

TOXICIDADE DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica* A. JUSS) NA
ESPERMATOGÊNESE DE *Ceraeochrysa claveri* (NAVÁS, 1911)
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE): ESTUDO CITOQUÍMICO,
IMUNOCITOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL

ANA SILVIA GIMENES GARCIA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

BOTUCATU – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

TOXICIDADE DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica* A. JUSS) NA
ESPERMATOGÊNESE DE *Ceraeochrysa claveri* (NAVÁS, 1911)
(NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE): ESTUDO CITOQUÍMICO,
IMUNOCITOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL

ANA SILVIA GIMENES GARCIA

Orientadora: Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Co-Orientadora: Profª Drª Daniela Carvalho dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional.

**BOTUCATU – SP
2014**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Garcia, Ana Silvia Gimenes.

Toxicidade do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) na
espermatogênese
de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae) : estudo
citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural / Ana Silvia Gimenes Garcia.
- Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientadora: Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Co-orientadora: Daniela Carvalho dos Santos

Capes: 20100000

1. Nim. 2. Toxicidade - Testes. 3. Insetos como agentes de controle
biológico de pragas. 4. Crisopideo. 5. Pragas - Controle integrado. 6.
Inseticidas biológicos.

Palavras-chave: *Ceraeochrysa claveri*; Morfologia; Óleo de nim; Testículos.

Dedicatória

A minha formação pessoal e profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus pais **Orlando** e **Silvia**, que além de ter me dado todo carinho e amor, nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e sempre me apoiaram e incentivaram em todas as minhas decisões. Por essa razão, gostaria de dedicar este trabalho e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor!

Agradecimientos

Agradeço imensamente a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui. Sem vocês eu não teria conseguido! Agradeço:

Minha família, especialmente meus pais e minhas irmãs Selma e Tatiane, por compreenderem minha ausência em vários momentos, e pelo incentivo durante essa caminhada. Ao demais, muito obrigada por todo carinho e incentivo (não vou citar nomes para não esquecer de ninguém!).

Meu noivo Bruno, por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desistir dos meus sonhos!

Prof^a Dr^a Daniela Carvalho dos Santos, que sempre me apoiou e guiou em diversos momentos dessa caminhada. Agradeço imensamente a tudo que aprendi com você, profissional e pessoalmente, e pela amizade que construímos durante esses anos!

Prof^a Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, pela disponibilidade, atenção e amizade. Sem você este trabalho não teria se realizado!

Prof^a Dr^a Silvia Machado e Prof^a Dr^a Tatiane Rodrigues, por todos os ensinamentos, auxílios e amizade durante esses anos.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 2012/02879-7).

Ao Marino e funcionários do laboratório CETMA - Comércio de Agentes para Controle Biológico Ltda., Lençóis Paulista-SP, pelo fornecimento de material biológico utilizado neste trabalho.

Funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica: Carolina, Claudete, Ligia, Maria Helena, Rodrigo, Shelly e Tiago. Muito obrigada por toda a ajuda no processamento do material, ensinamentos, companheirismo e amizade durante esse processo. Vocês fizeram do laboratório minha segunda casa!

Técnicos do Departamento de Morfologia: Vicente, José Eduardo e Keila. Agradeço pelos ensinamentos, apoio técnico e amizade.

Aos demais funcionários do IB: Luciana, Gelson, funcionários da Pós-graduação e da biblioteca, muito obrigada pela atenção e serviços prestados!

Funcionárias da limpeza, Dominique e Edna, obrigada pela amizade, companheirismo nesses anos!

Aos amigos Bruno (tio), Priscila e Rafael, obrigada por todo o apoio e companheirismo em nosso primeiro ano em Botucatu, vocês foram minha família aqui!

Aos amigos de longa data: Fernando (tio), Rafael e Vanessa, obrigada por sempre me apoiarem e compreenderem minha ausência, mas nunca deixar abalar nossa amizade!

Às primeiras amigas que fiz em Botucatu, Andrea e Paloma. Obrigada pela amizade e apoio!

Aos amigos do departamento: Adauto, Bianca, Brenda, Diego, Érica, Juliana, Julio, Talita, obrigada pelas inúmeras risadas, e acima de tudo, pela amizade!!!

A meu colega de laboratório, Elton: só tenho a agradecer por tudo o que você me ensinou nesses anos e pela sincera amizade. Muito obrigada!

“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas.
É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá.
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar...”
(Caminhos do coração – Gonzaguinha)

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	15
3.1. Material Biológico	16
3.2. Instalação dos Bioensaios	17
3.3. Coleta e processamento dos testículos	17
3.3.1. Técnicas para análise em Microscopia de Luz	18
3.3.1.1. Análise citoquímica	18
3.3.1.2. Análise imunocitoquímica	19
3.3.2. Técnicas para análise Ultraestrutural	20
3.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	20
3.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4. Resultados	22
4.1. Capítulo 1	24
Morfologia do testículo e espermatogênese em <i>Ceraeochrysa claveri</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	
4.2. Capítulo 2	52
Efeito do óleo de nim (<i>Azadirachta indica</i>) na espermatogênese de <i>Ceraeochrysa claveri</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	
5. Conclusões	77
6. Referências	79

Resumo

O uso da agricultura orgânica vem crescendo devido à conscientização da sociedade sobre a importância do consumo de alimentos livres de agrotóxicos e inseticidas tão prejudiciais à saúde. Assim, a busca pela preservação dos recursos naturais também está em crescimento, juntamente com a agricultura orgânica e do manejo integrado de pragas. Na busca por insetos que possam ser utilizados no controle biológico, sendo esta uma importante ferramenta na agricultura orgânica e manejo integrado de pragas, os crisopídeos vem se mostrando um forte agente controlador, uma vez que suas larvas são predadoras de diversos ovos e larvas de insetos pragas de diferentes culturas comerciais. Com o propósito de avaliar o efeito do óleo de nim, um extrato vegetal com propriedades bioinseticidas, sobre os crisopídeos, ovos de *Diatraea saccharalis* foram tratados com óleo de nim em três diferentes concentrações e oferecidos como alimento a larvas de *Ceraeochrysa claveri*, avaliando deste modo o efeito da ingestão do óleo de nim na fase larval sobre a morfologia do testículo durante o desenvolvimento de *C. claveri*, assim como sobre o processo de espermatogênese deste predador. Foram utilizadas a análise histológica, ultraestrutural e imunocitoquímica para a avaliação da toxicidade do óleo de nim sobre as células do testículo de *C. claveri*; sendo esta avaliação realizada em testículos de larvas de terceiro instar, pupas e adultos. As análises demonstraram que a morfologia dos testículos varia de arredondado em larvas, para alongado em pupas e espiralado em adultos, enquanto sua coloração varia de esbranquiçado a amarelo intenso, respectivamente. Os testículos são recobertos por túnica externa e túnica interna, esta última emitindo septos, que dividem o testículo em dois folículos. As células germinativas são agrupadas em cistos, rodeados por células císticas somáticas. Esses cistos são constituídos por espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides. As espermatogônias sofrem divisão mitótica e dão origem aos espermatócitos; as células dos cistos são interligadas por canais circulares, que permitem seu desenvolvimento sincrônico. Os espermatócitos sofrem divisões meióticas e originam as espermátides. Durante a fase de espermátide, o núcleo sofre uma condensação da cromatina em um dos pólos e se forma o acrossoma, o axonema com um padrão de microtúbulos 9 + 9 + 2 e dois derivados mitocondriais de mesmo tamanho, dando origem ao espermatozóide e completando o processo de espermatogênese. O óleo de nim mostrou-se prejudicial ao processo de espermatogênese de *C. claveri*, uma vez que os testículos de animais submetidos ao tratamento apresentaram grande desorganização na formação e no desenvolvimento dos cistos espermáticos, retardando o processo de espermatogênese e a formação de gametas masculinos, o que pode trazer prejuízos para a reprodução da espécie. O conhecimento da morfologia do testículo e principalmente do processo de espermatogênese de *C. claveri*, juntamente com o conhecimento sobre o efeito da ingestão do óleo de nim sobre este órgão reprodutivo, pode trazer importantes contribuições sobre a viabilidade do uso associado do óleo de nim e de crisopídeos como predadores naturais não alvos em culturas que priorizam a manutenção da diversidade e manejo integrado das pragas.

Palavras-chave: *Ceraeochrysa claveri*; morfologia; óleo de nim; testículos

ABSTRACT

The use of organic agriculture is growing due to the awareness of the society about the importance of eating foods free of pesticides and insecticides as harmful to health. Thus, the search for conservation of natural resources is also growing, along with organic agriculture and integrated pest management. In search of insects that can be used in biological control, which is an important tool in organic agriculture and integrated pest management, the lacewings has proved a strong controlling agent, since their larvae are predators of eggs and larvae of many insects pests of different commercial crops. In order to evaluate the effect of neem oil, a plant extract with insecticides properties on lacewings, *Diatraea saccharalis* eggs were treated with neem oil at three different concentrations and offered as food for the larvae of *Ceraeochrysa claveri*, thereby evaluating the effect of intake of neem oil on the larval morphology of testis during development of *C. claveri*, as well as on the process of spermatogenesis of this predator. Histological, ultrastructural, and immunohistochemistry analysis was used to evaluate the toxicity of neem oil on cells of the testis of *C. claveri*, and this evaluation performed in testes of third instar larvae, pupae and adults. The analyzes showed that the morphology of the testes varies from rounded shape in larvae to elongated shape in pupae and spiral shape in adults, while its color varies from whitish to bright yellow, respectively. The testes are covered by an outer layer and an inner layer, the latter septa emit, which divide the testis into two follicles. The germ cells are grouped into cysts, cystic surrounded by somatic cells. These cysts consist of spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The spermatogonia undergo mitotic division and give rise to spermatocytes, the cells of the cysts are interconnected by ring canals, which allow their synchronous development. Spermatocytes undergo meiotic divisions and produce spermatids. During the spermatid, the core undergoes a condensation of the chromatin at one of the poles and is formed acrosome, the axonema with a pattern of microtubules $9 + 9 + 2$ e two mitochondrial derivatives of the same size, giving rise to sperm and completing the process of spermatogenesis. The neem oil proved detrimental to the process of spermatogenesis of *C. claveri*, since the testes of animals undergoing treatment showed great disruption in the formation and development of sperm cysts, slowing the process of spermatogenesis and formation of male gametes, which may bring losses to reproduction of the species. Knowledge of the morphology of testis and especially the process of spermatogenesis of *C. claveri* along with knowledge about the effect of intake of neem oil on this reproductive organ, can make important contributions on the viability of the combined use of neem oil and lacewings like nontargets natural predators in cultures that prioritize the maintenance of diversity and integrated pest management.

Keywords: *Ceraeochrysa claveri*; morphology; neem oil; testicles

1. *Introdução*

A Ordem Neuroptera envolve cerca de 6000 espécies, distribuídas em 17 famílias. Atualmente, essa família é a mais importante economicamente e um dos maiores grupos da Ordem Neuroptera, incluindo mais de 1200 espécies e subespécies conhecidas. *Ceraeochrysa* é um dos gêneros de Chrysopidae mais diversos, e se distribui do Canadá até o norte da Argentina, mas a ampla maioria das espécies ocorre na região Neotropical (ADAMS; PENNY, 1985; FREITAS; PENNY, 2001).

Os insetos da família Chrysopidae, conhecidos como crisopídeos, são os mais estudados dentro da ordem Neuroptera. São importantes predadores e são encontrados em muitas culturas de interesse econômico como algodoeiro, citros, milho, entre outras, exercendo um importante papel no controle biológico natural de pragas. Podem alimentar-se de ovos, lagartas neonatas, pulgões, cochonilhas, ácaros e vários outros artrópodes de pequeno tamanho e de tegumento facilmente perfurável. Os crisopídeos se destacam pela voracidade na fase jovem, facilidade de criação em laboratório, elevado potencial de reprodução, além de não necessitar de presas na fase adulta (GALLO *et al.*, 2002; SCUDELER; SANTOS, 2013).

Os crisopídeos são insetos holometabólicos, caracterizados por apresentarem as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são esféricos, com comprimento de 0,7 a 2,3 mm e são colocados na extremidade de um pedicelo, produzido por secreção de glândulas coletéricas, de tamanho variando entre 2 e 26 mm. Sua coloração vai do amarelado ao verde-azulado quando ovipositados e escurecem à medida que o embrião se desenvolve. A função dos pedicelos que sustentam os ovos não está bem determinada, mas acredita-se que seja um mecanismo de proteção contra predação ou canibalismo (ADAMS; PENNY, 1985; PAULIAN, 1999; GALLO *et al.*, 2002). A duração da fase de ovo depende da espécie, e para uma mesma espécie, varia de acordo com a

temperatura, umidade e idade das fêmeas (CANARD; PRINCIPI, 1984; BARBOSA *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2003).

O desenvolvimento larval apresenta três instares, nos quais as larvas são predadoras (CANARD; PRINCIPI, 1984). A duração das ecdises e da fase larval é influenciada diretamente por fatores climáticos, disponibilidade e qualidade dos alimentos, sendo que o alimento ingerido durante a fase larval pode afetar, posteriormente, o processo de reprodução. Segundo Parra (1991), a quantidade e qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento, peso, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos (BIAGIONI; FREITAS, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Larvas de crisopídeos apresentam canibalismo, sendo mais comum entre as larvas recém eclodidas e os ovos de mesma postura, embora esta tendência de canibalismo continue por todo o período larval (NEW, 1975; CANARD; PRINCIPI, 1984; BEZERRA *et al.*, 2009).

Os crisopídeos se apresentam mais eficientes como predadores na fase larval, onde necessitam de substâncias ricas em proteínas e carboidratos na sua alimentação. São de hábito livre e se alimentam de várias presas, sendo que a eficiência nesta fase ocorre principalmente no terceiro instar, quando as larvas possuem maior voracidade. Nesse instar, consomem cerca de 80% do alimento (CANARD; PRINCIPI, 1984).

A larva de terceiro instar, após completar seu desenvolvimento, tece um casulo esférico de seda, produzido nos túbulos de Malpighi e excretada pelo ânus, onde empupa. Decorridos alguns dias surge a pupa móvel ou o adulto farato, que rompe o casulo fazendo um orifício circular com o auxílio das mandíbulas, fixa-se em um

substrato e passa pela última ecdise, surgindo o adulto (GEPP, 1984; CANARD; PRINCIPI, 1984).

Segundo Canard *et al.* (1984), os adultos são insetos pequenos, apresentando corpo delicado e coloração geralmente esverdeada, asas membranosas reticuladas e pernas ambulatorias normais. Durante o dia são encontrados pousados nas faces inferiores das folhas e a noite são vistos voando ou pousando perto de focos luminosos. Ao serem pressionados entre os dedos liberam odor desagradável (BARNARD, 1984; GALLO *et al.*, 2002; FREITAS, 2002).

Os hábitos alimentares dos adultos são variáveis, podendo algumas espécies se alimentar de pólen, exsudatos açucarados das plantas, “honeydew”, néctar; outras podem ser predadoras. Em condições laboratoriais, uma dieta a base de mel e levedura de cerveja (1:1) é utilizada como alimento (BIAGIONI; FREITAS, 2001; MANTOANELLI; ALBUQUERQUE, 2007).

O aparelho reprodutor masculino dos insetos apresenta grande variedade quanto à morfologia. Geralmente é constituído por um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias, e canal ejaculador (SNODGRASS, 1993; CHAPMAN, 1998), e sua principal função é a produção e armazenamento de espermatozóides e seu transporte, de forma viável, para o trato reprodutivo feminino (GULLAN, 2007).

Os testículos são órgãos de formatos ovóides, constituídos por folículos testiculares (onde são produzidos os espermatozóides) que variam em organização e número dependendo da espécie (PHILLIPS, 1970; DUMSER, 1980; FERREIRA *et al.*, 2006; GULLAN, 2007). Em *Chromacris speciosa* (FERREIRA *et al.*, 2006) os testículos apresentaram-se como um órgão único e oval envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, associado a tecido gorduroso. Em pupas de *C. claveri* existe um par de

testículos alongados e esbranquiçados, enquanto que em adultos eles são espiralados, de coloração amarelada e estão localizados dorsalmente sobre as glândulas acessórias (SCUDELER *et al.*, 2009).

Segundo Ferreira *et al.*, 2006, cada folículo testicular apresenta células germinativas organizadas em cistos. Tais cistos são formados por células císticas que envolvem grupos de espermatogônias, ou grupos de espermatócitos ou grupos de espermatídes. Já os espermatozóides são organizados na forma de feixes (PHILLIPS, 1970; GULLAN, 2007).

A maturação dos cistos (processo de espermatogênese) ocorre no sentido apical-basal (PHILLIPS, 1970) e no interior de cada cisto, as células germinativas se desenvolvem de modo sincrônico (PHILLIPS, 1970; CRUZ-LANDIM, 2001; FRIEDLANDER *et al.*, 2005). A espermiogênese é o período final da espermatogênese, que resulta na diferenciação e maturação das espermatídes em espermatozóides, envolvendo processos como alongamento nuclear, condensação da cromatina, formação acrossomal, desenvolvimento do flagelo, axonema e derivados mitocondriais (NAME *et al.*, 2007).

A morte celular é um fenômeno bastante comum nos organismos multicelulares, podendo ser considerada como parte integrante da vida destes organismos. Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e os mais comuns são autofagia, necrose e apoptose. Autofagia ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares. A necrose ocorre quando as células sofrem algum tipo de insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma e perda da integridade da membrana plasmática. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no

local. A apoptose ocorre em diversas situações, como na reposição fisiológica de alguns tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. Durante a apoptose ocorre uma retração da célula, causando perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, mas as mitocôndrias podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (blebs) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte das células, caracterizada por um processo ativo de alterações morfológicas e bioquímicas, a apoptose. A apoptose é também um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA for lesado (HÄCKER, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007).

A morte celular programada tem sido estudada em insetos e desempenha um papel importante na remoção de espermatozóides anormais. Cistos em desenvolvimento utilizam atividade das caspases para auxiliar na redução do citoplasma durante a individualização dos espermatozóides (CAGAN, 2003).

Embora existam algumas pesquisas desenvolvidas sobre o processo de morte celular em testículos de insetos (AL-TAWEEL; FOX, 1982; POLANSKA *et al.*, 2005),

nenhuma delas relaciona o efeito do óleo de nim sobre o processo de morte celular em testículos de crisopídeos.

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. Em ecossistemas agrícolas brasileiros, Freitas; Penny (2001) coletaram 15 espécies de *Ceraeochrysa*, dentre estas *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911). Atualmente, poucas pesquisas tem sido realizadas com esta espécie, as quais são concentradas nos aspectos biológicos da espécie, havendo uma carência de estudos morfológicos com este grupo (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Os predadores da família Chrysopidae têm sido registrados como agentes dotados de alta voracidade e capacidade de busca de suas presas, reduzindo a densidade populacional de diversos artrópodes-praga (GRAVENA, 1992; ALBUQUERQUE *et al.*, 1994). O controle biológico de pragas agrícolas é mais viável que o uso de inseticidas, pois tal controle não degrada o meio ambiente, não requer um alto custo para que seja executado, não causa problemas de saúde e não seleciona insetos-pragas resistentes, ao contrário dos inseticidas utilizados. A busca por métodos alternativos de controle inclui também a utilização de produtos naturais, que geralmente são menos prejudiciais ao ambiente, dentre os quais destacam-se os inseticidas de origem vegetal (ROEL *et al.*, 2000; NEVES *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004).

Pesquisas envolvendo plantas com atividade inseticida evoluíram bastante nas últimas décadas, em diversos países. Plantas da família Meliaceae têm sido as mais investigadas, destacando-se o nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), por sua atividade inseticida, acaricida, fungicida e nematocida, também provocando efeito anti-

alimentar, redução do crescimento, inibição da ecdise, inibição da biossíntese da quitina, redução da fecundidade e longevidade de adultos, alterações na capacidade de atração de feromônios, deformações em pupas e adultos, esterilização, inibição de oviposição, mortalidade e repelência, além de possuir baixíssima toxicidade ao homem e animais domésticos (SCHMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; ROEL, 2001; MARTINEZ, 2002). A azadiractina afeta também a reprodução, tanto se o tratamento for feito na fase adulta, como ainda na juvenil. A maturação reprodutiva é comprometida (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

O interesse por essa espécie deve-se à presença de um limonóide denominado azadiractina, cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002; NEVES *et al.*, 2003). Além da azadiractina, os principais componentes biologicamente ativos do nim são meliantriol, limoneno, salanina, nimbim e outros triterpenóides, entre os mais de 150 compostos já isolados (SCHMUTTERER, 1990; NEVES *et al.*, 2003).

O nim e seus derivados chegam a afetar mais de 400 espécies de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Thysanoptera, e Neuroptera. Espécies de insetos reagem diferentemente aos compostos do nim, que podem causar efeito antialimentar, repelente, regulador do crescimento, interferência nas funções bioquímicas e fisiológicas, efeitos sobre a reprodução, e em certos casos, a morte (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002; NEVES *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004; GILLOTT, 2005).

Diversos autores relataram efeitos da azadiractina em testículos de insetos. Dorn (1986) relata redução no comportamento de acasalamento de *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) do sexo masculino após o tratamento com azadiractina. Também foi

encontrada degeneração dos feixes de espermatozóides e não formação dos mesmos em *Epilachna varivestis* (Coleoptera) e *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera), além de degeneração dos espermatócitos, sugerindo uma ação direta da azadiractina na membrana testicular, tornando o tecido incapaz de desenvolver espermatócitos em *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) (SCHULZ; SCHLÜTER, 1983; SHIMIZU, 1988; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2004).

Nisbet *et al.* (1995) utilizaram em *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), um derivado radiomarcado de azadiractina, com atividade biológica semelhante à molécula original, para identificar alguns dos tecidos onde se liga a azadiractina, e obtiveram como resultado que 94% deste composto se liga às membranas testiculares e 37% nos ovários. Ainda com a mesma espécie, insetos que receberam injeções de azadiractina pura, em diferentes concentrações, apresentaram seus testículos significativamente menores em comprimento, largura e peso, quando comparados ao grupo controle (LINTON *et al.*, 1997).

Em machos de *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera) tratados topicamente com azadiractina (25, 50, 100 e 200 ppm), houve desintegração do epitélio testicular, degeneração de espermátides e de feixes de espermatozóides (TAYADE, 2012).

O efeito do nim sobre insetos não-alvos ainda não é bem entendido. Ele não está livre de apresentar alguns efeitos sobre os inimigos naturais, embora esses efeitos pareçam ser menos intensos do que sobre as pragas (AGUIAR-MENEZES, 2005).

Produtos de nim são aparentemente seguros para alguns insetos predadores, porém, estudos feitos até o momento, apesar dos resultados promissores, apontam para uma série de limitações ao uso de extratos vegetais em programas de controle de pragas agrícolas. Uma outra consideração é a maneira de contato entre os inimigos naturais e os biopesticidas. Quase todos os estudos estão preocupados com o contato

direto, como tratamentos com pulverização e uso tópico, mas a exposição indireta através do consumo de presa tratada é raramente considerada (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; SCHMUTTERER, 1997; QI *et al.*, 2001; SCUDELER; SANTOS, 2013).

Pupas e adultos do predador *Chrysoperla externa* (Neuroptera) foram pulverizadas nas concentrações 0,5, 1, 2 e 5% de óleo de nim, durante a fase de pupa. O óleo de nim em todas as concentrações testadas não afetou negativamente a viabilidade e duração do estágio de pupa, mas em adultos, nas concentrações de 1 e 2% provocou mortalidade significativa ao longo do tempo (COSME *et al.*, 2009). Já para a espécie predadora *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera), larvas tratadas com óleo de nim a 0,5, 1 e 2%, graves alterações foram observadas a nível ultraestrutural em células do intestino médio de larvas. A mesma espécie e tratamentos realizados também resultaram em efeitos deletérios nos casulos deste inseto, o que torna o espécime mais vulnerável aos inimigos naturais durante sua metamorfose (SCUDELER; SANTOS, 2013; SCUDELER *et al.*, 2013).

Considerando a importância econômica de *C. claveri* na agricultura surge a necessidade de ampliar o conhecimento a respeito da biologia deste inseto para o desenvolvimento de novas metodologias de controle biológico com o uso do óleo de nim para controle e repelência de insetos pragas sem agredir os inimigos naturais. Com o estudo da morfologia e ultra-estrutura dos testículos deste inseto, pretendemos avaliar o efeito da ingestão do óleo de nim no desenvolvimento e na morfologia dos testículos, assim como na espermatogênese de *C. claveri*.

2. Objetivos

Frente à justificativa proposta, pretendemos avaliar o efeito do óleo de nim no desenvolvimento e na morfologia dos testículos de *Ceraeochrysa claveri* alimentados na fase larval com ovos de *Diatraea saccharalis* tratados com óleo de nim. Para isto realizaremos:

- Caracterização da morfologia e da ultraestrutura dos testículos de larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos de *C. claveri*;
- Caracterização do processo da espermatogênese em *C. claveri* ;
- Identificação do processo de morte celular nos testículos de larvas de terceiro ínstar de *C. claveri*.

3. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

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

Os adultos foram criados em gaiolas transparentes 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 das fêmeas e colocação da dieta. Os ovos foram coletados a cada três dias, coincidindo com o dia da limpeza da gaiola e troca da dieta, sendo posteriormente acondicionados em caixas plásticas de 18x11x5 cm até a emergência das larvas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas foram individualizadas em potes plásticos de 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura, e alimentadas com ovos de *D. saccharalis*. As pupas foram mantidas no mesmo pote em que já estavam na fase larval, pois seu casulo adere à superfície, e acrescentado um pedaço de algodão embebido com água destilada para manutenção da umidade.

Com a emergência dos adultos, estes foram 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 CETMA - Comércio de Agentes para Controle Biológico Ltda., Lençóis Paulista-SP. No Laboratório de Insetos, casais das mariposas foram 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 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 (30 min) (CORREIA *et al.*, 2009) e colocados nos potes que continham as larvas. Ovos tratados foram fornecidos em abundância as larvas e trocados a cada quatro dias, uma vez que o efeito residual do óleo de nim é de cinco à sete dias (SCHUMUTTERER, 1990). O controle foi feito com larvas alimentadas com ovos de *D. saccharalis* de um dia, imersos em água destilada (5s) e secos a temperatura ambiente (30 min).

3.3. Coleta e processamento dos testículos

Para a coleta e processamento dos testículos foram utilizadas larvas de terceiro instar, 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 instar. 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 realizada a dissecação pela região dorsal, fazendo uso de solução salina para insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) sob microscópio estereoscópico. Os testículos eram imediatamente pré-fixados no local pelo gotejamento de solução fixadora adequada.

Em seguida eram isolados e transferidos para recipiente de vidro contendo a mesma solução fixadora, para processamento posterior.

3.3.1. Técnicas para análise em Microscopia de Luz

Para as técnicas de microscopia de luz, os testículos foram imediatamente pré-fixados no local, pelo gotejamento das seguintes soluções fixadoras:

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

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 e álcool etílico 95% por 4h; embebição em mistura de resina (JB4 da Polysciences) e álcool 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 a 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 à coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.) (PEARSE, 1972) ,conforme protocolo abaixo:

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.

Para a análise e documentação fotográfica dos cortes obtidos após a realização das técnicas citoquímicas utilizamos microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

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 etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Os cortes histológicos serão submetidos ao protocolo do kit QIA-33 Calbiochem, para detecção de DNA fragmentado em células em processo de morte celular, 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. Esta técnica que visa a identificação de células em apoptose é conhecida como TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP Nick End Labeling).

A análise e documentação fotográfica foi realizada em microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

3.3.2. Técnicas para Análise Ultraestrutural

3.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os testículos dos grupos controle e tratados coletados foram fixados em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, e processados de acordo com o protocolo de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP:

- ✓ 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 (0,5 µm) 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 TECNAI, da FEI Company.

3.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os testículos dos grupos controle e tratados foram coletados, fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 48h e processados de acordo com o protocolo de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP:

- ✓ 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.

4. Resultados

Os resultados obtidos serão apresentados na forma de artigos científicos, que serão submetidos a revistas especializadas. Os artigos serão denominados como Capítulo 1 e 2.

Capítulo 1: Morfologia do testículo e espermatogênese em *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

Capítulo 2: Efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica*) na espermatogênese de *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

4.1. Capitulo 1

CAPÍTULO 1

Morfologia do testículo e espermatogênese em *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

Morphology of the testis and spermatogenesis in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

AUTORES: Ana Silvia Gimenes Garcia^{1*}, Patricia Fernanda Felipe Pinheiro², Daniela Carvalho dos Santos¹

¹ Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

² Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

***Autor correspondente:** gimenes@ibb.unesp.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia dos testículos e a espermatogênese em *C. claveri*, um importante predador de ovos e larvas de insetos, de grande interesse econômico. O estudo foi realizado através de análises em microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A morfologia dos testículos varia de arredondado em larvas para alongado em pupas e espiralado em adultos, enquanto sua coloração vai de esbranquiçada a amarelo intenso. Os testículos são recobertos pela túnica externa e interna, esta última emitindo septos, que dividem o testículo em dois folículos. As células germinativas são agrupadas em cistos, rodeados por células císticas. Esses cistos são constituídos por espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides. As espermatogônias sofrem divisão mitótica e dão origem aos espermatócitos. As células dos cistos são interligadas por canais circulares, que permitem seu desenvolvimento sincrônico. Os espermatócitos sofrem divisões meióticas e originam as espermatídes. Durante a fase de espermatíde, o núcleo sofre uma condensação da cromatina em um dos pólos e se forma o acrossoma. A cauda dos espermatozóides apresenta um axonema com um padrão de microtúbulos 9 + 9 + 2 e dois derivados mitocondriais de mesmo tamanho. Microtúbulos da manchete foram observados em torno do núcleo e axonema durante a espermiogênese.

Palavras-chave: *C. claveri*, espermatogênese, morfologia, testículos, ultraestrutura.

Introdução

A Ordem Neuroptera envolve cerca de 6000 espécies, distribuídas em 17 famílias. Atualmente, essa família é a mais importante economicamente e um dos maiores grupos da Ordem Neuroptera, incluindo mais de 1200 espécies e subespécies conhecidas (ADAMS; PENNY, 1985; FREITAS; PENNY, 2001). Os insetos da família Chrysopidae, conhecidos como crisopídeos, são os mais estudados dentro desta ordem. São importantes predadores encontrados em muitas culturas de interesse econômico como algodoeiro, citros, milho, entre outras, exercendo um importante papel no controle biológico natural de pragas (GALLO *et al.*, 2002; SCUDELER; SANTOS, 2013).

O aparelho reprodutor masculino dos insetos apresenta grande variedade quanto à morfologia. Geralmente é constituído por um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias, e canal ejaculador (SNODGRASS, 1993; CHAPMAN, 1998), e sua principal função é a produção e armazenamento de espermatozóides e seu transporte, de forma viável, para o trato reprodutivo feminino (GULLAN, 2007).

Os testículos são órgãos de formato ovóide, constituídos por folículos testiculares, que variam em organização e número dependendo da espécie. Cada folículo testicular apresenta células germinativas organizadas em cistos. Tais cistos são formados por células císticas que envolvem grupos de espermatogônias, ou grupos de espermatócitos ou grupos de espermátides. Já os espermatozóides são organizados na forma de feixes (PHILLIPS, 1970; DUMSER, 1980; FERREIRA *et al.*, 2006; GULLAN, 2007).

O processo de espermatogênese nos insetos compreende a multiplicação, o desenvolvimento e a maturação das células da linhagem espermatogênica para a formação de espermatozóides ou gametas masculinos haplóides. A maturação dos

cistos ocorre no sentido apical-basal e no interior de cada cisto, as células germinativas se desenvolvem de modo sincrônico (PHILLIPS, 1970; CRUZ-LANDIM, 2001; FRIEDLANDER *et al.*, 2005). A espermiogênese é o período final da espermatogênese, que resulta na diferenciação e maturação das espermátides em espermatozóides, envolvendo processos como alongamento nuclear, condensação da cromatina, formação acrossomal, desenvolvimento do flagelo, axonema e derivados mitocondriais (NAME *et al.*, 2007).

Por se tratar de uma espécie muito utilizada no controle biológico de insetos praga e considerando a importância econômica de *C. claveri*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfologia do testículo e o processo de espermatogênese durante o seu desenvolvimento.

Material e Métodos

Material Biológico

Para o presente estudo foram utilizadas larvas de terceiro instar, pupas e adultos de *C. claveri*. Tais insetos foram obtidos à partir da criação realizada no Laboratório de Insetos do IBB, UNESP, onde os espécimes foram mantidos à temperatura controlada $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e 12hL:12E de fotoperíodo.

Os adultos foram criados em gaiolas transparentes de polietileno, com 18x9 cm. A superfície superior foi revestida internamente com papel sulfite branco servindo como substrato para postura das fêmeas e colocação da dieta. Os ovos foram coletados a cada três dias, sendo acondicionados em caixas plásticas de 18x11x5 cm até a emergência das larvas. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram individualizadas em potes plásticos de 6x2 cm, e alimentadas com ovos de *D. saccharalis*. As pupas foram mantidas no mesmo pote em que já estavam na fase larval, pois seu casulo adere à

superfície, e acrescentado um pedaço de algodão embebido com água destilada para manutenção da umidade. Com a emergência dos adultos, estes foram retirados e colocados nas gaiolas, alimentados com dieta à base de levedura de cerveja e mel (1:1), formando casais, para manutenção da criação.

Microscopia de Luz

Para a coleta e processamento dos testículos em microscopia de luz, foram utilizadas larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos. As larvas foram dissecadas três dias após sofrerem a ecdise para o terceiro instar. As pupas foram dissecadas cinco dias após o dia da pupação. Já os adultos 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 foram crioanestesiados e dissecados, pela região dorsal, fazendo uso de solução salina para insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) sob microscópio estereoscópico. Os testículos foram isolados e fixados em solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 24 horas. Em seguida, desidratação em séries crescentes de etanol (50%, 70%, 100%), embebição em resina metacrilato-glicol (Kit Leica historesina) e seções de 3 µm foram cortados em micrótomo Leica RM 2045. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) (PEARSE, 1972) e analisados em microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

Microscopia Eletrônica

Larvas de terceiro instar, pupas e adultos de *C. claveri* foram crioanestesiados brevemente e dissecados em solução salina de insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) para remoção dos testículos.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão, os testículos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M (pH 7,3) durante 24 horas à temperatura ambiente; pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavados em água destilada, o material foi contrastado com acetato de uranila 0,5% em água durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e embebidos em resina Araldite®. Cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina, enquanto os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e, em seguida, analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão TECNAI, da FEI Company, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura, os testículos foram fixados durante 48 horas à temperatura ambiente em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) e lavados em água destilada. Eles foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% diluído em água destilada por 30 minutos em temperatura ambiente, desidratados através de uma série crescente de etanol, secos em ponto crítico com CO₂ líquido, metalizados em ouro e examinados em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta

200 da FEI Company, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP.

Resultados

Morfologia dos testículos de *Ceraeochrysa claveri*

Os testículos de larvas de *C. claveri* apresentam formato arredondado e coloração esbranquiçada. Cada testículo possui uma túnica celular que o recobre interna e externamente. A túnica interna emite septos, e divide o testículo em folículos testiculares. O número de folículos não é descrito para a espécie e aparentemente, este inseto possui dois folículos, já que o septo divide o testículo ao meio (não foi possível sua contagem). A camada interna da túnica apresenta células com citoplasma e núcleo achatados, enquanto a túnica externa apresenta células um pouco mais arredondadas. A superfície é lisa e o corpo gorduroso perivisceral adere a toda superfície dos testículos, assim como traquéias são vistas no exterior dos mesmos (Figs. 1A e B).

Os testículos das pupas de *C. claveri* passam do formato arredondado em larvas para formato alongado e coloração esbranquiçada. Assim como nas larvas, a superfície é lisa e recoberta inteiramente por grandes massas de tecido gorduroso perivisceral. Também é possível observar o vaso deferente partindo da região distal dos testículos (Figs. 1C e D).

Os testículos de insetos adultos possuem formato espiralado e coloração amarela intensa, mais uma vez diferente de larvas e pupas, onde possuíam formato arredondado e em seguida alongado. Como encontrado em larvas e pupas, a superfície dos testículos também é lisa e recoberta por tecido gorduroso, apresentam

traquéias em seu exterior e o vaso deferente também pode ser observado (Figs. 1E e F).

Espermatogênese em *C. claveri*

Na região apical dos testículos encontramos cistos compostos por células com citoplasma e núcleo volumosos, as quais acreditamos ser as espermatogônias. O citoplasma é mais elétron-denso que o núcleo e podemos observar grande quantidade de mitocôndrias, discreto retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. O núcleo é arredondado, com envoltório nuclear regular (Fig. 2A). As espermatogônias sofrem divisão mitótica e formam os espermatócitos (Fig. 1A1). Dentro do cisto, as espermatogônias são interligadas por meio de pontes citoplasmáticas, também chamadas de canais circulares, permitindo o desenvolvimento sincrônico de todas as células do cisto. Os canais circulares são ocupados pelo fusoma, que é constituído por elementos membranosos semelhantes ao retículo endoplasmático liso (Figs. 2B e C).

Os cistos de espermatócitos também são envoltos pelas células císticas, com citoplasma volumoso e com a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Seu citoplasma é menos elétron-denso que o encontrado nas espermatogônias, com núcleo grande e arredondado e nucléolo evidente (Fig. 2D). Na microscopia de luz detectamos que o citoplasma dos espermatócitos torna-se granulado, com inúmeras manchas brancas. No material analisado encontramos uma grande quantidade de cistos de espermatócitos, os quais apresentam-se como células bastante volumosas até o início da divisão meiótica que dará origem aos cistos contendo espermátides (Fig. 3A).

Em microscopia de luz, as espermátides se apresentam como células volumosas com estruturas circulares no citoplasma de alguns cistos, e pequeno núcleo (Fig. 3B). Em cistos mais desenvolvidos, aparecem inúmeras estruturas circulares, bem menores

que as anteriores, que preenchem todo o cisto (Fig. 3C). Na microscopia eletrônica de transmissão, podemos observar o início da formação do derivado mitocondrial, ou “nebenkern”, e o citoplasma da célula se torna vacuolizado (Fig. 3D). Também foi possível encontrar estágios mais desenvolvidos do nebenkern (Fig. 3E). Não foi possível observar o processo de formação do acrossoma e do axonema, apenas detectamos estes elementos já formados.

Com a formação do acrossoma, o núcleo torna-se bastante condensado, e o acrossoma é visto como uma estrutura bastante elétron-densa em uma extremidade do núcleo, recobrindo-o como se fosse uma capa. Além disso, o núcleo se apresenta com formato mais alongado, citoplasma bastante reduzido e é possível observar a presença dos microtúbulos da manchete (Fig. 3F).

O axonema se apresenta com um par de microtúbulos centrais, nove pares de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (9+9+2) (Fig. 4A). É possível notar a presença de microtúbulos da manchete, além do núcleo e derivados mitocondriais juntos ao axonema (Fig. 4B).

Na microscopia de luz podemos observar feixes alongados de espermatozóides, com cortes da cauda e dos núcleos, mas não é possível dizer se estão individualizados (Fig. 4C). Já em microscopia eletrônica de transmissão, encontramos a região da cauda dos espermatozóides bastante alongada, notando-se a presença de axonema e derivados mitocondriais alongados (Fig. 4D).

As três fases do ciclo de vida de *C. claveri* foram avaliadas. Durante a fase de larva, os cistos acima descritos encontrados foram de espermatogônias e espermatócitos. Na fase de pupa, foram detectados muitos cistos de espermatogônias e espermatócitos, e algumas espermátides, a grande maioria em microscopia de luz. Já para os adultos, foram encontrados todos os cistos, mas acreditamos que os

espermatozoides não estejam maduros, pois não os encontramos individualizados em microscopia eletrônica de transmissão.

FIG. 1. Visão geral dos testículos de larvas, pupas e adultos, em microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV). **A.** Testículo de larva em ML, com morfologia arredondada, túnica externa (Te), apresentando células mais arredondadas, e túnica interna (Ti), com células mais achatadas emitindo septos (S). Nota-se cistos contendo espermatogônias (Go) e espermatócitos (Ct). Coloração: H.E. Barra = 20µm. **A1.** Detalhe, em microscopia de luz, de cistos de espermatogônias (Go) em divisão sincrônica. Coloração: H.E. Barra = 5µm. **B.** Testículos de larvas em MEV, apresentando formato arredondado e com presença de traquéia (Tr) e tecido gorduroso perivisceral (Tg). Barra = 10µm. **C.** Testículo de pupa em ML, com formato alongado, túnica externa (Te) e interna (Ti), com emissão de septos (S) e tecido gorduroso ao redor (Tg). Presença de cistos contendo espermatogônias (Go) e espermatócitos (Ct). Coloração: H.E. Barra = 20µm. **D.** Testículo de pupa em MEV, apresentando formato alongado e grande quantidade de tecido gorduroso perivisceral (Tg) e vaso deferente (Vd). Barra = 25µm. **E.** Visão geral do testículo de adulto de *C. claveri* em ML. Nota-se morfologia espiralada, e tecido gorduroso perivisceral recobrindo todo o material (Tg). Coloração: H.E. Barra = 50µm. **F.** Testículo de adulto em MEV, apresentando formato espiralado e com presença de traquéia (Tr), tecido gorduroso perivisceral (Tg) e vaso deferente (Vd). Barra = 50µm.

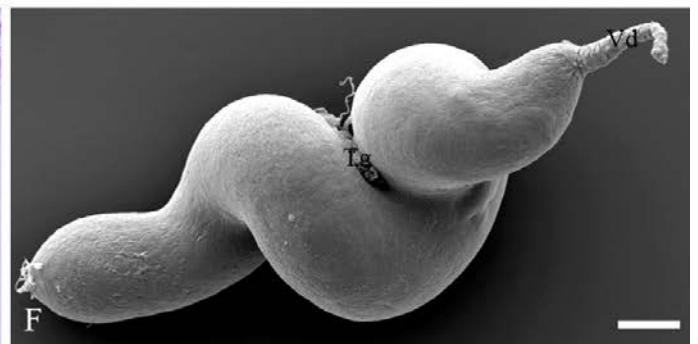
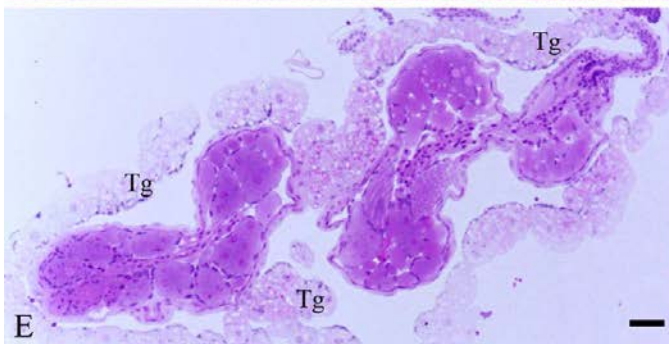
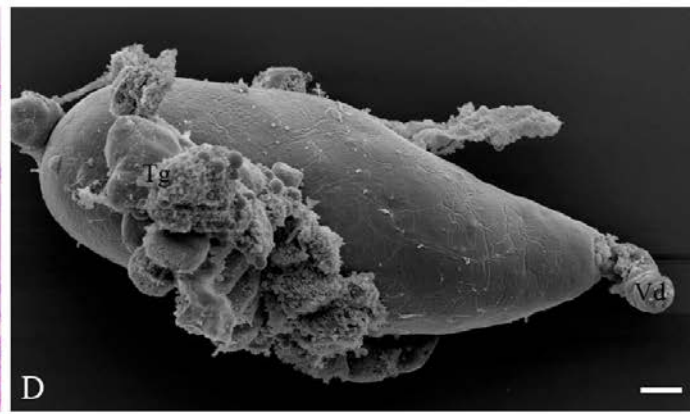
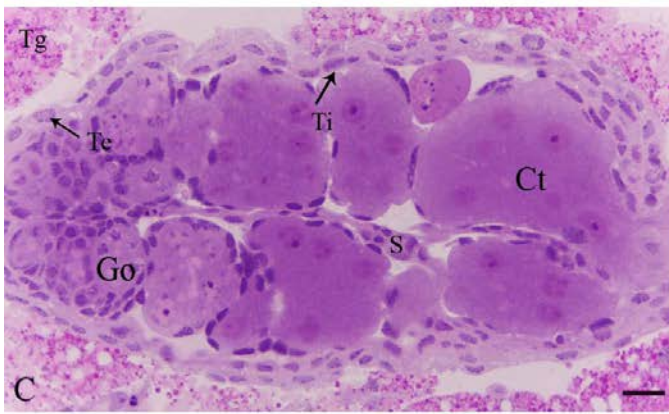
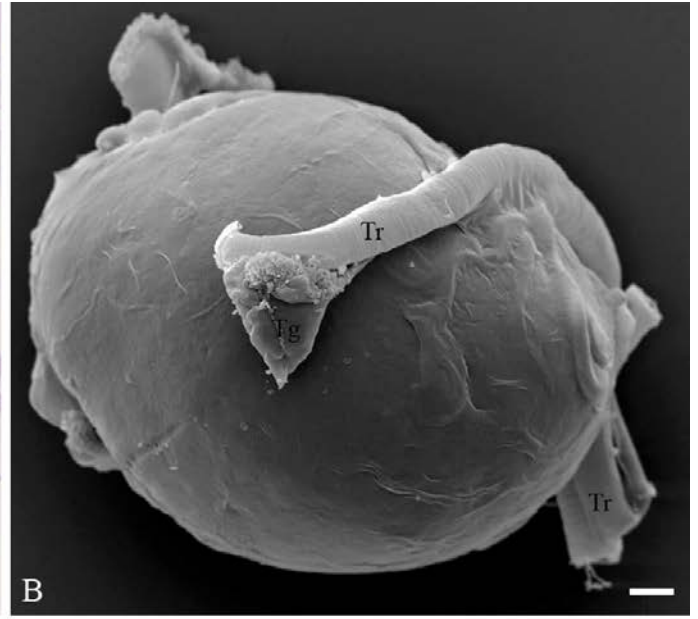
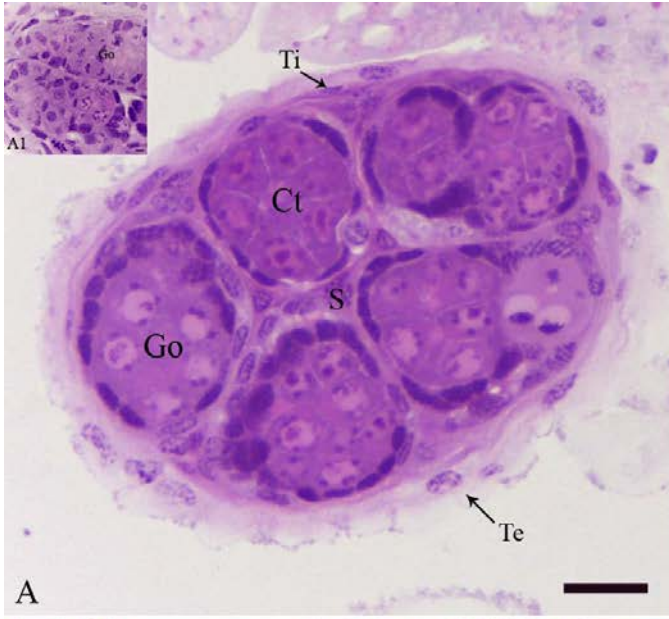


FIG. 2. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão. **A.** Cisto contendo espermatogônias, com presença de célula cística (Cis), núcleo (N) e mitocôndrias (M). Barra = 5 μ m. **B.** Canais circulares (setas) e grande quantidade de mitocôndrias (M). Barra = 2,5 μ m. **C.** Detalhe de fusoma (Fu), canal circular (setas) e mitocôndrias (M). Barra = 1 μ m. **D.** Cisto de espermatócitos contendo núcleo (N) e mitocôndrias (M). Barra = 5 μ m.

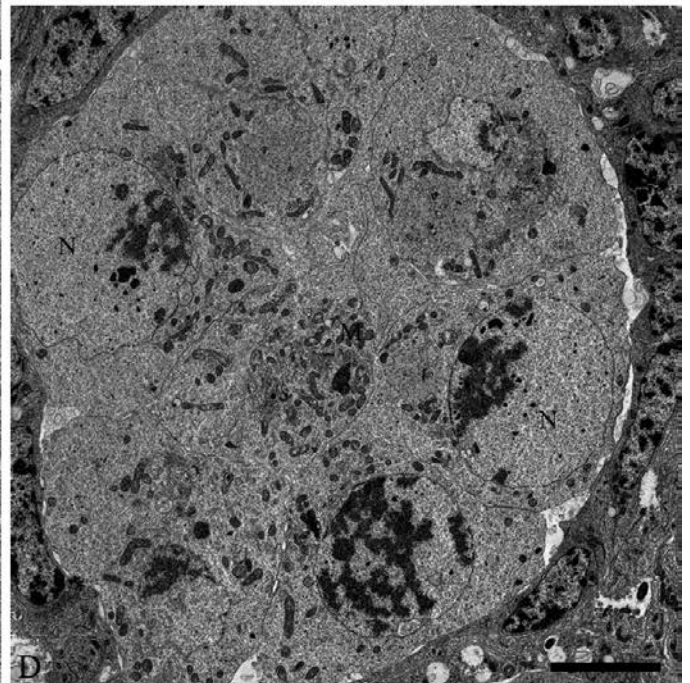
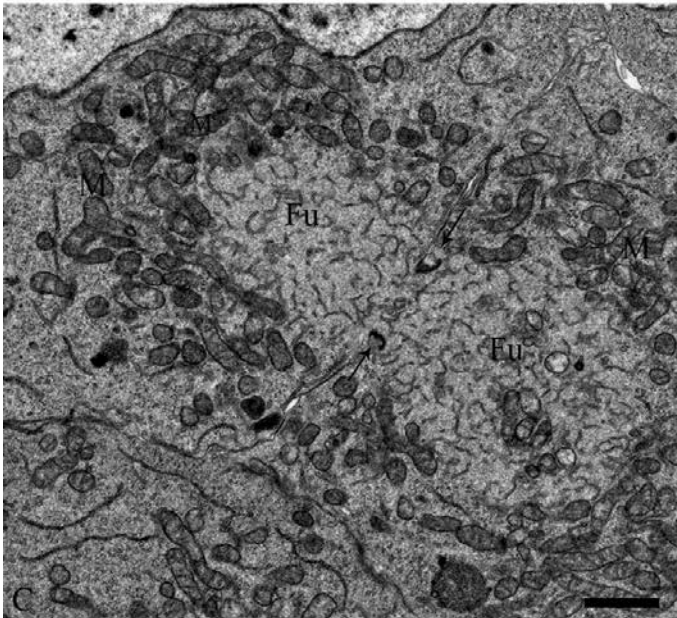
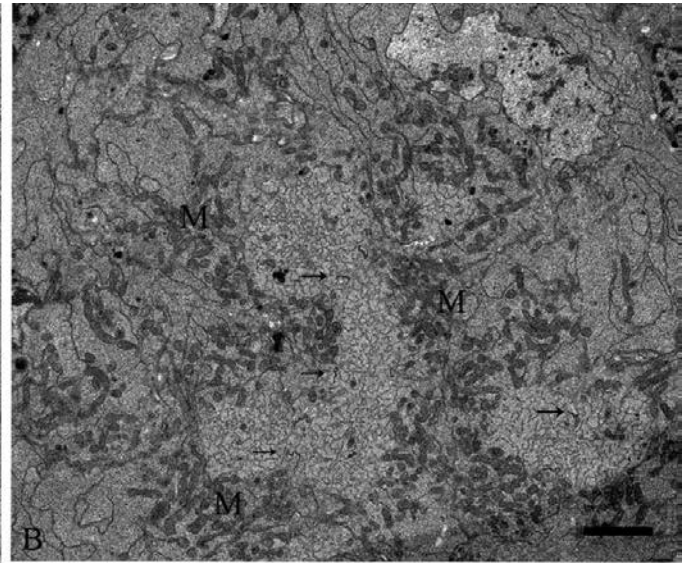
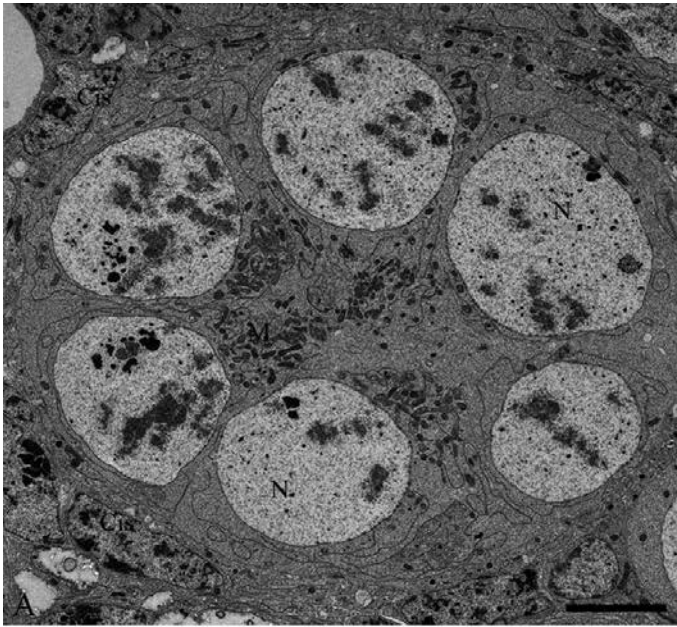


FIG. 3. A. Espermatócito de pupa em ML. Núcleo volumoso (N) e estruturas circulares no citoplasma (Ec). Coloração: H.E. Barra = 5 μ m. **B.** Espermátide de pupa em ML. Grandes estruturas circulares (Ec) e núcleo reduzido (N). Coloração: H.E. Barra = 5 μ m. **C.** Vários cistos de espermátides de adulto (Td) em ML. Coloração: H.E. Barra = 5 μ m. **D.** Início da formação do “nebenkern” (Nb) em MET. Barra = 2 μ m. **E.** “Nebenkern” desenvolvido (Nb) em MET. Barra = 5 μ m. **F.** Espermátide de adulto em MET, apresentando núcleo (N) com cromatina condensada, acrossoma (seta) e microtúbulos da manchete (*). Barra = 500nm.

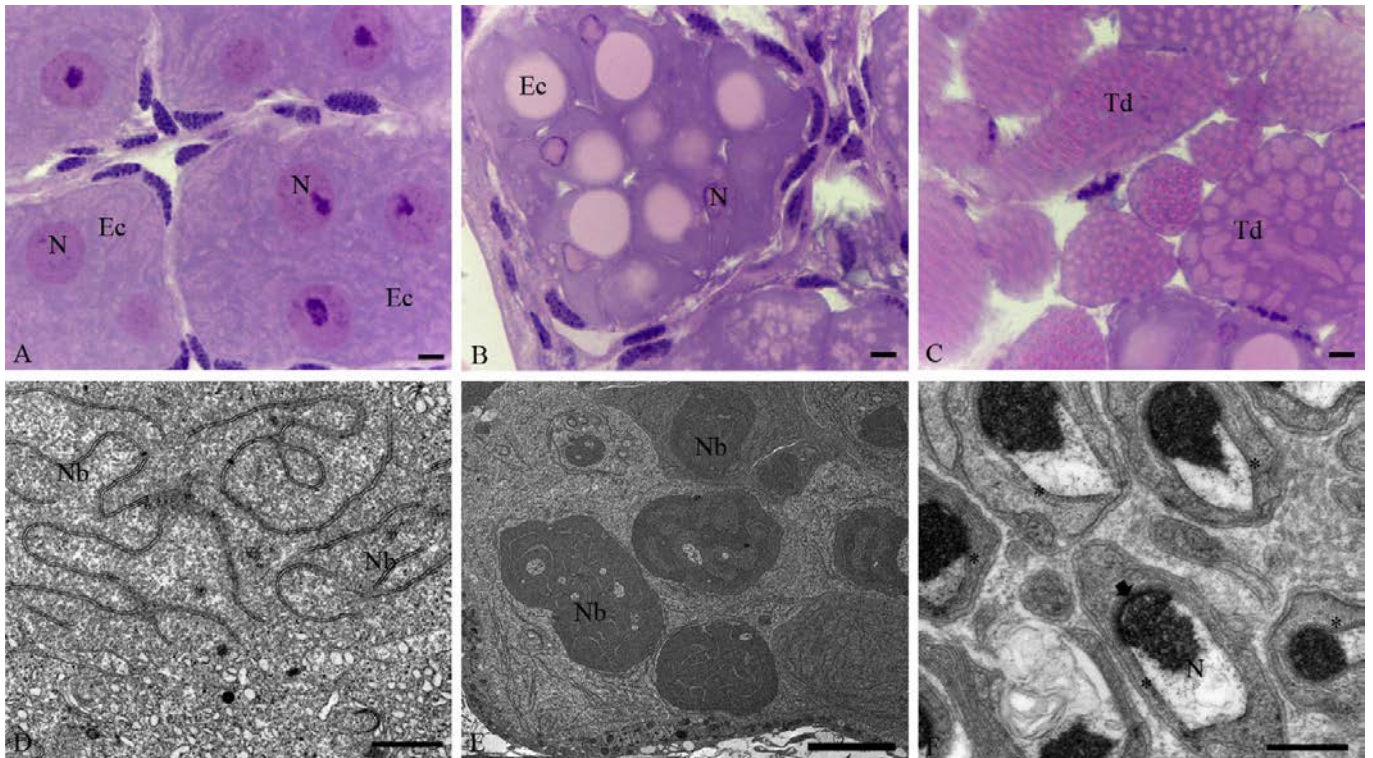
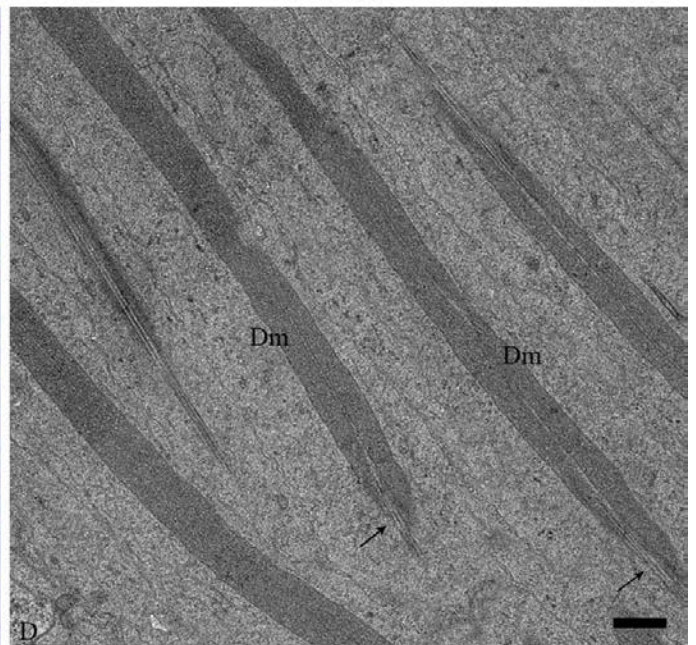
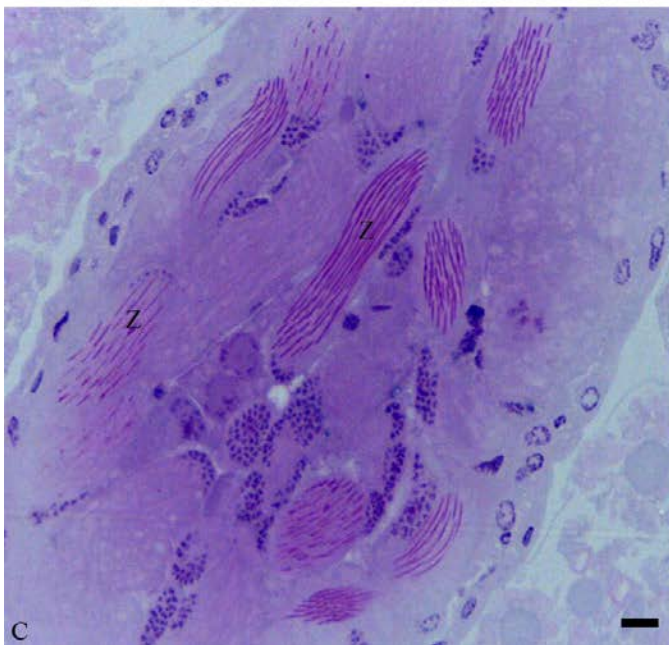
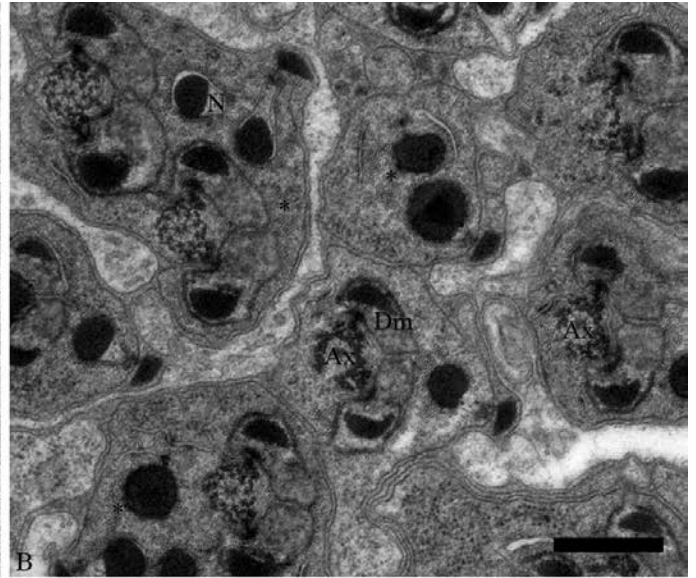
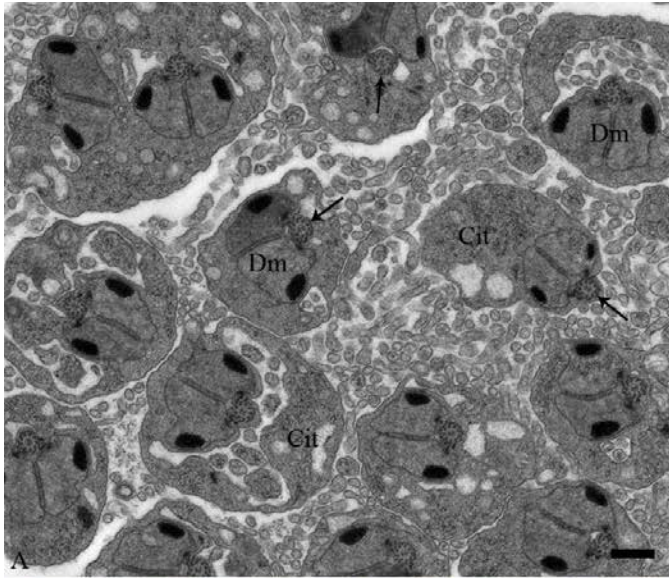


FIG. 4. **A.** Cauda de espermatozóide com axonema (seta) e derivados mitocondriais (Dm) em MET. Redução do citoplasma (Cit). Barra = 0,5µm. **B.** Detalhe, em MET, da região do axonema (Ax), núcleo (N), microtúbulos da manchete (*). Barra = 0,5µm. **C.** Espermatozóides (Z) em microscopia de luz. Coloração: H.E. Barra = 10µm. **D.** Cauda de espermatozóides alongada em MET, notando-se axonema (setas) e derivados mitocondriais (Dm). Barra = 1µm.



Discussão

Os testículos de insetos de diversas ordens e espécies diferem entre si. Em *C. claveri* encontramos um par de testículos que se apresentam arredondados em larvas, alongados em pupas e espiralados em adultos, com coloração passando de esbranquiçada a amarela intensa. Eles são revestidos por uma túnica que os recobre externa e internamente, com emissão de septos da camada interna. Esses septos dividem o testículo em folículos, que aparentemente são dois nesta espécie. Casos semelhantes são encontrados na literatura, como em *Zorotypus caudelli* (Zoraptera), onde os testículos também são formados por dois folículos, mas em forma de banana; nos Hymenoptera *Polistes versicolor versicolor* e *Myschocyttarus cassununga* os testículos são constituídos por três folículos, enquanto em *Gryon pennsylvanicum* o testículo possui apenas um folículo (DALLAI *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2012; PAOLI *et al.*, 2013). Nenhum destes estudos da literatura traz a descrição do formato dos testículos durante o desenvolvimento do inseto, como apresentamos aqui para *C. claveri*.

Dentro da ordem Hemiptera existem insetos com testículos ovais (*Triatoma brasiliensis* e *Triatoma melanica*), revestidos por uma membrana testicular, conforme detectamos em *C. claveri* (FREITAS *et al.*, 2010). Em quase todos os Diptera, os testículos são envolvidos por duas camadas de tecido, a túnica externa e interna, e em testículo de *Chrysomya megacephala* analisado em microscopia eletrônica de varredura, foi observada uma superfície lisa com penetração de traqueíolas (SUKONTASON *et al.*, 2011). Em *C. claveri* também foi possível observar superfície lisa em todas as fases do desenvolvimento do inseto, com presença de traquéias e tecido gorduroso recobrindo todo o testículo externamente.

Em *C. claveri*, o desenvolvimento das células germinativas de machos ocorre dentro de cistos, revestidos por células císticas. As células dos cistos são interligadas por canais circulares que se originam da citocinese incompleta que ocorre durante a divisão mitótica das espermatogônias, permitindo a comunicação entre as células germinativas do cisto e compartilhamento de constituintes citoplasmáticos, sincronizando, por exemplo, as divisões celulares mitóticas e meióticas seguintes (HAGLUND *et al.*, 2011). O aparecimento dos canais circulares é extremamente estudado e discutido por inúmeros pesquisadores, em diferentes insetos, machos e fêmeas (KING; AKAI, 1971; HIME *et al.*, 1996; ONG; TAN, 2010; GREENBAUM *et al.*, 2011; HAGLUND *et al.*, 2011). Em *Drosophila melanogaster* (Diptera), a estrutura dos canais circulares de machos é diferente do descrito em fêmeas. Canais circulares de insetos machos não contêm um aro de actina filamentosa internamente, que é um dos principais componentes de canais circulares femininos. Também não aumentam seu tamanho, como também ocorre em fêmeas, mas mantém um diâmetro de 1-1,5 µm. A ultraestrutura dos canais em machos ainda não foi descrita em detalhes. Sabe-se que pelo menos quatro proteínas estão presentes (Pnut, Set1, Set2 e anilina) formando o canal circular de machos (HIME *et al.*, 1996; GREENBAUM *et al.*, 2011; HAGLUND *et al.*, 2011). Organização semelhante de cistos, com presença de canais circulares, foi encontrada em *Apis mellifera* (Hymenoptera) e em *D. melanogaster* (CRUZ-LANDIM, 2001; de CUEVAS; MATUNIS, 2011). Em estudo realizado com *Aeolothrips intermedius* (Thysanoptera) os cistos possuem pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, mas a divisão não é sincronizada, e células em diferentes fases de divisão são encontradas (PACCAGNINI *et al.*, 2010). Em insetos da ordem Diptera, *Zaprionus indianus* e *Z. sepsoides*, a divisão é sincrônica, e todas as células de um

cisto estão na mesma fase de divisão, como encontrado em nosso estudo (REGO *et al.*, 2013).

Além dos canais circulares, observamos a presença de fusoma em *C. claveri*, que se assemelha ao retículo endoplasmático liso e liga as células germinativas do cisto através dos canais circulares. O fusoma é derivado de uma estrutura esférica das células primordiais da linhagem germinativa chamado espectrosoma. Em fêmeas, à medida que as células germinativas dividem-se para formar os cistos, o fusoma cresce e é distribuído entre as células do cisto. No final das divisões o fusoma se rompe. Nos machos, o fusoma se mantém até a fase de espermatíde (de CUEVAS *et al.*, 1997; GREENBAUM *et al.*, 2011). Fusomas encontrados em *D. melanogaster* contêm numerosas vesículas e túbulos membranosos, que são similares ao retículo endoplasmático liso, que parecem orientar a construção dos cistos, mas sua origem e conteúdo são desconhecidos (de CUEVAS *et al.*, 1997).

Em larvas foi possível observar cistos contendo espermatogônias e espermatócitos. Espermatídes só foram detectadas em pupas e adultos, indicando que em larvas ainda não ocorre o processo de espermiogênese. Larvas de *Conwentzia psociformis* (Neuroptera) também não apresentaram atividade espermatogênica. A espermiogênese incia-se somente durante a pupação. Em espécies de Coniopterygidae (Neuroptera), os testículos aparecem normais no estágio larval, mas são degenerados progressivamente na fase de pupa, de modo que reste apenas um recipiente oval ventral preenchido com espermatozóides no adulto (ZIZZARI *et al.*, 2008). Em *C. claveri*, os testículos não se degeneram, embora ainda não tenha sido possível encontrar espermatozóides maduros em adultos recém-emergidos.

Os espermatócitos em *C. claveri* se caracterizam pela presença de núcleos grandes, mitocôndrias e citoplasma pouco elétron-denso. Detectamos a presença de

estruturas circulares claras no citoplasma dos espermátócitos que acreditamos ser uma organização funcional da célula para a formação de estruturas relacionadas aos derivados mitocondriais, tal como o “nebenkern”, que dará origem ao derivado mitocondrial. Em *C. megacephala* e *Dolycoris baccarum* (Heteroptera), a presença de espermátócitos também foi observada em pupas, e que, após divisões meióticas, originam as espermátides (SUKONTASON *et al.*, 2011; ÖZYURT *et al.*, 2013).

A espermiogênese em *C. claveri* parece ocorrer como na maioria dos insetos, com formação de derivados mitocondriais, acrossoma, axonema, alongamento do núcleo e individualização dos espermatozóides, descritos em diversos trabalhos (AFZELIUS; DALLAI, 1988; DUMSER, 1980; NAME *et al.*, 2007; ZIZZARI *et al.*, 2008; PACCAGNINI *et al.*, 2010; NAME *et al.*, 2012; PAOLI *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2013).

No início da formação dos derivados mitocondriais, as mitocôndrias se agrupam e começam a se fundir, formando duas estruturas enroladas uma na outra em camadas concêntricas, denominada de complexo mitocondrial ou “nebenkern”. Depois de enovelada, essa massa de mitocôndrias, eventualmente, se divide em duas constituindo os derivados mitocondriais (PHILLIPS, 1970). Em *C. claveri* detectamos o início da formação do “nebenkern” e seu desenvolvimento mais adiantado, com aspecto mais elétron-denso que no primeiro estágio. Em seguida aparece dividido em dois, acompanhando o axonema. Durante a diferenciação desta estrutura em *Lucilia cuprina* (Diptera), o “nebenkern” se transforma em dois derivados mitocondriais com igual tamanho, no entanto, em *Lucilia eximia*, o “nebenkern” permanece único (NAME *et al.*, 2012). *C. psociformis* apresenta dois derivados mitocondrias alongados enquanto que em insetos da família Mantispidae (Neuroptera), os dois derivados mitocondriais são muito grandes, mostrando diferenças entre insetos da mesma ordem (ZIZZARI *et al.*, 2008; ZIZZARI *et al.*, 2010). Já em *Hypanthidium foveolatum*

(Hymenoptera) e *Tylopsis lillifolia* (Orthoptera), o “nebenkern” aparece inicialmente como um aglomerado de mitocôndrias e se divide em dois, formando os derivados mitocondriais (GRACIELLE *et al.*, 2009; VISCUSO *et al.*, 2012).

Em *L. cuprina*, durante os estágios de maturação da espermátide, o acrossoma se posiciona na parte anterior do núcleo que está em alongamento, e seu conteúdo é elétron-denso. O núcleo passa por um processo de condensação, ocorrendo de duas formas nesta espécie: condensação homogênea em todo o núcleo ou centralizada numa determinada região. Microtúbulos foram observados ao redor do núcleo (NAME *et al.*, 2012). Em *H. foveolatum* o núcleo se condensa gradualmente, da periferia para a região central, e apresenta microtúbulos ao redor (GRACIELLE *et al.*, 2009). Microtúbulos também foram observados ao redor do núcleo e do axonema em insetos da ordem Coleoptera, como *Dermestes frischii*, em famílias dentro da ordem Neuroptera, como Mantispidae e Coniopterygidae e em Hymenoptera, com *G. pennsylvanicum* (HODGES, 1982; ZIZZARI *et al.*, 2008; ZIZZARI *et al.*, 2010; PAOLI *et al.*, 2013). Em *C. claveri* podemos observar a condensação do núcleo centralizada, e não em todo o núcleo. Também foi detectada a presença dos microtúbulos da manchete, que, segundo Dumser (1980), é um agrupamento de microtúbulos que formam uma estrutura cilíndrica, a manchete, que auxilia no alongamento da espermátide. À medida que o citoplasma em alongamento alcança os microtúbulos do axonema, os microtúbulos da manchete se dissociam.

O axonema de *C. claveri* apresenta organização clássica descrita para a maioria dos insetos, com um par de microtúbulos centrais, 9 pares de microtúbulos periféricos e 9 microtúbulos acessórios (9+9+2) (PHILLIPS, 1970). Outros insetos da ordem Neuroptera possuem arranjos diferentes como 9+9+3, como *C. psociformis*, *Semidalis sp.* e *Coniopteryx sp.*, que é comum em insetos como aranhas (ZIZZARI *et al.*, 2008).

Já para *Libelloides longicornis* e *Perlamantista perla*, também Neuroptera, o padrão foi o clássico 9+9+2, que, como descrito em Zizzari *et al.*, (2010) é o padrão na maioria das espécies de Neuroptera. Para insetos de outras ordens, como *H. foveolatum* e *G. pennsylvanicum* (Hymenoptera), *Z. indianus* e *Z. sepsoides* (Diptera), o padrão se manteve, com o arranjo de 9+9+2 (GRACIELLE *et al.*, 2009; PAOLI *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2013).

Referências

- ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazon basin. Part 11a. Introductions and Chrysopini. **Acta Amazônica**, p. 413-79, 1985.
- AFZELIUS, B.A.; DALLAI, R. Spermatozoa of Megaloptera and Raphidioptera (Insecta, Neuropteroidea). **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, 101: 185-191, 1988.
- ARAÚJO, V.A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO, J. Morphology of the male reproductive system of the social wasp, *Polistes versicolor versicolor*, with phylogenetic implications. **Journal of Insect Science**, 10(71):1-10, 2010.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and Function**, 4th edn. London, Hodder & Stoughton, 788p, 1998.
- CRUZ-LANDIM, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) Testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, (91):183-189, 2001.
- DALLAI, R.; MERCATI, D.; GOTTARDO, M.; MACHIDA, R.; MASHIMO, Y.; BEUTEL, R.G. The male reproductive system of *Zorotypus caudelli* Karny (Zoraptera): Sperm structure and spermiogenesis. **Arthropod Structure & Development**, 40: 531-547, 2011.
- de CUEVAS, M.; LILLY, M.A.; SPRADLING, A.C. Germline cyst formation In *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.**, 31:405–28, 1997.
- de CUEVAS, M.; MATUNIS, E.L. The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. **Development**, 138: 2861-2869, 2011.
- DUMSER, J.B. The regulation of spermatogenesis in insects. **Ann. Rev. Entomol.**, 25: 341-69, 1980.

- FERREIRA, A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SANTOS, F.A.B.; VEIGA, A.F.S.L.; TEIXEIRA, A.A.C. Histologia do aparelho reprodutor masculino e morfometria da população celular dos folículos testiculares de *Chromacris speciosa* (Thunberg, 1824) (Orthoptera: Romaleidae) submetido a três fotoperíodos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 73(3): 349-355, 2006.
- FREITAS, S.; PENNY, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, San Francisco, 52(19): 245-395, 2001.
- FREITAS, S.P.C.; GONÇALVES, T.C.M.; SERRÃO, J.E.; COSTA, J.; SANTOS-MALLET, J.R. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Micron**, 41: 518-525, 2010.
- FRIEDLANDER, M.; SETH, R.K.; REYNOLDS, S.E. Eupyrene and apyrene sperm: Dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. **Adv. Insect Physiol.**, 32: 206-308, 2005.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 2002.
- GRACIELLE, I.M.S.; FIORILLO, B.S.; LINO-NETO, J.; BÃO, S.N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**, 40: 419-425, 2009.
- GREENBAUM, M.P.; IWAMORI, T.; BUCHOLD, G.M.; MATZUK, M.M. Germ cell intercellular bridges. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3: 1-19, 2011.
- GULLAN, P.J. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo: Roca, 2007.
- HAGLUND, K.; NEZIS, I.P.; STENMARK, H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. **Communicative & Integrative Biology**, 4(1): 1-9, 2011.
- HIME, G.R.; BRILL, J.A.; FULLER, M.T. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. **Journal of Cell Science**, 109: 2779-2788, 1996.

- HODGES, R.J. Ultrastructure of the somatic and germ cells of the testes of *Dermestes frischii* Kugelann (Coleoptera: Dermestidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryo**, 11(5/6): 235–253, 1982.
- KING, R.C.; AKAI, H. Spermatogenesis in *Bombyx mori*. I. The canal system joining sister spermatocytes. **J. Morphol.**, 134: 47–55, 1971.
- MOREIRA, J.; BRITO, P.; MANCINI, K.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. The descriptions of new microanatomical structures of the male reproductive system and sperm of *Myschocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). **Micron**, 43: 292–297, 2012.
- NAME, K.P.O.; BARROS-CORDEIRO, K.B.; FILHO, J.B.G.; WOLFF, M.; PUJOL-LUZ, J.R.; BÁO, S.N. Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermiogenesis in Three Species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Morphology**, 273:160–172, 2012.
- NAME, K.P.O.; REIS, G.P.F.; BÁO, S.N. An ultrastructural study of spermiogenesis in two species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biocell**, 31(2): 229–236, 2007.
- ONG, S.; TAN, C. Germline cyst formation and incomplete cytokinesis during *Drosophila melanogaster* oogenesis. **Dev Biol**, 337:84–98, 2010
- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. The morphology and histology of the male reproductive system in *Dolycoris baccarum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) - Light and scanning electron microscope studies. **Micron**, 44: 101–106, 2013.
- PACCAGNINI, E.; MERCATI, D.; GIUSTI, F.; CONTI, B.; DALLAI, R. The spermatogenesis and the sperm structure of Terebrantia (Thysanoptera, Insecta). **Tissue and Cell**, 42: 247–258, 2010.
- PAOLI, F.; GOTTARDO, M.; DALLAI, R.; ROVERSI, P.F. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of the egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Arthropod Structure & Development**, 42: 297–308, 2013.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. 3ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 759p, 1972.
- PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell. Biol.**, 44: 243–277, 1970.

- REGO, L.N.A.A.; SILISTINO-SOUZA, R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MADI-RAVAZZI, L. Spermatogenesis of *Zaprionus indianus* and *Zaprionus sepsoides* (Diptera, Drosophilidae): Cytochemical, structural and ultrastructural characterization. **Genetics and Molecular Biology**, 36(1): 50-60, 2013.
- SCUDELER, E.L.; SANTOS, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44: 125–132, 2013.
- SNODGRASS, R.E. Principles of insect morphology. 2.ed. London, Cornell University Press, 667p, 1993.
- SUKONTASON, K.L.; CHAIWONG, T.; CHAISRI, U.; KURAHASHI, H.; SANFORD, M.; SUKONTASON, K. Reproductive organ of blow fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): ultrastructural of testis. **Journal of Parasitology Research**, 2011.
- VISCUSO, R.; SOTTILE, L.; BRUNDO, M.V.; VITALE, D.G.M. Genesis of spermatodesms in *Tylopsis liliifolia* (Orthoptera: Phaneropterinae) and their transit in the male genital tract. **Tissue and Cell**, 44:195–203, 2012.
- ZIZZARI, Z.V.; LUPETTI, P.; MENCARELLI, C.; DALLAI, R. Sperm ultrastructure and spermiogenesis of Coniopterygidae (Neuroptera, Insecta). **Arthropod Structure & Development**, 37: 410–417, 2008.
- ZIZZARI, Z.V.; MACHIDA, R.; TSUTSUMI, K.; REYNOSO-VELASCO, D.; LUPETTI, P.; DALLAI, R. Ultrastructural studies on euspermatozoa and paraspermatozoa in Mantispidae (Insecta, Neuroptera). **Tissue and Cell**, 42: 81–87, 2010.

CAPÍTULO 2

Efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica*) na espermatogênese de *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

Effect of neem oil (*Azadirachta indica*) on spermatogenesis of *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae)

AUTORES: Ana Silvia Gimenes Garcia^{1*}, Patricia Fernanda Felipe Pinheiro², Daniela Carvalho dos Santos¹

¹ Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

² Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo de nim na morfologia dos testículos e na espermatogênese de *C. claveri*, um importante predador de ovos e larvas de insetos, de grande interesse econômico. O estudo foi realizado através de análises citoquímicas e imunocitoquímicas e em microscopia eletrônica de transmissão. O óleo de nim mostrou-se prejudicial ao processo de espermatogênese de *C. claveri*, uma vez que os testículos de animais submetidos ao tratamento apresentaram grande desorganização na formação e no desenvolvimento dos cistos espermáticos, retardando o processo de espermatogênese e a formação de gametas masculinos, o que pode trazer prejuízos para a reprodução da espécie. O conhecimento da morfologia do testículo e principalmente do processo de espermatogênese de *C. claveri*, juntamente com o conhecimento sobre o efeito da ingestão do óleo de nim sobre este órgão reprodutivo, pode trazer importantes contribuições sobre a viabilidade do uso associado do óleo de nim e de crisopídeos como predadores naturais não alvos em culturas que priorizam a manutenção da diversidade e manejo integrado das pragas.

Palavras-chave: *C. claveri*, espermatogênese, morfologia, óleo de nim, testículos.

Introdução

Os insetos da família Chrysopidae, conhecidos como crisopídeos, são os mais estudados dentro da ordem Neuroptera. São importantes predadores encontrados em muitas culturas de interesse econômico como algodoeiro, citros, milho, entre outras, exercendo um importante papel no controle biológico natural de pragas (FREITAS, 2002; GALLO *et al.*, 2002; SCUDELER; SANTOS, 2013).

Pesquisas envolvendo plantas com atividade inseticida evoluíram bastante nas últimas décadas e plantas da família Meliaceae têm sido as mais investigadas, destacando-se o nim (*Azadirachta indica* A. Juss) por sua atividade inseticida, provocando diversos efeitos nos insetos, como anti-alimentar, redução do crescimento, inibição da ecdise, redução da fecundidade, esterilização, mortalidade, repelência, entre outros (SCHMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; ROEL, 2001; MARTINEZ, 2002). A azadiractina afeta também a reprodução, tanto se o tratamento for feito na fase adulta, como ainda na juvenil. A maturação reprodutiva é comprometida (VIEGAS JÚNIOR, 2003). O interesse por essa espécie deve-se à presença de um composto denominado azadiractina, cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002; NEVES *et al.*, 2003). O óleo de nim afeta diversos órgãos e tecidos, inclusive os testículos de diversas espécies de insetos (SCHULZ; SCHLÜTER, 1983; SHIMIZU, 1988; LINTON *et al.*, 1997; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2004; TAYADE, 2012; SCUDELER; SANTOS, 2013; SCUDELER *et al.*, 2013)

Considerando a importância econômica de *C. claveri* na agricultura, surge a necessidade de ampliar o conhecimento a respeito da biologia deste inseto para o desenvolvimento de novas metodologias de controle biológico, com o uso do óleo de nim para controle e repelência de insetos pragas, sem agredir os inimigos naturais.

Assim, pretendemos avaliar o efeito da ingestão do óleo de nim no desenvolvimento e na morfologia dos testículos, assim como na espermatogênese de *C. claveri*.

Material e Métodos

Material Biológico

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

Os adultos foram criados em gaiolas transparentes de polietileno, com 18x9 cm. A superfície superior foi revestida internamente com papel sulfite branco, servindo como substrato para postura das fêmeas e colocação da dieta. Os ovos foram coletados a cada três dias, sendo acondicionados em caixas plásticas de 18x11x5 cm até a emergência das larvas. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram individualizadas em potes plásticos de 6x2 cm, e alimentadas com ovos de *D. saccharalis*. As pupas foram mantidas no mesmo pote em que já estavam na fase larval, pois seu casulo adere à superfície, e acrescentado um pedaço de algodão embebido com água destilada para manutenção da umidade.

Com a emergência dos adultos, estes foram retirados e colocados nas gaiolas formando casais, para manutenção da criação.

Instalação dos Bioensaios

Larvas de *C. claveri* recém emergidas foram individualizadas em potes plásticos 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 (30 min) (CORREIA *et al.*, 2009) e colocados nos potes que continham as larvas. Ovos tratados foram fornecidos em abundância às larvas e trocados a cada quatro dias, uma vez que o efeito residual do óleo de nim é de cinco à sete dias (SCHUMUTTERER, 1990). O controle foi feito com larvas alimentadas com ovos de *D. saccharalis* de um dia, imersos em água destilada (5s) e secos a temperatura ambiente (30 min).

Microscopia de Luz

Para a coleta e processamento dos testículos em microscopia de luz, foram utilizadas larvas de terceiro ínstar, pupas e adultos dos grupos controle e tratados. As larvas foram dissecadas três dias após sofrerem a ecdise para o terceiro instar. 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).

Análise Citoquímica

Os espécimes foram crioanestesiados e dissecados, pela região dorsal, fazendo uso de solução salina para insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) sob microscópio estereoscópico. Os testículos foram isolados e fixados em solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 24 horas. Em seguida, desidratação em séries crescentes de etanol (50%, 70%, 100%), embebição em resina metacrilato-glicol (Kit Leica historesina) e seções de 3 µm foram cortados em micrótomo Leica RM 2045. Os cortes foram corados com Hematoxilina e

Eosina (H.E.) (PEARSE, 1972) e analisados em microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

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 etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Os cortes histológicos serão submetidos ao protocolo do kit QIA-33 Calbiochem, para detecção de DNA fragmentado em células em processo de morte celular, conforme Gavrieli *et al.* (1992). Os alvos dessa reação foram os novos finais 3'-OH gerados pela fragmentação internucleossomal do DNA durante o processo de morte celular. Esta técnica que visa a identificação de células em apoptose é conhecida como TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP Nick End Labeling).

A análise e documentação fotográfica foi realizada em microscópio óptico Leica DM 500 com sistema de captação de imagens digital LAS EZ.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Larvas de terceiro instar, pupas e adultos de *C. claveri* dos grupos controle e tratados, foram crioanestesiados brevemente e dissecados em solução salina de insetos (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄) para remoção dos testículos.

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão, os testículos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0.1M (pH 7,3) durante 24 horas à temperatura ambiente; pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavados em água destilada, o material foi contrastado com acetato de uranila 0,5% em água durante 2 horas à temperatura

ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e embebidos em resina Araldite®. Cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina, enquanto os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e, em seguida, analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão TECNAI, da FEI Company, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP.

Resultados

Grupo controle

As análises apontaram que insetos machos de *Ceraeochrysa claveri* apresentam um par de testículos que possuem formato arredondado em larvas, alongado em pupas e espiralado nos adultos (Figs. 1A-C). A coloração varia de esbranquiçada, em larvas e pupas, para amarelo intenso em adultos. Cada testículo possui uma túnica celular que o recobre interna e externamente. A camada interna da túnica apresenta células com citoplasma e núcleo achatados, enquanto a túnica externa apresenta células um pouco mais arredondadas (Figs. 1A e 1B). Cada testículo é recoberto ainda por uma camada de tecido gorduroso perivisceral de coloração esbranquiçada, formada por uma massa compacta de células (Fig. 1C).

A espermatogênese em *C. claveri* ocorre no sentido apical-basal e as células espermáticas estão agrupadas em cistos com diferentes estágios de desenvolvimento. Em cada cisto, todas as células germinativas estão na mesma fase da espermatogênese devido à presença de pontes citoplasmáticas que permitem a comunicação entre as células do cisto e assim, o desenvolvimento sincrônico (Figs. 1D e 2A).

Os cistos encontrados possuem quatro estágios de maturação, dividindo-se em espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides. Os cistos constituídos por espermatogônias apresentam morfologia esférica, núcleo e citoplasma volumosos e foram encontrados em todas as fases de desenvolvimento dos insetos, ou seja, em larvas, pupas e adultos (Fig. 2A). Os cistos de espermatócitos apresentam citoplasma menos elétron-denso que das espermatogônias, núcleo grande e nucléolo evidente. Este tipo de cisto foi observado em todo o ciclo de vida do inseto analisado (Fig. 2B). Cistos contendo espermatídes apresentaram núcleo pequeno e condensado em um dos pólos, rodeado por microtúbulos da manchete, que auxiliam no alongamento das células (Fig. 2C). Também detectamos o “nebenkern”, que é um agrupamento de mitocôndrias que dá origem aos derivados mitocondriais, e o axonema, com arranjo de 9+9+2 microtúbulos. Cistos de espermatíde puderam ser observados em larvas, pupas e adultos, entretanto, apenas em adultos observamos as espermatídes pela microscopia eletrônica de transmissão. Já os espermatozóides foram detectados como células de formato alongado, com núcleo acompanhando o formato celular e dispostas em feixes (Fig. 2D). Porém, estas células não puderam ser detectadas na microscopia eletrônica de transmissão. Pretendemos investigar melhor esta fase na ultraestrutura.

Grupos tratados com óleo de nim

O formato dos testículos não apresentou diferenças em nenhuma das concentrações de óleo de nim testadas. Em microscopia de luz e eletrônica de transmissão podemos observar alterações na túnica externa em todos os grupos tratados com óleo de nim (Figs. 3A e 3C). As células que compõem esta túnica apresentaram uma forma mais achatada como a que apresenta a túnica interna, e citoplasma bastante vacuolizado. Já nos cistos espermáticos, podemos observar uma

grande retração, com espaçamento bastante evidente os cistos de testículos submetidos a todos os tratamentos (Figs. 3A, B e D).

Entre as células germinativas, cistos de espermatogônias não apresentaram alterações morfológicas em relação ao grupo controle. Os cistos contendo espermatócitos apresentaram alterações no formato do núcleo, o qual apresenta-se com contorno mais irregular que o controle (Fig. 3E). Cistos contendo espermátides não foram observados em pupas tratadas com 2% de óleo de nim, porém, em adultos, estes cistos apareceram em grande quantidade (Fig. 3F). Assim como no grupo controle, cistos contendo espermatozóides foram observados em todos os grupos experimentais (Fig. 4A). O que parece ter ocorrido é uma certa desorganização quanto à maturação dos cistos, já que eles não foram encontrados em ordem de maturação no sentido apical-basal, como é o caso do grupo controle, mas sim diferentes estágios de maturação na mesma região do testículo (Fig. 4B).

Foram detectados cistos com células em processo de morte celular (Figs. 4C e 4D). Todas as células do cisto se encontraram em degeneração, com núcleo condensado e organelas degeneradas. Para o teste do túnel em testículo de larvas, não observamos marcações positivas para apoptose em células germinativas em nenhum tratamento. Apenas células císticas e da túnica apresentaram marcação positiva (Figs. 4E-H).

FIG. 1. Visão geral dos testículos de larvas, pupas e adultos do grupo controle, em microscopia de luz (ML). **A.** Testículo de larva com morfologia arredondada, túnica externa (Te), apresentando células mais arredondadas, e túnica interna (Ti), com células mais achatadas emitindo septos (S). Podemos observar cistos de espermatogônias (Go). Coloração: H.E. Barra = 10µm. **B.** Testículo de pupa com formato alongado, túnica externa (Te) e interna (Ti) e tecido gorduroso ao redor (Tg). Presença de cistos de espermatogônias (Go) e espermatócitos (Ct). Coloração: H.E. Barra = 10µm. **C.** Visão geral do testículo de adulto de *C. claveri*. Nota-se morfologia espiralada, e tecido gorduroso perivisceral recobrindo todo o material (Tg). Coloração: H.E. Barra = 50µm. **D.** Detalhe de cistos de espermatogônias (Go) em divisão sincrônica (*), com células císticas (Cc) ao redor dos cistos. Coloração: H.E. Barra = 5µm.

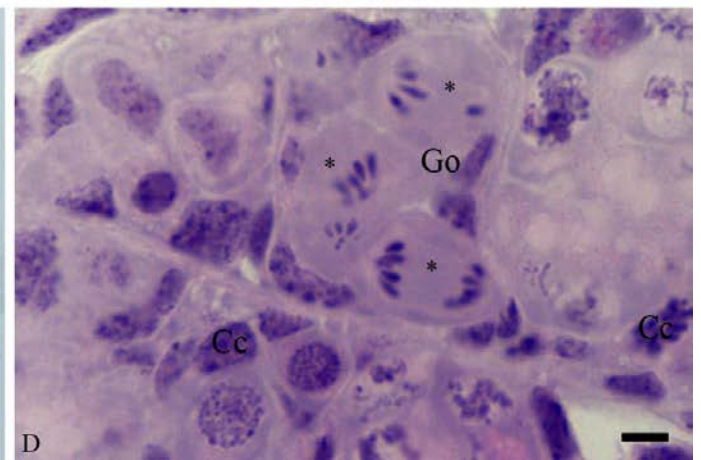
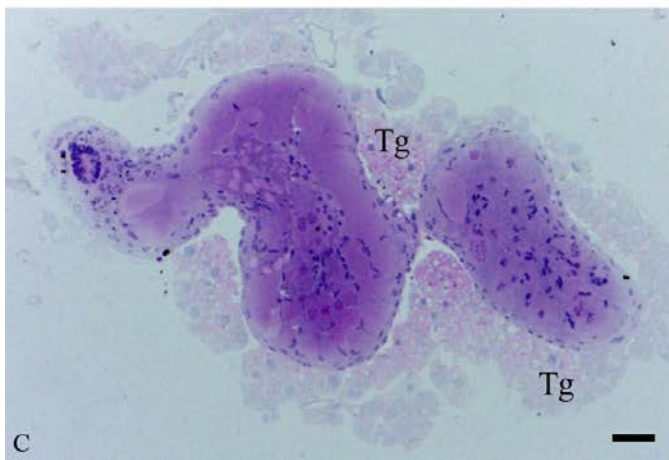
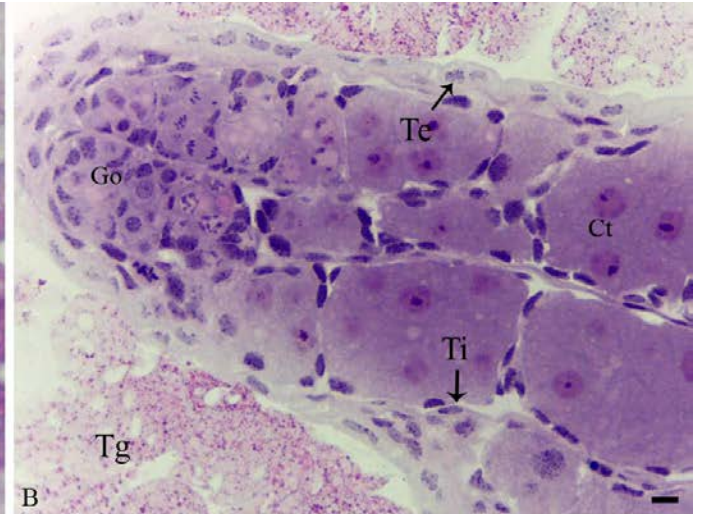
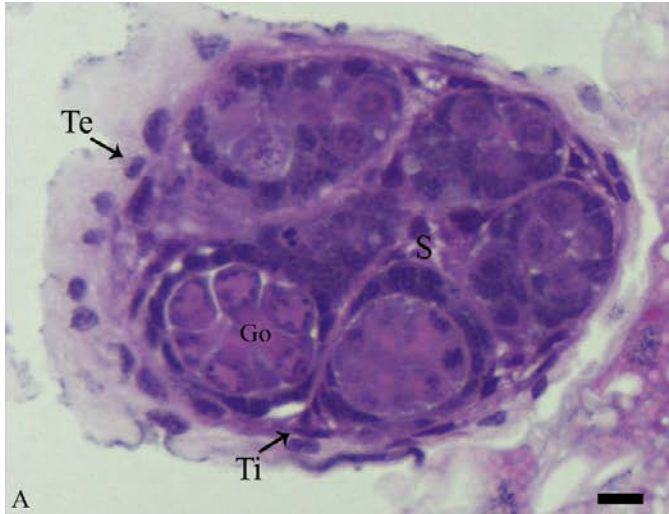


FIG. 2. A. Cisto contendo espermatogônias, com presença de núcleo (N), mitocôndrias (M), canais circulares (setas). Notar diferença de densidade entre o núcleo e o citoplasma. Barra = 2,5µm. **B.** Cisto de espermatócitos contendo núcleo (N) e mitocôndrias (M), canais circulares (seta). Barra = 2,5µm. **C.** Cisto de espermatídes apresentando núcleo (N) com cromatina condensada, microtúbulos da manchete (*), derivados mitocondriais (Dm) e axonema (Ax). Barra = 500nm. **D.** Espermatozóides (Z) em microscopia de luz. Coloração: H.E. Barra = 10µm.

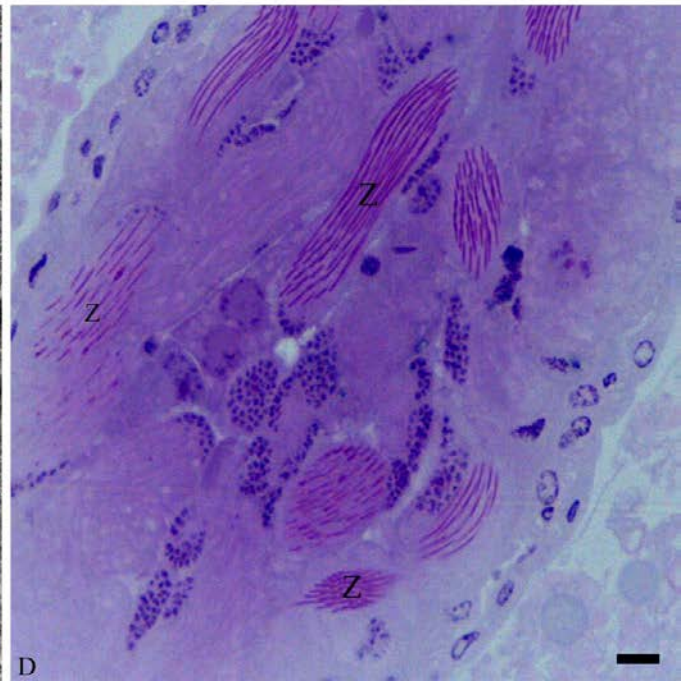
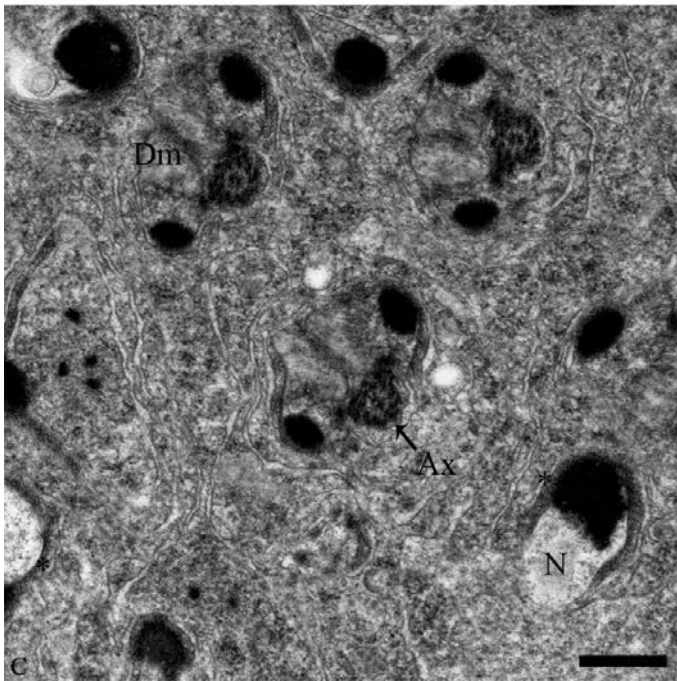
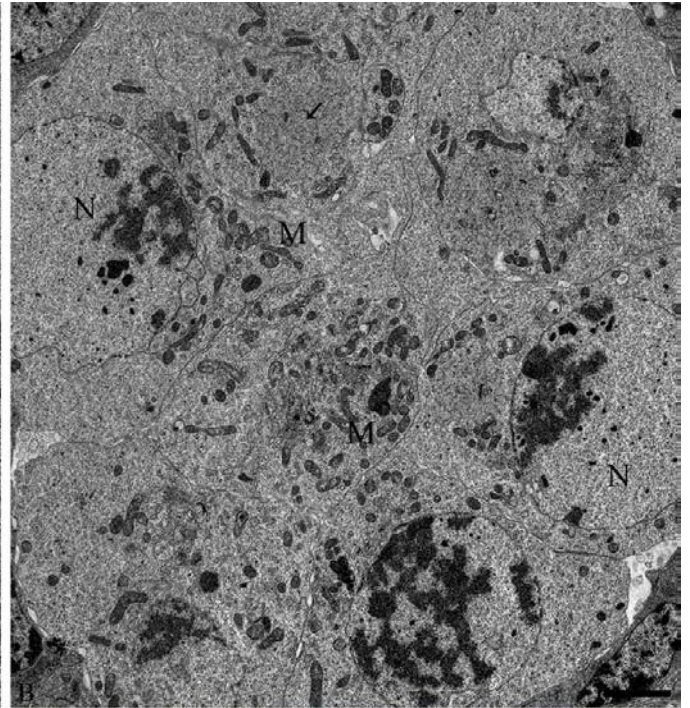
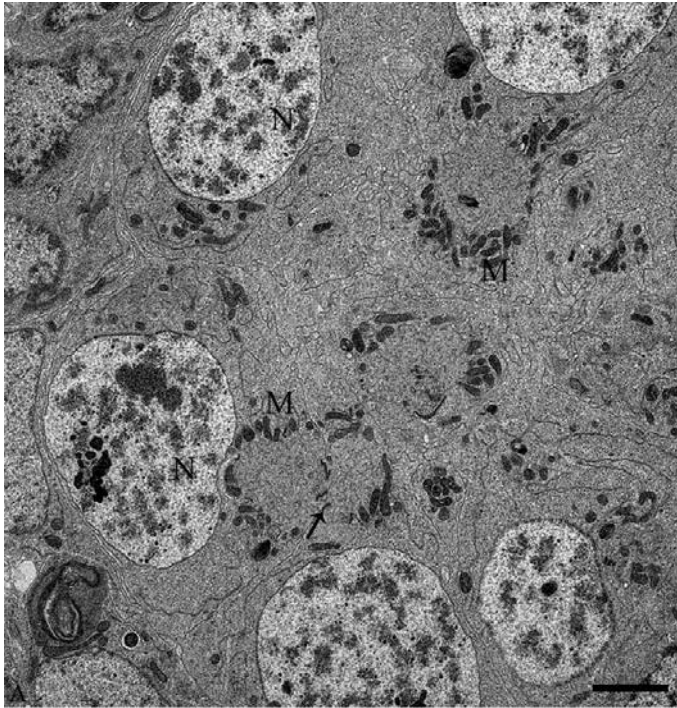


FIG. 3. Grupos tratados com óleo de nim. **A.** Testículo de larva tratada a 0,5%. Presença de cistos contendo espermatogônias (Go) e espermatócitos (Ct) e septo (S). Retração dos cistos (Rt). Coloração: H.E. Barra = 10µm. **B.** Testículo de adulto tratado a 0,5%. Deformação na túnica (Te) e retração dos cistos (Rt). Tecido gorduroso (Tg) ao redor do testículo. Coloração: H.E. Barra = 50µm. **C.** Túnica de pupa tratada a 2%, em MET. Grande vacuolização (V) e retração (Rt), e presença de núcleos (N). Barra = 1µm. **D.** Vários cistos de espermatídes (Td) de adulto tratado a 1%, em MET. Notar espaçamento entre os cistos (Rt). Barra = 2,5µm. **E.** Núcleo (N) de espermatócito de larva, tratada a 0,5%, em MET. Contorno irregular (setas). Barra = 2,5µm. **F.** Grande quantidade de espermatídes (Td) e presença de espermatócito (Ct) em adultos tratados a 0,5%, em ML. Coloração: H.E. Barra = 10µm.

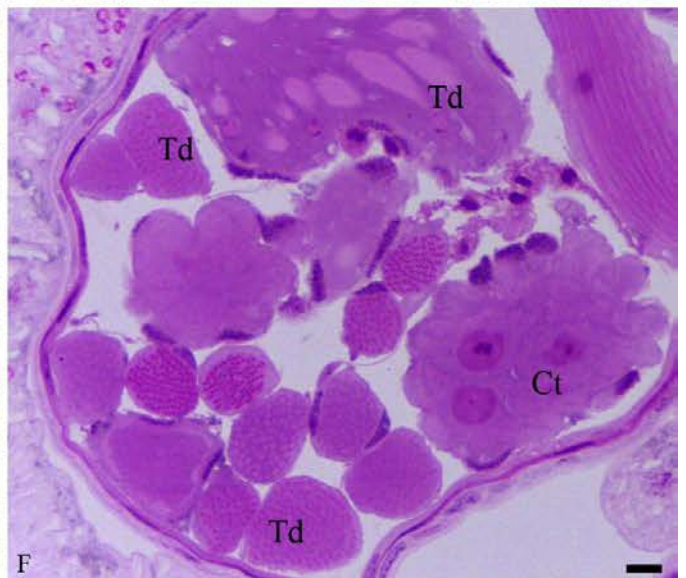
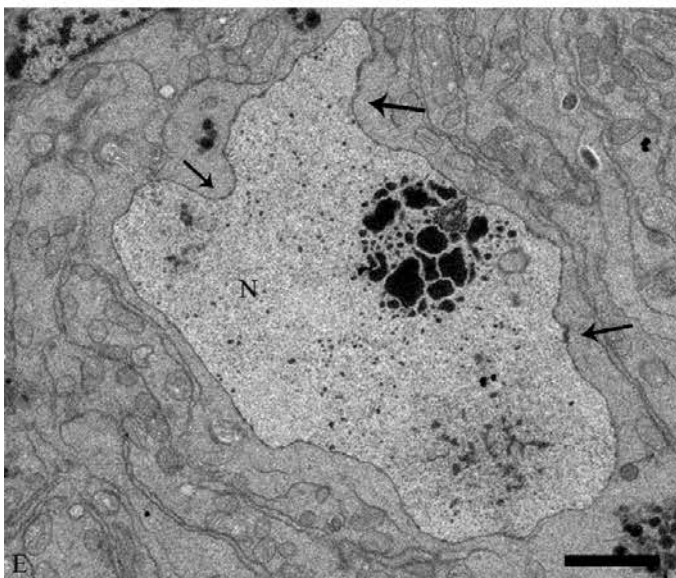
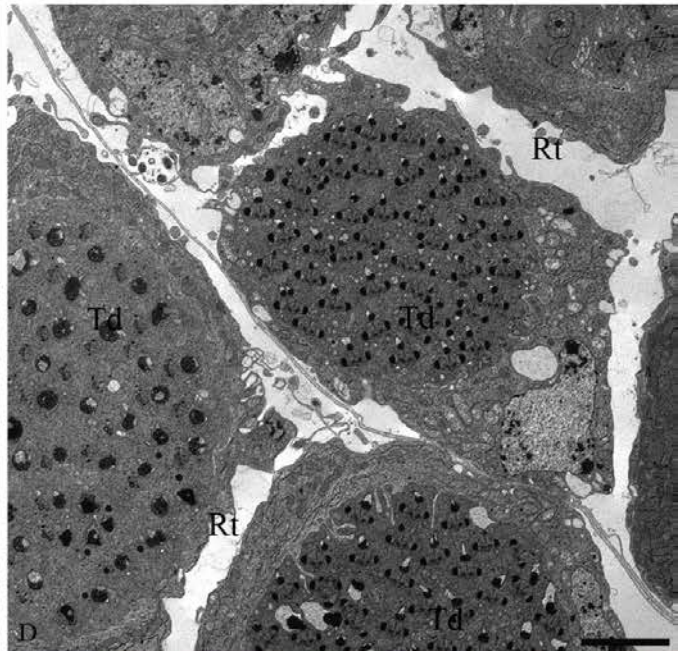
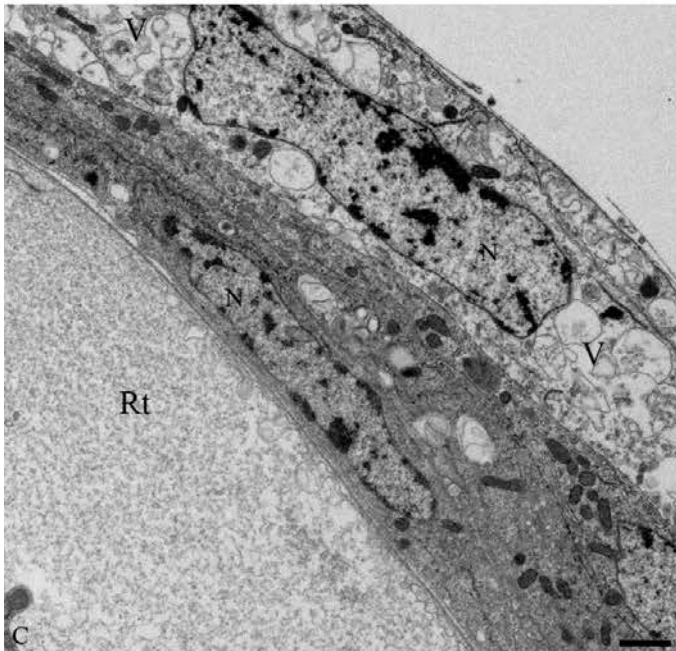
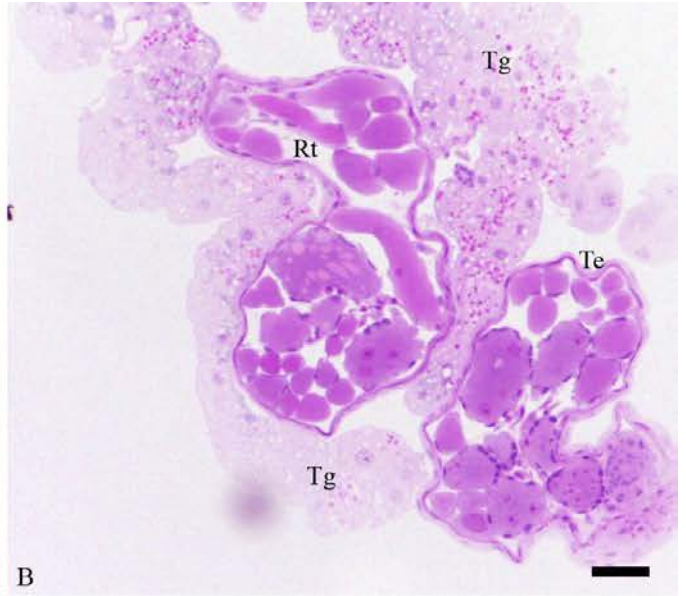
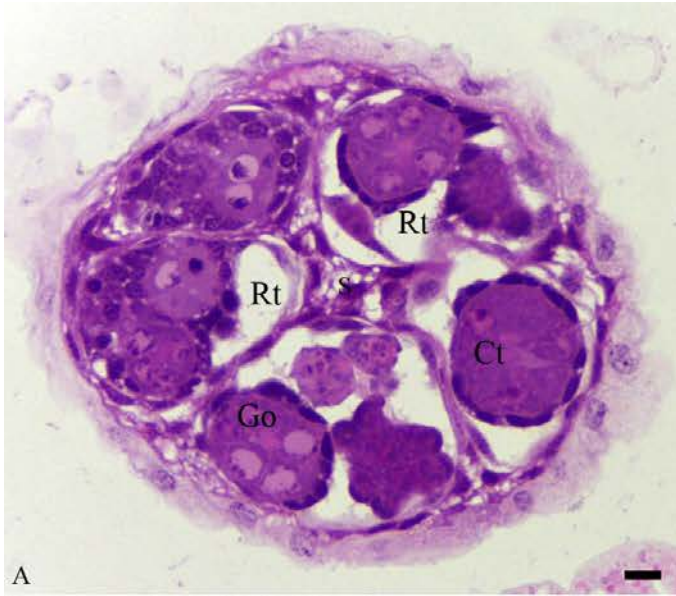
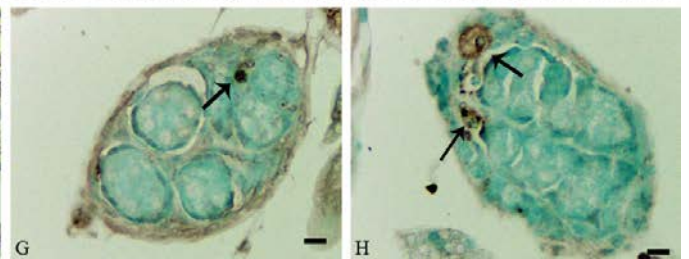
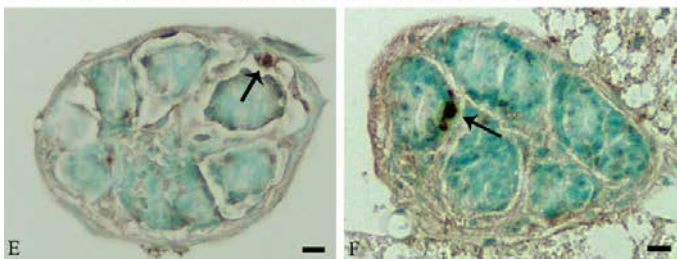
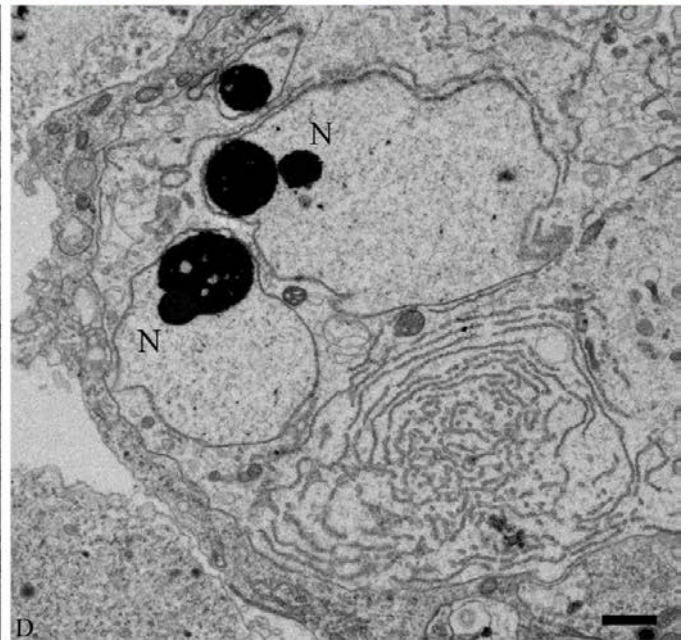
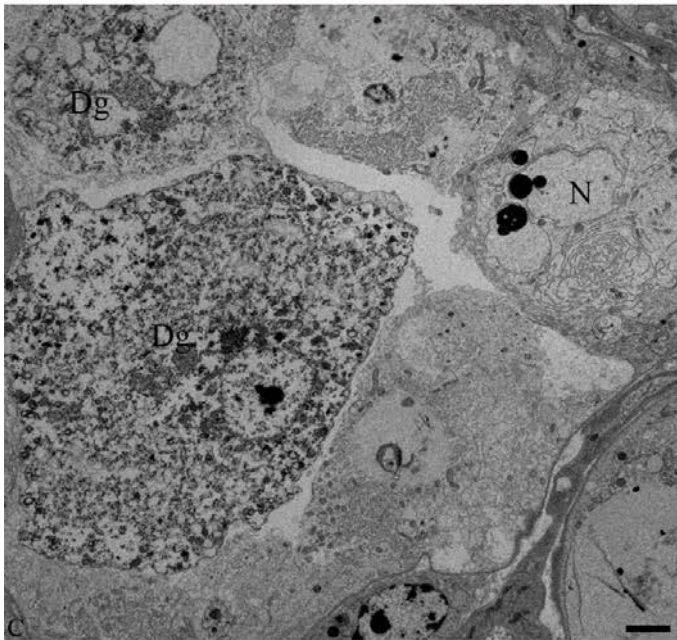
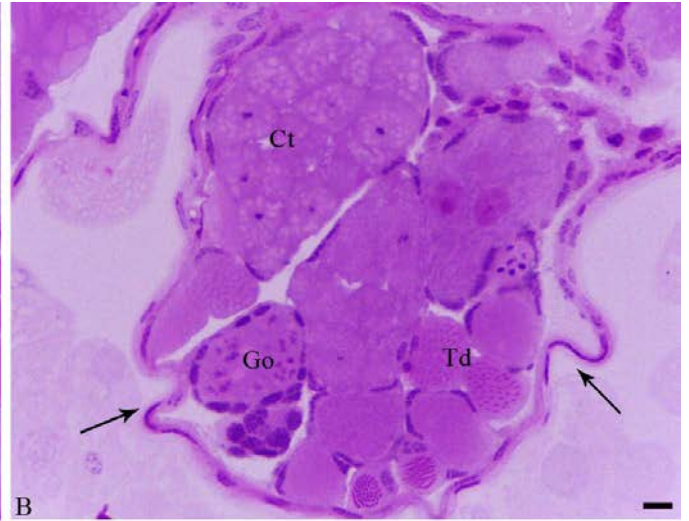
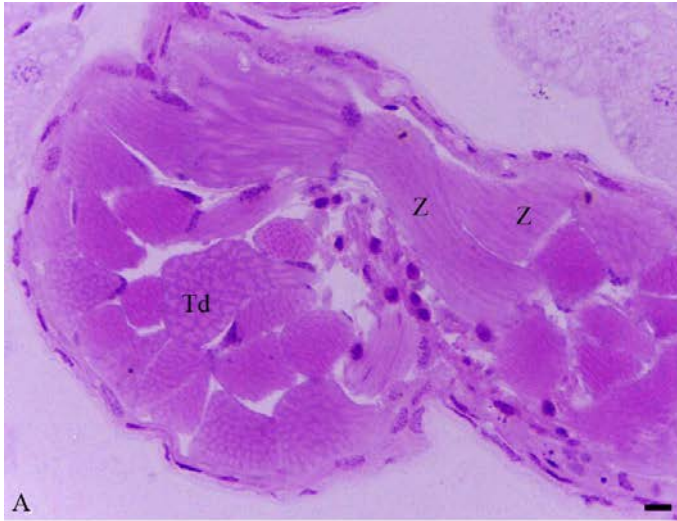


FIG. 4. A. Cistos de espermatozóides (Z) em adultos tratados a 1% em ML e grande quantidade de espermátides (Td). Coloração: H.E. Barra = 10µm. **B.** Testículos de adulto tratado a 2%, em ML, apresentando desorganização dos cistos. Podemos notar a presença de espermatogônias (Go) juntamente com espermatócitos (Ct) e espermátides (Td). Túnica irregular (setas). Coloração: H.E. Barra = 10µm. **C.** Cisto com característica de morte celular, em larva tratada a 2%. Citoplasma em degeneração (Dg) e núcleo condensado (N). Barra = 2,5µm. **D.** Detalhe em MET de célula em processo de morte, de larva tratada a 2%. Núcleo com cromatina condensada (N). Barra = 1µm. **E.** Teste do TUNEL em larva controle. Marcação positiva em célula da túnica (seta). Barra = 10µm. **F.** Teste do TUNEL em larva tratada a 0,5%. Marcação positiva em célula cística (seta). Barra = 10µm. **G.** Teste do TUNEL em larva tratada a 1%. Marcação positiva em célula cística (seta). Barra = 10µm. **H.** Teste do TUNEL em larva tratada a 2%. Marcação positiva em células da túnica e cística (setas). Barra = 10µm.



Discussão

Os testículos de *C. claveri* apresentam formato arredondado em larvas, alongado em pupas e espiralado em adultos. A superfície é lisa e recoberta por tecido gorduroso, apresentam traquéias em seu exterior e o vaso deferente também pode ser observado. Na literatura podemos encontrar insetos com os mais diversos formatos e colorações de testículos, como exemplo, em duas espécies de *Triatoma* (Hemiptera) e em *Chrysomya megacephala* (Diptera), os testículos possuem formato oval, mas em adultos de *Dolycoris baccarum* (Heteroptera), os testículos possuem formato alongado. O testículo desses insetos é recoberto por uma membrana testicular, interna e externamente (FREITAS *et al.*, 2010; SUKONTASON *et al.*, 2011; ÖZYURT *et al.*, 2013).

Para grupos tratados com óleo de nim, o formato não foi alterado com os tratamentos e a presença de tecido gorduroso, traquéias e vaso deferente se manteve. Em *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), insetos que receberam injeções de azadiractina pura, em diferentes concentrações, apresentaram seus testículos significativamente menores em comprimento, largura e peso, quando comparados ao grupo controle (LINTON *et al.*, 1997). Ainda em Orthoptera, *Heteracris littoralis* apresentou redução no comprimento dos testículos em insetos tratados topicamente com azadiractina, de 6,25mm para 5,15mm (GHAZAWI *et al.*, 2007).

A mesma organização dos testículos em cistos encontrada em *C. claveri* foi observada em três subfamílias de Aphidoidea, *Tylopsis liliifolia* (Orthoptera), *Lagria villosa* (Tenebrionidae) e *D. baccarum* (VITALE *et al.*, 2011; VISCUSO *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; ÖZYURT *et al.*, 2013). Os cistos encontrados no grupo controle apresentaram características normais, sendo estes cistos constituídos por espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides.

Para os grupos de *C. claveri* tratados com óleo de nim, foram observadas alterações na túnica externa em todas as concentrações testadas (0,5, 1 e 2%). Em *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) a azadiractina causa degeneração dos espermatócitos, e o autor sugere uma ação direta da azadiractina na membrana testicular, tornando o tecido incapaz de desenvolver espermatócitos (SHIMIZU, 1988). Em trabalho realizado por Nisbet *et al.* (1995) com *S. gregaria*, foi utilizado um derivado radiomarcado de azadiractina, com atividade biológica semelhante à molécula original, para identificar alguns dos tecidos onde a azadiractina se liga, e obtiveram como resultado que 94% deste composto se liga às membranas testiculares. Machos de *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera) tratados topicamente com azadiractina (25 a 200 ppm), houve desintegração do epitélio testicular, degeneração de espermátides e de feixes de espermatozóides (TAYADE, 2012).

Em *C. claveri* encontramos um possível retardo na espermatogênese, onde observou-se uma grande quantidade de cistos contendo espermátides, e uma discreta redução no número de cistos de espermatozóides. Schulz; Schlüter (1983) e Abdel-Rahman *et al.* (2004), relataram degeneração dos feixes de espermatozóides em *Epilachna varivestis* (Coleoptera) e *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera), respectivamente. Em *S. gregaria*, a azadiractina ligou-se preferencialmente a um dos componentes da cauda dos espermatozóides (NISBET *et al.*, 1996). Em *H. littoralis* houve degeneração do epitélio testicular e das espermátides. Em concentrações elevadas, a formação de cistos em torno das espermatogônias foi inibida, e não houve desenvolvimento de espermatócitos, mas em concentrações mais baixas, o processo de formação de espermatócitos prossegue até o aparecimento dos espermatozóides, mas podem ocorrer degenerações (GHAZAWI *et al.*, 2007).

No teste do TUNEL em larvas de *C. claveri*, a ingestão do óleo de nim não induziu a morte celular por apoptose, uma vez que não foram encontradas diferenças qualitativas de células em apoptose entre os grupos tratados e controle. Vários casos de morte celular por apoptose são relatados na literatura, em diversos órgãos de insetos como intestino, ovários e testículos (GREGORC; BOWEN, 1997; HARTFELDER; STEINBRUCK, 1997; POLANSKA *et al.*, 1997; CAGAN, 2003). Cistos em processo de morte foram verificados, mas é possível que seja um caso, por exemplo, de remoção cistos anormais ou durante a diapausa de alguns insetos (POLANSKA *et al.*, 1997; CAGAN, 2003). Em estudo de intestino de *C. claveri* submetido ao mesmo tratamento que o do presente trabalho, mostrou que o óleo de nim não causou morte celular por apoptose no tecido (SCUDELER; SANTOS, 2013).

Referências

- ABDEL-RAHMAN, A.G.; EL-SAYED, A.K.; LAILA, S.H.; IMAM, A.I. Histological alternations in male testis of *Pectinophora gossypiella* (S.) adults induced by treating larvae with neem formulations. **1º Arab Conference of Applied Biological Pest Control**, Cairo, Egypt, 5-7: 171p, 2004.
- CAGAN, R.L. Spermatogenesis: Borrowing the Apoptotic Machinery. **Current Biology**, 13: 600–R602, 2003.
- 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.

- DIAS, G.; OLIVEIRA, C. M.; LINO-NETO, J. Testicular and spermatogenic characteristics of *Lagria villosa* (Tenebrionidae: Lagriinae) with taxonomic inferences. **Tissue and Cell**, 45: 227-230, 2013.
- FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Parra, J. R. P. *et al.* São Paulo: Manole, cap. 13, p. 209-224, 2002.
- FREITAS, S.P.C.; GONÇALVES, T.C.M.; SERRÃO, J.E.; COSTA, J.; SANTOS-MALLET, J.R. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Micron**, 41: 518-525, 2010.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 2002.
- 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**, 119: 493-501, 1992.
- 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**, 16(1): 57-65, 2007.
- GREGORC, A.; BOWEN, I.D. Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. **Cell Biology International**, 21(3): 151-158, 1997.

- HARTFELDER, K.; STEINBRÜCK, G. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. **Invert. Reprod. Dev.**, 31: 237-250, 1997.
- LINTON, Y.M.; NISBET, A.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J. The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). **Journal of Insect Physiology**, 43(11): 1077-1084, 1997.
- MARTINEZ, S.S. **O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Paraná, Instituto Agronômico do Paraná IAPAR, 142p., 2002.
- MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, 39: 903-924, 1993.
- NEVES, B.P.; OLIVEIRA, I.P.; NOGUEIRA, J.C.M. Cultivo e utilização do nim indiano. **Circular Técnica**, 62, 2003.
- NISBET, A.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J.; WILLIAMS, L.M.; HANNAH, L.; JENNENS, L.; LEY, S.V.; MORDUE, W. Autoradiographic localization of [22,23-³H₂] dihydroazadirachtin binding sites in desert locust testes and effects of azadirachtin on sperm motility. **Tissue & Cell**, 28(6): 725- 729, 1996.
- NISBET, A.J.; MORDUE, A. J.; MORDUE, W. Detection of [22,23-³H₂] dihydroazadirachtin binding sites on *Schistocerca gregaria* (Forsk.) testes membranes. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 25(5): 551-557, 1995.
- ÖZYURT, N.; CANDAN, S.; SULUDERE, Z. The morphology and histology of the male reproductive system in *Dolycoris baccarum* Linnaeus 1758 (Heteroptera: Pentatomidae) - Light and scanning electron microscope studies. **Micron**, 44: 101–106, 2013.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied.** 3ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 759p, 1972.

- POLANSKA, M.A.; CIUK, M.A.; CYMBOROWSKI, B.; BEBAS, P. Germ Cell Death in the Testis and its Relation to Spermatogenesis in the Wax Moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), Effects of Facultative Diapause. **Journal of Experimental Zoology**, 303A: 1013-1029, 2005.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev. Int. Desenv. Local** 1: 43-50, 2001.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35: 271-297, 1990.
- SCHULZ, W.D.; SCHLÜTER, U. Structural damage caused by neem in *Epilichna varivestis*: a summary of histological and ultrastructural data. **II Tissues affected in adults**, p. 237-252, 1983.
- SCUDELER, E.L.; GARCIA, A.S.G.; PADOVANI, C.R.; SANTOS, D.C. Action of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on cocoon spinning in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 97: 176–182, 2013.
- SCUDELER, E.L.; SANTOS, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44: 125–132, 2013.
- SHIMIZU, T. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage army worm, *Mamestra brassicae*, *in vitro*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 46: 197-199, 1988.
- SUKONTASON, K.L.; CHAIWONG, T.; CHAISRI, U.; KURAHASHI, H.; SANFORD, M.; SUKONTASON, K. Reproductive organ of blow fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): ultrastructural of testis. **Journal of Parasitology Research**, 2011.

- TAYADE, D.V. Effect of phytochemical azadirachtin on the morphology and cytology of the testis follicle of the Indian grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Bioscience Discovery**, 3(1): 79-81, 2012.
- VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química nova**, 26(3): 390-400, 2003.
- VISCUSO, R.; SOTTILE, L.; BRUNDO, M.V.; VITALE, D.G.M. Genesis of spermatodesms in *Tylopsis liliifolia* (Orthoptera: Phaneropterinae) and their transit in the male genital tract. **Tissue and Cell**, 44:195–203, 2012.
- VITALE, D.G.M.; BRUNDO, M.V.; VISCUSO, R. Morphological and ultrastructural organization of the male genital apparatus of some Aphididae (Insecta, Homoptera). **Tissue and Cell**, 43: 271-282, 2011.

5. *Conclusões*

- ✓ O testículo de *Ceraeochrysa claveri* apresenta formatos diferentes durante o desenvolvimento do inseto, ou seja, se apresenta arredondado em larvas, alongado em pupas e espiralado em adultos;
- ✓ O desenvolvimento das células germinativas ocorre dentro de cistos, no sentido apical-basal. Os cistos encontrados foram de espermatogônias, espermatócitos, espermátide e espermatozóides, e a maturação destes cistos ocorre de maneira semelhante a diversos outros insetos, com divisões mitóticas nas espermatogônias, divisões meióticas nos espermatócitos, e diferenciação das espermátides em espermatozóides;
- ✓ O óleo de nim mostrou-se prejudicial ao processo de espermatogênese em *C. claveri*, uma vez que os testículos apresentaram desorganização na formação e no desenvolvimento dos cistos espermáticos, retardando o processo de espermatogênese e a formação de gametas masculinos, o que pode trazer prejuízos para a reprodução da espécie.

6. Referências

- ABDEL-RAHMAN, A.G.; EL-SAYED, A.K.; LAILA, S.H.; IMAM, A.I. Histological alternations in male testis of *Pectinophora gossypiella* (S.) adults induced by treating larvae with neem formulations. **1º Arab Conference of Applied Biological Pest Control**, Cairo, Egypt, 5-7: 171p, 2004.
- ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazon basin. Part 11a. Introductions and Chrysopini. **Acta Amazônica**, p. 413-79, 1985.
- AGUIAR-MENEZES, E.L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Documentos, 205. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 58p, 2005.
- ALBUQUERQUE, G.S.; TAUBER, C.A.; TAUBER, M.J. *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae): Life history and potential for biological control in Central and South America. **Biological Control**, 4(1):8-13, 1994.
- 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). Santa Maria, **Ciência Rural**, 39(2): 313-318, 2009.
- AL-TAWEEL, A.A; FOX, D.P. X-ray-induced cell death in the testis of dermestid beetles (Dermestes: Coleoptera). **Mutation Research**, 106: 55-71, 1982.
- BARBOSA, L.R.; FREITAS, de S.; AUAD, A.M. Capacidade reprodutiva e viabilidade de ovos de *Ceraeochrysa everes* (BANKS, 1920) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes condições de acasalamento. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, 26(3): 466-471, 2002.
- BARNARD, P.C. Adult morphology related to classification In: **Biology of Chrysopidae**. CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, p.19-29, 1984.

- BEZERRA, C.E.S.; NOGUEIRA, C.H.F.; SOMBRA, K.D.S.; DEMARTELAERE, A.C.F.; ARAUJO, E.L. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae): aspectos biológicos, potencial de utilização e perspectivas futuras. *Caatinga* (Mossoró,Brasil), 22(): 01-05, 2009.
- BIAGIONI, A.; FREITAS, S. Efeito de diferentes dietas sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysoperla defreitasi* Brooks (Neuroptera:Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, 30(2): 333-336, 2001.
- CAGAN, R.L. Spermatogenesis: Borrowing the Apoptotic Machinery. **Current Biology**, 13: 600–602, 2003.
- CANARD, M.; PRINCIPI, M.M. Development of Chrysopidae. In CANARD, M.; SÈMÈRIA, Y.; NEW, T.R. (Eds.) **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, p. 57-75, 1984.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and Function**, 4th edn. London, Hodder & Stoughton, 788p, 1998.
- 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.
- COSME, L.V.; CARVALHO, G.A.; MOURA, A.P.; PARREIRA, D.S. Toxicidade de óleo de nim para pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Arq. Inst. Biol.**, 76(2): 233-238, 2009.
- COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, 26(2): 173-185, 2004.

- CRUZ-LANDIM, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) Testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, (91):183-189, 2001.
- DORN, A.; RADEMACHER, J.M.; SEHN, E. Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. **J. Insect Physiol.**, 32(3): 231-238, 1986.
- DUMSER, J.B. The regulation of spermatogenesis in insects. **Ann. Rev. Entomol.**, 25: 341-69, 1980.
- FERREIRA, A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SANTOS, F.A.B.; VEIGA, A.F.S.L.; TEIXEIRA, A.A.C. Histologia do aparelho reprodutor masculino e morfometria da população celular dos folículos testiculares de *Chromacris speciosa* (Thunberg, 1824) (Orthoptera: Romaleidae) submetido a três fotoperíodos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 73(3): 349-355, 2006.
- FREITAS, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Parra, J. R. P. *et al.* São Paulo: Manole, cap. 13, p. 209-224, 2002.
- FREITAS, S.; PENNY, N.D. The green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian agro-ecosystems. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, San Francisco, 52(19): 245-395, 2001.
- FRIEDLANDER, M.; SETH, R.K.; REYNOLDS, S.E. Eupyrene and apyrene sperm: Dichotomous spermatogenesis in Lepidoptera. **Adv. Insect Physiol.**, 32: 206-308, 2005.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 2002.

- 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**, 119: 493-501, 1992.
- GEPP, J. Morphology and anatomy of the preimaginal stages of Chrysopidae: a short survey. In: **Biology of Chrysopidae**. CANARD, M.; SÉMÉRIA, Y.; NEW, T.R. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, p. 9-19, 1984.
- GILLOTT, C. **Entomology**. New York, Plenum, 798p, 2005.
- GRAVENA, S. **Manejo ecológico de pragas do cafeeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 30 p., 1992.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3): 335-343, 2007.
- GULLAN, P.J. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo: Roca, 2007.
- HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, v.301, p. 5-17, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983, 123p.
- LINTON, Y.M.; NISBET, A.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J. The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). **Journal of Insect Physiology**, 43(11): 1077-1084, 1997.
- MACEDO, L.P.M.; SOUZA, B.; CARVALHO, C.F.; ECOLE, C.C.; GOUSSAIN, M.M. Efeito da idade das fêmeas e de fatores ambientais sobre a reprodução do predador *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, 25(2): 309-313, 2003.
- MANTOANELLI, E.; ALBUQUERQUE, G.S. Desenvolvimento e comportamento larval de *Leucochrysa* (*Leucochrysa*) *varia* (Schneider) (Neuroptera, Chrysopidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(2): 302-311, 2007.

MARTINEZ, S.S. **O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.**

Paraná, Instituto Agrônômico do Paraná IAPAR, 142p., 2002.

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

NAME, K.P.O.; REIS, G.P.F.; BÁO, S.N. An ultrastructural study of spermiogenesis in two species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biocell**, 31(2): 229-236, 2007.

NEVES, B.P.; OLIVEIRA, I.P.; NOGUEIRA, J.C.M. Cultivo e utilização do nim indiano. **Circular Técnica**, 62, 2003.

NEW, T.R. The biology of Chrysopidae and Hemerobiidae (Neuroptera), with reference to their usage as biocontrol agents: a review. **Transactions of the royal Entomological Society of London**, London, 127(2): 115- 140, 1975.

NISBET, A.J.; MORDUE, A. J.; MORDUE, W. Detection of [22,23-³H₂] dihydroazadirachtin binding sites on *Schistocerca gregaria* (Forsk.) testes membranes. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 25(5): 551-557, 1995.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZU, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, p.9-57, 1991.

PAULIAN, M. Lutte biologique contre les ravageurs. Les Chrysopes, auxiliaires contre des insectes divers. PHYTOMA. La Défense des Végétaux, n. 522, dec. 1999.

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

PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell. Biol.**, 44: 243-277, 1970.

POLANSKA, M.A.; CIUK, M.A.; CYMBOROWSKI, B.; BEBAS, P. Germ Cell Death in the Testis and its Relation to Spermatogenesis in the Wax Moth, *Galleria*

- mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), Effects of Facultative Diapause. **Journal of Experimental Zoology**, 303A: 1013-1029, 2005.
- 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). **Biol. Control**, 22: 185–190, 2001.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Rev. Int. Desenv. Local** 1: 43-50, 2001.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIN, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 29: 799-808, 2000.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35: 271-297, 1990.
- SCHMUTTERER, H. Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. **J. Appl. Entomol.**, 121: 121–128, 1997.
- SCHULZ, W.D.; SCHLÜTER, U. Structural damage caused by neem in *Epilichna varivestis*: a summary of histological and ultrastructural data. **II Tissues affected in adults**, p. 237-252, 1983.
- SCUDELER, E.L.; GARCIA, A.S.G.; PADOVANI, C.R.; SANTOS, D.C. Action of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on cocoon spinning in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 97: 176–182, 2013.

- SCUDELER, E.L.; SANTOS, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44: 125–132, 2013.
- SCUDELER, E.L.; NANYA, S.; CONTE, H. Morfologia interna do aparelho reprodutor de pupa e adulto macho de *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Anais do XVIII EAIC**, Londrina: UEL, 2009.
- SHIMIZU, T. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage army worm, *Mamestra brassicae*, *in vitro*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 46: 197-199, 1988.
- SNODGRASS, R.E. Principles of insect morphology. 2.ed. London, Cornell University Press, 667p, 1993.
- TAYADE, D.V. Effect of phytochemical azadirachtin on the morphology and cytology of the testis follicle of the Indian grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Bioscience Discovery**, 3(1): 79-81, 2012.
- VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química nova**, 26(3): 390-400, 2003.