópio estereoscópico. O canal alimentar foi imediatamente pré-fixado, no local, pelo gotejamento de solução fixadora adequada. Em seguida o intestino médio foi isolado e transferido para recipiente de vidro contendo a mesma solução fixadora, para processamento posterior.

3.3.1. Técnicas para análise em Microscopia de Luz

Após a liberação das traquéias e remoção do canal alimentar, o intestino médio foi imediatamente pré-fixado no local, pelo gotejamento das soluções fixadoras:

- solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 24 horas, para amostras que foram submetidas às técnicas de coloração citoquímica;
- solução fixadora contendo formalina 10% tamponada em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 24 horas, para amostras que foram submetidas à técnica imunocitoquímica.

Estudos anatômicos também foram realizados no momento da dissecação, onde o intestino médio foi corado sobre o próprio inseto com azul de toluidina e posteriormente retirado do inseto e efetuado a documentação fotográfica em microscópio estereoscópico Olympus SZX16 com sistema de captação de imagens digital Olympus Cell D.

3.3.1.1. Análise Citoquímica

Após a fixação inicial por 24h, o material foi submetido à técnica de inclusão em metacrilato-glicol (historresina), seguindo o seguinte protocolo: desidratação em álcool etílico 70% por 24h, seguida pela passagem em álcool etílico 95% por 4h, embebição em mistura de resina (JB4 da Polysciences) e álcool etílico 95% por 4h, embebição em resina pura por 12h e embebição e inclusão em resina pura + catalisador (1: 0,04 ml), usando moldes apropriados. Após a polimerização em estufa à 37°C por 24h, os blocos foram aderidos com Araldite® em suporte de madeira.

Os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram obtidos com navalha de vidro em micrótomo Leica RM 2045, sendo colocados em estufa para melhor aderência à lâmina, sendo então submetidos às seguintes colorações citoquímicas: Hematoxilina e Eosina (H.E.) (PEARSE, 1972), Feulgen (PEARSE, 1972) para detecção de DNA e PAS (Ácido Periódico de Schiff) (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983) para detecção de polissacarídeos neutros, conforme os protocolos abaixo:

A) H.E.

- coloração com Hematoxilina de Harris (15min);
- lavagem dos cortes em água corrente (10min);
- passagem em álcool etílico 90%;
- coloração com Eosina alcoólica (5min);
- desidratação em séries crescente de álcool etílico;
- diafanização em xilol;
- montagem em meio de Permount.

B) FEULGEN

- incubar os cortes para reação com ácido clorídrico 1N* em estufa à 60°C (15min);
- detenção da hidrólise com água destilada gelada;
- lavagem dos cortes em água corrente (10min);
- incubar em Reativo de Schiff, no escuro (45min);
- lavagem dos cortes em água corrente (10min);
- coloração com verde luz 1%* (10min).
- desidratação em séries crescente de álcool etílico;
- diafanização em xilol;
- montagem em meio de Permout.

C) P.A.S.

- banhar os cortes em ácido periódico 0,5% (15min);
- incubar em Reativo de Schiff, no escuro (30min);
- coloração com Hematoxilina de Harris (8min);
- desidratação em séries crescente de álcool etílico;
- diafanização em xilol;
- montagem em meio de Permout.

Para a análise e documentação fotográfica dos cortes obtidos após a realização das técnicas citoquímicas utilizamos microscópio óptico Axioskop 40 da Zeiss com sistema de captação de imagens digital AxioVision 4.7.2.

3.3.1.2. Análise Imunocitoquímica

Após fixação inicial por 24h em formalina 10% tamponada, o material foi submetido à técnica de inclusão em parafina, seguindo o seguinte protocolo: desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. O material foi submetido ao protocolo do kit QIA33 - TdT-FragEL™ DNA Fragmentation (Calbiochem) para detecção de DNA fragmentado em células em processo de morte celular por apoptose, conforme Gavrieli *et al.* (1992). Os alvos dessa

reação foram os novos finais 3'-OH gerados pela fragmentação inter-nucleossomal do DNA durante o processo de morte celular devido a ativação de endonucleases endógenas. Esta técnica que visa a identificação de células em apoptose é conhecida como TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP nick end labelling).

A análise e documentação fotográfica foi realizada em microscópio óptico Axioskop 40 da Zeiss com sistema de captação de imagens digital AxioVision 4.7.2.

3.3.2. Técnicas para análise Ultraestrutural

3.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O intestino médio dos grupos controle e tratados foram coletados de modo a expor a sua superfície interna do intestino, ou seja, superfície luminal, sendo fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 48h e submetidos ao seguinte protocolo:

- lavagem em água destilada (3 vezes de 5min);
- pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em água destilada (30min);
- desidratação em séries crescentes de álcool etílico;
- secagem em aparelho ponto crítico CPD 020 (Balzer Union), com CO₂ líquido;
- colagem das amostras em suportes metálicos;
- metalização no aparelho SCD 050 (BAL-TEC), com camada de 10-20 nm de pó de ouro.

As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 da FEI Company, com voltagens variando de 10-12,5 KV.

3.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O intestino médio coletado dos grupos controle e tratados, previamente fixado em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 foi subdividido em região anterior, média e posterior.

3.3.2.2.1. *Preparação Convencional*

Após a fixação dos fragmentos por 24h em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, estes foram posteriormente submetidos ao seguinte protocolo:

- lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (3 vezes de 5 min);
- pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão (2h);
- lavagem em água destilada (3 vezes de 5 min);
- contrastação em bloco em solução de acetato de uranila 0,5% (2h);
- desidratação em séries crescentes de soluções de acetona;
- embebição em mistura de resina (Araldite[®]) e acetona 100% (1:1) (12h);
- embebição em resina pura em estufa a 37°C (1h);
- inclusão em resina pura e polimerização em estufa a 60°C (48h).

Cortes semi-finos (0,5µm) foram obtidos, corados à quente com solução de azul de toluidina, sendo analisados em microscópio de luz para escolha dos blocos adequados.

Após a escolha do material de interesse foram realizados cortes ultrafinos (60 – 80 nm) que foram contrastados com solução alcoólica (50%) saturada de acetato de uranila (20 min) e citrato de chumbo (20 min). As análises e documentação fotográfica das amostras foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão CM 100 da Philips.

3.3.2.2.2. *Citoquímica Ultraestrutural*

A) LIPÍDIO

Após a fixação inicial dos fragmentos, por 2h, estes foram submetidos à técnica de detecção de lipídio pelo método ósmio-imidazol, desenvolvida por Angermüller e Fahimi (1982), conforme o seguinte protocolo:

- lavagem em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (1 vez de 10 min);
- lavagem em tampão imidazol 0,1M pH 7,5 (1 vez de 10 min);
- pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% em tampão imidazol 0,1M pH 7,5* (30 min no escuro);

- lavagem em tampão imidazol 0,1M pH 7,5 (2 vezes de 10 min);
- desidratar em séries crescentes de acetona;
- inclusão em resina (Araldite[®]) conforme rotina.

* Solução estoque: tetróxido de ósmio a 4% em água; tampão imidazol 0,2M pH 7,5. Misturar 1:1 no momento da fixação, colocando primeiro o material no tampão imidazol e em seguida adicionar sob agitação, o tetróxido de ósmio.

Cortes ultrafinos (60 – 80nm) foram rapidamente contrastados em solução alcoólica saturada acetato de uranila (5 min) e citrato de chumbo (5 min). Os cortes foram analisados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão CM 100 da Philips.

4.RESULTADOS

4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EPITÉLIO INTESTINAL

O intestino médio em larva, pupa e adulto é constituído por epitélio pseudoestratificado colunar, onde identificamos dois tipos celulares: células colunares e células regenerativas. Células endócrinas também estão presentes no intestino médio, no entanto, sua visualização fica comprometida na microscopia de luz sem a utilização de técnicas específicas. O epitélio está apoiado sobre uma lâmina basal fina e circundado por células musculares. As análises histológicas mostram a existência de três possíveis regiões morfofuncionais no intestino médio, uma vez que as células apresentam diferentes morfologias nestas regiões.

LARVA

Anatomicamente, o intestino médio de *C. claveri* apresenta-se na forma de um tubo contorcido, ocupando grande parte do abdômen e com grande capacidade de distensão durante a alimentação. A região anterior mostra-se pouco dilatada, seguindo para a região média que se apresenta mais estreita e contorcida, e região posterior, representada por uma dilatação na região distal do intestino médio. Seguida a essa dilatação observa-se a inserção dos túbulos de Malpighi (Fig. 1A).

Região anterior

Em larvas controle, não tratadas com óleo de nim, o epitélio apresenta superfície basal e apical irregular com protusões citoplasmáticas de forma e tamanhos diferentes liberadas em direção ao lúmen acidófilo. As células colunares possuem formato cilíndrico, com microvilosidades na região apical constituindo uma borda estriada acidófila. O citoplasma é fracamente basófilo, vacuolizado principalmente na região basal, muitas vezes alterando o formato do núcleo. Grânulos acidófilos podem ser encontrados na região apical das células. O núcleo é ovalado, geralmente situado na região média da célula, apresentando predomínio de cromatina pouco condensada homogeneamente dispersa (Figs. 1B e C). Grânulos PAS – positivo ocorrem em todo o citoplasma, predominando no interior das protusões citoplasmáticas e nas regiões média e apical das células colunares (Fig. 2E).

Células regenerativas ocorrem em grupos ou isoladas e aparecem na base do epitélio. São pequenas, de formato arredondado, oval ou levemente alongadas, com

citoplasma fortemente basófilo. Seu núcleo acompanha a morfologia da célula, com cromatina pouco condensada (Figs. 1B e C). Poucas células apresentaram grânulos PAS – positivo, estando estes situados na região apical das células (Fig. 2E).

Em larvas tratadas com óleo de nim as células colunares apresentaram-se mais alongadas, com região apical dilatada e com protusões citoplasmáticas, tornando a superfície apical do epitélio mais irregular em relação ao grupo controle. Citoplasma mostrou-se basófilo, com maiores quantidades de vacúolos nas regiões basais e médias. Núcleos apresentam-se ovais, mais basófilos em relação às larvas controle (Figs. 1D, E, F e G). Com o aumento das concentrações de óleo de nim utilizadas nos tratamentos, houve aumento nos alongamentos, dilatações apicais, vacúolos e diminuição crescente na quantidade de grânulos PAS – positivo no citoplasma das células colunares (Figs. 2F, 3A e B).

No tratamento com 1 e 2% de óleo de nim lises puderam ser observadas (Figs. 1E e 2A). Já no tratamento com 2% de óleo de nim, os núcleos das células colunares são menores, possuem formato oval ou de meia lua devido ao acúmulo de vacúolos na região basal das células, são mais basófilos, com cromatina descondensada (Fig. 2B). Núcleos maiores, dilatados com cromatina condensada na periferia do envoltório nuclear também puderam ser observados em algumas células colunares (Figs. 2C e D). Em alguns pontos, as células epiteliais apresentam um desarranjo na sua estrutura, com espaçamento entre as membranas laterais (Fig. 2B). Além deste espaçamento intercelular, também foi possível observar espaçamento entre a região basal de células colunares e lâmina basal (Fig. 1G).

Região média

No grupo controle as células colunares mostram citoplasma vacuolizado, com grandes vacúolos na região apical e pequenos vacúolos na região basal. O formato celular varia de colunar a cúbico, de acordo com a distensão do epitélio, por caracterizar-se uma região levemente contorcida. A superfície apical do epitélio é mais regular do que na região anterior, apesar de também ocorrer protusões citoplasmáticas. Os núcleos são ovais, presentes na região média das células, apresentando cromatina pouco condensada (Fig. 3C). Grânulos PAS – positivo ocorrem na região média e apical das células colunares, mas em menor quantidade em relação às células da região anterior (Fig. 4C). Células regenerativas também estão presentes na base do epitélio, não apresentando diferenças em relação às células regenerativas da região anterior (Fig. 3C).

No tratamento com 0,5% de óleo de nim, as células colunares apresentaram aumento no número de vacúolos na região média e apical, dificultando a observação dos limites citoplasmáticos (Fig. 3D). Maiores quantidades de grânulos PAS- positivo estão presentes nas regiões basais e médias (Fig. 4D). Poucas células regenerativas foram constatadas nesta região.

Já no tratamento com 1% células colunares sofreram alongamento, com presença de grandes vacúolos na região média e apical, conferindo aspecto irregular ao núcleo (Fig. 3E). Dilatações na região apical e protusões citoplasmáticas foram freqüentes. Poucos grânulos PAS- positivo foram observados na região média e apical das celulares colunares (Fig. 4E).

Com 2%, células colunares mostraram-se alongadas, com citoplasma bastante vacuolizado, com grânulos e dilatações na região apical. Lise foi detectada, assim como volumosos núcleos com grânulos cromatina condensada ao redor do envoltório nuclear. Os núcleos são menores e ovais com cromatina descondensada. Separação entre membranas laterais semelhante à região anterior também foram registradas (Figs. 3F, 4A e B). Grânulos PAS – positivo ocorreram de modo esparsos, acumulando entre os vacúolos existentes na região média e apical (Fig. 4F).

Região posterior

No grupo controle as células colunares possuem formato cúbico, com superfície basal e apical regulares. O citoplasma da região basal é bastante vacuolizado, enquanto que o núcleo esférico localiza-se na região média das células, com cromatina descondensada. Células regenerativas estão presentes na base do epitélio (Fig. 5A). Grânulos PAS – positivo ocorrem na região basal das células colunares. (Fig. 5E). Conteúdos alimentares envoltos por membrana peritrófica basófila e PAS- positiva acumulam-se desta região do intestino (Figs. 5A e E).

Para o tratamento com 0,5% a superfície basal das células colunares mostrou-se mais irregular, acompanhando o aumento de vacúolos na região média e apical das células (Fig. 5B). Poucos grânulos PAS – positivo estão presentes na região basal e média das células colunares (Fig. 5F). Não houve alterações na freqüência de células regenerativas.

Já para os tratamentos a 1 e 2% as células colunares apresentaram dilatações na região apical, a qual observa-se acúmulo de grânulos, citoplasma com maior número de vacúolos, principalmente na região média, sendo que, na concentração de 2% esta acarretou maior número de vacúolos (Figs. 5C e D). Poucos grânulos PAS – positivo

foram observados no tratamento de 1 e 2%, estando estes acumulados na região basal e média das células (Fig. 5G e H). Lises ocorreram no tratamento a 2%, observando semelhança quanto ao aspecto e coloração entre o conteúdo citoplasmático destas células e o conteúdo existente no lúmen (Figs. 5D).

Em larvas de *C. claveri*, observa-se que independente do tratamento utilizado as células regenerativas não sofreram alterações perceptíveis nas análises histológicas. Com relação às mudanças histopatológicas decorrentes dos tratamentos, alterações mais intensas foram constatadas nas células colunares, tais como: alta vacuolização citoplasmática, alongamento, dilatação e formação de protusões citoplasmáticas, distanciamento entre células e lâmina basal, núcleos com cromatina condensada, lises, diminuição significativa de grânulos PAS – positivo proporcional ao aumento das concentrações do óleo de nim, indicando deste modo a ocorrência de toxicidade deste óleo por ingestão ao epitélio larval de *C. claveri*.

PUPA

O epitélio larval de *C. claveri* é trocado inteiramente na metamorfose, sendo possível observar no quinto dia de pupação este epitélio na cavidade intestinal sofrendo progressiva degeneração, apresentando células com citoplasma acidófilo e altamente vacuolizado, núcleos com formatos irregulares e condensados. No lúmen, a membrana peritrófica foi positiva ao PAS e poucos grânulos PAS – positivo ocorrem no epitélio larval em degeneração. Um novo epitélio, no caso pupal, é visto abaixo do epitélio larval limitando a cavidade intestinal (Fig. 6A).

Região anterior

Em pupas obtidas de larvas não tratadas com óleo de nim as células colunares são cilíndricas, apresentam superfície basal irregular, citoplasma pouco basófilo, com pequenos vacúolos no citoplasma basal e escassos vacúolos na região média e apical; grânulos estão presentes na região média e apical. Protusões citoplasmáticas também ocorrem freqüentemente. O núcleo esférico está localizado preferencialmente na região basal das células com grânulos homogêneos de cromatina dispersos (Fig. 6B). A reação com PAS indicou a presença de uma grande quantidade de grânulos PAS – positivo na região apical e em menor quantidade na região basal (Fig. 6F). Poucas células regenerativas foram observadas nesta região no intestino médio.

Pupas resultantes de larvas tratadas com óleo de nim apresentaram células colunares com formato cúbico, aumento de irregularidades no contorno da região basal, aumento no acúmulo de vacúolos e de grânulos com o aumento das concentrações utilizadas nos tratamentos com óleo de nim (Figs. 6C, D e E). O mesmo foi observado para grânulos PAS – positivo (Figs. 6G, H e I).

Região média

Células colunares de pupas controle possuem formato cúbico, com superfície basal e apical regulares, citoplasma pouco basófilo e com grânulos na região média e apical. Grandes núcleos esféricos são localizados preferencialmente na região basal das células, apresentando cromatina descondensada (Fig. 7A). Poucos grânulos PAS – positivo ocorrem nas regiões apical e média das células (Fig. 7D).

Pupas dos tratamentos com nim apresentaram células colunares com formato pavimentoso, núcleos ovais e mais condensados, além de maiores quantidades de grânulos PAS- positivo nas regiões média e apical (Figs. 7B e C). Também foi possível constatar aumento gradativo de grânulos PAS - positivos com aumento das concentrações utilizadas de óleo de nim.

Região posterior

As células colunares de pupas controle são cúbicas, com superfície basal regular, citoplasma pouco basófilo e com grânulos nas regiões média e apical. Vacúolos podem estar presentes na região média e apical, estando o núcleo esférico na região basal. A reação com PAS evidenciou grânulos PAS – positivos principalmente na região apical e média (Figs. 7E e F)

A principal alteração nas células colunares nos tratamentos foi em relação à quantidade de grânulos PAS- positivo, que semelhante as outras regiões do epitélio, houve um aumento na região apical e média, sendo este aumento proporcional as concentrações de óleo de nim utilizadas (Fig. 7G).

Semelhante aos resultados obtidos na fase de larva, as modificações histopatológicas foram mais intensas nos tratamentos com maiores concentrações do óleo de nim, sendo constatada alterações no formato das células colunares na região anterior e média, e aumento de grânulos PAS – positivo em todas as regiões do epitélio pupal.

ADULTO

Morfologicamente, o intestino médio em adultos apresenta-se sendo um tubo alongado (Fig. 8A) localizado no abdômen, tendo sua parede formada por um epitélio pseudoestratificado e externamente envolto por camada de células musculares organizadas em uma túnica circular interna e outra longitudinal externa. O lúmen acidófilo apresenta varias camada de membrana peritrófica organizadas de modo paralelo (Fig. 8B). Devido às diferentes alterações morfológicas observadas ao longo do intestino médio nos tratamentos, três regiões morfofuncionais foram caracterizadas.

Região anterior

Em adultos resultantes de larvas controle apresentaram células colunares basófilas, com borda estriada acidófila, região apical com grânulos e vacúolos, além de protusões citoplasmáticas. A região basal apresenta contorno regular, núcleos esféricos e centrais, com cromatina homogeneamente dispersa (Fig. 8B). Não foram constatados grânulos PAS – positivo nas células, enquanto que a lâmina basal e as várias camadas da membrana peritrófica reagiram positivamente ao PAS (Fig. 9A).

Vários ninhos de células regenerativas estão presentes, apresentando estas células citoplasma fortemente basófilo, com o núcleo acompanhando a morfologia das células, que variam de prismático a ovalado. (Fig. 8B).

Em adultos obtidos de larvas dos três tratamentos com óleo de nim constatamos a formação de dobras no epitélio (Figs. 8C e E). No tratamento a 0,5% as células colunares apresentaram núcleos picnóticos, com cromatina condensada na periferia do envoltório nuclear (Fig. 8D), além da presença de pequenos grânulos PAS – positivo no citoplasma (Fig. 9B), grânulos que não foram observados em adultos controle.

Para o tratamento a 1% as dobras epiteliais são acompanhadas por células colunares são mais alongadas (Fig. 8E). Já no tratamento a 2% visualizamos desprendimento das microvilosidades (Fig. 8F).

Região média

Para o grupo controle as células colunares desta região são semelhantes ao da região anterior, tendo como diferenças maior acúmulo de grânulos na região apical (Fig. 9C) e a presença de poucos grânulos PAS – positivo (Fig. 10D).

Em adultos obtidos de larvas tratadas a 0,5% de óleo de nim, vários grânulos acidófilos ocorreram no citoplasma, além do desprendimento da superfície apical com as microvilosidades em direção ao lúmen (Fig. 9D); células colunares apresentaram

núcleos pequenos na região apical, com grânulos de cromatina condensados na periferia do envoltório nuclear (Fig. 9E). Aumento significativo de grânulos PAS – positivo foi observado nas células colunares (Fig. 10E).

Nos indivíduos obtidos do tratamento a 1% foi observada a presença de dobras no epitélio, células colunares mais alongadas e separação entre as membranas laterais das células colunares. Células regenerativas são alongadas, acompanhando o alongamento das células colunares (Fig. 9F).

Com 2% de óleo de nim, as células do epitélio apresentaram grandes espaços intercelulares formados devido à separação entre as membranas laterais, células colunares contendo grandes quantidades de vacúolos ao redor do núcleo e na região apical, além de grande acúmulo de grânulos pigmentados (Fig. 10A). Também foram constatadas a presença de núcleos picnóticos com formato irregular e grânulos de cromatina condensados preferencialmente na periferia do envoltório nuclear (Fig. 10B). Lises também puderam ser diagnosticadas, assim como a presença de várias camadas de membrana peritrófica desorganizadas no lúmen (Fig. 10C). Vários grânulos positivos ao PAS puderam ser identificados neste tratamento, assim como a lâmina basal mais espessa (Fig. 10F).

Região posterior

Adultos controle apresentaram células colunares cúbicas com superfície apical e basal com contorno regular, além de borda estriada acidófila (Fig. 11A). Pequenos grânulos PAS – positivo foram visualizados na região média e apical das células colunares (Fig. 11E).

Para os tratamentos com óleo de nim as células colunares desta região apresentaram maiores acúmulo de grânulos pigmentados e vacúolos nas regiões média e apical, aumentando proporcionalmente com as concentrações usadas nos tratamentos. Para o tratamento a 0,5% ocorreram irregularidades na borda estriada e alguns núcleos com cromatina condensada na periferia do envoltório nuclear (Fig. 11B).

Para 1% as células colunares e regenerativas são alongadas, com maiores depósitos de grânulos e vacúolos na região média e apical das células colunares e ocorrência de várias protusões citoplasmáticas (Fig. 11C). Já a 2% ocorreram separações entre as células e grande acúmulo de grânulos na região apical das células colunares (Fig. 11D). Maiores quantidades de grânulos positivos ao PAS também puderam ser verificados, além da lâmina basal mais espessa (Fig. 11F).

Semelhante a fase de pupa, os adultos não tendo contato com o óleo de nim, a sua ingestão na fase de larva ocasionou alterações histológicas severas, que afetaram a integridade deste epitélio. Dentre as alterações constatadas podemos citar a formação de dobras no epitélio; espaços intercelulares; protusões citoplasmáticas; desprendimento das microvilosidades e aumento de grânulos PAS – positivo.

4.2. ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DO EPITÉLIO INTESTINAL

A reação de TUNEL revelou claramente um padrão distinto de coloração nuclear, obtendo como produto da reação uma coloração marrom, indicando reação DAB – positivo. A reação marcou de forma direta e específica a fragmentação do DNA em núcleos em processo de morte celular do tipo apoptótico.

LARVA

Núcleos de células colunares e musculares do epitélio intestinal de larvas controle e tratadas apresentaram reação TUNEL – positivo, não sendo constatada a indução de morte celular programada nas células epiteliais das larvas submetidas ao tratamento com óleo de nim (Figs. 12A, B, C e D). Observamos que a morte celular ocorre principalmente nas células colunares (Figs. 12B e D), não havendo uma região específica ao longo do intestino médio onde se concentrou maior número de células em processo de morte celular. Não foi constatado reação TUNEL – positivo em núcleos de células regenerativas.

PUPA

O epitélio pupal reagiu de modo semelhante ao da fase anterior, poucas células colunares apresentaram núcleos com reação TUNEL – positivo. Oposto a este dado, o epitélio larval em degeneração no lúmen do intestino médio apresentou vários núcleos TUNEL – positivo, assim como núcleos TUNEL – negativo, principalmente na região anterior e posterior do intestino, onde se acumula a maior quantidade de células do epitélio larval em degeneração (Figs. 12E e F).

O tratamento com óleo nim na fase de larva não induziu morte celular na fase de pupa, ocorrendo de modo semelhante ao controle, onde poucos núcleos TUNEL – positivo ocorrem no epitélio pupal e vários no antigo epitélio larval em degeneração (Figs. 13A e B). Poucos núcleos de células regenerativas apresentaram reação TUNEL – positivo (Fig. 13C).

ADULTO

Somente núcleos de células colunares apresentaram reação TUNEL – positivo não havendo diferença entre adultos controle e adultos obtidos de larvas tratadas com óleo de nim, constatando maiores números de células em morte celular na região anterior e média do intestino médio (Figs. 13D, E, F e G).

De modo geral, poucos núcleos apresentaram reação positiva ao TUNEL, tanto em indivíduos controle como tratados com óleo de nim nas diferentes fases de vida avaliada. A análise em microscopia de luz convencional indicou algumas células com possíveis aspectos morfológicos de morte celular (Figs. 2D, 4A, 8D, 9E), que puderam ser confirmadas pela reação de TUNEL.

Acreditamos que as alterações celulares ocasionadas pelo tratamento com óleo de nim nas diferentes concentrações avaliadas acarretem morte celular por necrose, morte não evidenciada pela reação de TUNEL.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: MICROSCOPIA DE LUZ

FIGURA 1**FOTOMICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Anatomia do intestino médio de larvas de *C. claveri*. Região anterior (Ra), região média (Rm) e região posterior (Rp) com inserção dos túbulos de Malpighi (Tm). Barra = 500 µm.
- B – C. Cortes longitudinais da região anterior do intestino médio de larvas controle, apresentando células colunares (Co) fracamente basófilas, com borda estriada acidófila (B), protusões citoplasmáticas (P) liberadas em direção ao lúmen (L) acidófilo, vacúolos (V) na região basal, grânulos acidófilos (G) na região apical e núcleos (N) ovais situados preferencialmente na região média das células. Grupos de células regenerativas (Cr) na base do epitélio. Feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barras = 20 µm. Coloração: H.E.
- D. Corte longitudinal da região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 0,5%. Células colunares (Co) alongadas, com região apical dilatada (D) e com protusões citoplasmáticas (P). Aumento na quantidade de vacúolos (V) nas regiões basal e média das células colunares. Núcleo (N); lúmen do intestino (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- E – F. Cortes longitudinais da região anterior do intestino médio de larvas tratadas com nim a 1,0%. Células colunares (Co) alongadas, com maiores quantidades de vacúolos (V) na região basal e média em relação aos tratamentos anteriores. Ocorrência de lise (Li) em células colunares. Protusões citoplasmáticas (P); núcleo (N); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); dilatação (D); células regenerativas (Cr). Barras = 20 µm. Coloração: H.E.
- G. Corte longitudinal da região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 2,0%. Células colunares (Co) alongadas, com citoplasma preenchido por vacúolos (V). Núcleo (N); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); dilatações apicais (D); separação entre célula colunar e lâmina basal (►); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.

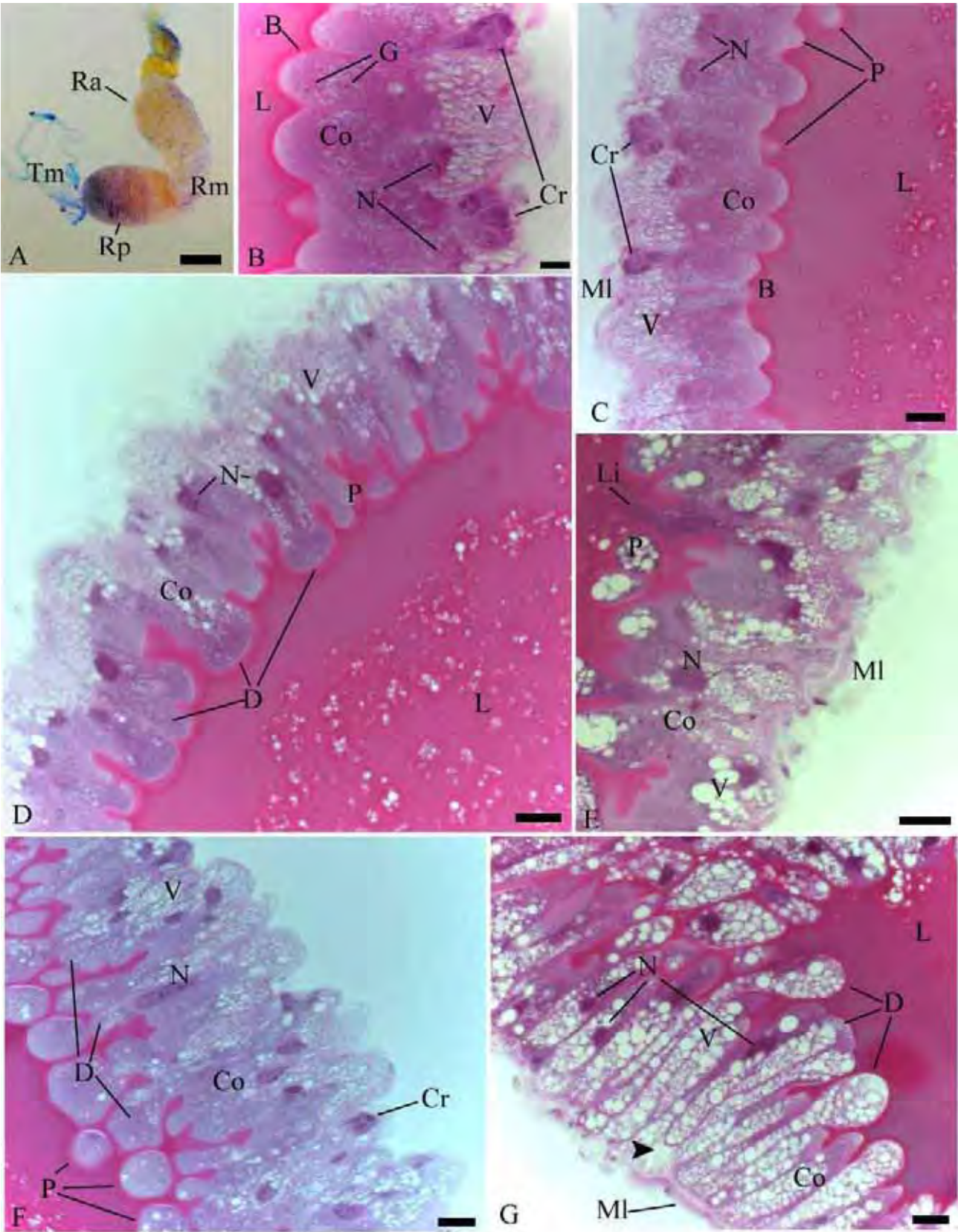


FIGURA 2

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A – D. Larvas tratadas com nim a 2,0%. Lise (Li) em células colunares (Co). Núcleo (N); vacúolos (V); membrana peritrófica (Mp); lúmen (L); protusões citoplasmáticas (P), dilatação (D); separação entre células (►); células regenerativas (Cr); feixes de fibras musculares circular (Mc) e longitudinal (Ml); núcleos com cromatina condensada (→). Barras = 20 µm. Colorações: H.E.: A - C; Feulgen: D.
- E. Larva controle. Predomínio de grânulos PAS- positivo (G) em protusões (P), região apical e média de células colunares (Co). Células regenerativas (Cr) apresentaram poucos grânulos, localizados na região apical das células. Núcleo (N); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- F. Região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 0,5%. Diminuição na quantidade de grânulos PAS – positivo (G) nas células colunares (Co), ocorrendo grânulos nas regiões médias e basais das células colunares. Lúmen (L); dilatações (D); núcleo (N); células regenerativas (Cr). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

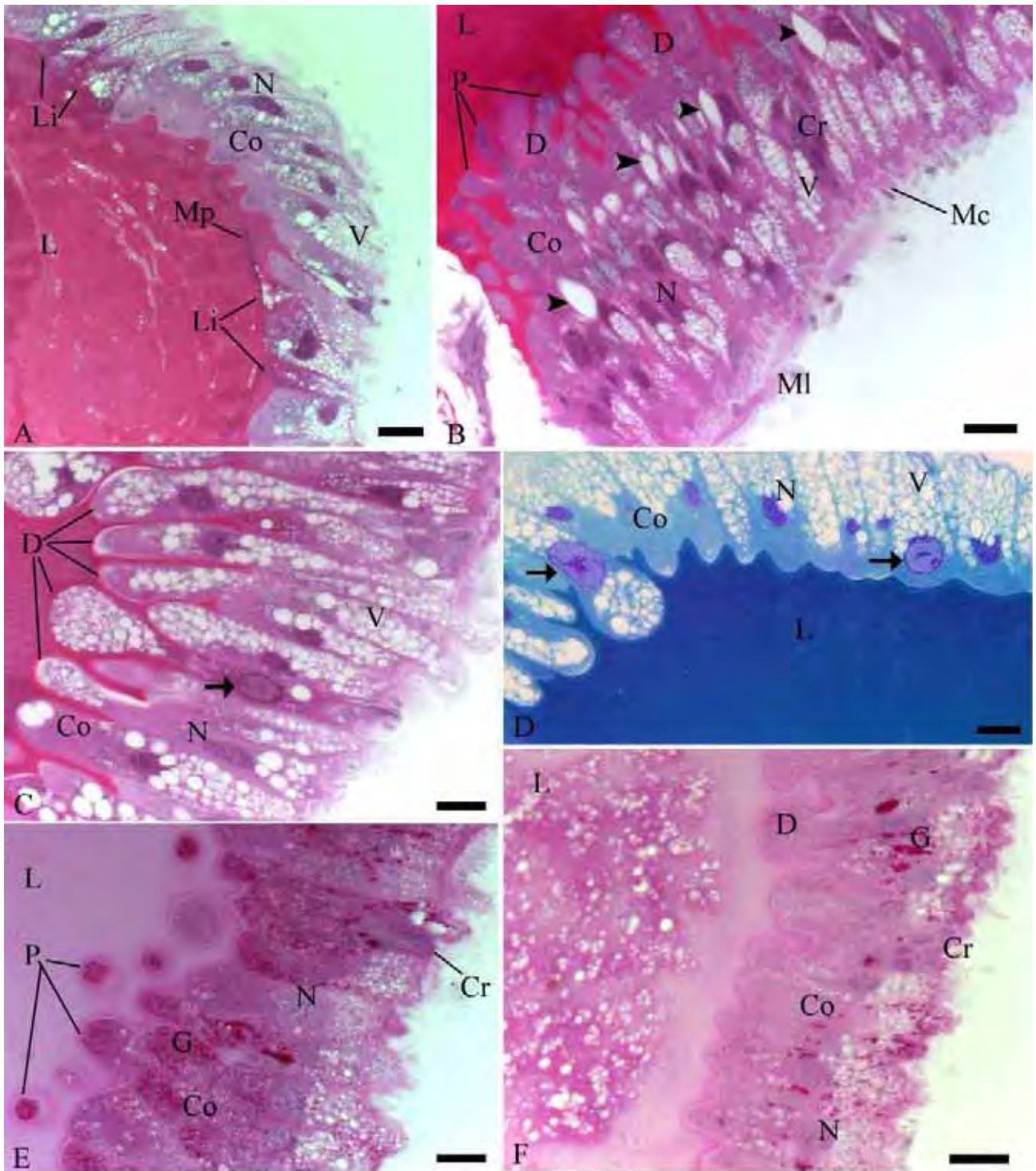


FIGURA 3

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 1,0%. Grânulos PAS –positivo (G) concentrados na região média das células colunares (Co). Lúmen (L); dilatações (D); núcleo (N); vacúolos (V); células regenerativas (Cr). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- B. Região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 2,0%. Poucos grânulos PAS –positivo (G) concentrados na região média e apical das células colunares (Co). Lúmen (L); núcleo (N); vacúolos (V); separação entre células (►); feixe de fibras musculares circular (Mc). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- C. Região média do intestino médio de larva controle. Células colunares (Co) com pequenos vacúolos (V) na região média e basal e grandes vacúolos na região apical. Lúmen (L); núcleo (N); célula regenerativa (Cr), feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- D. Região média do intestino médio de larva tratada a 0,5% com óleo de nim. Células colunares (Co) com aumento no número de vacúolos (V) citoplasmáticos o que dificulta a observação dos limites citoplasmáticos. Núcleo (N); células regenerativas (Cr); membrana peritrófica (Mp); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- E. Região média do intestino médio de larva tratada a 1,0% de óleo de nim. Grandes vacúolos (V) citoplasmáticos na região média ao redor dos núcleos (N) das células colunares (Co). Membrana peritrófica (Mp); lúmen (L); borda estriada acidófila (B). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- F. Região média do intestino médio de larva tratada a 2,0% de óleo de nim. Células colunares (Co) alongadas, com muitos vacúolos (V) no citoplasma. Ocorrência de lise (Li) de células colunares nesta concentração. Lúmen (L); núcleo (N); feixe de fibras musculares circular (Mc). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.

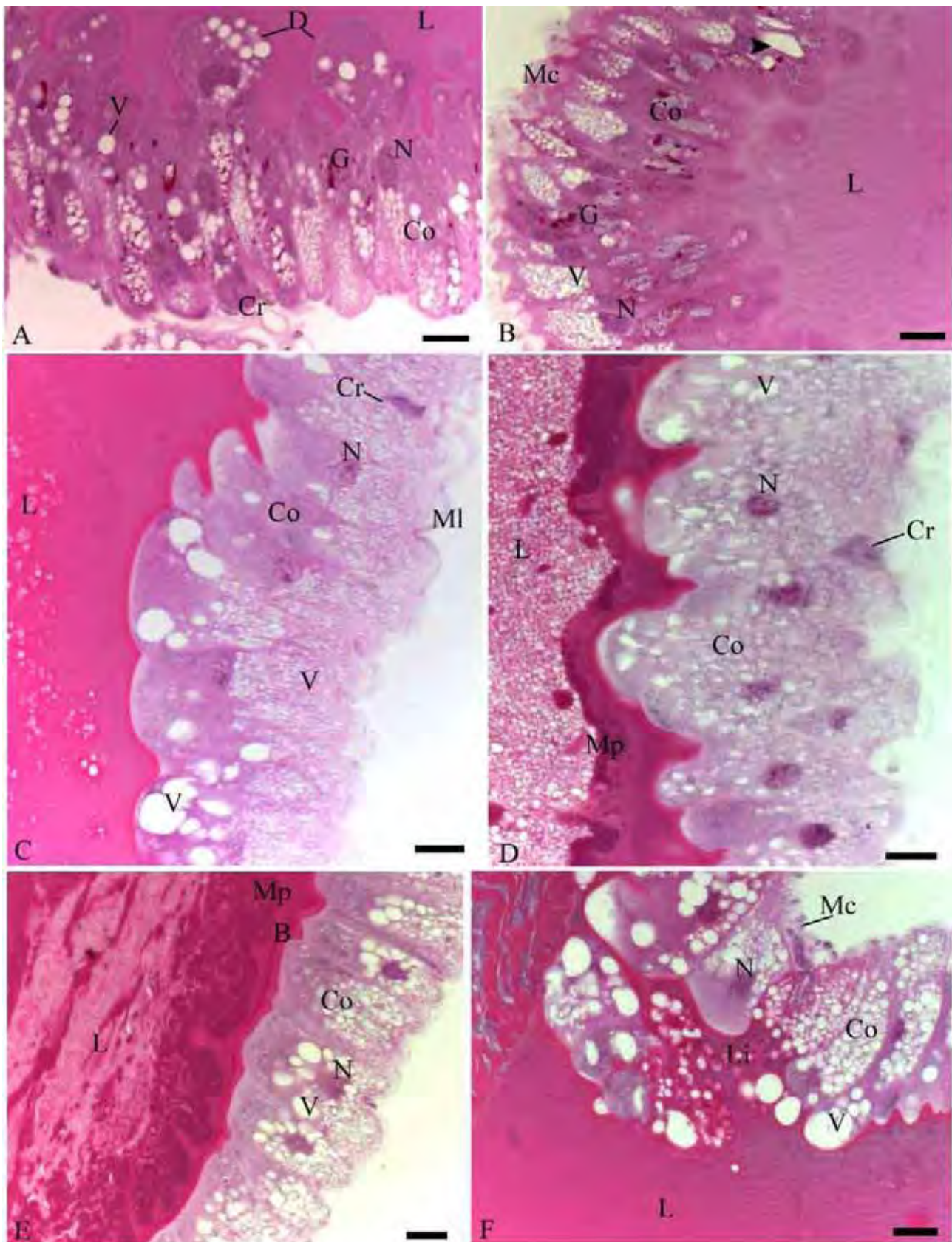


FIGURA 4

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Larva tratada com óleo de nim a 2,0%. Presença de célula colunar (Co) com cromatina condensada ao redor do envoltório nuclear (→). Vacúolos citoplasmáticos (V); grânulos (G) na região apical; borda estriada acidófila (B); feixes de fibras musculares longitudinal (Ml); espaço luminal (L); núcleo (N). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- B. Larva tratada com óleo de nim a 2,0%. Espaçamento entre as membranas laterais (►) das células colunares (Co), as quais apresentam grande quantidade de vacúolos (V) citoplasmáticos e de grânulos (G) próximo aos núcleos (N). Feixes de fibras musculares circular (Mc) e longitudinal (Ml); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- C. Larva controle. Presença de grânulos PAS – positivo (G) na região média e apical de células colunares (Co). Vacúolos citoplasmáticos (V). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- D. Larva tratada com nim a 0,5%. Aumento em relação às larvas controle na quantidade de grânulos PAS – positivo (G) nas células colunares (Co). Núcleo (N); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- E. Larva tratada com nim a 1,0%. Poucos grânulos PAS – positivo (G) nas células colunares (Co). Vacúolos (V); dilatações apicais (D); núcleo (N); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- F. Larva tratada com nim a 2,0%. Grânulos PAS – positivo (G) entre os vacúolos (V) citoplasmáticos nas células colunares (Co). Lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

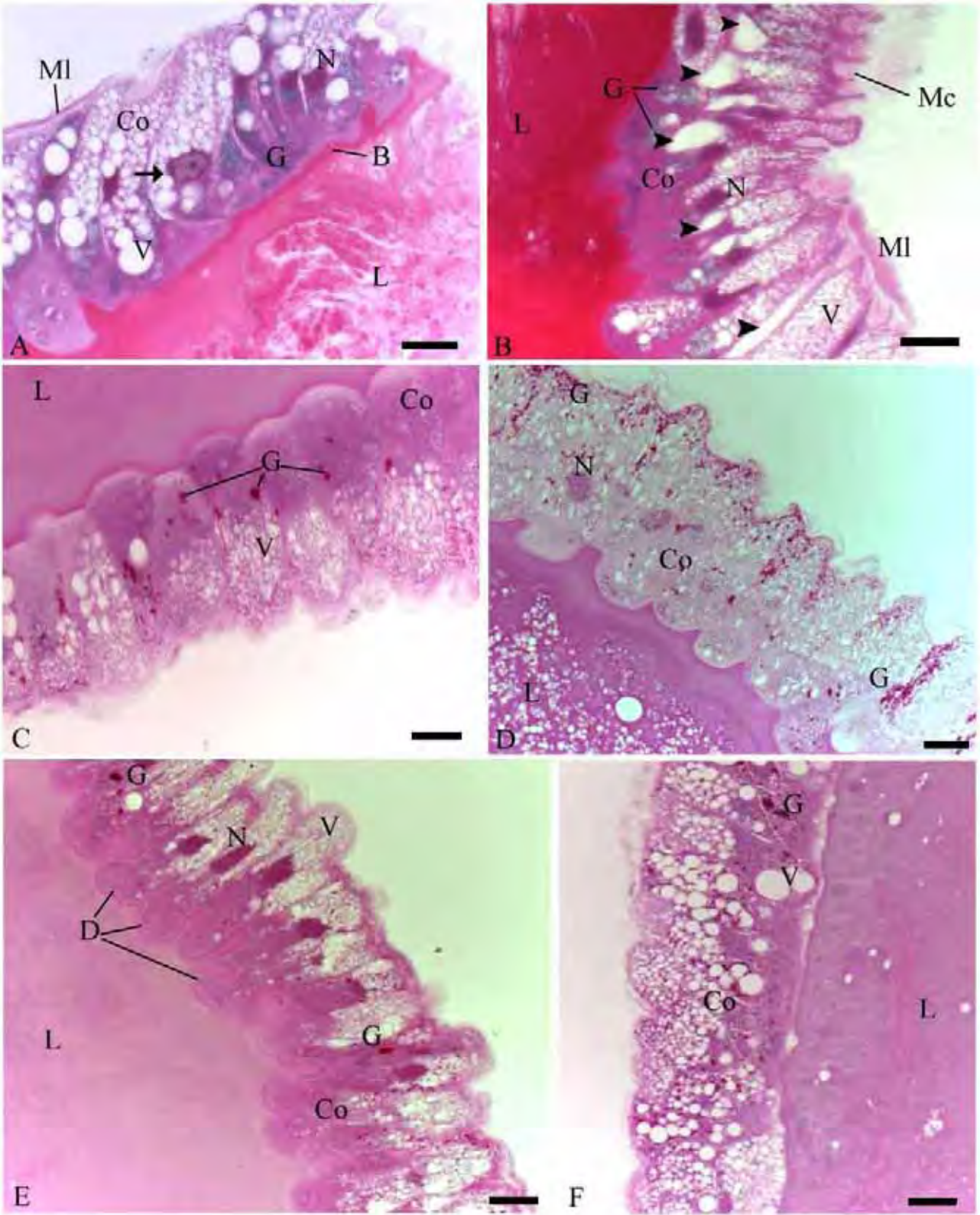


FIGURA 5**FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Larva controle. Células colunares (Co) cúbicas, com superfície basal e apical com contornos regulares, vacúolos (V) na região basal e núcleo (N) esférico na região média. Células regenerativas (Cr) na base do epitélio. Feixes de fibras musculares circular (Mc); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- B. Larva tratada a 0,5%. Células colunares (Co) com contorno da região basal mais irregular e presença de maiores vacúolos (V). Células regenerativas (Cr); núcleo (N); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- C. Larva tratada com 1,0% de óleo de nim. Dilatações (D) na superfície apical das células colunares (Co), seguido com aumento de vacúolos (V) no citoplasma. Feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); células regenerativas (Cr); núcleo (N); grânulos (G); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- D. Larva tratada com 2,0% de óleo de nim. Dilatações (D) na superfície apical das células colunares (Co), aumento de vacúolos (V) e ocorrência de lise (Li). Núcleo (N); grânulos (G); espaço ecto (Ec) e endoperitófico (Ed); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- E. Larva controle. Detalhe da presença de grânulos PAS –positivo (G) na região basal das células colunares (Co). Protusão citoplasmática (P); núcleo (N); grânulos pigmentados (*); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- F. Larva tratada a 0,5% de óleo de nim. Leve decréscimo na quantidade de grânulos PAS – positivo (G) na região basal das células colunares (Co). Vacúolos (V); núcleo (N); grânulos pigmentados (*); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- G. Larva tratada a 1,0% de óleo de nim. Grânulos PAS – positivo (G) na região média das células colunares (Co). Vacúolos (V); células regenerativas (Cr); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); dilatações apicais (D); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- H. Larva tratada a 2,0% de óleo de nim. Grânulos PAS – positivo (G) na região média das células colunares (Co). Vacúolos (V); núcleo (N); grânulos pigmentados (*); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); membrana peritrófica (Mp); espaço luminal (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

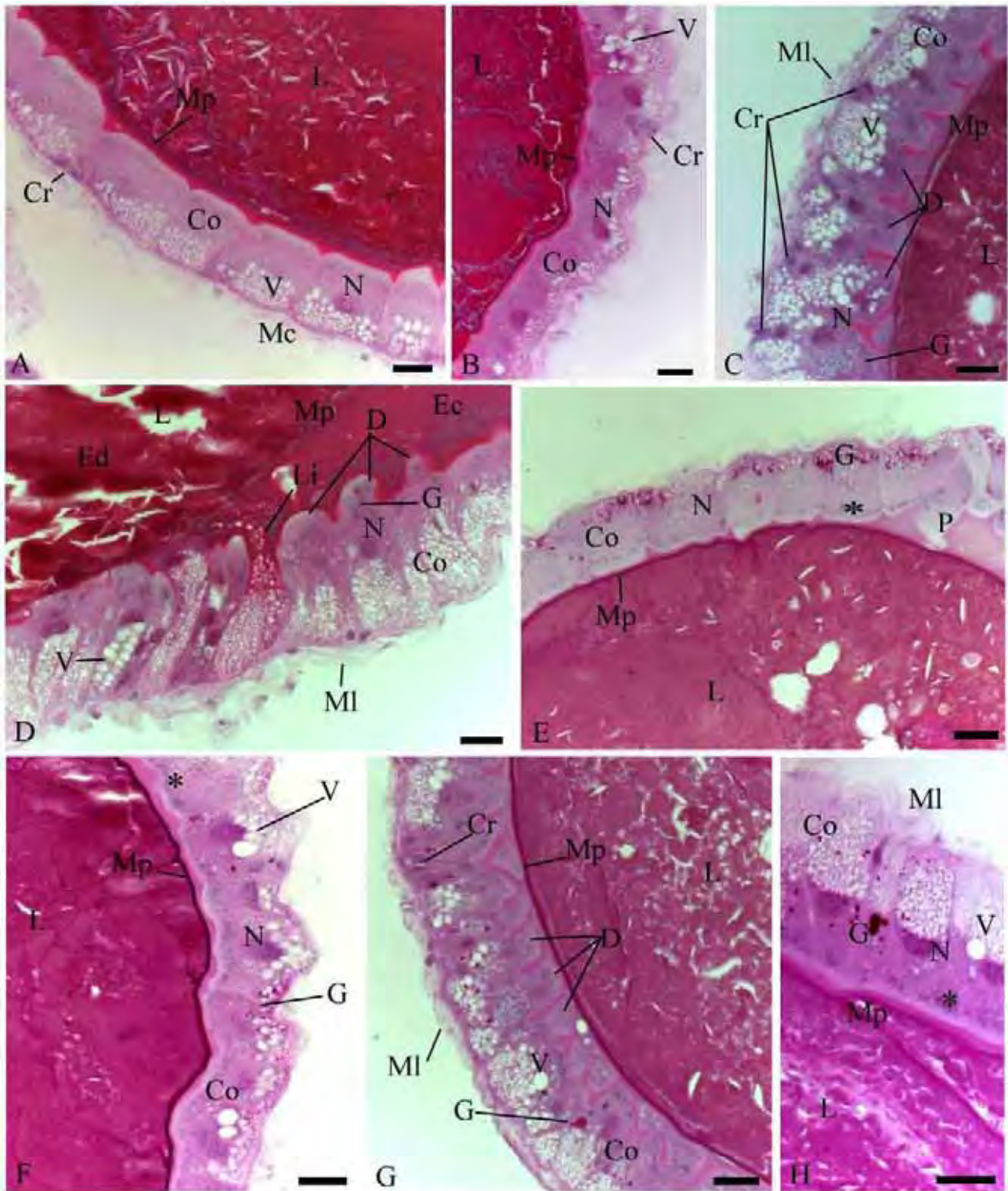


FIGURA 6

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Pupa controle. Região anterior (Ra), média (Rm) e posterior (Rp) apresentando o antigo epitélio larval (El) em processo de degeneração na cavidade intestinal, a qual é delimitada pelo novo epitélio pupal (Ep). Barra = 100 μ m. Coloração: PAS.
- B. Região anterior do intestino médio de pupa controle. Células colunares (Co) cilíndricas, com citoplasma pouco basófilo, com escassos vacúolos (V) na região apical e média, grânulos (*) na região média e apical, núcleo (N) esférico descondensado na região basal. Protusões citoplasmáticas (P) estão presentes em direção ao lúmen (L). Feixes de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 μ m. Coloração: H.E.
- C. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 0,5%.
- D. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 1,0%.
- E. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Irregularidades no contorno da região basal das células colunares (Co), acompanhado pelo aumento de grânulos (*) e de vacúolos (V). Núcleo (N); feixes de fibras musculares longitudinal (Ml); epitélio larval (El). Barras = 20 μ m. Colorações: H.E.
- F. Região anterior do intestino médio de pupa controle. Detalhe da presença de grânulos PAS – positivo (G) na região apical das células colunares (Co). Grânulos pigmentados (*); vacúolos (V); epitélio larval (El). Barra = 20 μ m. Coloração: PAS.
- G. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 0,5%.
- H. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 1,0%.
- I. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Reação com PAS indicou que o aumento nas concentrações utilizadas de óleo de nim resultou em aumento no acúmulo de grânulos PAS – positivo (G) por todo citoplasma das células colunares (Co). Grânulos pigmentados (*); núcleo (N); epitélio larval (El). Barra = 20 μ m. Colorações: PAS

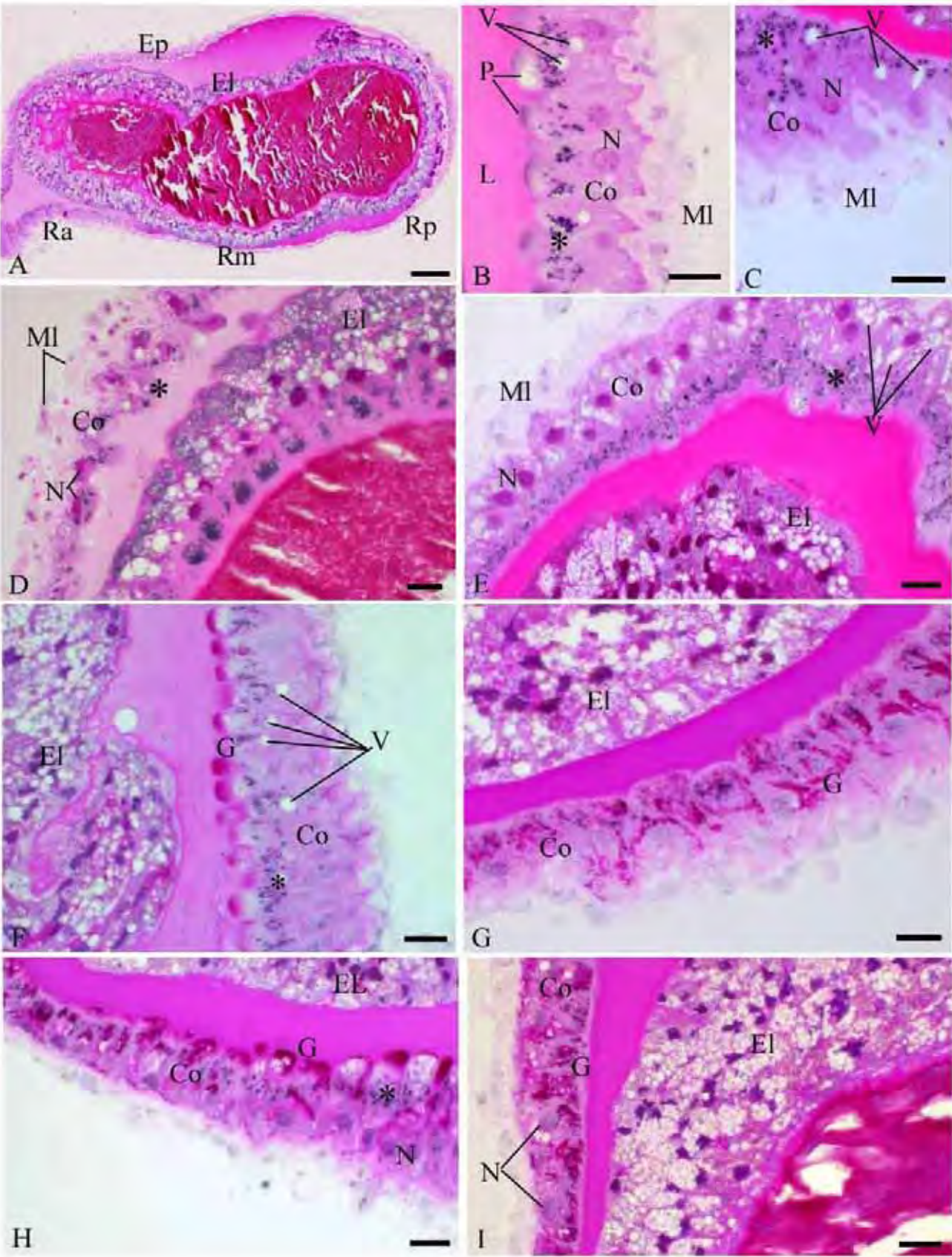


FIGURA 7

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Região média do intestino médio de pupa controle. Células colunares (Co) com formato cúbico, grânulos (*) na região apical e núcleos (N) basais. Feixes de fibras musculares circular (Mc); antigo epitélio larval (El); membrana peritrófica (Mp). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- B. Região média do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2%. Células colunares (Co) com formato pavimentoso, núcleos (N) pequenos ovais ou com formato irregular na região basal. Grânulos (*); epitélio larval (El); membrana peritrófica (Mp). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- C. Região média do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2%. Detalhe da presença de muitos grânulos PAS – positivo (G) por todo citoplasma das células colunares (Co). Feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- D. Região média do intestino médio de pupa controle. Ocorrência de poucos grânulos PAS – positivo (G) na região apical e média das células colunares (Co). Núcleo (N); epitélio larval (El). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- E. Região posterior do intestino médio de pupa controle. Células colunares (Co) cúbicas, com citoplasma pouco basófilo, com vacúolos (V) e grânulos (*) na região média e apical e núcleo esférico (N) na região basal. Feixes de fibras musculares circular (Mc) e longitudinal (Ml); lúmen (L). Barra= 20 µm. Coloração: H.E.
- F. Região posterior do intestino médio de pupa controle. Células colunares (Co) com grânulos PAS – positivo (G) na região apical e média. Núcleo (N); vacúolos (V), grânulos (*); lúmen (L). Barra= 20 µm. Coloração: PAS.
- G. Região posterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2%. Detalhe da presença de vários grânulos PAS – positivo (G) por todo citoplasma das células colunares (Co). Lúmen(L); núcleo (N); vacúolos (V); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

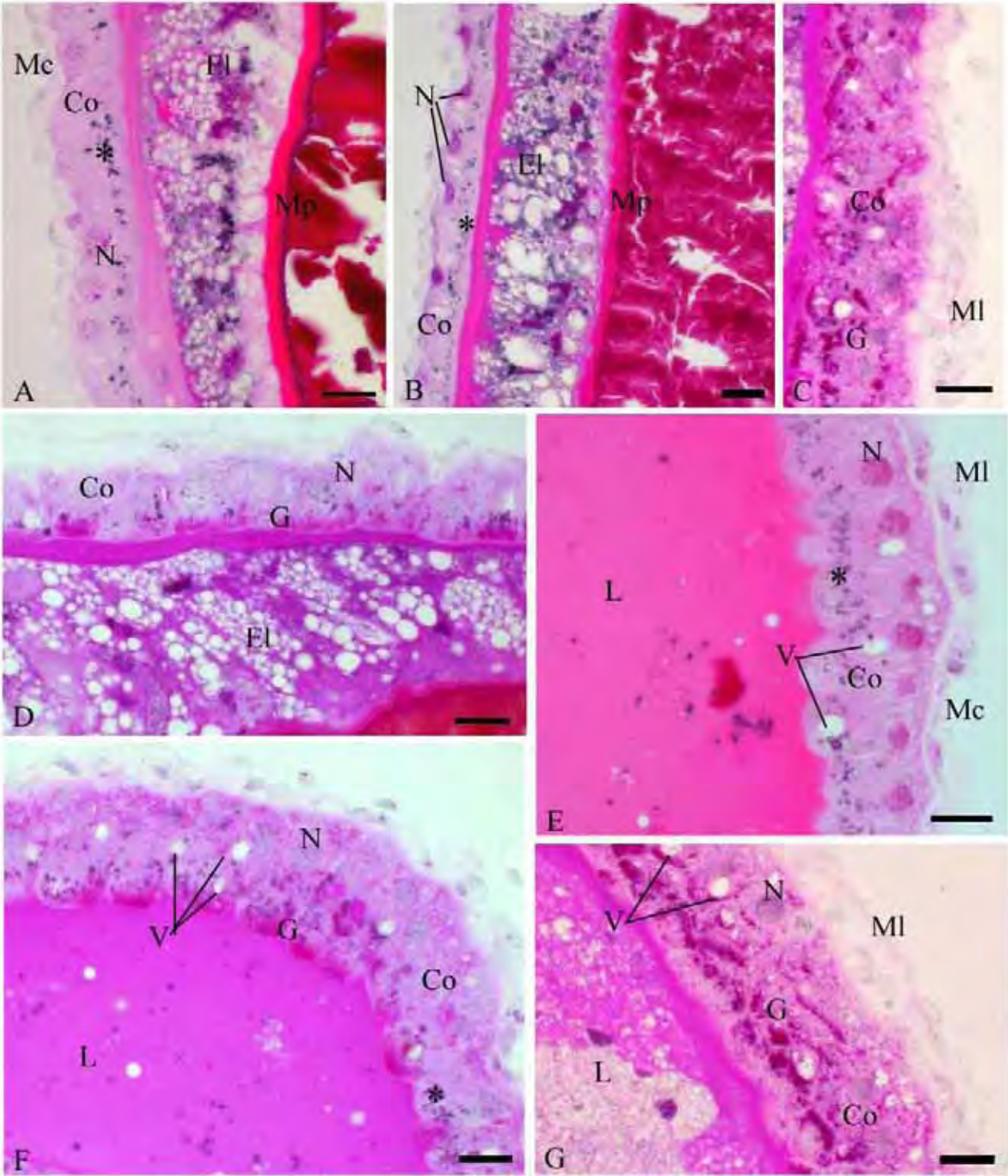


FIGURA 8**FOTOMICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTOS DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Anatomia do intestino médio de adulto de *C. claveri*. Região anterior (Ra), média (Rm) e posterior (Rp). Divertículo (Dv); túbulos de Malpighi (Tm) e íleo (I). Barra = 1 mm. Coloração: Azul de toluidina.
- B. Corte longitudinal da região anterior do intestino médio de adulto controle. Epitélio pseudoestratificado, composto por células colunares (Co) basófilas e células regenerativas (Cr) fortemente basófilas. Células colunares apresentam núcleos (N) esféricos e centrais, pequenos vacúolos (V) na região média e apical, além de grânulos apicais (*) e presença de protusões citoplasmáticas (P). Borda estriada acidófila (B) margeada por várias camadas de membrana peritrófica (Mp) no lúmen (L). Feixes de fibras musculares circular (Mc) e longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- C - D. Cortes longitudinais da região anterior do intestino médio de adultos resultantes de larvas tratadas com óleo de nim a 0,5%. Formação de dobras (De) no epitélio. Núcleos picnóticos com cromatina condensada ao redor do envoltório nuclear (→). Feixe de fibras musculares longitudinal (Ml); ninhos de células regenerativas (Cr); células colunares (Co), núcleos normais (N); borda estriada acidófila (B); lúmen (L). Barras = 20 µm. Colorações: H.E.: C; Feulgen: D.
- E. Corte longitudinal da região anterior do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com óleo de nim a 1,0%. Células colunares (Co) alongadas nas dobras epiteliais (De). Núcleo (N); grânulos apicais (*); borda estriada acidófila (B); células regenerativas (Cr); válvula estomodeal (Vs). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- F. Corte longitudinal da região anterior do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com óleo de nim a 2,0%. Desprendimento da região apical com as microvilosidades (Dp) das células colunares (Co). Grânulos (*); núcleo (N); células regenerativas (Cr); membrana peritrófica (Mp). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.

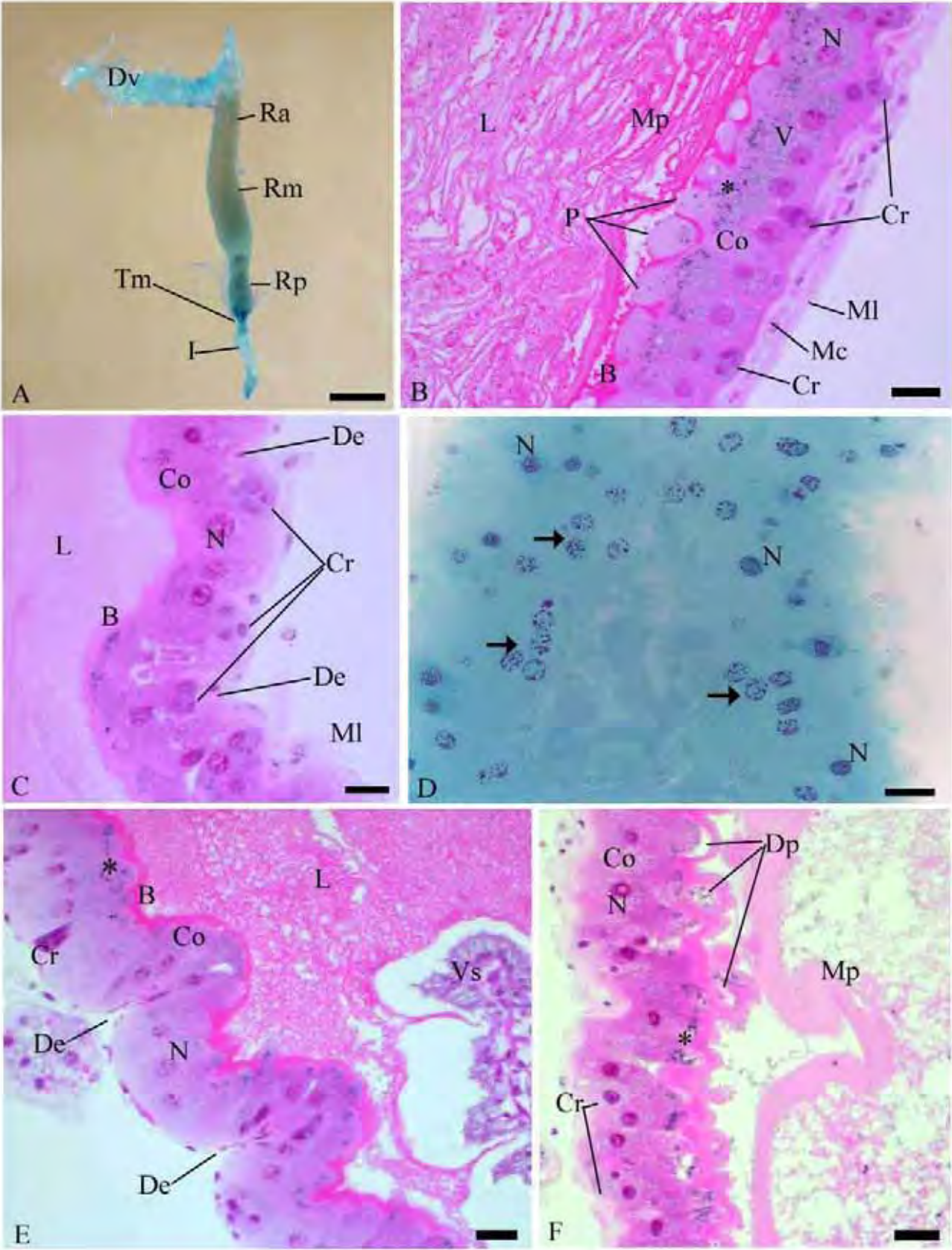


FIGURA 9

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTOS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Região anterior do intestino médio de adulto controle. Ausência de grânulos PAS – positivo no citoplasma das células colunares (Co). Lâmina basal (Lb) e as várias camadas de membrana peritrófica (Mp) se mostraram positiva ao PAS. Grânulos (*); núcleo (N); espaço ectoperitrófico (Ec); borda estriada (B). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- B. Região anterior do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com óleo de nim a 0,5%. Ocorrência de grânulos PAS – positivo (G) no citoplasma das células colunares (Co). Dobras epiteliais (De); lâmina basal (Lb); grânulos (*); camadas de membrana peritrófica (Mp) menos organizada em camadas paralelas. Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- C. Região média do intestino médio de adulto controle. Células colunares (Co); núcleo (N); células regenerativas (Cr); vacúolos (V); grânulos (*); borda estriada acidófila (B); espaço ectoperitrófico (Ec); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- D – E. Região anterior do intestino médio de adultos resultantes de larvas tratadas com óleo de nim a 0,5%. Desprendimento da superfície apical (Dp) em direção ao lúmen (L), grânulos acidófilos (g) na região apical das células colunares (Co). Células regenerativas (Cr) na base do epitélio. Dobras epiteliais (De) com células colunares apresentando núcleo na região apical da célula, e com cromatina condensada (→). Núcleo normal (N); borda estriada (B); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barras = 20 µm. Coloração: H.E.
- F. Região anterior do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com óleo de nim a 1,0 %. Presença de dobras (De) na base do epitélio, células colunares alongadas (Co) e com separação entre as membranas laterais (►). Grânulos (*); borda estriada acidófila (B); lúmen (L); células regenerativas (Cr); feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barras = 20 µm. Coloração: H.E.

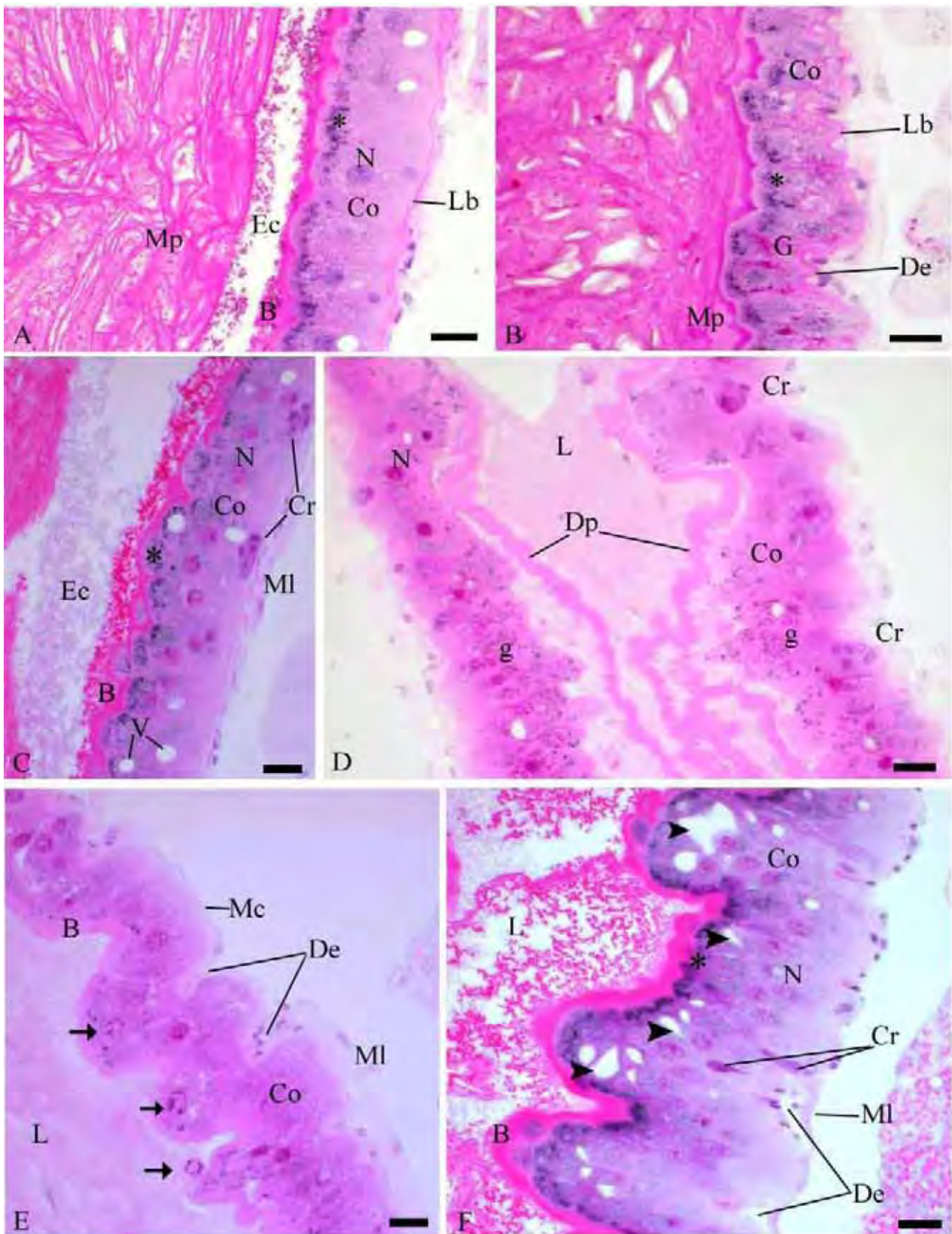


FIGURA 10

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTOS DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A – C. Adultos resultantes de larvas tratadas com nim a 2,0%. Separação entre as membranas laterais (►) de células colunares (Co) e células regenerativas (Cr). Vários núcleos picnóticos, com formato irregular e cromatina condensada ao redor do envoltório nuclear, próximos de núcleos normais (N) e ocorrência de lise (Li) em célula colunar. Camadas de membrana peritrófica (Mp) desorganizadas no lúmen (L). Dobras epiteliais (De); grânulos (*); borda estriada acidófila (B); espaço ectoperitrófico (Ec); feixes de fibras musculares longitudinal (Ml). Barras = 20 µm. Coloração: H.E.: A e C; Feulgen: B.
- D. Adulto controle. Poucos grânulos PAS – positivo (G) nas células colunares (Co). Lâmina basal (Lb), assim como as camadas de membrana peritrófica (Mp) foram positivas ao PAS. Células regenerativas (Cr); grânulos (*); espaço ectoperitrófico (Ec). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- E. Adulto resultante de larva tratada com nim a 0,5 %. Vários grânulos PAS – positivo (G) no citoplasma das células colunares (Co). Lâmina basal (Lb); grânulos (*); camadas da membrana peritrófica (Mp). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- F. Adulto resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Muitos grânulos PAS – positivo (G) acumulado no citoplasma das células colunares (Co). Lâmina basal espessa (Lb); separação entre membranas laterais (►); grânulos (*); camadas desorganizadas da membrana peritrófica (Mp); espaço ectoperitrófico (Ec). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

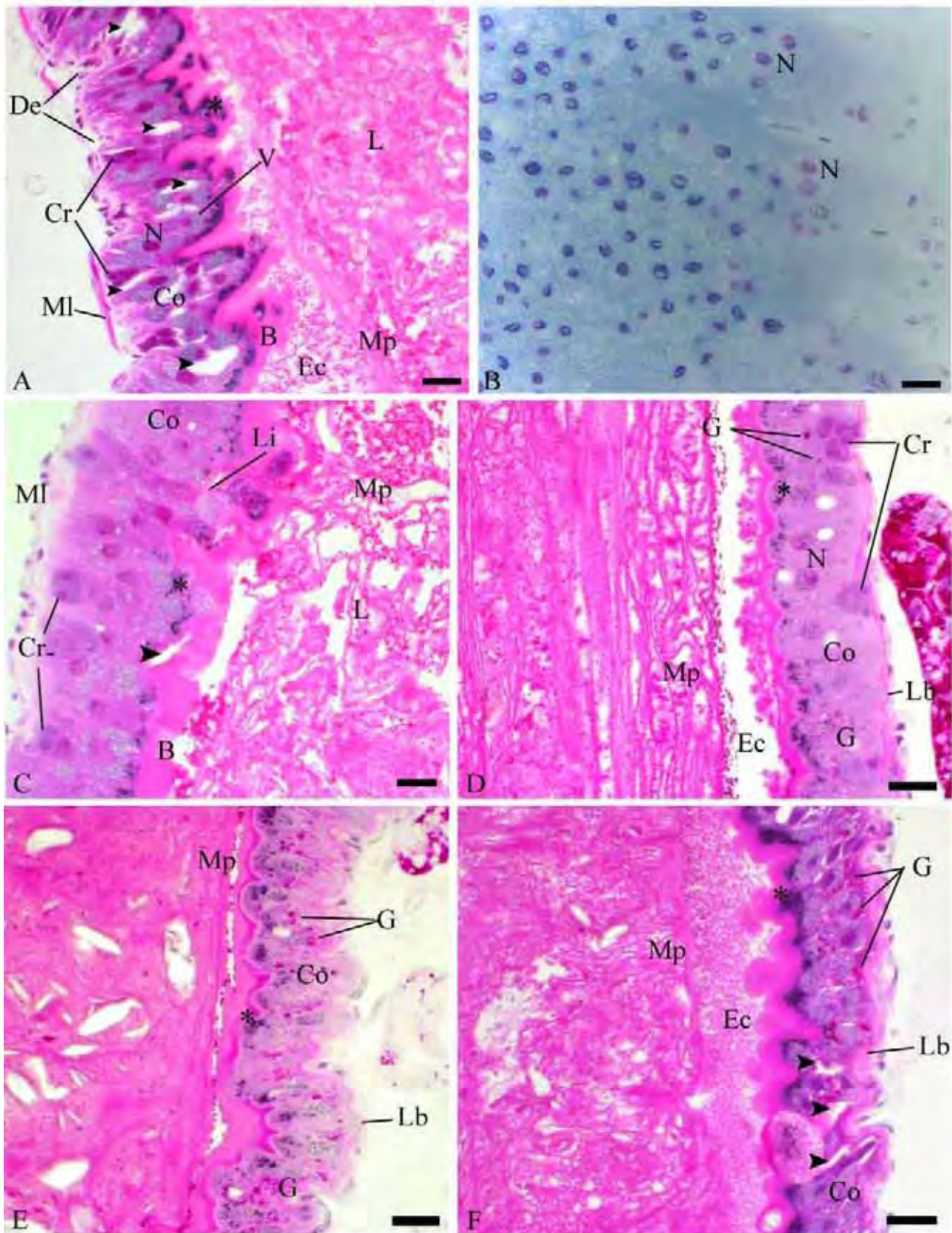


FIGURA 11**FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTOS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Adulto controle. Células colunares (Co) com superfície apical e basal com contornos regulares, presença de vacúolos (V) e de grânulos (*) no citoplasma, borda estriada acidófila (B). Células regenerativas (Cr) presentes na base do epitélio. Núcleo (N), feixe de fibras musculares longitudinal (Ml). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- B. Adulto resultante de larva tratada com nim a 0,5 %. Presença de borda estriada não contínua (b) nas células colunares (Co); maiores acúmulos de grânulos (*) e de vacúolos (V) ao redor dos núcleos (N). Células regenerativas (Cr); cromatina condensada ao redor do núcleo (→); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- C. Adulto resultante de larva tratada com nim a 1,0 %. Células colunares (Co) e regenerativas (Cr) alongadas, muitos grânulos apicais (*), vacúolos (V) e protusões citoplasmáticas (P). Espaço ectoperitrófico (Ec); camadas de membrana peritrófica (Mp); feixe de fibras musculares circular (Mc). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- D. Adulto resultante de larva tratada com nim a 2,0 %. Acúmulo de grânulos (*) na região apical, e separação entre células (►) colunares (Co) e regenerativas (Cr). Núcleo (N); lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: H.E.
- E. Adulto controle. Pequenos grânulos PAS – positivos (G) na região apical das células colunares (Co). Lâmina basal (Lb) mostrou-se positiva ao PAS. Células regenerativas (Cr); granulos (*); espaço ectoperitrófico (Ec); camadas de membrana peritrófica (Mp). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.
- F. Adulto resultante de larva tratada com nim a 2,0 %. Maiores quantidades de grânulos PAS – positivo (G) no citoplasma das células colunares (Co). Lâmina basal (Lb) apresenta-se mais espessa nesta região no intestino nesta concentração. Separação entre células (►); muitos grânulos (*) na região apical; células regenerativas (Cr) ; lúmen (L). Barra = 20 µm. Coloração: PAS.

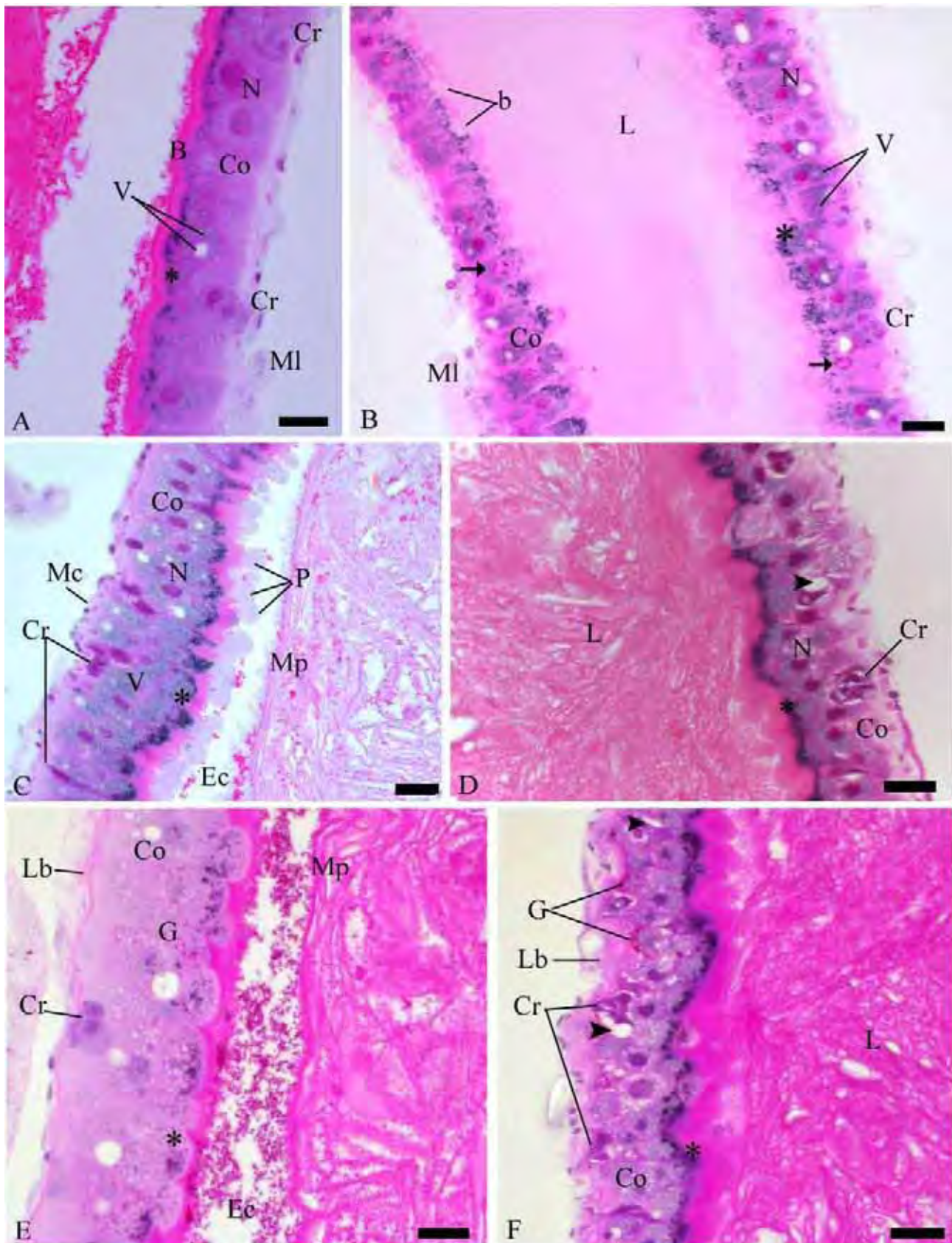


FIGURA 12

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVA E PUPA DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Larva controle. Núcleo de célula muscular TUNEL – positivo (→) na região anterior do intestino médio. Núcleo de célula muscular TUNEL – negativo (►); núcleo de célula colunar TUNEL – negativo (Co); núcleo de células regenerativas TUNEL – negativo (Cr); lúmen (L). Barra = 20 µm.
- B. Larva controle. Núcleo de célula colunar TUNEL – positivo (→) ao redor de vários núcleos de células colunares TUNEL – negativo (Co). Barra = 20 µm.
- C. Larva tratada com nim a 2%. Núcleo de célula muscular TUNEL - positivo (→) que compõe fibra muscular longitudinal da região média do intestino médio. Núcleo de célula muscular TUNEL – negativo (►); núcleo de célula colunar TUNEL – negativo (Co); membrana peritrófica (Mp); lúmen (L) . Barra = 20 µm.
- D. Larva tratada com nim a 2%. Região posterior do intestino médio apresentando células colunares com núcleos TUNEL - positivo (→) e núcleos TUNEL – negativo (Co); lúmen (L). Barra = 20 µm.
- E. Pupa controle. Região posterior do intestino médio com vários núcleos TUNEL – positivo (→) e núcleos TUNEL – negativo (N) no epitélio larval (El) em degeneração no lúmen (L). Epitélio pupal (Ep) apresenta células colunares com núcleos TUNEL – negativo (Co) em toda sua extensão; membrana peritrófica (Mp). Barra = 50 µm.
- F. Pupa controle. Região anterior do intestino médio apresentando muitos núcleos TUNEL – positivo (→) no epitélio larval (El) em degeneração no lúmen (L), assim como núcleos TUNEL – negativo (N). Núcleo de célula colunar TUNEL – positivo (→) no epitélio pupal (Ep), sendo a maioria dos núcleos das células colunares TUNEL – negativo (Co). Barra = 50 µm.

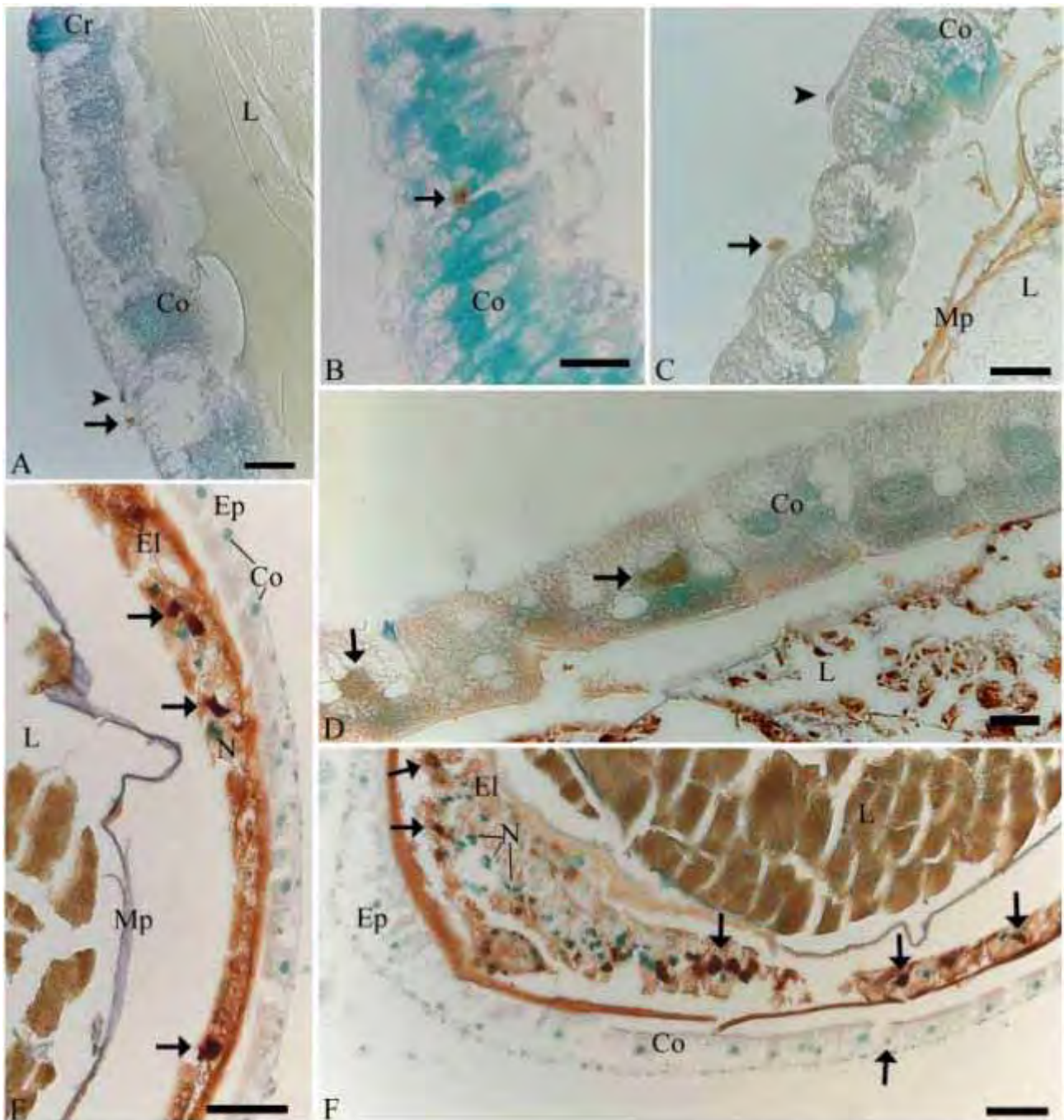
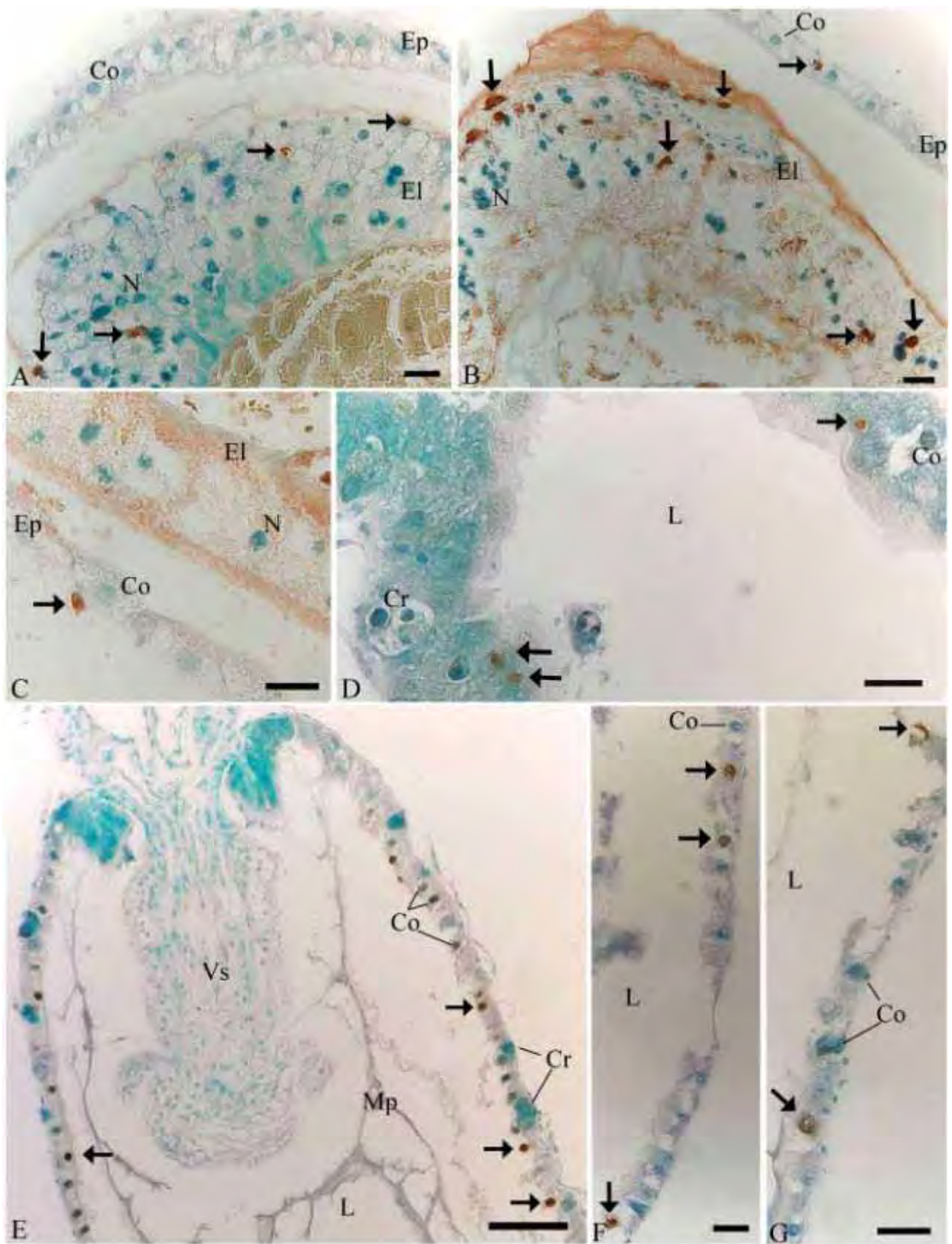


FIGURA 13

FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES LONGITUDINAIS DO INTESTINO MÉDIO DE PUPA E ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri*.

- A. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 1,0%. Epitélio pupal (Ep) com células colunares apresentando núcleos TUNEL – negativo (Co). Epitélio larval em degeneração (El) apresentando núcleos TUNEL – positivo (→) e núcleos TUNEL – negativo (N). Barra = 20 µm.
- B. Região anterior do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Epitélio pupal (Ep) com células colunares apresentando núcleos TUNEL – negativo (Co) e núcleo TUNEL – positivo (→). Epitélio larval em degeneração (El) apresentando núcleos TUNEL – positivo (→) e núcleos TUNEL – negativo (N). Barra = 20 µm.
- C. Região média do intestino médio de pupa resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Epitélio pupal (Ep) com núcleo de célula regenerativa TUNEL – positivo (→) e núcleo de célula colunar TUNEL – negativo (Co). Epitélio larval em degeneração (El) apresentando núcleos TUNEL – negativo (N). Barra = 20 µm.
- D. Adulto controle. Região média do intestino médio apresentando células colunares com núcleos TUNEL - positivo (→), núcleos TUNEL – negativo (Co); núcleos de células regenerativas TUNEL – negativo (Cr); lúmen (L). Barra = 20 µm.
- E. Região anterior do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com nim a 0,5%. Epitélio intestinal apresenta células colunares com núcleos TUNEL – positivo (→). Núcleos das células colunares TUNEL – negativo (Co); núcleos das células regenerativas TUNEL – negativas (Cr); válvula estomodeal (Vs) membrana peritrófica (Mp); lúmen (L). Barra = 50 µm.
- F – G. Região média do intestino médio de adulto resultante de larva tratada com nim a 2,0%. Células colunares com núcleos TUNEL – positivo (→); núcleos de células colunares TUNEL – negativo (Co); lúmen (L). Barras = 20 µm.



4.3. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE EPITELIAL DO INTESTINO MÉDIO

A análise da superfície interna do intestino médio permitiu visualizar somente a superfície apical das células colunares, por serem as mais altas, numerosas e apresentarem uma grande quantidade de microvilosidades voltadas em direção ao lúmen. Devido ao fato das células regenerativas e endócrinas estarem localizadas preferencialmente na base do epitélio, suas visualizações nas preparações não foram possíveis.

LARVA

Semelhante a análise em microscopia de luz, o intestino médio de larvas de terceiro ínstar apresenta-se na forma de um tubo contorcido. Ligada posteriormente ao papo, a região anterior do intestino médio apresenta uma grande capacidade de dilatação, assim como a região posterior, estando entreposta a estas duas regiões a região média, a qual apresenta-se estreita e contorcida (Fig. 14A). Na superfície epitelial constatamos variações na morfologia das células ao longo do intestino, onde foi possível definir três padrões epiteliais distintos, mas sem um limite preciso entre ambos (Fig. 14B).

Região anterior

Em larvas controle a região anterior apresentou células abauladas, com diâmetros apicais regulares, recobertas por abundantes microvilosidades bastante regulares. Protusões citoplasmáticas apicais foram escassas. Estas protusões são arredondadas, de tamanhos variados e desprovidas de microvilosidades. As protusões também mostraram variações em sua morfologia, de lisa a bastante irregular (Figs. 14C e D). Prováveis gotas lipídicas puderam ser encontradas sobre as microvilosidades. Estas gotas lipídicas também puderam ser constatadas em fraturas na parede do epitélio intestinal (Figs. 14C e E).

Eventualmente notamos uma fina membrana peritrófica recobrindo as células colunares, entretanto como esta membrana é frágil, ela foi freqüentemente observada rompida (Fig. 14F). Também verificamos a presença de perfurações regulares e

circulares de diferentes diâmetros na membrana peritrófica, em correspondência à liberação de protusões citoplasmáticas (Fig. 14E).

Larvas tratadas com óleo de nim a 0,5% apresentaram células colunares com diâmetros e alturas variadas, exibindo padrão irregular de microvilosidades e protusões citoplasmáticas mais numerosas, as quais variaram sua morfologia de lisa a enrugada, com ausência de microvilosidades (Figs. 15A, B e C). Podemos notar a formação de varias protusões citoplasmáticas, as quais iniciam sua formação em pequenas áreas desprovidas de microvilosidades na superfície apical das células colunares (Fig. 15B). Células colunares também apresentaram a região apical dilatada em relação ao grupo controle.

No tratamento a 1%, várias células colunares abauladas com microvilosidades esparsas e desorganizadas apresentaram alturas variadas, conferindo aspecto irregular à superfície epitelial. Chama atenção a presença de células rompidas, liberando gotículas lipídicas para o lúmen intestinal (Fig. 15D). Existe pouca diferença em relação ao grupo anterior com relação às protusões citoplasmáticas. Membrana peritrófica mostrou-se muita fina e com vários pontos de rompimento (Fig. 15E).

Larvas submetidas ao tratamento com óleo de nim a 2% apresentaram células abauladas, com microvilosidades esparsas e desorganizadas; além de protusões citoplasmáticas de aspecto granuloso, com discretas perfurações na membrana apical (Figs. 15F e 16B). Células colunares rompidas também foram constatadas, apresentando membrana apical colabada e enrugada (Fig. 16A). Detritos aparecem associados às microvilosidades na superfície das células colunares (Fig. 16B).

Região média

Larvas controle apresentam células epiteliais mais achatadas e justapostas em relação à região anterior, com diâmetros apicais irregulares e região apical plana, que confere uma altura regular as células colunares. Possuem microvilosidades regulares não proeminentes. Protusões citoplasmáticas são escassas, sendo estas arredondadas, de tamanhos variados e desprovidas de microvilosidades (Figs. 16C e D).

No tratamento a 0,5% constatamos grandes alterações morfológicas. Algumas células colunares apresentaram superfície apical mais dilatada; microvilosidades desorganizadas e grande quantidade de protusões citoplasmáticas, de tamanho e morfologia variada, sendo freqüente a existência de inúmeras protusões/célula. A membrana citoplasmática nas maiores protusões é freqüentemente lisa e granulosa, já nas menores protusões é enrugada e colabada (Figs. 16E e F).

Com 1%, células colunares mostram-se mais abauladas, devido à possível dilatação na região apical, tornando-se neste modo menos justapostas. Microvilosidades são menos proeminentes e desorganizadas (Fig. 17A). Protusões citoplasmáticas arredondadas possuem aspecto granuloso, e em regiões focais podemos notar a presença de células com ápice dilatado devido à formação de protusões apicais, muitas as quais estão rompidas (Fig. 17B). Gotículas lipídicas também puderam ser observadas sobre as microvilosidades (Fig. 17A).

Já para o tratamento com nim a 2% existiu pouca diferença em relação ao tratamento anterior, exceto as microvilosidades mais esparsas e desorganizadas, associadas com detritos e a presença de protusões de aspecto granuloso sendo liberadas em direção ao lúmen (Fig. 17C).

Região posterior

Em larvas controle a superfície epitelial possui células bastante achatadas e justapostas, com diâmetros apicais irregulares e altura regular, que confere uma superfície epitelial plana. As microvilosidades são regulares e não proeminentes. Pequenas e médias protusões lisas e arredondadas são comuns desta região do intestino médio (Figs. 17D e E).

Para o tratamento a 0,5% não observamos alterações morfológicas, a não ser um discreto aumento na altura de algumas células colunares de modo pontual, que passaram de achatadas para abauladas, proporcionando maior irregularidade na superfície epitelial (Fig. 17F).

Existiu pouca diferença no tratamento com óleo de nim a 1% em relação ao tratamento anterior, exceto as microvilosidades alteradas, com aspecto irregular e desorganizado (Fig. 18A). Já a 2% as células colunares são abauladas, algumas apresentando pequenas depressões na membrana apical, com ausência de microvilosidades, onde possivelmente foi liberada protusões citoplasmáticas. Detritos também puderam ser observados sobre as microvilosidades (Fig. 18B).

Com base nos dados descritos para as três regiões do intestino médio, notamos que a ingestão do óleo de nim mostrou-se prejudicial à integridade da superfície epitelial, pois verificamos alterações quanto ao formato das células colunares, disposição e distribuição das microvilosidades e na liberação de protusões citoplasmáticas, sendo estas alterações dose dependentes.

PUPA

O intestino médio na fase de pupa apresentou-se menor do que na fase de larva, sendo este um tubo alongado, levemente contorcido nas extremidades (Fig. 18C). Semelhante a fase de larva, sua superfície epitelial apresentou variação na morfologia das células colunares ao longo do comprimento, onde também foi possível definir três padrões epiteliais distintos, mas sem um limite preciso entre ambos (Fig. 18D).

Região anterior

Em pupas controle, as células colunares são abauladas, com diâmetros próximos, altura regular e microvilosidades exuberantes com padrão irregular. Escassas protusões citoplasmáticas apicais ocorrem, sendo estas protusões lisas e arredondadas. Pequenos pontos na superfície apical com escassez de microvilosidades indicam a formação de protusões nas células colunares (Fig. 18E).

Alterações significativas puderam ser constatadas no tratamento com 0,5% como microvilosidades desorganizadas; aumento de protusões citoplasmáticas; áreas circulares com microvilosidades desorganizadas no centro da superfície apical (Figs. 18F e 19A). Esta desorganização pontual de microvilosidades pode estar associada à eliminação de protusão por parte da célula colunar.

No tratamento a 1% chama atenção a escassez de microvilosidades, assim como uma grande quantidade de células com a superfície apical alongada, que provavelmente dará origem a protusões citoplasmáticas (Figs. 19B e C). Para o tratamento a 2%, houve uma diminuição expressiva nas microvilosidades, as quais são escassas e desorganizadas na superfície apical das células colunares (Figs. 19D e E).

Região média

No grupo controle, a região média apresentou células levemente abauladas, com microvilosidades exuberantes e regulares. Poucos pontos apresentaram microvilosidades esparsas, as quais correspondem a pontos de formação de protusões citoplasmáticas (Fig. 19F).

Para o tratamento a 0,5%, notou-se a ocorrência de varias áreas arredondadas com microvilosidades desorganizadas, apresentando microvilosidades desorganizadas na lateral e ausência de microvilosidades na área central (Fig. 20A). Semelhante a região anterior neste tratamento, acreditamos que esta alteração esteja associada à liberação de protusões citoplasmáticas em momentos anteriores.

Alterações semelhantes a estas também puderam ser observadas no tratamento a 1% (Fig. 20C). Um achado interessante foi a formação a protusões citoplasmáticas com microvilosidades esparsas e proeminentes na membrana (Fig. 20B), uma vez que não tínhamos encontrado nas observações anteriores protusões citoplasmáticas com microvilosidades.

No tratamento a 2% áreas circulares com microvilosidades desorganizadas também ocorreram; além da maior escassez de microvilosidades, superfície apical abaulada e eliminação de conteúdo citoplasmático na superfície epitelial devido ao rompimento na membrana apical (Fig. 20D).

Região posterior

Em pupas controle a superfície epitelial apresentou células bastante achatadas e justapostas, com altura regular, que confere uma superfície epitelial plana. As microvilosidades são regulares e não proeminentes. Poucas protusões lisas e arredondadas foram encontradas desta região do intestino médio (Fig. 20E).

Para o tratamento de 0,5 e 1%, a principal alteração desencadeada foi a ocorrência de áreas circulares com microvilosidades desorganizadas, sendo mais freqüente na concentração de 1%. Além desta alteração, a 1% as células apresentaram-se mais abauladas (Fig. 20F e 21A).

A 2% ocorreram severas alterações, dentre elas células colunares com poucas microvilosidades, sendo estas proeminentes e desorganizadas; células rompidas, com membrana colabada e enrugada, além da eliminação de conteúdo citoplasmático (Fig. 21B).

Semelhante a fase de larva, pupas também apresentaram várias alterações da superfície do epitélio pupal ao longo do intestino médio, em relação as microvilosidades e protusões citoplasmáticas.

ADULTO

Anatomicamente podemos localizar o papo com uma extensão lateral denominada divertículo e posteriormente ao papo o proventrículo e o intestino médio. O intestino médio exibe um único diâmetro ao longo de seu comprimento (Fig. 21C).

Região anterior

Adultos controles apresentaram células abauladas, justapostas, com diâmetro apicais variados, recobertas por abundantes microvilosidades, as quais variam de regular

a irregular dependendo da célula. Em poucos pontos foram verificados protusões citoplasmáticas em formação na superfície apical das células, sendo escassas nesta região do intestino (Figs 21D e E). Observamos a membrana peritrófica, sendo esta constituída por várias camadas lamelares sobrepostas (Fig. 21F).

No tratamento a 0,5%, observou-se um aumento na quantidade de protusões citoplasmáticas, sendo elas lisas e arredondadas, com diferentes tamanhos. As microvilosidades também apresentaram mais irregulares, com início de desorganização (Fig 22A).

Com o aumento das concentrações dos tratamentos de 1 e 2%, houve um aumento de protusões citoplasmáticas e desorganização das microvilosidades, sendo estas dose dependentes (Figs. 22B, C e D). Estas protusões são na maioria volumosas, lisas e arredondadas. Na concentração de 2% notamos a ocorrência de pequenas rupturas na membrana apical das protusões, assim como a presença de esparsas microvilosidades (Fig. 22E).

Região média

Em adultos controle as células são abauladas, com abundante microvilosidades bastante regulares. Protusões são ausentes, mas a existência de pequenas depressões na superfície apical nas células colunares são indicativos da ocorrência de liberação de protusões em momentos anteriores (Fig. 22F).

Nos tratamentos com óleo de nim, notamos uma crescente presença de protusões citoplasmáticas apicais com o aumento da concentração utilizada nos tratamentos, assim como desorganização das microvilosidades (Figs. 23A, B e D). A 1% constatamos células colunares com escassez de microvilosidades na superfície apical, devido à formação de protusões (Fig. 23C). Já a 2% encontramos alterações mais severas, com áreas inteiras cobertas por células emitindo grande quantidade protusões, além do rompimento da membrana plasmática apical em algumas protusões (Figs. 23E e F).

Região posterior

A superfície epitelial em adultos controle exibiu células colunares abauladas, de diâmetros variados, recobertas por abundantes microvilosidades, com aspecto regular e com ausência de protusões citoplasmáticas (Fig. 24A).

A região posterior nos tratamentos respondeu de modo semelhante à região média, isto é, as alterações sofridas na superfície epitelial foram proporcionais às concentrações de óleo de nim utilizadas. Para os três tratamentos com óleo de nim houve progressiva desorganização das microvilosidades e aumento de protusões

citoplasmáticas, sendo estas geralmente volumosas, podendo estar total ou parcialmente desprovidas de microvilosidades (Figs. 24B, C, D, E e F).

A fase de adulto mostrou ainda ser susceptível ao óleo de nim ingerido na fase de larva, o qual ocasionou alterações ultraestruturais na superfície do epitélio do intestino médio, sendo verificado alterações na disposição das microvilosidades e formação e liberação de protusões citoplasmáticas.

**DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA:
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA**

FIGURA 14**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Intestino médio de larvas de *C. claveri*. Região anterior (Ra), ligada posteriormente ao papo (Pa), região média (Rm) e região posterior (Rp). Barra = 300 μ m.
- B. Vista geral da superfície epitelial do intestino médio, apresentando variação morfológica das células epiteliais ao longo de seu comprimento. Região anterior (Ra), média (Rm) e posterior (Rp). Barra = 200 μ m.
- C – D. Região anterior do intestino médio de larva controle, mostrando células epiteliais abauladas (Ca), com padrão regular de microvilosidades (Mv). Notar a presença de protusões citoplasmáticas (P), podendo estas serem lisas (Pl) ou com contorno irregular (Pr), além de provável gota lipídica (L) sobre as microvilosidades. Barras: C = 10 μ m; D = 15 μ m.
- E. Fratura na parede do intestino médio, onde podemos notar a presença de prováveis gotas lipídicas (L) no seu interior, além da presença de perfurações circulares de diferentes diâmetros ($\rightarrow$) na membrana peritrófica (Mp), em correspondência a prováveis protusões citoplasmáticas (P). Feixes de fibras muscular circular (Mc) e longitudinal (Ml). Barra = 10 μ m.
- F. Fina membrana peritrófica (Mp) recobrindo células colunares abauladas (Ca). Barra = 20 μ m.

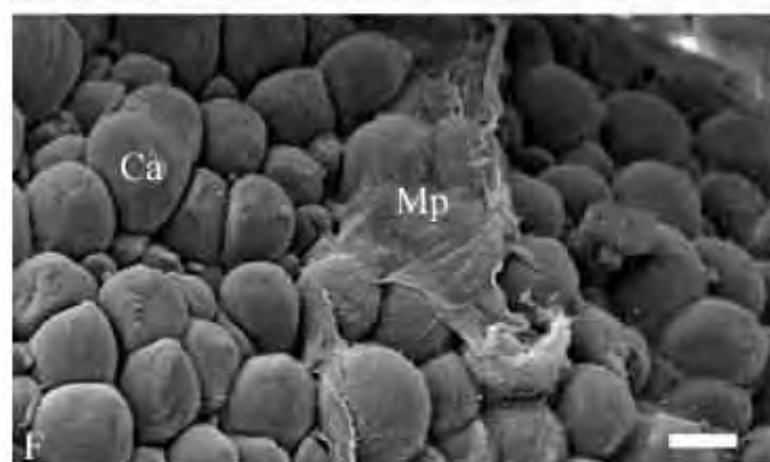
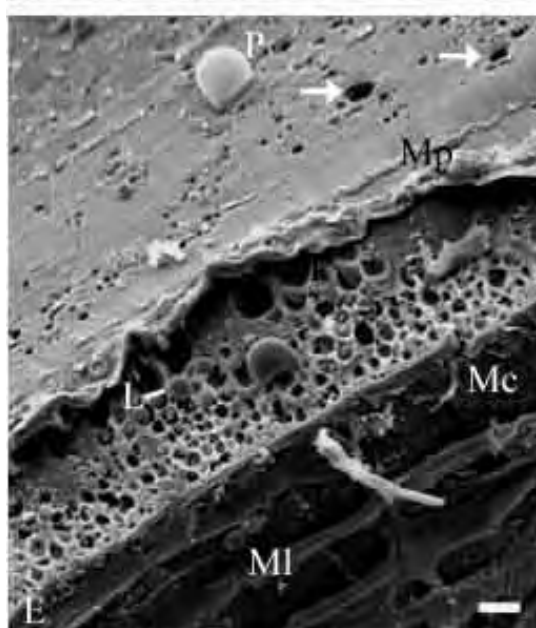
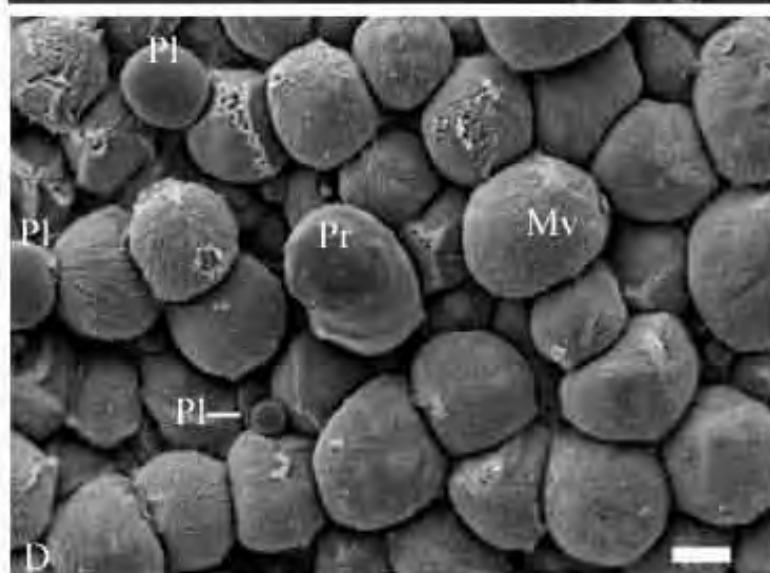
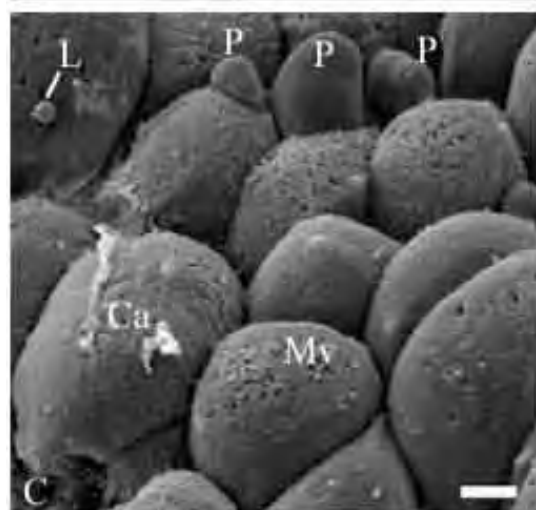
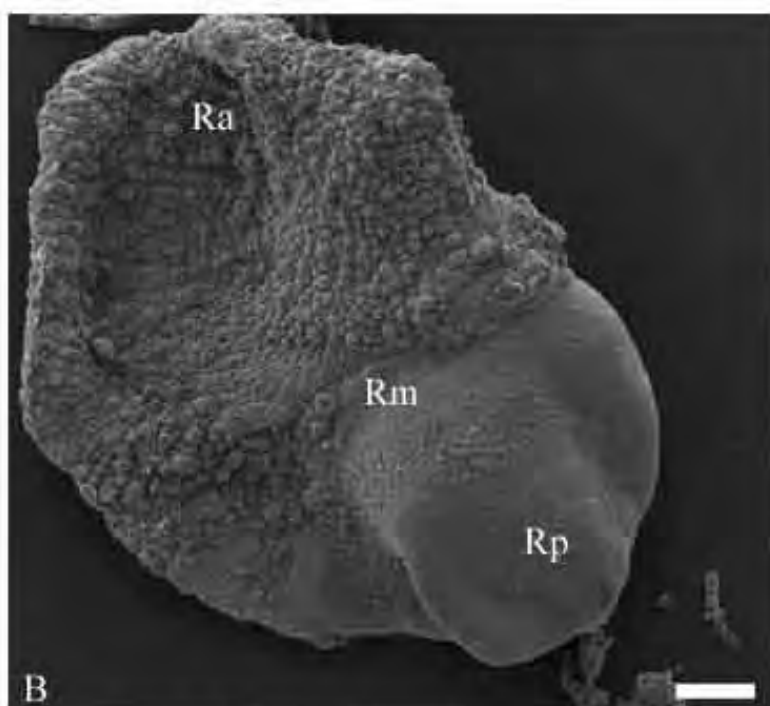
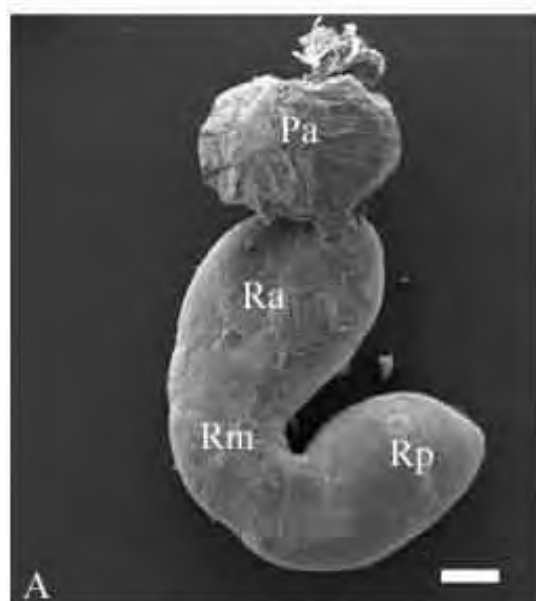


FIGURA 15**ELÉTRON-MICROGRAFIA DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A – B – C. Superfície epitelial de larvas tratadas com óleo de nim a 0,5%. Notar a presença de células colunares abauladas (Ca), com diferentes diâmetros e alturas. Microvilosidades com padrão irregular, levemente aglomerada (*), formação de protusões citoplasmáticas apicais (→), presença de protusões citoplasmáticas com formato arredondado e tamanhos variados, desprovidas de microvilosidades, podendo estas protusões serem lisas (Pl) ou irregulares (Pr). Barras: A e C = 15 µm; B = 5 µm.
- D. Superfície epitelial de larva tratada com óleo de nim a 1,0%. Detalhe das células colunares abauladas (Ca) com diferentes alturas, com microvilosidades esparsas e desorganizadas (*). Presença de células rompidas (►), liberando prováveis gotas lipídicas (L). Barra = 20 µm.
- E. Superfície epitelial de larva tratada com óleo de nim a 1,0%. Notar célula colunar abaulada com microvilosidades desorganizadas (*) e protusões citoplasmáticas lisas (Pl) e enrugada (Pr) sobre uma fina membrana peritrófica (Mp), a qual apresenta-se rompida em vários pontos. Barra = 15 µm.
- F. Larva tratada com óleo de nim a 2%. Detalhe de protusões citoplasmáticas de aspecto granuloso (P), com discretas perfurações na membrana apical (►). Notar microvilosidades esparsas e irregulares (*). Barra = 10 µm.

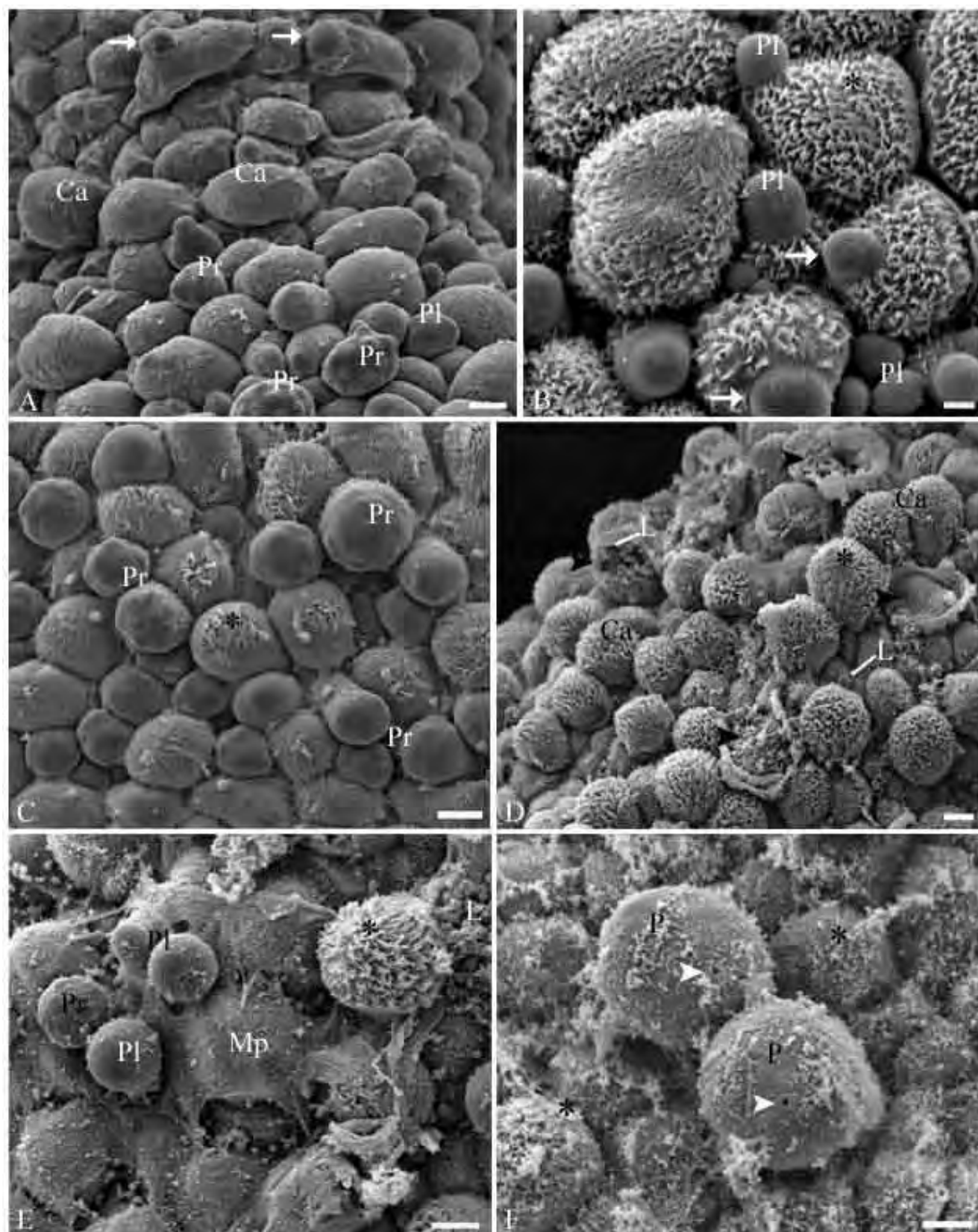


FIGURA 16**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 2,0%. Detalhe de células colunares abauladas (Ca) com curtas microvilosidades escassas ao lado de outras alteradas, com rompimento da membrana apical, estando colabada e enrugada (►). Notar a presença de detritos (De) associados as microvilosidades na superfície das células colunares. Barra = 20 µm.
- B. Região anterior do intestino médio de larva tratada com nim a 2,0%. Notar microvilosidades desorganizadas e proeminentes (*), com detritos (De) associados. Barra = 4 µm.
- C – D. Região média do intestino médio de larva controle. Detalhe das células colunares com aspecto normal, justapostas e achatadas (Ci), com microvilosidades regulares não proeminentes (Mv). Notar a escassez de protusões citoplasmáticas (P). Barras = 10 µm.
- E – F. Região média do intestino médio de larva tratada a 0,5%. Grande concentração de protusões citoplasmáticas lisas e granulosas (P) e outras enrugadas e colabadas (Pr), sendo emitidas de uma única célula colunar achatada apicalmente (Ci). Notar a presença de células colunares com região apical dilatada (D) e microvilosidades irregulares (*). Barras = 15 µm.

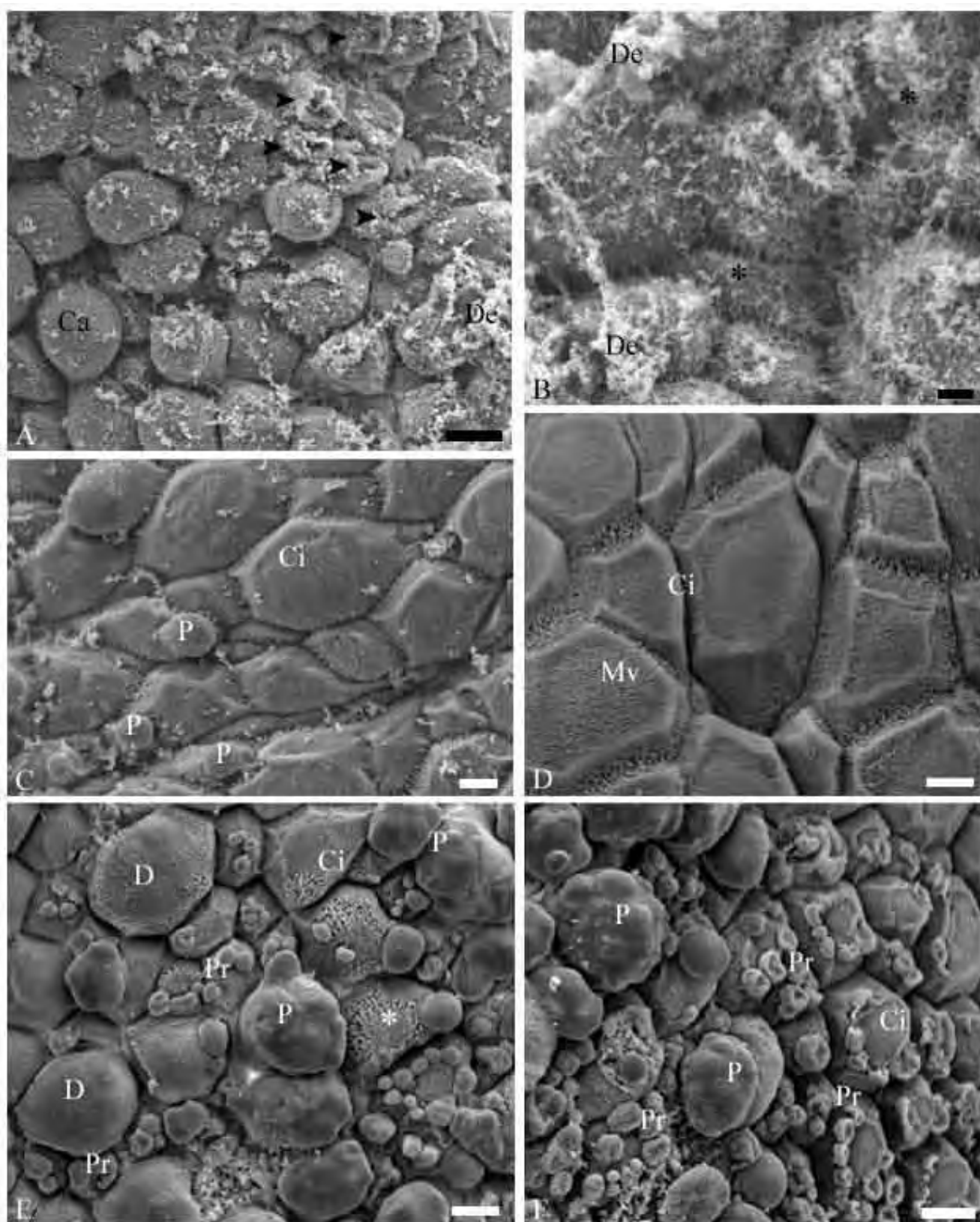


FIGURA 17**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Região média do intestino médio de larva tratada a 1,0% com óleo de nim. Superfície epitelial com células colunares mais abauladas (Ca), com protusões citoplasmáticas de aspecto granuloso (P). Notar a presença de prováveis gotas lipídicas (L) entre as células. Microvilosidades não proeminentes (*). Barra = 8 μm .
- B. Região média do intestino médio de larva tratada a 1,0% com óleo de nim. Notar a presença de células colunares dilatadas (D) e varias protusões citoplasmáticas (P) com membrana apical rompida (►). Barra = 20 μm .
- C. Região média do intestino médio de larva tratada a 2,0% com óleo de nim. Microvilosidades esparsas e desorganizadas (*), associadas com detritos (De) e detalhe das protusões citoplasmáticas (→) de aspecto granuloso sendo formadas na região apical das células colunares. Barra = 4 μm .
- D – E. Região posterior do intestino médio de larva controle. Detalhe das células colunares achatadas e justapostas, exibindo diâmetros variáveis e abundante microvilosidades regulares (Mv). Notar a presença de pequenas e médias protusões citoplasmáticas (P). Detalhe na liberação de protusão citoplasmática (→). Barras: D = 10 μm ; E = 4 μm .
- F. Região posterior do intestino médio de larva tratada com óleo de nim a 0,5%. Vista geral de células colunares mais abauladas (Ca). Barra = 15 μm .

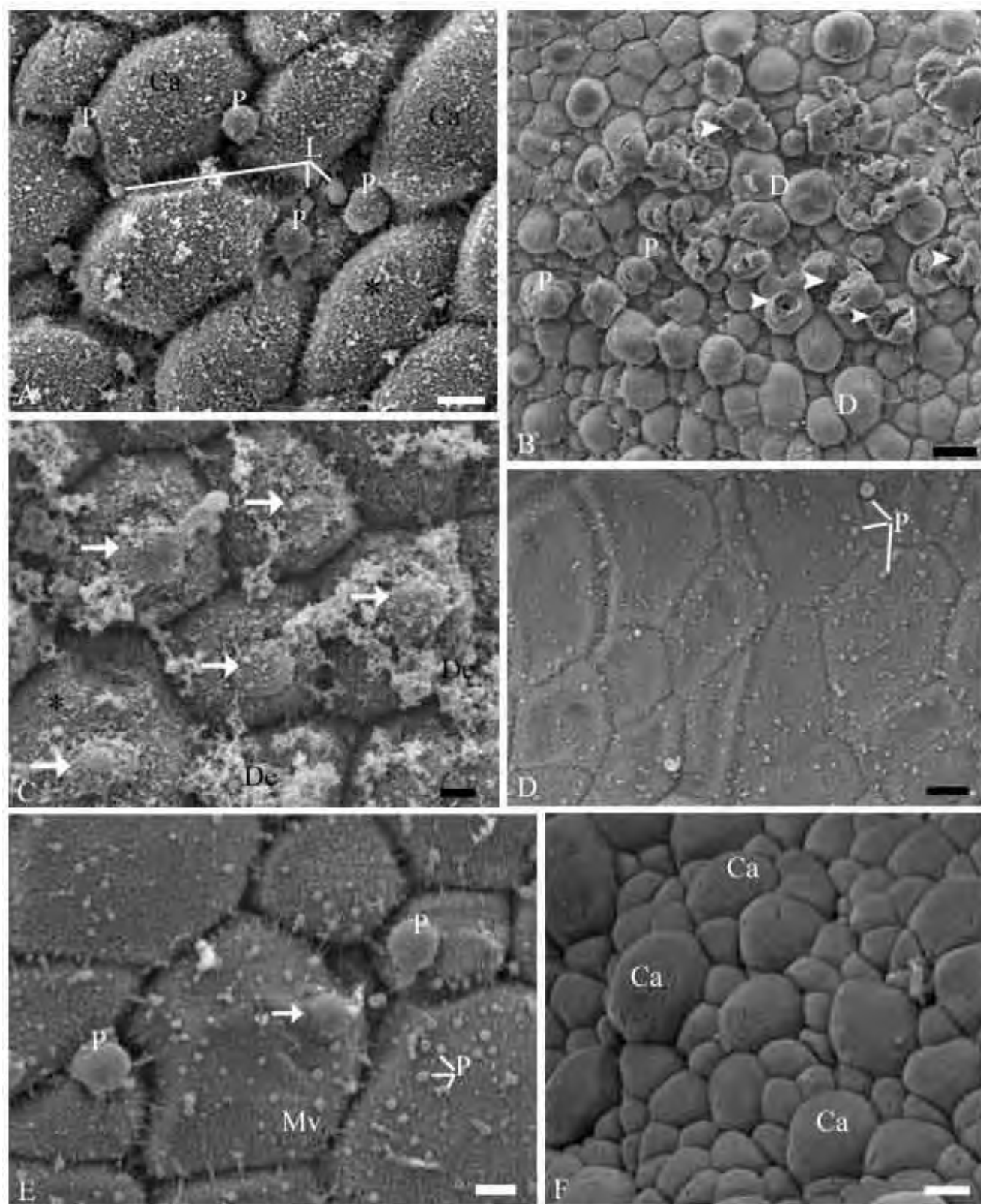


FIGURA 18**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Região posterior do intestino médio de larva tratada com nim a 1,0%. Superfície epitelial das células colunares achatadas com microvilosidades desorganizadas (*) e protusões citoplasmáticas de aspecto granuloso (P). Barra = 8 μm .
- B. Região posterior do intestino médio de larva tratada com nim a 2,0%. Detalhe da superfície de algumas células colunares abauladas (Ca) exibindo áreas circulares sem microvilosidades (►). Notar detritos (De) e protusões (P) sobre as microvilosidades. Barra = 10 μm .
- C. Vista geral externa do intestino de *C. claveri* na fase de pupa. Região anterior (Ra), média (Rm) e posterior (Rp). Barra = 148 μm .
- D. Vista geral da superfície epitelial do intestino médio de pupa controle mostrando a variabilidade na morfologia da superfície das células colunares ao longo do comprimento. Região anterior (Ra), média (Rm) e posterior (Rp). Barra = 50 μm .
- E. Região anterior do intestino médio de pupa controle. Notar células colunares abauladas, justapostas, com exuberantes microvilosidades (Mv) e escassez de protusões citoplasmáticas (P). Alguns pontos com escassez de microvilosidades indicam a formação de protusões (→). Barra = 5 μm .
- F. Região anterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 0,5%. Detalhe de células colunares com microvilosidades desorganizadas (*) e aumento de protusões citoplasmáticas (P) em relação ao grupo anterior. Barra = 4 μm .

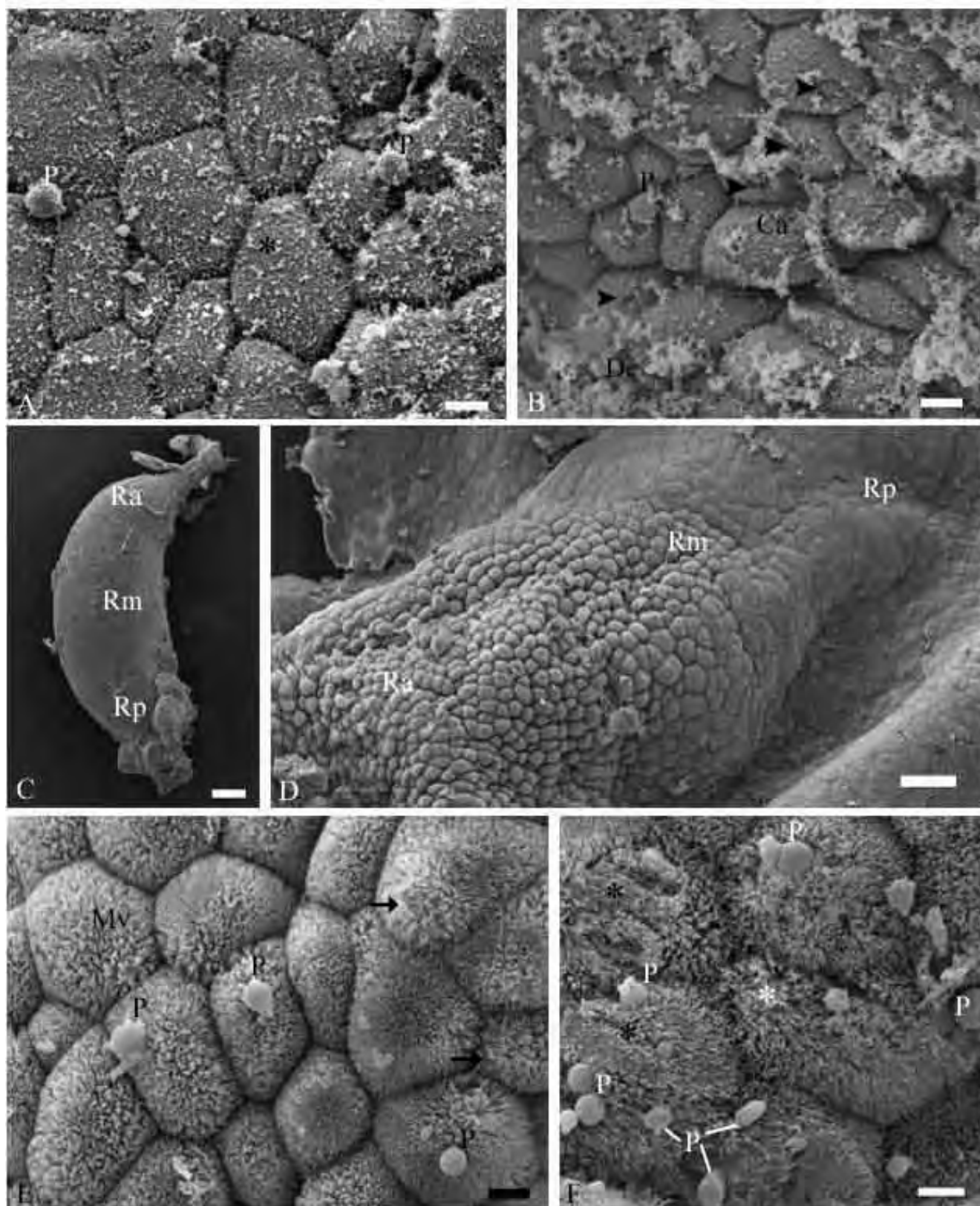


FIGURA 19**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE PUPA DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Região anterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 0,5%. Detalhe da superfície de algumas células colunares exibindo áreas arredondadas com padrão distinto de distribuição das microvilosidades (→) e poucas protusões citoplasmáticas (P). Barra = 8 µm.
- B. Região anterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 1,0%. Superfície epitelial mostrando células colunares abauladas com microvilosidades alteradas e desorganizadas (*). Notar a presença de protusões citoplasmáticas de superfície lisa (P) sobre as microvilosidades. Barra = 4 µm.
- C. Região anterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 1,0%. Notar a grande quantidade de protusões citoplasmáticas lisas (Pl) em área com escassez de microvilosidades (*). Gotas lipídicas (L) também puderam ser observadas sobre as microvilosidades. Barra = 5 µm.
- D – E. Região anterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 2,0%. Detalhe de células colunares abauladas, algumas com região apical dilatada (D), com microvilosidades irregulares e escassas (*). Barras: D = 8 µm; E = 4 µm.
- F. Região média do intestino médio de pupa controle. Notar células colunares levemente abauladas, com microvilosidades exuberantes (Mv) e poucos pontos de formação de protusões citoplasmáticas (→). Barra = 5 µm.

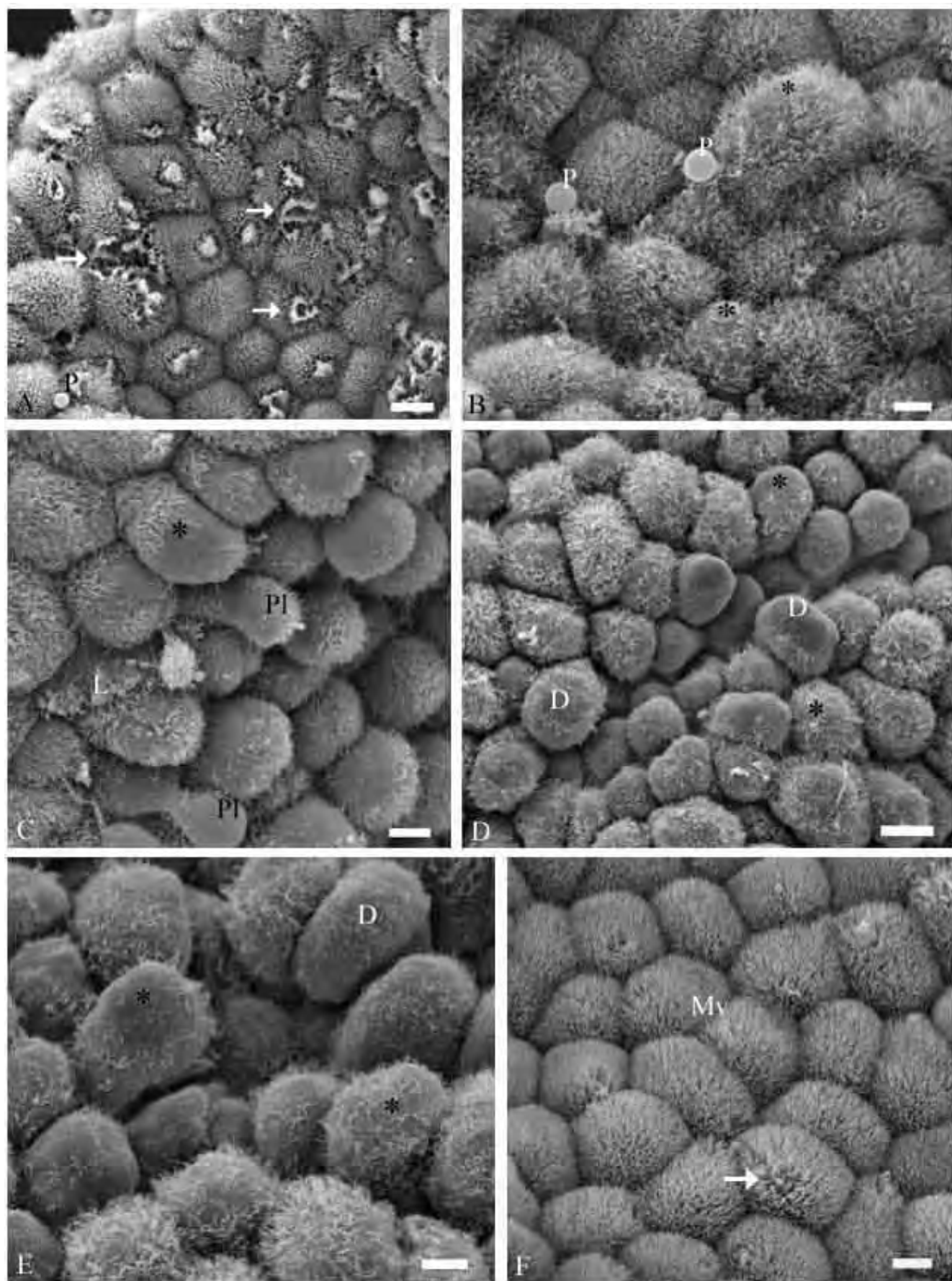


FIGURA 20**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE PUPA DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Região média do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 0,5%. Detalhe da superfície de algumas células colunares exibindo áreas arredondadas com padrão distinto de distribuição de microvilosidades, estando ausente microvilosidades na área central (→). Barra = 8 µm.
- B. Região média do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 1,0%. Notar a formação de protusões citoplasmáticas com microvilosidades proeminentes (*), além da presença de protusão citoplasmática arredondada com microvilosidades (P). Provável gota lipídica (L) sobre microvilosidades. Barra = 4 µm.
- C. Região média do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 2,0%. Notar a presença de áreas arredondadas com disposição irregular das microvilosidades na borda e ausência na área central (→). Barra = 8 µm.
- D. Região média do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 2,0%. Superfície das células colunares abauladas (Ca), exibindo escassas microvilosidades proeminentes (*), protusões citoplasmáticas lisas (P), eliminação de conteúdo citoplasmático de aspecto granular para a superfície epitelial (►) com prováveis gotas lipídicas (L). Barra = 8 µm.
- E. Região posterior do intestino médio de pupa controle. Vista geral da superfície epitelial mostrando células colunares achatadas e justapostas, com microvilosidades regulares (Mv). Notar a presença de pequenas protusões citoplasmáticas lisas (P). Barra = 7 µm.
- F. Região posterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 0,5%. Notar a presença de áreas circulares com microvilosidades desorganizadas (→) entre células colunares com microvilosidades regulares (Mv). Barra = 8 µm.

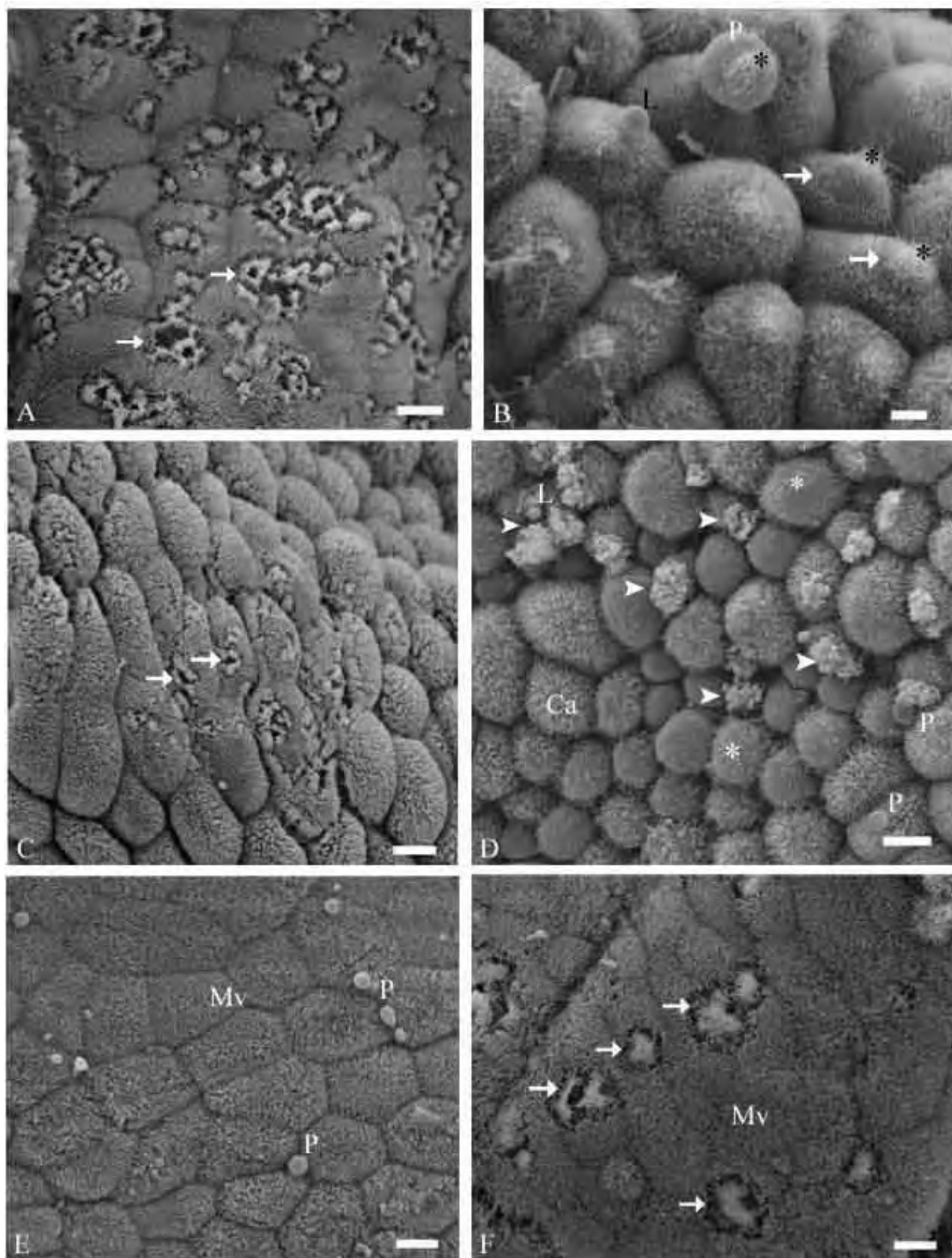


FIGURA 21**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Região posterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 1,0%. Detalhe da superfície de algumas células colunares abauladas (Ca) exibindo na superfície apical áreas arredondadas com padrão distinto de distribuição de microvilosidades, estando ausente microvilosidades na área central (→). Notar a presença de pequenas gotas lipídicas (L). Barra = 8 μ m.
- B. Região posterior do intestino médio de pupa tratada com óleo de nim a 2,0%. Vista geral da superfície epitelial, apresentando células colunares com microvilosidades escassas e exuberantes (*) emitindo protusões citoplasmáticas com membrana colabada e enrugada (Pr). Notar o rompimento da membrana plasmática apical (►) em algumas células colunares, liberando conteúdo citoplasmático para o lúmen e adquirindo aspecto enrugado e colabado. Barra = 8 μ m.
- C. Vista geral de parte do canal alimentar de adulto controle de *C. claveri*. Notar a presença do papo (Pa), divertículo (Dv), proventriculo (Pv), intestino médio (Im) e íleo (I). Barra = 500 μ m.
- D – E. Região anterior do intestino médio de adulto controle. Notar células colunares abauladas (Ca) com abundante microvilosidades (Mv) que variam de regular a irregular (*) dependendo da célula, formação de protusões citoplasmáticas (P) apicais. Barras: D = 8 μ ; E = 4 μ m.
- F. Detalhe da membrana peritrófica (Mp) em adulto controle. Observar a presença de varias camadas lamelares (►). Barra = 2 μ m.

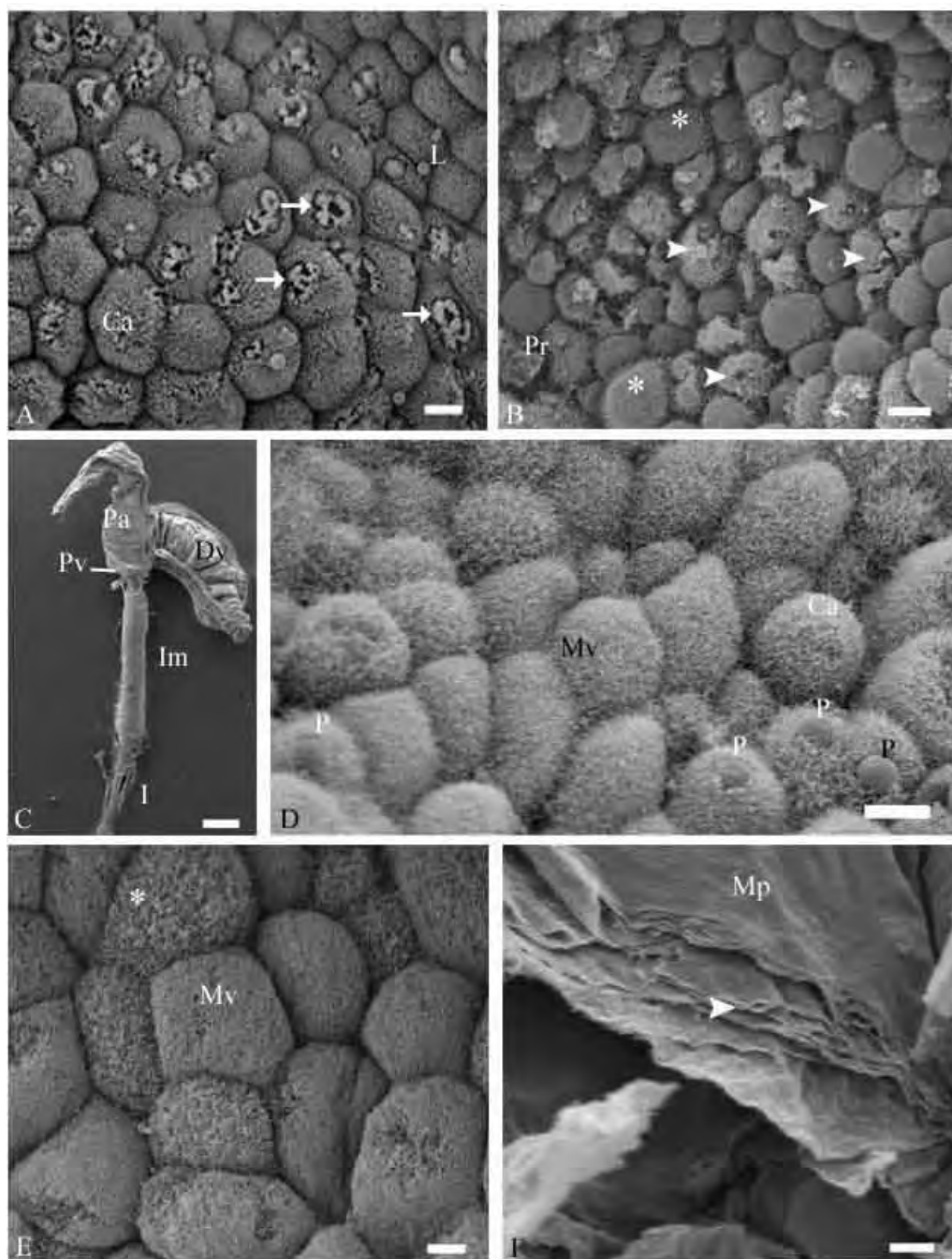


FIGURA 22**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTO DE
Ceraeochrysa claveri.**

- A. Região anterior do intestino médio de adulto tratado com óleo de nim a 0,5%. Notar protusões citoplasmáticas lisas e arredondadas (Pl), com diferentes tamanhos. Microvilosidades apresentam-se mais irregulares (*), com início de desorganização. Barra = 8 μ m.
- B. Região anterior do intestino médio de adulto tratado com óleo de nim a 1,0%. Detalhe no aumento de protusões citoplasmáticas lisas (Pl), acompanhado pela desorganização das microvilosidades (*). Barra = 8 μ m.
- C. Região anterior do intestino médio de adulto tratado com óleo de nim a 1,0%. Notar microvilosidades proeminentes e desorganizadas (*). Barra = 8 μ m.
- D – E. Região anterior do intestino médio de adulto tratado com óleo de nim a 2,0%. Detalhe da grande quantidade de protusões citoplasmáticas (P), algumas apresentando micro-rupturas apicais (►). Notar microvilosidades desorganizadas (*). Barras: D = 13 μ m; E = 5 μ m.
- F. Região média do intestino médio de adulto controle. Vista geral da superfície epitelial com células levemente abauladas e justapostas com microvilosidades regulares (Mv). Notar a presença de depressões apicais (→), as quais provavelmente correspondem a liberação de protusões citoplasmáticas. Barra = 8 μ m.

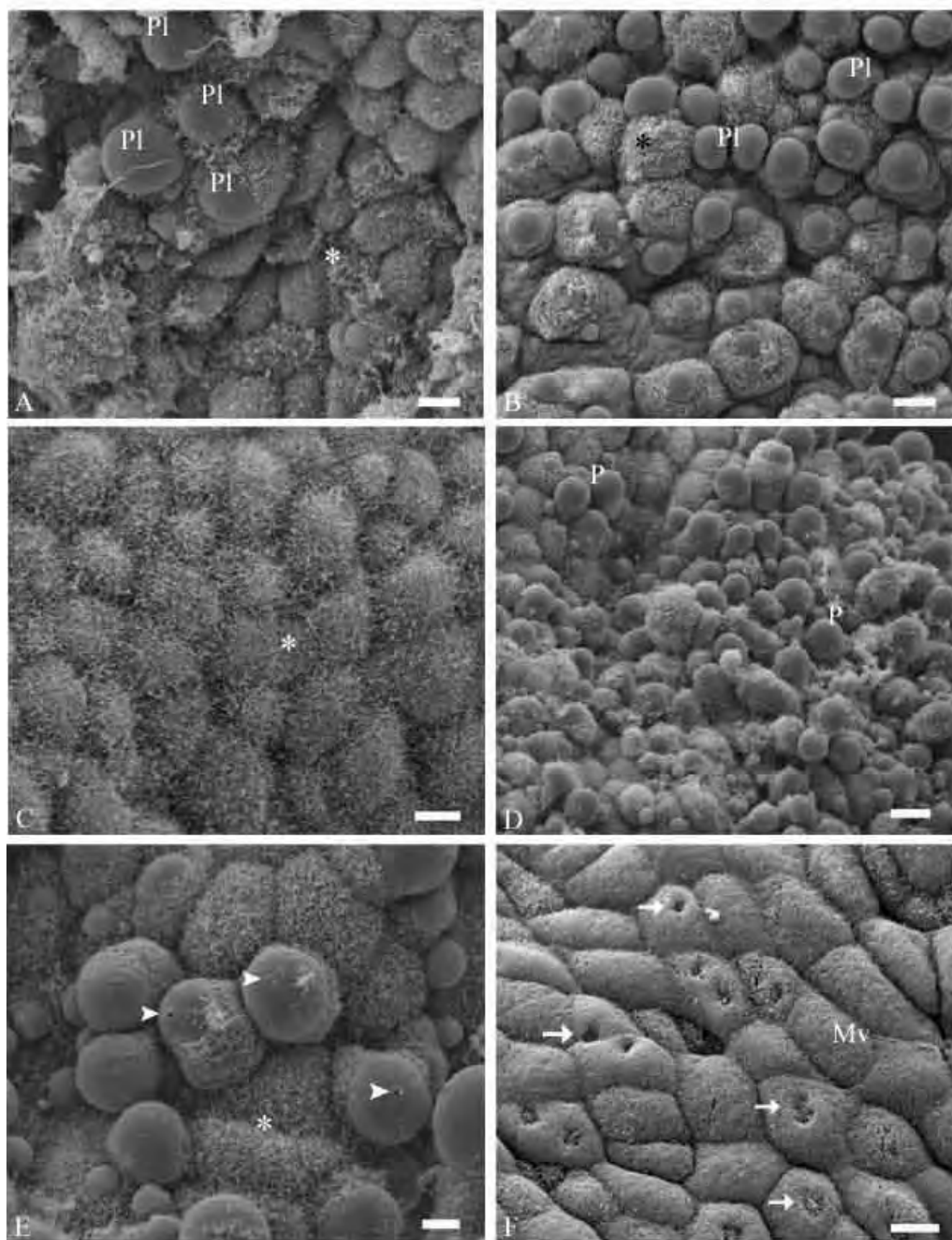


FIGURA 23**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE
ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A – B. Adulto tratado com óleo de nim a 0,5%. Notar a presença de protusões citoplasmáticas (P), assim como a formação de protusões (→). Microvilosidades apresentam aspecto alterado e desorganizado (*). Barras = 8 µm.
- C. Adulto tratado com óleo de nim a 1,0%. Vista geral da superfície epitelial, mostrando grande quantidade de protusões citoplasmáticas (P) em áreas de escassez de microvilosidades (*) na superfície apical das células colunares. Barra = 8 µm.
- D. Adulto tratado com óleo de nim a 1,0%. Notar microvilosidades proeminentes e escassas (*). Barra = 8 µm.
- E. Adulto tratado com óleo de nim a 2,0%. Detalhe das células colunares emitindo grande quantidade de protusões citoplasmáticas lisas (Pl). Notar a escassez de microvilosidades (*) nas células com protusões citoplasmáticas. Barra = 5 µm.
- F. Adulto tratado com óleo de nim a 2,0%. Células colunares com microvilosidades desorganizadas (*), grande concentração de protusões citoplasmáticas lisas (Pl). Notar rompimento da membrana plasmática apical (►) em várias protusões. Barra = 10 µm.

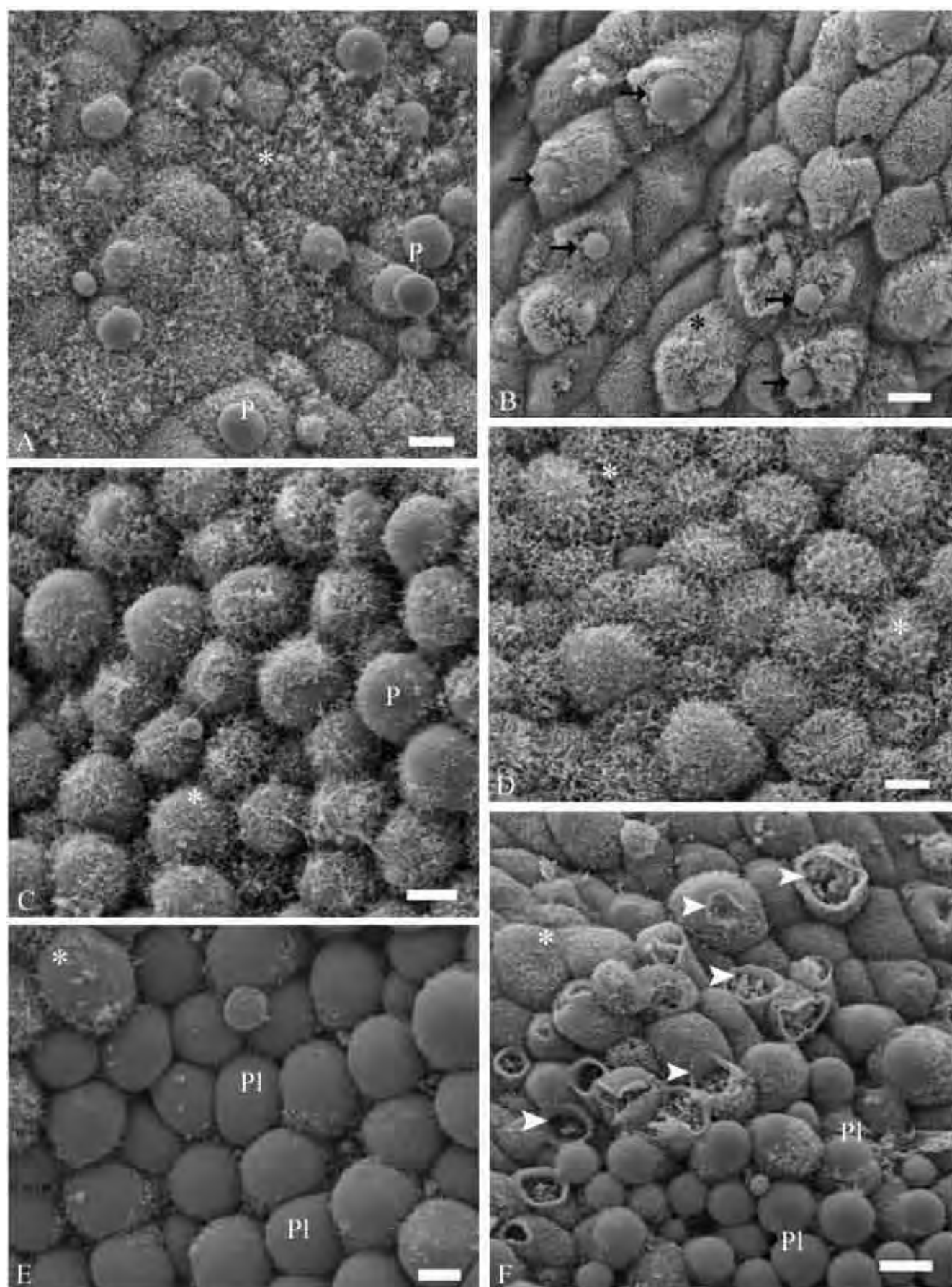
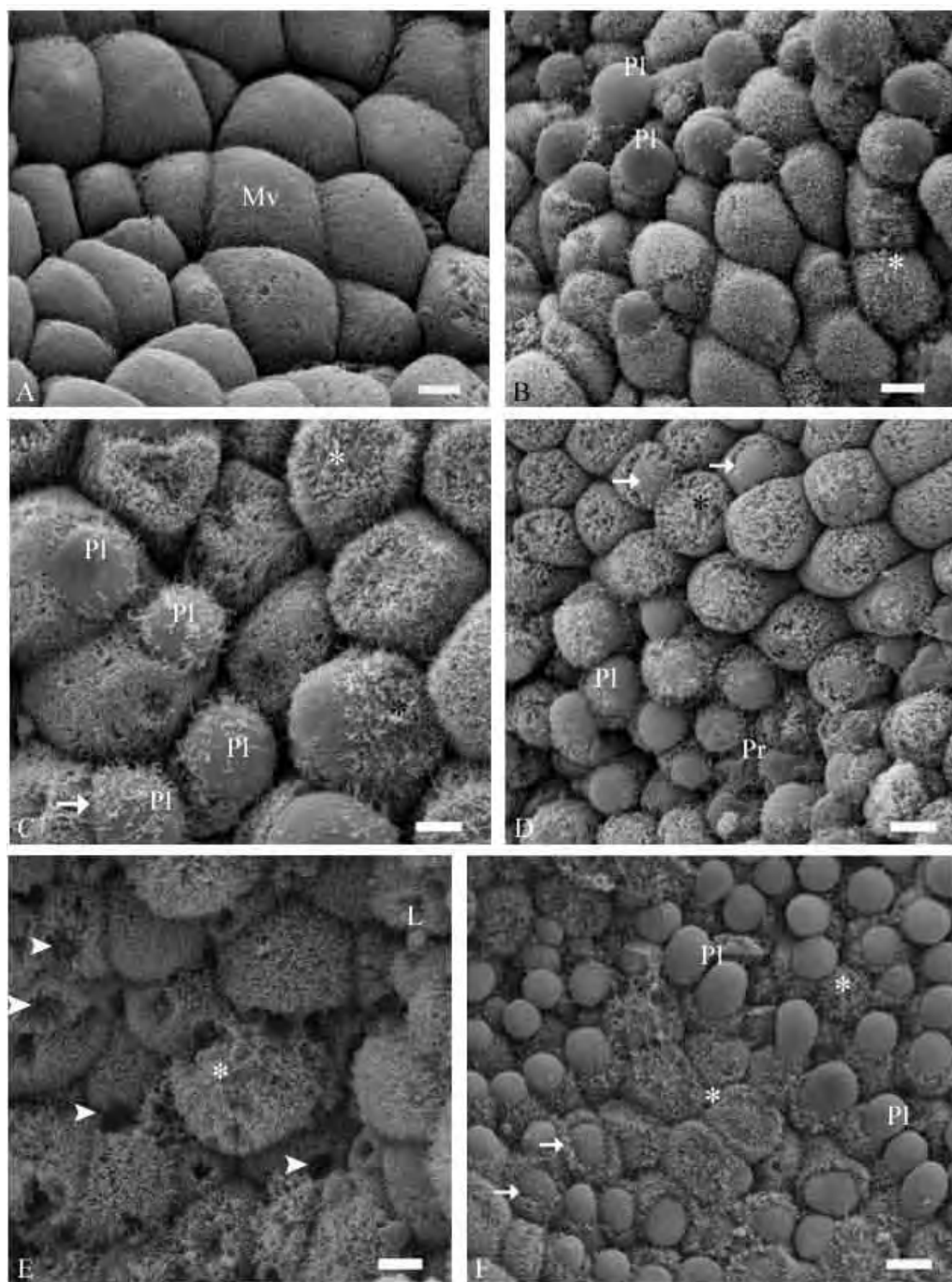


FIGURA 24**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Adulto controle. Células colunares abauladas de diferentes diâmetros com microvilosidades abundantes e regulares (Mv) Barra = 4 μm .
- B. Adulto tratado com óleo de nim a 0,5%. Células colunares abauladas, com microvilosidades desorganizadas (*) e com várias protusões citoplasmáticas lisas (Pl). barra = 8 μm .
- C. Adulto tratado com óleo de nim a 0,5%. Células colunares com microvilosidades desorganizadas (*) com protusões citoplasmáticas lisas (Pl) com discretas microvilosidades. Notar a formação de protusão citoplasmática ($\rightarrow$). Barra = 4 μm .
- D. Adulto tratado com óleo de nim a 1,0%. Grande concentração de protusões citoplasmáticas irregulares (Pr) e lisas (Pl) sendo liberadas ($\rightarrow$) por entre as microvilosidades proeminentes (*). Barra = 8 μm .
- E. Adulto tratado com óleo de nim a 2,0%. Detalhe de perfurações irregulares ($\blacktriangleright$) entre as microvilosidades proeminentes (*). Notar a presença de pequenas gotas lipídicas (L). Barra = 5 μm .
- F. Adulto tratado com óleo de nim a 2,0%. Detalhe das células colunares emitindo grande quantidade de protusões citoplasmáticas lisas (Pl). Notar microvilosidades desorganizadas (*) e a formação de protusões na superfície apical das células colunares ($\rightarrow$). Barra = 8 μm .



4.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EPITELIAIS DO INTESTINO MÉDIO

No epitélio do intestino médio três tipos celulares foram identificados na análise ultraestrutural: células colunares, regenerativas e endócrinas (Figs. 26B, 27A e D). Este epitélio apóia-se sobre uma membrana basal, que externamente é envolta por fibras musculares estriadas, dispostas circular e longitudinalmente (Fig. 26B).

LARVA

Região anterior

Em larvas controle a região anterior do intestino médio apresenta células colunares grande quantidade de microvilosidades, sendo estas longas e com diâmetro regular ao longo de toda a sua extensão (Fig. 25A). O citoplasma apical possui grande quantidade de mitocôndrias de diferentes formatos e tamanhos com matriz elétron-densa, vesículas de secreção com conteúdo elétron-denso, juntamente com vacúolos digestivos e corpos multivesiculares (Figs. 25B e C).

Poucos esferitos foram observados no citoplasma destas células, concentrando estes principalmente no citoplasma apical das células. Pequenas gotas lipídicas, assim como abundante retículo endoplasmático rugoso ocorrem no citoplasma apical em direção ao citoplasma supranuclear (Figs. 25D e E).

No citoplasma supranuclear e perinuclear identificamos depósitos de grânulos de glicogênio, assim como abundante retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Figs. 25E e G). Vacúolos autofágicos também puderam ser constatados nesta região (Fig. 25F).

Na região basal das células colunares observam-se extensas invaginações da membrana plasmática basal, associadas com mitocôndrias e gotas lipídicas, constituindo o labirinto basal (Fig. 26A). O labirinto basal apresenta invaginações estreitas que podem atingir até a região média do citoplasma (Fig. 26B). No espaço extracelular formado pelo labirinto basal podemos identificar a presença de grânulos elétron-densos (Fig. 26C).

Juntamente com o grande acúmulo de gotas lipídicas, o citoplasma basal e médio apresentam pequenos depósitos de glicogênio (Fig. 26A). Abaixo do epitélio a

membrana basal acompanha a superfície irregular das células colunares, sendo esta membrana delgada, contínua e formada por uma matriz granulada elétron-densa (Fig. 26C).

O núcleo das células colunares apresenta formato oval, com predomínio de cromatina pouco condensada (Fig. 26B). O acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma basal e infranuclear pode muitas vezes alterar o formato nuclear (Fig. 26E). Bactérias endossimbiontes, possivelmente gram-negativas foram encontradas no citoplasma destas células (Fig. 26D).

Células regenerativas, localizadas na base do epitélio, apresentam formato oval, levemente cônico, com citoplasma elétron-lucente em relação às células colunares vizinhas (Fig. 27A). O citoplasma apresenta predomínio de ribossomos livres, ocorrendo de modo discreto organelas tais como mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático rugoso, pequenos complexos de Golgi e corpos multivesiculares (Figs. 27B e C).

Pequenas gotas lipídicas também puderam ser visualizadas no citoplasma basal das células regenerativas, assim como acúmulo de glicogênio e bactérias endossimbiontes (Fig. 27A). Com relação à membrana plasmática basal, esta se apresenta pouco desenvolvida.

O núcleo das células regenerativas ocupa grande área do citoplasma, apresentado formato oval, levemente alongado, seguindo a morfologia da célula. A cromatina ocorre de modo frouxo, com diversos grumos heterocromáticos (Fig. 27A).

As células endócrinas são visualizadas de modo semelhante às células regenerativas preferencialmente na base do epitélio, sendo raramente observadas. Apresentam na maioria das vezes formato cônico, levemente alongado com citoplasma pouco denso, repleto de pequenos grânulos elétron-densos (Fig. 26 D e 27A).

Dois tipos de células endócrinas puderam ser constatados: tipo 1, apresenta grânulos sólidos elétron-densos, totalmente preenchidos por uma matriz densa (Figs. 27F e 28C). Chama atenção a presença de grandes grumos heterocromáticos no núcleo deste tipo de célula (Figs. 27D e E). A célula endócrina do tipo 2 apresenta grânulos aureolados, apresentando um espaço elétron-lucente entre a membrana e a matriz densa do grânulo. Em menor quantidade podemos observar a presença de grânulos sólidos, neste caso não aureolados (Figs 28A e B).

Diferente do tipo 1, o núcleo da célula endócrina do tipo 2 apresenta cromatina frouxa, com grumos heterocromáticos homogeneamente dispersos (Fig. 28A). O núcleo

pode ser considerado volumoso, por ocupar um grande espaço citoplasmático, semelhante aos das células regenerativas.

No citoplasma podemos constatar o predomínio de ribossomos livres, assim como poucas organelas, tais como complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias. Em relação às mitocôndrias, muitas vezes, estas são menos elétrôn-densas em relação às células colunares. Vacúolo com conteúdo elétrôn-lucente são dificilmente visualizados (Figs. 27F e 28C).

Para ambos os tipos de células endócrinas descritas a membrana plasmática basal não é desenvolvida, apresentando um discreto labirinto basal (Figs. 27F, 28B e 38C). A superfície apical destas células não foi observada fazendo contato com o lúmen do intestino médio (Figs. 27D e 28A).

No tratamento a 0,5% com óleo de nim as células colunares exibem um discreto aumento na ocorrência de protusões citoplasmáticas, assim como alterações ultraestruturais. Notamos que as microvilosidades são escassas e curtas na superfície apical (Fig. 28E). Com relação ao citoplasma, houve aumento na quantidade de corpos multivesiculares, vacúolos digestivos com conteúdo denso e heterogêneo, gotas lipídicas e vacúolos elétrôn-lucentes contendo material membranoso (Figs. 28F e H). Esferitos não foram visualizados nas células. Protusões citoplasmáticas apresentam pequenos vacúolos com conteúdo elétrôn-lucentes, mitocôndrias, microvilosidades esparsas e grandes gotas lipídicas coalescentes (Fig. 28D).

Retículo endoplasmático liso e rugoso e complexo de Golgi vesicular também se mostraram desenvolvidos no citoplasma apical e supranuclear (Fig. 28G). No caso do retículo endoplasmático liso apresentou-se desenvolvido próximo somente no citoplasma supranuclear e perinuclear, juntamente com o retículo endoplasmático rugoso (Figs. 29A e B). Não visualizamos depósitos de glicogênio nesta região do citoplasma das células colunares. Gotas lipídicas ocorreram em menor número e em maior tamanho.

No citoplasma basal das células colunares constatamos menor extensão das invaginações da membrana basal em direção ao interior da célula, com espaço extracelular mais dilatado em relação ao grupo controle. O labirinto basal mostra-se associado com poucas mitocôndrias elétrôn-densas, volumosas gotas lipídicas e depósitos de glicogênio (Fig. 29C).

Células regenerativas não apresentaram diferenças ultraestruturais em relação ao grupo controle (Fig. 29D), apenas a ocorrência de espaços intercelulares entre células

regenerativas e colunares (Fig. 29E). Com relação às células endócrinas, somente a do tipo 1, as quais possuem grânulos elétron-densos sólidos apresentaram cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas no citoplasma basal (Fig. 29F).

Para o tratamento a 1%, alterações ultraestruturais nas microvilosidades não foram constatadas, apenas um leve espaçamento (Fig. 30B). No citoplasma apical o retículo endoplasmático rugoso apresentou-se desenvolvido, com arranjo concêntrico, geralmente próximo a gotas lipídicas. Mitocôndrias elétron-densas e gotas lipídicas predominam nesta região (Figs 30A e B).

O citoplasma supranuclear e perinuclear apresentou volumosas gotas lipídicas, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos, além de esferitos com poucas lamelas com material finamente floculado. Vacúolos autofágicos e digestivos também são constatados do citoplasma supranuclear (Figs. 30C, D e E).

Com relação à base celular, o labirinto basal apresenta discretamente dilatado, principalmente na região mais próxima a lâmina basal. Associado ao labirinto basal encontramos mitocôndrias, gotas lipídicas e raros depósitos de glicogênio (Fig. 30F).

Não constatamos alterações ultraestruturais nas células regenerativas. Células endócrinas do tipo 1 apresentaram retículo endoplasmático liso desenvolvido e fragmentado na região perinuclear do citoplasma (Fig. 30G).

Para o tratamento a 2% com óleo de nim, microvilosidades das células colunares ocorrem de modo esparsa e irregular na superfície apical (Fig. 31A). O citoplasma apical mostra-se rarefeito com retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado, além de gotas lipídicas, grânulos elétron-densos e menor quantidade de mitocôndrias (Figs. 31A e B). Mitocôndrias apresentam diferentes formatos, muitas vezes formando possíveis autofagossomos, após englobar material citosólico (Figs. 31C e D). A matriz mitocondrial também mostra-se levemente granulada e elétron-densa, o que dificulta a visualização das cristas mitocondrias. Corpos multivesiculares densos e heterogêneos também ocorrem na região apical (Fig. 31C).

O citoplasma supranuclear comportou-se de modo semelhante ao apical, com retículo endoplasmático com cisternas dilatadas e fragmentadas, com presença de mitocôndrias aneladas, formando muitas vezes possíveis autofagossomos (Fig. 31D).

Já na região perinuclear, apenas retículo endoplasmático rugoso fragmentado ocorre juntamente com mitocôndrias mais edemaciadas e menos elétron-densas (Fig. 31E). Mitocôndrias, gotas lipídicas e pequenos acúmulos de glicogênio ocorrem em associação com o labirinto basal, o qual mostra-se dilatado (Fig. 31F).

As células regenerativas e endócrinas não mostraram alterações decorrentes do tratamento.

Região Média

As células colunares do grupo controle apresentam microvilosidades regulares, com ápice mais afilado e de menor tamanho em relação às microvilosidades na região anterior do intestino médio (Figs. 32A e B). O citoplasma apical identificamos abundante vacúolos digestivos com conteúdo elétron-denso, além de pequenas gotas lipídicas, mitocôndrias com matriz elétron-densa e retículo endoplasmático rugoso (Figs 32A e B).

O citoplasma supranuclear exhibe vários vacúolos digestivos e autofágicos, sendo uma região rica em mitocôndrias alongadas e elétron-densas. Depósitos de grânulos de glicogênio foram raros nesta região do intestino médio, diferentemente do retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi que se apresentam de forma abundante (Figs. 32C e D).

Vários esferitos isolados também podem ser visualizados nesta região, muitos destes apresentando número variável de lamelas elétron-densas, ou mesmo apenas material finamente floculado (Fig. 32D). Esferitos também podem ocorrer de forma agrupada, muitas vezes ocorrendo fusão entre suas membranas, ou mesmo se fundir com gotas lipídicas (Fig. 32E).

O citoplasma basal e infranuclear das células colunares exibem grande acúmulo de gotas lipídicas, sendo estas maiores na região infranuclear e menores na região basal das células. O depósito dessas gotas pode muitas vezes ocupar um grande espaço celular e, algumas vezes estas acabam se fundindo em gotas maiores próximas a região perinuclear (Fig. 32F).

Na base celular visualizam-se abundantes invaginações da membrana basal, que não se aprofundam para o interior da célula colunar tanto quanto as invaginações da região anterior no intestino médio (Fig. 33A). Associado ao labirinto basal encontram-se apenas mitocôndrias e gotas lipídicas; o espaço extracelular do labirinto basal mostra-se pouco mais dilatado em relação a região anterior do intestino médio, mas também apresentam grânulos elétron-densos no espaço extracelular (Figs. 33B e C).

Os núcleos das células colunares apresentam cromatina frouxa, com grumos heterocromáticos homogeneamente dispersos. Também visualizamos a presença de bactérias intranucleares em algumas células colunares (Fig. 33D e E).

Células endócrinas e regenerativas (Fig. 33F) apresentam características ultraestruturais semelhantes às descritas para a região anterior do intestino médio.

Nas células colunares do tratamento a 0,5% constatamos pouca irregularidade na disposição das microvilosidades, o citoplasma apical apresenta acúmulo de vacúolos elétron-lucos com conteúdo membranoso, assim como a presença de corpos multivesiculares e vacúolos digestivos. Ambos os retículos endoplasmático liso e rugoso mostraram-se desenvolvidos (Figs. 34A e B).

Na região supranuclear visualizamos esferitos com poucas camadas de material elétron-denso. Semelhante ao citoplasma apical, ambos os retículos endoplasmáticos e complexo de Golgi apresentaram-se desenvolvidos (Figs. 34C e D). O citoplasma perinuclear apresenta acúmulo de volumosas gotas lipídicas, semelhantes ao grupo controle. Espaços intercelulares puderam ser constatados entre as células colunares (Fig. 34E).

A base celular apresentou labirinto basal pouco mais dilatado e aprofundado em direção a região média da célula em comparação a mesma região do grupo controle, também estando associado com mitocôndrias e pequenas e médias gotas lipídicas (Fig. 34F).

Células regenerativas e endócrinas não mostraram diferenças citoplasmáticas ultraestruturais em relação ao controle.

Células colunares apresentaram no tratamento a 1% predomínio de corpos multivesiculares heterogêneos no citoplasma apical. Retículos endoplasmáticos liso e rugoso também mostraram-se desenvolvidos (Fig. 35A e B). Protusões citoplasmáticas continham principalmente mitocôndrias, corpos multivesiculares e gotas lipídicas (Fig. 35C). Microvilosidades apresentaram-se normais, ocorrendo tanto na superfície apical quanto nas protusões citoplasmáticas.

O citoplasma supranuclear apresentou figuras de mielina, esferitos em menor quantidade e tamanho enquanto que os dois tipos retículos endoplasmáticos e complexo de Golgi mostraram-se desenvolvidos (Figs. 35D e E).

O labirinto basal ocorreu de forma dilatada, associado a mitocôndrias e a maiores quantidades de pequenas e médias gotas lipídicas quando comparados aos tratamentos controle e em menor concentração de óleo de nim (Fig. 35F).

Células regenerativas e endócrinas não apresentaram diferenças ultraestruturais em relação ao controle.

Finalmente para o tratamento a 2%, visualizamos células colunares com microvilosidades irregulares, com ápice afilado, liberando pequenas microvesículas (Figs. 36A e B). O citoplasma apical apresentou poucas organelas, ocorrendo principalmente mitocôndrias com matriz elétron-densa, retículo endoplasmático rugoso com cisternas fragmentadas e dilatadas, além de pequenas gotas lipídicas, corpos multivesiculares e vacúolos digestivos heterogêneos (Figs. 36A, C e D).

O citoplasma supranuclear apresentou complexo de Golgi desenvolvido e esferitos com pouco material floculado. Mitocôndrias ocorrem de forma alongada e elétron-densa (Figs. 36E e F).

Já no citoplasma basal, amplos espaços extracelulares puderam ser visualizados no labirinto basal (Fig. 36G). Espaços intercelulares ocorreram na base celular entre células colunares e regenerativas (Fig. 36H).

Células endócrinas e regenerativas mostraram-se normais quando comparadas ao grupo controle.

Região posterior

As células colunares do grupo controle apresentam superfície apical com numerosas microvilosidades, as quais fazem contato com a membrana peritrófica, devido ao acúmulo de bolo alimentar que ocorre nesta região do intestino médio.

A membrana peritrófica mostra-se constituída por uma única camada, onde a superfície ectoperitrófica que entra em contato com as microvilosidades apresenta-se mais elétron-densa, enquanto que a superfície voltada para o espaço endoperitrófico em contato com o bolo alimentar é menos contrastada (Fig. 37A).

Vacúolos digestivos, corpos multivesiculares e mitocôndrias ocorrem de forma abundante, assim como pequenos depósitos de glicogênio, gotas lipídicas e pequenos esferitos no citoplasma apical (Figs. 37B, C e D).

Com relação ao citoplasma supranuclear e perinuclear, em geral notamos maiores quantidades de retículo endoplasmático rugoso e de complexo de Golgi. Esferitos, depósitos de glicogênio e gotas lipídicas também ocorrem em grande quantidade (Fig. 37D). Semelhante a região média do intestino, também podemos constatar a fusão entre membranas de esferitos (Fig. 37E) e entre gotas lipídicas e esferitos (Fig. 37D). Volumosos vacúolos autofágicos podem ser visualizados, muitos contendo esferitos no interior (Fig. 37F). Bactérias endossimbiontes também ocorrem no citoplasma entre esferitos e gotas lipídicas, semelhante às outras regiões do intestino (Fig. 37D).

Na base celular notamos abundantes invaginações da membrana basal, mas estas, em relação às outras regiões do intestino médio, são as que menos se aprofundam em direção a região média das células colunares. Outra diferença visível é com relação à dilatação do espaço extracelular do labirinto basal, sendo este mais dilatado em comparação as outras regiões do intestino avaliadas (Figs. 37G e H)

O labirinto basal mostra-se associado a mitocôndrias de diferentes tamanhos, depósitos de grânulos de glicogênio e a grandes gotas lipídicas (Fig. 37G). Talvez devido ao fato das gotas lipídicas serem volumosas, estas dificultam a formação de extensas invaginações da membrana basal em direção ao interior da células colunares. Raros esferitos também podem ser observados próximos ao labirinto basal (Fig. 37H). Semelhante às outras regiões do intestino, também constatamos grânulos elétron-densos no espaço extracelular no labirinto basal (Fig. 38A).

Células regenerativas e endócrinas não mostraram diferenças ultraestruturais quando comparadas as outras regiões do intestino médio (Figs. 38B e C).

Para o tratamento a 0.5% de óleo de nim as células colunares não apresentaram alterações nas microvilosidades. Houve predomínio de mitocôndrias, corpos multivesiculares heterogêneos e de pequenas gotas lipídicas no citoplasma apical (Fig. 38D).

Na região supranuclear retículo endoplasmático rugoso e esferitos ocorrem de modo mais abundantemente, sendo raros os depósitos de glicogênio, diferentemente do grupo controle, que apresentava de forma abundante. Já no citoplasma infranuclear predomina o acúmulo de gotas lipídicas. Pequenos espaços intercelulares podem ser visualizados entre células colunares (Figs. 38E e G).

Na base celular, somente gotas lipídicas e mitocôndrias foram constatadas em associação ao labirinto basal (Fig. 38F), ao contrário do grupo controle que apresentava também associação com depósitos de glicogênio.

Com relação às células regenerativas e endócrinas, somente células endócrinas do tipo 1 apresentaram alterações, apresentando retículo endoplasmático liso desenvolvido e a formação de espaços intercelulares em contato com as células colunares vizinhas (Fig. 39A).

No tratamento a 1%, células colunares apresentaram microvilosidades mais esparsas, seguido por citoplasma apical rarefeito, com mitocôndrias elétron-densas, retículo endoplasmático rugoso fragmentado e vacúolos elétron-lucentes (Fig. 39B).

No citoplasma supranuclear e perinuclear podemos constatar o predomínio de vacúolos elétron-lucentes com material finamente floculado e também esferitos. Esferitos também são observados no citoplasma perinuclear, juntamente com retículos endoplasmático rugoso e cisternas vesiculadas do complexo de Golgi (Figs. 39C e D).

O labirinto basal apresentou-se pouco dilatado, estando associado com grandes quantidades de pequenas gotas lipídicas e escassas mitocôndrias (Fig. 39E). Semelhante ao tratamento anterior com óleo de nim, somente em células endócrinas do tipo 1 foram visualizadas alterações ultraestruturais, as quais apresentaram retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado (Fig. 39F). Nenhuma alteração foi observada na células regenerativas.

Para o tratamento a 2%, células colunares apresentaram microvilosidades esparsas, com liberação de microvesículas; citoplasma apical rarefeito com abundante retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado, mitocôndrias elétron-densas e poucos vacúolos digestivos e corpos multivesiculares (Figs. 40A e B).

No citoplasma supranuclear visualizamos retículo endoplasmático liso e rugoso desenvolvidos (Fig. 40C). Já no citoplasma infranuclear, constatamos grandes figuras do tipo mielina (Fig. 40D). O labirinto basal apresentou-se dilatado e associado a mitocôndrias e pequenas e médias gotas lipídicas (Fig. 40E).

Alterações ultraestruturais nas células regenerativas e endócrinas não foram visualizadas, apenas a formação de espaços intercelulares com material floculado entre células regenerativas e colunares próximas a base do epitélio (Fig. 40F).

Com base nos dados observados nas três regiões do intestino médio, a ingestão do óleo de nim, nas três concentrações avaliadas, ocasionou uma série de alterações ultraestruturais, principalmente nas células colunares e endócrinas do tipo 1. Células colunares apresentaram alterações nas microvilosidades, quanto à disposição na superfície apical, ocorrendo de modo esparsa e irregular e a liberação de microvesículas; presença de retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado principalmente no citoplasma apical e supranuclear; retículo endoplasmático liso desenvolvido; ocorrência de vacúolos elétron-lucentes contendo material membranoso; diminuição na quantidade de depósitos de glicogênio; aparecimento de figuras de mielina, espaços intercelulares entre células colunares, regenerativas e endócrinas e labirinto basal dilatado.

Células endócrinas do tipo 1 mostraram alterações no retículo endoplasmático liso, ocorrendo muitas vezes de forma desenvolvida no citoplasma basal, ou retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas e fragmentadas.

PUPA

Região anterior

Células colunares no grupo controle apresentaram abundantes microvilosidades distribuídas de modo regular, seguida por citoplasma apical rarefeito, com pouca organização ultraestrutural, apresentando predomínio de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, volumosos grânulos elétron-densos e raros corpos multivesiculares (Figs. 41A e B).

O citoplasma supranuclear e perinuclear é preenchido por volumosos vacúolos elétron-lucentes contendo material membranoso (Fig. 41C). Entre estes vacúolos visualizamos predomínio de ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, complexo de Golgi e pequenos depósitos de glicogênio (Fig 41D).

Já no citoplasma infranuclear e basal também houve predomínio de vacúolos, de modo que o labirinto basal muitas vezes acaba alojando vacúolos no espaço extracelular. Poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e glicogênio ocorreram associados ao labirinto basal (Figs. 41E e F). A membrana basal mostra-se mais espessa, onde podemos distinguir uma camada mais elétron-densa, sendo esta voltada para a camada muscular e outra menos elétron-densa voltada para o labirinto basal (Figs. 41E e 42F). A irregularidade da membrana basal ao redor das células epiteliais também foi maior em comparação a fase de larva (Fig. 41E).

Células regenerativas (Fig. 42A) e endócrinas não apresentaram diferenças ultraestruturais quando comparadas as da fase larval.

No tratamento a 0,5% notamos nas células colunares microvilosidades mais esparsas, citoplasma apical com maiores quantidades de vacúolos elétron-lucentes, glicogênio, mitocôndrias e grânulos densos (Fig. 42B). Protusões também foram identificadas, apresentando citoplasma rarefeito com extensos depósitos de glicogênio, grânulos densos, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Fig. 42C). Na região média do citoplasma, ocorreram muitos vacúolos elétron-lucentes, depósitos de glicogênio e raras gotas lipídicas (Fig. 42D).

Na base celular o labirinto basal apresentou estreitas invaginações associadas a cisternas fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 42E). Células regenerativas não mostraram alterações ultraestruturais, diferentemente das células endócrinas do tipo 1, as quais apresentaram intensa vacuolização do citoplasma, possivelmente devido a dilatação e fragmentação do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 42F).

Para o tratamento a 1% com óleo de nim, somente se intensificaram as alterações ultraestruturais, como a rarefação do citoplasma apical e a perda de microvilosidades (Fig. 43A). Além da ocorrência de vacuolização do citoplasma e aumento na quantidade de depósitos de glicogênio nas células colunares (Fig. 43B), células musculares também apresentaram vacuolização do citoplasma, devido à dilatação e fragmentação do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 43C).

Com o tratamento a 2%, notamos aumento da vacuolização ocasionando o alongamento das células colunares, e conseqüentemente liberação de protusões citoplasmáticas com escassas microvilosidades (Fig. 43D). O citoplasma apresenta-se rarefeito, com depósitos de glicogênio, grânulos densos, vacúolos e raras gotas lipídicas (Figs. 43D e E).

Semelhante as outras concentrações avaliadas, o labirinto basal apresentou estreitas invaginações, que entram em contato com a membrana basal densa e muito irregular. Também foi possível visualizar a distribuição irregular de miofibrilas em fibras musculares (Fig. 43F).

Região média

Células colunares do grupo controle apresentaram ultraestrutura muito semelhante as da região anterior do intestino. Microvilosidades ocorreram de forma menos acentuada, seguida por citoplasma com predomínio de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, grânulos elétron-densos e corpos multivesiculares (Fig. 44A).

No citoplasma rarefeito existiu predomínio de vacúolos elétron-lucentes, de modo que observamos o retículo endoplasmático rugoso mais desenvolvido no citoplasma perinuclear. O núcleo apresenta-se levemente achatado, localizado próximo a base da célula (Fig. 44B). O labirinto basal mostrou-se dilatado e associado a vacúolos e a poucas mitocôndrias (Fig. 44C).

Para os tratamentos com óleo de nim, as células colunares apresentaram características semelhantes à da região anterior, ocorrendo diminuição na quantidade de microvilosidades, rarefação do citoplasma, tornando-se menos elétron-denso, além do

aumento na vacuolização do citoplasma, muitos destes, associado a volumosos depósitos de glicogênio que ocorreram em maiores quantidades nos tratamentos com o nim (Figs. 44D, E, F e 45B). Células regenerativas não apresentaram alterações, apenas em células endócrinas do tipo 1 constatamos retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado (Fig. 45A).

Região posterior

No grupo controle, as células colunares apresentam as mesmas características ultraestruturais gerais observadas nas outras regiões do intestino médio. Como na região média, notamos grande quantidade de grânulos elétron-densos e corpos multivesiculares no citoplasma apical e supranuclear. Outro aspecto observado foi a existência de contato entre as microvilosidades e membrana peritrófica. Vacúolos predominam no citoplasma, principalmente no citoplasma supranuclear (Fig. 45C).

O núcleo situa-se próximo à base celular, com labirinto basal dilatado e associado a poucas mitocôndrias e vacúolos elétron-lucentes (Fig. 45C). As células regenerativas e endócrinas apresentaram normais, com as mesmas características descritas para a fase de larva.

Nos tratamentos com óleo de nim notamos crescente aumento na vacuolização do citoplasma e depósitos de glicogênio das células colunares, principalmente no citoplasma apical, ocorrendo muitas vezes a liberação de protusões citoplasmáticas com citoplasma rarefeito e esparsas microvilosidades. Devido ao contato da membrana peritrófica com a superfície apical das células colunares, protusões acabam sendo impedidas de serem formadas e liberadas, ocorrendo desta forma a dilatação da superfície apical, estando esta preenchida por citoplasma rarefeito com vacúolos elétron-lucentes, depósitos de glicogênio e poucas organelas como mitocôndrias (Fig. 45E).

Células regenerativas e endócrinas não apresentaram modificações. Já células musculares apresentaram disposição irregular das miofibrilas (Fig. 45D).

Com base nos dados descritos na análise ultraestrutural do epitélio do intestino médio na fase de pupa, a ingestão do óleo de nim mostrou-se prejudicial as três regiões avaliadas do intestino, causando alterações nas microvilosidades, tornando-as escassas; aumento na liberação de protusões citoplasmáticas; aumento na vacuolização do citoplasma e depósitos de glicogênio nas células colunares; alteração no retículo endoplasmático rugoso nas células endócrinas do tipo 1, ocorrendo de forma dilatada e

fragmentada; e nas fibras musculares, retículo endoplasmático dilatado e fragmentado, além da ocorrência de disposição irregular das miofibrilas.

ADULTO

Região anterior

A superfície apical das células colunares de adultos controle apresentaram abundantes microvilosidades, sendo estas longas e com diâmetro regular ao longo de toda sua extensão, sendo freqüente observar nas extremidades das microvilosidades a liberação de microvesículas (Fig. 46A). No citoplasma apical também verificamos a presença de vesículas de secreção e predomínio de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, raras figuras de mielina e esferitos, contendo estes, apenas material finamente floculado (Figs. 46A e B). Raras protusões citoplasmáticas foram observadas, contendo estas predomínio de cisternas retículo endoplasmático rugoso (Fig. 46C).

No citoplasma supranuclear observamos maiores quantidades de esferitos, contendo material floculado ou apenas estruturas lamelares no interior. Houve ainda abundância de retículo endoplasmático rugoso, seguido por mitocôndrias (Fig. 46D). O mesmo foi observado para o citoplasma perinuclear. O núcleo apresenta-se esférico na maioria das vezes, e com predomínio de cromatina descondensada (Fig. 46E).

O citoplasma basal mostrou-se mais rarefeito em comparação ao apical, havendo predomínio de mitocôndrias e retículo endoplasmático associados às estreitas e longas invaginações do labirinto basal (Fig. 46F).

Com relação às células regenerativas e endócrinas, estas não apresentaram diferenças ultraestruturais em comparação às fases de larva e pupa. Células regenerativas na fase adulta ocorreram aparentemente em grupos maiores de células na base do epitélio e também apresentaram bactérias endossimbiontes (Fig. 47A).

No tratamento a 0,5% células colunares apresentaram microvilosidades com granulações elétron-densas no seu interior e na membrana (Fig. 47B). No citoplasma apical houve predomínio de mitocôndrias, vesículas de secreção elétron-densas, ocorrência de algumas cisternas do retículo endoplasmático rugoso levemente dilatadas, retículo endoplasmático liso desenvolvido e presença de complexo de Golgi vesicular (Fig. 47B e C).

No citoplasma perinuclear visualizamos citoplasma mais rarefeito com cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, muitas em continuidade com espaço perinuclear também dilatado (Figs. 47D e E). O citoplasma infranuclear e basal também apresentaram citoplasma rarefeito, com poucas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias associadas às estreitas invaginações do labirinto basal (Fig. 47F).

Células regenerativas e endócrinas exibiram morfologia semelhante ao grupo controle.

Para os tratamentos na concentração de 1 e 2% de óleo de nim verificamos nas células colunares crescente irregularidade na disposição das microvilosidades (Fig. 48A). No citoplasma apical mitocôndrias edemaciadas, com matriz elétron-lucente e cristas mitocôndriais irregulares ocorreram juntamente com mitocôndrias normais, as quais apresentam matriz mitocondrial elétron-densa (Fig. 48B).

No citoplasma supranuclear e perinuclear ocorreu predomínio de cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas, juntamente com mitocôndrias edemaciadas, e vacúolos elétron-lucentes, possivelmente originários de mitocôndrias edemaciadas as quais perderam suas cristas mitocondriais. Raros esferitos também são observados (Figs. 48C e D).

Na base celular o labirinto mostrou-se associado a cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas e também a mitocôndrias normais e as vezes mitocôndrias alteradas (Fig. 48E). Não foi observado de alteração nas células endócrinas, mas em células regenerativas notamos a ocorrência de mitocôndrias edemaciadas (Fig. 48F).

Região média

Células colunares do grupo controle apresentaram microvilosidades longas e regulares, seguidas por citoplasma apical que apresentou uma faixa cortical rica em mitocôndrias e pequenos vacúolos digestivos heterogêneos. Logo abaixo desta faixa ocorre o predomínio de esferitos e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 49A).

Verificamos o predomínio de esferitos com material floculado ocorrendo desde o citoplasma apical até o citoplasma infranuclear. Raras gotas lipídicas ocorreram nas células colunares. Entre os esferitos, ocorreu o predomínio de longas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e raros endossimbiontes (Figs. 49B e C).

O labirinto basal apresentou estreitas invaginações de membrana, estando a estas associadas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 49D). Em ninhos de células regenerativas visualizamos maiores quantidades de células (Fig. 49E). Células

endócrinas, semelhante às regenerativas apresentaram poucas organelas, havendo predomínio de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, além de grânulos elétrondensos distribuídos por todo citoplasma (Fig. 49F).

Nos tratamentos com óleo de nim as células colunares sofreram severas alterações ultraestruturais já na concentração de 0,5%. Microvilosidades ocorreram de modo esparsas e irregular, ocorrendo liberação de microvesículas apicais (Fig. 50A e B). Para as outras concentrações microvilosidades ocorreram dilatadas, com vacúolos na extremidade e liberação de microvesículas. Lises também foram constatadas (Figs. 50C).

No citoplasma apical houve predomínio de mitocôndrias edemaciadas e grânulos densos (Fig. 50A). Depósitos de glicogênio ocorreram no ápice de células colunares no tratamento a 2% (Fig. 50C). Esferitos com pouco material floculado e vacúolos elétrondescentes também foram freqüentes com o aumento da concentração do óleo de nim, assim como o aparecimento de espaços intercelulares (Figs. 50D – F).

No citoplasma supranuclear podemos constatar cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas (Fig. 51A). No citoplasma basal, o labirinto basal não mostrou alterações, apresentando estreitas invaginações associadas com mitocôndrias edemaciadas e as cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas (Fig. 51B).

Células regenerativas continham cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas, assim como mitocôndrias edemaciadas, com cristas mitocondriais alteradas (Figs. 51C e D). Apenas nas células endócrinas do tipo 1 constatamos alterações nas mitocôndrias, semelhante a fibras musculares que envolvem externamente a camada epitelial (Fig. 51E e F).

Região posterior

Células colunares do grupo controle apresentaram longas microvilosidades, seguidas por citoplasma apical rico em vesículas de secreção; mitocôndrias com matriz elétrondensa; grânulos densos e poucas cisternas de endoplasmático rugoso (Figs. 52A e B).

Esferitos com material floculado ou com única camada de material floculado ocorreram em grande quantidade no citoplasma da região média até o citoplasma infranuclear. Entre os esferitos, observamos longas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figs. 52C e D).

Semelhante a região anterior e média do intestino, o labirinto basal apresentou estreitas invaginação, estando a estas associadas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Fig. 52E). Células endócrinas, semelhante as outras fases de *C. claveri* avaliadas apresentaram poucas organelas, havendo predomínio grânulos elétron-densos distribuídos principalmente na base da célula, além de cisternas do retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Fig. 52F).

Semelhante a região média, nos tratamentos com óleo de nim verificamos nas células colunares a presença de microvilosidades alargadas contendo vacúolos no interior, ocasionando a liberação de microvesículas; microvilosidades com espessura irregular ao longo do seu comprimento e também a ocorrência de lises (Figs. 53A – D). Células com ápice dilatado e liberação de protusões citoplasmática foram mais freqüentes nos tratamentos com óleo de nim (Fig. 53E).

No citoplasma apical ocorreu o predomínio de mitocôndrias edemaciadas, com cristas mitocondriais alteradas, semelhante as observadas na região média e perinuclear, que também apresentavam cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas (Figs. 53B, C, F, 54A). Estas alterações nas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso também foram constatadas na base das células colunares (Fig. 54B).

O desprendimento de células colunares da membrana basal, assim como a formação de espaços intercelulares foi observada nos tratamentos com o óleo de nim (Figs. 54C, D e F). Células regenerativas apresentaram mitocôndrias edemaciadas (Fig. 54E), enquanto que células endócrinas não mostraram alterações nesta região do intestino avaliada.

Para as três regiões do intestino médio analisadas constatamos alterações ultraestruturais nas células colunares, regenerativas e endócrinas; sendo as principais modificações observadas: microvilosidades dispostas irregularmente, ocorrendo vacúolos no interior e liberação de microvesículas; lises; cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas; mitocôndrias edemaciadas; formação de espaços intercelulares; fibras musculares com mitocôndrias intumescidas.

**DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA:
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO**

FIGURA 25**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

A – C. Ápice das células colunares: microvilosidades regulares (Mv), vesículas de secreção elétron-densas (Vs), mitocôndrias (M), vacúolos digestivos (Vd), corpos multivesiculares (Cv), esferitos (S) e gotas lipídicas (Li). Barras: A e C = 0,5 μm ; B = 1 μm .

D. Citoplasma apical das células colunares: retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), gotas lipídicas (Li) e esferitos (S). Barra = 1 μm .

E – F. Citoplasma supranuclear e perinuclear das células colunares: depósitos de glicogênio (G), gotas lipídicas (Li), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), núcleo (N), vacúolo autofágico (Va) em fusão com vacúolo contendo material floculado (*) e gota lipídica (Li). Barras = 1 μm .

G. Citoplasma supranuclear das células colunares: complexo de Golgi (Cg), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M) e gota lipídica (Li). Barra = 0,5 μm .

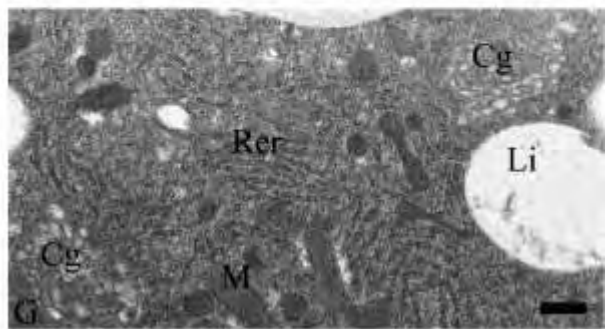
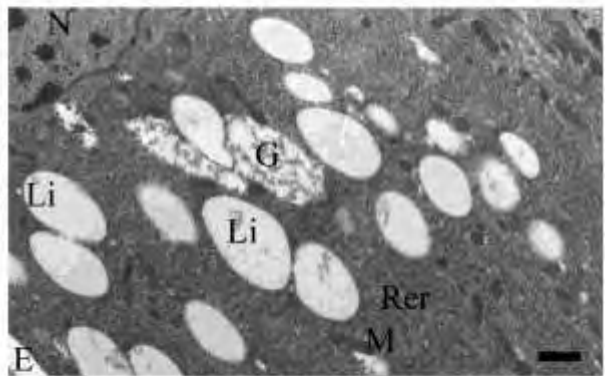
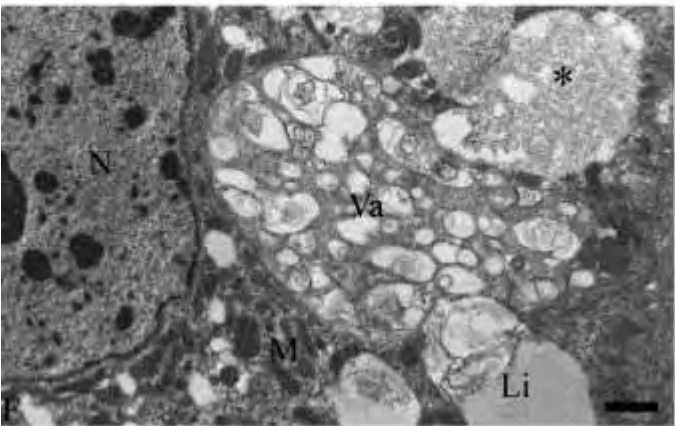
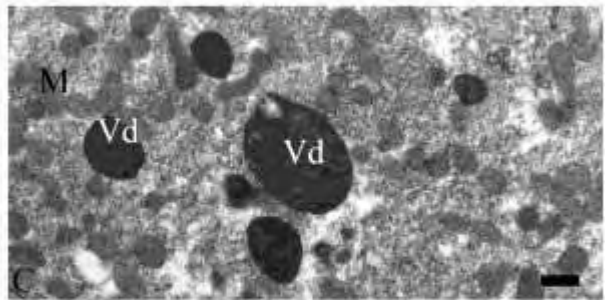
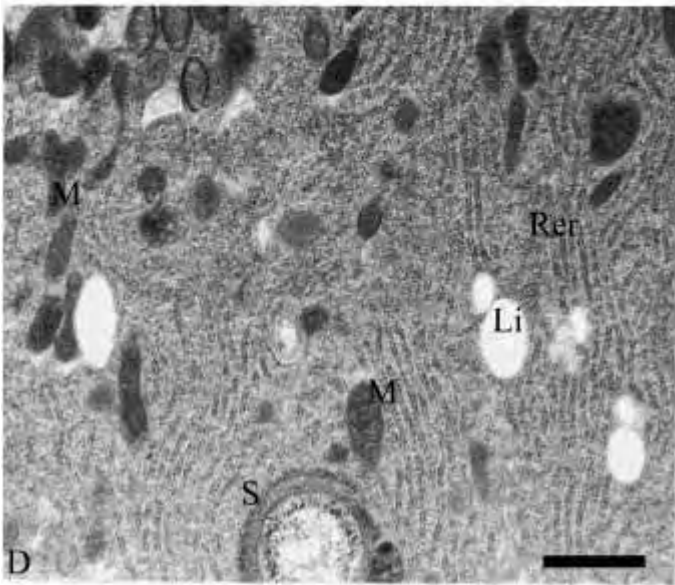
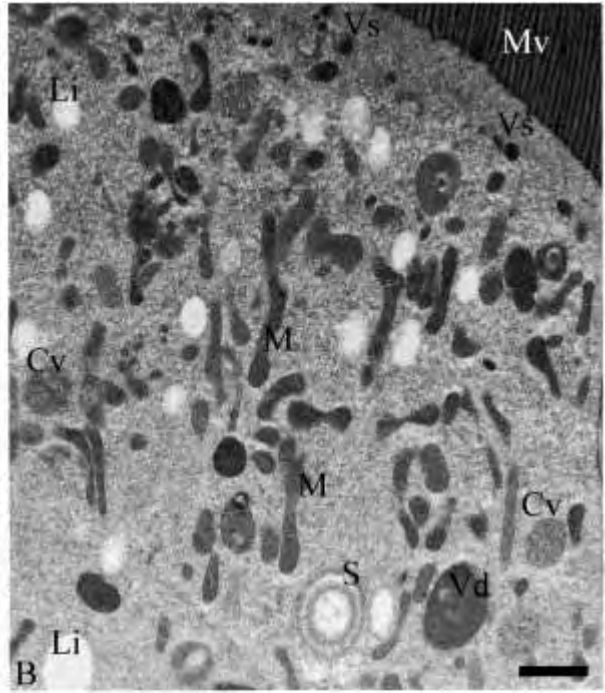
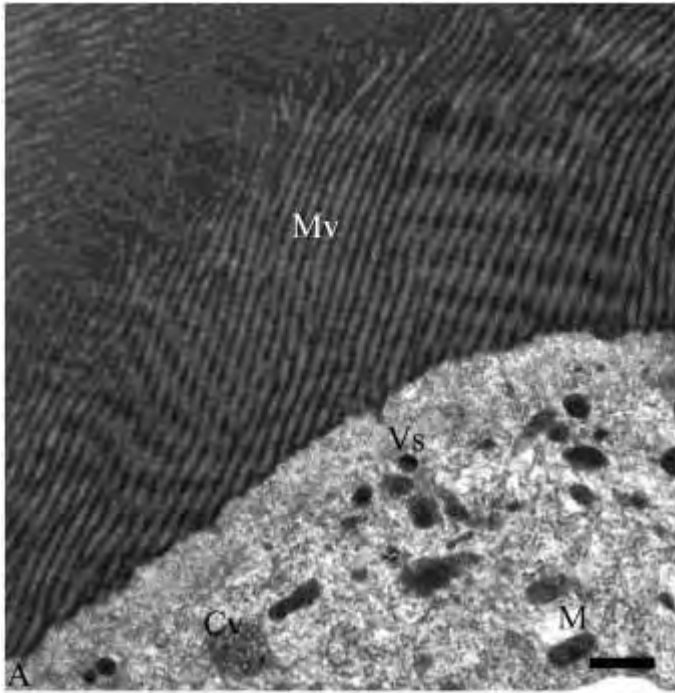


FIGURA 26**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Base das células colunares: estreitas invaginações do labirinto basal (Lb) associado a mitocôndrias (M), gotas lipídicas (Li) e pequenos depósitos de grânulos de glicogênio (G). Membrana basal (B) e fibra muscular (Fm). Barra = 1µm.
- B. Citoplasma infranuclear das células colunares com labirinto basal (Lb) atingindo a região média das células colunares. Núcleo (N), gotas lipídicas de diferentes tamanhos (Li), mitocôndrias (M), membrana basal (B), feixe de fibra muscular estriada circular (Mc) e longitudinal (Ml). Barra = 2 µm.
- C. Base da célula colunar: grânulos elétron-densos (setas) no espaço extracelular do labirinto basal (Lb); membrana basal (B) constituída por matriz granulada elétron-densa; fibra muscular (Fm). Técnica Ósmio-Imidazol. Barra = 0,25 µm.
- D. Detalhe de bactérias endossimbiontes (Bac), possivelmente gram-negativas por apresentarem parede constituída por membrana externa (seta) e membrana interna (►). Gota lipídica (Li). Técnica Ósmio-Imidazol. Barra = 0,1 µm.
- E. Célula colunar: acúmulo de gotas lipídicas (Li) no citoplasma basal e infranuclear alteram o formato nuclear, conferindo-lhe aspecto de meia lua. Núcleo (N). Volumosas gotas lipídicas apresentam área central não corada pela técnica Ósmio-Imidazol (*). Barra = 2 µm.

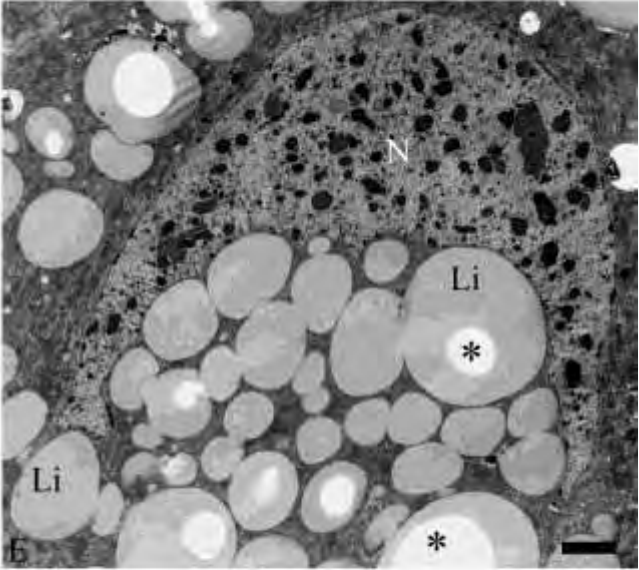
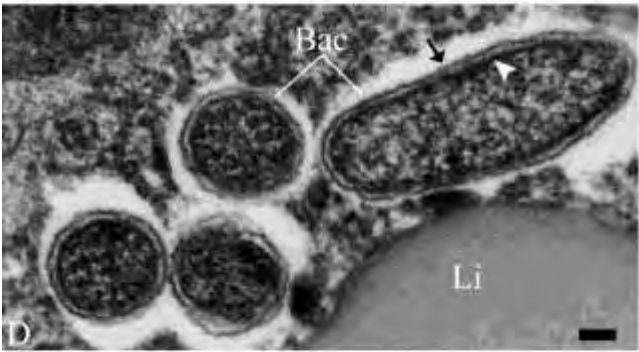
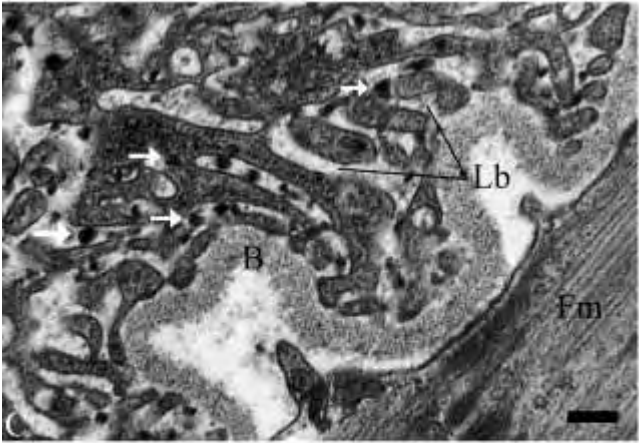
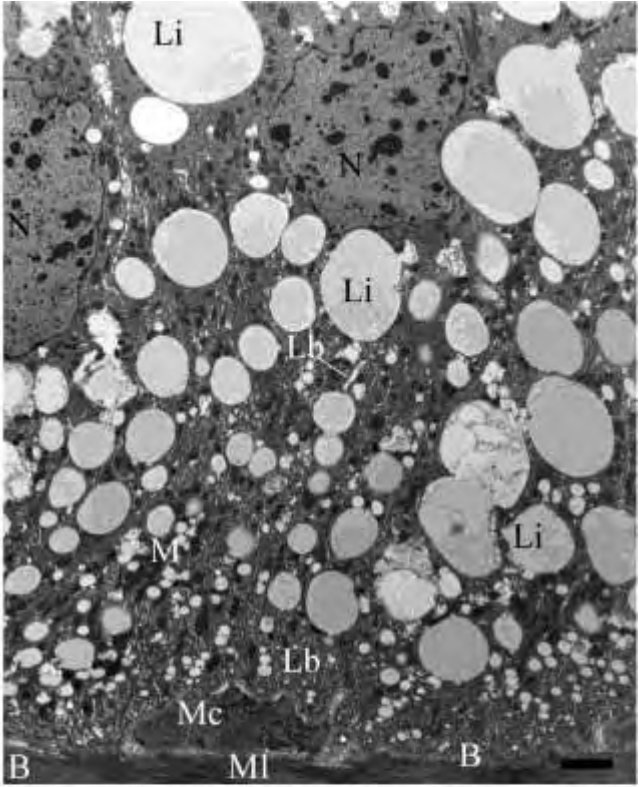
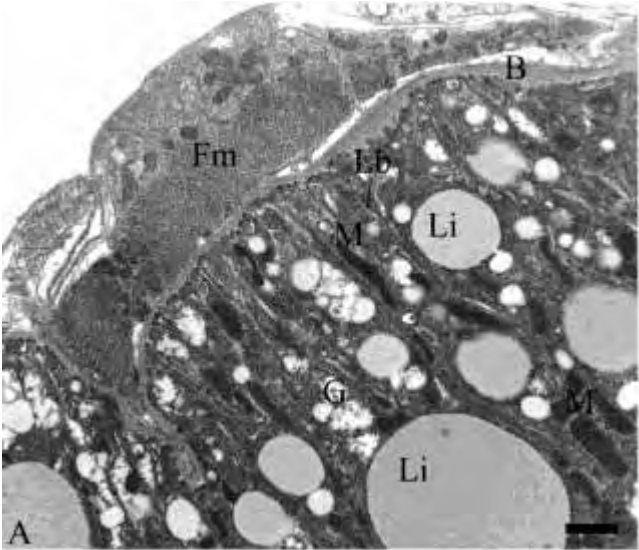


FIGURA 27**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Células regenerativas na base do epitélio intestinal. Mitocôndrias (M), depósito de glicogênio (G), gotas lipídicas (Li), bactérias endossimbiontes (Bac), núcleo (N), lâmina basal (B), fibra muscular (Fm) e célula colunar (Co). Barra = 1µm.
- B – C. Célula regenerativa: núcleo (N), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M), discreto retículo endoplasmático rugoso (Rer), complexo de Golgi (Cg), corpo multivesicular (Cv) e célula colunar (Co). Barras = 0,5 µm.
- D. Célula endócrina (tipo 1) localizada preferencialmente na base epitelial, com formato cônico alongado, citoplasma pouco denso com grânulos densos (Gs). Núcleo (N), vacúolo digestivo (Vd), célula colunar (Co), gotas lipídicas (Li), labirinto basal (Lb), feixe muscular circular (Mc) e membrana basal (B). Barra = 1 µm.
- E. Célula endócrina tipo 1: grânulos sólidos elétron-densos (Gs), núcleo (N) com grande quantidade de grumos heterocromáticos, vacúolo com conteúdo elétron-lucente (V). Célula colunar (Co), membrana basal (B) e fibra muscular (Fm). Barra = 1 µm.
- F. Região basal da célula endócrina tipo 1: acúmulo de grânulos sólidos elétron-densos (Gs), vacúolo com conteúdo elétron-lucente (V), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), núcleo (N), célula colunar (Co), labirinto basal pouco desenvolvido (Lb), membrana basal (B) e fibra muscular (Fm). Barra = 0,5 µm.

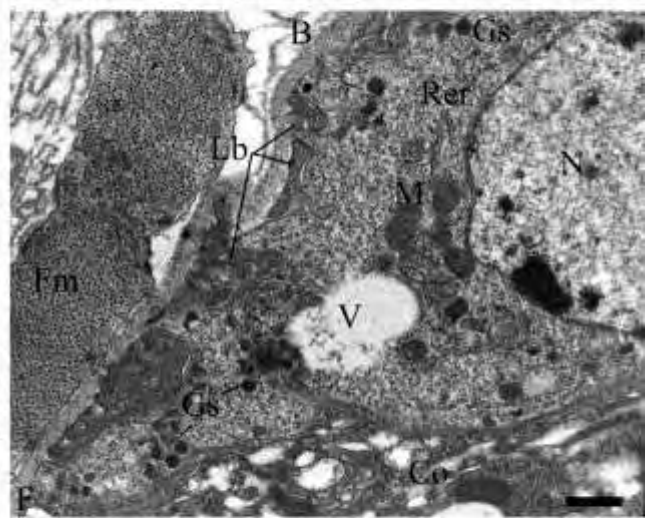
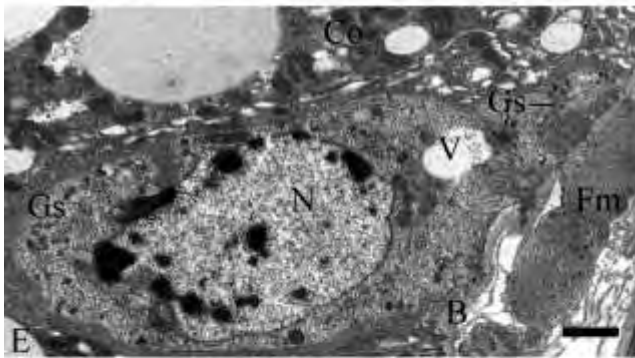
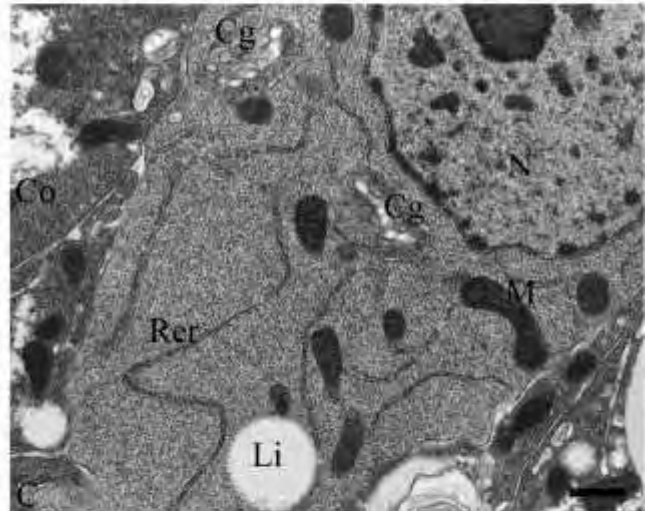
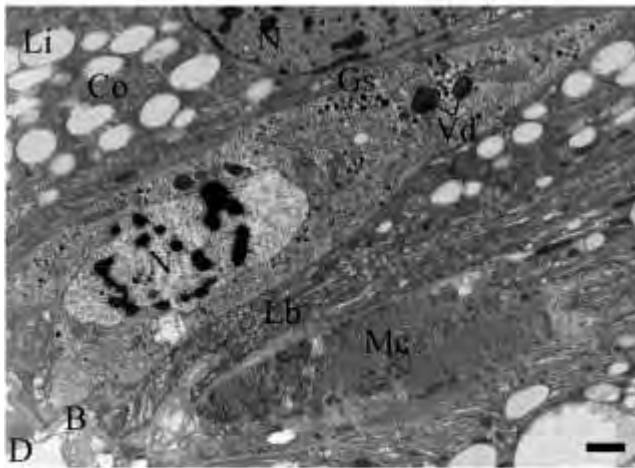
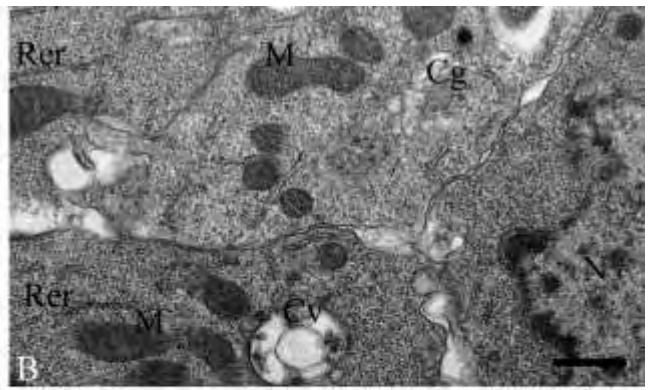
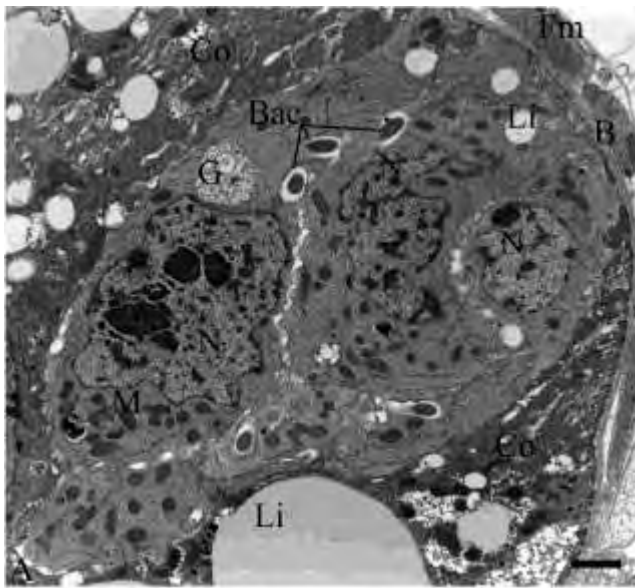


FIGURA 28**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Larva controle: célula endócrina (tipo 2), com formato cônico alongado, citoplasma pouco denso com grânulos aureolado (Ga). Núcleo (N), célula colunar (Co), gotas lipídicas (Li) e fibra muscular (Fm). Barra = 2 μm .
- B. Larva controle: região basal da célula endócrina tipo 2: acúmulo de grânulos aureolados (Ga), escassos grânulos sólidos elétron-densos (Gs), labirinto basal (Lb), membrana basal (B) e glicogênio. Barra = 0,5 μm .
- C. Larva controle: ápice de célula endócrina (tipo 1): grânulos sólidos elétron-densos (Gs), complexo de Golgi (Cg), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer) e núcleo (N). Barra = 0,5 μm .
- D. Larva tratada com 0,5% de óleo de nim: protusão citoplasmática da célula colunar com microvilosidades esparsas, grandes gotas lipídicas (Li), vacúolos com conteúdo eletron-lucente (V) e mitocôndrias (M) com morfologia variável. Barra= 3 μm .
- E - H. Larva tratada com 0,5% de óleo de nim: ápice da célula colunar com microvilosidades (Mv) escassas e curtas, retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), vacúolos digestivos (Vd), vacúolos elétron-lucentes contendo material membranoso (V), gotas lipídicas (Li), complexo de Golgi (Cg) e corpos multivesiculares (Cv). Barras: E = 0,25 μm ; F e H = 1 μm ; G = 0,5 μm .

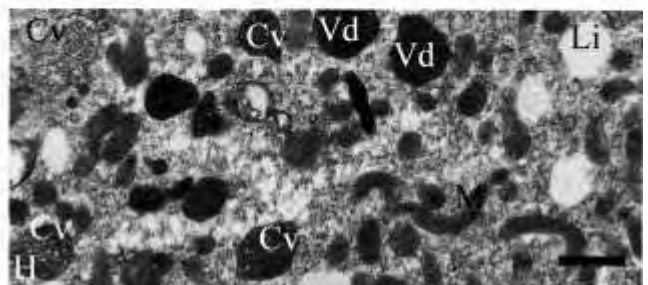
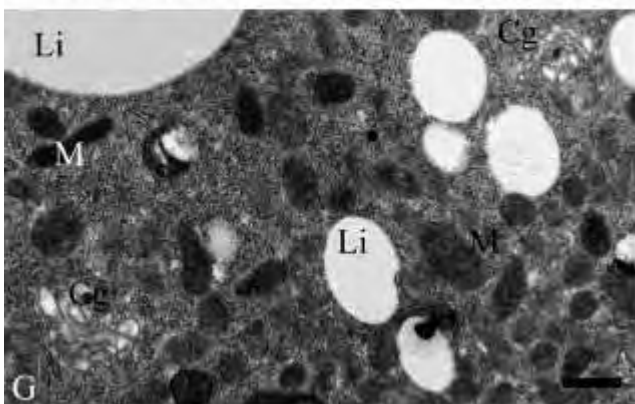
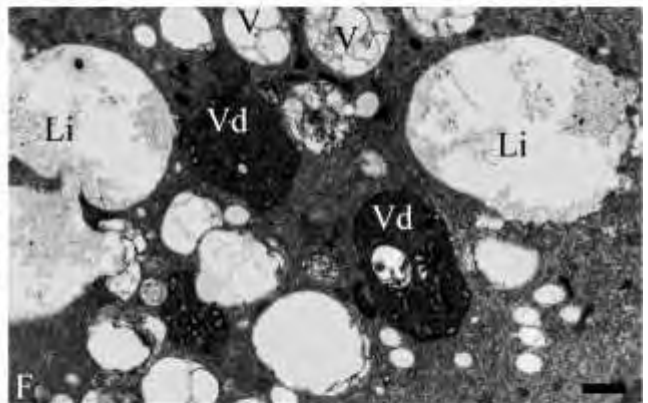
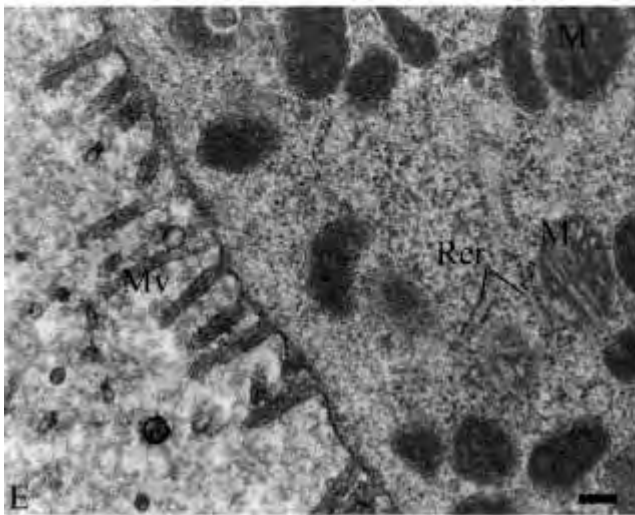
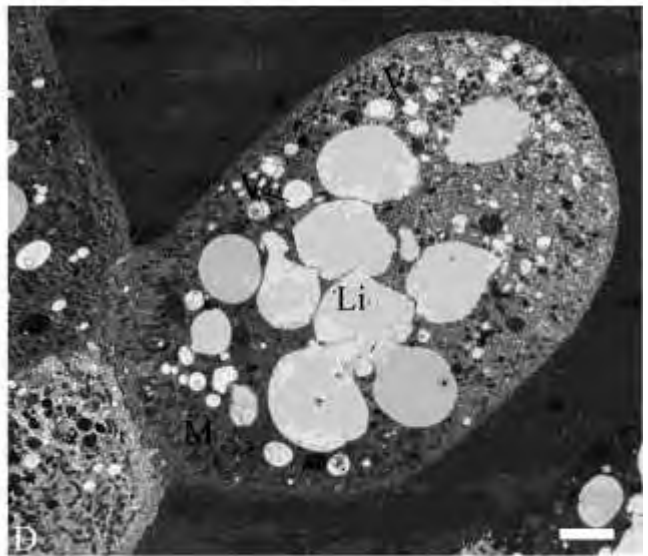
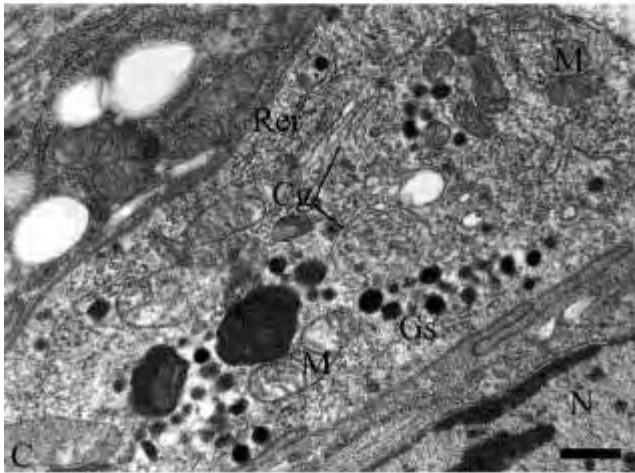
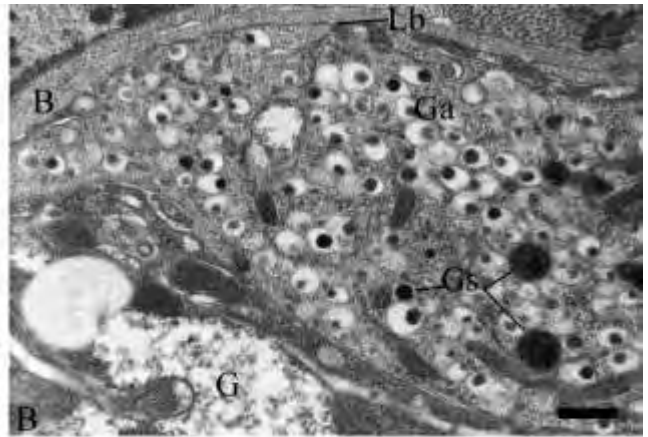
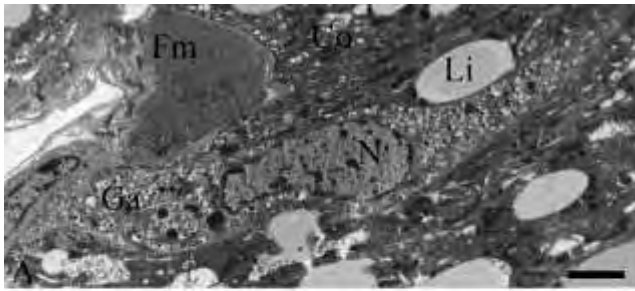


FIGURA 29

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 0,5% DE ÓLEO DE NIM.

- A. Citoplasma supranuclear da célula colunar: retículo endoplasmático rugoso (Rer) e retículo endoplasmático liso (Rel) desenvolvidos; mitocôndrias (M). Barra = 0,1 μ m.
- B. Citoplasma perinuclear da célula colunar: retículo endoplasmático rugoso (Rer) e retículo endoplasmático liso (Rel) desenvolvidos; núcleo (N); gota lipídica (Li). Barra = 0,25 μ m.
- C. Base das células colunares: labirinto basal (Lb) mais dilatado, associado a gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M) e depósitos de glicogênio (G); lâmina basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 1 μ m.
- D – E. Células regenerativas: núcleo (N), discreto retículo endoplasmático rugoso (Rer), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M), bactérias endossimbiontes (Bac), espaço intercelular ($\rightarrow$), célula colunar (Co), membrana basal (B), fibra muscular (Fm). Barras = 1 μ m.
- F. Base da célula endócrina do tipo 1: retículo endoplasmático rugoso (Rer) com cisternas dilatadas, mitocôndrias (M) e grânulos sólidos elétron-densos (Gs). Barra = 0,2 μ m.

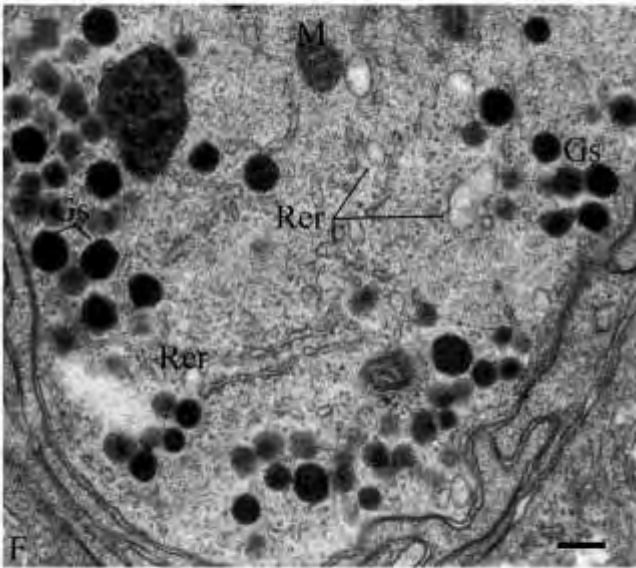
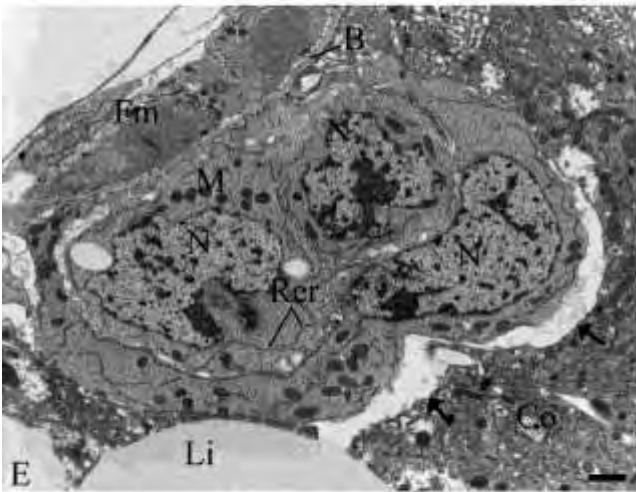
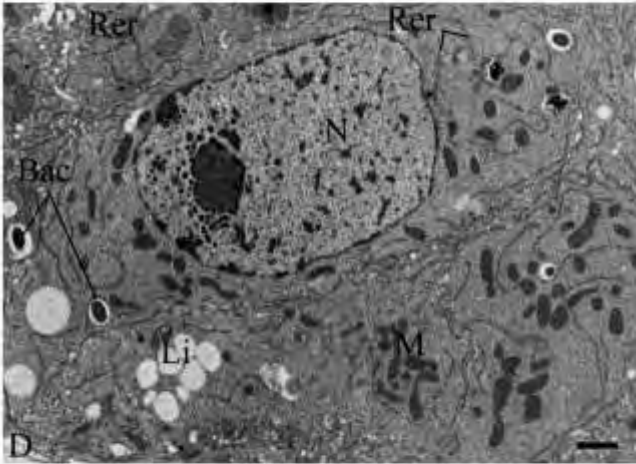
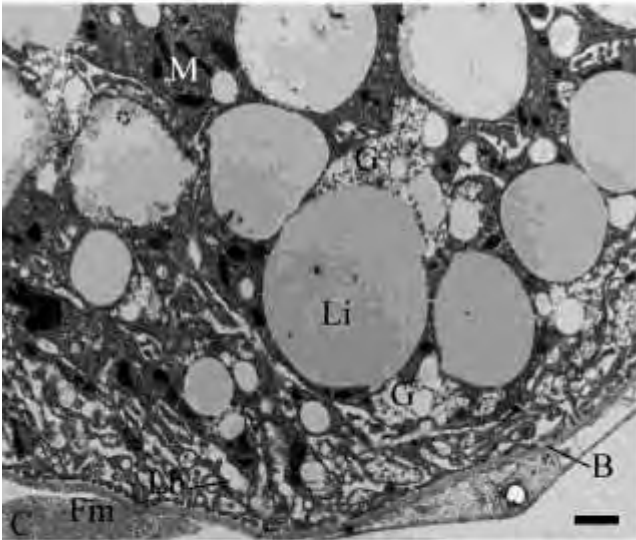
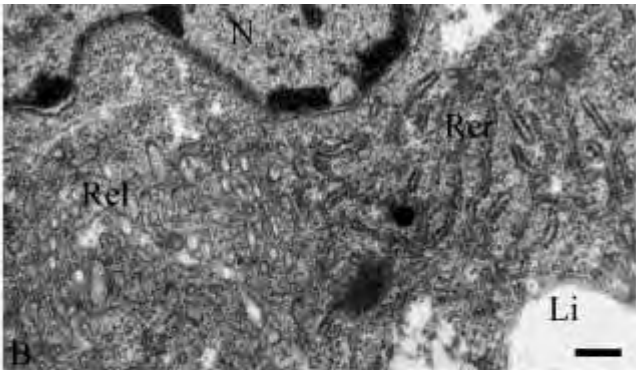
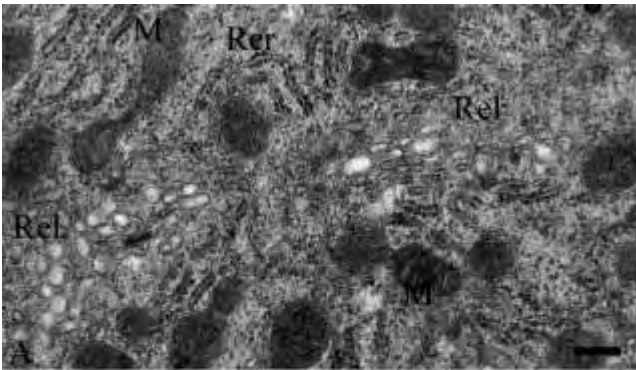


FIGURA 30

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 1% DE ÓLEO DE NIM.

- A – B. Citoplasma apical das células colunares: microvilosidades (Mv) levemente esparsas, retículo endoplasmático rugoso (Rer) em arranjo concêntrico, mitocôndrias (M) de morfologia variada, vesículas de secreção (Vs), vacúolo digestivo (Vd), gotas lipídicas (Li), corpos multivesiculares (Cv) e junção septada (Js). Barras = 0,5 μ m.
- C. Citoplasma perinuclear da célula colunar: retículo endoplasmático rugoso (Rer) concêntrico, gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M) e núcleo (N). Barra = 1 μ m.
- D – E. Citoplasma supranuclear das células colunares: retículo endoplasmático rugoso (Rer), complexo de Golgi (Cg), esferitos (S), vacúolos autofágicos (Va), vacúolo digestivo (Vd), gota lipídica (Li) e mitocôndrias (M). Barras = 0,5 μ m.
- F. Base da célula colunar: labirinto basal discretamente dilatado (Lb), retículo endoplasmático rugoso (Rer), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M), membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.
- G. Base da célula endócrina do tipo 1: retículo endoplasmático liso (Rel) desenvolvido, com cisternas fragmentadas, retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), núcleo (N) e grânulos sólidos elétron-densos (Gs). Barra = 0,2 μ m.

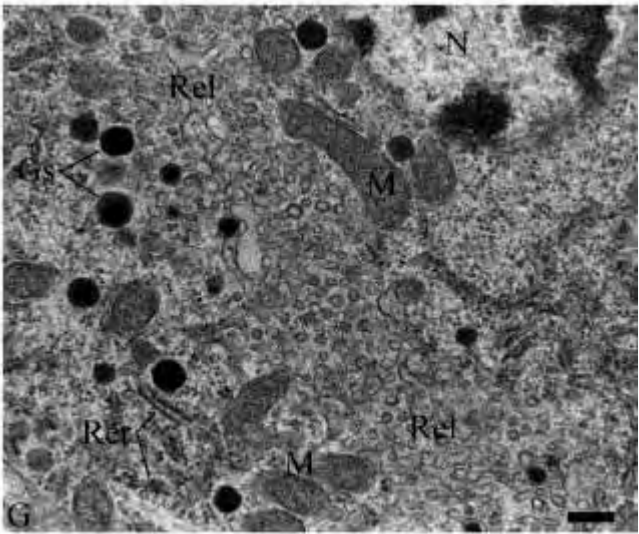
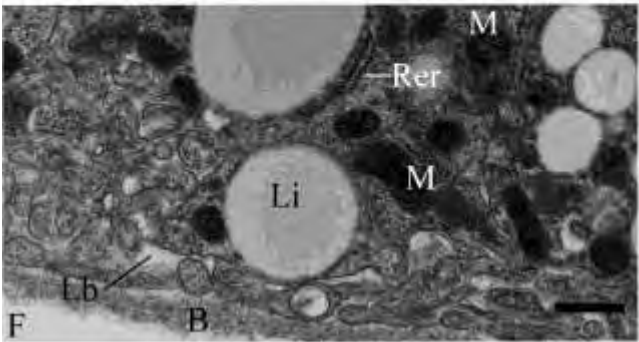
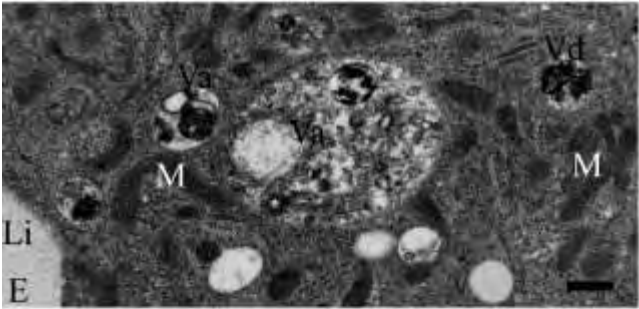
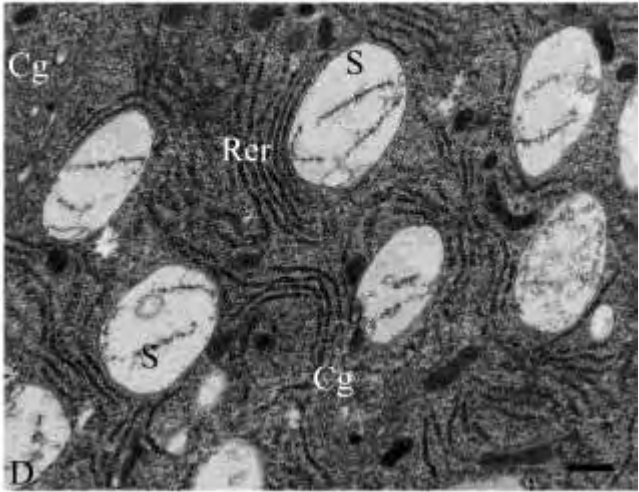
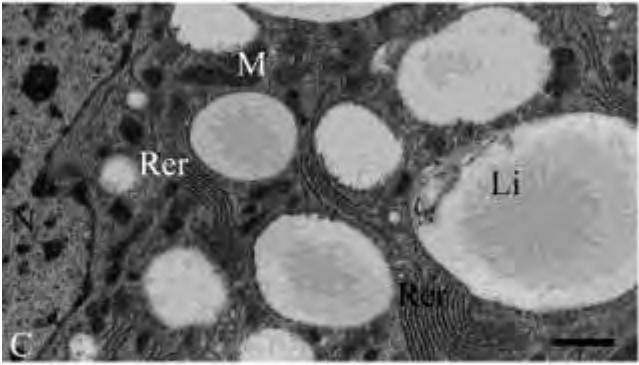
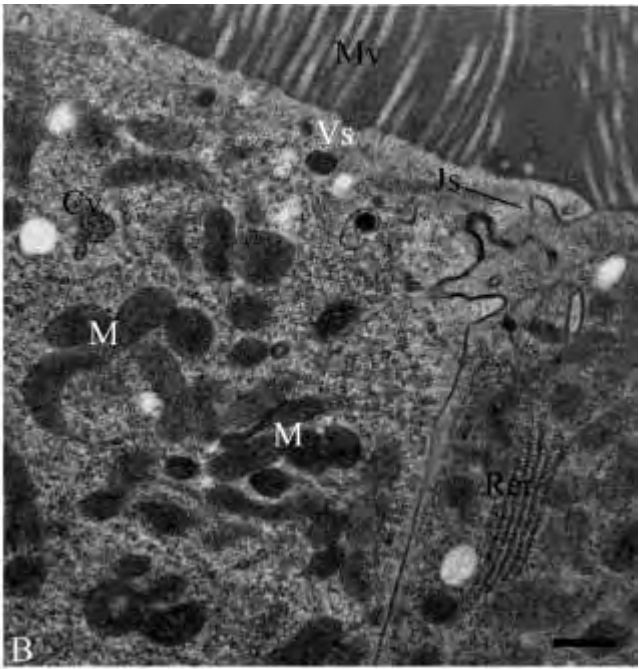
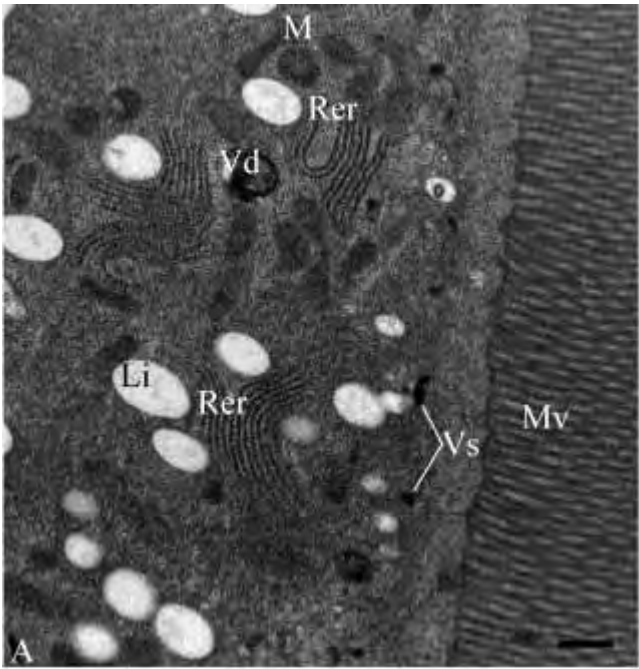


FIGURA 31

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 2% DE ÓLEO DE NIM.

- A – C. Ápice da célula colunar: microvilosidades (Mv) distribuídas irregularmente, poucas vesículas de secreção (Vs), cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatadas e fragmentada, grânulos de secreção elétron-densos (Gs) mitocôndrias (M) de morfologia variada, algumas formando fagóforos (→) que englobam material citosólico, vacúolo digestivo (Vd), gotas lipídicas (Li) e corpos multivesiculares (Cv). Barras = 0,5 μ m.
- D. Citoplasma supranuclear da célula colunar: retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatado e fragmentado, mitocôndrias (M) de formato anelado, algumas englobando conteúdo citosólico (→), dando a origem a autofagosomos. Barra = 0,25 μ m.
- E. Citoplasma perinuclear da célula colunares: retículo endoplasmático rugoso (Rer) fragmentado, mitocôndrias (M) menos elétron-densas e núcleo (N). Barra = 0,5 μ m.
- F. Base da célula colunar: labirinto basal dilatado (Lb), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M), depósitos de glicogênio e membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.

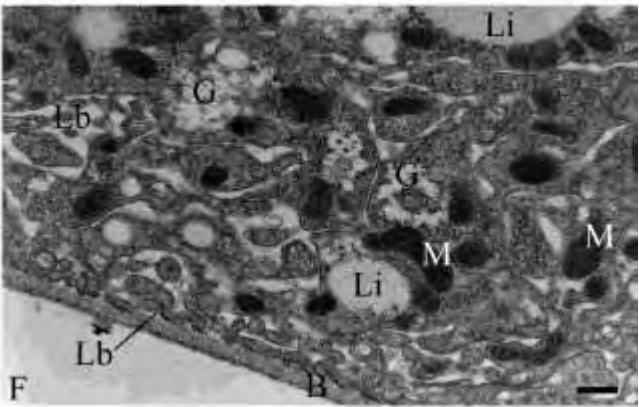
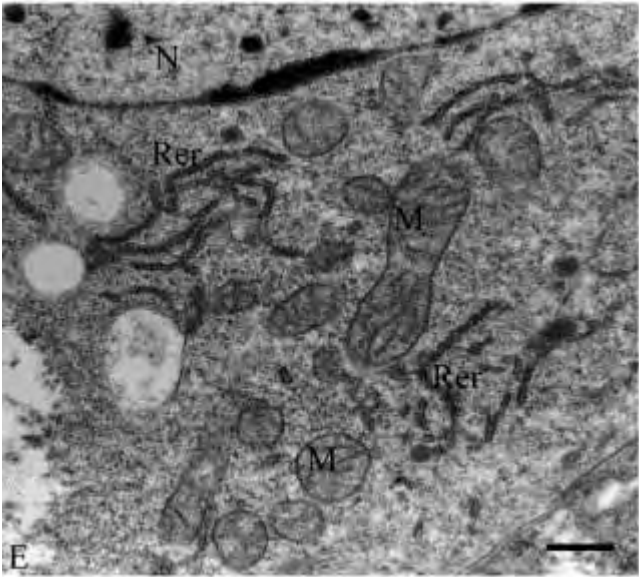
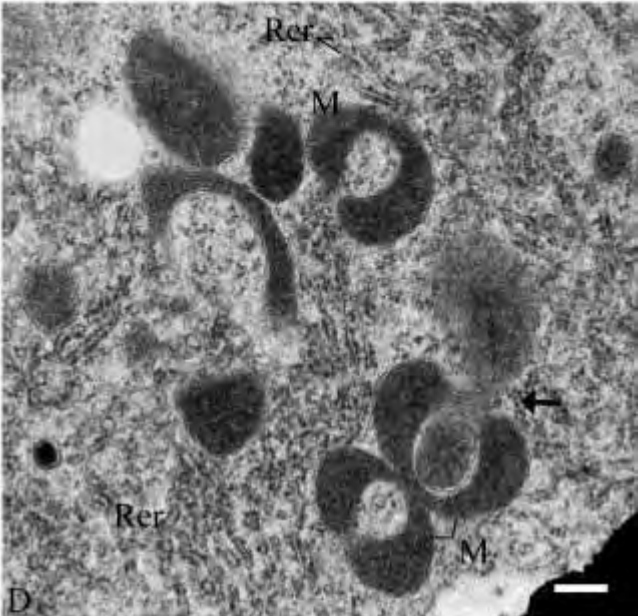
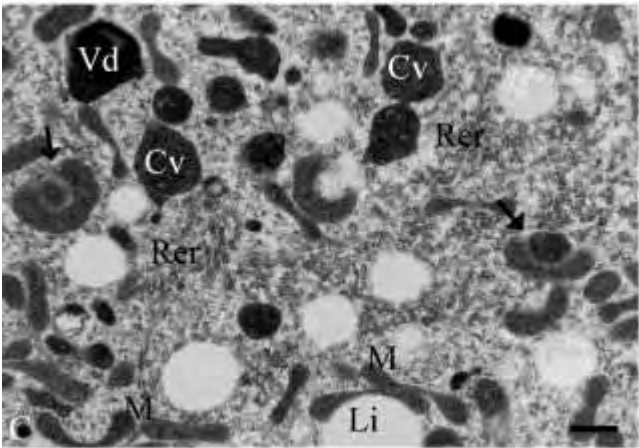
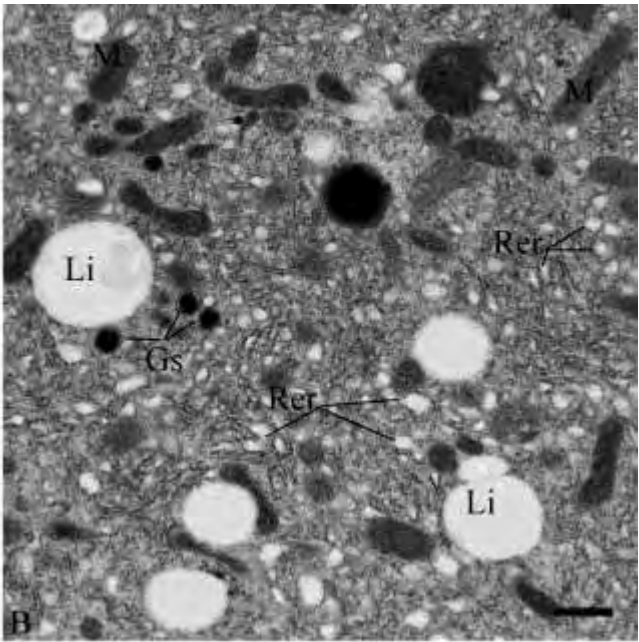
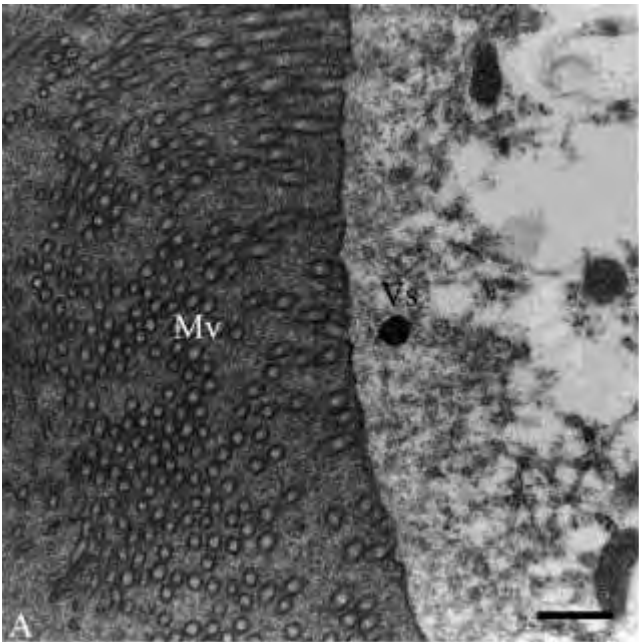


FIGURA 32**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE
LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A - B. Citoplasma apical da célula colunar: microvilosidades (Mv) com ápice afilado ($\rightarrow$), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M) de morfologia variada, vacúolos digestivos (Vd) e gotas lipídicas (Li). Barras = 0,5 μ m.
- C - D. Citoplasma supranuclear da célula colunar: vacúolos autofágicos (Va), vacúolos digestivos (Vd), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer), complexo de Golgi (Cg), esferitos (S), depósitos de glicogênio (G) e bactérias (Bac). Barras: C = 0,5 μ m; D = 1 μ m.
- E. Região média da célula colunar: acúmulo de esferitos (S), os quais podem ocorrer de forma agrupada, fusão ($\rightarrow$) entre esferitos e gotas lipídicas (Li); mitocôndrias (M) elétron-densas e núcleo (N). Técnica Ósmio-Imidazol. Barra = 2 μ m.
- F. Região média da célula colunar: acúmulo de volumosas gotas lipídicas (Li) ao redor do núcleo; coalescência de gotas lipídicas ($\rightarrow$), halo (*) central em volumosas gotas lipídicas que não foi marcado pela técnica ósmio-imidazol. Barra = 2 μ m.

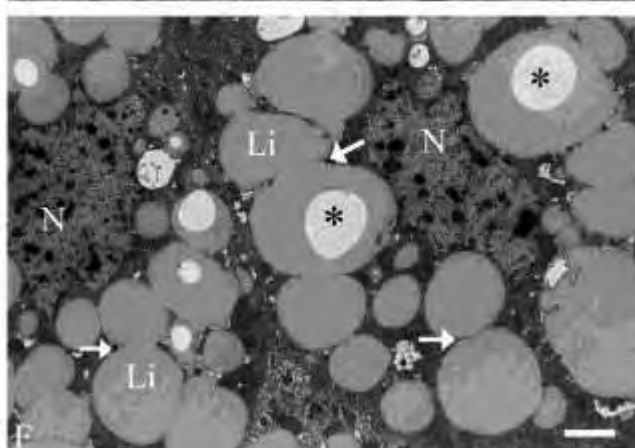
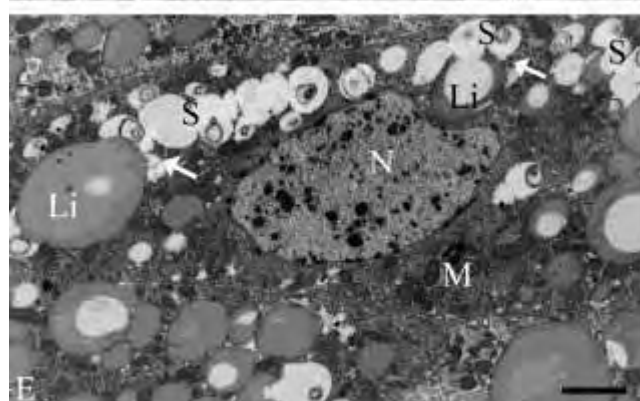
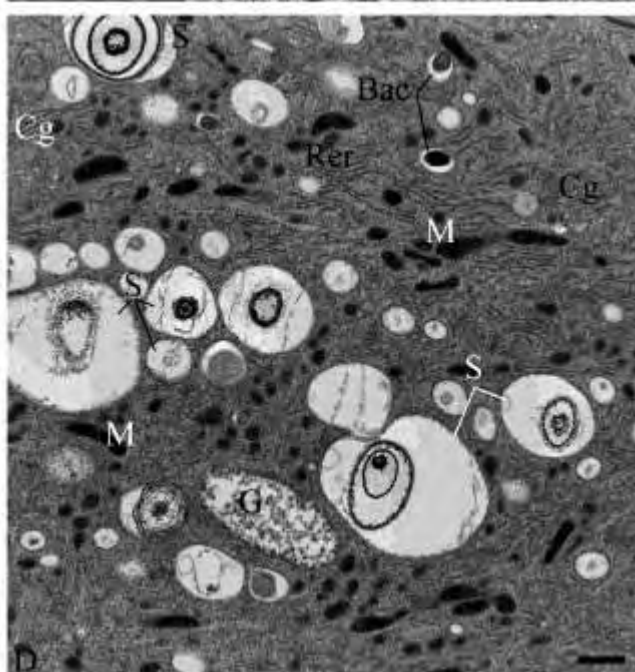
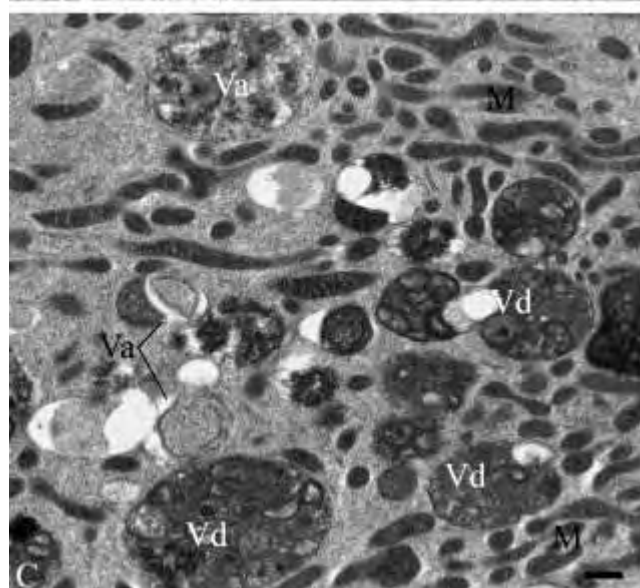
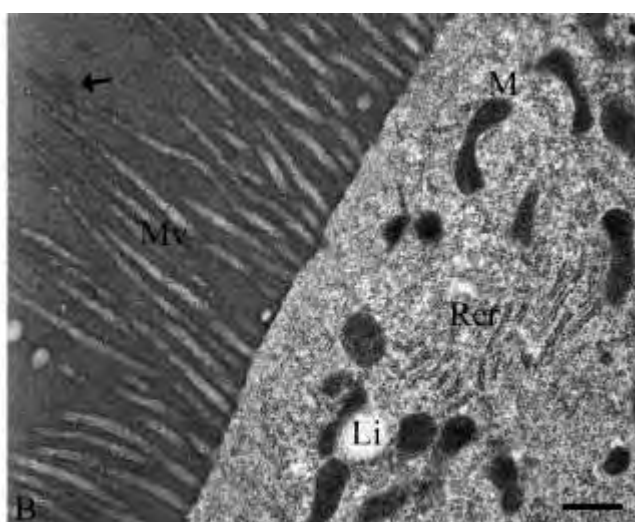
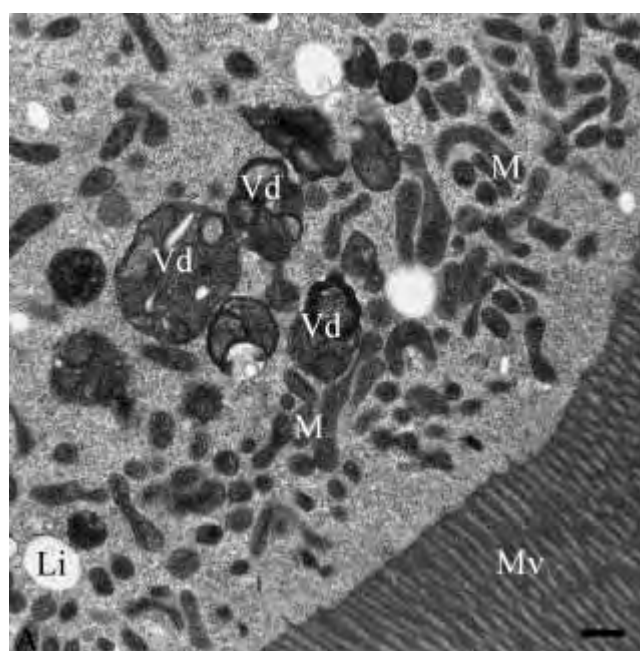


FIGURA 33**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE
LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A - B. Citoplasma basal da célula colunar: labirinto basal (Lb) associado a mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li). Membrana basal (B), feixe de músculo circular (Mc), feixe de músculo longitudinal (Ml) e fibras musculares (Fm). Barras: A = 2 μm ; B = 0,5 μm .
- C. Base da célula colunar: grânulos elétron-densos ($\rightarrow$) no espaço extracelular do labirinto basal (Lb). Gotas lipídicas (Li), membrana basal (B) e fibra muscular (Fm). Técnica Ósmio-Imidazol. Barras: C = 1 μm .
- D – E. Núcleo de célula colunar (N): presença de bactérias intranucleares (Bac); heterocromatina (*); gotas lipídicas (Li). Barras: D = 2 μm ; E = 0,2 μm .
- F. Região basal do epitélio intestinal: ninho de células regenerativas na base do epitélio, entre células colunares (Co). Núcleo (N) das células regenerativas, mitocôndrias (M), gotas lipídicas (Li) e labirinto basal (Lb) das células colunares. Técnica Ósmio-Imidazol. Barra = 2 μm .

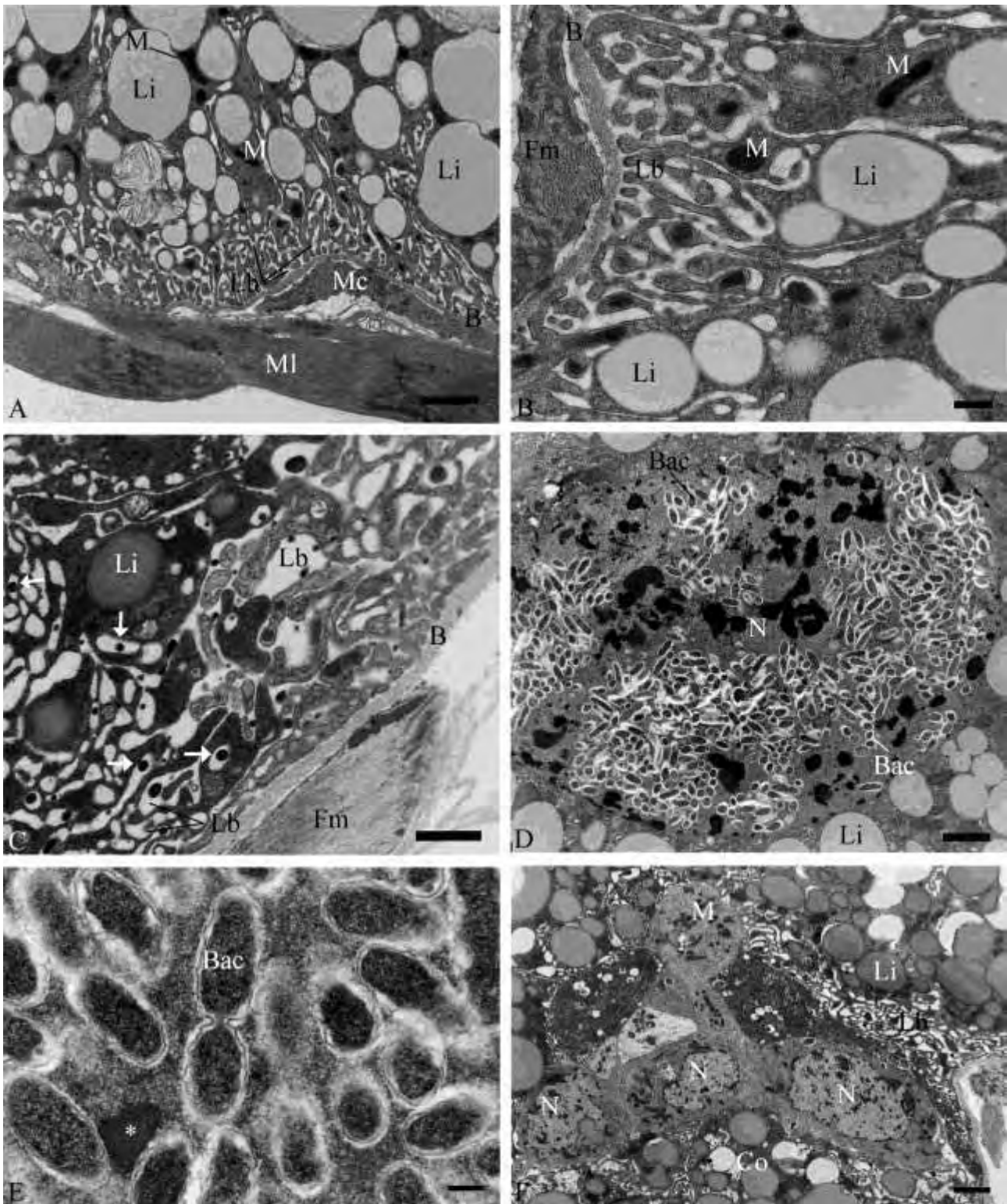


FIGURA 34

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 0,5% DE ÓLEO DE NIM.

- A - B. Citoplasma apical das células colunares: microvilosidades (Mv) pouco irregulares, acúmulo de vacúolos eletrôn-lucentes com conteúdo membranoso (V), vacúolos digestivos (Vd), corpos multivesiculares (Cv), mitocôndrias (M), gotas lipídicas (Li) retículo endoplasmático rugoso (Rer) e retículo endoplasmático liso (Rel). Barras = 0,5 μ m.
- C - D. Citoplasma supranuclear da célula colunar: esferitos (S) com poucas camadas lamelares, retículo endoplasmático rugoso (Rer), retículo endoplasmático liso (Rel), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M) e complexo de Golgi (Cg). Barras = 0,5 μ m.
- E. Citoplasma perinuclear da célula colunar: acúmulo de volumosas gotas lipídicas (Li) ao redor do núcleo (N); ocorrência de espaços intercelulares (*) entre células colunares. Barra = 2 μ m.
- F. Região basal da célula colunar: labirinto basal (Lb) dilatado e mais aprofundado em direção a região média da célula, estando associado a gotas lipídicas (Li) e mitocôndrias (M). Membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 2 μ m.

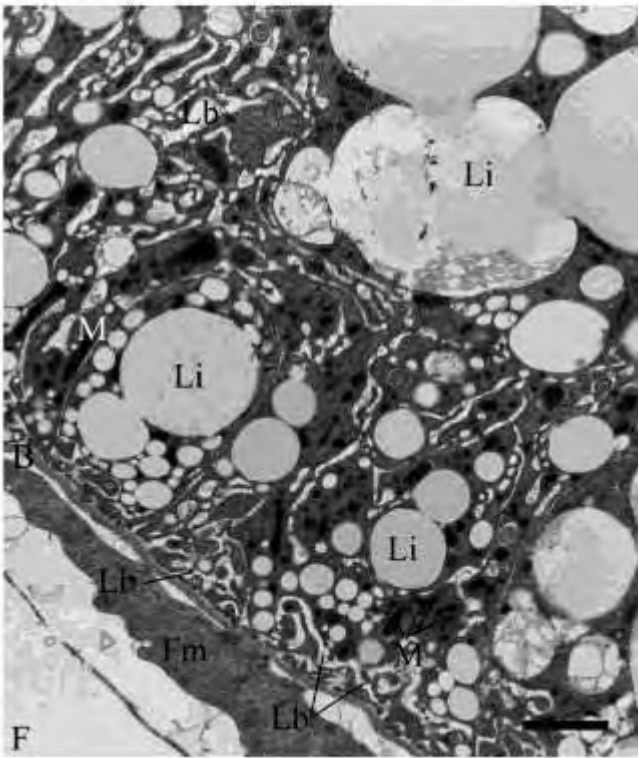
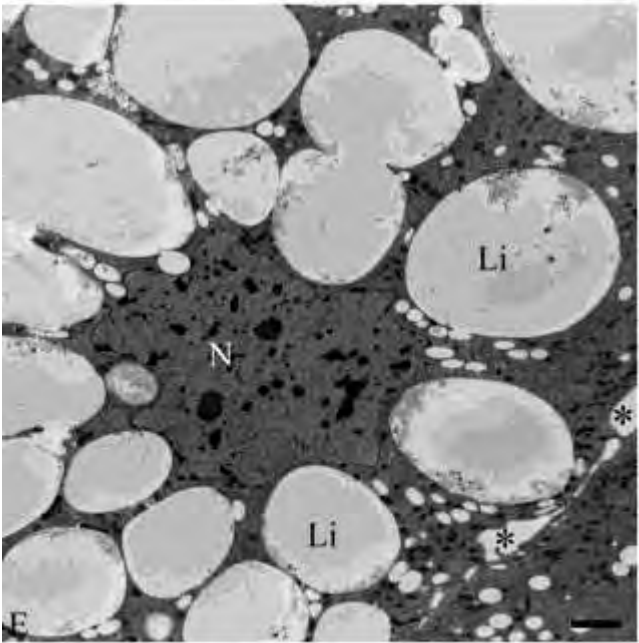
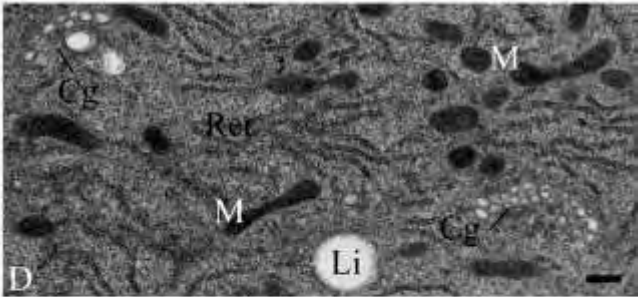
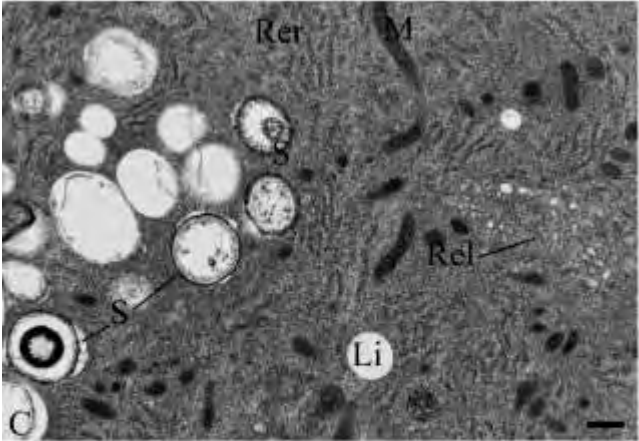
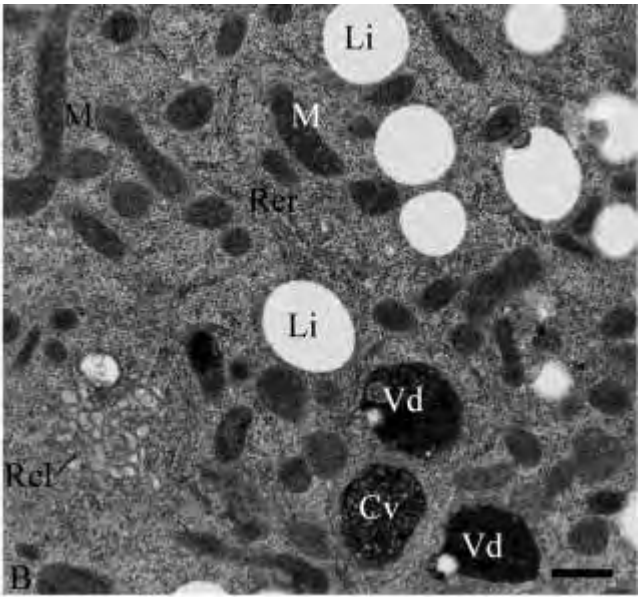
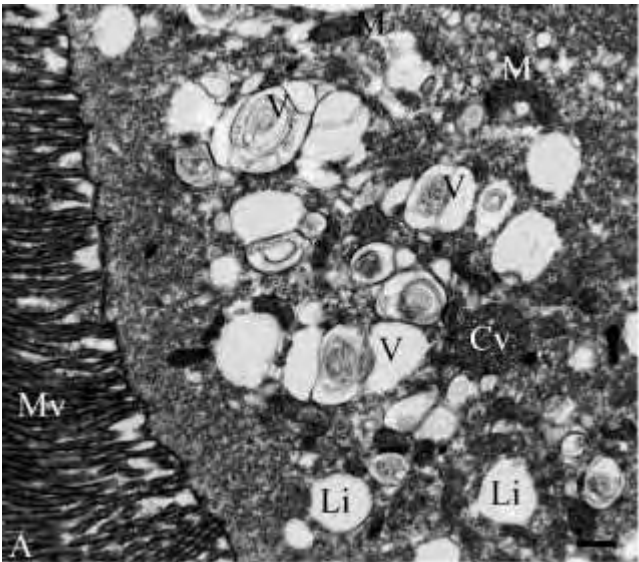


FIGURA 35

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 1% DE ÓLEO DE NIM.

- A - B. Citoplasma apical das células colunares: corpos multivesiculares heterogêneos (Cv), mitocôndrias (M), gotas lipídicas (Li) retículo endoplasmático rugoso (Rer), retículo endoplasmático liso (Rel) e complexo Golgi (Cg). Barras = 0,5 μm .
- C. Protusão citoplasmática: mitocôndrias (M), corpos multivesiculares (Cv), vacúolo digestivo (Vd), gotas lipídicas (Li) e microvilosidades (Mv). Barra = 1 μm .
- D. Citoplasma supranuclear da célula colunar: esferitos (S), figuras do tipo mielina (Fmi), gotas lipídicas (Li), mitocôndrias (M), vacúolo com conteúdo elétron-lucente (V). Barra = 0,5 μm .
- E. Citoplasma supranuclear da célula colunar: retículo endoplasmático rugoso (Rer), retículo endoplasmático liso (Rel), complexo de Golgi (Cg), mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li). Barra = 0,25 μm .
- F. Citoplasma basal da célula colunar: labirinto basal (Lb) dilatado, associado a gotas lipídicas (Li) e mitocôndrias (M). Membrana basal (B). Barra = 1 μm .

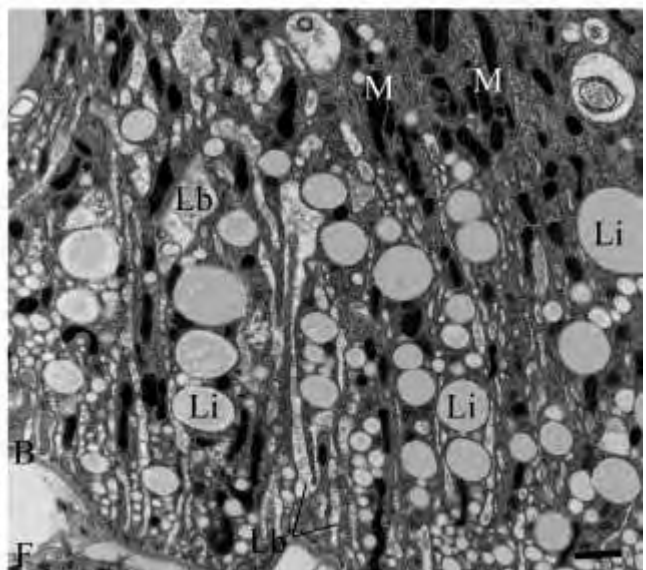
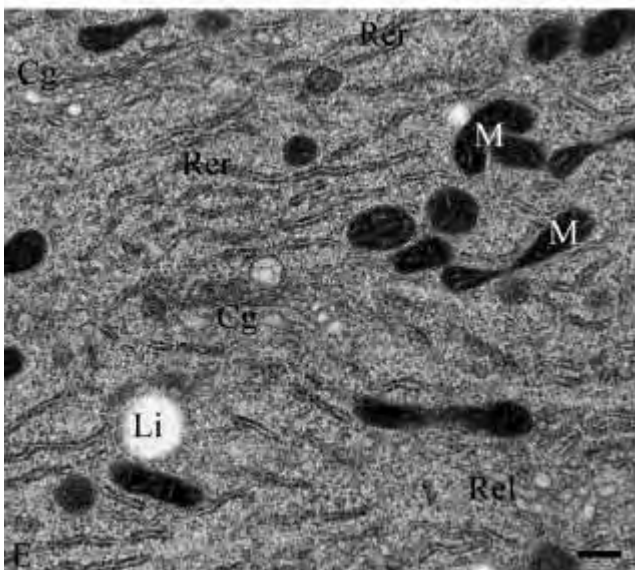
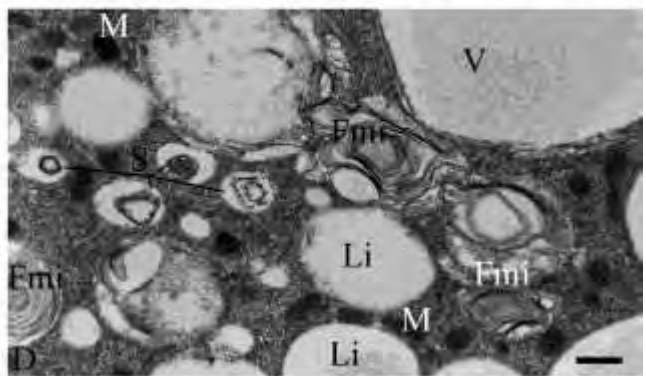
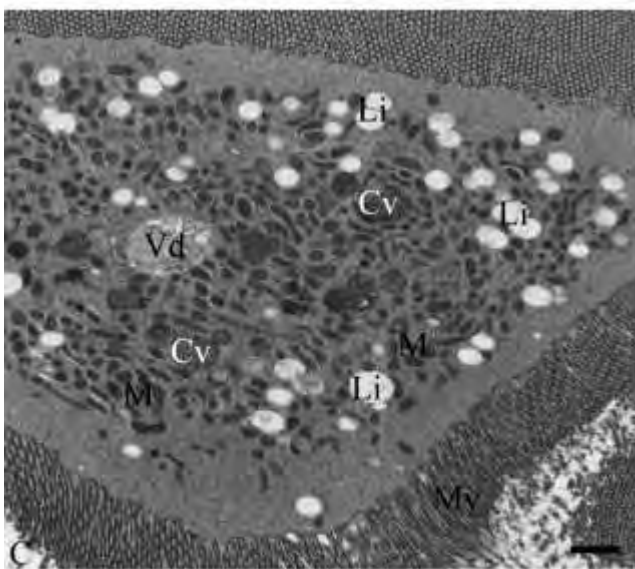
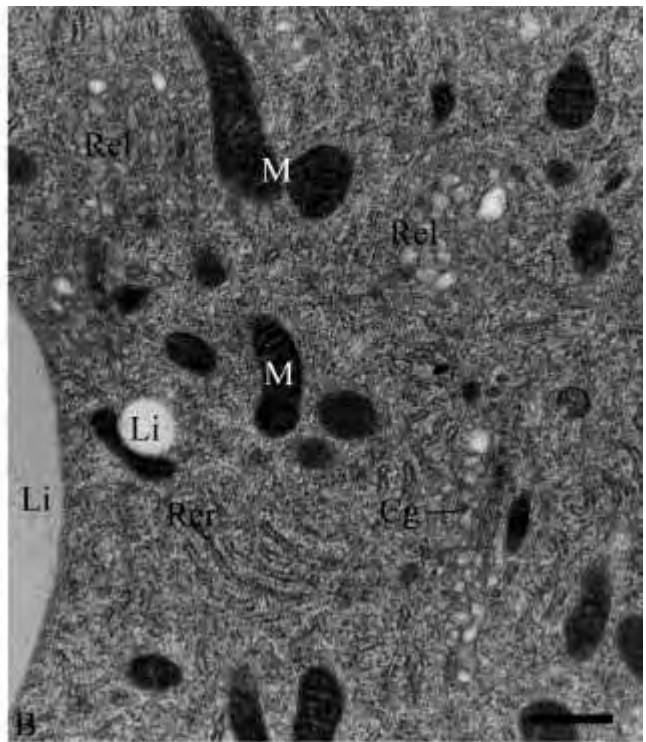
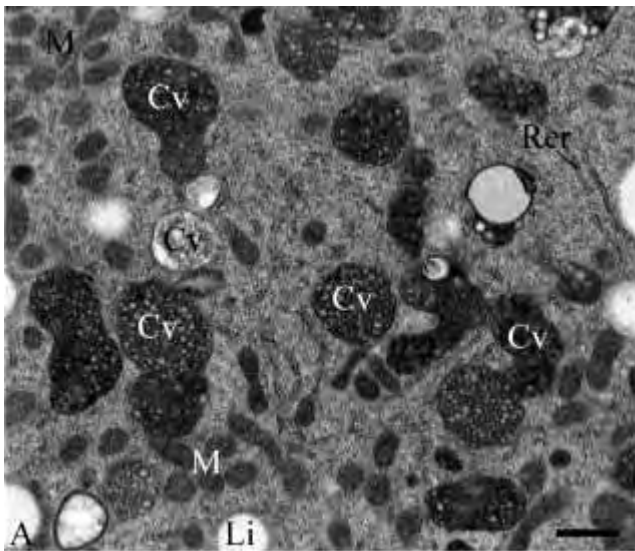


FIGURA 36

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 2% DE ÓLEO DE NIM.

- A - B. Detalhe do ápice das células colunares: microvilosidades (Mv) irregulares, com ápice afilado, liberando microvesículas ($\rightarrow$); mitocôndrias (M); gotas lipídicas (Li); retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barras: A = 0,5 μ m; B = 0,2 μ m.
- C - D. Citoplasma apical das células colunares: microvilosidades (Mv), retículo endoplasmático rugoso (Rer) com cisternas dilatadas e fragmentadas, grânulos de secreção (Gs), mitocôndrias (M), corpos multivesiculares (Cv), vacúolos digestivos (Vd) heterogêneos e gotas lipídicas (Li). Barras: C = 0,25 μ m; D = 0,5 μ m.
- E. Citoplasma supranuclear da célula colunar: complexo de Golgi (Cg) desenvolvidos, esferitos com material floculado (S) e mitocôndrias (M). Barra = 0,5 μ m.
- F. Detalhe do citoplasma supranuclear da célula colunar: mitocôndrias (M) alongadas e com matriz elétron-densa; retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 0,5 μ m.
- G. Detalhe do citoplasma basal da célula colunar com labirinto basal (Lb) dilatado, associado a gotas lipídicas (Li) e mitocôndrias (M). Fibra muscular. Barra = 1 μ m.
- H. Base do epitélio intestinal: ocorrência de espaços intercelulares (*) entre células colunares (Co) e regenerativas (Cr). Núcleo (N) das células regenerativas, glicogênio (G), mitocôndrias (M), labirinto basal (Lb) dilatado nas células colunares. Barra = 2 μ m.

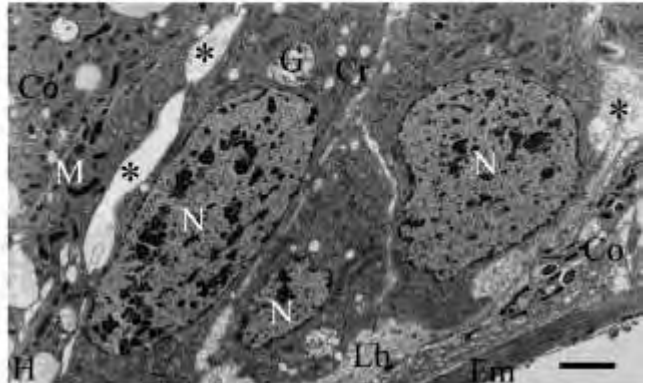
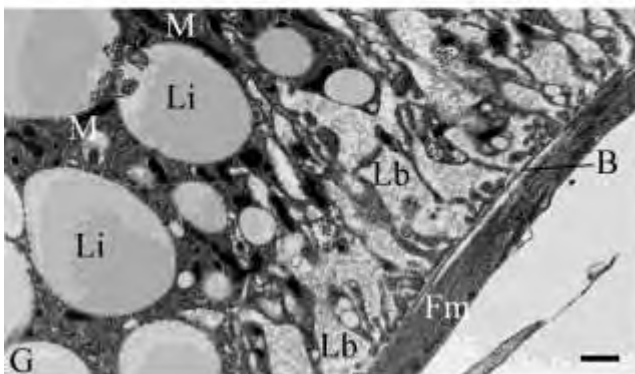
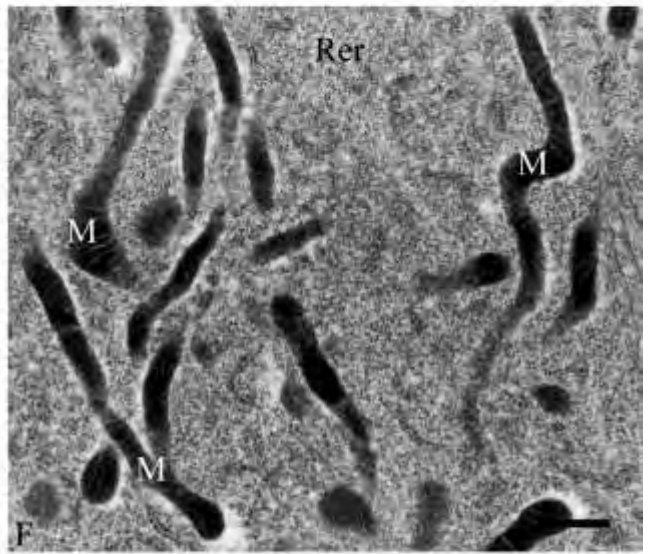
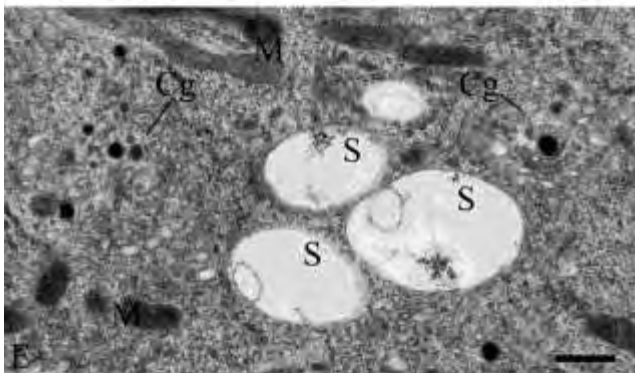
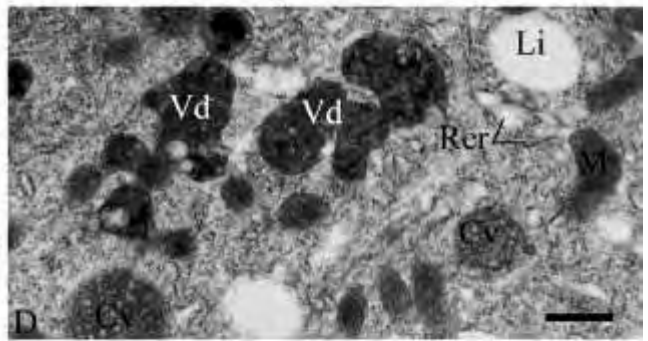
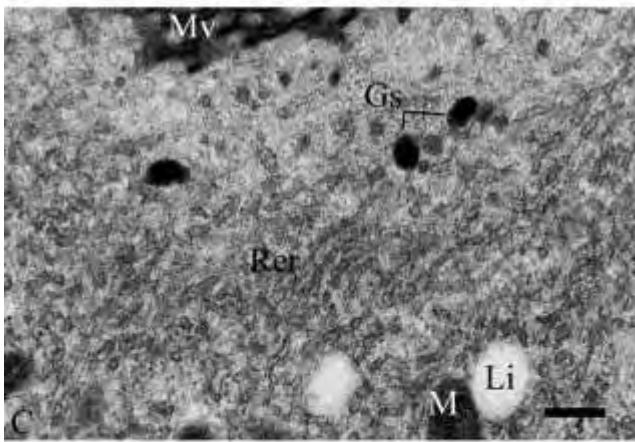
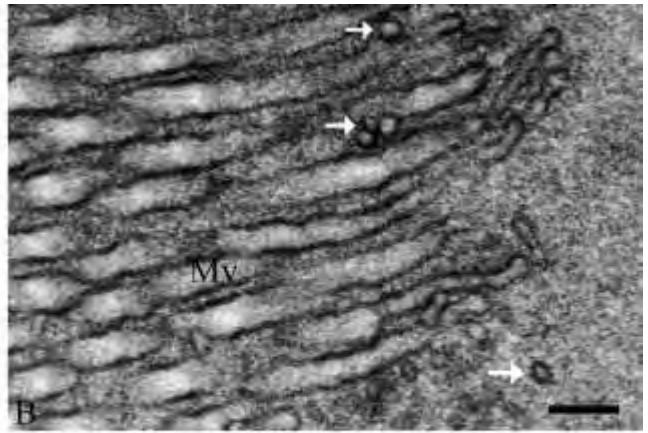
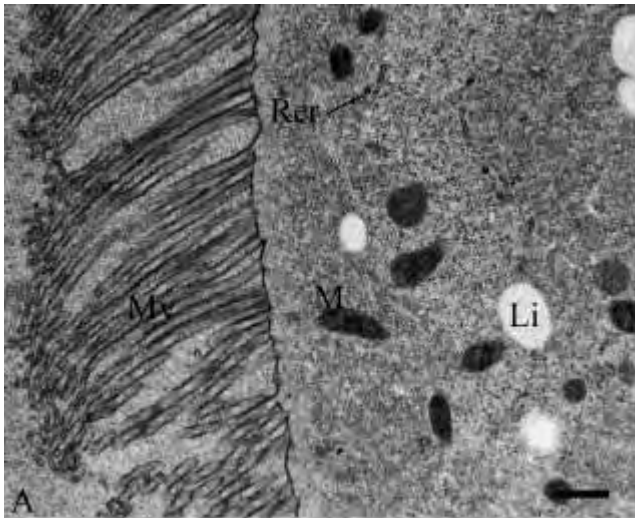


FIGURA 37**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Ápice das células colunares: microvilosidades (Mv) em contato com a membrana peritrófica (Mp), a qual apresenta-se mais eletrôn-densa (►) na superfície em contato com as microvilosidades em relação a superfície endoperitrófica (Ed); mitocôndrias (M) de variada morfologia; gotas lipídicas (Li); vacúolos digestivos (Vd). Barra = 1 µm.
- B – C. Citoplasma apical das células colunares: vacúolos digestivos (Vd), corpos multivesiculares (Cv), vacúolo autofágico (Va), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer), esferitos (S) e glicogênio (G). Barras: B = 0,5 µm; C = 2 µm.
- D. Detalhe do citoplasma supranuclear da célula colunar: glicogênio (G), retículo endoplasmático rugoso (Rer), gotas lipídicas (Li) que podem fundir-se (→) entre elas ou com esferitos (S), bactérias (Bac). Barra = 2 µm.
- E. Detalhe de fusão de membranas de esferitos (S) no citoplasma supranuclear da célula colunar. Mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li). Técnica Ósmio-Imidazol. Barra = 1 µm.
- F. Citoplasma supranuclear da célula colunar com volumosos vacúolos autofágicos (Va), alguns contendo esferitos (S). Retículo endoplasmático rugoso (Rer), glicogênio (G) e mitocôndrias (M). Barra = 1 µm.
- G – H. Citoplasma basal da célula colunar: labirinto basal (Lb) dilatado e pouco aprofundado em direção a região média da célula, estando associado a depósitos de glicogênio (G), mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li) as quais podem sofrer coalescência (→) entre si. Esferito (S); lâmina basal (B); fibra muscular (Fm). Barras = 1 µm.

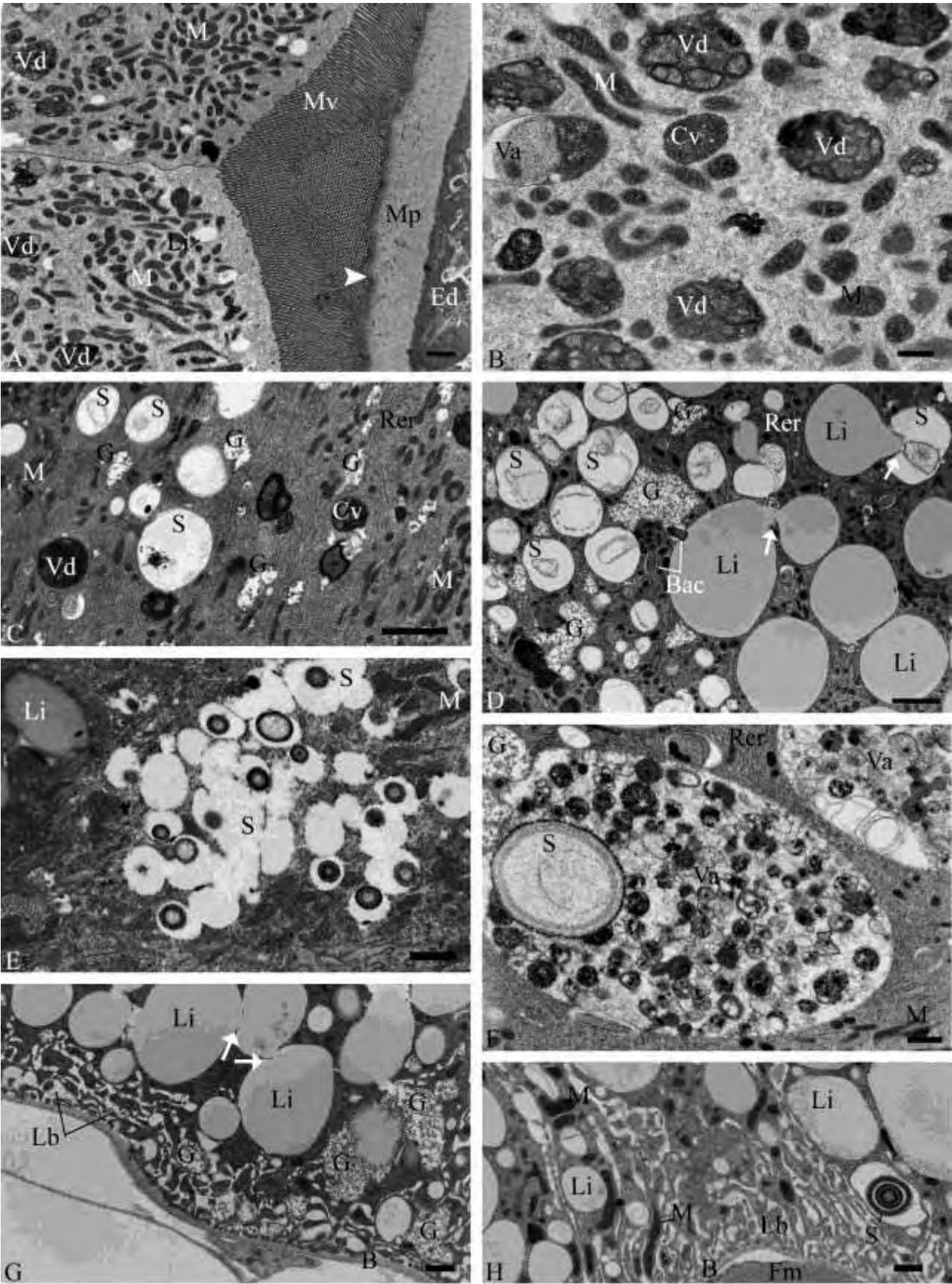


FIGURA 38**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Base da célula colunar do grupo controle: grânulos elétron-densos (→) no espaço extracelular do labirinto basal (Lb); gotas lipídicas (Li); membrana basal (B); fibra muscular (Fm); núcleo (N); célula regenerativa (Cr); mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 0,5 µm.
- B. Detalhe de células endócrinas tipo 2 do grupo controle: citoplasma preenchido por grânulos aureolados (Ga); mitocôndrias (M). Membrana basal (B), labirinto basal (Lb) dilatado das células colunares vizinhas, estando associado a depósitos de glicogênio (G) e a gotas lipídicas (Li). Barra = 1 µm.
- C. Detalhe do citoplasma basal de célula endócrina do tipo 1 do grupo controle: acúmulo de grânulos sólidos elétron-densos (Gs), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), labirinto basal (Lb) pouco desenvolvido. Núcleo (N); membrana basal (B) Barra = 0,5 µm.
- D. Detalhe do citoplasma apical de células colunares do tratamento com 0,5% de óleo de nim: predomínio de vacúolos digestivos (Vd), corpos multivesiculares (Cv), mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li). Barra = 0,5 µm.
- E. Detalhe da região média das células colunares do tratamento a 0,5% de óleo de nim: citoplasma supranuclear com predomínio de retículo endoplasmático rugoso (Rer), esferitos (S) e mitocôndrias (M); no citoplasma infranuclear predomínio de gotas lipídicas (Li). Notar a ocorrência de espaços intercelulares (*) entre as células colunares. Barra = 2 µm.
- F. Citoplasma basal da célula colunar do tratamento a 0,5%: labirinto basal (Lb) associado com mitocôndrias (M) e gotas lipídicas (Li); membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barras = 1 µm.
- G. Detalhe do citoplasma na região média das células colunares do tratamento a 0,5% com óleo de nim: formação de espaços intercelulares (*) entre as células. Gota lipídica (Li), retículo endoplasmático rugoso (Rer) e mitocôndrias (M). Barra = 0,25 µm.

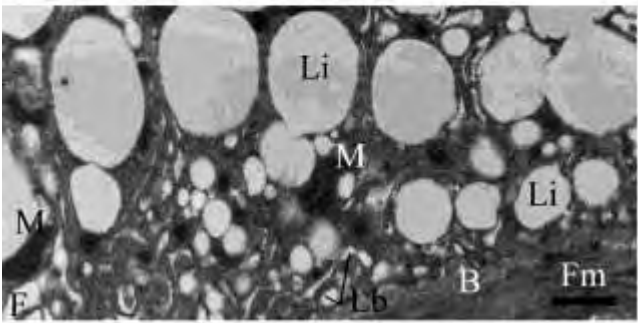
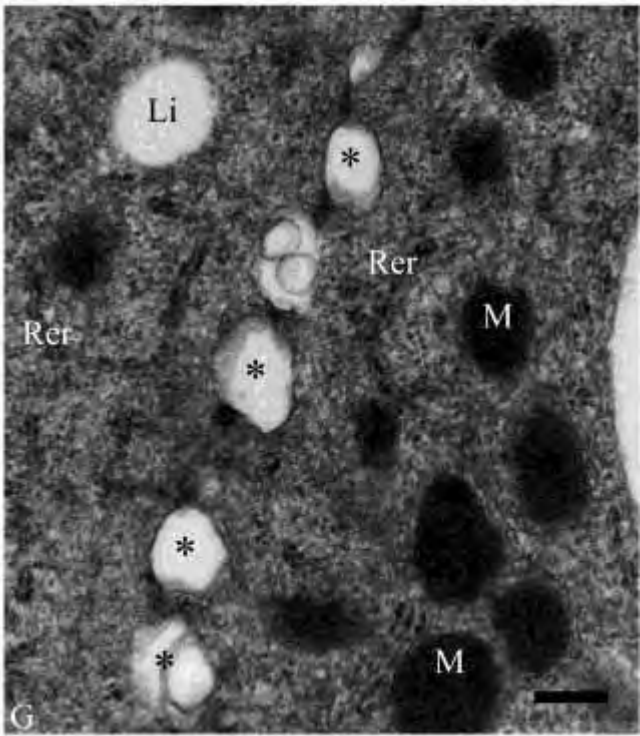
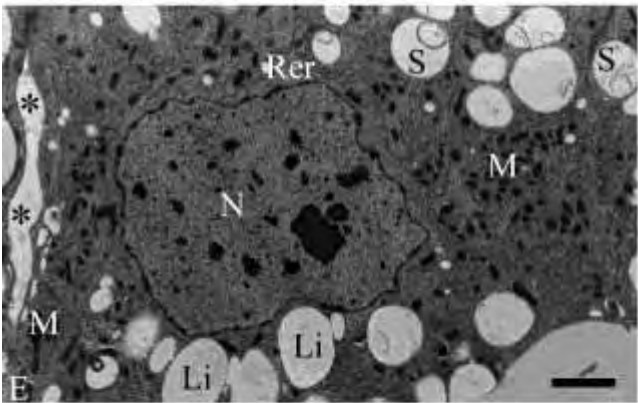
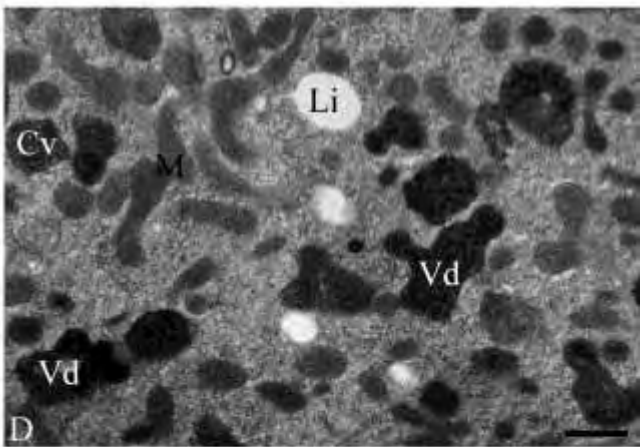
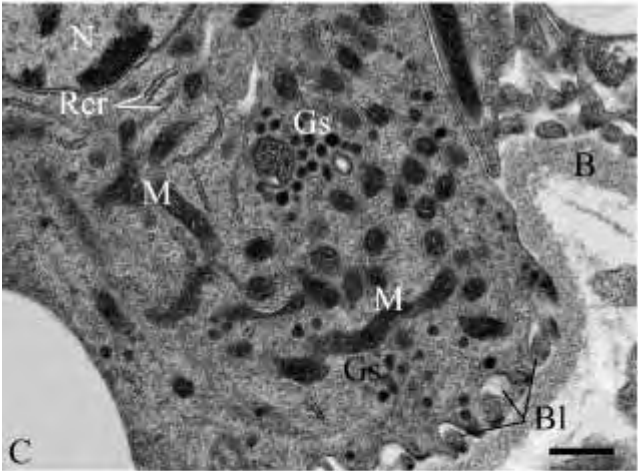
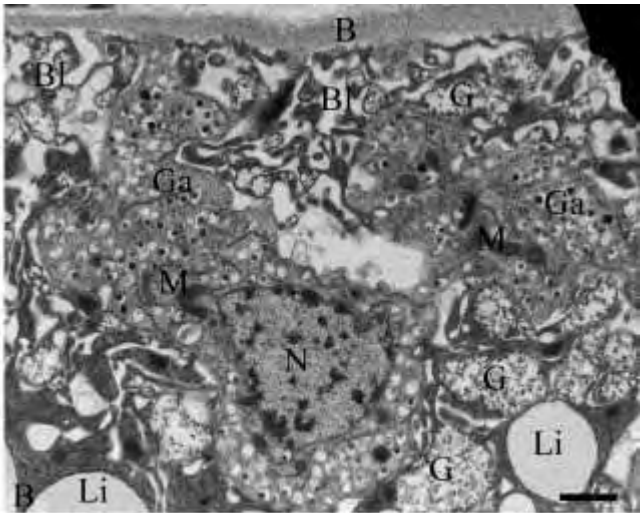
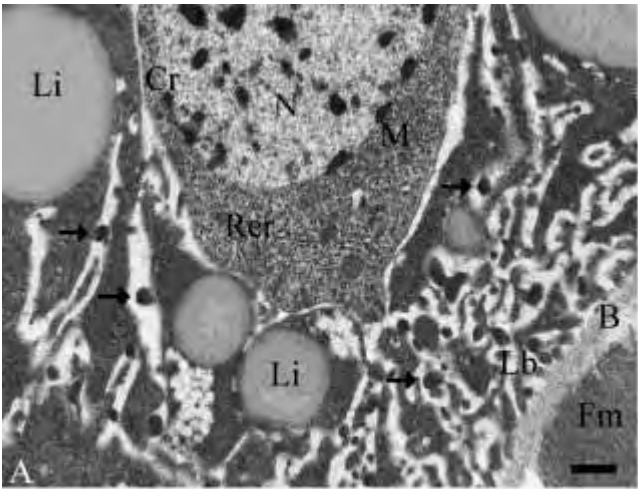


FIGURA 39**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM**

- A. Detalhe do citoplasma basal de célula endócrina tipo 1 do tratamento a 0,5% com óleo de nim: retículo endoplasmático liso (Rel) desenvolvido, grânulos sólidos elétron-densos (Gs), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer), espaço intercelular (*) entre célula endócrina e colunar (Co), gota lipídica (Li). Barra = 0,5 μ m.
- B. Citoplasma apical de célula colunar do tratamento a 1% de óleo de nim. Microvilosidades (Mv) esparsas, citoplasma rarefeito com vesículas de secreção (Vs), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer) fragmentado e vacúolo elétron-lucente. Barra = 0,5 μ m.
- C. Citoplasma perinuclear de célula colunar do tratamento a 1% de óleo de nim. Esferitos (S), vacúolo elétron-lucente, retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), complexo de Golgi vesicular (Cg), glicogênio (G), gota lipídica (Li), núcleo (N). Barra = 0,5 μ m.
- D. Detalhe do citoplasma supranuclear de célula colunar do tratamento a 1% com óleo de nim: predomínio de vacúolos elétron-lucentes (V) contendo material floculado; esferitos (S); núcleo (N). Barra = 3 μ m.
- E. Citoplasma basal da célula colunar do tratamento a 1%: labirinto basal pouco dilatado, associado com mitocôndrias (M) e grande quantidade de gotas lipídicas (Li); membrana basal (B). Barra = 1 μ m.
- F. Detalhe do citoplasma basal de célula endócrina do tipo 1 do tratamento a 1% de óleo de nim: retículo endoplasmático rugoso (Rer) com cisternas dilatadas e fragmentadas, grânulos sólidos elétron-densos (Gs), mitocôndrias (M), célula colunar (Co) e gotas lipídicas (Li). Barra = 0,25 μ m.

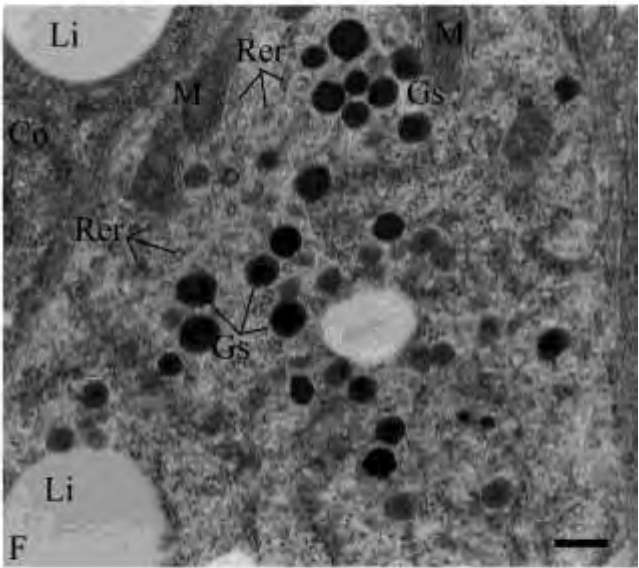
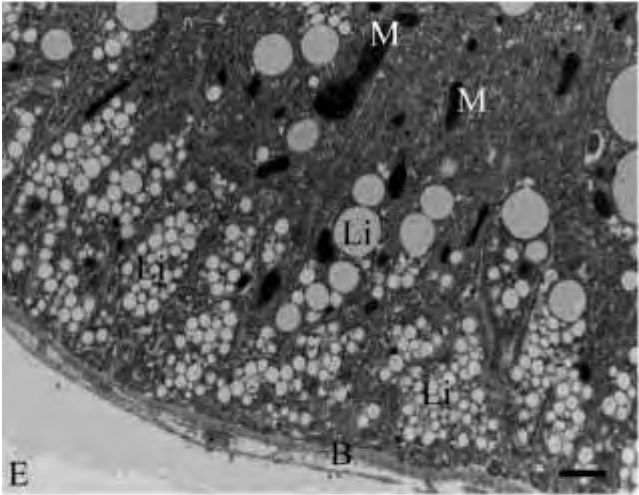
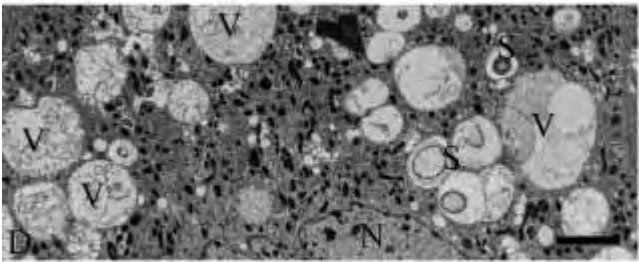
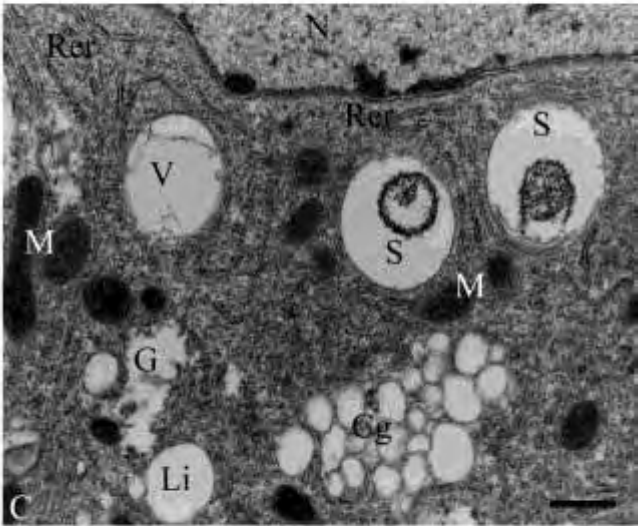
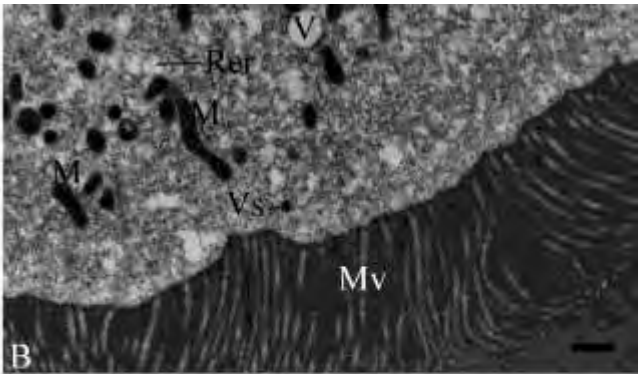
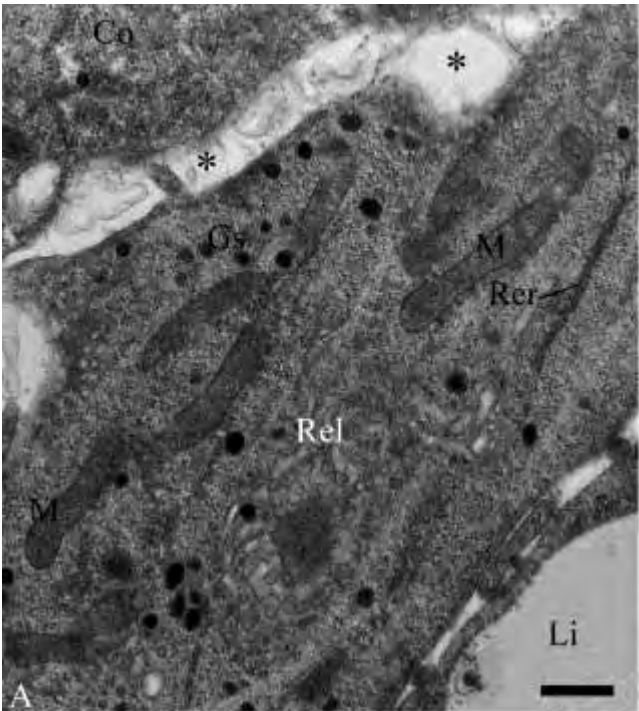


FIGURA 40

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE LARVAS DE *Ceraeochrysa claveri* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO A 2%
COM ÓLEO DE NIM

- A – B. Citoplasma apical de célula colunar: Microvilosidades (Mv) esparsas, com liberação de microvesículas (→), citoplasma rarefeito com retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatado e fragmentado, mitocôndrias (M) e corpos multivesiculares (Cv). Barras = 0,5 µm.
- C. Detalhe do citoplasma supranuclear com retículo endoplasmático liso (Rel) e retículo endoplasmático rugoso (Rer) desenvolvidos. Mitocôndrias (M), gota lipídica (Li) e corpo multivesicular (Cv). Barra = 0,2 µm.
- D. Citoplasma infranuclear da célula colunar: acúmulo de figuras do tipo mielina (Fmi), gotas lipídicas (Li) e mitocôndrias (M). Barra = 1 µm.
- E. Citoplasma basal da célula colunar: labirinto basal (Lb) dilatado, associado a mitocôndrias (M) e a gotas lipídicas (Li); membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 2 µm.
- F. Detalhe da base epitelial: ocorrência de espaços intercelulares (*) com material floculado entre células regenerativas (Cr) e colunares (Co). Retículo endoplasmático rugoso (Rer), glicogênio (G), núcleo (N), gotas lipídicas (Li), célula endócrina (Ce) e membrana basal (B). Barra = 2 µm.

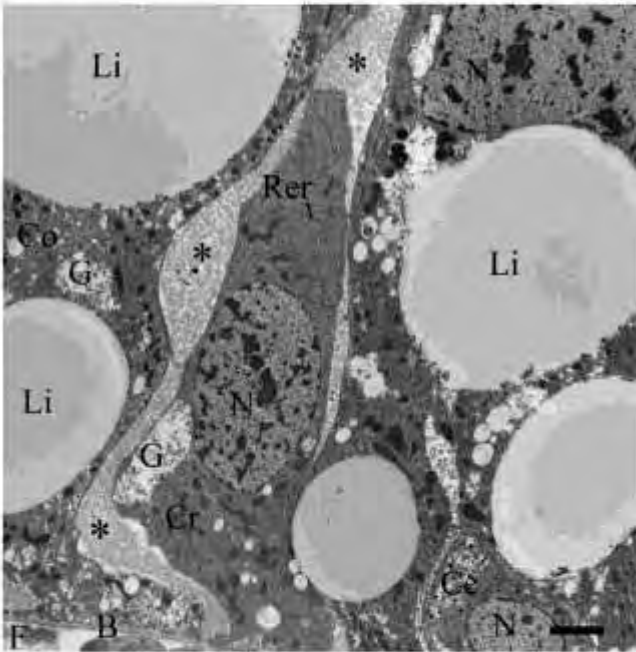
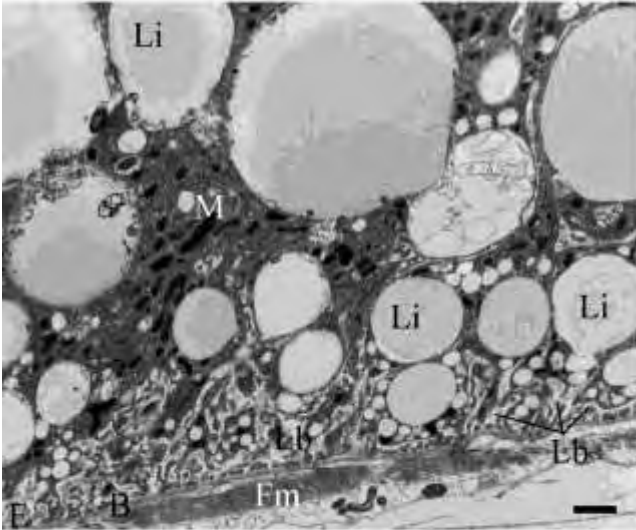
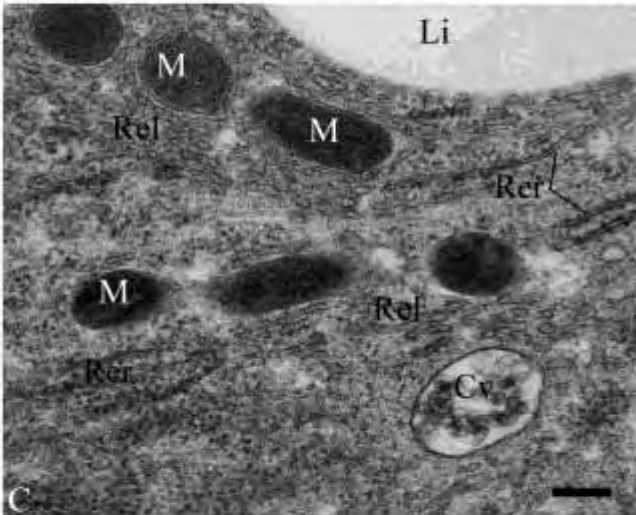
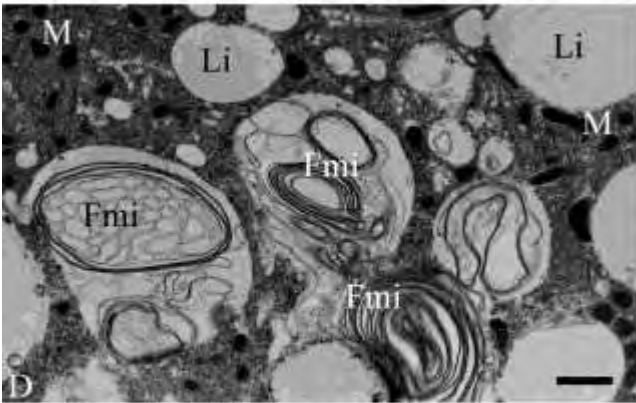
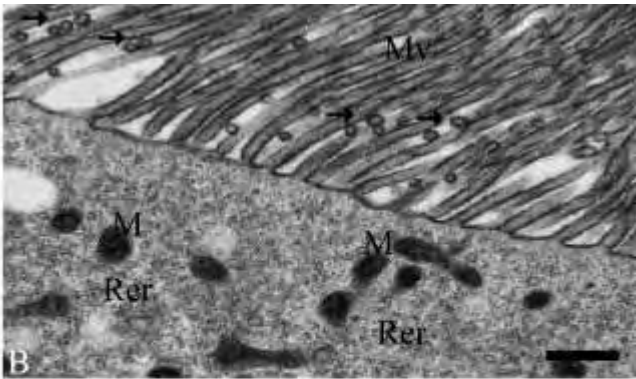
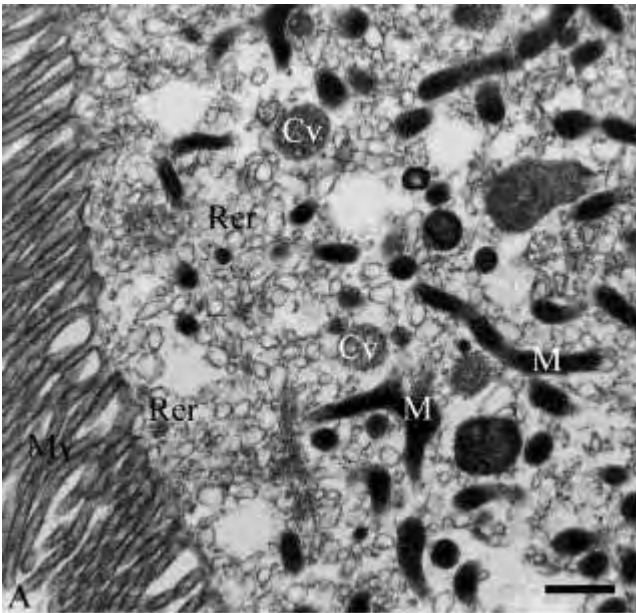


FIGURA 41**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE PUPAS CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A – B. Citoplasma apical das células colunares: microvilosidades (Mv) distribuídas regularmente, predomínio de mitocôndrias (M), grânulos elétron-densos (Gd), retículo endoplasmático rugoso (Rer) e corpos multivesiculares (Cv). Barras: A = 0,25 μm ; B = 0,5 μm .
- C – D. Citoplasma surpranuclear e perinuclear de célula colunar: vacúolos elétron-lucentes com conteúdo membranoso (V); pequenos depósitos de glicogênio (G); núcleo (N); retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias (M) e complexo de Golgi (Cg). Barras: C = 1 μm ; D = 0,25 μm .
- E. Citoplasma infranuclear e basal de célula colunar: vacúolos elétron-lucentes (V), depósitos de glicogênio (G) e mitocôndrias (M) associadas ao labirinto basal (Lb). Notar membrana basal (B) espessa e mais irregular ao redor da base celular, sendo constituída por uma camada mais elétron-densa ($\rightarrow$) e outra menos elétron-densa ($\blacktriangleright$); fibra muscular (Fm); núcleo (N). Barra = 1 μm .
- F. Detalhe da base de célula colunar: poucas mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer) e glicogênio (G) associados ao labirinto basal (Lb). Notar a presença de vacúolos (V) no interior do espaço extracelular do labirinto basal. Bactéria (Bac); membrana basal (B). Barra = 0,5 μm .

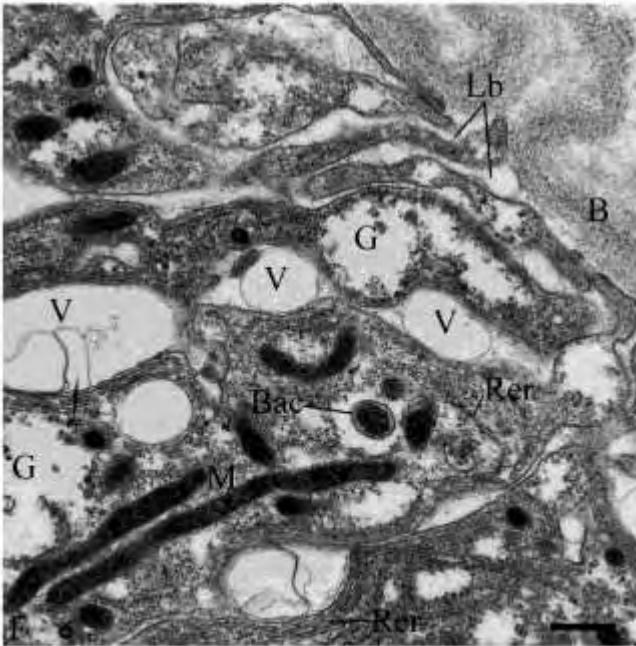
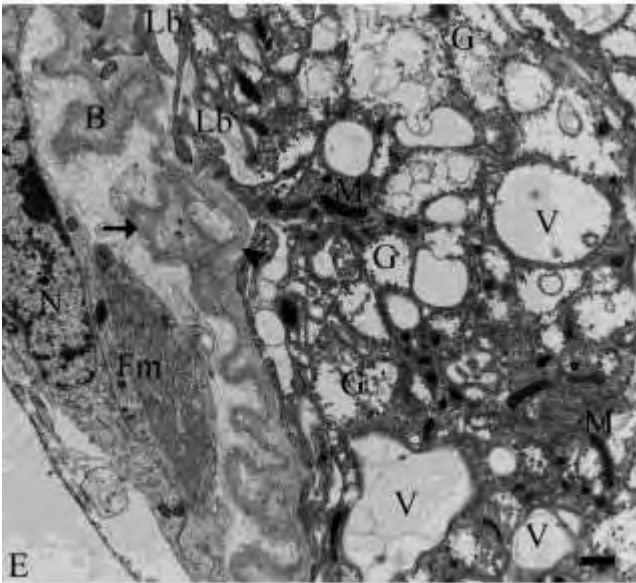
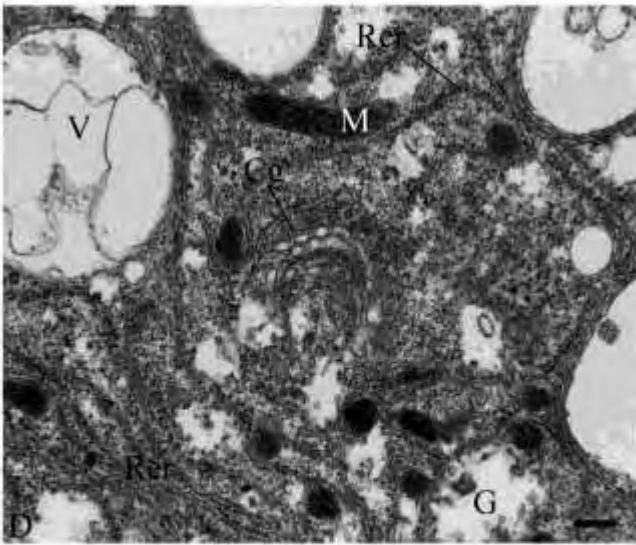
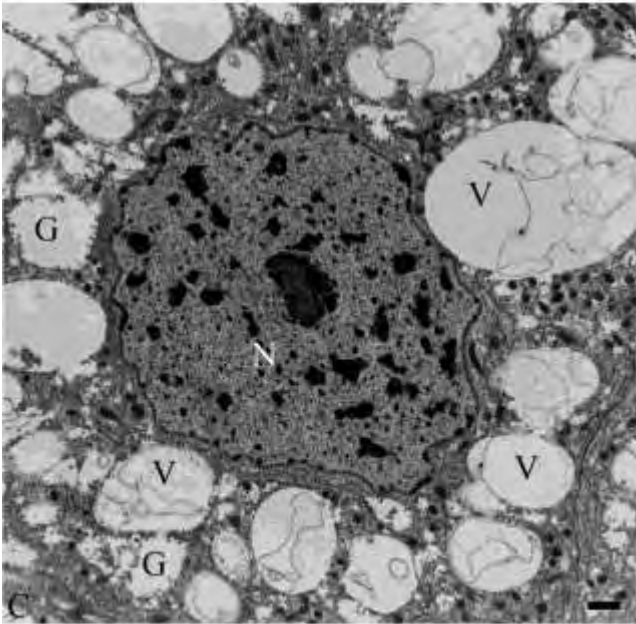
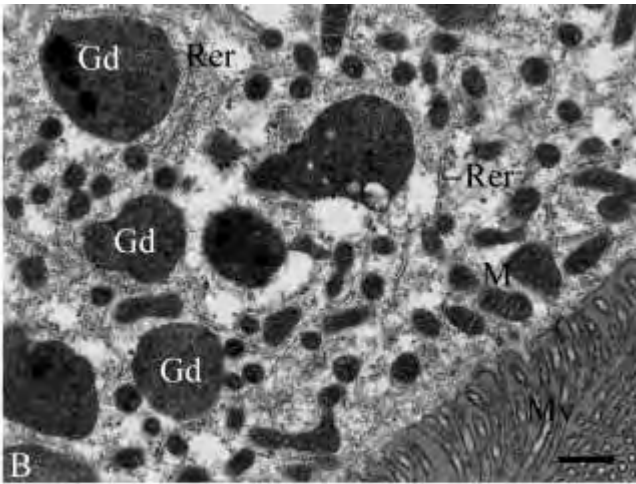
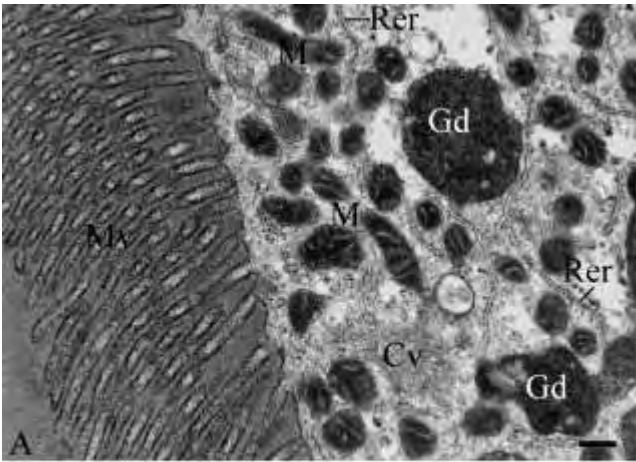


FIGURA 42**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO MÉDIO
DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Célula regenerativa (Cr) do grupo controle apresentando núcleo (N) e citoplasma mais elétron-lucente em relação às células colunares (Co) vizinhas. Vacúolos (V), glicogênio (G), mitocôndrias (M), labirinto basal (Lb) e bactéria endossimbionte (Bac). Barra = 1 μ m.
- B. Citoplasma apical de célula colunar de pupa obtida do tratamento com óleo de nim a 0.5%. Microvilosidades (Mv) esparsas, citoplasma rarefeito com depósitos de glicogênio, vacúolos elétron-lucentes (V), mitocôndrias, grânulos densos e retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 0,5 μ m.
- C. Protusões citoplasmáticas (P) em pupa obtida do tratamento com óleo de nim a 0,5%: citoplasma rarefeito com depósitos de glicogênio (G), grânulos densos (Gd), mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 3 μ m.
- D. Região média de célula colunar de pupa obtida do tratamento a 0,5% de óleo de nim: vacúolos (V) e glicogênio (G) predominam no citoplasma, seguido por grânulos densos. Gota lipídica (Li); retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias (M); núcleo (N). Barra = 3 μ m.
- E. Base celular de célula colunar de pupa obtida do tratamento a 0,5%. Estreitas invaginações do labirinto basal (Lb), retículo endoplasmático rugoso (Rer) fragmentado, vacúolos (V), membrana basal (B), fibra muscular (Fm). Barra = 0,5 μ m.
- F. Detalhe do citoplasma basal de célula endócrina tipo 1 de pupa obtida do tratamento a 0,5%: citoplasma com vacúolos (V), dilatação e fragmentação do retículo endoplasmático rugoso (Rer). Grânulos sólidos elétron-densos (Gs); membrana basal (B) sendo constituída por 2 camadas, uma mais elétron-densa ($\rightarrow$) e outra menos elétron-densa ($\blacktriangleright$). Barra = 0,5 μ m.

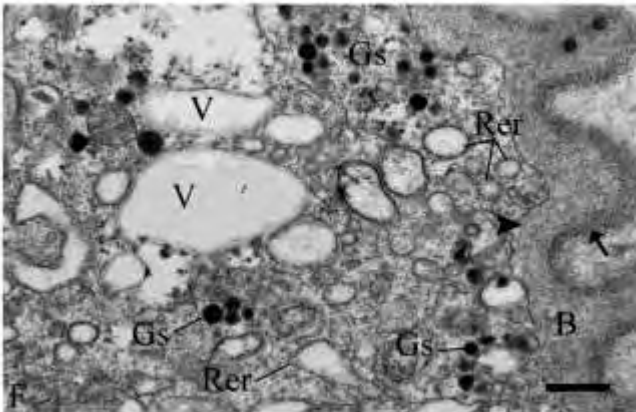
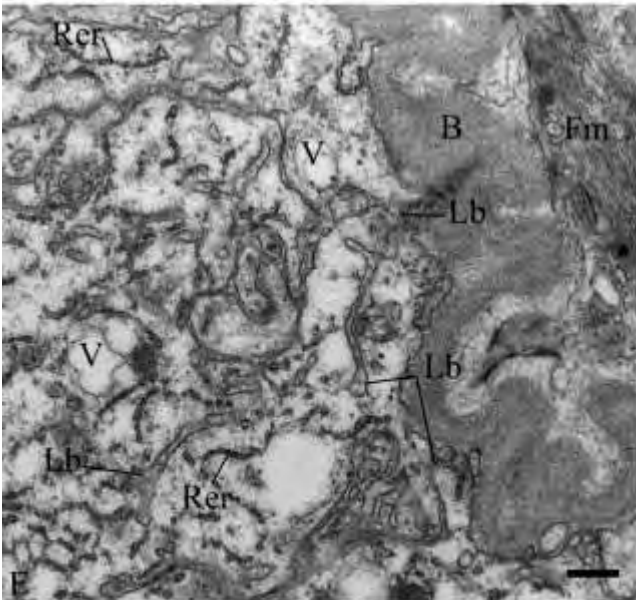
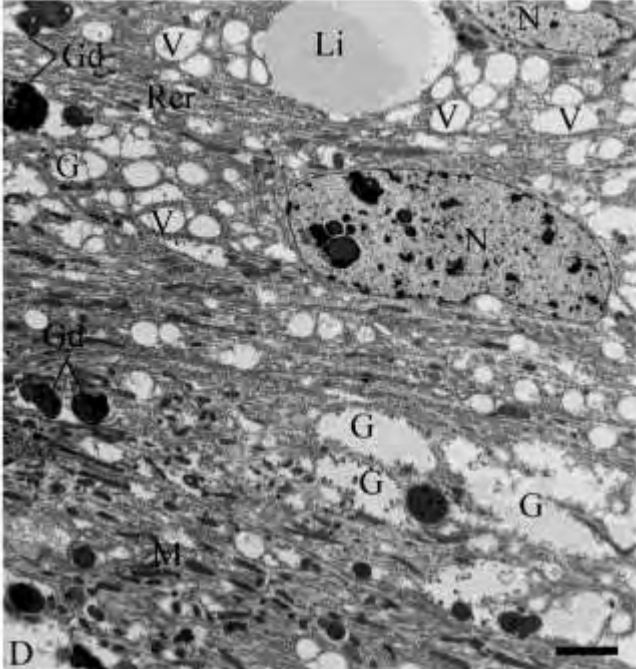
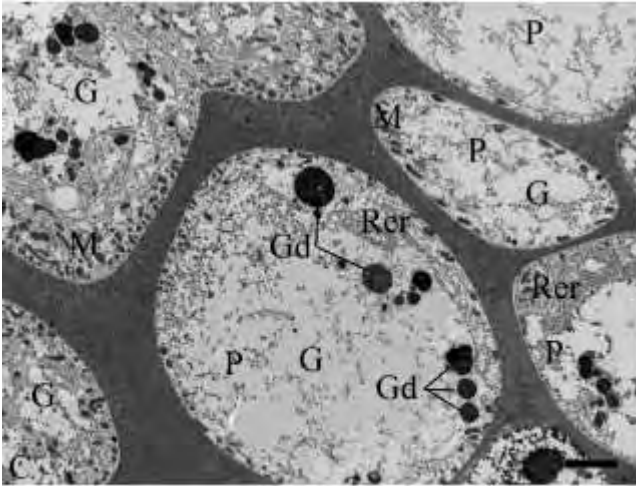
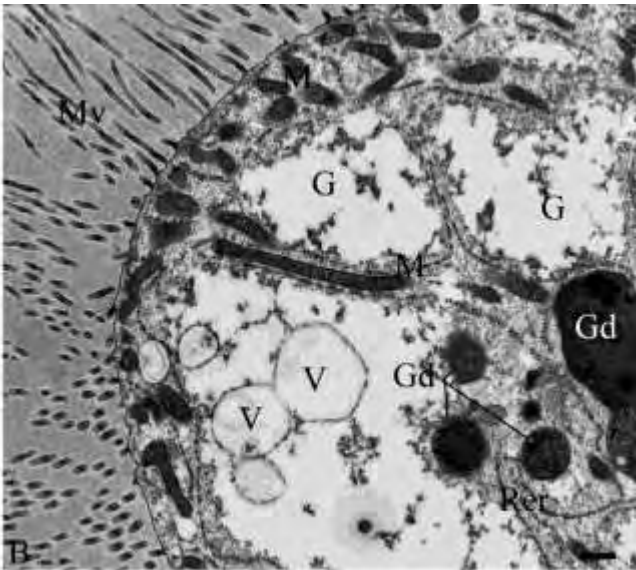
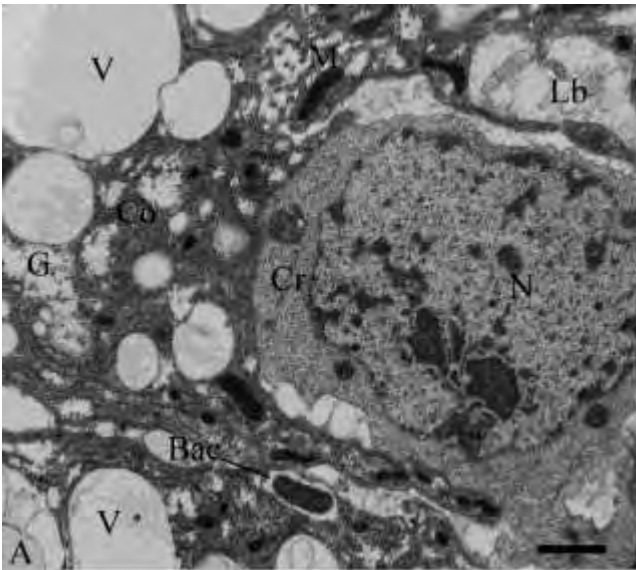


FIGURA 43

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDAS DO TRATAMENTO
COM ÓLEO DE NIM

- A. Citoplasma apical de célula colunar de pupa obtida do tratamento a 1%. Microvilosidades (Mv) esparsas e irregulares, citoplasma rarefeito, com mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer) fragmentado. Junção septada (Js). Barra = 0,5 μ m.
- B. Citoplasma infranuclear e basal de célula colunar de pupa obtida do tratamento a 1% com óleo de nim. Grandes depósitos de glicogênio (G); retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias (M); vacúolos (V); gota lipídica (Li) e membrana basal (B). Barra = 1 μ m.
- C. Célula muscular de pupa obtida do tratamento a 1%: citoplasma com retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatado e fragmentado; núcleo (N); membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.
- D – E. Célula colunar de pupa obtida do tratamento a 2%. Região apical dilatada ($\rightarrow$) podendo ocorrer a liberação de protusões citoplasmáticas (P). Escassas microvilosidades (Mv) na superfície apical, citoplasma com vacuólos (V), depósitos de glicogênio (G), grânulos densos (Gd), retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M), gota lipídica (Li) e núcleo (N). Barras: D = 5 μ m; E = 1 μ m.
- F. Detalhe da base celular de célula colunar de pupa obtida do tratamento a 2%: labirinto basal (Lb) com estreitas invaginações associadas a mitocôndrias (M); membrana basal (B); fibra muscular com miofibrilas distribuídas irregularmente ($\rightarrow$); ectotraquéia (Tr). Barra = 0,5 μ m.

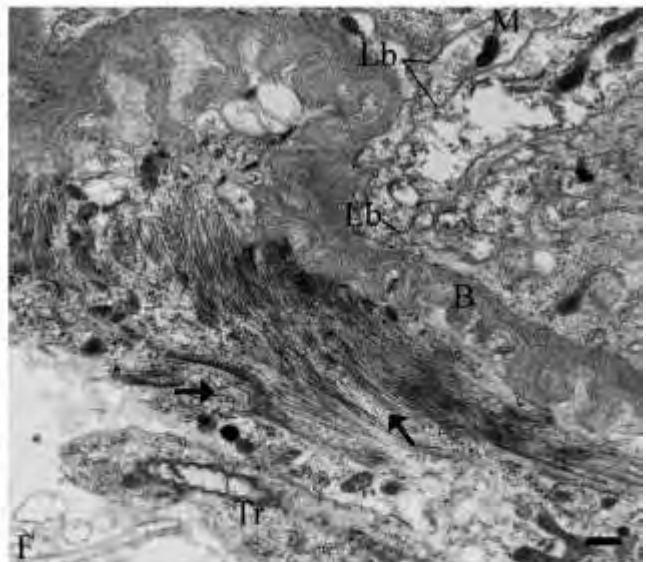
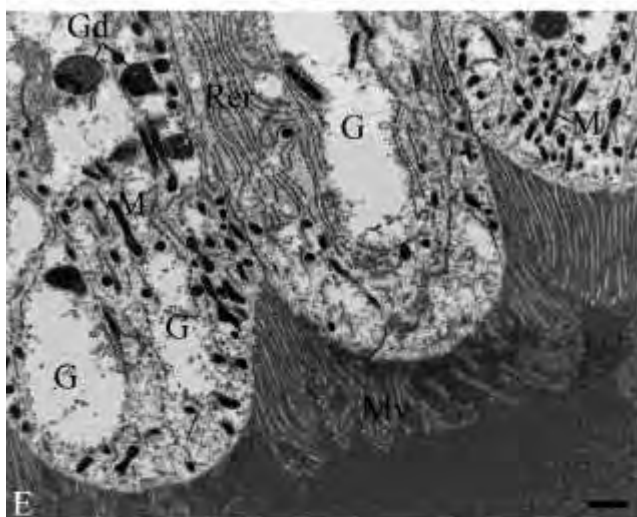
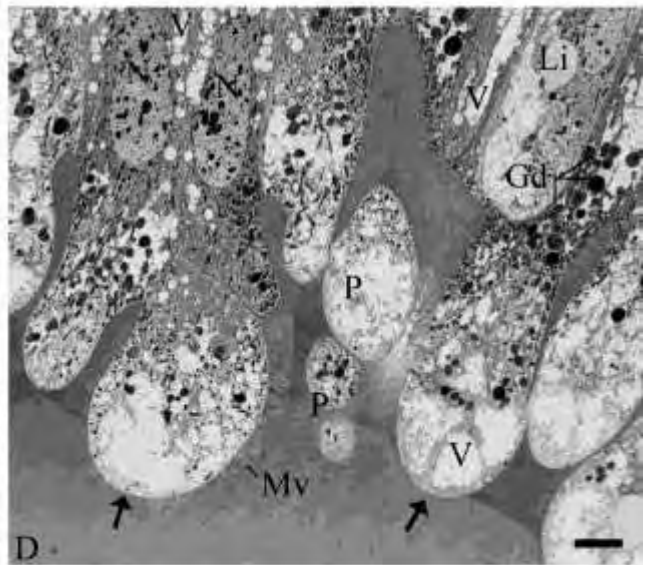
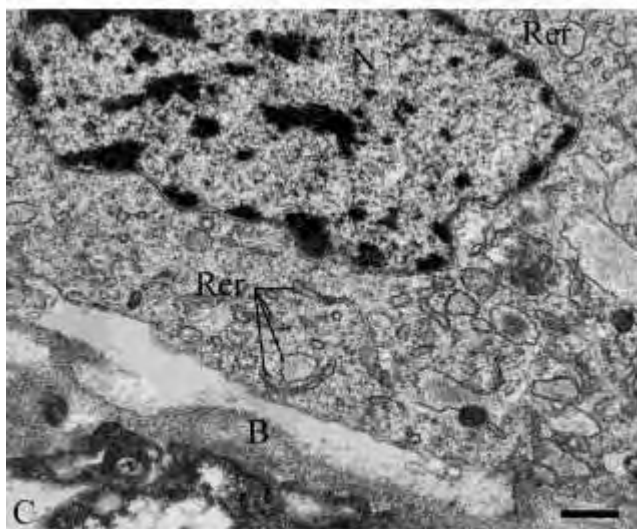
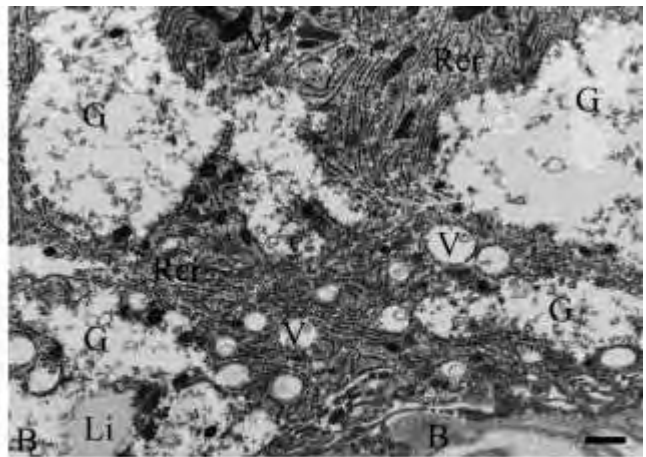
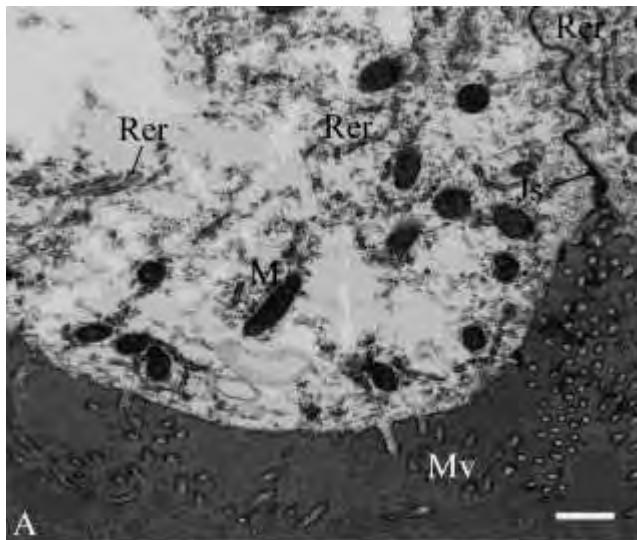


FIGURA 44**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Ápice da célula colunar do grupo controle: microvilosidades (Mv), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer), grânulos densos (Gd), vacúolos (V) e corpos multivesiculares (Cv). Barra = 0,5 μ m.
- B. Citoplasma perinuclear e basal de célula colunar do grupo controle: retículo endoplasmático rugoso (Rer) desenvolvido no citoplasma perinuclear; núcleo (N); vacúolos (V) no citoplasma basal; labirinto basal (Lb) dilatado; membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 2 μ m.
- C. Base da célula colunar do grupo controle: labirinto basal (Lb) dilatado, associado a vacúolos (V) e a poucas mitocôndrias (M). Lâmina basal (B). Barra = 1 μ m.
- D. Ápice da célula colunar de pupa obtida do tratamento a 0,5%: microvilosidades (Mv) escassas; citoplasma rarefeito com mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (Rer) fragmentado e grânulos densos (Gd). Barra = 0,5 μ m.
- E. Células colunares de pupa obtida do tratamento a 0,5% de óleo de nim: microvilosidades (Mv) escassas, citoplasma pouco elétron-denso, com acúmulo de grânulos densos (Gd) na região apical da célula, volumosos vacúolos (V); núcleo (N); gota lipídica (Li); labirinto basal (Lb); lâmina basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 3 μ m.
- F. Células colunares de pupa obtida do tratamento a 1% de óleo de nim: citoplasma preenchido por grandes depósitos de glicogênio (G), vacúolos (V) e grânulos densos (Gd). Retículo endoplasmático rugoso (Rer); núcleo (N); mitocôndrias (M); labirinto basal (Lb); membrana basal (B). Barra = 2 μ m.

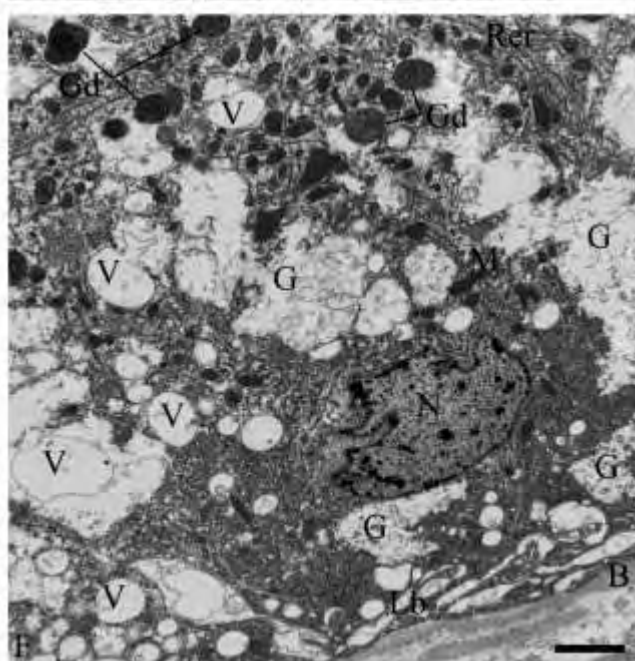


FIGURA 45**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA E POSTERIOR DO
INTESTINO MÉDIO DE PUPAS DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Células endócrina do tipo 1 da região média do intestino médio de pupa obtida do tratamento a 1% de óleo de nim: retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatado e fragmentado; núcleo (N); grânulos sólidos elétron-densos (Gs); mitocôndrias (M); membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 0,5 μ m.
- B. Células colunares da região média do intestino médio de pupa obtida do tratamento a 2% de óleo de nim: citoplasma preenchido por depósitos de glicogênio (G), vacúolos elétron-lucentes (V) e grânulos densos (Gd). Lâmina basal (B). Barra = 2 μ m.
- C. Células colunares da região posterior do intestino médio de pupa controle: microvilosidades (Mv) regulares em contato com membrana peritrófica (Mp), grânulos densos (Gs), vacúolos (V), núcleo (N), labirinto basal (Lb) e membrana basal (B). Barra = 2 μ m.
- D. Base do epitélio da região posterior do intestino médio de pupa obtida do tratamento a 2%: fibra muscular com miofibrilas dispostas irregularmente ($\rightarrow$); figura de mielina (Fmi); miofibrilas dispostas regularmente (*). Núcleo (N) de célula muscular; membrana basal (B). Barra = 2 μ m.
- E. Células colunares da região posterior do intestino médio de pupa obtida do tratamento a 1% de óleo de nim: membrana peritrófica (Mp); protusões citoplasmáticas (P); microvilosidades (Mv) escassas; citoplasma apical rarefeito com predomínio de vacúolos (V) e depósitos de glicogênio (G). Grânulos densos (Gd); retículo endoplasmático rugoso (Rer); gota lipídica (Li); núcleo (N). Barra = 3 μ m.

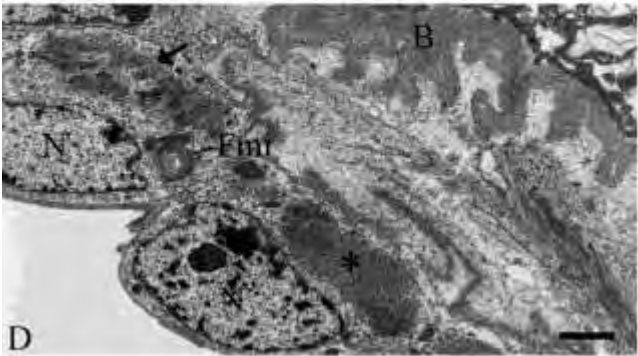
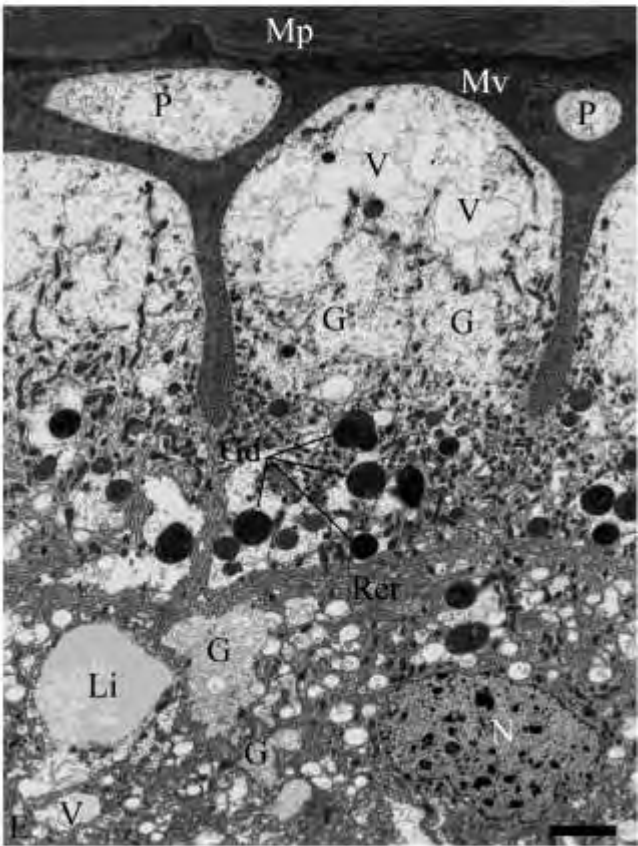
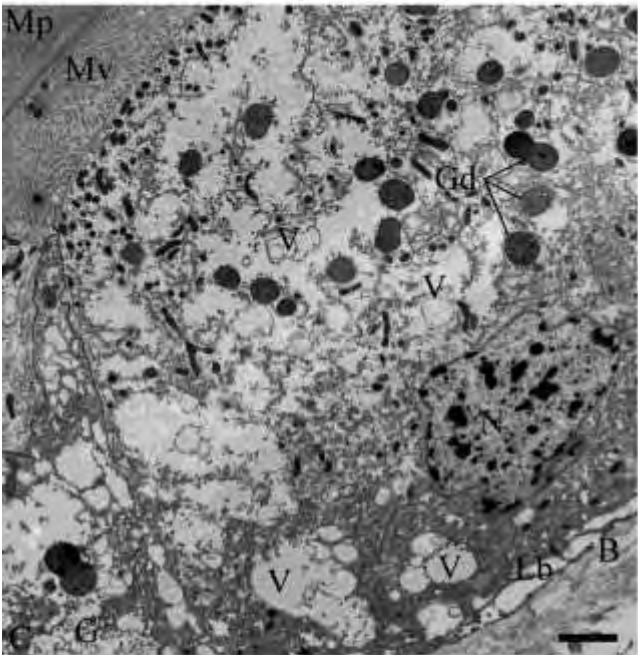
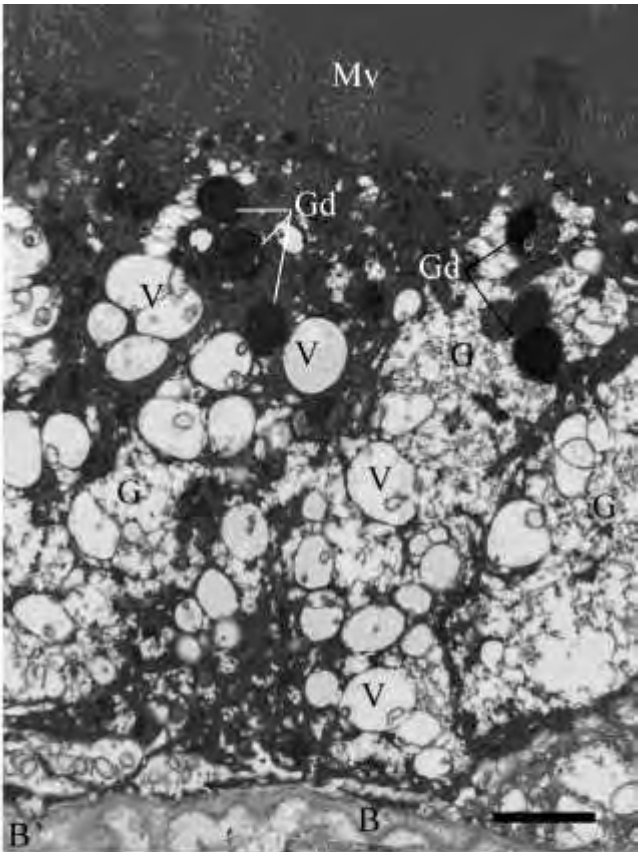
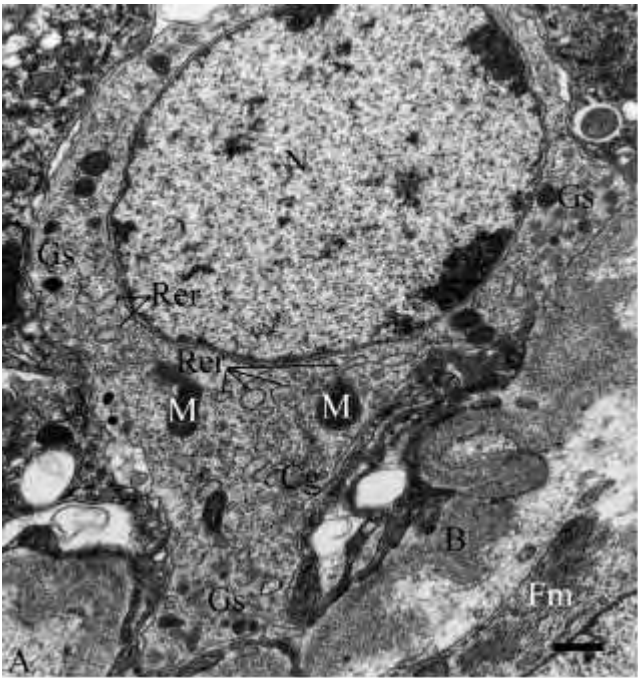


FIGURA 46**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Ápice das células colunares: longas microvilosidades (Mv) liberando microvesículas (→); vesículas de secreção (Vs); mitocôndrias (M). Barra = 0,5 µm.
- B. Citoplasma apical de célula colunar: mitocôndrias (M), cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Rer), raras figuras de mielina (Fmi) e esferitos (S) com material finamente floculado. Barra = 0,5 µm.
- C. Ápice de célula colunar: liberação de protusão citoplasmática com ausência de microvilosidades (Mv), contendo poucas mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 0,5 µm.
- D. Citoplasma supranuclear de célula colunar: esferitos (S) com material floculado ou lamelar; mitocôndrias (M); retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 0,5 µm.
- E. Citoplasma perinuclear de célula colunar: esferitos (S), cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias (M) e núcleo (N). Barra = 1 µm.
- F. Base da célula colunar: estreitas invaginações do labirinto basal (Lb), estando associados a elas mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer); membrana basal (B). Barra = 1 µm.

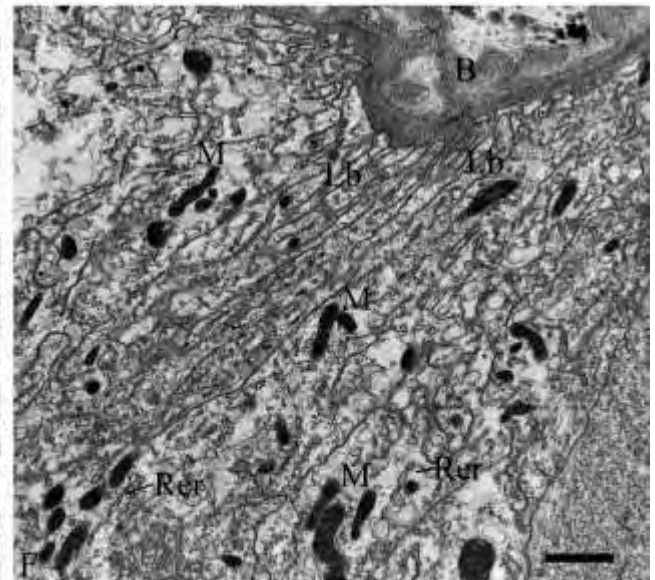
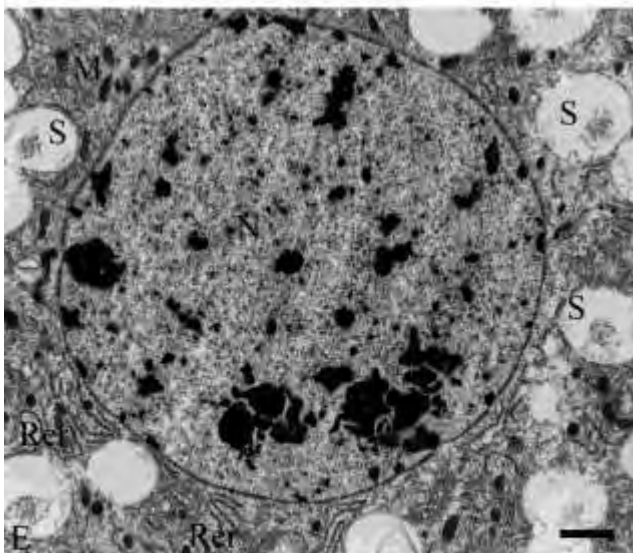
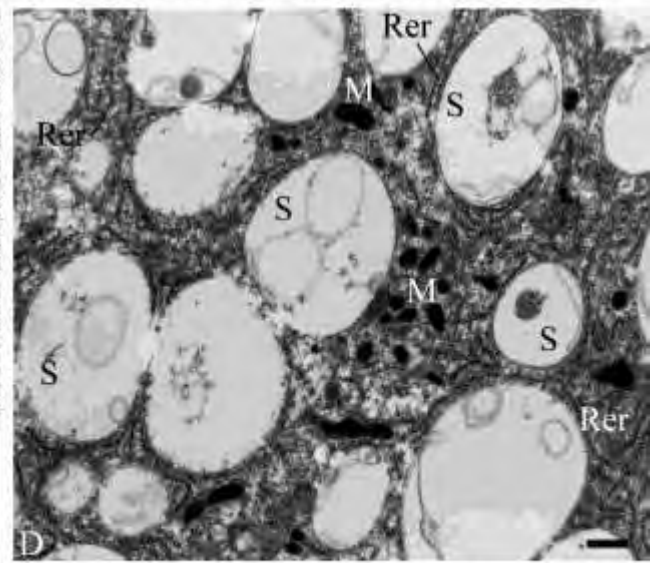
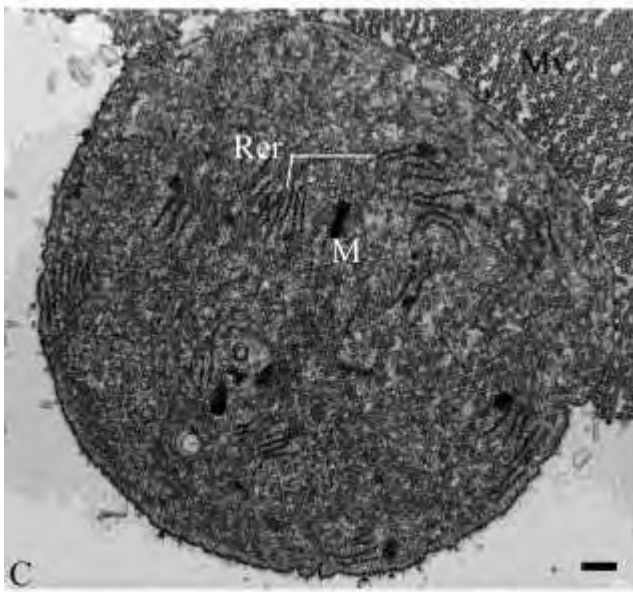
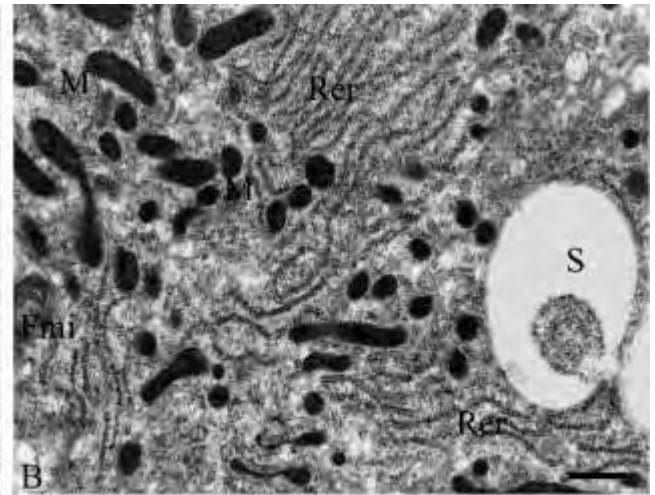
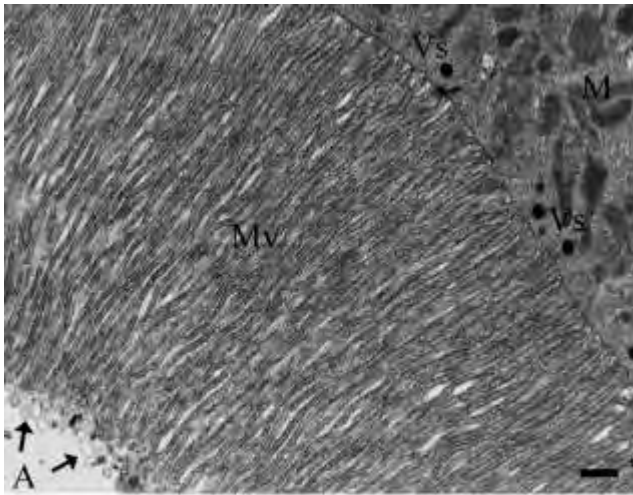


FIGURA 47**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Células regenerativas de adulto controle: núcleo (N); bactérias endossimbiontes (Bac); labirinto basal (Lb) de célula colunar vizinha. Barra = 2 μm .
- B – C. Ápice de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: microvilosidades (Mv) com granulações ($\rightarrow$); vesículas de secreção (Vs); mitocôndrias (M); cisternas de retículo endoplasmático rugoso levemente dilatadas (Rer); retículo endoplasmático liso (Rel); complexo de Golgi (Cg) vesicular; junção septada (Js); vacúolo digestivo (Vd). Barras = 0,5 μm .
- D – E. Citoplasma perinuclear de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatadas; mitocôndrias (M); bactéria (Bac); espaço perinuclear ($\rightarrow$) dilatado; núcleo (N). Barras = 0,5 μm .
- F. Base da célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: citoplasma rarefeito com poucas invaginações do labirinto basal (Lb), associadas a mitocôndrias (M) e ao retículo endoplasmático rugoso (Rer); lamina basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 0,5 μm .

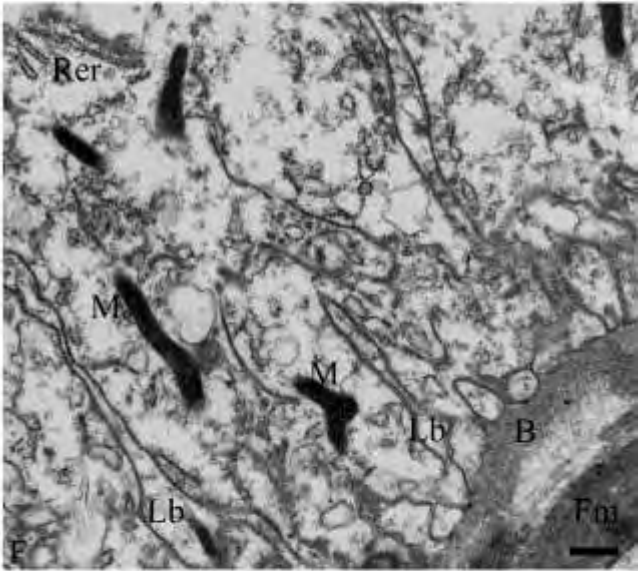
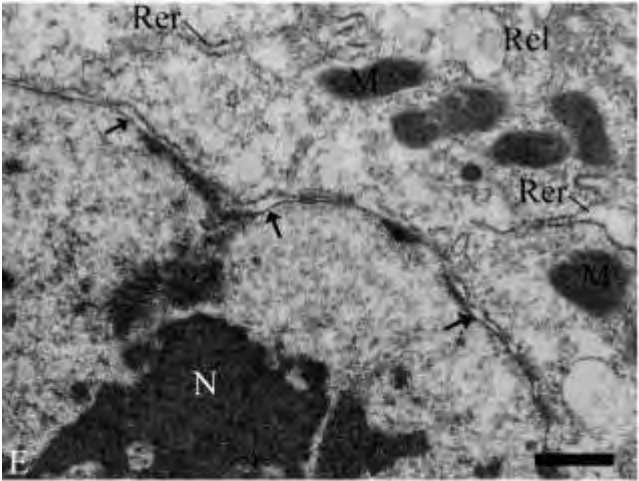
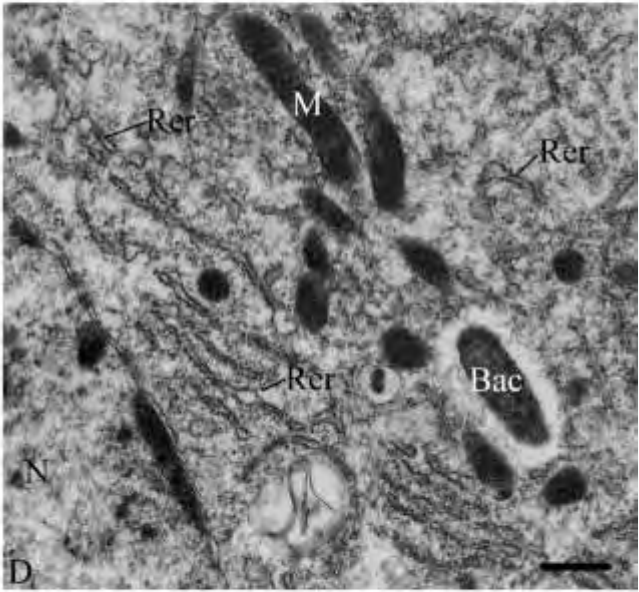
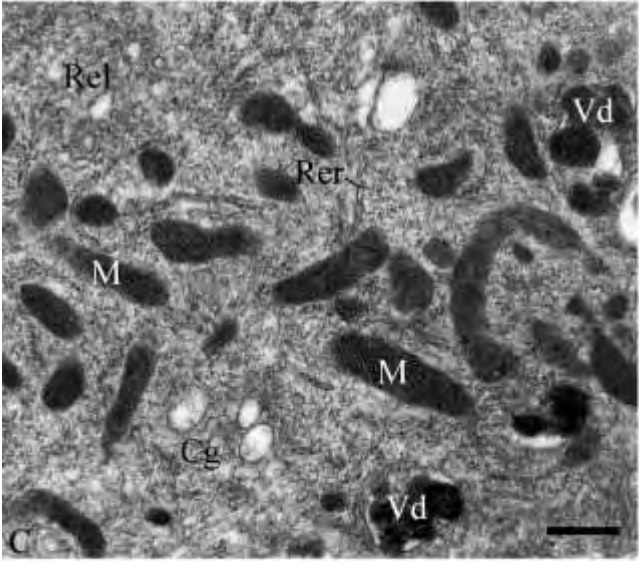
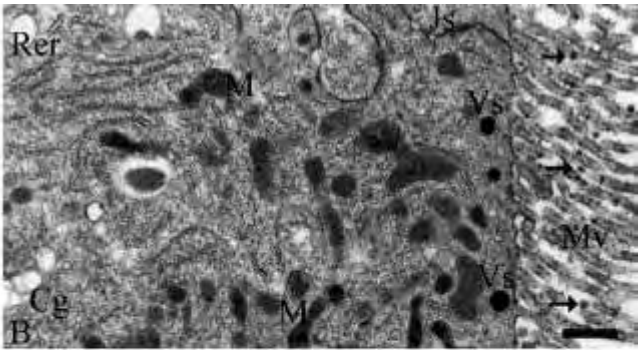
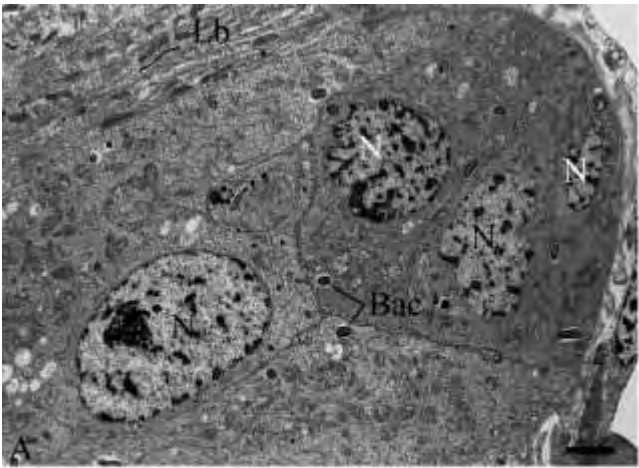


FIGURA 48

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO ANTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDO DO
TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM.

- A. Ápice da célula colunar de adulto obtido do tratamento a 2%: microvilosidades (Mv) escassas e irregulares; vesículas de secreção (Vs). Barra = 0,5 μ m.
- B. Citoplasma apical de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: mitocôndrias edemaciadas (*) juntamente com mitocôndrias normais (M); vacúolo autofágico (Va). Barra = 1 μ m.
- C. Detalhe do citoplasma supranuclear de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 2%: mitocôndrias edemaciadas (*); vacúolos (V); esferitos (S); mitocôndrias normais (M); cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas (Rer). Barra = 0,5 μ m.
- D. Citoplasma perinuclear de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: mitocôndrias alteradas (*), juntamente com mitocôndrias normais (M), retículo endoplasmático rugoso dilatado (Rer) e núcleo (N). Barra = 0,5 μ m.
- E. Base de célula colunar de adulto resultante do tratamento de larva a 1% com óleo de nim: labirinto basal (Lb); mitocôndrias normais (M); mitocôndrias edemaciadas (*); retículo endoplasmático rugoso (Rer) dilatado e fragmentado; membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.
- F. Célula endócrina do tipo 2 e regenerativa (Cr) de adulto resultante do tratamento de larva com óleo de nim a 2%: grânulos aureolados (Ga); retículo endoplasmático rugoso (Rer); bactérias (Bac); complexo de Golgi (Cg); mitocôndrias edemaciadas (*). Barra = 0,5 μ m.

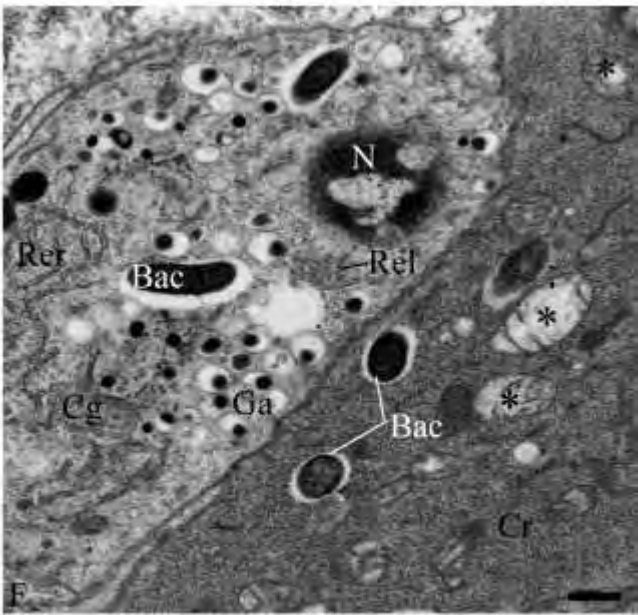
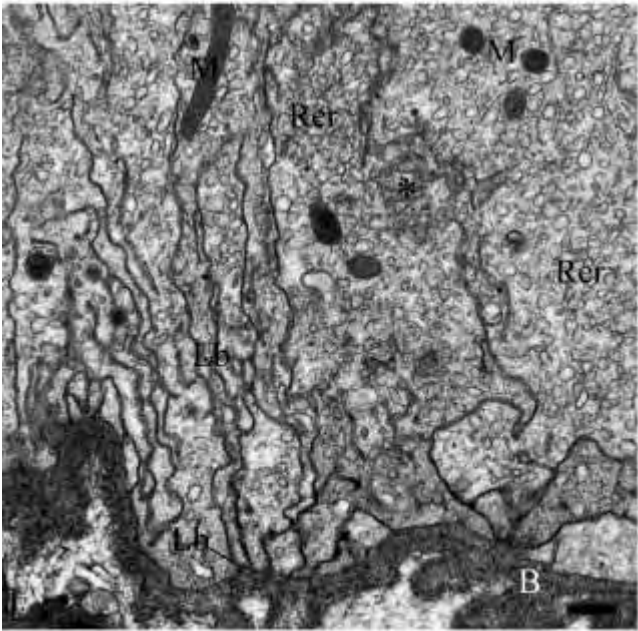
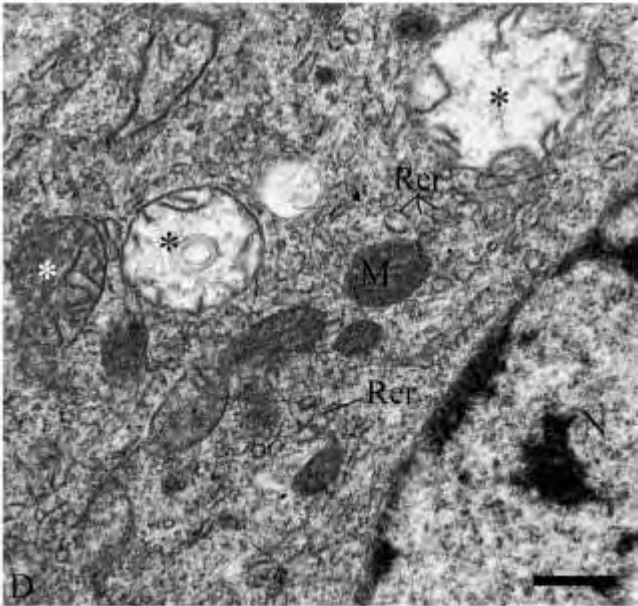
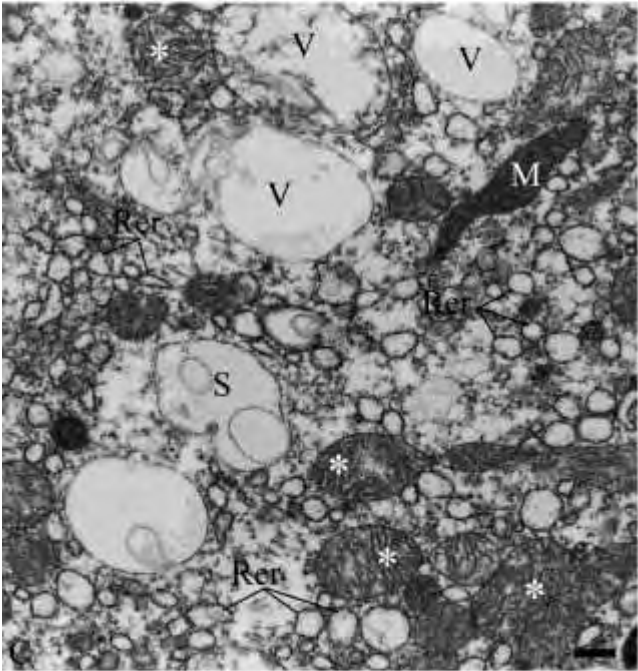
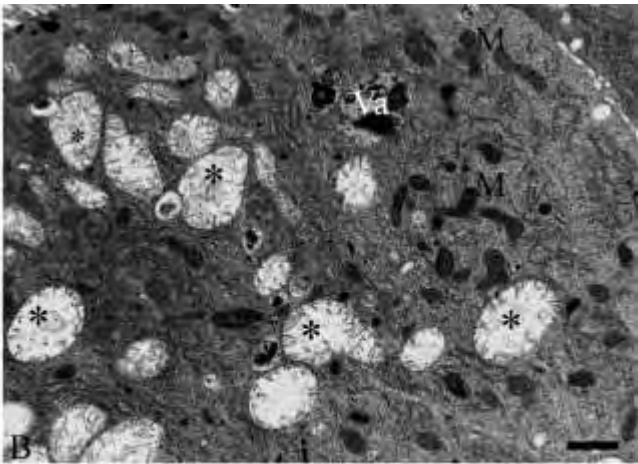
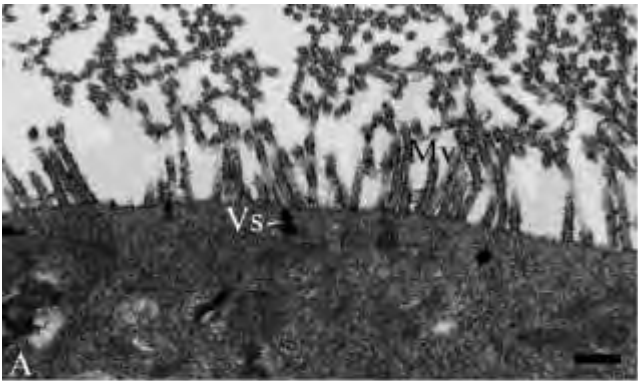


FIGURA 49**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO
DE ADULTO CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A. Ápice de célula colunar: microvilosidades (Mv) longas e regulares; mitocôndrias (M); vacúolos digestivos (Vd) heterogêneos; esferitos (S) e retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barra = 1 μ m.
- B. Citoplasma da região média de células colunares: predomínio de esferitos (S) com material floculado; raras gotas lipídicas (Li); abundância de mitocôndrias (M) na região apical das células; longas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Rer), núcleo (N). Barra = 2 μ m.
- C. Detalhe do citoplasma perinuclear de célula colunar: esferitos (S); cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias (M); bactéria (Bac); núcleo (N). Barra = 1 μ m.
- D. Citoplasma basal de célula colunar: estreitas invaginações do labirinto basal (Lb), associadas a mitocôndrias (M) e a cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer); membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.
- E. Ninho de células regenerativas: núcleo (N); bactérias (Bac); depósito de glicogênio (G); célula colunar (Co); membrana basal (B); feixes de fibras musculares circular (Mc) e longitudinal (Ml). Barra = 2 μ m.
- F. Célula endócrina do tipo 2: predomínio no citoplasma de grânulos aurelados (Ga); poucas mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (Rer); gota lipídica (Li); núcleo (N); labirinto basal (Lb) pouco desenvolvido; membrana basal (B). Barra = 0,5 μ m.

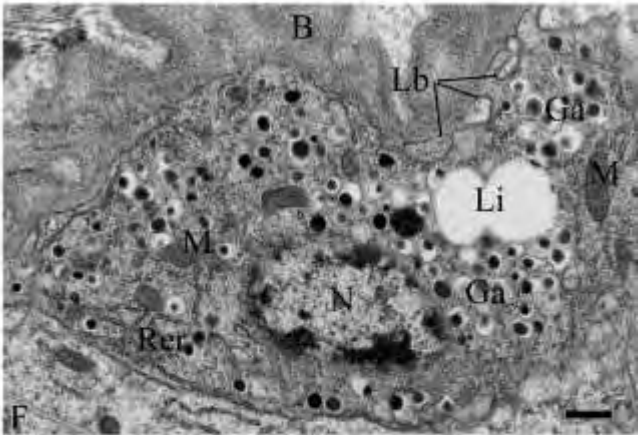
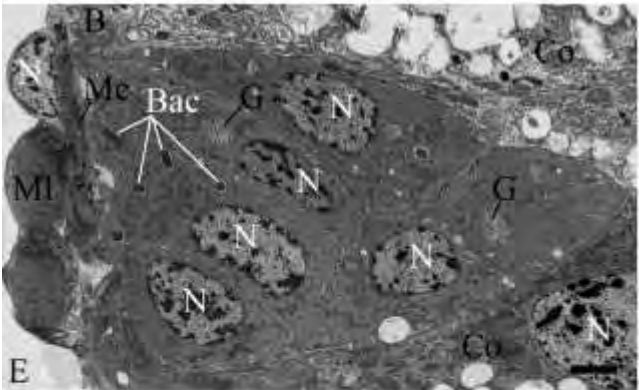
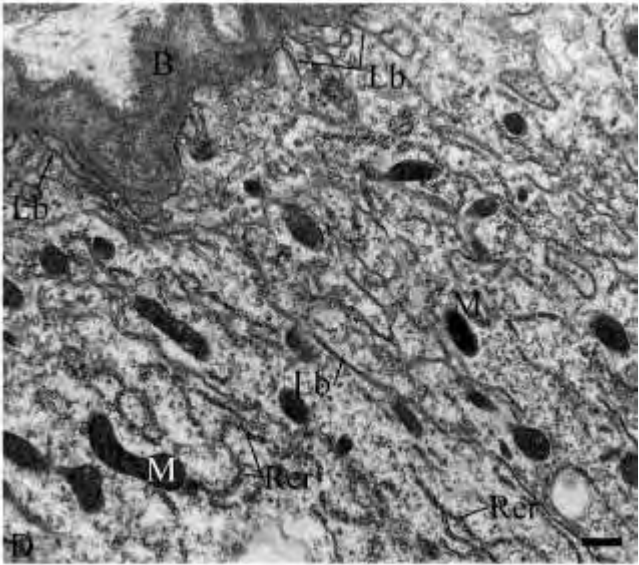
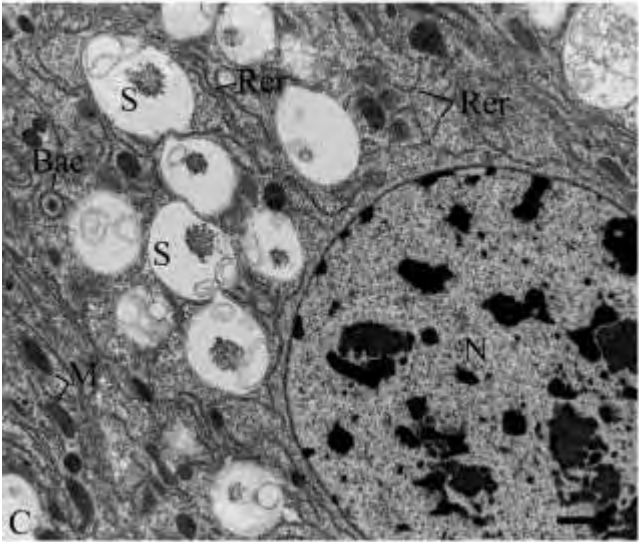
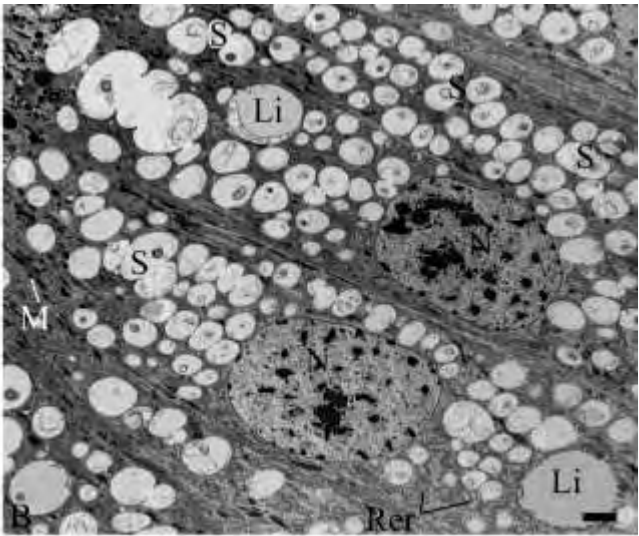
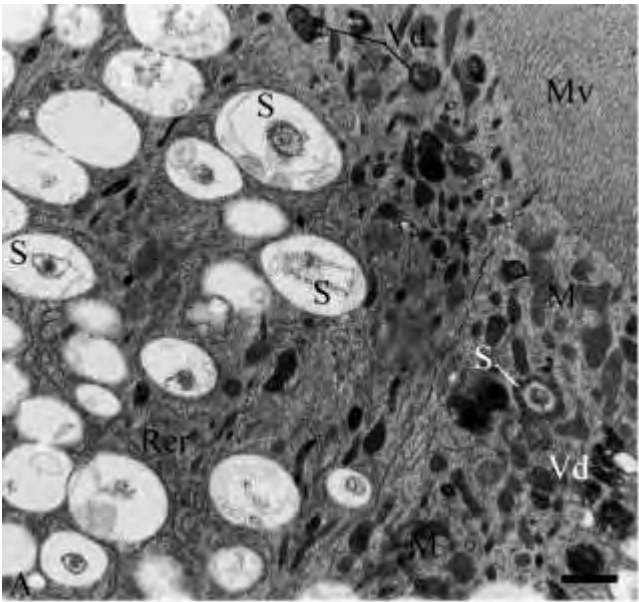


FIGURA 50

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDO DO TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM.

- A. Ápice da célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: microvilosidades (Mv) escassas e irregulares; microvesículas (→); vacúolos elétron-lucentes (V); mitocôndrias edemaciadas (*); grânulos densos (Gd). Barra = 1 μ m.
- B. Citoplasma apical de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: microvilosidades (Mv) dilatadas com vacúolos na extremidade (►) acarretando posterior liberação de microvesículas; mitocôndrias (M) menos elétron-densas; grânulos densos (Gd); vacúolos elétron-lucentes (V); vacúolo autofágico (Va). Barra = 1 μ m.
- C. Ápice de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 2%: microvilosidades (Mv) dilatadas, com liberação de microvesículas (→); lise (*); gota lipídica (Li); mitocôndrias (M) levemente alteradas; depósito de glicogênio (G); esferitos (S); grânulos densos (Gd). Barra = 2 μ m.
- D. Detalhe de junção entre células colunares na região apical do citoplasma, em adulto obtido do tratamento a 0,5%: aparecimento de espaços intercelulares (►); mitocôndrias edemaciadas (*) com alterações nas cristas mitocondriais; cisternas do retículo endoplasmático rugoso levemente dilatadas e fragmentadas (Rer). Barra = 0,25 μ m.
- E – F. Detalhe da região média das células colunares em adultos obtidos dos tratamentos a 0,5% e 2% respectivamente: formação de espaços intercelulares (►); espaços intercelulares (Is); mitocôndrias edemaciadas (*); retículo endoplasmático rugoso dilatado (Rer); gota lipídica (Li); esferitos (S); núcleo (N); mitocôndrias normais (M). Barras: E = 1 μ m; F = 2 μ m.

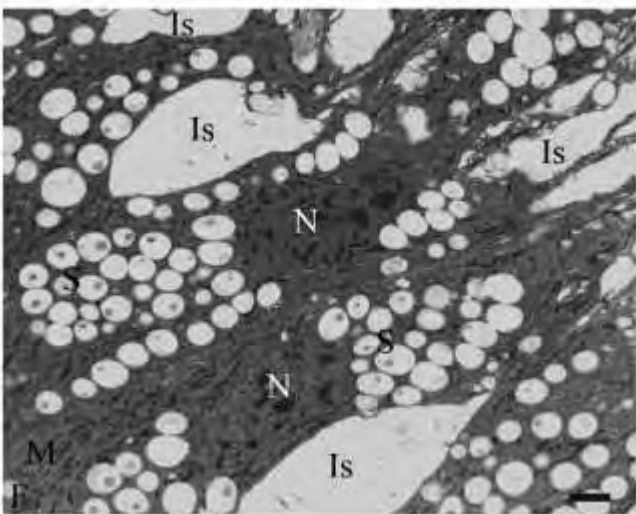
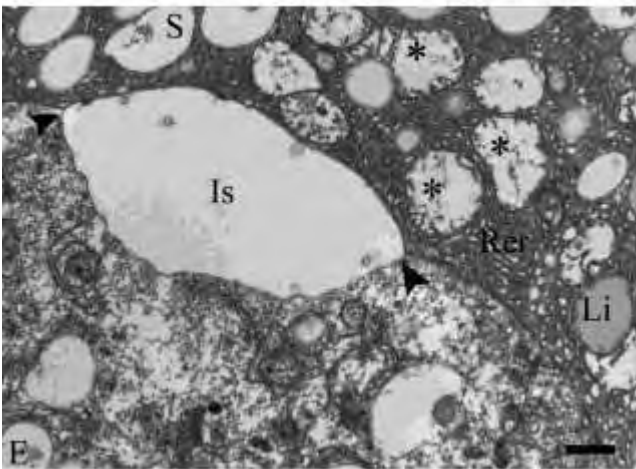
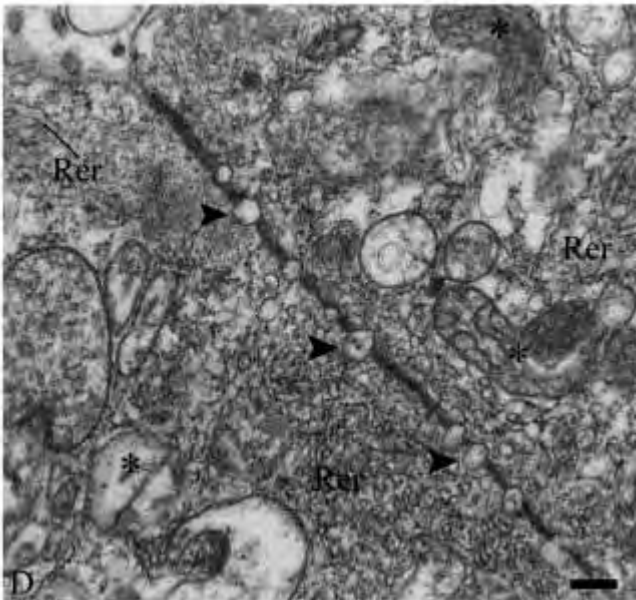
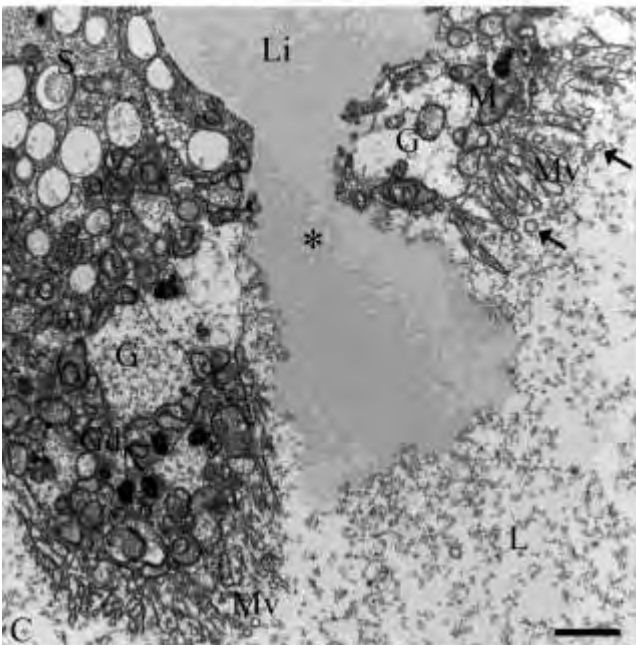
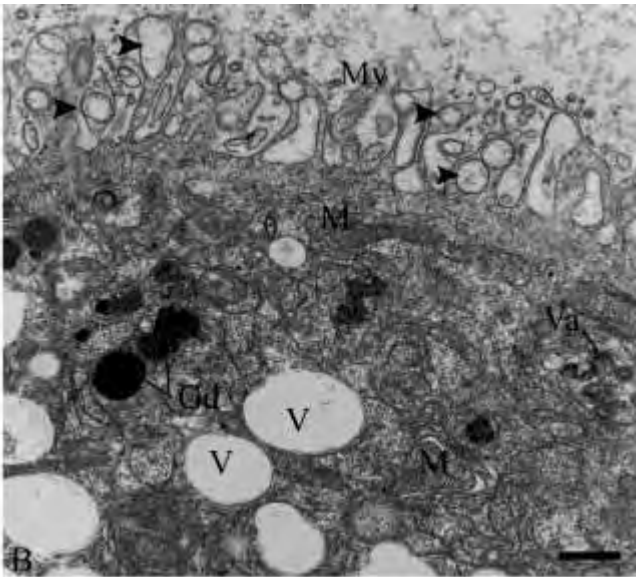
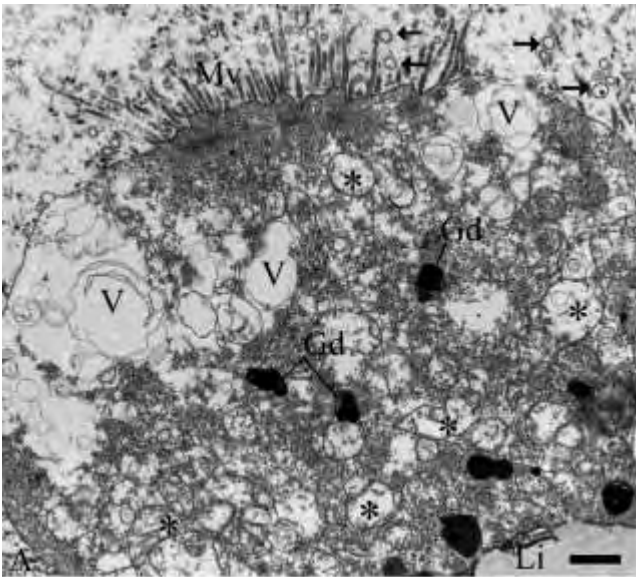


FIGURA 51**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO MÉDIA DO INTESTINO MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDO DO TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM.**

- A. Detalhe do citoplasma supranuclear de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas (Rer); vacúolos eletrôn-lucentes (V). Barra = 0,5 μm .
- B. Base de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: estreitas invaginações do labirinto basal (Lb) associadas a mitocôndrias edemaciadas (*) e a retículo endoplasmático rugoso dilatado (Rer); membrana basal (B). Barra = 0,5 μm .
- C – D. Detalhe do citoplasma de células regenerativas de adultos resultantes do tratamento de larvas com óleo de nim a 0,5% e 1% respectivamente: cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas (Rer); retículo endoplasmático liso (Rel) desenvolvido; mitocôndrias edemaciadas (*); mitocôndria aparentemente normal (M); núcleo (N); gota lipídica (Li). Barras: C = 1 μm ; D = 0,5 μm .
- E. Detalhe de célula endócrina do tipo 1 de adulto obtido do tratamento a 0,5%: citoplasma rarefeito com grânulos sólidos eletrôn-densos (Gs); mitocôndria edemaciada (*); célula colunar (Co); membrana basal (B); esferito (S). Barra = 0,5 μm .
- F. Fibra muscular (Fm) de adulto obtido do tratamento a 0,5%: mitocôndrias edemaciadas (*); núcleo (N); membrana basal (B); labirinto basal (Lb). Barra = 0,5 μm .

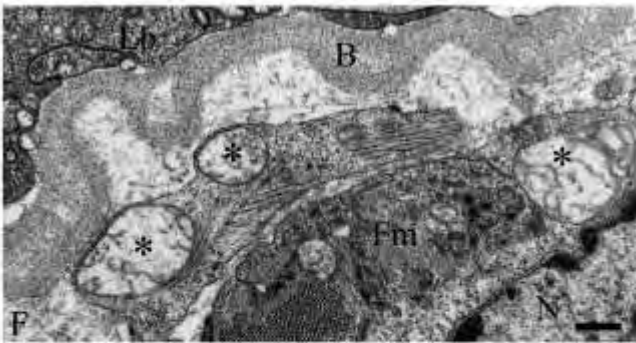
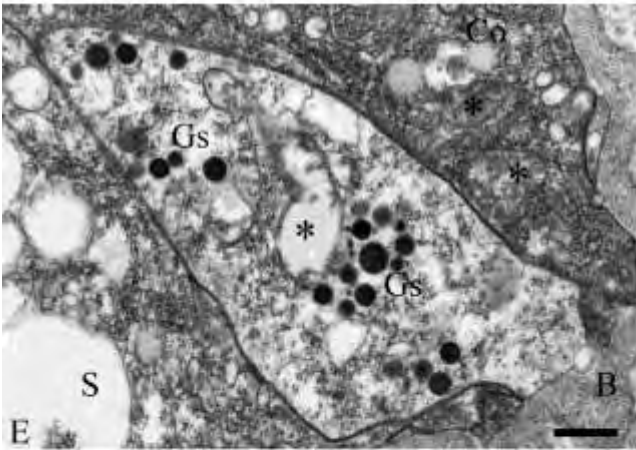
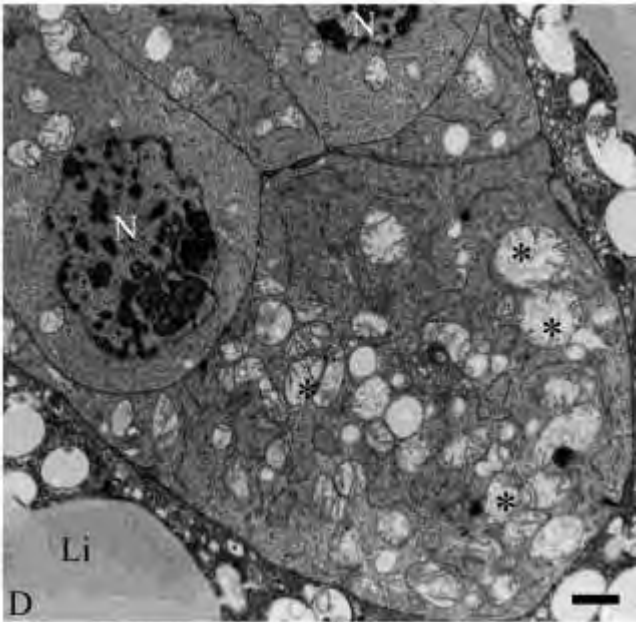
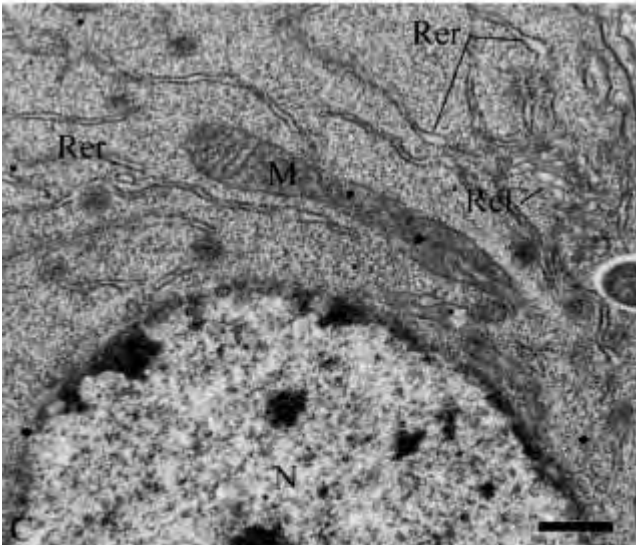
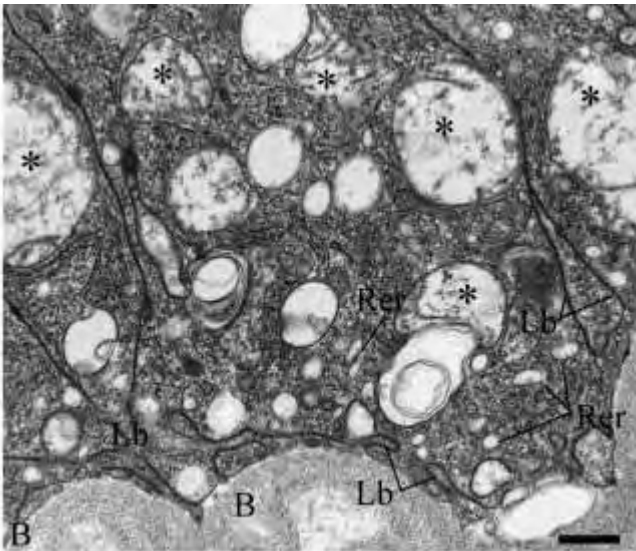
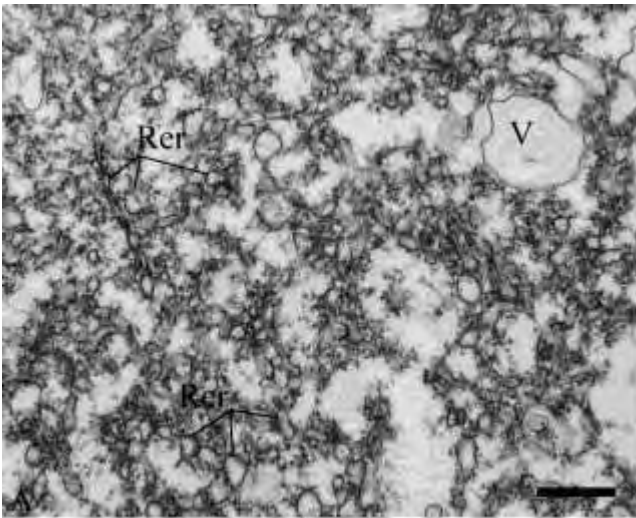


FIGURA 52**ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO CONTROLE DE *Ceraeochrysa claveri*.**

- A – B. Ápice de células colunares: microvilosidades (Mv) longas e regulares; mitocôndrias (M); vesículas de secreção (Vs); grânulos densos (Gd); retículo endoplasmático rugoso (Rer). Barras: A = 1 μm ; B = 0,5 μm .
- C. Citoplasma da região média de células colunares: predomínio de esferitos (S) com material floculado ou com única camada; fusão de membrana entre esferitos ($\rightarrow$); mitocôndrias (M); longas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Rer) entre os esferitos. Barra = 1 μm .
- D. Detalhe do citoplasma perinuclear de célula colunar: adundância de retículo endoplasmático rugoso (Rer); esferitos (S); mitocôndrias (M); complexo de Golgi (Cg). Barra = 0,5 μm .
- E. Base de célula colunar: estreitas invaginações do labirinto basal (Lb) associadas a mitocôndrias (M) e cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer); membrana basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 0,5 μm .
- F. Detalhe do citoplasma basal de célula endócrina do tipo 2 : predomínio de grânulos aureolados (Ga); cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias (M); núcleo (N); lâmina basal (B). Barra = 0,5 μm .

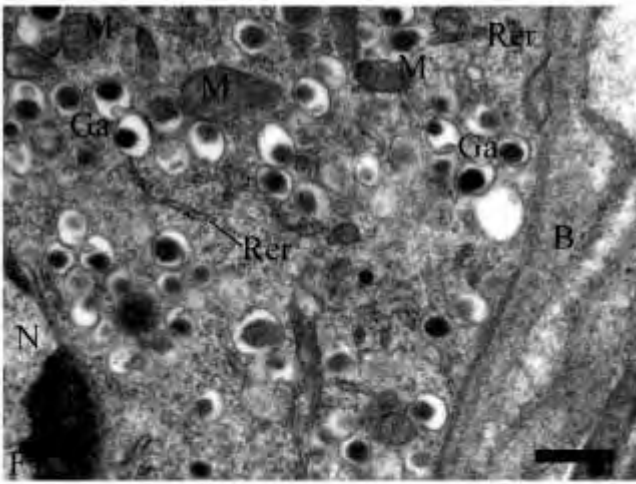
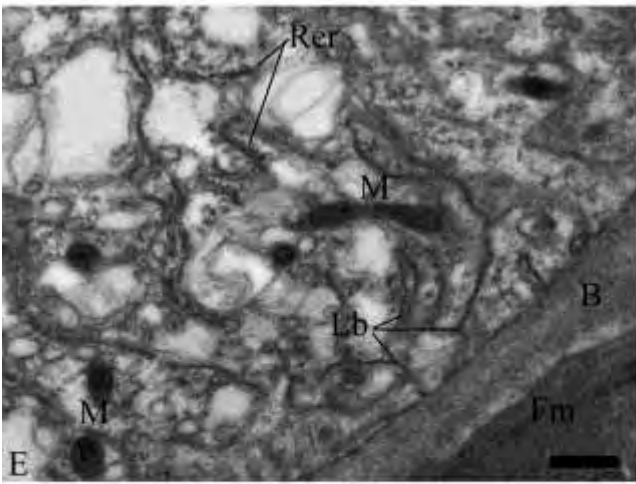
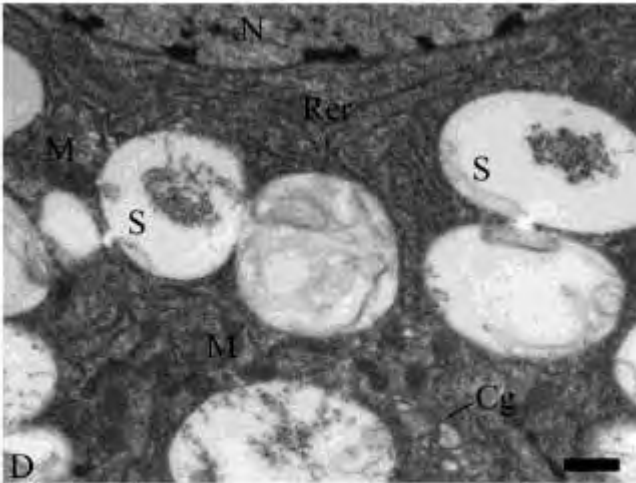
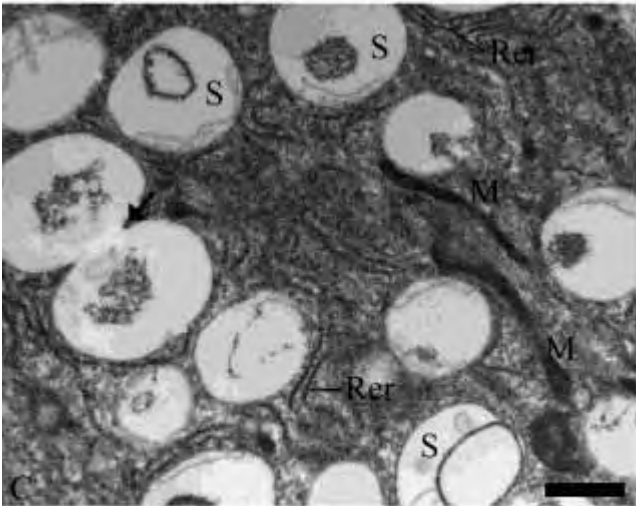
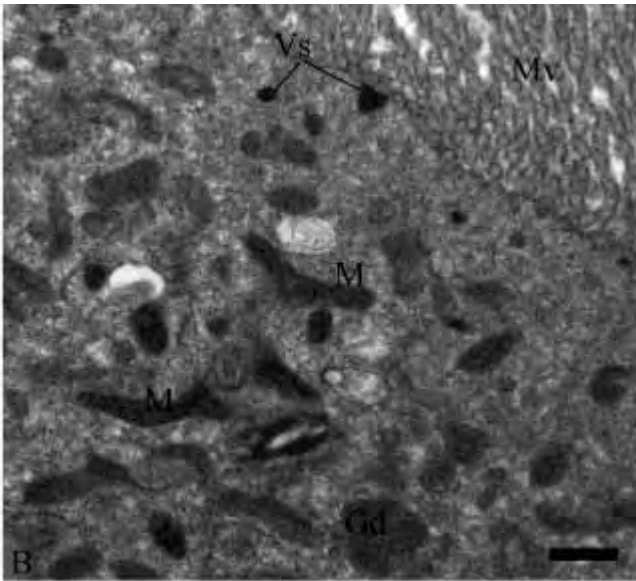
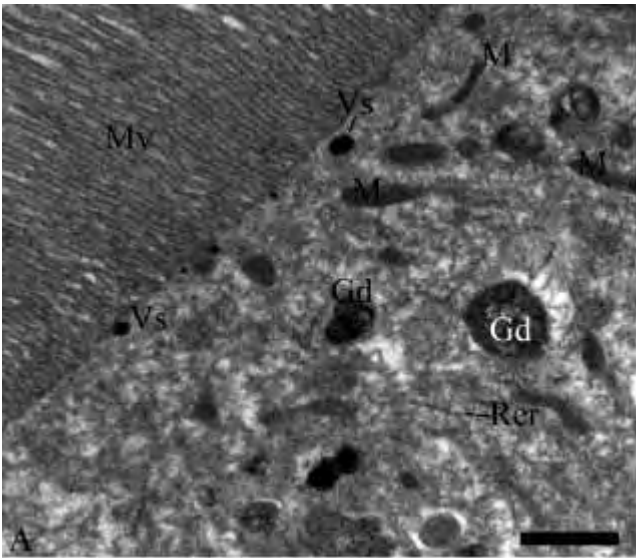


FIGURA 53

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDO DO
TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM.

- A. Ápice de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 0,5%: microvilosidades (Mv) dilatadas, com vacúolos no interior (►), ocasionando a liberação de microvesículas (→); grânulo denso (Gd); mitocôndria (M). Barra = 0,5 µm.
- B – C. Citoplasma apical de adulto obtido do tratamento a 1%: microvilosidades (Mv) com espessura irregular (→) ao longo do seu comprimento; mitocôndrias edemaciadas (*); grânulos densos (Gd); mitocôndrias normais (M); cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas (Rer). Barras: B = 1 µ; C = 0,25 µm.
- D. Detalhe de lise no ápice de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: eliminação de vacúolos elétron-lucentes (V); grânulos densos (Gd); microvilosidades (Mv); gota lipídica (Li). Barra = 1 µm.
- E. Ápice dilatado (→) e liberação de protusões citoplasmática (P) em células colunares de adulto obtido do tratamento a 1%. Microvilosidades (Mv); grânulos densos (Gd); gota lipídica (Li); esferitos (S); núcleo (N). Barra = 3 µm.
- F. Detalhe do citoplasma na região média do citoplasma de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: predomínio de cisternas dilatadas e fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso (Rer); mitocôndrias edemaciadas (*) e mitocôndrias aparentemente normais (M). Barra = 0,5 µm.

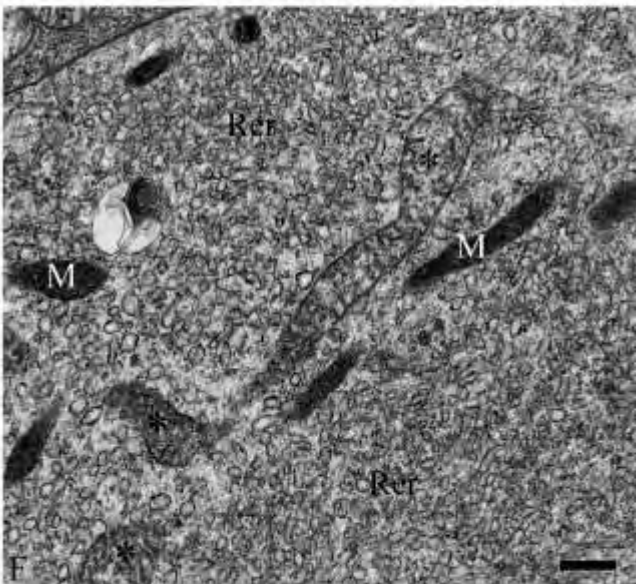
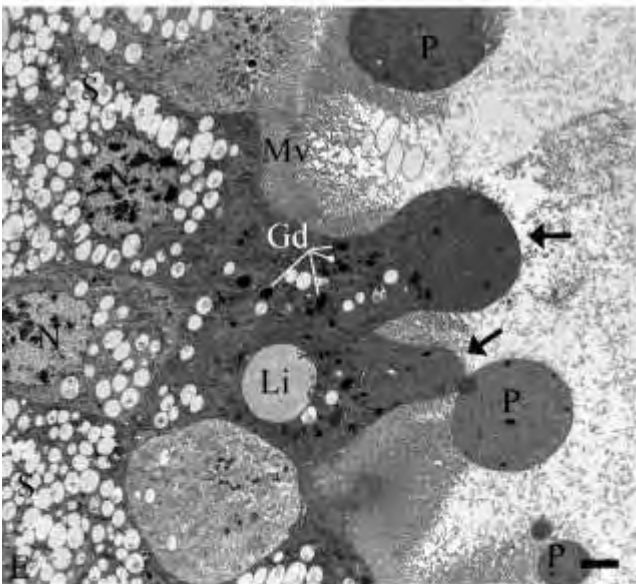
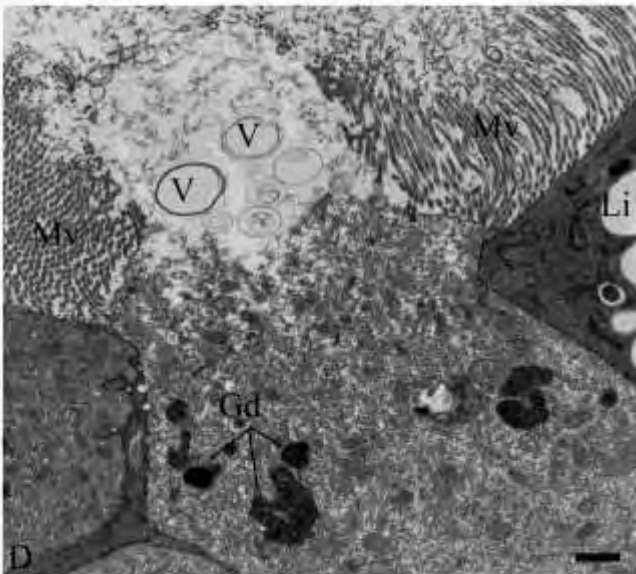
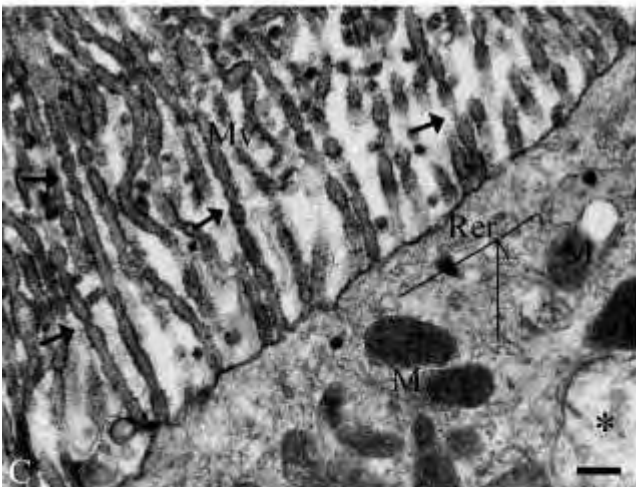
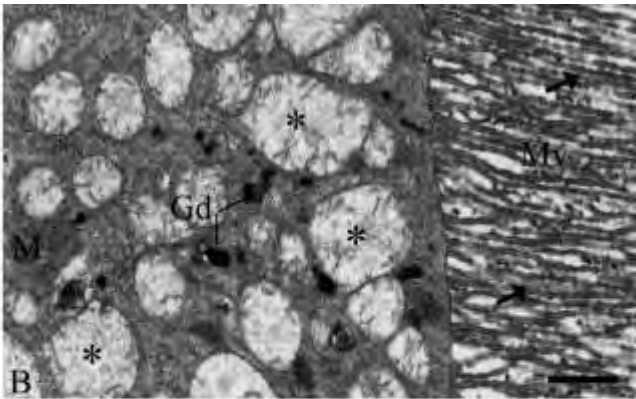
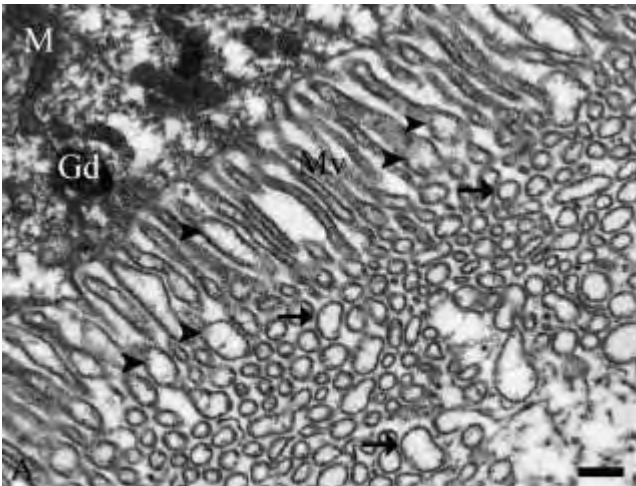
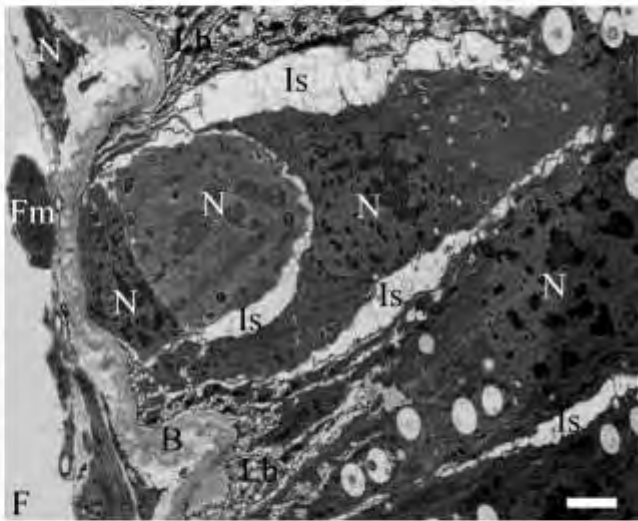
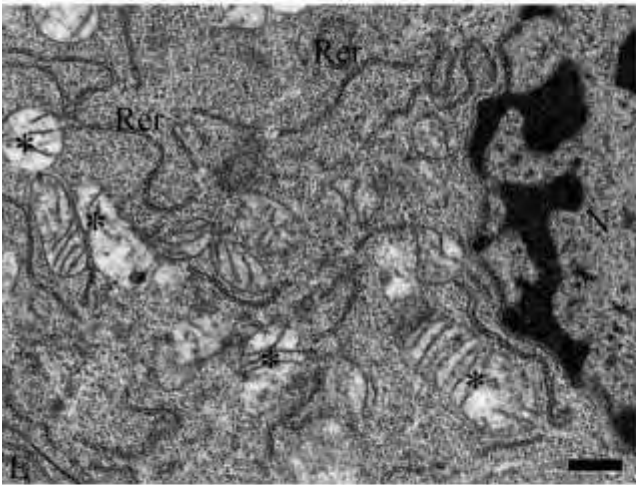
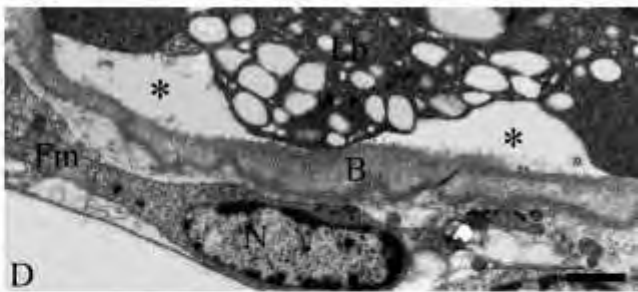
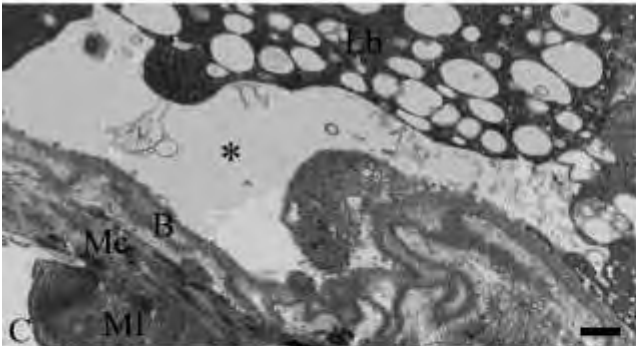
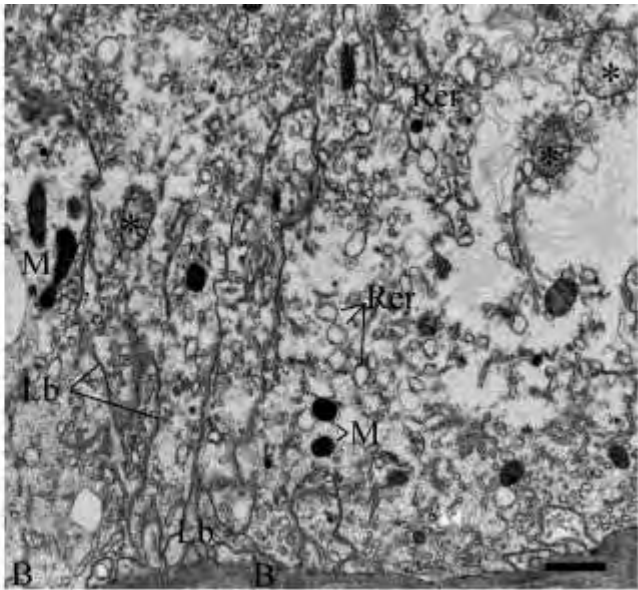
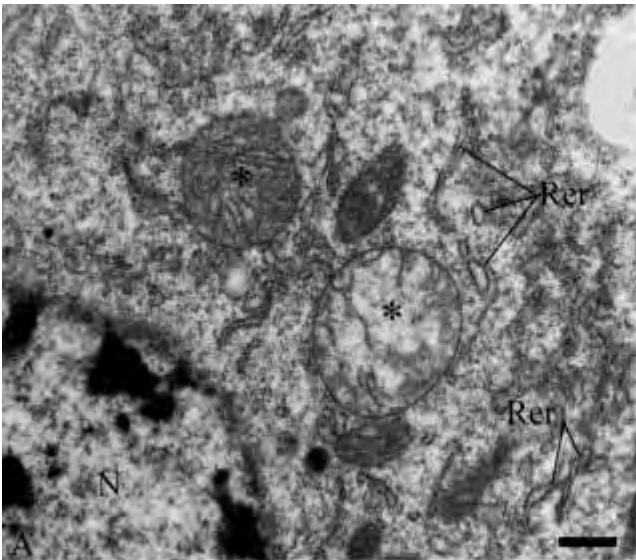


FIGURA 54

ELÉTRON-MICROGRAFIAS DA REGIÃO POSTERIOR DO INTESTINO
MÉDIO DE ADULTO DE *Ceraeochrysa claveri* OBTIDO DO
TRATAMENTO COM ÓLEO DE NIM.

- A. Detalhe de citoplasma perinuclear de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: cisternas dilatadas e fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso (Rer), mitocôndrias edemaciadas (*) e núcleo (N). Barra = 0,5 μm .
- B. Base de célula colunar de adulto obtido do tratamento a 1%: estreitas invaginações no labirinto basal (Lb), associadas a cisternas dilatadas e fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso (Rer) e a mitocôndrias normais (M) e edemaciadas (*); membrana basal (B). Barra = 1 μm .
- C – D. Desprendimento (*) da base de células colunares da membrana basal (B) em adultos obtidos do tratamento a 0,5%. Labirinto basal (Lb); feixe de músculo circular (Mc) e longitudinal (Ml); fibra muscular (Fm); núcleo (N). Barras = 1 μm .
- E. Detalhe do citoplasma perinuclear de célula regenerativa de adulto obtido do tratamento a 0,5%: longas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Rer) aparentemente normais; mitocôndrias edemaciadas (*); núcleo (N). Barra = 0,5 μm .
- F. Presença de espaços intercelulares (Is) entre células colunares e regenerativas de adulto obtido do tratamento a 2%. Labirinto basal (Lb); núcleo (N); lâmina basal (B); fibra muscular (Fm). Barra = 2 μm .



5. *DISCUSSÃO*

Histologicamente o intestino médio de *C. claveri* apresenta parede formada por um epitélio pseudoestratificado, que repousa sobre uma lâmina basal seguida de fibras musculares circulares internas e longitudinais externas.

Levy *et al.* (2004) caracterizaram a ocorrência de um epitélio pseudoestratificado em *A. gemmatalis*; assim como Hakim, Baldwin e Loeb (2001) em *Manduca sexta* e *Heliothis virescens*. Na grande maioria dos insetos o epitélio é descrito sendo do tipo simples, como observado por Fialho *et al.* (2009) em *B. tabidus*; Sousa *et al.* (2009) para *Alabama argillacea*; Okuda *et al.* (2007) em *Culex quinquefasciatus*; Martins *et al.* (2006) para *Melipona quadrifasciata anthidioides*; Wanderley-Teixeira *et al.* (2006) em *Tropidacris collaris*; Evangelista e Leite (2003) em *Dermatobia hominis*. As características morfológicas das células que compõe o epitélio intestinal de *C. claveri*, caracteriza um epitélio pseudoestratificado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), o qual apresenta células que têm contato com a lâmina basal, porém não atingem a superfície do epitélio.

As células colunares, também descritas como células digestivas, principais ou enterócitos, apresentaram características morfológicas de células absorptivas que incluem microvilosidades na região apical, grânulos citoplasmáticos e invaginações no labirinto basal. São as células mais numerosas no epitélio, com citoplasma basófilo e borda estriada acidófila (LEVY *et al.*, 2004; OKUDA *et al.*, 2007; FIALHO *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2009). Apesar destas características comuns, a morfologia e ultraestrutura das células colunares de *C. claveri* apresentaram diferenças entre as regiões anterior, média e posterior do intestino médio como também foi relatado em adulto de *C. erythrocephala* por De Priester (1971), em larva de *Rhynchosciara americana* por Ferreira, Ribeiro e Terra (1981), em larva de *D. saccharalis* por Pinheiro *et al.* (2008a) e em adulto de *B. tabidus* por Fialho *et al.* (2009).

Na fase de larva de *C. claveri* verificamos variações ultraestruturais relacionadas com as diferentes regiões do intestino médio. A região anterior caracterizou-se por ser a principal área de liberação de protusões citoplasmáticas e por apresentar longas microvilosidades, exercendo função de secreção e de absorção. O citoplasma supranuclear apresentou abundante retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, possivelmente envolvidos na síntese protéica para a secreção de enzimas. Depósitos de glicogênio e gotas lipídicas também ocorreram nesta região, indicando ser uma área de absorção e metabolismo de carboidratos e lipídios (LEVY *et al.*, 2004; FIALHO *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010). Com relação às

estreitas invaginações do labirinto basal associadas a mitocôndrias, que se estendem pelo citosol, esta indica ser uma área de absorção, tendo como finalidade concentrar solutos, criando um gradiente osmótico que facilitaria a absorção de água, absorção que deve ser baixa, por ocorrer escassos esferitos no citoplasma das células colunares nesta região (FERREIRA; RIBEIRO; TERRA, 1981; TERRA; COSTA; FERREIRA, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2009).

Na região média constatamos menor liberação de protusões citoplasmáticas, assim como ocorrência de microvilosidades de comprimento intermediário, maiores quantidades de vacúolos digestivos, autofágicos e esferitos, aumentando em direção a região posterior, caracterizando uma área de absorção e digestão. Esta região mostra-se como uma área de transição entre a região anterior e posterior, por apresentar características intermediárias entre as duas regiões. Na região posterior, a superfície das células colunares é mais regular, com curtas microvilosidades e eliminam pequenas protusões citoplasmáticas. Verificou-se abundância de vacúolos digestivos e corpos multivesiculares no citoplasma, além de grandes quantidades de glicogênio, esferitos e de volumosas gotas lipídicas, caracterizando uma área de intensa absorção e digestão de carboidratos, lipídios, água e íons, com labirinto basal dilatado e associado a mitocôndrias, gotas lipídicas e glicogênio.

Cioffi (1979) em larva de *Manduca sexta* também observou intenso processo de secreção na região anterior do mesêntero, o qual foi diminuindo em direção a região posterior; labirinto basal era estreito e associado com mitocôndrias enquanto que na região posterior estava associado a mitocôndrias, glicogênio, complexo de Golgi e lipídios. De Priester (1971) e Ferreira, Ribeiro e Terra (1981) constataram grande acúmulo de gotas lipídicas na região média e posterior do intestino médio de *C. erythrocephala* e *R. americana* respectivamente, semelhante a fase larval de *C. claveri*, o que pode atuar como reserva temporária para ser utilizada durante os períodos de falta de presa. A grande quantidade de lipídio armazenado no intestino médio, principalmente da região média e posterior pode também estar relacionado com o tipo de dieta ingerida na fase de larva, no caso ovos de *D. saccharalis*, fonte rica em lipídios (ARRESE *et al.*, 2001; ATELLA *et al.*, 2005; FRUTTERO *et al.*, 2011).

Apesar da região média e posterior apresentar labirinto basal mais dilatado que na região anterior, o que segundo Ferreira, Ribeiro e Terra (1981) caracterizaria uma região de secreção, a riqueza de mitocôndrias, vacúolos digestivos e autofágicos no citoplasma apical, além de glicogênio, gotas lipídicas, esferitos, desenvolvido retículo

endoplasmático rugoso e complexo de Golgi indica ser uma área de absorção e digestão. Para De Priester (1971) o grau de dilatação do espaço extracelular no labirinto basal estaria relacionado com o estado nutricional, expandindo durante períodos de jejum. Para Houck e Hardy (1982) o aumento da superfície do labirinto basal na dilatação poderia indicar um reforço na função de transporte de água após a ingestão de alimento por *Culex tarsalis* para ser excretada via túbulos de Malpighi. Notamos existir uma falta de concordância entre autores com relação às diferenças do labirinto basal, por isto caracterizamos a região anterior como sendo principalmente secretora e a região média e posterior absorptiva e digestiva. Não podemos esquecer que as células colunares apresentam-se como células polifuncionais, entretanto as observações ultraestruturais destas células para as regiões anterior, média e posterior um apontam um papel diferenciado para elas.

Células colunares na fase de pupa apresentaram apenas morfologia e distribuição de microvilosidades diferenciada ao longo do mesêntero, seguindo características da fase larval, com células mais abauladas na região anterior, tornando-se mais achatadas e justapostas em direção a região posterior; assim como a distribuição de microvilosidades, sendo estas mais proeminentes e levemente maiores na região anterior. Pequenas protusões citoplasmáticas também foram registradas nas três regiões avaliadas do mesêntero.

Na avaliação ultraestrutural, as células colunares ocorreram de modo muito semelhante nas três regiões do intestino médio, apresentando citoplasma rarefeito, com predomínio de mitocôndrias, depósitos de glicogênio, grânulos elétron-densos, corpos multivesiculares, vacúolos elétron-lucentes e fragmentos de retículo endoplasmático rugoso. O labirinto basal mostrou-se dilatado e associado a poucas mitocôndrias e vacúolos elétron-lucentes. Descrição semelhante foi realizada por Cruz-Landim e Cavalcante (2003) em pupa de *Apis mellifera* os quais descreveram um epitélio mais achatado, vacuolizado, citoplasma apical com muitos ribossomos livres, fragmentos de retículo endoplasmático rugoso, depósitos de lipídios e grânulos elétron-densos. Tettamanti *et al.* (2007) também constataram morfologia e ultraestrutura semelhante em *H. virescens* já no epitélio pré-pupal, com grânulos densos, além de depósitos de glicogênio e de gotas lipídicas, indicando que o epitélio pupal é funcional por apresentar muitas características como microvilosidades e expressão de enzimas que atuam no processo absorptivo e digestivo.

Na fase de adulto as células colunares apresentaram formato cilíndrico, com superfície abaulada e justaposta com longas microvilosidades proeminentes. Ultraestruturalmente notamos maiores quantidades de protusões citoplasmáticas e microvesículas sendo liberadas na região anterior do intestino médio, enquanto que vacúolos digestivos e esferitos predominaram na região média e posterior. Nas três regiões observamos mitocôndrias no citoplasma apical, desenvolvido retículo endoplasmático rugoso, complexos de Golgi e estreitas invaginações do labirinto basal, as quais se mostraram mais intensas e longas na região anterior do mesêntero. Podemos inferir que a região anterior teria como função principal a secreção, enquanto que a região média e posterior função absorviva e digestiva, semelhante à fase de larva.

Woolfolk, Cohen e Inglis (2004) encontraram nas células colunares do intestino médio de adulto de *Chrysoperla rufilabris* características semelhantes às observadas em *C. claveri*, como conspícuas microvilosidades, numerosas mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, indicando alta atividade metabólica. Esferitos também foram relatados na região posterior do intestino médio, podendo esta ser uma característica presente na família Chrysopidae.

Esferitos consistem em grânulos citoplasmáticos esféricos envoltos por membrana, cujo conteúdo principalmente de origem mineral é depositado em camadas concêntricas, comumente relatadas em células colunares e regenerativas no intestino médio de insetos (TURBECK, 1974; WAKU; SUMIMOTO, 1974; WOOLFOLK; COHEN; INGLIS, 2004; ROST-ROSZKOWSKA; POPRAWA; SWIATEK, 2007; TETTAMANTI *et al.*, 2007; PINHEIRO; CONTE; GREGORIO, 2008b; FIALHO *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010). Sua composição química varia nos invertebrados, sendo frequentemente encontrado compostos inorgânicos como cálcio, fósforo, magnésio e silício (TURBECK, 1974; WAKU; SUMIMOTO, 1974; LIPOVSEK *et al.*, 2002; FONTANETTI; TIRITAN; CAMARGO-MATHIAS, 2006) e compostos orgânicos como polissacarídeos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (LIPOVSEK *et al.*, 2002).

Tanto para a fase de larva quanto para fase de adulto observamos os esferitos preferencialmente no citoplasma supranuclear e perinuclear de células colunares, localizadas principalmente da região média e posterior do intestino médio de *C. claveri*. Turbeck (1974) constatou esferitos preferencialmente no citoplasma apical de células colunares e regenerativas para sete espécies de larvas da ordem Lepidoptera. O mesmo foi descrito por Rost-roszkowska, Poprawa e Swiatek (2007) para células colunares da

larva de *Allacma fusca* onde também ocorrem esferitos na região perinuclear. Entretanto Pinheiro, Conte e Gregório (2008b) não constataram localização preferencial de esferitos nas células colunares ou mesmo nas regiões do intestino médio de larva de *D. saccharalis*.

Acreditamos que a presença preferencial de esferitos na região média e posterior do intestino médio de *C. claveri* esteja associada com absorção e armazenamento de íons nestas regiões, assim como observado em *B. tabidus* por Fialho *et al.* (2009), em *C. hemipterus* por Azevedo *et al.* (2009) e em *T. vitticeps* por Rocha *et al.* (2010), os quais descreveram esferitos na região anterior do intestino médio, sugerindo função de transporte e armazenamento de íons e água nesta região.

Protusões citoplasmáticas variaram ao longo do intestino médio, diminuindo em número e tamanho em direção a região posterior do intestino para as três fases do ciclo de vida de *C. claveri*. Para De Priester (1971) protusões estão principalmente relacionadas com processos de degeneração, servindo para eliminação de componentes celulares degenerados, sendo este processo esperado em condições fisiologicamente desfavoráveis, como jejum prolongado. Khan e Ford (1962) avaliando a atividade enzimática do intestino médio de *Dysdercus fasciatus* com a produção de protusões citoplasmáticas não observaram nenhuma relação, concluindo que protusões citoplasmáticas representariam uma degeneração normal no epitélio provocada pela privação de alimento, não levando a um imediato colapso das células epiteliais.

Jaral (2005) observou em *Cenocorixa bifida* a ocorrência de exocitose de grânulos de secreção, assim como a presença de protusões citoplasmáticas no processo de secreção enzimática e de degeneração celular. Algo semelhante também constatado por Cristofolletti, Ribeiro e Terra (2001) no intestino médio de larva de *Tenebrio molitor*, onde presença de protusões em células colunares na região anterior do intestino médio seriam responsáveis pela secreção de amilase, um tipo de secreção apócrina. Amilase foi detectada próximo ao complexo de Golgi, em grandes vesículas de secreção próximas ao ápice celular e nas protusões citoplasmáticas. Já tripsina foi observada em pequenas vesículas próximas ao ápice celular de células da região posterior do intestino, sugerindo processo de secreção por exocitose.

Para Cruz-Landim, Serrão e Silva-de-Moraes (1996) protusões citoplasmáticas e microvilosidades dilatadas com conteúdo elétron-lucente foram positivas para fosfatases ácidas, caracterizando um processo de secreção enzimática para o lúmen intestinal. A secreção apócrina pode ser vista como uma resposta após hipertrofia do epitélio causada

pela infecção de *Bacillus sphaericus* em células epiteliais do intestino médio de larvas de *A. aegypti*, *Anopheles albitarsis* e *Culex quinquefasciatus*, sendo mais intensas nas espécies mais resistentes, podendo atuar como um mecanismo de defesa para o inseto (OLIVEIRA; TADEI; ABDALLA, 2009).

Em nossas observações acreditamos que tanto a secreção do tipo apócrina, microapócrina e por exocitose devem ocorrer normalmente em *C. claveri*. Também notamos expressivo aumento na formação de liberação de protusões citoplasmáticas nos tratamentos com óleo de nim, podendo ser um resposta a dilatação do ápice das células colunares afetadas.

Secreção microapócrina observada em Lepidoptera (LEVY, 2005; TERRA; COSTA; FERREIRA, 2006) também foi constatada na fase adulta de *C. claveri*. Segundo Terra, Costa e Ferreira (2006) pequenas vesículas migrariam para o interior das microvilosidades, onde elas fusionariam com a membrana das mesmas, sendo seu conteúdo liberado para o lúmen, ou liberado em vesículas de dupla membrana. Notamos que a liberação de microvesículas foi mais intensa nos tratamentos com óleo de nim nas fases de larva e adulto, principalmente na região média e posterior do intestino médio de *C. claveri*.

Células colunares apresentaram diminuição no número de protusões citoplasmáticas e na quantidade de grânulos PAS – positivo da região anterior em direção a região posterior em larvas e pupas controle. Para adultos controle, a região média no intestino médio foi a que apresentou maiores quantidades de grânulos PAS – positivo. Essa grande quantidade de material PAS – positivo no citoplasma das células colunares também foi observado no intestino médio de *Dermatobia hominis* (LELLO; VIEIRA, 2001) e em *D. saccharalis* (PINHEIRO *et al.*, 2008). Pinheiro *et al.* (2008) observaram em *D. saccharalis* o oposto a *C. claveri*, havendo aumento de protusões e grânulos PAS – positivo em direção à região posterior do intestino médio.

Material PAS – positivo pode representar depósitos de glicogênio e/ou grânulos de secreção contendo polissacarídeos neutros. Grânulos de glicogênio em células digestivas em todas as regiões do intestino médio de *B. tabidus* foram relatados por Fialho *et al.* (2009), podendo indicar que essas regiões estocam açúcares em nível intracelular, proporcionando energia necessária para as células epiteliais realizarem diferentes atividades metabólicas.

Insetos predadores não têm alimento amplamente disponível como os fitófagos, por isto, necessitam de síntese rápida de enzimas digestivas ao se alimentarem, o que

demanda gasto de energia que pode ser, rapidamente obtida a partir de reservas de glicogênio. Reservas de glicogênio estão freqüentemente associadas à intensa atividade de absorção das células digestivas. Isto pode ocorrer, também, para *C. claveri*, pois esse predador apresenta digestão extra-oral e alguns nutrientes podem ser absorvidos sem digestão adicional no intestino médio semelhante a *B. tabidus* (FIALHO *et al.*, 2009; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996).

Em nossas análises ultraestruturais observamos a presença de bactérias endossimbiontes intracelulares nos três tipos celulares que compõem o epitélio do intestino médio nas três fases do ciclo de vida de *C. claveri*, e apenas bactérias intranucleares em células colunares na fase de larva. Pelas características ultraestruturais destas bactérias, acreditamos que sejam bactérias gram-negativas, por apresentarem parede celular composta por membrana externa que recobre uma fina camada de peptidoglicano sobre a membrana plasmática e por serem bacilos não esporulados, ou seja, não apresentam endósporos. Bution e Caetano (2010) e Arneodo *et al.* (2008) relataram a ocorrência de bactérias simbiotes gram-negativas no lúmen e intranuclear respectivamente. Segundo Bution e Caetano (2010) a presença de envelope duplo típico de bactéria gram-negativa torna este tipo de bactéria resistente a ação enzimática presente no lúmen do intestino médio, permitindo sua presença nesta região do sistema digestório.

Densa população de bactérias no lúmen do intestino médio do crisopídeo *C. carnea* na fase larval foi descrita como possíveis bactérias simbióticas, que poderiam atuar na decomposição de resíduos que permanecem no lúmen do intestino (CHEN *et al.*, 2006), assim como a presença de leveduras simbiotes em adultos de *C. rufilabris* e *C. carnea* respectivamente (WOOLFOLK; INGLIS, 2004; CHEN *et al.*, 2006). Bactérias simbióticas podem estar presentes no interior de células especializadas denominadas de micetócitos ou bacteriócitos ou presentes no interior de todos os tipos de células do inseto hospedeiro, sendo este último denominado de “*guest microbes*” (ISHIKAWA, 2003). Segundo Douglas e Beard (1996) simbiose microbiana no intestino médio dos insetos pode ser classificada pela localização em três grandes grupos: no lúmen do intestino médio, em células epiteliais e nos cecos gástricos.

Bactérias endossimbiontes, ou simbiotes intracelulares foram denominados por Caetano, Bution e Zara (2009) como endocitobiontes, por ocorrem dentro de células digestivas do mesêntero de *Odontomachus bauri*. Segundo os autores, o papel deste endocitobiontes no ciclo de vida do inseto pode apresentar grande variabilidade,

podendo participar da digestão de alimentos, atuando como organismos simbiotes e também pode representar uma nova possibilidade de explorar os recursos alimentares do ambiente. Atualmente é amplamente aceito que os endossimbiontes desempenham importantes papéis na nutrição dos insetos hospedeiros, podendo contribuir na digestão, produção de vitaminas essenciais e impedir a entrada de microorganismos potencialmente prejudiciais (DOUGLAS; BEARD, 1996; ISHIKAWA, 2003; DILLON; DILLON, 2004).

Acreditamos que devido ao fato de termos constatado estes endocitobiontes nos indivíduos amostrados nas três fases do ciclo de vida de *C. claveri*, estes não seriam apenas bactérias transitórias, mas sim bactérias intracelulares simbiotes.

A análise histológica e ultraestrutural das células regenerativas permitiu observar sua ocorrência na região basal do epitélio do intestino médio de *C. claveri*, ocorrendo de forma isolada, em pares ou grupos, denominados de nidi (ninhos). Estas células apresentaram formato oval a esférico, com citoplasma fortemente basófilo, semelhante ao descrito por Levy *et al.* (2004) em *A. gemmatilis*, por Wanderley-Teixeira *et al.* (2006) em *T. collaris*. Na análise ultraestrutural caracterizamos estas células por sua localização preferencialmente basal e presença de poucas organelas, como escassas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, esporádicas mitocôndrias e complexos de Golgi, predomínio de ribossomos livres e volumosos núcleos, características semelhantes às descritas por De Priester, 1971; Turbeck, 1974; Baldwin e Hakim, 1991; Levy *et al.*, 2004; Rost, 2006; Okuda *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2010).

Não constamos diferenças no número de células regenerativas ao longo do intestino médio nas três fases de vida de *C. claveri*, apenas a ocorrência de grupos com maiores números de células na fase de adulto; diferentemente de De Priester (1971) que em *Calliphora erythrocephala* notou distribuição desigual ao longo do intestino médio. Células regenerativas possuem a habilidade de se diferenciarem em células colunares e endócrinas, tendo como função o crescimento, regeneração e substituição das células do epitélio intestinal (O'BRIEN, 1966; RAES *et al.*, 1994; LELLO; VIEIRA, 2001; EVANGELISTA *et al.*, 2003; UWO; UI-TEI; TAKEDA, 2002; JARIAL, 2005; ROST, 2006; WANDERLEY-TEIXEIRA *et al.*, 2006; TETTAMANTI *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2009; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

Aparentemente o epitélio larval de *C. claveri* é trocado inteiramente apenas na metamorfose, devido à proliferação e diferenciação das células regenerativas. No quinto

dia de pupação o antigo epitélio larval, com núcleos densos e irregulares, ainda está presente na cavidade intestinal, onde sofre histólise por processos apoptóticos e autofágicos, permitindo a recaptura de nutrientes que estavam nele armazenados por atividade enzimática do novo epitélio pupal (UWO; UI-TEI; TAKEDA, 2002; TETTAMANTI *et al.*, 2007; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010). O epitélio pupal que delimita a cavidade intestinal em *D. hominis* (LELLO; VIEIRA, 2001) também apresentou pequenos vacúolos e grânulos PAS – positivo, semelhante ao observado em pupas de *C. claveri*.

Células endócrinas, tipo celular menos observado nas análises, já foram descritas no epitélio intestinal de várias espécies de insetos como *C. erythrocephala* (DE PRIESTER, 1971); *Aedes aegypti* (BROW; RAIKHEL; LEA, 1985); *Apis mellifera* (RAES; VERBEKE, 1994); *Agrotis segetum* (GÜL *et al.*, 2001); *Lutzomyia longipalpis* (LEITE; EVANGELISTA, 2001); *A. gemmatalis* (LEVY *et al.*, 2004); *Spodoptera exigua* (ROST-ROSZKOWSKA *et al.*, 2008); *Alabama argillacea* (SOUSA *et al.*, 2008); *Cimex hemipterus* (AZEVEDO *et al.*, 2009).

Como característica ultraestrutural comum a este tipo celular, são células distribuídas basalmente e de forma isolada no epitélio, entre células colunares e regenerativas, possuem formato triangular, piramidal ou cônico; membrana basal com pouco ou ausência de labirinto basal; citoplasma pobre em organelas com ribossomos livres e escassas mitocôndrias, entretanto com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. Predominam no citoplasma numerosos grânulos secretores, de diferentes elétrons densidades, preferencialmente na região basal e basolateral das células endócrinas, possivelmente produtos de secreção do complexo de Golgi (DE PRIESTER, 1971; BROW; RAIKHEL; LEA, 1985; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; GÜL *et al.*, 2001; LEVY *et al.*, 2004; ROST-ROSZKOWSKA *et al.*, 2008).

Constatamos dois tipos de células endócrinas com base na morfologia de seus grânulos citoplasmáticos. O tipo mais freqüente (tipo 1) apresentou grânulos sólidos elétron-densos, homogêneos. Já o tipo 2 apresentou grânulos aureolados, com halo entre a membrana e a matriz densa do grânulo. Brow, Raikhel e Lea (1985) assim como Levy *et al.* (2004) descrevem a ocorrência destes dois tipos de grânulos, sendo que, cada célula apresenta apenas um tipo de grânulo.

Células endócrinas também podem ser classificadas em: abertas, as quais se estendem até o lúmen, apresentando microvilosidades apicais; e o tipo fechado, células

limitadas pelas células colunares, que não entram em contato com o lúmen. (BROW; RAIKHEL; LEA, 1985; BILLINGSLEY, 1990; RAES; VERBEKE, 1994; LEITE; EVANGELISTA, 2001). Em nossas observações somente observamos a presença de células endócrinas do tipo fechado, isto é, que não atingem a superfície luminal do intestino médio.

Grânulos citoplasmáticos das células endócrinas seriam secretados por exocitose ao longo da membrana basal e basolateral para hemocele (BROW; RAIKHEL; LEA, 1985; BILLINGSLEY, 1990; RAES; VERBEKE, 1994). O processo de secreção das células endócrinas pode ser mediado pela dieta do inseto. Células endócrinas do tipo aberto, que estão em contato com o lúmen, podem ser especializadas na recepção de sinais moleculares do alimento ingerido pelo inseto (BROW; RAIKHEL; LEA, 1985). Células endócrinas teriam função similar as células neurosecretoras encontradas no canal alimentar dos vertebrados, atuando na síntese e secreção de hormônios polipeptídeos, os quais atuariam no controle da diferenciação das células regenerativas, produção de enzimas digestivas pelas células colunares, bem como nos efeitos da atividade de tecidos mais distantes como no sistema nervoso central e tecido gorduroso (BROW; RAIKHEL; LEA, 1985; ROSZKOWSKA *et al.*, 2008; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; SHENAL; ZITNAN, 1996).

Não notamos variações ultraestruturais ou na ocorrência de células endócrinas ao longo do intestino médio, diferentemente de Brow, Raikhel e Lea (1985) que encontraram em *A. aegypti* distribuição específica das células endócrinas ao longo do comprimento do mesêntero. Variações na elétron densidade dos grânulos secretores podem indicar diferentes estágios de maturação e atividade, ou estar relacionado com as condições cito fisiológicas ou com a direção do plano de corte (LEITE; EVANGELISTA, 2001; GÜL *et al.*, 2001).

Os resultados histológicos e ultraestruturais para *C. claveri* mostraram aspectos morfológicos das células epiteliais, principalmente das células colunares nas diferentes regiões do intestino médio, que se modificaram de acordo com a concentração do óleo de nim utilizado, sendo o mesmo descrito para trabalhos com a *A. indica* e para outros óleos e derivados vegetais (STEINLY; BERENBAUM, 1985; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; NOGUEIRA *et al.*, 1997; REY; PAUTOU; MEYRAN, 1999; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; JING *et al.*, 2005; NDIONE *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2009; ROEL *et al.*, 2010; LÜ; WU; LIU., 2010; ALMEHMADI, 2011; QI *et al.*, 2011).

Várias destas modificações como alterações nas microvilosidades, ruptura da membrana plasmática, vacuolização do citoplasma, hipertrofia celular, formação e ampliação de espaços intercelulares além de outros efeitos iniciais de necrose vão de encontro com as observações histológicas causadas pela administração do óleo de nim ou de derivados vegetais em células colunares (STEINLY; BERENBAUM, 1985; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; REY; PAUTOU; MEYRAN, 1999; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; NDIONE *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2009; ROEL *et al.*, 2010; ALMEHMADI, 2011).

Ultraestruturalmente as modificações nas microvilosidades estão relacionadas com alterações nos microfilamentos de actina, como observado por Percy e Fast (1983) e Nogueira *et al.* (1997). Nogueira *et al.* (1997) relataram a ausência de feixes de microfilamentos de actina no interior das microvilosidades após a ingestão de azadiractina em *Rhodnius prolixus*. Segundo Cheville (1994, 2009) após progressiva dilatação em células lesionadas, a superfície celular tornar-se desorganizada e microvilosidades ficam irregulares ou mesmo são perdidas. Em lesões tóxicas os filamentos de actina desintegram-se e perdem sua conexão com a membrana plasmática que recobre as microvilosidades, causando posterior encurtamento das microvilosidades, o que reflete uma progressiva perda da arquitetura celular proporcionada pelo citoesqueleto.

Hipertrofia celular comumente observada em células colunares submetidas aos tratamentos com óleos, extratos vegetais e toxinas, a qual origina dilatações apicais corresponde a primeira mudança em lesões aguda a células, provocada pela expansão do volume celular devido a perda do controle no balanço iônico e entrada de água (PERCY; FAST, 1984; BAUER; PANKRATZ, 1992; CHEVILLE, 1994, 2009). Acreditamos que componentes do óleo de nim possam ocasionar modificações no balanço iônico, que estão relacionadas com alterações observadas no labirinto basal das células colunares como descrevemos em *C. claveri* e em *R. prolixus* por Nogueira *et al.* (1997). *Bacillus thuringiensis* também acarreta alterações no labirinto basal, geralmente aumentando a superfície de membrana ou espaço intercelular, podendo ser um indicativo de reforço no transporte de excesso de fluido para hemocele (DE LELLO *et al.*, 1984; BAUER; PANKRATZ, 1992).

A formação de espaços intercelulares assim como o distanciamento das células colunares da membrana basal constatada nos tratamentos de *C. claveri* com óleo de nim também foi relatada em tratamentos com óleo de nim (NDIONE *et al.*, 2007; CORREIA

et al., 2009), tanino (STEINLY; BERENBAUM, 1985; REY; PAUTOU; MEYRAN, 1999) e ácido bórico (CRUZ *et al.*, 2010). Acreditamos que complexos juncionais sejam rompidos, permitindo a formação destes espaços, do mesmo modo que Steinly e Berembaum (1985) e Rey *et al.* (1999) descreveram em seus trabalhos. Cheville (1994, 2009) cita que durante severa dilatação celular, junções celulares podem ser desintegradas, fazendo com que as células percam sua normal coesão com as células vizinhas, além de supressão na síntese de moléculas de adesão e de seus receptores; integrinas e outros receptores de adesão acabam sendo endocitados, levando a dissociação e perda de coesão entre as células.

Em nossos achados foi possível caracterizar um conjunto de alterações ultraestruturais nas organelas citoplasmáticas das células colunares, modificações constatadas em todo intestino médio, principalmente na fase de larva e adulta de *C. claveri*, com intensidades proporcionais as concentrações de óleo de nim ingerido: retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado, retículo endoplasmático liso desenvolvido, aparecimento de figuras de mielina e mitocôndrias edemaciadas; sendo muitos destas modificações semelhantes às descritas em trabalhos com azadiractina (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993), derivados de plantas (JING *et al.*, 2005; LÜ; WU; LIU, 2010; QI *et al.*, 2011) e por *Bacillus thuringiensis* (PERCY; FAST, 1983; DE LELLO *et al.*, 1984; BAUER; PANKRATZ, 1992). Estas modificações acompanhadas com as alterações em nível de membrana plasmática e citoesqueleto, como dilatação celular, perda de microvilosidades, formação de protusões citoplasmáticas, espaços intercelulares e rompimento da membrana plasmática com perda dos componentes celulares são evidências do processo muito diversificado de degeneração celular por necrose (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; CHEVILLE, 1994, 2009; PROSKURYAKOV *et al.*, 2004; GREGORC; POGACNIK; BOWEN, 2003; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; RELLO *et al.*, 2005; ROST-ROSZKOWSKA *et al.*, 2008b).

Alterações citopatológicas com sinais típicos de necrose também já foram descritos em outros tecidos após administração da azadiractina como descrito por Sayah *et al.* (1996) em células foliculares e adipócitos de *Labidura riparia*, Sayah (2002) em corpora allata de *L. riparia*, Lucantoni *et al.* (2006) em célula foliculares de *Anopholes stephensi* e por Ghazawi *et al.* (2007) em células foliculares de *Heteracris littoralis*.

Do mesmo modo que a membrana plasmática, as membranas das organelas citoplasmáticas também devem bombear íons para manter o equilíbrio hídrico nas

células. Em lesões direcionadas nas membranas citoplasmáticas, água tende a se acumular nas cisternas do retículo endoplasmático e no envoltório nuclear, no caso, espaço perinuclear, como observado em adulto de *C. claveri* submetido ao tratamento de 0,5% de óleo de nim. Dilatação do retículo endoplasmático e consequentemente perda de elétron densidade são um dos primeiros sinais de lesão na maioria das células, que pode posteriormente culminar na fragmentação das membranas do retículo endoplasmático em vesículas, acarretando na vacuolização do citoplasma (ENDO; NISHITSUTSUJI-UWO, 1980; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; CHEVILLE, 1994, 2009; JING *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2011).

Observamos em alguns grupos de *C. claveri* tratados com o óleo de nim, alguns pontos focais, a ocorrência de figuras de mielina, que segundo Cheville (1994, 2009) correspondem a fragmentos irregulares de membrana do retículo endoplasmático que se agregam e reorientam em arranjo laminar quando ocorre a degeneração do retículo endoplasmático, sendo freqüente em células que possuem muito retículo endoplasmático. Lü *et al.* (2010) também faz menção às figuras de mielina no mesêntero de *Mythimna separata* tratada com fraxinelona. Podemos inferir a presença de vacúolos autofágicos ou autofagossomos no processo de remoção e digestão intracelular destas figuras de mielina e de outras organelas celulares danificadas durante o processo lesivo ocasionado pelo tratamento do óleo de nim, sendo comum a descrição destes em células lesionadas (BAUER; PANKRATZ, 1992; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; CHEVILLE, 1994, 2009; SAYAH *et al.*, 1996).

A constatação de retículo endoplasmático liso desenvolvido nas células colunares, principalmente na região apical, supranuclear e perinuclear indica a ocorrência de intoxicação crônica neste órgão, evidenciando uma possível tentativa de detoxificação destas células (CHEVILLE, 1994, 2009) ou ocorrência de adaptação a esta injúria frente aos compostos tóxicos expostos por longos períodos (HUTTERER *et al.*, 1968). Do mesmo modo que o retículo endoplasmático rugoso, o retículo endoplasmático liso também pode fragmentar-se e formar vesículas em lesões agudas. Acreditamos que devido ao fato de termos observado retículo endoplasmático liso apenas nos grupos submetidos ao tratamento com óleo de nim, esta seria uma possível resposta na tentativa de detoxificação, por ser tratar de uma exposição crônica, tendo a célula tempo suficiente para responder aos compostos tóxicos ingeridos pela larva. Não constatamos em trabalhos a descrição de desenvolvimento do retículo endoplasmático

liso, talvez devido ao fato da grande maioria deles apenas avaliar o efeito de uma única exposição, no caso aguda em um curto período de tempo, geralmente de horas.

Mitocôndrias edemacidas foram frequentemente observadas nos tratamentos com óleo de nim, principalmente na fase de adulto. Mitocôndrias dilatadas, com cristas mitocondriais alteradas pelo processo de cristólise é característica de células em severos processos de dilatação, em que o excesso de solutos e água entram e se acumulam na matriz mitocondrial, transformando as mitocôndrias em estruturas vacuolizadas, que contribuem para a aparência vacuolizada de células dilatadas. Algumas toxinas podem ser acumuladas ou causam danos nas mitocôndrias, interferindo no processo de fosforilação oxidativa ou na cadeia transportadora de elétron (CHEVILLE, 1994, 2009). Trabalhos apontam a ocorrência de alterações ultraestruturais nas mitocôndrias devido ao uso da azadiractina (NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; SAYAH *et al.*, 1996; SAYAH, 2002; GHAZAWI *et al.*, 2007), assim como de outros derivados de plantas (JING *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2011) e toxina do *Bacillus thuringiensis* (ENDO; NISHITSUTSUJI-UWO, 1980; PERCY; FAST, 1983; DE LELLO *et al.*, 1984; BAUER; PANKRATZ, 1992)

A análise citoquímica para glicoconjugados neutros utilizando a reação do PAS indicou uma diminuição de glicoconjugados neutros proporcionais as concentrações utilizadas do óleo de nim nos tratamentos em todas as regiões do intestino médio para a fase de larva, e aumento nas fases de pupa e adulto.

Rharrabe *et al.* (2008) avaliando a ação da azadiractina em larvas de *Plodia interpunctella* constataram uma severa redução de proteínas, glicogênio e lipídios contidos nas larvas tratadas, possivelmente devido ao efeito antialimentar, repelente e tóxico, os quais provocaram perda de peso e aumento de mortalidade. Observamos durante nossos tratamentos uma redução na alimentação das larvas de *C. claveri* submetidas ao tratamento com óleo de nim, e este efeito antialimentar poderia ter ocasionado menor ingestão de nutrientes, dentre estes os de natureza glicídica.

Já Sayah *et al.* (1996) relataram que em adipócitos de *Labidura riparia* que receberam injeção de azadiractina, houve diminuição de organelas proteossintéticas, mas a presença de grandes áreas com grânulos de glicogênio. O fato de termos encontrado maiores concentrações de glicoconjugados neutros, dentre estes glicogênio em nossos tratamentos na fase de pupa e adulta pode estar relacionado com a propriedade hipoglicêmica que *A. indica* possui, tornando esta planta um possível agente para o controle da diabetes (HUSSAIN, 2002; BHAT *et al.*, 2008; BHAT *et al.*, 2009).

Segundo Bhat *et al.* (2009) o extrato clorofórmico e aquoso de *A. indica* aumentou a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e também proporcionou um aumento significativo na quantidade de glicogênio hepático e muscular em ratos com diabetes induzida, indicando que o extrato de *A. indica* tem um efeito direto no metabolismo de glicose.

No caso de pupa e adulto tratados com óleo de nim, a propriedade hipoglicêmica que *A. indica* possui facilitou a absorção de nutrientes glicídicos originários na histólise do antigo epitélio larval presente no lúmen, não sofrendo o efeito antialimentar do óleo de nim.

A reação do TUNEL permitiu confirmar que as alterações geradas pela ingestão do óleo de nim por larvas de *C. claveri* não induziram morte celular do tipo apoptótica, uma vez que não constatamos diferenças no número de células em apoptose entre os indivíduos controle e tratados.

As marcações *in situ* pela técnica do TUNEL das extremidades das fitas de DNA clivadas durante o processo de apoptose permite marcar células apoptóticas em um padrão distinto antes do aparecimento das alterações morfológicas, as quais apresentam um limitado tempo de observação (GAVRIELI *et al.*, 1992; HOCKENBERY, 1995).

Alguns kits são incapazes de diferenciar células em morte celular por apoptose ou necrose, como o ISCDDK (*in situ* cell death detection kit). Necrose e apoptose podem ocorrer simultaneamente em vários processos patológicos, durante processos normais de renovação de tecidos, embriogênese e resposta imune (GAVRIELI *et al.*, 1992; GREGORIC; BOWEN, 2000; GREGORC; POGACNIK; BOWEN, 2004; GREGORC; ELLIS, 2011).

Por muito tempo a necrose era considerada como uma alternativa para a morte celular programada ou apoptose. De fato a necrose apresenta características morfológicas distintas e está acompanhada pela rápida permeabilização da membrana plasmática, dilatação celular, colapso da membrana plasmática e finalmente lise. (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003; RELLO *et al.*, 2005).

A análise em MEV permitiu caracterizar diferenças na superfície epitelial ao longo do intestino médio de larva, pupa e adulto de *C. claveri*, seja em relação ao formato das células colunares, organização das microvilosidades e liberação de protusões citoplasmáticas. Fialho *et al.* (2009) avaliando de modo segmentado o intestino médio de adultos de *B. tabidus* também constataram diferenças em relação ao comprimento das microvilosidades entre as três regiões do intestino.

Poucos trabalhos apontam lesões ultraestruturais na superfície apical das células colunares observadas ao MEV (GRIEGO; FANCHER; SPENCE, 1980; SPIES; SPENCE, 1985; CHIANG; YEN; PENG, 1986; NOGUEIRA *et al.*, 1997; LEVY, 2005). As alterações mais observadas correspondem à desorganização e espaçamento das microvilosidades, tornando-se escassas e proeminentes em alguns pontos focais, além da dilatação da superfície apical, formação e liberação de diferentes tipos e formatos de protusões citoplasmáticas em direção ao lúmen e células rompidas, podendo caracterizar a ocorrência de necrose.

Nogueira *et al.* (1997) avaliando a ingestão de azadiractina por *Rhodnius prolixus* constataram em MEV que a superfície epitelial do intestino médio já não era homogênea, uma vez que as células colunares apresentavam microvilosidades agrupadas, conferindo aparência enrugada a superfície epitelial.

Levy (2005) analisando a superfície epitelial do mesêntero de *A. gemmatilis* infectada por AgMNPV ao MEV também visualizou alterações nas microvilosidades, ocorrendo de modo escasso e proeminente, além da liberação de protusões citoplasmáticas. Estas protusões poderiam estar ocorrendo devido à capacidade de larvas resistentes de degradar e expulsar porções infectadas do epitélio para o lúmen intestinal.

Efeitos da endotoxina de *B. thuringiensis* avaliados em MEV apresentaram lesões semelhantes às descritas em nossos tratamentos. Griego, Fancher e Spence (1980) relatam em *Manduca sexta* a diminuição do comprimento das microvilosidades já após 1 hora de tratamento com *B. thuringiensis*. Já Spies e Spence (1985) constataram em *M. sexta* uma redução do número e comprimento das microvilosidades, estando estas esparsas e irregulares, além da freqüente dilatação e produção de protusões citoplasmáticas mais ou menos esféricas em direção ao espaço luminal, podendo estas protusões serem solidamente preenchidas com material citoplasmático ou não. Chiang, Yen e Peng (1986) também observaram em *Corcyra cephalonica* infectada por *B. thuringiensis* a perda das microvilosidades, dilatação de células colunares, eliminação de protusões e conseqüentemente lise da célula liberando seu conteúdo citoplasmático.

Spies e Spence (1985) observaram que muitas células romperam-se liberando materiais celular granular e organelas devido ao processo de vacuolização do citoplasma. Outros trabalhos em MET também relatam alterações nas microvilosidades devido a exposição a *B. thuringiensis*, azadiractina e celangulina V respectivamente

(PERCY; FAST, 1983; CAVADOS *et al.*, 2004; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; QI *et al.*, 2011).

Nasiruddin e Mordue (Luntz) (1993) avaliando a ação da azadiractina no intestino médio de *L. migratoria* observaram uma diminuição das microvilosidades devido a dilatação das células, assim como a ausência de microvilosidades em algumas regiões e a ruptura da membrana apical liberando seu conteúdo para o lúmen. Nasiruddin e Mordue (Luntz) (1993) relatam ainda que o tempo de ação tóxica da azadiractina é extremamente lenta quando comparado com *B. thuringiensis* assim como a grau de lesão das células, que não é tão profundo como encontrado nos tratamentos com *B. thuringiensis*.

Nossas observações se assemelham às lesões ocasionadas por *B. thuringiensis*, pois ao invés de uma exposição aguda que geralmente ocorre nos trabalhos com azadiractina e até mesmo por *B. thuringiensis*, em nossos tratamentos com óleo de nim houve uma exposição crônica da larva de *C. claveri*, causando deste modo alterações mais severas que de uma simples exposição aguda.

A formação de protusões citoplasmáticas em células que estão em processo de necrose está associada à perda do controle do fluxo de água através da membrana plasmática, mas que nem sempre causa o rompimento da membrana (RELLO *et al.*, 2005). Também podemos associar a perda de integridade e a reorganização do citoesqueleto com as alterações nas microvilosidades e formação de protusões citoplasmáticas (PERCY; FAST, 1983; CHEVILLE, 1994, 2009; HACKER, 2000; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

Semelhante a apoptose, onde um grande número de proteínas estruturais como gelsolina, actina são clivadas por caspases, na necrose enzimas proteolíticas também podem ser ativadas, ocasionando a transdução de sinal letal via cascata de caspases, levando a destruição de várias proteínas alvos, dentre elas as do citoesqueleto, fazendo com que o suporte da rede do citoesqueleto desapareça em áreas irregulares, criando focos de fraqueza na matriz citoplasmática, levando a formação de protusões na superfície (CHEVILLE, 1994, 2009; BORNER; MONNEY, 1999; HACKER, 2000; LEIST; JÄÄTTELÄ, 2001; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). Anuradha, Annadurai e Shashidhara (2007) constataram que a azadiractina A induz a despolimerização da actina, causando severos defeitos na organização do citoesqueleto.

Embora protusões aparentem requerer para sua iniciação a atividade da caspase-3, uma vez iniciado ela pode continuar sua formação na presença de inibidores de caspases, indicando que caspases ativam mecanismos posteriores que medeiam a formação de protusões. Em algumas circunstâncias, a execução do processo de necrose requer a ativação de caspases. Uma série de trabalhos vem demonstrando ampla ocorrência de morte celular programada caspase independente, tanto por apoptose ou necrose (BORNER; MONNEY, 1999; HACKER, 2000; LEIST; JAATELA, 2001; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003; ANURADHA; ANNADURAI; SHASHIDHARA, 2007).

Células regenerativas em *C. claveri* apresentaram variadas repostas para os tratamentos com óleo de nim. Para as três fases do ciclo de vida avaliadas, somente na fase de adulto observamos alterações evidentes decorrentes da ingestão do óleo de nim, o qual ocasionou o aparecimento de cisternas de retículo endoplasmático rugoso dilatadas e mitocôndrias edemaciadas. Este tipo celular raras vezes é analisado em trabalhos que avaliam processos de infecções por vírus, bactérias, toxinas, inseticidas e derivados vegetais. Quando descritas, encontramos variadas respostas destas células: a não ocorrência de alterações (ENDO; NISHITSUTSUJI-UWO, 1980; PERCY; FAST, 1983; LEVY, 2005); células em proliferação para realizar rápida renovação celular, podendo atuar como mecanismo de defesa (SPIES; SPENCE, 1985; CHIANG; YEN; PENG, 1986; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003) e redução do número de células e vacuolização citoplasmática (MATHAVAM; SUDHA; PECHIMUTHU, 1989; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; NASIRUDDIN; MORDUE (LUNTZ), 1993; REED; MAJUMDAR, 1998; CORREIA *et al.*, 2009).

Em trabalhos que utilizaram o óleo de nim ou mesmo a azadiractina, apenas constataram a redução no número de células regenerativas como relatado por Mordue (Luntz); Blackwell, 1993; Nasiruddin; Mordue (Luntz), 1993; Reed; Majumdar, 1998; Correia *et al.*, 2009. Este efeito observado pode ser devido ao efeito da azadiractina, que inibe a ocorrência de mitose (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; REED; MAJUMDAR, 1998). Em nosso trabalho não podemos afirmar se houve ou não redução das células regenerativas, pois não realizamos contagem destas células, mas durante as análises não notamos diferenças no número de células em relação ao grupo controle. Apenas a nível ultraestrutural notamos alterações na fase de adulto, podendo estas alterações estar relacionadas com o tempo de exposição, (no nosso caso, crônica), que acarretou em alterações condizentes a de células em processo de degeneração.

A fisiologia digestiva deste predador também deve ser levada em conta, uma vez que, a larva de *C. claveri*, semelhante às outras larvas de crisopídeos não tem a capacidade de excretar fezes durante seu desenvolvimento larval, o que pode acarretar o acúmulo de compostos presentes no óleo de nim junto com outros restos não digeridos do bolo alimentar no intestino médio na forma de mecônio, sendo este eliminado somente na fase adulta. Segundo Hogervorst *et al.* (2006) efeitos negativos causado por este tipo de fisiologia digestiva de acúmulo de restos alimentares e substâncias não digeridas pode ser a causa de hipertrofia e parada prematura da absorção de nutrientes quando larvas de *Chrysoperla carnea* ingerem aglutinina de *Galanthus nivalis*.

Em nossas observações ao MET, células endócrinas do tipo 1 nas três fases do ciclo de vida de *C. claveri* obtidas de indivíduos tratados com óleo de nim apresentaram alterações ultraestruturais como cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas e fragmentadas; retículo endoplasmático liso desenvolvido; formação de espaços intercelulares e mitocôndrias edemaciadas. Não encontramos trabalhos que descrevessem alterações ultraestruturais em células endócrinas do epitélio intestinal decorrentes de tratamentos com *A. indica* ou com outros derivados de plantas, bactérias ou vírus.

Por ser um tipo celular raro ao longo do epitélio isso pode dificultar sua descrição nos trabalhos. Também podemos observar que diferentemente da maioria dos trabalhos, em nosso trabalho a larva sofreu uma exposição contínua, ou seja, crônica ao óleo de nim, o que pode ter acarretado neste tipo celular, alterações condizentes com as observadas nas células colunares em processo de degeneração por necrose.

Acreditamos que as alterações observadas nas células endócrinas sejam fruto da ação dos tratamentos, pois a azadiractina tem efeito direto na motilidade do intestino nos insetos, reduzindo a frequência de contrações e passagem de alimento por este, afetando indiretamente as células endócrinas na liberação de hormônios que estimulam a motilidade intestinal (MORDUE (LUNTZ); COTTEE; EVANS, 1985; SHENAL; ZITNAN, 1996). Estudos avaliando a ação da azadiractina em células de glândulas endócrinas de insetos como *corpora allata*, *corpora cardiaca* e glândula protorácica responsáveis pela liberação de neuro hormônios, apresentaram efeitos citotóxicos, muitos destes condizentes ao observado em nossas análises das células endócrinas, como formação de espaços intercelulares, cisternas fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias dilatadas com matriz pouco elétron-densa e

indistintas cristas mitocondriais (MEURANT; SERNIA; REMBOLD, 1994; SAYAH *et al.*, 1998; SAYAH, 2002).

A hipertrofia do retículo endoplasmático liso visualizada em algumas células endócrinas pode servir como um parâmetro de sensibilidade toxicológica, que nem sempre está associada com a hiperatividade do retículo endoplasmático liso, estado em que já houve a adaptação desta organela as condições de injúria provocadas pela exposição a compostos tóxicos por longos períodos (HUTTERER *et al.*, 1968).

Abaixo da membrana basal, estão dispostas uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais. A espessura do feixe muscular está ligada a variação do número de fibras musculares. Os feixes do músculo circular podem ser encontrados algumas vezes em invaginações na base do epitélio intestinal (WIGGLESWORTH, 1965; SNODGRASS, 1993; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; KOEHLER; ZIA; DESSER, 2002; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

O intestino médio de *C. claveri* apresentou semelhança ao descrito para *Anopheles quadrimaculatus* em que Schaefer, Vanderberg e Rhodin (1967) constataram poucas traquéolas e fibras musculares com escassas mitocôndrias. Nos tratamentos com óleo de nim, somente na fase de pupa e adulto visualizamos alterações nas fibras musculares, sendo detectado retículo endoplasmático rugoso dilatado e fragmentado, miofibrilas dispostas irregularmente e mitocôndrias intumescidas.

Nasiruddin e Mordue (Luntz) (1993) constataram no intestino médio de *L. migratoria* após aplicação de azadiractina a ocorrência de dilatação dos feixes musculares a nível ultraestrutural, presença de mitocôndrias dilatadas, mas nenhuma alteração no arranjo das miofibrilas. A degradação parcial da membrana basal (MANICKAM; IWANAGA; KAWASAKI, 2008) e dos feixes musculares (LELLO; VIEIRA, 2001; CRUZ-LANDIM; CAVALCANTE, 2003) que ocorre no início metamorfose é importante para a remodelação do intestino médio, que além de morte celular programada envolve o rearranjo de tecidos. Acreditamos que o rearranjo nas fibras musculares seja prejudicado pela azadiractina, a qual provocou desorganização nas miofibrilas na fase de pupa, fase posterior ao rearranjo dos feixes musculares, os quais estavam expostos ao óleo de nim desde a fase larval. Já Nasiruddin e Mordue (Luntz) (1993) possivelmente não constataram este desarranjo devido ao fato de utilizarem nos experimentos com azadiractina adultos de *L. migratoria*.

6. CONCLUSÕES

- O epitélio do intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* é do tipo pseudoestratificado, existindo diferenças morfológicas que permitem caracterizar a existência de duas regiões, anterior e posterior, tendo como função secretora e absorptiva respectivamente, e região média apresentando características intermediárias, atuando principalmente na absorção;
- A ingestão do óleo de nim na fase larval de *C. claveri* mostrou-se tóxica a este predador, ocasionando alterações ultraestruturais nas três fases do ciclo de vida avaliadas;
- Não houve distribuição preferencial ao longo do intestino médio para as alterações celulares resultantes da ingestão do óleo de nim;
- O óleo de nim causou lesões nas células colunares, regenerativas, endócrinas e musculares, lesões caracterizadas por um conjunto de alterações ultraestruturais nas organelas citoplasmáticas, membrana plasmática e citoesqueleto, evidenciando a ocorrência de degeneração celular por necrose.

7.REFERÊNCIAS

ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazon Basin. **Acta Amazonica**, v.15, n.3-4, p.413-479, 1985.

AGGARWAL, N.; BRAR, D.S. Effects of different neem preparations in comparison to synthetic insecticides on the whitefly parasitoid *Encarsia sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae) and the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) on cotton under laboratory conditions. **J. Pest. Sci.**, v.79, p.201-207, 2006.

AHMAD, M.; OßIEWATSCH, H.R.; BASEDOW, T. Effects of neem-treated aphids as food/hosts on their predators and parasitoids. **J. Appl. Ent.**, v.127, p.458-464, 2003.

ALBUQUERQUE, G.S.; TAUBER, C.A.; TAUBER, M.J. *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa* spp.: potential for biological control in the New World tropics and subtropics. In: MCEWN, P.K.; NEW, T.R.; WHITTINGTON, A.E. (Eds.). **Lacewings in the crop environment**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 408-423.

ALBUQUERQUE, G.S. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 23, p. 969-1022.

ALMEIDA, M.F.; BARROS, R.; JUNIOR, M.G.C.G.; FREITAS, S.; BEZERRA, A.L. Biologia de *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera: Chrysopidae) predando *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.313-318, 2009.

ALMEHMADI, R.M. Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). **Journal of Entomology**, n.8, v.1, p.63-72, 2011.

AL-MEHMADI, R.M.; AL-KHALAF, A.A. Larvicidal and histological effects of the *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* say larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of King Saud University (Science)**, v.22, p.77-85, 2010.

ALMEIDA, M.F.; BARROS, R.; JUNIOR, M.G.C.G.; FREITAS, S.; BEZERRA, A.L. Biologia de *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera: Chrysopidae) predando *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.313-318, 2009.

ANGERMÜLLER, S.; FAHIMI, D.H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.**, v. 14, p.823-825, 1982.

ANURADHA, A.; ANNADURAI, R.S.; SHASHIDHARA, L.S. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n.37, p.627-634, 2007.

ARNEODO, J.D.; BRESSAN, A.; LHERMINIER, J.; MICHEL, J.; BOUDON-PADIEU, E. Ultrastructural detection of an unusual intranuclear bacterium in *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, p.310-313, 2008.

ARRESE, E.L.; CANAVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.7-17, 2001.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.17-25, 2003.

ATELLA, G.C.; GONDIM, K.C.; MACHADO, E.A.; MEDEIROS, M.N.; SILVA-NETO, M.A.C.; MASUDA, H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **Annals of Brazilian Academy of Sciences**, v.77, n.3, p.405-430, 2005.

AZEVEDO, D.O.; NEVES, C.A.; MALLET, J.R.S.; GONÇALVES, T.C.M.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). **J. Med. Entomol.**, v.46, n.3, p.435-441, 2009.

BALDWIN, K.M.; HAKIM, S. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during moulting in the moth, *Manduca sexta*. **Tissue and Cell**, v.23, n.3, p.411-422, 1991.

BARNARD, P.C. Adult morphology related to classification. In: CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1984, p.19-29.

- BARROS, R.; DEGRANDE, P.E.; RIBEIRO, J.F.; RODRIGUES, A.L.L.; NOGUEIRA, R.F.; FERNANDES, M.G. Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.73, n.1, p.57-64, 2006.
- BAUER, L.S.; PANKRATZ, H.S. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.15-25, 1992.
- BHAT, M.; ZINJARDE, S.S.; BHARGAVA, S.Y.; KUMAR, A.R.; JOSHI, B.N. Antidiabetic indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. **eCAM**, p.1-6, 2008.
- BHAT, M.; KOTHIWALE, S.K.; TIRMALE, A.R.; BHARGAVA, S.Y.; JOSHI, B.N. Antidiabetic properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: in vivo studies in murine diabetes model. **eCAM**, p.1-8, 2009.
- BIAGIONI, A.; FREITAS, S. Efeito de diferentes dietas sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysoperla defreitasi* Brooks (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.333-336, 2001.
- BILLINGSLEY, P.F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.219-248, 1990.
- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.
- BORNER, C.; MONNEY, L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? **Cell Death and Differentiation**, v.6, p.497-507, 1999.
- BROWN, M.R.; RAIKHEL, A.S.; LEA, A.O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue & Cell**, v.17, n.5, p.709-721, 1985.
- BUTION, M.L.; CAETANO, F.H. The midgut of *Cephalotes* ants (Formicidae: Myrmicinae): Ultrastructure of the epithelium and symbiotic bacteria. **Micron**, v.41, p.448-454, 2010.

CAETANO, F.H.; BUTION, M.L.; ZARA, F.J. First report of endocytobionts in the digestive tract of ponerine ants. **Micron**, v.40, p.194-197, 2009.

CANARD, M.; PRINCIPI, M.M. Development of Chrysopidae. In: CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1984, p.57-75.

CARVALHO, G.A.; BEZERRA, D.; SOUZA, B.; CARVALHO, C.F. Efeitos de inseticidas usados na cultura do algodoeiro sobre *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.699-706, 2003.

CAVADOS, C.F.G.; MAJEROWICZ, S.; CHAVES, J.Q.; ARAUJO-COUTINHO, C.J.P.C.; RABINOVITCH, L. Histopathological and Ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n.5, p.493-498, 2004.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770p.

CHEVILLE, N.F. **Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation**. Ames: Iowa State University Press, 1994. 946p.

CHEVILLE, N.F. **Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease**. 2. ed. Ames: Willey-Blackwell, 2009. 973p.

CHEN, T.; CHU, C.; HU, C.; MU, J.; HENNEBERRY, T. J. Observations on midgut structure and content of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.99, n.5, 917-919, 2006.

CHIANG, A.S.; YEN, D.F.; PENG, W.K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.333-339, 1986.

CIOFFI, M. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. **Tissue & Cell**, v.11, n.3, p.467-479, 1979.

CORDEIRO, E.M.G.; CORRÊA, A.S.; VENZON, M.; GUEDES, R.N.C. Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. **Chemosphere**, v.81, p.1352-1357, 2010.

CORLEY, L.S.; LAVINE, M.D. A review of insect stem cell types. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.17, p.510-517, 2006.

CORREIA, A.A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.V.; TORRES, J.B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, v.38, n.1, p.83-91, 2009.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.143-155, 2001.

CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J.E.; SILVA-DE-MORAES, R.L.M. Cytoplasmic protusions from digestive cells of bees. **Cytobios**, v.88, p.95-194, 1996.

CRUZ-LANDIM, C.; CAVALCANTE, V.M. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apinae). **Zoological Science**, v.20, n.9, p.1099-1107, 2003.

CRUZ, A.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, O.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology Toxicology**, v.26, p.165-176, 2010.

DE LELLO, E.; HANTON, W.K.; BISHOFF, S.T.; MISCH, D.W. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): low doses compared with fasting. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.43, p.169-181, 1984.

DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. **J. Ultrastructure Research**, v.36, p.783-805, 1971.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Ann. Rev. Entomol.**, v.49, p.71-92, 2004.

DOUGLAS, A.E.; BEARD, C.B. Microbial symbioses in the midgut of insects. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p.420-431.

ENDO, Y.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.36, p.90-103, 1980.

EVANGELISTA, L.C.; LEITE, A.C.R. Midgut ultrastructure of the third instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) based on transmission electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v.40, n.2, p.133-140, 2003.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. **Journal Insect Physiology**, v.27, n.8, p.559-570, 1981.

FIALHO, M.C.Q.; ZANUNCIO, J.C.; NEVES, C.A.; RAMALHO, F.S.; SERRÃO, J.E. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v.102, n.1, p.119-127, 2009.

FONTANETTI, C.S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Brazilian Journal Morphological Science**, v.23, n.3-4, p.487-493, 2006.

FREITAS, S. **O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas em laboratório**. Jaboticabal: Funep, 2001, 66p.

FREITAS, S.; PENNY, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 52, n.19, p. 245-395, 2001.

FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J.R.P. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. Cap. 13, p. 209-224.

FRUTTERO, L.L.; FREDE, S.; RUBIOLO, E.R.; CANAVOSO, L.E. The storage of nutritional resources during vitellogenesis of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): The pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocytes. **Journal of Insect Physiology**, v.57, p.475-486, 2011.

GARCIA, J.J.; WANG, P.; ZHONG, J.; GRANADOS, R.R. Primary and continuous midgut cell cultures from *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cell Development Biology – Animal**, v.37, p.353-359, 2001.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology**, v.119, n.3, p.493-501, 1992.

GEPP, J. Morphology and anatomy of the preimaginal stages of Chrysopidae: a short survey. In: CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p.9-19.

GHAZAWI, N.A.; EL-SHRANOUBI, E.D.; EL-SHAZLY, M.M.; ABDEL RAHMAN, K.M. Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Orthoptera Research**, v.16, n.1, p.57-65, 2007.

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. In situ localization of the heat-shock and histone proteins in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. **Cell Biology International**, v.23, p.211-218, 1999.

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline. **Cell Biology International**, v.24, n.5, p.319-324, 2000.

GREGORC, A.; POGACNIK, A.; BOWEN, I.D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. **Apidologie**, v.35, p.453-460, 2004.

GREGORC, A.; ELLIS, J. Cell death localization *in situ* in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.200-207, 2011.

GRIEGO, V.M.; FANCHER, L.J.; SPENCE, K.D. Scanning electron microscopy of the disruption of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, midgut by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.35, p.186-189, 1980.

GÜL, N.; SAYAR, H.; ÖZSOY, N.; AYVALI, C. A study on endocrine cells in the midgut of *Agrotis segetum* (Denn. And Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish Journal Zoology**, v.25, p.193-197, 2001.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**, v.301, p.5-17, 2000.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.M.; LOEB, M. The role of the stem cells in midgut growth and regeneration. **In Vitro Cell Development Biology Animal**, v.37, n.6, p.338-342, 2001.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Reviews Entomology**, n.55, p.593-608, 2010.

HASSANPOUR, M.; MOHAGHEGH, J.; IRANIPOUR, S.; NOURI-GANBALANI, G.; ENKEGAARD, A. Functional response of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): effect of prey and predator stages. **Insect Science**, v.18, p.217-224, 2011.

HOCKENBERY, D. Defining apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.146, n.1, p.16-19, 1995.

HOGERVORST, P.A.M.; FERRY, N.; GATEHOUSE, A.M.R.; WÄCKERS, F.L.; ROMEIS, J. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.614-624, 2006.

HOUK, E.J.; HARDY, J.L. Midgut cellular responses to bloodmeal digestion in the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett (Diptera: Culicidae). **International Journal Insect Morphology & Embryology**, v.11, n.2, p.109-119, 1982.

HUSSAIN, H.E.M.A. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica*, **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.17, n.2, p.115-123, 2002.

HUTTERER, F.; SCHAFFNER, F.; KLION, F.M.; POPPER, H. Hypertrophic, hypoactive smooth endoplasmic reticulum: a sensitive indicator of hepatotoxicity exemplified by dieldrin. **Science**, v.161, p.1017-1019, 1968.

ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: an introduction. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.1-21.

JARIAL, M.S. Electron microscopic study of the anterior midgut in *Cenocorixa bifida* Hung. (Hemiptera: Corixidae) with reference to its secretory function. **Zoological Science**, v.22, p.783-790, 2005.

JING, L.; FANG, Y.; YING, X.; WENXING, H.; MENG, X.; SYED, M.N.; FANG, C. Toxic impact of ingested jatropherol-I on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Applied Entomology**, v.129, n.2, p.98-104, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. 123p.

KHAN, M.R.; FORD, J.B. Studies on digestive enzyme production and its relationship to the cytology of the midgut epithelium in *Dysdercus fasciatus* Sign. (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **Journal Insect Physiology**, v.8, p.597-608, 1962.

KINSINGER, R.A.; MCGAUGHEY, W.M.H. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on larvae of the indianmeal moth and the almond moth. **Annals of the Entomological Society of America**, v.72, n.6, p.787-790, 1979.

KOEHLER, A.; ZIA, C.; DESSER, S.S. Structural organization of the midgut musculature in black flies (*Simulium* spp.). **Canadian Journal Zoology**, v.80, p.910-917, 2002.

KNAAK, N.; TAGLIARI, M.S.; FIUZA, L.M. Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.83-89, 2010.

KLOWDEN, M.J. **Physiological systems in insects**. California: Academic Press, 2002. p.163-203.

LAMBERT, F. B.; ALBUQUERQUE, G. S. Seleção dos locais de oviposição por fêmeas de *Ceraeochrysa spp.* (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu, MG. **Anais...** Caxambu, 2007.

LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.

LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.589-598, 2001.

LEITE, A.C.R.; EVANGELISTA, L.G. Ultrastructure of endocrine cells from abdominal midgut epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, n.5, p.749-752, 2001.

LELLO, E.; VIEIRA, A.M. Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera, Cuterebridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.1, p.91-98, 2001.

LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F.; GREGÓRIO, E.A.; ARREBOLA, N.R.; TOLEDO, L.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal Biology**, v.64, n.3B, p.633-638, 2004.

LEVY, S.M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hüber, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovirus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. 2005. 172f. Tese (Doutorado - Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2005.

LIPOVSEK, S.; LETOFSKY-PAPST, I.; HOFER, F.; PABST, M.A. Seasonal and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites in the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). **Micron**, v.33, p.647-654, 2002.

LUCANTONI, L.; GIUSTI, F.; CRISTOFARO, M.; PASQUALINI, L.; ESPOSITO, F.; LUPETTI, P.; HABLUETZEL, A. Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopholes stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Tissue and Cell**, v.38, p.361-371, 2006.

LÜ, M.; WU, W.; LIU, H. Effects of fraxinellone on the midgut ultrastructural changes of *Mythimna separata* Walker. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p.263-268, 2010.

MALCZEWSKA, M.; GELMAN, D.B.; CYMBOROWSKI, B. Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in chilled *Galleria mellonella* larvae. **Journal Insect Physiology**, v.34, n.7, p.725-732, 1988.

MANICKAM, A.; IWANAGA, M.; KAWASAKI, H. The degradation of the basement membrane in the metamorphic organs during the larval-pupal transformation of *Bombyx mori*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v.77, p.133-139, 2008.

MANTOANELLI, E.; ALBUQUERQUE, G. S. Desenvolvimento e comportamento larval de *Leucochrysa* (*Leucochrysa*) *varia* (Schneider) (Neuroptera, Chrysopidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, n. 2, p.302-311, 2007.

MARANA, S.R.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Ultrastructure and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midgut. **Journal Insect Physiology**, v.43, n.5, p.465-473, 1997.

MARTINEZ, S.S. **O nim - *Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Iapar, 2002. 142p.

MARTINS, G.F.; NEVES, C.A.; CAMPOS, L.A.O.; SERRÃO, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v.37, p.161-168, 2006.

MATHAVAN, S.; SUDHA, P.M.; PECHIMUTHU, S.M. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.217-227, 1989.

MEDINA, P., SMAGGHE, G.; BUDIA, F.; TIRRY, L.; VIÑUELA, E. Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, v.32, n.1, p.196-203, 2003.

MERGNER, W.J.; JONES, R.T.; TRUMP, B.F. **Cell death**: mechanisms of acute and lethal cell injury. New York: Field & Wood Medical Publishers, 1990. v.1, 263p.

MEURANT, K.; SERNIA, C.; REMBOLD, H. The effects of Azadirachtin A on the morphology of the ring complex of *Lucilia cuprina* (Wied) larvae (Diptera: Insecta). **Cell Tissue Reserach**, v.275, p.247-254, 1994.

MITCHELL, M.J.; SMITH, S.L.; JOHNSON, S.; MORGAN, E.D. Effects on the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.35, p.199-209, 1997.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.17, p.4096-40105, 2009.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadiractha indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, n.25, v.1, p.139-148, 2005.

MOURA, A.P.; CARVALHO, G.A.; MOSCARDINI, V.F.; MARQUES, M.C.; SOUZA, J.R. Toxicidade de pesticidas recomendados na produção integrada de maçã (PIM) a populações de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, v.38, n.3, p.395-404, 2009.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; COTTEE, P.K.; EVANS, K.A. Azadirachtin: its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*. **Physiological Entomology**, v.10, p.431-437, 1985.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal Insect Physiology**, v.39, n.11, p.903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v.29, n.4, p.615-632, 2000.

NASIRUDDIN, M.; MORDUE (LUNTZ), A.J. Effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Tissue and Cell**, v.25, n.6, p.875-884, 1993.

NATHAN, S.S.; CHUNG, P.G.; MURUGAN, K. Effect of botanical insecticides and bacterial toxins on the gut enzyme of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis*. **Phytoparasitica**, v.32, n.5, p.433-443, 2004.

NDIONE, R.D.; FAYE, O.; NDIAYE, M.; DIEYE, A.; AFOUTOU, J.M. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.24, p.2846-2854, 2007.

NOGUEIRA, N.F.S.; GONZALES, M.; GARCIA, E.M.; SOUZA, W. Effect of Azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.58-63, 1997.

O'BRIEN, J.F. Origin and structural function of the basal cells of the larval midgut in the mosquito, *Aedes aegypti* Linnaeus. **Journal of the New York Entomological Society**, v.74, n.1, p.59-63, 1966.

OKUDA, K.; ALMEIDA, F.; MORTARA, R.A.; KRIEGER, H.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A.T. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v.53, p.1307-1315, 2007.

OSWALD, J.D. **Neuropterida Species of the World**. Version 2.0, 2007. Disponível em: < <http://lacewing.tamu.edu/Species-Catalogue/> >. Acesso em: 5 nov. 2011.

OLIVEIRA, C.D.; TADEI, W.P.; ABDALLA, F.C. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy

against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? **Neotropical Entomology**, v.38, n.5, p.624-631, 2009.

PALLI, S.R.; SOHI, S.S.; COOK, B.J.; BROWNRIGHT, A.J.; CAPUTO, G.F.; RETNAKARAN, A. RNA and protein-synthesis inhibitors induced apoptosis in a midgut cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Insect Physiology**, n.42, p.1061-1069, 1996.

PAPPAS, M.L.; BROUFAS, G.D.; KOVEOS, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control. **Journal of Entomology**, v.8, n.3, p.301-326, 2011.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. 3.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972. 759p.

PERCY, J.; FAST, P.G. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effects on silkworm midgut cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.41, p.86-98, 1983.

PINHEIRO, D.O.; SILVA, R.J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E.A. Morphometric study of the midgut epithelium in larvar of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p.453-459, 2003.

PINHEIRO, D.O.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E.A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical Entomology**, v.37, n.4, p.413-419, 2008a.

PINHEIRO, D.O.; CONTE, H.; GREGÓRIO, E.A. Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. **Biocell**, v.32, n.1, p.61-67, 2008b.

PRINCIPI, M. M.; CANARD, M. Feeding habits. In: CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p. 76-92.

PROSKURYAKOV, S.Y; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v.283, p.1-16, 2003.

QI, B.; GORDON, G.; GIMME, W. Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). **Biological Control**, v.22, p.185-190, 2001.

QI, Z.; SHI, B.; HU, Z.; ZHANG, Y; WU, W. Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separata* walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.74, n.3, p.439-44, 2011.

RAES, H.; VERBEKE, M. Light and electron microscopical study of two types of endocrines cell in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **Tissue & Cell**, v.26, n.2, p.223-230, 1994.

RAES, H.; VERBEKE, M. MEULEMANS, W.; COSTER, W. Organisation and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*L. Apis mellifera*). **Tissue and Cell**, v.26, n.2, p.231-238, 1994.

RAIZADA, R.B.; SRIVASTAVA, M.K.; KAUSHAL, R.A.; SINGH, R.P. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.477-483, 2001.

RELLO, S.; STOCKERT, J.C.; MORENO, V.; GÁMEZ, A.; PACHECO, M.; JUARRANZ, A; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**, v.10, n.1, p.201-208, 2005.

REED, E.; MAJUMDAR, S.K. Differential cytotoxic effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. **Entomologica Experimentalis Applicata**, v.89, p.215-221, 1998.

REMBOLD, H. Azadirachtin: their structure and mode of action. In: ARSON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p.150-163.

REY, D.; PAUTOU, M.P.; MEYRAN, J.C. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic dipterlarval larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.173-181, 1999.

RHARRABE, K.; AMRI, H.; BOUAYAD, N.; SAYAH, F. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hubber (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.290-294, 2008.

ROCHA, L.L.V.; NEVES, C.A.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.405-415, 2010.

ROEL, A.R.; DOURADO, D.M.; MATIAS, R.; PORTO, K.R.A.; BEDNASKI, A.V.; COSTA, R.B. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54, n.3, p.505-510, 2010.

ROST, M.M. Comparative studies on regeneration of the midgut epithelium in *Lepisma saccharina* and *Thermobia domestica*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.99, n.5, p.910-916, 2006.

ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; POPRAWA, I.; SWIATEK, P. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of the first larva of *Allacma fusca* (Insecta, Collembola, Symphyleona). **Invertebrate Biology**, v.126, n.4, p.366-372, 2007.

ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; CHECHELSKA, A.; FRADCZAK, M.; SALITRA, K. Ultrastructure of two types of endocrine cells in the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* Hübner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Zoologica Poloniae**, v.53, n. 1-4, p.27-35, 2008a.

ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; POPRAWA, I.; KLAG, J.; MIGULA, P.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J. PRZYBYLOWICZ, W. Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna* cf. *nylanderi* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. **Canadian Journal Zoology**, v. 86, p.1179-1188, 2008b.

ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; MACHIDA, R.; FUKUI, M. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum*. **Tissue and Cell**, v.42, p.24-31, 2010.

SAITO, M.L. As plantas praguicidas, alternativa para o controle de pragas na agricultura. **Informativo Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna/SP, 2004. p.1-3.

SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SOUZA, B.; CARVALHO, C.F. Influência de diferentes dietas em fases imaturas de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Anais Sociedade Entomologica do Brasil**, v.26, p.309-314, 1997.

SAYAH, F.; FAYET, C.; IDIOMAR, M.; KARLINSKY, A. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera), **Tissue & Cell**, v.28, n.6, p.741-749, 1996.

SAYAH, F. Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdysone treatment in adult females of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue & Cell**, v.34, n.2, p.53-62, 2002.

SCHAEFER, C.W.; VANDERBERG, J.P.; RHODIN, J. The fine structure of mosquito midgut muscle. **The Journal of Cell Biology**, v.34, n.3, p.905-911, 1967.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review Entomology**, v.35, p.271-297, 1990.

SEHNAL, F.; ZITNAN, D. Midgut endocrine cells. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p.55-85.

SIDIQUI, B.S.; AFSHAN, F.; GULZAR, T.; SULTANA, R.; NAQVI, S.N.; TARIQ, R. M. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.4, p.415-417, 2003.

SILVA, R.A.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; REIS, P.R.; PEREIRA, A.M.A.R.; COSME, L.V. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro a larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) e

efeitos sobre as fases subseqüentes do desenvolvimento do predador. **Neotropical Entomology**, v.34, n.6, p.951-959, 2005.

SNODGRASS, R.E. **Principles of insect morphology**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1993. 573p.

SOUSA, M.E.C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; SIQUEIRA, H.A.A.; SANTOS, F.A.B.; ALVES, L.C. Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009.

SPIES, A.G.; SPENCE, K.D. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. **Tissue & Cell**, v.17, n.3, p.379-394, 1985.

STEINLY, B.A.; BERENBAUM, M. Histopathological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilio polyxenes* and *Papilio glaucus*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v.39, p.3-9, 1985.

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall. 1996. p.86-114.

TERRA, W.R. Evolution of digestive system of insects. **Annual Reviews Entomology**, v.35, p.181-200, 1990.

TERRA, W.R.; COSTA, R.H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.2, p.255-269, 2006.

TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; AMBROSETTI, E.; PONTI, B.; CONGIU, T.; FERRARESE, R.; RIVAS-PENA, M.; PENNACCHIO, F.; EGUILEOR, M. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. **Cell Tissue Research**, n.330, p.345-359, 2007.

TURBECK, B.O. A study of the concentrically laminated concretions, "spherites", in the regenerative cells of the midgut of lepidopterus larvae. **Tissue & Cell**, v.6, n.4, p.627-640, 1974.

UWO, M.F.; UI-TEI, K.; TAKEDA, P.P.M. Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. **Cell Tissue Res.**, n.308, p.319-331, 2002.

VEIGAS Jr., C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VENZON, M.; ROSADO, M.C.; PALLINI, A; FIALHO, A; PEREIRA, C.J. Toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopis connexa*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.42, n.5, p.627-631, 2007.

WAKU, Y.; SUMIMOTO, K. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. Electron microscopy. **Tissue & Cell**, v.6, n.1, p.127-136, 1974.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; CUNHA, F.M.; COSTA, M.K.C.M.; VEIGA, A.F.S.L.; OLIVEIRA, J.V. Histological description of the midgut and the pyloric valve of the *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Brazilian Journal Biology**, p.1045-1049, 2006.

WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insect physiology**. 6.ed. London: Methuen, 1965. 741p.

WOOLFOLK, S.W.; COHEN, A.C.; INGLIS, G.D. Morphology of the alimentary canal of the *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults in relation to microbial symbionts. **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, n.4, p.796-808, 2004.

WOOLFOLK, S.W.; INGLIS, G.D. Microorganisms associated with field-collected *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults with emphasis on yeast symbionts. **Biological Control**, v.29, p.155-168, 2004.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Physiology**, v.19, p.124-128, 2004.

ANEXO

Efeitos do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) nas células do intestino
médio da larva predadora *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera:
Chrysopidae)

Artigo submetido a revista Biological Control: Effects of neem oil (*Azadirachta indica*
A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera:
Chrysopidae). Elton Luiz Scudeler, Daniela Carvalho dos Santos.

Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera: Chrysopidae)

Elton Luiz Scudeler^a, Daniela Carvalho dos Santos^{a,b,*}

^a Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Campus de Botucatu, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

^b Centro de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Campus de Botucatu, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author. Fax: + 55 (14) 3815 3744.

E-mail address: escudeler@ibb.unesp.br (E.L. Scudeler), daniela@ibb.unesp.br (D.C. Santos)

ABSTRACT

The effects of ingested neem oil, a botanical insecticide obtained from the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*, on the midgut cells of predatory larvae of *Ceraeochrysa claveri* were analyzed. *C. claveri* were fed with eggs of *Diatraea saccharalis* treated with neem oil at a concentration of 0.5%, 1% and 2% during the larval period. Light and electron microscopy showed severe damages in columnar cells, which had many cytoplasmic protrusions, clustering and ruptured of the microvilli, swollen cells, ruptured cells, dilatation and vesiculation of rough endoplasmic reticulum, development of smooth endoplasmic reticulum, enlargement of extracellular spaces of the basal labyrinth, intercellular spaces and necrosis. The indirect ingestion of neem oil with prey can result in severe alterations showing direct cytotoxic effect of neem oil on midgut cells of *C. claveri* larvae. Therefore, the notion that plants derived are safer to non-target species must be questioned in future studies.

Keywords: neem oil; lacewings; midgut; morphology; columnar cells.

1. Introduction

Preservation of natural enemies in the agroecosystems is important and necessary to establish an effective biological control, avoiding problems with pesticide resistance

and contributing to a decrease in pesticide dependency, causing less environment and human contamination.

The green lacewing, *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae) is one of the most polyphagous predator commonly found in neotropical agroecosystems where they are considered an important biological control agents (Albuquerque et al., 2001; De Freitas and Penny, 2001; Pappas et al., 2011). Due to the larvae polyphagous feeding habits, green lacewings are natural enemies of several pests, such as whiteflies, thrips, lepidopteran pests, aphids and mites (Pappas et al., 2011).

Neem oil has been thought to be a promising source of natural pesticide as an insect control agent. The major component of neem seed kernel extract is azadirachtin, a tetranortriterpenoid. It combines various ways of action against insects such as antifeedant, growth disrupting, moulting defects, repellency, fecundity and fitness-reducing properties on many insect species (Rembold, 1989; Schmutterer, 1990; Mordue (Luntz) and Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) and Nisbet, 2000; Morgan, 2009). Neem oil and its components, taken together, have direct effects on midgut and a variety of tissues and organs (Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993; Sayah et al., 1996; Nogueira et al., 1997; Lucantoni et al., 2006; Ghazawi et al., 2007; Ndione et al., 2007; Correia et al., 2009; Roel et al., 2010).

Due to their selectivity, neem products can be recommended for many integrated pest management (IPM) programs, and besides their impact in natural enemies has been questioned (Qi et al., 2001; Ahmad et al., 2003; Medina et al., 2003; Aggarwal and Brar, 2006; Cordeiro et al., 2010), the use of neem oil associated with green lacewing for many IPM programs seems to be an excellent strategy for the sustainable agriculture.

There are many studies focused on the bioassay of neem products against insect-pests (Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993; Sayah et al., 1996; Nogueira et al., 1997; Lucantoni et al., 2006; Ghazawi et al., 2007; Ndione et al., 2007; Correia et al., 2009; Roel et al., 2010), but little is known about the toxicity of these products in natural enemies and their action mechanism on the green lacewing midgut.

The present study aims to investigate the effects of neem oil in the midgut cells of *Ceraeochrysa claveri* larvae by light and electron microscopy. This study could be used to evaluate the viability of associated use of neem oil and the green lacewing in the pest management programs.

2. Materials and methods

2.1. Insect

Freshly hatched larvae of green lacewings (*C. claveri*) were obtained from the stock of the Insect Laboratory in the Department of Morphology at the Institute of Bioscience at UNESP, Botucatu, Brazil. They were kept in an environmental chamber, with controlled temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity about 70%, and 12 h photoperiod.

2.2. Bioassays

Neem oil (*A. indica*) (commercial formulation Natuneem®) was diluted in distilled water to 0.5% (5 ml/l), 1% (10 ml/l) and 2% (20 ml/l) respectively. Fresh eggs of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) were immersed in the solutions (5 s) and dried at room temperature (1 h).

Freshly hatched green lacewings were placed individually into polyethylene cages (2 cm height x 6 cm diameter). *C. claveri* larvae were feeding by *D. saccharalis* eggs treated with neem oil (treated group) and treated with water only (control group) during the larval period. Each dose replicated three times with 15 larvae in each replication.

2.3. Light microscopy

Larvae of *C. claveri* (the third day of third instar) obtained from the control and treated groups were cryoanesthetized briefly and dissected in insect saline solution (0.1M NaCl, 0.1M Na_2HPO_4 and 0.1M KH_2PO_4). The midgut was isolated and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) for 24 h. After dehydration in graded ethanol series, the midgut was embedded in glycol methacrylate (Historesin-Leica) and sections of 3 μm were cut on Leica RM 2045. The sections were stained with hematoxylin-eosin (Pearse, 1972), analyzed and photographed with a Zeiss Axioskop 40 microscope.

2.3.1. TUNEL assay

The midgut was fixed in 10% formalin for 24h, dehydrated in a series of alcohols and xylene, and embedded in paraffin wax. Sections of 5 μ m were cut on a Leica RM 2045 microtome and mounted on slides. Dewaxed and hydrated tissue sections were rinsed in tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, pH 7.6, 140 mM NaCl) and incubated in permeabilization solution (2 mg/ml Proteinase K in 10 mM Tris pH 8). Further procedures were conducted in accordance with test Kit protocols (TdT-FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem[®]). Diaminobenzidine (DAB) substrate was applied onto the tissue sections to develop a brown reaction product. The sections were counterstained with methyl green. Negative control labeling was prepared according to Kit protocol (TdT-FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem[®]). Slides were examined with a Zeiss Axioskop 40 microscope.

2.4. Electron microscopy

Larvae of *C. claveri* (the third day of third instar) obtained from the control and treated groups were cryoanesthetized briefly and dissected in insect saline solution (0.1M NaCl, 0.1M Na₂HPO₄ and 0.1M KH₂PO₄).

2.4.1. Scanning electron microscopy (SEM)

For scanning electron microscopy, the midgut fragments were fixed for 48 h at room temperature in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) and washed in distilled water. They were the post-fixed in 1% osmium tetroxide diluted in distilled water, dehydrated through a graded series of ethanol, critical point-dried with CO₂, coated with gold and examined in a Quanta 200 scanning electron microscope.

2.4.2. Transmission electron microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy studies, the midgut fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) for 24 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h, dehydrated in graded acetone series, and embedded in Araldite[®] resin. Ultra-thin

sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then analyzed using a Philips CM100 transmission electron microscope.

3. Results

The midgut wall is composed by a pseudostratified columnar epithelial tissue with acidophilic brush border supported by muscular layers composed of bundles of inner circular and outer longitudinal muscles. There are few cytoplasmic protrusions in the apex of columnar cells of the control group and in the basal region of the epithelium, regenerative cells, with strongly basophilic cytoplasm were found (Fig. 1A).

In the experimental group, we observed several cytoplasmic protrusions in the swollen and vacuolated columnar cells, we also detected intercellular spaces between these cells and lyses occurrence (Figs. 1B-D). In neem oil-treated larvae, the TUNEL detection is negative for columnar cells nucleus (Figs. 1E and F).

The general appearance of the apical surface of midgut epithelial cells of untreated *C. claveri* larvae is shown in the scanning electron microscope in Fig. 2A. Midgut epithelium shows a few apical cytoplasmic protrusions and microvilli are densely packed on the surface of the columnar cells. In insects that have ingested neem oil, the epithelial surface is heterogeneous (Fig. 2B). Many columnar cells produced spherical cytoplasmic protrusions above the luminal surface; microvilli are clustered and it is possible to see many swollen columnar cells ruptured, releasing a granular debris of cellular materials (Fig. 2C). It can be seen that most columnar cells microvilli are sparse and prominent (Fig. 2D).

Transmission electron microscopy shows that columnar cells of untreated *C. claveri* is characterized by numerous microvilli and large quantities of mitochondria, lysosomes and lipid droplets in the apical cytoplasm (Fig. 3A). Rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, spherites, glycogen, mitochondria and some endosymbiont bacteria occur in the perinuclear region of the columnar cells (Fig. 3B). The basal region of the columnar cells is characterized by narrow channels formed by infoldings of plasma membrane forming the basal labyrinth. Mitochondria, lipid droplets and glycogen are often associated with basal labyrinth (Fig. 3C). The regenerative cells are found in groups (nidi) in the basal region of the epithelium. They contained a granular cytoplasm, little rough endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid droplet, glycogen and some endosymbiont bacteria (Fig. 3D).

When treated with neem oil, columnar cells developed severe pathologic changes. The microvilli are ruptured and they are reduced in number (Fig. 4A). Cytoplasmic protrusions are filled with cytoplasmic material, but revealed many lipid droplets and vacuoles with electron-lucent content (Fig. 4B). After neem oil administration, the rough endoplasmic reticulum is dilated and fragmented in the apical cytoplasm and smooth endoplasmic reticulum increased in the supranuclear cytoplasm (Fig. 4C and D). The strongly fragmented and scattered rough endoplasmic reticulum contributes to the vacuolated appearance of apical cytoplasm. Multivesicular bodies are seen in the cytoplasm (Fig. 5A). Myelinic structures emerged and accumulated in basal cytoplasm (Fig. 5B). The basal region showed development of large extracellular spaces associated with few mitochondria and glycogen (Fig. 5C). The disruption of junctional complexes among midgut cells created intercellular spaces with flocculated material (Fig. 5D).

4. Discussion

The columnar cells, also described as digestive cells or enterocytes showed morphological characteristics of absorptive and secretory cells that include conspicuous microvilli, numerous mitochondria, Golgi complex, rough endoplasmic reticulum, spherites and channel formed by infoldings of plasma membrane forming the basal labyrinth indicating high metabolic activity (Woolfolk et al., 2004; Fialho et al., 2009; Sousa et al., 2009). Spherites or spherocrystals are associated with absorption and storage of ions, as observed in *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) by Fialho et al. (2009), in *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae) by Azevedo et al. (2009) and *Triatoma vitticeps* (Hemiptera: Reduviidae) by Rocha et al. (2010).

Endosymbiotic bacteria, or intracellular symbiont were called by Caetano et al. (2009) as endocytobionts occur inside digestive cells of midgut *Odontomachus bauri* (Hymenoptera: Formicidae). These authors suggest that the role of this endocytobionts in the life cycle of the insect may have high variability and may participate in digestion of food, acting as symbiotic organisms and may also represent an opportunity to explore new food resources of the environment.

In this study, the observations of symptoms indicated ultrastructural changes in microvilli, rupture of plasma membrane, vacuolization of the cytoplasm, cell hypertrophy, formation and expansion of intercellular spaces and other initial effects of

necrosis are similar to the observations caused by the administration of neem oil or plant-derived compounds in columnar cells (Steinly and Berenbaum, 1985; Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993; Rey et al., 1999; Ndione et al., 2007; Correia et al., 2009; Roel et al., 2010; Almehmadi, 2011).

The TUNEL reaction (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling dUDP) confirmed that the changes generated by the ingestion of neem oil by larvae of *C. claveri* did not induce cell death by apoptosis, once we did not find differences in the number of apoptotic cells between treated and control groups. The markings in situ of the ends of DNA strands cleaved during apoptosis by TUNEL technique that allows marking apoptotic cells in a distinct pattern before the onset of morphological changes, which have a limited observation time (Gavrieli et al., 1992; Hockenbery, 1995).

Ultrastructural changes in the microvilli are related to changes in actin microfilaments, as observed by Percy and Fast (1983) and Nogueira et al. (1997). Nogueira et al. (1997) reported the absence of bundles of actin microfilaments within the microvilli after ingestion of azadirachtin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). According to Cheville (1994, 2009) after progressive cell swelling of injured cells, the cell surface becomes disorganized and microvilli become irregular or are lost from the cell.

Few ultrastructural studies indicate lesions on the apical surface of columnar cells observed with scanning electron microscopy (SEM) (Griego et al., 1980; Spies and Spence, 1985; Chiang et al., 1986; Nogueira et al., 1997). The most observed correspond to reduction in number of the microvilli and their disorganization, becoming scarce in some prominent focal points and swollen of the apical surface, formation and release of different types and formats of cytoplasmic protrusions toward the lumen, cells ruptured, that may characterize the occurrence of necrosis.

Nogueira et al. (1997) showed with SEM that after ingestion of azadirachtin by *R. prolixus* the midgut epithelial surface was not homogeneous, once the columnar cells presented clustered microvilli, giving a wrinkled appearance to the epithelial surface. Effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin assessed in SEM showed lesions similar to those described in our treatments. Griego et al. (1980) reported in *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) a length reduction of microvilli after 1 hour of treatment with *B. thuringiensis*. Spies and Spence (1985) found in *M. sexta* reduction in the number and length of microvilli and they were sparse and irregular, and the production of

cytoplasmic protrusions. Chiang et al. (1986) also observed in *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae) infected with *B. thuringiensis* loss of microvilli, swollen of columnar cells, thus eliminating protrusions and cell lysis releasing their cytoplasmic contents.

The formation of cytoplasmic protrusions in cells that are in the process of necrosis is associated with loss of control of water influx across the cytoplasmic membrane, but that does not always cause the rupture of the membrane (Rello et al., 2005). We can also associate the loss of integrity and cytoskeletal reorganization with changes in the formation of microvilli and cytoplasmic protrusions (Percy and Fast, 1983; Cheville, 1994, 2009; Hacker, 2000; Proskuryakov et al., 2003).

Similar to apoptosis, where a large number of structural proteins such as gelsolin, actin is cleaved by caspases, in necrosis proteolytic enzymes can also be activated, causing the lethal signal transduction cascade through caspases, leading to destruction of several protein targets, among them the cytoskeleton, causing the support network of the cytoskeleton disappearing in irregular areas, creating points of weakness in the cytoplasmic matrix, leading to formation of protrusions on the surface (Cheville, 1994, 2009; Borner and Monney, 1999; Hacker, 2000; Leist and Jäätelä, 2001; Proskuryakov et al., 2003). Anuradha et al. (2007) showed that azadirachtin A induces depolymerization of actin, causing severe defects in the organization of the cytoskeleton.

Cellular hypertrophy commonly observed in columnar cells subjected to treatments with oils, plant-derived and toxins, which originates apical swollen corresponds to the first change in acute injury cells caused by the expansion of cell volume due to loss of control in the ionic balance and influx water (Percy and Fast, 1983; Bauer and Pankratz, 1992; Cheville, 1994, 2009). We believe that components of neem oil can lead changes in ionic balance, which are related changes observed in the basal labyrinth of columnar cells as described in *C. claveri* and *R. prolixus* by Nogueira et al. (1997). *Bacillus thuringiensis* also causes changes in the basal labyrinth, usually increasing the surface membrane or extracellular space, may be indicative of an increase in the transport of excess fluid to hemocoel (De Lello et al., 1984; Bauer and Pankratz, 1992).

In this study, it was possible to characterize a set of ultrastructural changes in cytoplasmic organelles of columnar cells throughout the midgut, according to proportional intensities of the concentrations of neem oil ingested: dilatation and

fragmentation of rough endoplasmic reticulum and development of the smooth endoplasmic reticulum, appearance of myelin figures, many of these changes are similar to those described in studies with azadirachtin (Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993), plant derived (Jing et al., 2005; Lü et al., 2010; Qi et al., 2011) and *B. thuringiensis* (Percy and Fast, 1983; De Lello et al., 1984; Bauer and Pankratz, 1992). These changes together with changes in level of cytoplasmic membrane and cytoskeleton, such as cell swelling, loss of microvilli, formation of cytoplasmic protrusions, intercellular spaces and disruption of the cytoplasmic membrane are very diverse evidence of the process of cell degeneration by necrosis (Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993; Cheville, 1994, 2009; Proskuryakov et al., 2003; Gregorc et al., 2004; Ziegler and Groscurth, 2004; Rello et al., 2005; Rost-Roszkowska et al., 2008).

Dilatation of the endoplasmic reticulum and therefore loss of electron density is an early sign of injury in most cells, which can subsequently lead the fragmentation of the membranes of the endoplasmic reticulum into vesicles, leading to vacuolization of the cytoplasm (Endo and Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Nasiruddin and Mordue (Luntz), 1993; Cheville, 1994, 2009; Jing et al. 2005; Qi et al., 2011).

The observation of columnar cells with smooth endoplasmic reticulum developed mainly in the supranuclear and perinuclear region indicates the occurrence of chronic toxicity in this organ, indicating a possible attempt to detoxify these cells (Cheville, 1994, 2009) or adapted to this occurrence of injury compared to the toxic compounds exposed for long periods (Hutterer et al., 1968). We believe that due to the fact that we observed only smooth endoplasmic reticulum in the groups submitted to treatment with neem oil, this would be a possible answer in an attempt detoxification because it is a case of chronic exposure, the cell has enough time to respond toxic compounds ingested by larvae.

We observed that in some groups of *C. claveri* treated with neem oil spotty areas with the occurrence of myelin figures, which according to Cheville (1994, 2009) correspond to irregular fragments of the endoplasmic reticulum membrane that aggregate and reorient into laminar arrangement and occurs when the endoplasmic reticulum degenerates, they were more frequent in cells with much endoplasmic reticulum. Lü et al. (2010) also make mentions of myelin figures in midgut of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) treated with fraxinellone.

The formation of intercellular spaces and detachment from basement membrane of columnar cells found in the treatment of *C. claveri* with neem oil has also been

reported in several treatments with neem oil (Ndione et al., 2007; Correia et al., 2009), tannin (Steinly and Berenbaum, 1985; Rey et al., 1999) and boric acid (Cruz et al., 2010). We believe that junctional complexes are disrupted, allowing the formation of these spaces, so that Steinly and Berenbaum (1985) and Rey et al. (1999) described in their work. Cheville (1994, 2009) mentions that during acute cell swelling, cell junctions can be disintegrated and the cells lose their normal cohesion with neighboring cells.

It is clear from the results of this study that the indirect ingestion of neem oil with prey can result in severe alterations observed at the ultrastructural level showing direct cytotoxic effect of neem oil on midgut cells of *C. claveri* larvae. Therefore, the notion that plants derived are safer to non-target species must be questioned in future studies.

Acknowledgments

We thank the Centro de Microscopia Eletrônica (CME), principally Tiago dos Santos Tardivo, Claudete dos Santos Tardivo and Ligia Barbosa Costa for helping in processing material used. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- Aggarwal, N., Brar, D.S., 2006. Effects of different neem preparations in comparison to synthetic insecticides on the whitefly parasitoid *Encarsia Sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae) and the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) on cotton under laboratory conditions. J. Pestic. Sci. 79, 201-207.
- Ahmad, M., Oßiewatsch, H.R., Basedow, T., 2003. Effects of neem-treated aphids as food/hosts on their predators and parasitoids. J. Appl. Entomol. 127, 458-464.
- Albuquerque, G.S., Tauber, C.A., Tauber, M.J., 2001. *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa* spp.: potential for biological control in the New World tropics and subtropics. In: McEwen, P.K., New, T.R., Whittington, A.E. (Eds.), *Lacewings in the crop environment*, Cambridge University Press, Cambridge, pp.408-423.

- Almehmadi, R.M., 2011. Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). J. Entomol. 8, 63-72.
- Anuradha, A., Annadurai, R.S., Shashidhara, L.S., 2007. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 627-634.
- Azevedo, D.O., Neves, C.A., Mallet, J.R.S., Gonçalves, T.C.M., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2009. Notes on midgut ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). J. Med. Entomol. 46 (3), 435-441.
- Bauer, L.S., Pankratz, H.S., 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. J. Invertebr. Pathol. 60, 15-25.
- Borner, C., Monney, L., 1999. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? Cell Death Differ. 6, 497-507.
- Caetano, F.H., Bution, M.L., Zara, F.J., 2009. First report of endocytobionts in the digestive tract of ponerine ants. Micron 40, 194-197.
- Cheville, N.F., 1994. Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation, Iowa State University Press, Ames, 946p.
- Cheville, N.F., 2009. Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease, 2 ed, Willey-Blackwell, Ames, 973p.
- Chiang, A.S., Yen, D.F., Peng, W.K., 1986. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thruringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 47, 333-339.
- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Venzon, M., Guedes, R.N.C., 2010. Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. Chemosphere 81, 1352-1357.
- Correia, A.A., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Oliveira, J.V., Torres, J.B., 2009. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. Neotrop. Entomol. 38, 83-91.
- Cruz, A.S., Silva-Zacarin, E.C.M., Bueno, O., Malaspina, O., 2010. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. Cell Biol. Toxicol. 26, 165-176.

- De Freitas, S., Penny, N.D., 2001. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 52 (19), 245-395.
- De Lello, E., Hanton, W.K., Bishoff, S.T., Misch, D.W., 1984. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): low doses compared with fasting. *J. Invertebr. Pathol.* 43, 169-181.
- Endo, Y., Nishiitsutsuji-Uwo, J., 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.* 36, 90-103.
- Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., 2009. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102 (1), 119-127.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (3), 493-501.
- Ghazawi, N.A., El-Shranoubi, E.D., El-Shazly, M.M., Abdel Rahman, K.M., 2007. Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). *J. Orthopt. Res.* 16, 57-65.
- Gregorc, A., Pogacnik, A., Bowen, I.D., 2004. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35, 453-460.
- Griego, V.M., Fancher, L.J., Spence, K.D., 1980. Scanning electron microscopy of the disruption of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, midgut by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.* 35, 186-189.
- Hacker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5-17.
- Hockenbery, D., 1995. Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* 146, 16-19.
- Hutterer, F., Schaffner, F., Klion, F.M., Popper, H., 1968. Hypertrophic, hypoactive smooth endoplasmic reticulum: a sensitive indicator of hepatotoxicity exemplified by dieldrin. *Science* 161, 1017-1019.
- Jing, L., Fang, Y., Ying, X., Wenxing, H., Meng, X., Syed, M.N., Fang, C., 2005. Toxic impact of ingested jatropherol-I on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Appl. Entomol.* 129 (2), 98-104.
- Leist, M., Jäätelä, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589-598.

- Lü, M., Wu, W.J., Liu, H.X., 2010. Effects of fraxinellone on the midgut ultrastructural changes of *Mythimna separata* Walker. *Pesticide Biochem. Phys.* 98, 263-268.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A., 2006. Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell* 38, 361-371.
- Medina, P., Smagghe, G., Budia, F., Tirry, L., Viñuela, E., 2003. Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 32, 196-203.
- Mordue (Luntz), A.J., Blackwell, A., 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39 (11), 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J., Nisbet, A.J., 2000. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Ann. Soc. Entomol. Bras.* 29 (4), 615-632.
- Morgan, E.D., 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4096-40105.
- Nasiruddin, M., Mordue (Luntz), A.J., 1993. Effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue Cell* 25 (6), 875-884.
- Ndione, R.D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Afoutou, J.M., 2007. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (24), 2846-2854.
- Nogueira, N.F.S., Gonzales, M., Garcia, E.M., Souza, W., 1997. Effect of Azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 58-63.
- Pappas, M.L., Broufas, G.D., Koveos, D.S., 2011. Chrysopid predators and their role in biological control. *J. Entomol.* 8 (3), 301-326.
- Pearse, A.G.E., 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*, 3 ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 759p.
- Percy, J., Fast, P.G., 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effects on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 86-98.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283, 1-16.

- Qi, B., Gordon, G., Gimme, W., 2001. Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol. Control* 22, 185-190.
- Qi, Z.J.; Shi, B.J., Hu, Z.N., Zhang, Y., Wu, W.J., 2011. Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separata* walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (3), 439-44.
- Rello, S., Stockert, J.C., Moreno, V., Gámez, A., Pacheco, M., Juarranz, A, Cañete, M., Villanueva, A., 2005. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* 10 (1), 201-208.
- Rembold, H., 1989. Azadirachtin: their structure and mode of action. In: Arson, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Eds.). *Insecticides of plant origin*. American Chemical Society, Washington, DC, pp.150-163.
- Rey, D., Pautou, M.P, Meyran, J.C., 1999. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic dipteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 173-181.
- Rocha, L.L.V., Neves, C.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2010. Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *C. R. Biologies* 333, 405-415.
- Roel, A.R., Dourado, D.M., Matias, R., Porto, K.R.A., Bednaski, A.V., Costa, R.B., 2010. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Entomol.* 54 (3), 505-510.
- Rost-Roszkowska, M.M., Poprawa, I., Klag, J., Migula, P., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W., 2008. Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna* cf. *nylanderi* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. *Can. J. Zool.* 86, 1179-1188.
- Sayah, F., Fayet, C., Idiomar, M., Karlinsky, A., 1996. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera), *Tissue Cell* 28 (6), 741-749.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Ann. Rev. Entomol.* 35, 271-297.
- Sousa, M.E.C., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Siqueira, H.A.A., Santos, F.A.B., Alves, L.C., 2009. Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. *Micron* 40, 743-749.

- Spies, A.G., Spence, K.D., 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. *Tissue Cell* 17 (3), 379-394.
- Steinly, B.A., Berenbaum, M., 1985. Histopathological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilio polyxenes* and *Papilio glaucus*. *Entomol. Exp. Appl.* 39, 3-9.
- Woolfolk, S.W., Cohen, A.C., Inglis, G.D., 2004. Morphology of the alimentary canal of the *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults in relation to microbial symbionts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97(4), 796-808.
- Ziegler, U., Groscurth, P., 2004. Morphological features of cell death. *Physiology* 19, 124-128.

LEGENDS OF FIGURES

Fig.1. Section of the midgut (control and treated) of *Ceraeochrysa claveri*. (A) General aspect of midgut epithelium (control) of *C. claveri* larvae: columnar cells (C) with vacuoles in the basal region, nucleus (N), striated border (B), little cytoplasmic protrusions (P); lumen (L); regenerative cells (R); longitudinal muscle (Lm). (B-D) Light microscopy of midgut epithelial cells of neem oil treated *C. claveri* (2 %). Notice several cytoplasmic protrusions (P) in the swollen and vacuolated columnar cells (C); intercellular spaces (Is); lysis (arrowhead). Hematoxylin-eosin stain. (E) Detection of apoptotic cells in the midgut epithelium (control) of *C. claveri* larvae. TUNEL-positive nucleus of the columnar cell is stained in brown (arrow); TUNEL-negative nucleus is stained in blue (N). (F) Detection of apoptotic cells in midgut epithelium of *C. claveri* larvae after ingestion of neem oil (2%). Absence of nucleus of the columnar cells TUNEL-positive; nucleus of muscle cell TUNEL-positive (arrow). Circular muscle (Cm); muscle fiber (Mf); peritrophic membrane (Pm). Bars = 20 µm.

Fig.2. SEM micrographs of surface of the midgut (control and treated). (A) Scanning electron microscopy showing the surface of the midgut epithelium (control) of *Ceraeochrysa claveri* larvae. Microvilli (Mv) were well-developed and continuous throughout the apex of the columnar cells; few cytoplasmic protrusions (P). Bar = 15 µm. (B) Scanning electron microscopy of midgut epithelial cells of neem oil treated *C. claveri* (0.5%). Columnar cells showed clustered microvilli (*) and many cytoplasmic protrusions (P). Bar = 5 µm. (C) Midgut epithelial cells of neem oil treated *C. claveri*

(1%). Swollen columnar cells were in evidence with clustered microvilli (*). Rupture of the apical cell wall (arrows). Bar = 20 μm . (D) Apical region of the columnar cells of neem oil treated *C. claveri* (2%). Sparse and prominent microvilli (*). Bar = 3 μm .

Fig.3. Transmission electron micrographs of the midgut epithelium (control) of *Ceraeochrysa claveri* larvae. (A) Apical region of the columnar cell showing long microvilli (Mv), many mitochondria (Mi), lysosomes (Ly), lipid droplets (Li). Bar = 0.5 μm . (B) General view of the perinuclear region of the columnar cell: rough endoplasmic reticulum (Rer) with well-developed cisternae, spherites (S), mitochondria (Mi), glycogen (Gl), Golgi complex (Gc), endosymbiont bacteria (Bac). Bar = 1 μm . (C) Basal region of the columnar cells showing the basal labyrinth (Bl) with narrow extracellular space attached with a large number of mitochondria (Mi), glycogen (Gl) and lipid droplets (Li). Bar = 1 μm . (D) Regenerative cells showing a granular cytoplasm, with central nucleus (N), mitochondria (Mi), rough endoplasmic reticulum (Rer), stock of glycogen (Gl), endosymbiont bacteria (Bac). Columnar cell (C); basal lamina (B); muscle fiber (Mf). Bar = 1 μm .

Fig.4. The ultrastructure changes in the columnar cell of *C. claveri* larvae after ingestion of neem oil. (A) Neem oil, 0.5%. Microvilli (Mv) ruptured and the quantities decreased. Bar = 0.25 μm . (B) Neem oil, 0.5%. Electron micrograph of protrusion showing small vacuoles (Va) with electron-lucent content; many lipid droplets (Li) and mitochondria (Mi). Bar = 3 μm . (C) Neem oil, 2%. Apical cytoplasm containing dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum (Rer) and small secretory granules (Sg). Bar = 0.5 μm . (D) Neem oil, 0.5%. supranuclear cytoplasm showing development of the smooth endoplasmic reticulum (Ser). Rough endoplasmic reticulum (Rer). Bar = 0.1 μm .

Fig.5. The ultrastructure changes in the columnar cell of *C. claveri* larvae after ingestion of neem oil, 2%. (A) Middle region showing extreme dilatation and vesiculation of rough endoplasmic reticulum (Rer); multivesicular bodies (Mvb); electron-dense mitochondria (Mi) with blurred cristae. Bar = 0.5 μm . (B) Basal region showing numerous myelinic structures (Ms). Bar = 1 μm . (C) Basal region showing basal labyrinth (Bl) with large extracellular spaces associated with few mitochondria (Mi) and glycogen (Gl). Basal lamina (B); muscle fiber (Mf). Bar = 1 μm . (D) Basal region of the midgut epithelium presents intercellular spaces (Is) between columnar (C) and

regenerative cells (R). Lipid droplet (Li); glycogen (Gl); nucleus (N); endocrine cell (Ec); basal lamina (B). Bar = 2 μ m.

FIGURE 1

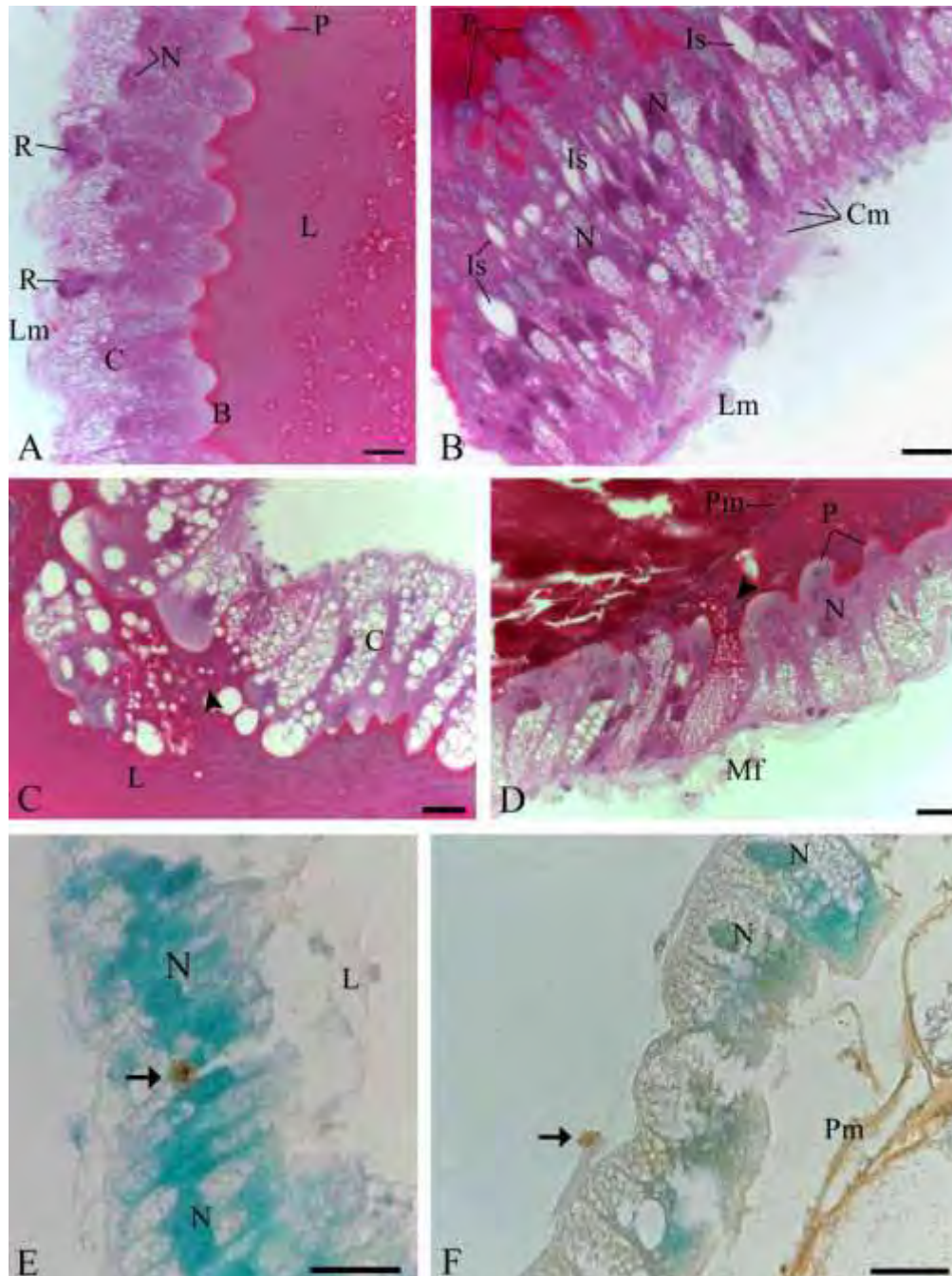


FIGURE 2

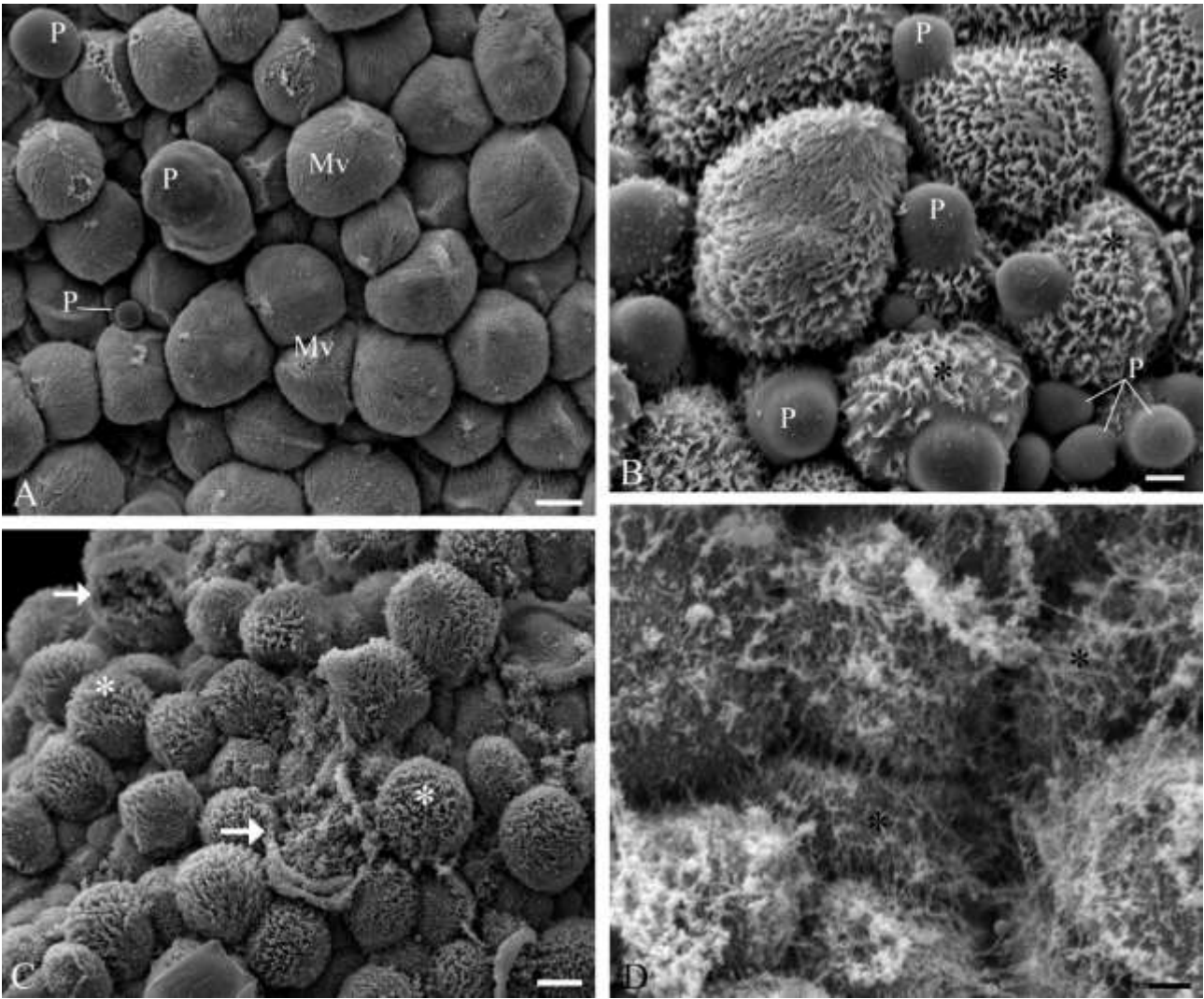


FIGURE 3

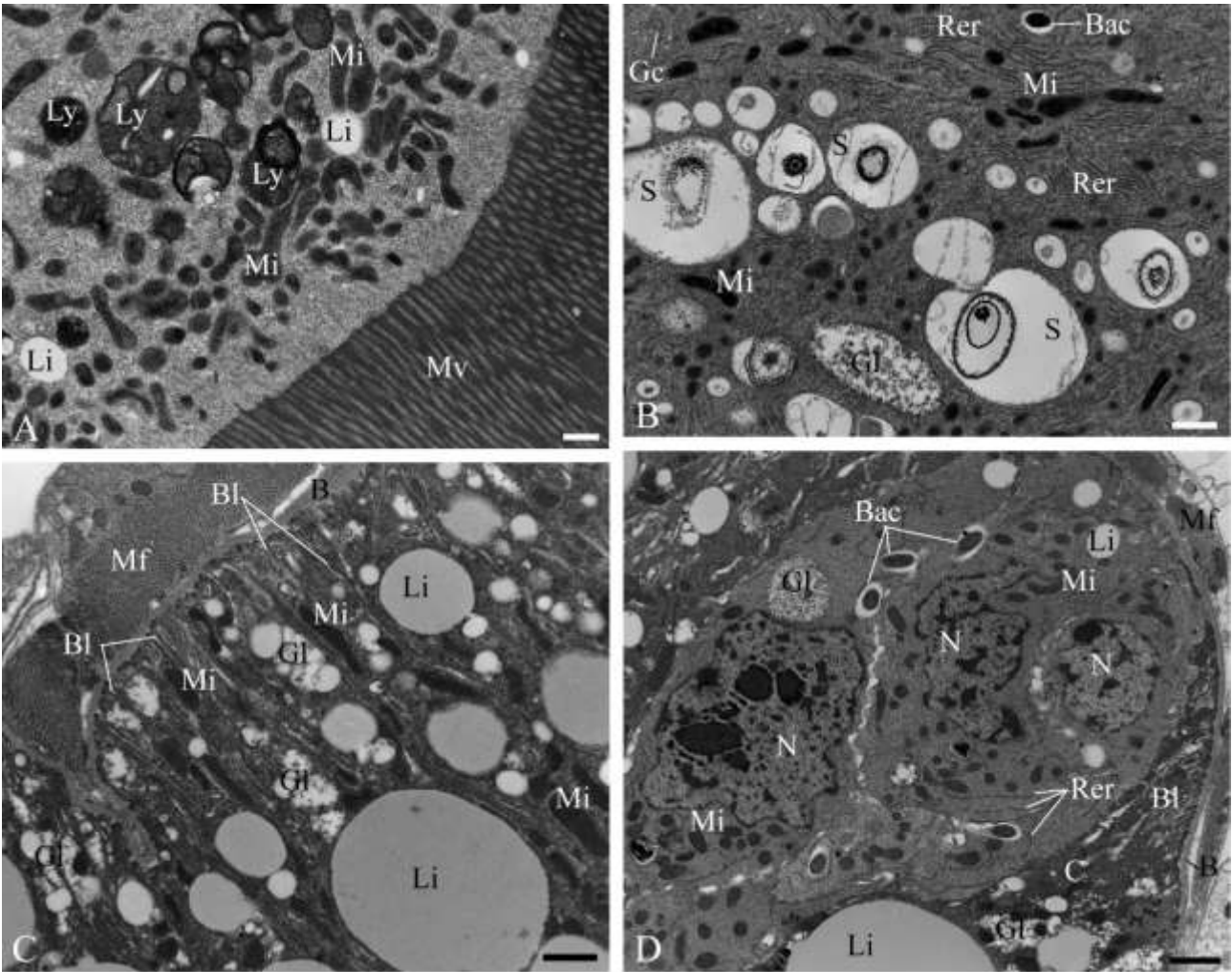


FIGURE 4

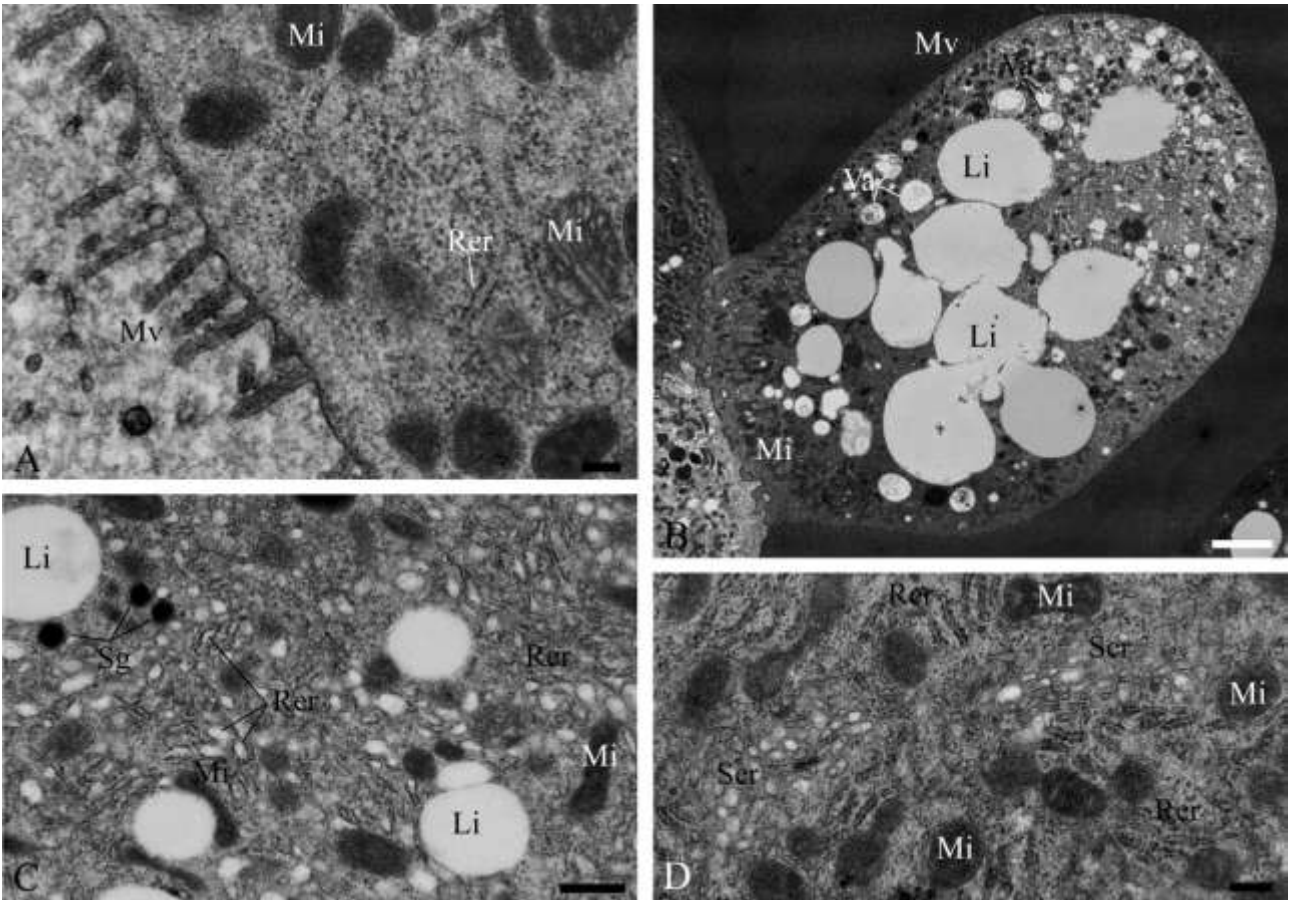


FIGURE 5

