

## SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Morfologia do Canal Alimentar de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Alimentadas com Folhas Tratadas com NimALICELY A CORREIA<sup>1</sup>, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA<sup>1</sup>, ÁLVARO A C TEIXEIRA<sup>2</sup>, JOSÉ V DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, JORGE B TORRES<sup>1</sup><sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, aliceliac@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, valeria@dmfa.ufrpe.br. UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

Edited by Fernando Barbosa Noll – UNESP

Neotropical Entomology 38(1):083-091 (2009)

Morphology of the Alimentary Canal of *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Fed on Neem-Treated Leaves

ABSTRACT - Research involving plants with insecticide activity evolved significantly in the last decades. Among these plants, the neem tree, *Azadirachta indica*, is commonly used against several insects, mainly Lepidoptera. The neem efficiency depends on the target insect and on the concentration used. A barrier against potential toxic agents ingested together with the food is the alimentary canal. Thus, this research aimed to describe the histology of the alimentary canal of *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) larvae fed on leaves treated with neem (Neemseto®) at a concentration of 0.5% and 1.0% and non treated, at different intervals (48, 96, 144, 192 and 240h), by quantifying the regenerative cells and analyzing the secretion of the mesenteron histochemically. Larvae were immobilized at low temperatures (-4°C), the alimentary canal was removed, fixed in Bouin's aqueous, embedded in paraplast and historesin, sectioned and stained with hematoxilin-eosin and periodic acid-Schiff. The histology of the alimentary canal of *S. frugiperda* was similar to other lepidopterans. Neem effects on morphology were seen only in the mesenteron, depending on the time and concentration used, such as: epithelium, reduction on regenerative cells and on the secretory activity in this region, confirmed by the histochemistry in both neem concentrations. These alterations were observed after 96h at 1.0%, and 144h at 0.5%. These results indicate that neem (Neemseto®), at the concentrations studied, may be effective to control *S. frugiperda* because it promotes meaningful morphological alterations in the mesenteron.

KEY WORDS: Morphology, histochemistry, *Azadirachta indica*, botanical insecticide, fall armyworm, midgut

RESUMO - Pesquisas envolvendo plantas com atividade inseticida evoluíram bastante nas últimas décadas. Entre essas plantas destaca-se o nim, *Azadirachta indica*, que atua sobre várias espécies de insetos, principalmente Lepidoptera. Sua ação depende da espécie de inseto e concentração aplicada. Uma barreira contra potenciais agentes tóxicos ingeridos com o alimento é o canal alimentar. Assim, a pesquisa teve por objetivo descrever, histologicamente, o canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) alimentadas com folhas tratadas com nim (Neemseto®), nas concentrações 0,5 e 1,0%, e com folhas não tratadas, nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h, quantificar as células regenerativas e analisar, histoquimicamente, o produto de secreção do mesêntero. As lagartas foram imobilizadas a baixa temperatura (-4°C), o canal alimentar foi retirado, fixado em Bouin aquoso, incluído em *paraplast* e historesina, e os cortes corados por hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff. Histologicamente, o canal alimentar de *S. frugiperda* mostrou-se semelhante ao de outros lepidópteros. Alterações morfológicas só foram evidenciadas no mesêntero, sendo a sua intensidade dependente do tempo e da concentração utilizada. Observou-se degeneração do epitélio e redução de células regenerativas e de atividade secretora dessa região, em ambas as concentrações de nim. Essas alterações foram observadas após 96h a 1,0% e 144h a 0,5%. Esses resultados demonstram que o nim (Neemseto®), nas concentrações estudadas, pode ser efetivo para o controle de *S. frugiperda* por promover alterações morfológicas no mesêntero.

PALAVRAS-CHAVE: Morfologia, histoquímica, *Azadirachta indica*, inseticida botânico, lagartado-cartucho, mesêntero

A cultura do milho, *Zea mays*, no Brasil, tem sido explorada praticamente durante o ano todo, seja na safra de verão, inverno ou outono (safrinha), contribuindo para aumentar a infestação da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith), praga-chave da cultura. Essa praga é cosmopolita, com grande capacidade de infestar várias culturas de importância econômica em diversos países. No Brasil ocorre também em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e outras gramíneas (Cruz 1995, Cruz *et al* 1999).

O uso de inseticidas tem sido o método mais eficiente no controle desse inseto. Entretanto, os produtos são caros e, em alguns casos, pouco eficazes e perigosos se usados de forma intensiva e incorreta. Assim, alguns avanços nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) na cultura do milho têm sido realizados, destacando-se a utilização de diversos metabólitos secundários presentes em raízes, folhas e sementes de algumas plantas, as quais são denominadas “plantas inseticidas” (Schmutterer 1990, Roel *et al* 2000, Roel 2001).

O nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), destaca-se entre as plantas inseticidas, tendo como composto bioativo a azadiractina, a qual provoca efeito anti-alimentar, redução no crescimento, inibição da ecdise, anormalidades morfológicas, mortalidade e repelência em inúmeros insetos, principalmente Lepidoptera. Sua ação, contudo, depende da espécie de inseto e da concentração aplicada (Roel 2001, Martinez & van Emden 2001, Costa *et al* 2004).

O efeito de nim como regulador de crescimento está supostamente associado a sua interferência no sistema neuroendócrino dos insetos, afetando diferentes funções fisiológicas controladas por ações neurohormonais, como o processo de muda, a síntese de proteínas, reprodução, diapausa e comportamento [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000, Martinez 2002, Neves *et al* 2003]. Porém são escassos os relatos a respeito da interferência do nim sobre a histofisiologia do canal alimentar em insetos.

O canal alimentar estomodeoproctodeo representa uma área de contato entre insetos e o meio ambiente. É o foco de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas (Chapman 1998, Levy *et al* 2004a), principalmente a região do mesêntero, onde as células epiteliais estão envolvidas nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes), função endócrina (células endócrinas) e na renovação do epitélio (células regenerativas) (Chiang *et al* 1986). Um mecanismo de defesa nessa região é a membrana peritrófica, que tem papel fundamental na biologia do intestino médio, por estar posicionada entre o conteúdo alimentar e o revestimento epitelial, desempenhando a função de proteger esse epitélio de danos mecânicos, exercendo ainda função de barreira contra toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (Lehane 1997).

Alterações no canal alimentar, principalmente na região do mesêntero, podem afetar o crescimento e desenvolvimento de insetos, bem como todos os eventos fisiológicos, pois esses processos dependem da alimentação adequada, de sua absorção e transformação no canal alimentar [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000]. Apesar de serem abundantes os estudos sobre os efeitos biológicos

do nim em Lepidoptera, não existem trabalhos que abordem alterações morfológicas da ação desse composto sobre a morfologia do canal alimentar de *S. frugiperda*. Assim, esse trabalho teve por objetivos descrever, histologicamente, o canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas tratadas com nim (Neemseto<sup>®</sup>) nas concentrações 0,5 e 1,0%, e com folhosa não-tratadas, verificar a interferência do nim na renovação do epitélio por meio da quantificação das células regenerativas, e analisar, histoquimicamente, o produto de secreção do mesêntero.

## Material e Métodos

**Obtenção das plantas.** Plantas de milho híbrido duplo AG 1051 foram cultivadas em casa-de-vegetação. Para tanto, cinco grãos de milho foram plantados por vasos de 5 L com solo + húmus de minhoca na proporção 2:1 + 12,13g de N-P-K (formulação 4% nitrogênio – 14% fósforo – 8% potássio). Após germinação foi realizado o desbaste de três plantas, ficando apenas as duas plantas mais desenvolvidas e com maior número de folhas por vaso, as quais foram utilizadas na alimentação dos insetos.

**Obtenção dos insetos.** Lagartas de *S. frugiperda* foram mantidas à temperatura de  $25,2 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $67 \pm 0,7\%$  e fotofase de 12h. As lagartas foram alimentadas com folhas de milho híbrido duplo AG 1051, cultivado em casa-de-vegetação, conforme método descrito anteriormente.

**Instalação dos bioensaios.** Lagartas de *S. frugiperda* de 3<sup>o</sup> instar (oito dias de desenvolvimento) foram alimentadas durante 48h com pedaços de folhas de milho (6 x 4,5 cm), com 20 a 40 dias de idade, tratados com nim (formulação comercial Neemseto<sup>®</sup>) nas concentrações de 0,5% (5ml/l) e 1,0% (10ml/l) e água destilada (testemunha), através da técnica de imersão (5 s), e secos a temperatura ambiente (30 min). As lagartas foram individualizadas em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido, e após o período inicial de alimentação (48h), as folhas foram substituídas diariamente por folhas não-tratadas, até que as lagartas atingissem a fase de pupa.

**Coleta e processamento do canal alimentar.** As lagartas submetidas aos tratamentos com nim a 0,5 e 1,0% foram avaliadas nos intervalos de 48, 96, 144, 192 e 240h, e a testemunha nos intervalos de 48, 96 e 144h, em virtude de as lagartas terem atingido a fase de pupa após esse período. As lagartas foram imobilizadas à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , dissecadas sob estereomicroscópio para retirada do estomodeo, mesêntero e proctodeo e fixadas em Bouïn aquoso por 6h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a desidratação em banhos de concentrações crescentes de etanol e diafanização em xilol, o material foi incluído em *paraplast* e historesina. Secções de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS.) (Michalany 1990). A análise histológica foi realizada utilizando-se microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e as imagens capturadas em fotomicroscópio OLYMPUS BX-51.

**Quantificação das células regenerativas.** Com o objetivo de verificar a interferência do nim na renovação do epitélio

do mesêntero, foi realizada a quantificação das células regenerativas baseando-se em Pinheiro *et al* (2003). Foram utilizadas cinco secções de cortes obtidas da região mediana do mesêntero de cinco lagartas. Cada lagarta correspondeu a uma repetição, sendo utilizadas cinco repetições/intervalo de tempo/tratamento. A captura de imagem foi efetuada por meio de câmera de vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através do aplicativo de pontos, associado ao programa ImageLab 2000 para Windows 3x. Em cada repetição (lâmina com a secção do corte) foram contadas as células regenerativas em dez campos aleatórios. O número médio de células regenerativas obtido nas amostras (repetições) de lagartas de *S. frugiperda* foi submetido à análise de variância em esquema fatorial 3x5 considerando os três tratamentos (testemunha, nim a 0,5 e 1,0%) e cinco intervalos de avaliação após tratamento (48, 96, 144, 192 e 240h) como fatores principais. No caso de resposta significativa na quantidade de células regenerativas em função dos intervalos de avaliação após tratamento, os resultados foram submetidos à análise de regressão para a sua interpretação e selecionadas as equações com base na sua significância (F e P) e maior coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Todas as análises foram conduzidas utilizando o Programa Estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001).

## Resultados

Histologicamente, o estomodeo de lagartas de *S. frugiperda* apresentou-se revestido por tecido epitelial simples envolvido por uma espessa íntima. Esse tecido apóia-se sobre duas camadas de tecido muscular estriado, sendo a camada mais interna disposta longitudinalmente e a mais externa, circularmente (Fig 1A). As células do tecido epitelial caracterizaram-se por apresentar morfologia achatada, núcleo bastante volumoso e citoplasma escasso (Fig 1B). O proctodeo também é revestido por tecido epitelial do tipo simples, envolvido por uma espessa íntima, porém com células de morfologia colunar, núcleo elíptico e basal (Fig 1C). Nessa região observaram-se duas camadas de tecido muscular estriado, sendo que a mais interna está disposta circularmente, enquanto que a mais externa se dispõe longitudinalmente (Fig 1D).

Externamente, o mesêntero é revestido por duas camadas de músculos, sendo a mais interna, apoiando o epitélio, circular e delgada, e a mais externa longitudinal, formando feixes espaçados. O epitélio é do tipo colunar simples, onde foram evidenciados três tipos de células: as regenerativas, situadas na base da camada epitelial, com citoplasma basófilo e núcleo esférico e central (Fig 2A); as células caliciformes, com a membrana plasmática do lúmen apresentando invaginações formando a câmara globosa, citoplasma acidófilo claro e núcleo basal (Fig 2B), e as células colunares altas, apresentando borda em escova, núcleo oval e citoplasma acidófilo (Fig 2C). Separando essas células do conteúdo alimentar evidenciou-se a membrana peritrófica (Fig 2B). Foi possível observar também, intensa atividade de secreção de natureza mucosa no lúmen do mesêntero, comprovada pela reação PAS positiva (Fig 2D). Células endócrinas não foram evidenciadas.

As lagartas de *S. frugiperda* tratadas com nim não apresentaram alterações morfológicas nas regiões do estomodeo e proctodeo. No entanto, na região do mesêntero, evidenciaram-se alterações morfológicas que variaram de intensidade de acordo com o tempo de exposição e a concentração (0,5 e 1,0%). Após 48h e 96h de tratamento, foram visualizadas modificações teciduais nas lagartas tratadas com nim, pois a lâmina epitelial apresentou células delgadas e alongadas, não sendo possível distinguir os tipos celulares, além de se reduzir significativamente a atividade secretora nas duas concentrações estudadas em comparação com a testemunha (Figs 3A e B). A redução observada no tratamento com nim a 1,0% parece ter afetado o processo de digestão devido à presença de alimento intacto no lúmen da região mediana do mesêntero (Fig 3C), o que não ocorreu no tratamento com nim a 0,5% (Fig 3D).

No tratamento com o nim a 0,5%, no intervalo de 144h, a camada epitelial apresentou áreas com projeções para o lúmen (Fig 4A), além do afastamento desse tecido da camada muscular (Fig 4B). No entanto, nas lagartas tratadas com nim a 1,0%, essas alterações foram evidenciadas já a partir de 96h, sendo verificado ainda o desprendimento de algumas células junto com o produto de secreção (Figs 4C e D). Em ambas concentrações não foi observada a borda em escova.

Os tratamentos com nim (0,5 e 1,0%) diminuíram o número de células regenerativas da região mediana do mesêntero em relação à testemunha ( $F_{2, 52} = 29,22$ ;  $P < 0,0001$ ), sendo o mesmo observado ao longo dos tempos de avaliação ( $F_{4, 52} = 6,17$ ;  $P = 0,0004$ ). Entretanto, não foi observada interação entre tratamentos e tempo de avaliação ( $F_{6, 52} = 0,71$ ;  $P = 0,6417$ ). A contagem ao longo do tempo demonstrou que no tratamento testemunha, o número de células se manteve constante ( $P > 0,05$ ), embora apresentasse queda na quantidade de células no intervalo de 144h. Por outro lado, em ambos os tratamentos com nim, o número de células regenerativas se reduziu significativamente em todos os intervalos de tempo após tratamento (Fig 5).

## Discussão

A camada epitelial do canal alimentar de lagartas de *S. frugiperda* seguiu o padrão descrito na literatura, que relata que todas as regiões são revestidas por uma única camada de células, com morfologia achatada na região do estomodeo e cúbica no proctodeo. A disposição da musculatura por todo o canal também seguiu padrão uniforme (Chapman 1998). Segundo Cavalcante & Cruz-Landim (1999) e Pinheiro *et al* (2003), no epitélio do mesêntero dos insetos há predominância de quatro tipos de células: colunares, caliciformes, regenerativas e células endócrinas. Essas células predominaram ao longo do epitélio do mesêntero das lagartas de *S. frugiperda*, as quais são consideradas responsáveis pela absorção do alimento digerido, mostrando aspectos morfológicos similares a outros lepidópteros (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Levy *et al* 2004a). Conforme estudos de Harper & Hopkins (1997) e Harper & Granados (1999), essas células epiteliais, também são responsáveis pela secreção de uma malha de microfibrilas de quitina embebidas

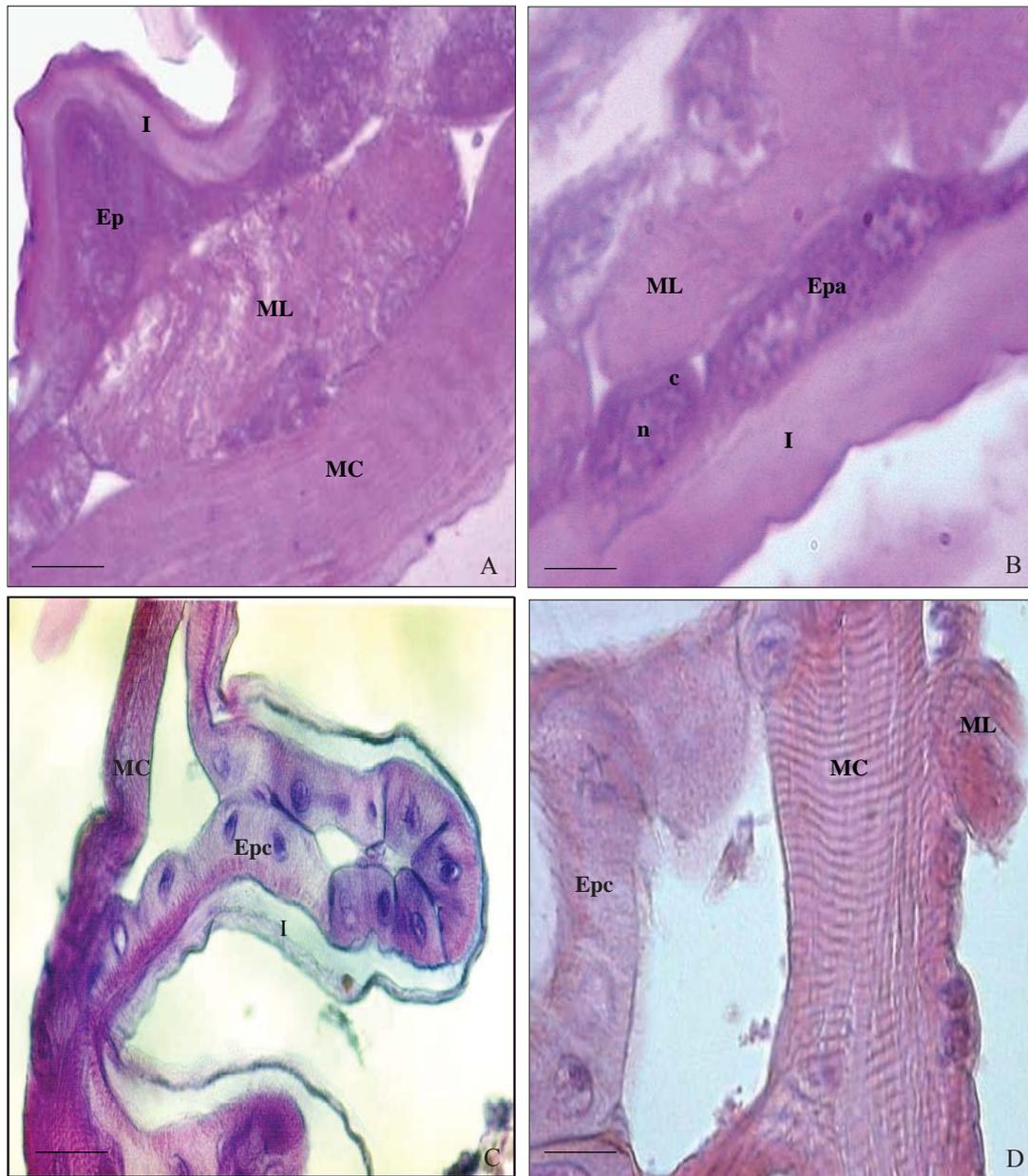


Fig 1 Estomodeo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (testemunha): (A) Parede do estomodeo mostrando tecido epitelial (Ep) e muscular em duas camadas: Longitudinal (ML) e circular (MC). Barra 10 µm. (B) Tecido epitelial simples achatado (Epa). Barra 10 µm. Proctodeo: (C) Epitélio simples colunar e íntima. Barra 25 µm. (D) Tecido muscular estriado disposto longitudinalmente (ML) e circularmente (MC). Barra 25 µm. Coloração HE. I – íntima, c – citoplasma, n – núcleo, Epc – epitélio colunar.

em uma matriz de proteínas e glicoproteínas denominada de membrana peritrófica, que exerce várias funções, tais como: proteção do epitélio contra danos mecânicos e químicos provocados pelo alimento, barreira física contra microrganismos e compartimentalização da digestão (Martins *et al* 2006).

As células caliciformes observadas em *S. frugiperda* são similares às de outros lepidópteros, apresentando cavidade típica, denominada de câmara globosa. Localizadas por todo epitélio do mesêntero, intercaladas por células

colunares, essas células têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células colunares na absorção de metabólitos (Cavalcante & Cruz-Landim 1999, Klowden, 2002). Através da análise histoquímica pelo P.A.S. foi possível constatar sua intensa atividade secretora de natureza mucosa, pois o corante reage com os grupamentos aldeídos dos polissacarídeos neutros, principal constituinte do muco (Junqueira & Carneiro 2008, Ross & Pawlina 2008).

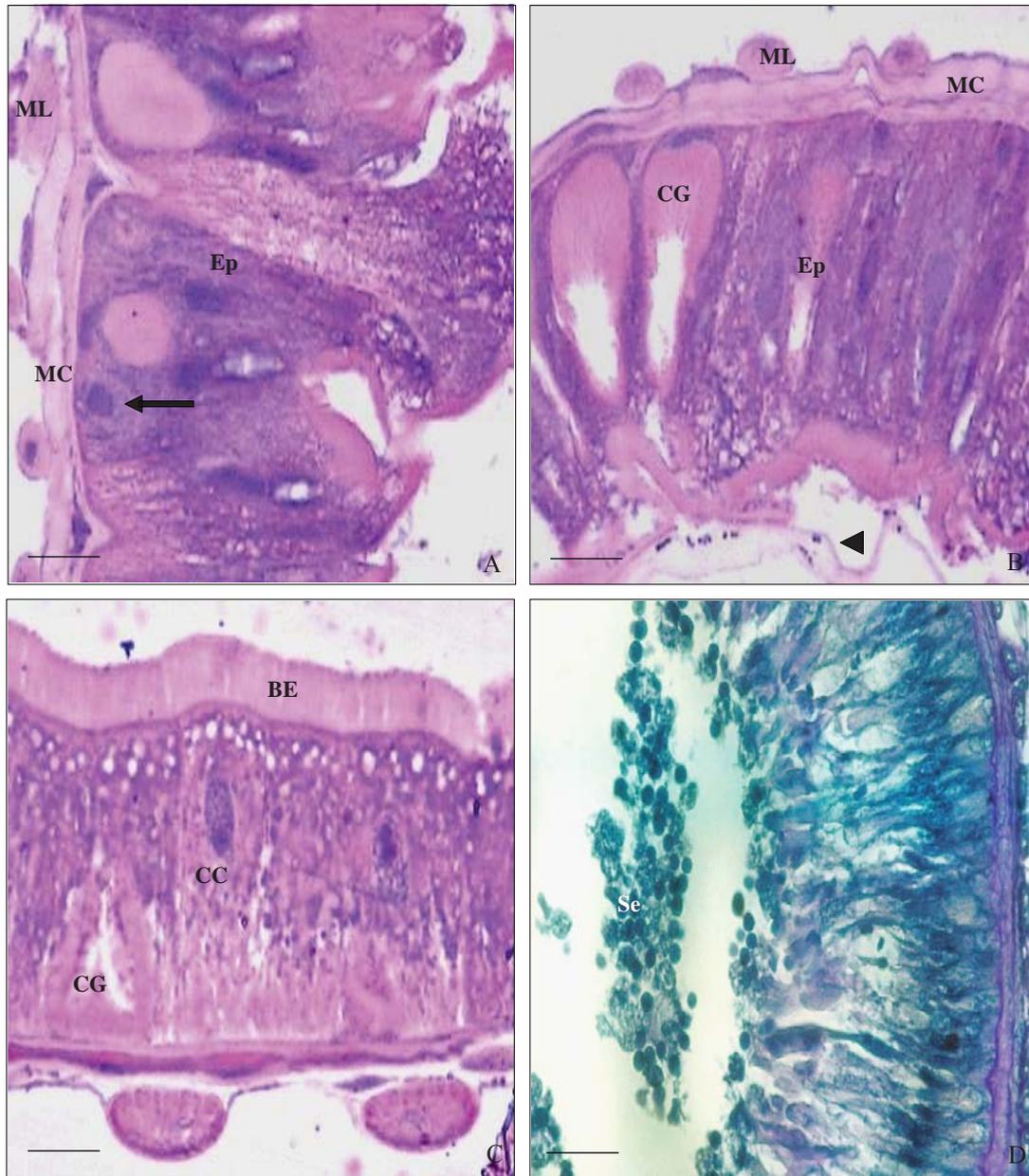


Fig 2 Mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (testemunha): (A) Tecido epitelial, muscular e célula regenerativa. Barra 25  $\mu$ m. (B) Células caliciformes e membrana peritrófica. Barra 25  $\mu$ m. (C) Célula colunar com borda em escova. Barra 25  $\mu$ m. Coloração H-E. (D) Secreção PAS positiva. Barra 25  $\mu$ m. Coloração PAS. ML – músculo longitudinal, MC – músculo circular, Ep – epitélio, n – núcleo, CR – célula regenerativa, ponta de seta – membrana peritrófica, CCa – célula caliciforme, CC – célula colunar, BE – borda em escova, Se – secreção.

As células regenerativas são indiferenciadas e responsáveis pela renovação do epitélio do intestino médio, substituindo as células que se desgastam e se perdem durante o processo de digestão, além de possibilitar o crescimento do canal alimentar a cada ecdise. São encontradas na base do intestino médio, isoladamente ou em grupos formando ninhos, não havendo diferenças em sua abundância ao longo do mesêntero (Pinheiro *et al* 2003, Wanderley-Teixeira *et al* 2006, Martins *et al* 2006).

A não visualização das células endócrinas no intestino

médio de *S. frugiperda* corrobora os dados de literatura, os quais apontam a dificuldade de identificação dessas células em microscopia de luz, utilizando-se de técnicas de rotina, sendo necessárias análises ultra-estruturais e imunohistoquímicas (Cassier & Frain-Maurel 1977, Montuenga *et al* 1989, Jimenez & Gilliam 1990).

As lagartas de *S. frugiperda* tratadas com nim não apresentaram alterações morfológicas nas regiões do estomodeo e proctodeo, visto que essas regiões são revestidas internamente por uma espessa íntima, que atua como barreira

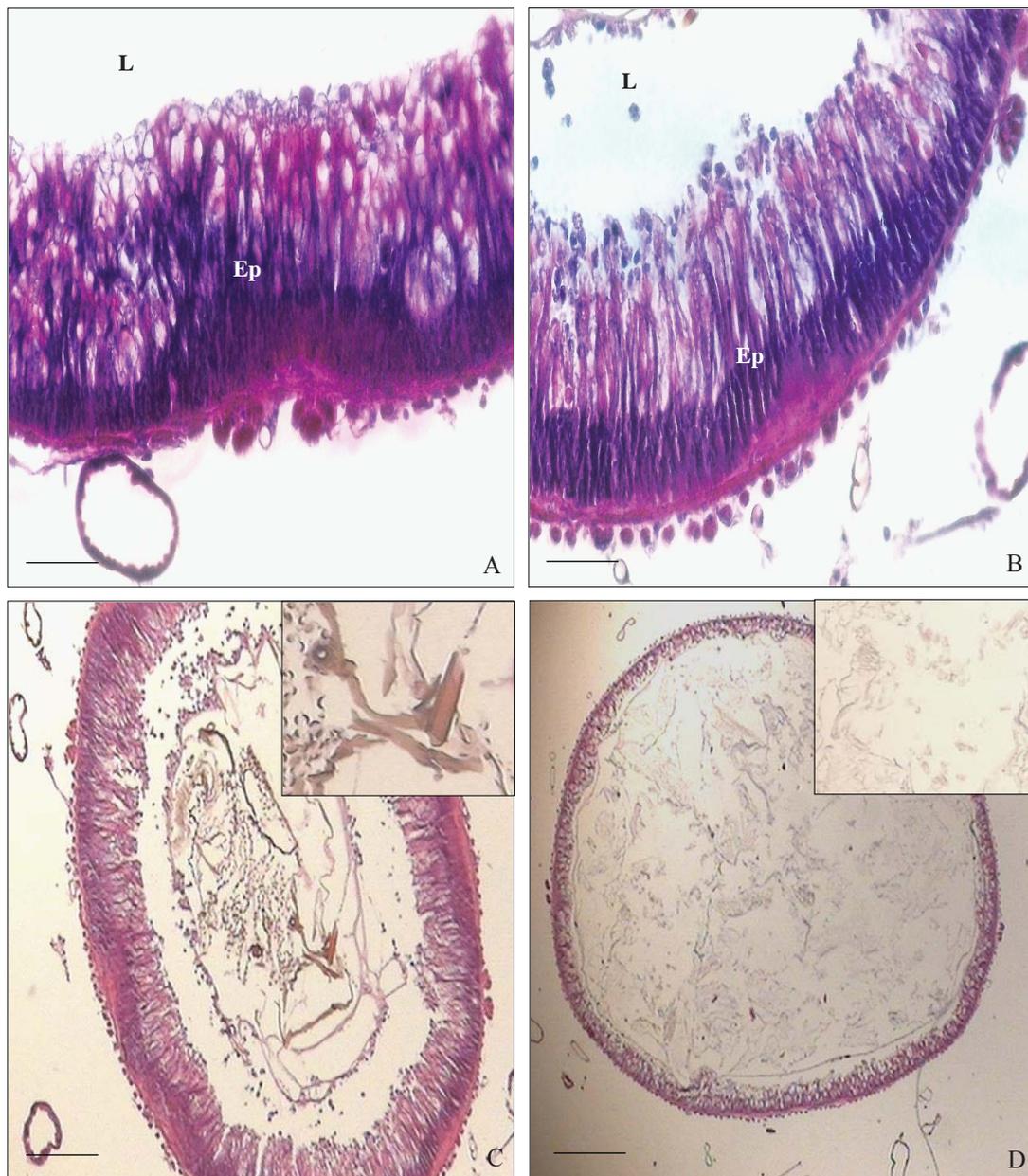


Fig 3 Mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com nim: (A) e (B) observar lúmen com redução da secreção nas concentrações 0,5% e 1,0%, respectivamente. Barra 200  $\mu$ m. (C) Conteúdo alimentar parcialmente digerido na concentração 1,0% no intervalo de tempo de 96h. Barra 200  $\mu$ m. (D) Conteúdo alimentar digerido na concentração 0,5% no intervalo de tempo de 96h. Barra 25  $\mu$ m. Coloração HE. L – lúmen, Ep – epitélio.

à entrada de organismos ou substâncias estranhas (Chapman, 1998, Levy et al 2004b). Como o mesêntero é o principal local de digestão e absorção de alimentos, constitui a região mais vulnerável à ação de elementos estranhos. Entretanto, antes da interação com as células epiteliais, os agentes invasores encontram como barreiras a membrana peritrófica e as enzimas digestivas (Barbehenn & Martin 1995, Matos et al 1999, Mohan et al 2006). Contudo, mesmo evidenciando a presença da membrana peritrófica íntegra em todos os intervalos de tratamento, essa estrutura não foi suficiente para impedir a ação do nim sobre o epitélio e evitar os danos

ocasionados.

Estudos realizados com *Schistocerca gregaria* (Forsk.) e *Locusta migratoria* (Fab.), tratados com 5, 10 e 15  $\mu$ g/g de azadiractina por peso do corpo, e em larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e *Agrotis ipsilon* (Hufn.), tratadas com 100 ppm do extrato de *Melia azedarach* (Meliaceae), mostraram redução na ingestão de alimentos, e na atividade das enzimas do mesêntero, perda de células regenerativas, efeito direto na musculatura e necrose celular [Nasiruddin & Mordue (Luntz) 1993, Schmidt et al 1997].

Segundo Mordue (Luntz) & Nisbet (2000), a azadiractina

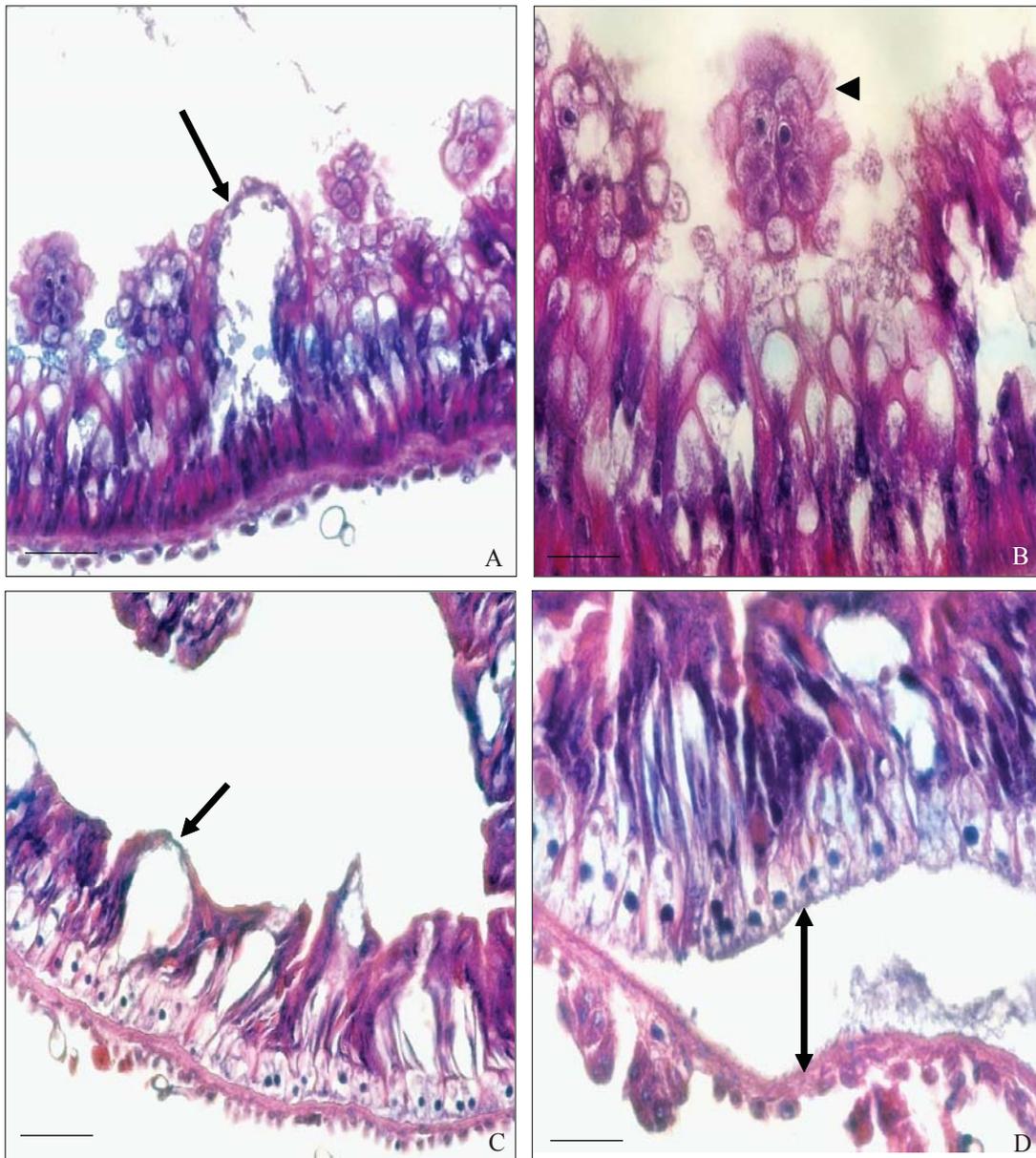


Fig 4 Mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com nim: (A) Projeção do tecido epitelial em lagarta na concentração 0,5%, intervalo de tempo de 144h. Barra 50  $\mu$ m. (B) Afastamento do tecido epitelial da camada muscular na concentração 0,5% no intervalo de tempo de 144h. Barra 25  $\mu$ m. (C) Projeção epitelial para o lúmen na concentração 1,0% no intervalo de tempo de 96h. Barra 50  $\mu$ m. (D) Liberação das células epiteliais junto com o produto de secreção na concentração 1,0% no intervalo de tempo de 96h. Barra 25  $\mu$ m. Coloração H-E. Seta – projeção do epitélio, ponta de seta – epitélio + secreção, seta dupla – afastamento do tecido epitelial, M – músculo, n – núcleo.

é absorvida pelas células causando inibição da divisão celular e da síntese proteica. Tais efeitos são refletidos pela flacidez e paralisia dos músculos, necrose das células do mesêntero, perda dos ninhos (células regenerativas) e, consequentemente, ausência de renovação do epitélio, além da ausência ou redução da produção de enzimas no mesêntero, que se evidenciam nas alterações observadas neste estudo.

A diminuição da quantidade de células regenerativas na testemunha no intervalo 144h pode estar relacionada ao

fato de as lagartas estarem próximas à fase de pupa, pois no último estágio larval as células do mesêntero começam a ser substituídas. Essa substituição depende da morte das células digestivas larvais e da proliferação e diferenciação das células regenerativas para constituir um novo epitélio no adulto (Grecor & Bowen 1997).

O retardo no início da fase de pupa promovido pela alimentação das lagartas com folhas tratadas com nim a 1%, resultou, provavelmente, da interferência da azadiractina no sistema neurosecretor do cérebro, afetando

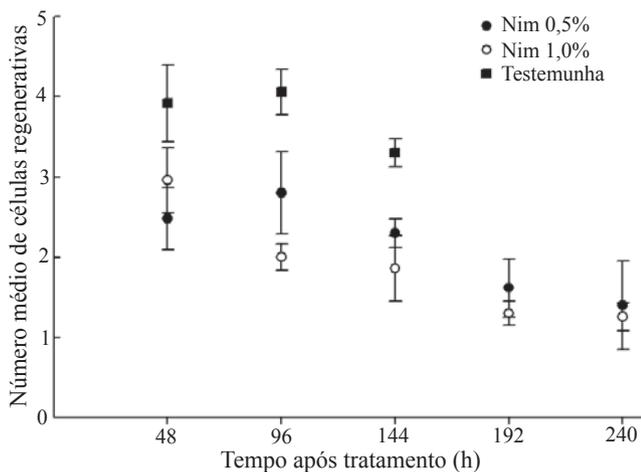


Fig 5 Número médio ( $\pm$  EP) de células regenerativas da região mediana do mesêntero de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, a partir do terceiro instar, não-tratadas ( $\hat{y} = \text{média} = 3,76 \pm 0,31$ ) e tratadas com nim a 0,5% ( $\hat{y} = 3,122 - 0,007x$ ;  $F = 6,77$ ;  $P = 0,0160$ ;  $R^2 = 0,23$ ) e nim a 1,0% ( $\hat{y} = 3,106 - 0,008x$ ;  $F = 20,79$ ;  $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,47$ ).

a síntese do hormônio protoracicotrópico (PTTH) e/ou dos neuropeptídeos alostatinas/alatotropinas, que controlam, respectivamente, a função das glândulas protorácicas e dos *corpora allata*. Na ausência da estimulação do PTTH, as glândulas protorácicas não produziram o hormônio da muda que, por sua vez, tem a função de controlar a formação da nova cutícula e ecdise, enquanto que a produção elevada de hormônio juvenil pelos *corpora allata*, dada pela inibição das alostatinas ou indução das alatotropinas, induziria a manutenção dos indivíduos no estágio larval [Mordue (Luntz) & Nisbet. 2000].

Em conclusão, a utilização do nim nas concentrações 0,5 e 1,0% ocasionou efeito tóxico local, produzindo histólise no mesêntero de lagartas de *S. frugiperda*, levando, provavelmente, ao funcionamento anormal desse tecido, alterando a secreção de enzimas, a absorção dos nutrientes e a renovação celular.

### Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho.

### Referências

- Barbehenn R V, Martin M M (1995) Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *J Insect Physiol* 41: 303-311.
- Behmer O A, Tolosa E M C, Freitas Neto A G (1976) Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, Edart, 115p.
- Cassier P, Fain-Maurel M A (1977) Sur la présence d'un système endocrine diffus dans le mésenteron de quelques insectes. *Archs Zool Exp Gén* 118: 197-209.
- Cavalcante V M, Cruz-Landim C (1999) Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-39.
- Chapman R F (1998) The insects: structure and function, 4th ed, Cambridge, Cambridge University Press, 788p.
- Chiang A S, Yen D F, Peng W K (1986) Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 47: 333-339.
- Costa E L N, Silva R F P, Fiuza L M (2004) Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol Leop* 26: 173-185.
- Cruz I (1995) A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 45p. (Circular Técnica 21).
- Cruz I, Viana P A, Waquil J M (1999) Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 39p. (Circular Técnica 31).
- Greco R A, Bowen I D (1997) Programmed cell death in the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biol Internet* 21: 151-58.
- Harper M S, Granados R R (1999) Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue Cell* 31: 202-211.
- Harper M S, Hopkins T L (1997) Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue Cell* 29: 463-475.
- Jimenez D, Gilliam M (1990) Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and non specific esterase. *Cell Tiss Res* 261: 431-443.
- Junqueira L C, Carneiro J (2008) Histologia básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 540p.
- Junqueira L C U, Junqueira L M M S (1983) Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Santos, 123p.
- Klowden M J (2002) Physiological systems in insects. New York, Academic Press, 415p.
- Lehane M J (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Ann Rev Entomol* 42: 525-550.
- Levy S M, Falleiros A M F, Gregório E A, Arrebola N R, Toledo L A (2004a) The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz J Biol* 64: 633-638.
- Levy S M, Falleiros A M F, Moscardi F, Gregório E A, Toledo L A (2004b) Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol* 33: 427-431.
- Martinez S S (2002) O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agrônomo do Paraná, 142p.
- Martinez S S, van Emden H F (2001) Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval)

- (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop Entomol* 30: 113-125.
- Martins G F, Neves L A O, J E Serrão (2006) The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37: 161-168.
- Matos T G T, Giugliano L G, Ribeiro B M, Bão S N (1999) Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Int J Insect Morphol Embryol* 28: 195-201.
- Michalany J (1990) Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo, Editora Michalany, 247p.
- Mohan S, Ma P W K, Pechan T, Bassford E R, Williams W P, Luthe D S (2006) Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *J Insect Physiol* 52: 21-28.
- Montuenga L M, Barrenechea M A, Sesma P, Vásquez J J (1989) Ultrastructure and immunocytochemistry of endocrine cells in the midgut of desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Cell Tissue Res* 258: 577-583.
- Mordue (Luntz) A J, Blackwell A (1993) Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz) A J, Nisbet A J (2000) Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An Soc Entomol Brasil* 29: 615-632.
- Nasiruddin M, Mordue (Luntz) A J (1993) The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue Cell* 25: 875-884.
- Neves B P, Oliveira I P, Nogueira J C M (2003) Cultivo e utilização do nim indiano. Goiânia, Embrapa Arroz e Feijão, 12p. (Circular Técnica 62).
- Pinheiro D O, Silva R J, Quagio-Grassiotto I, Gregório E A (2003) Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Neotrop Entomol* 32: 453-459.
- Roel A R (2001) Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Rev Int Desenv Local* 1: 43-50.
- Roel A R, Vendramim J D, Frighetto R T S, Frighetto N (2000) Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *An Soc Entomol Brasil* 29: 799-808.
- Ross M H, Pawlina W (2008) Histologia: texto e atlas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 928p.
- SAS Institute (1999-2001) SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schmidt G H, Ahmed A A I, Breuer M (1997) Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Notuidae). *Az Schädlingkd* 70: 4-12.
- Schmutterer H (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 35: 271-297.
- Wanderley-Teixeira V, Teixeira A A C, Cunha F M, Costa M K C M, Veiga A F S L, Oliveira J V (2006) Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). *Braz J Biol* 66: 1045-1049.

Received 13/III/08. Accepted 22/I/09.

---