

VINÍCIUS CORDEIRO ROCHA

**MORFOLOGIA DA ESPERMATECA E INTESTINO MÉDIO DE *Lutzia bigoti*
(DIPTERA; CULICIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R672m
2023

Rocha, Vinícius Cordeiro, 1995-

Morfologia da espermateca e intestino médio de *Lutzia bigoti* (Diptera; Culicidae) / Vinícius Cordeiro Rocha. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (71 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 59-71.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.571>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Lutzia bigoti*. 2. Espermateca. 3. Intestinos. I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.772

VINÍCIUS CORDEIRO ROCHA

**MORFOLOGIA DA ESPERMATECA E INTESTINO MÉDIO DE *Lutzia bigoti*
(DIPTERA; CULICIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **VINÍCIUS CORDEIRO ROCHA**
Data: 19/09/2023 14:35:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Vinícius Cordeiro Rocha
Autor

Documento assinado digitalmente
 **GUSTAVO FERREIRA MARTINS**
Data: 18/09/2023 19:11:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gustavo Ferreira Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao orientador Gustavo F. Martins, pela grande ajuda, apoio e tempo concedido.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, em especial à técnica Renata, e aos colegas Pollyana, Rhiala e Renan, pela ajuda no trabalho de campo, apoio técnico e recomendações.

Ao pessoal do Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio material e técnico em parte desse trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, pelo uso dos equipamentos e microscópios.

À minha mãe, Claudete, pelo apoio e suporte.

Aos meus amigos Diogo, Celso, Vitor, Lucas e tantos outros que foram importantes ao longo dessa caminhada.

RESUMO

ROCHA, Vinícius Cordeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Morfologia da espermateca e intestino médio de *Lutzia bigoti* (Diptera; Culicidae).** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Mosquitos (Diptera: Culicidae) têm um grande impacto na sociedade, sendo perturbadores e transmissores de patógenos. Estudar órgãos chave para a reprodução, como a espermateca, e para digestão e infecção do vetor, como o intestino médio, é fundamental para a compreensão da biologia desses insetos e para estabelecer métodos de controle. Nesse trabalho, abordamos a morfologia da espermateca e intestino médio de *Lutzia bigoti*, uma espécie predadora na fase larval, que habita regiões de mata do continente americano. A espermateca nessa espécie tem três reservatórios, cada um envolvido por uma cutícula multilamelar, e conectado a porção inicial do trato reprodutivo da fêmea por um ducto, também delimitado por cutícula. O reservatório é revestido por células epiteliais achatadas, enquanto o ducto é revestido por células colunares. Células glandulares estão reunidas, formando a glândula espermatecal associada ao reservatório, próximo ao ponto de conexão ao ducto. Além delas, há células glandulares individuais associadas e espalhadas ao longo do ducto. Ambas células glandulares liberam secreções no lúmen do reservatório e do ducto por meio de um pequeno ducto celular. Tais secreções são provavelmente importantes para a nutrição e manutenção dos espermatozoides. O intestino médio de *Lt. bigoti* é dividido em duas porções, anterior e posterior. O anterior é fino e longo, tendo um lúmen estreito, enquanto que o posterior é dilatado, com lúmen amplo. As células digestivas são o tipo mais comum do intestino médio, tendo um formato de cuboide a colunar, se organizando como um epitélio simples. Essas células possuem microvilosidades na porção apical e um conjunto de dobramentos de membrana na porção basal. Outrossim, são ricas em mitocôndrias, concentradas nas porções apical e basal. Nas células digestivas do intestino médio posterior da fêmea, o retículo endoplasmático rugoso tem suas cisternas apresentando uma organização concêntrica. Células basais também estão presentes, apresentando um formato fusiforme, sendo pobres em organelas. Ambos os órgãos estão de acordo com o que tem sido descrito para outras espécies de mosquitos hematófagos.

Palavras-chave: Mosquitos. Espermateca. Intestino médio.

ABSTRACT

ROCHA, Vinícius Cordeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023.
Morphology of the spermatheca and midgut of *Lutzia bigoti* (Diptera; Culicidae).
Adviser: Gustavo Ferreira Martins.

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) have a huge impact in society, being a considerable nuisance and transmitting pathogens. Studying key organs for reproduction, like spermatheca, and for digestion and vector infection, as the the midgut, is crucial in order to understand the biology of these insects and to establish control methods. In this study, we addressed the morphology of the spermatheca and midgut of *Lutzia bigoti*, a predator species in its larval stage, that lives in forested areas in the American continent. The spermatheca in this specie has three reservoirs, each one of them surrounded by a multilayered cuticle and connected to the initial portion of the female's reproductive tract by a duct, which is also delimited by a cuticle. The reservoir is covered by flattened epithelial cells, as for the duct, the cells have a columnar shape. A group of glandular cells, forming the spermathecal gland, are associated with the reservoir, being next to the point of attachment with the duct. Also, glandular cells associated individually with the spermathecal duct are present throughout the structure. Both types of glandular cells release their secretions inside the reservoir and duct lumen through a cell ductile. Such secretions are likely important for nourishment and maintenance of the spermatozooids. The midgut of *Lt. bigoti* is divided in two portions, anterior and posterior midgut. The anterior is thin and long, having a narrow lumen, as the posterior is wider, having an open lumen. The digestive cells are the most common of the midgut, having a cuboidal to columnar shape and being organized as a single epithelium. Such cells have microvilli in its apical portion and a set of membrane foldings in its basal portion. Also, they are rich in mitochondria, distributed in an apical-basal fashion. In the digestive cells of the posterior midgut of the female, the rough endoplasmic reticulum have their lamellae concentrically shaped. Basal cells are also found presenting a fusiform shape, being poor in organelles. Both organs are in line with what have been described for other blood sucking mosquitoes.

Keywords: Mosquitoes. Spermatheca. Midgut.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1. Biologia e importância dos mosquitos	8
1.2. O gênero <i>Lutzia</i>	10
1.3. A espermateca dos mosquitos	12
1.3.1. O reservatório da espermateca	13
1.3.2. O ducto da espermateca	15
1.3.3. Células glandulares da espermateca	16
1.4. O intestino médio dos mosquitos	18
1.4.1. Função e morfologia	18
1.4.2. Matriz peritrófica	20
1.4.3. Tipos celulares	21
1.4.3.1. Células digestivas	21
1.4.3.2. Células enteroendócrinas	25
1.4.3.3. Células regenerativas	26
2. Justificativa	28
3. Objetivos	29
3.1. Objetivos gerais	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. Material e métodos.....	30
4.1. Coleta e criação dos mosquitos	30
4.2. Microscopia eletrônica de varredura	30
4.3. Microscopia óptica	31
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão	31
5. Resultados	33
5.1. Espermateca	33
5.2. Intestino médio	40
6. Discussão	50
6.1. Espermateca.....	50
6.2. Intestino médio.....	54
7. Conclusões e Considerações finais	58
8. Referências.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia e importância dos mosquitos

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) são insetos holometábolos, isso é, seu ciclo de vida se divide nas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos, e as formas imaturas (larvas e pupas) ficam na água. Nesse ambiente, as larvas dos mosquitos se alimentam de uma variedade de componentes, incluindo detritos, algas e microrganismos, além de outros invertebrados, em algumas espécies (Becker *et al.*, 2010; Steffan & Evenhuis, 1981). Já os mosquitos adultos se alimentam de néctar e seiva vegetal. Além disso, na maioria das espécies, a fêmea também se alimenta de sangue (Becker *et al.*, 2010).

Existem cerca de 3500 espécies descritas na família Culicidae, separadas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae, sendo que a última contém a maioria das espécies (Mullen & Durden, 2019). Esses insetos possuem ampla distribuição e abundância no mundo, ausentes apenas em regiões permanentemente congeladas (Consoli & Oliveira, 1994; Becker *et al.*, 2010).

O hábito hematófago das fêmeas adultas na maioria das espécies de mosquitos é a razão pela qual esses insetos possuem alta relevância na saúde pública. As fêmeas se alimentam do sangue de vertebrados, principalmente mamíferos e aves, para a obtenção da fonte proteica para o desenvolvimento dos ovos. Porém, algumas espécies, como *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*, possuem fêmeas autógenas, o que significa que podem realizar a primeira oviposição sem terem adquirido sangue (Ariani *et al.*, 2015; Clements, 1963; Strickman & Fonseca, 2012). Devido ao comportamento hematófago, os mosquitos podem atuar como vetores de diversos patógenos que afligem os seres humanos, além de outros vertebrados, causando um grande número de óbitos, além de impactos econômicos e sociais (Colmenares *et al.*, 2022; Tolle, 2009).

Fêmeas de mosquitos se tornam infectadas com o patógeno ao se alimentarem do sangue de um indivíduo contaminado. O parasito, presente no sangue ingerido, na porção posterior do intestino médio, evade as enzimas digestivas do inseto, passa pela matriz peritrófica, chegando ao epitélio do intestino médio posterior, onde se multiplica. Em seguida, o patógeno pode passar pela lâmina basal, chegando à

hemolinfa, de onde pode alcançar e se replicar em outros tecidos, como corpo gorduroso, tecido muscular e nervoso. Por fim, os patógenos podem alcançar as glândulas salivares (Fig 1). Ao chegar e se replicar nessas estruturas, o parasito faz com que a fêmea do mosquito possa ser capaz de infectar outros hospedeiros ao se alimentar de seu sangue (Ruckert & Ebel, 2018). Dessa forma, é perceptível que o parasito encontra várias barreiras à sua proliferação no organismo vetor, sendo elas, enzimas digestivas do vetor, matriz peritrófica, epitélio digestivo, membrana basal, hemócitos da hemolinfa, glândulas salivares, etc. (Abraham & Lorena, 2004; Ruckert & Ebel, 2018). As células em diferentes órgãos do vetor apresentam respostas antivirais quando infectadas, por exemplo, por meio da ativação do sistema complemento, morte celular programada (apoptose) e pelo uso de iRNA's, que apresentam uma resposta potente e específica à infecção viral (Chowdhury *et al.*, 2020; Ruckert & Ebel, 2018; Vaidyanathan & Scott, 2006).

Dentre os mosquitos vetores de patógenos, destacam-se os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. O *Ae. aegypti* possui alta capacidade de dispersão e um comportamento antropofílico, tendo o homem como o alvo preferido. As fêmeas podem colocar seus ovos em uma variedade de locais, naturais ou artificiais, que contenham água parada, comuns no ambiente urbano (Consoli & Oliveira, 1994). Os mosquitos dessa espécie atuam como vetores de diversos vírus, dentre eles os vírus da Dengue, da Zika e Febre Amarela (Kotsakiozi *et al.*, 2017).

Algumas espécies do gênero *Anopheles*, como *Anopheles gambiae* e *Anopheles darlingii*, são conhecidas por serem vetores dos protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da Malária, doença responsável por um alto número de enfermidades e mortes, principalmente na África (Coetzee *et al.*, 2000; Sinka *et al.*, 2010). Mosquitos do gênero *Culex* também são vetores de patógenos, como o vírus da febre do Nilo e o nematódeo *Wuchereria bancrofti* (Calistri *et al.*, 2010; Okorie & Souza, 2016). A espécie *Culex quinquefasciatus*, o mosquito doméstico tropical, é muito presente nas cidades e habitações rurais da América do Sul, causando muita perturbação no período da noite (Consoli & Oliveira, 1994).

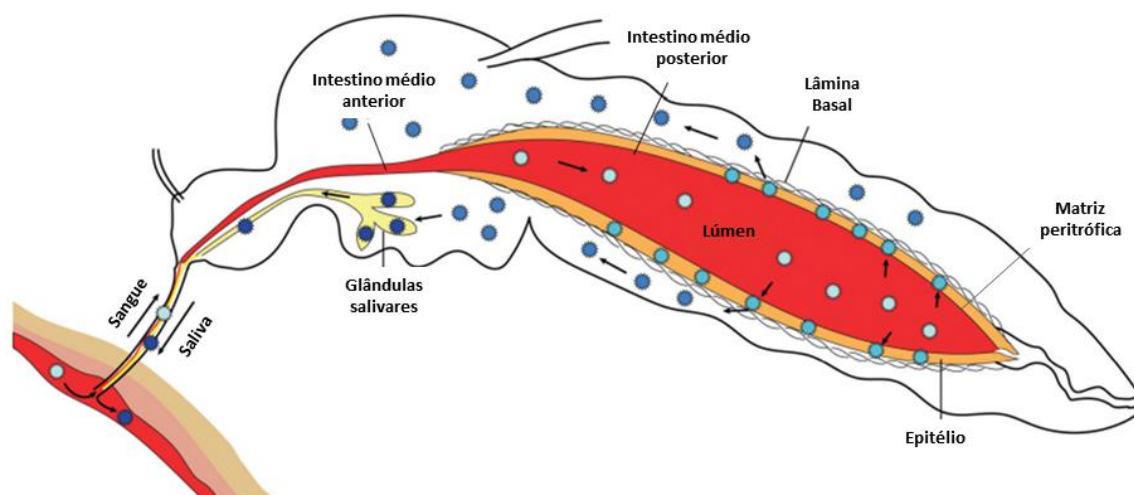


Figura 1: Ciclo do patógeno no mosquito vetor, sendo ingerido no sangue infectado, passando pelo intestino médio e chegando às glândulas salivares. O intestino médio apresenta porções anterior e posterior. Adaptado de Rückert & Ebel, 2018.

1.2. O gênero *Lutzia*

Os mosquitos do gênero *Lutzia* apresentam grande porte (Figs 2A a C), sendo encontrados em diferentes continentes (Jin *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2013). As larvas desse gênero são predadoras, se alimentando principalmente das larvas de outros mosquitos (Jackson, 1953; Rajasekaran & Chowdiah, 1972). As larvas da espécie *Lutzia bigoti* são notáveis predadores. Em laboratório, foi frequentemente observado que uma larva se alimenta de cinco larvas de *Ae. aegypti* em até 12 horas. Em duas ocasiões, armadilhas dispostas no ambiente natural para a captura dos imaturos, foram encontradas contendo apenas larvas de *Lt. bigoti*, sugerindo uma eficiente predação no local (observação pessoal). Tal fenômeno também foi observado em *Lt. tigripes* (Jackson, 1953). Apesar de ser uma espécie predadora, o canibalismo em *Lt. bigoti* não foi observado, pois em diversas ocasiões no decorrer desse trabalho, foram colocadas três larvas em um mesmo recipiente com 150 mL de água e larvas de *Ae. aegypti*, não sendo observado canibalismo (observação pessoal). O comportamento

canibal é comum em alguns mosquitos com larvas predadoras, como os do gênero *Toxorhynchites* (Donald *et al.*, 2020).

Existem poucas informações sobre o comportamento de cópula e postura em *Lutzia*. Porém, foi descrito que as fêmeas de *Lt. bigoti* podem colocar seus ovos em ocos de árvores, além de variados recipientes artificiais (Moser *et al.*, 2009). Nessa mesma espécie, parece haver uma preferência das fêmeas por águas ricas em matéria orgânica, que muitas vezes apresentam forte odor, para ovipositarem, devido ao fato de que a maioria dos imaturos coletados ao longo desse trabalho foram encontrados em armadilhas com tais características (observação pessoal). Tal comportamento pode ser explicado devido à uma maior abundância de presas nesses locais. Por exemplo, já foi demonstrado que há uma preferência por esses ambientes para oviposição no mosquito doméstico noturno *Cx. quinquefasciatus* (Consoli & Oliveira, 1994).

Quando descritos por Theobald em 1903, foi dado à *Lutzia* o status de gênero. Porém, foi considerado como um subgênero de *Culex* em 1932. Outra mudança ocorreu em 2003, quando seu status de gênero foi restaurado por Tanaka (Theobald, 1903; Edwards, 1932; Tanaka, 2003). Porém, ainda hoje a posição taxonômica de *Lutzia* permanece incerta. Isso ocorre devido à conflitos entre análises morfológicas e moleculares que apontam relações filogenéticas distintas em *Culex* (Kitching *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2019). Com base em análises mais recentes utilizando comparações de sequências de genes codificadores de proteínas do DNA mitocondrial de diferentes espécies de *Culex* e *Lutzia*, foi apontado que *Lutzia* deve ser considerado como um grupo monofilético e deve ser atribuído ao clado o status de gênero (Sun *et al.*, 2019). Ainda existem dúvidas se o gênero *Culex* é de fato um grupo monofilético, podendo ser necessária uma reclassificação nesse gênero (Harbach *et al.*, 2012). Tal fato torna ainda mais difícil posicionar *Lutzia* em relação a este grupo (Harbach *et al.*, 2012).

No que se refere ao comportamento alimentar sanguíneo, existem relatos de que as fêmeas de *Lt. bigoti* se alimentam principalmente em animais domésticos, sendo raro em ser humano (Moser *et al.*, 2009). Por outro lado, há informações de que esses mosquitos não são antropofílicos (Consoli & Oliveira, 1994). Além disso, indivíduos de *Lt. bigoti* não apresentaram comportamento hematofágico em laboratório, quando oferecidas diferentes fontes sanguíneas, como sangue humano, de ave (*Gallus gallus*) e bovino (*Bos taurus*). Foram feitas tentativas de alimentação

durante o dia e noite (observação pessoal). Em *Lt. fuscatus*, o repasto sanguíneo ocorre principalmente em pássaros (Bai *et al.*, 1982).

É notável que há uma carência de informações em relação ao comportamento alimentar de *Lutzia*. Caso esses organismos se alimentem no ser humano, podem atuar como vetores de patógenos. Por outro lado, se o ser humano não for alvo desse gênero, estes possuem um alto potencial como agentes de controle biológico de mosquitos vetores, dado o seu comportamento alimentar na fase larval.



Figura 2: Larva em 4° estágio (A), fêmea (B) e macho (C) adultos de *Lutzia bigoti*.

1.3. A espermateca dos mosquitos

A espermateca é um órgão presente na fêmea dos insetos, dentre outros grupos de organismos, responsável pelo armazenamento e manutenção dos espermatozoides após a cópula (Snodgrass, 1935). Esse órgão é de extrema importância para a reprodução, trazendo muitas vantagens para a fêmea. Sua existência faz com que seja possível uma separação temporal entre cópula e fertilização dos ovos, pois os gametas podem ser mantidos viáveis na estrutura por um tempo que vai de dias até anos, dependendo do grupo (Pascini & Martins, 2017). Além disso, a espermateca possibilita uma redução no número de cópulas, o que leva à uma economia de energia, pois a fêmea é capaz de armazenar gametas suficientes

para várias posturas em poucas cópulas (Rueffler *et al.*, 2006; Jones & Ratterman, 2009; Manier *et al.*, 2010). Por fim, a espermateca torna possível uma seleção sexual pós cópula, onde a fêmea pode selecionar os gametas masculinos mais saudáveis durante a migração e estocagem (Gotoh *et al.*, 2017).

A espermateca (Fig 3) é dividida em diferentes componentes com funções específicas: reservatório, ducto, células glandulares, células epiteliais e fibras musculares (Pascini & Martins, 2017). A seguir essas partes serão tratadas em detalhes.

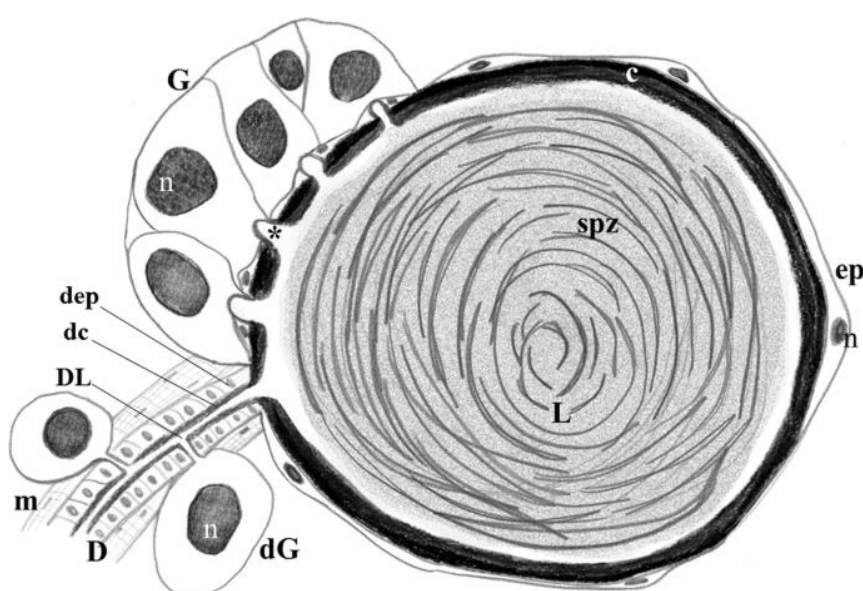


Figura 3: Esquema mostrando os componentes principais de uma espermateca de *Aedes aegypti*. c: cutícula. D:ducto. dc: cutícula do ducto. dep: epitélio do ducto. DG: célula glandular do ducto. DL: lúmen do ducto. ep: epitélio. G: porção glandular. L: lúmen do reservatório. m: fibras musculares da espermateca. n: núcleo. spz: espermatozoides. Pascini *et.al*, 2020.

1.3.1. O reservatório da espermateca

O reservatório da espermateca é o local onde ficam armazenados os espermatozoides após a cópula. O reservatório apresenta um lúmen, onde ficam os gametas, que é delimitado por uma cutícula multilamelar. Nos mosquitos, o reservatório apresenta um formato que vai do esférico ao oval (Dehghan *et al.*, 2014;

Shaw *et al.*, 2014). Dentro da estrutura, os gametas ficam organizados em um arranjo circular, em paralelo uns aos outros, de forma a maximizar a quantidade de espermatozoides por reservatório (Pascini *et al.*, 2012). A cutícula possibilita um isolamento e proteção dos gametas de componentes da hemolinfa e do ambiente externo, além de contribuir para o balanço iônico e osmorregulação no lúmen (Pascini & Martins, 2017; Schoeters & Billen, 2000). A espessura da cutícula que delimita o reservatório parece variar entre os diferentes grupos de mosquitos, sendo mais espessa em *Anopheles aquasalis* do que em *Ae. aegypti* (Pascini *et al.*, 2013).

O número de reservatórios da espermateca em insetos varia dependendo do grupo (Pascini & Martins, 2017). Essa variação existe também dentro de Culicidae, pois mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Uranotaenia* e algumas espécies de *Aedes* apresentam apenas um reservatório, enquanto a maioria dos culicídeos apresentam três (Downes, 1968; Ndiaye *et al.*, 1997). Nesses últimos, a capacidade de estocagem parece não ser utilizada ao máximo, pois a terceira espermateca não se encontra cheia na maioria das fêmeas inseminadas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Jones & Wheeler, 1965; Olivia *et al.*, 2013). Ainda em mosquitos com três reservatórios, existem diferenças no tamanho comparando-se diferentes reservatórios. Por exemplo, em *Ae. aegypti* há um reservatório maior, o mediano, que apresenta em média 100 µm de diâmetro, enquanto os laterais possuem 75 µm em média (Pascini *et al.*, 2012). Em *Culex pipiens*, o reservatório mediano é também maior que os laterais (Dehghan *et al.*, 2014).

O reservatório da espermateca apresenta células epiteliais externamente à cutícula. Essas células apresentam um formato colunar, com dobramentos na porção basal e mitocôndrias abundantes em algumas espécies de insetos, como na vespa social, *Polistes erythrocephalus*, e em parte do reservatório na formiga *Crematogaster opuntiae*. Tais características sugerem uma função de transporte de substâncias oriundas da hemolinfa para o lúmen do reservatório (Martins *et al.*, 2008; Wheeler & Kruttsch, 1994). Por outro lado, em mosquitos, como *Ae. aegypti*, as células epiteliais apresentam um formato mais achatado, sendo fortemente aderidas umas às outras. Em *Ae. aegypti*, as células epiteliais do reservatório possuem poucas organelas e especializações são ausentes. Além disso, foi mostrado que essas células são negativas à reação de PAS, que detecta polissacarídeos neutros. Sendo assim, a provável função dessas células é de isolar os gametas da hemolinfa e secretar a cutícula, não participando do transporte de substâncias entre reservatório e hemolinfa,

como ocorre em outros grupos de insetos (Pascini *et al.*, 2012). Em *An. aquasalis*, o epitélio do reservatório apresenta células glandulares e células epiteliais longas e irregulares (Pascini *et al.*, 2013).

1.3.2. O ducto da espermateca

O ducto da espermateca é o meio de passagem dos espermatozoides da porção inicial do trato reprodutivo da fêmea para o reservatório, e vice-versa (Tombes & Roppel, 1927). Em *Ae. aegypti*, o ducto do reservatório maior se conecta diretamente à bolsa copulatória, enquanto os ductos dos outros reservatórios se fundem antes da conexão (Clements & Potter, 1967). Existem variações no comprimento dessa estrutura quando comparadas diferentes espécies de mosquitos. Por exemplo, o ducto em *An. aquasalis* é mais curto, apresentando 142 µm de comprimento, quando comparado ao de *Ae. aegypti*, com 265 µm (Jones & Wheeler, 1965; Pascini *et al.*, 2013).

Assim como ocorre no reservatório, há uma cutícula que delimita o ducto da espermateca, sendo esta contínua à que delimita o reservatório. Porém, a cutícula no ducto não possui a estrutura lamelar encontrada no reservatório em mosquitos (Clements & Potter, 1967). Em relação à estrutura e composição da cutícula do ducto em mosquitos, foi mostrado que em *An. aquasalis*, a cutícula do ducto se projeta em direção ao lúmen em alguns pontos de interrupção com a cutícula do reservatório (Pascini *et al.*, 2013). Além disso, a cutícula do ducto nos mosquitos contém resilina, que confere elasticidade à estrutura (Pascini & Martins, 2017). Tal elasticidade pode ser importante para o enchimento rápido da espermateca, pois poderia permitir uma dilatação na estrutura, de forma a possibilitar a passagem de mais gametas (Degner & Harrington, 2016).

Por fim, externamente à cutícula do ducto, está presente uma camada de células epiteliais colunares com núcleos evidentes, o epitélio do ducto. Esse epitélio parece ter funções que vão além da manutenção da cutícula em alguns grupos de insetos. Por exemplo, nas abelhas do gênero *Bombus*, é provável que as células epiteliais do ducto liberem secreções em seu lúmen, que podem ser importantes para o metabolismo dos gametas durante sua passagem pela estrutura (Schoeters & Billen, 2000). Além disso, foi sugerido que essas secreções podem facilitar a passagem dos gametas pelo ducto, atuando como um lubrificante, em *Zorotypus hubbardi* (Dalai *et*

al., 2012). Em *An. aquasalis* e *Ae. aegypti*, essas células possuem formato colunar, com grandes núcleos. Nesses últimos, foram identificadas membranas convolutas na porção voltada para a cutícula (Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013). Por fim, as funções das células epiteliais do ducto em Culicidae não têm sido abordadas em profundidade. Essas células provavelmente atuam na síntese e manutenção da cutícula do ducto (Clements & Potter, 1967). Outrossim, podem também estar envolvidas em secreção de substâncias no lúmen, que atuam na proteção dos gametas contra patógenos durante sua passagem no ducto, pois foi mostrada uma abundância de transcritos do inibidor serina protease KSPI nas células epiteliais do ducto em *Ae. aegypti* (Pascini *et al.*, 2020)

Células glandulares se conectam individualmente ao ducto por meio de pequenos ductos, revestidos por cutícula bastante fina, lançando secreções no lúmen do mesmo (Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013). O papel dessas secreções ainda não foi completamente elucidado, porém, a expressão do inibidor serina protease KSPI nas células glandulares do ducto da espermateca de *Ae. aegypti* também foi detectada. Sendo assim, no ducto, as células glandulares, bem como as células epiteliais, estão envolvidas na atividade antimicrobiana (Pascini *et al.*, 2020).

As fibras musculares associadas ao ducto, são importantes para o enchimento e liberação de espermatozoides do reservatório, pois podem atuar gerando movimentos peristálticos no ducto, transportando os gametas (Degner & Harrington, 2016). Além disso, as fibras musculares do ducto podem gerar um vácuo na espermateca devido à sua contração, o que pode contribuir para o enchimento mais rápido do reservatório, como sugerido para *An. gambiae* (Giglioli, 1963). Em *Ae. aegypti*, as fibras musculares estão dispostas longitudinalmente em relação ao ducto, sendo encontradas ao longo de todo o ducto (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012). Em *An. aquasalis*, as fibras estão distribuídas ao longo do ducto em um arranjo helicoidal (Pascini *et al.*, 2013).

1.3.3. Células glandulares da espermateca

As secreções liberadas pelas células glandulares da espermateca são essenciais na estocagem dos gametas, nutrição e manutenção da sua viabilidade (Degner & Harrington, 2016; Pascini & Martins, 2017; Wolfner, 2011). Em fêmeas virgens e fertilizadas de *Ae. aegypti*, as células glandulares, bem como seus pequenos

ductos (que fazem a conexão da mesma com o reservatório) e o lúmen do reservatório da espermateca, se mostram positivos quando submetidos a reação de PAS, que detecta polissacarídeos neutros. Isso sugere a secreção de açúcares pelas células glandulares no lúmen do reservatório, que servem de fonte de energia para os gametas (Pascini *et al.*, 2012). Nessa mesma espécie, foi detectada uma abundância de transcritos da enzima glicose desidrogenase (Gld) nas células glandulares da espermateca de fêmeas virgens, enzima envolvida no metabolismo de carboidratos (Pascini *et al.*, 2020). A presença de polissacarídeos na espermateca também foi detectada em outros insetos (Batnagar & Musgrave, 1970; Llango, 2005).

As secreções liberadas no lúmen do reservatório podem também conter componentes importantes para a manutenção da viabilidade dos gametas. Por exemplo, a heme peroxidase HPX 15, que tem a provável função de proteger os gametas contra estresse oxidativo em *An. gambiae* (Shaw *et al.*, 2014). Outrossim, genes correspondentes a enzimas antioxidantes são altamente expressos nas células glandulares da espermateca de rainhas de formigas da espécie *Cremogaster osakensis* (Gotoh *et al.*, 2017). Além disso, as células glandulares podem ter um papel no balanço osmótico e motilidade dos gametas no reservatório, além da proteção contra microrganismos detectados na espermateca de diferentes espécies de insetos (Baer *et al.*, 2009; Dávila *et al.*, 2018; Pascini *et al.*, 2020; Verma, 1972). É possível também que as células glandulares tenham um papel importante na entrada de gametas na espermateca, pois foi demonstrado que espermatozoides apresentam quimiotaxia positiva em relação a secreções da espermateca em *Anthonomus grandis* e *Drosophila melanogaster* (Grodner & Steffens, 1978; Schnakenberg *et al.*, 2011).

Nos mosquitos, as células glandulares da espermateca são grandes quando comparadas às células epiteliais, possuindo núcleos com formato oval bem evidente e com eucromatina abundante. Tais células podem ser divididas em dois grupos, células associadas ao reservatório e células associadas ao ducto. As primeiras, se encontram associadas ao reservatório próximo ao ponto de conexão desse com o ducto, em *Ae. aegypti* (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012). Já em *An. aquasalis*, estão distribuídas ao redor do reservatório (Pascini *et al.*, 2013). Em relação a aquelas associadas ao ducto, se inserem individualmente ao longo da estrutura (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013). Em *An. aquasalis*, essas células estão em maior número na porção mais próxima do reservatório (Pascini *et al.*, 2013). As células glandulares apresentam microvilosidades em sua porção

apical, que se associam à porção terminal de um pequeno ducto, delimitado por cutícula, que por sua vez se comunica com o lúmen do reservatório ou ducto da espermateca. Em *An. aquasalis*, existem células epiteliais que flanqueiam o pequeno ducto da célula glandular (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2013).

O citoplasma das células glandulares dos mosquitos apresenta características típicas de célula secretora. Essas células em *Ae. aegypti* possuem um conjunto de organelas em seu citoplasma, quais sejam: retículo endoplasmático, complexo de Golgi, numerosas mitocôndrias e vesículas. Na região apical dessas células há uma abundância de filamentos de actina e microvilosidades (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012). Assim como em *Ae. aegypti*, há uma abundância de mitocôndrias e filamentos de actina na porção apical das células glandulares em *An. aquasalis*. Além disso, estão presentes grandes estruturas de reserva no citoplasma, repletas de componentes a serem liberados no lúmen (Pascini *et al.*, 2013). Em *An. gambiae*, as células glandulares apresentam um retículo endoplasmático bem desenvolvido, mitocôndrias extensivas e a presença de corpos multilamelares e vesículas (Shaw *et al.*, 2014). A abundância de mitocôndrias, retículo endoplasmático, vesículas e citoesqueleto no citoplasma das células glandulares, bem como a presença de microvilosidades na porção apical, são características de células com atividade secretora (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2014).

1.4. O intestino médio dos mosquitos

1.4.1. Função e morfologia

O trato digestório em insetos é responsável pela digestão e absorção dos alimentos, bem como pela excreção, esta última ocorrendo em sua porção final. É dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. As porções anterior e posterior são de origem ectodérmica, possuindo um revestimento cuticular, que é substituído a cada muda do inseto. Já a porção média é de origem endodérmica, não sendo revestida por cutícula (Simpson & Douglas, 2013).

O intestino anterior é composto pela boca, faringe, esôfago, papo e proventrículo, sendo esse último o ponto de encontro com o intestino médio. Já o intestino médio termina no piloro, onde se inicia o intestino posterior. No ponto de

encontro dessas duas porções, há também a inserção dos túbulos de Malpighi, estruturas que lançam excretas, coletadas da hemolinfa, no lúmen do intestino posterior. Por fim, o intestino posterior é dividido em íleo, reto e ânus (Simpson & Douglas, 2013).

O intestino médio é onde ocorre a secreção de enzimas digestivas e a absorção dos produtos da digestão (Nation, 2016). Essa estrutura apresenta um epitélio simples, cujas células possuem formatos que vão do cúbico ao colunar, apresentando borda estriada em sua porção apical, ou seja, voltada para o lúmen, e na sua base, estando apoiadas em uma lâmina basal. Externamente à lâmina basal, estão presentes fibras musculares (Franz *et al.*, 2015; Gullan & Cranston, 2014). Ao longo de todo o intestino médio são encontradas traquéolas na porção voltada para a hemolinfa e atuam nas trocas gasosas (Okuda *et al.*, 2002).

Nos mosquitos hematófagos, o intestino médio é dividido em duas porções: intestino médio anterior e intestino médio posterior (Fig 1). O intestino médio anterior (IMA), majoritariamente localizado no tórax, é estreito e alongado, já o intestino médio posterior (IMP), localizado no abdômen, é dilatado (Hecker, 1977; Okuda *et al.*, 2002). No mosquito não hematófago *Toxorhynchites theobaldi*, pode-se ainda dividir o IMA em duas porções, devido a diferenças na morfologia geral da estrutura. Nessa espécie, a porção mais anterior do IMA apresenta dobras externamente, que não são encontradas na porção posterior. Essa primeira porção com dobramentos é mais curta quando comparada à segunda. Além disso, o IMP é mais curto em relação ao IMA nessa espécie quando comparados aos mosquitos hematófagos (Godoy *et al.*, 2015).

Machos e fêmeas de mosquitos hematófagos apresentam diferenças no intestino médio quando comparados, sendo essa estrutura nas fêmeas bem mais desenvolvida. Tal diferença pode ser explicada pela ocorrência da digestão sanguínea nas fêmeas, enquanto nos machos a dieta consiste basicamente de açúcares (Janeh *et al.*, 2017). Nos mosquitos não hematófagos não há dimorfismo no órgão, pois o intestino médio de machos e fêmeas de *Tx. theobaldi* não apresenta grandes diferenças, sendo muito similar em estrutura geral ao encontrado em machos de mosquitos hematófagos (Godoy *et al.*, 2015).

O IMA é responsável pela digestão e absorção de açúcares, enquanto o IMP tem ainda a função de digerir proteínas, sendo o local em que ocorre a digestão do sangue em mosquitos hematófagos (Hecker, 1977; Silva *et al.*, 2019). O IMP tem sido extensivamente estudado nos mosquitos hematófagos, pois é o primeiro ponto de

contato entre o mosquito vetor e o parasito, sendo assim um ponto chave no ciclo do patógeno (Ayers *et al.*, 2021). O patógeno, presente no sangue, passa pela matriz peritrófica e invade as células do intestino médio posterior, podendo se replicar e evadir tais células, chegando a outros órgãos do organismo vetor (Fig 1) (Zieller *et al.*, 2000).

1.4.2. Matriz peritrófica

O epitélio do intestino médio sintetiza uma matriz extracelular constituída por uma rede de quitina, proteínas e glicoproteínas que envolve o alimento, a chamada matriz peritrófica (Gullan & Cranston, 2014). Em *An. stephensi*, grânulos contendo precursores da matriz peritrófica são visualizados na porção apical das células digestivas do IMP, sendo liberados no lúmen durante a alimentação (Billingsley, 1990).

A respeito da função da matriz peritrófica em mosquitos, é provável que esteja envolvida na proteção do epitélio intestinal contra a abrasão dos alimentos (Billingsley, 1990; Stohler, 1961). A matriz peritrófica também atua na proteção do epitélio intestinal contra componentes reativos presentes no alimento. Por exemplo, no mosquito *Ae. aegypti* ocorre a ligação do grupo heme a componentes da matriz peritrófica. O grupo heme é um componente tóxico para os mosquitos, gerado após a hidrólise da hemoglobina do sangue (Pascoa *et al.*, 2002). Além disso, a matriz pode atuar como uma barreira contra patógenos presentes no alimento, impedindo o contato desses com o epitélio intestinal (Shao *et al.*, 2001). Por fim, essa estrutura compartimentaliza o processo de digestão, delimitando um espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, onde diferentes processos digestivos, envolvendo diferentes enzimas, podem ocorrer. A matriz peritrófica torna possível a movimentação do conteúdo em direções opostas em ambos os espaços, o que reduz a perda de enzimas digestivas ao longo do processo (Gullan & Cranston, 2014).

Nos insetos, podem ser encontrados dois tipos distintos de matriz peritrófica: a do tipo 1, onde a matriz é sintetizada ao longo de todo o intestino médio pelas células digestivas, e a do tipo 2, onde é produzida por um conjunto de células localizadas na cárdia (Shao *et al.*, 2001). Nas larvas dos mosquitos, encontra-se a matriz peritrófica do tipo 2, enquanto nos adultos está presente a do tipo 1 (Nation, 2016). Os mosquitos adultos sintetizam a matriz peritrófica apenas após ingerirem dietas particuladas como o sangue (Whiten *et al.*, 2018).

Além da matriz peritrófica, parece haver outros componentes associados às células do intestino médio. Nos mosquitos *Ae. aegypti*, foi identificada uma rede tubular membranosa associada às microvilosidades das células epiteliais do intestino médio. Essa rede é formada por fibras, que também podem se apresentar entre as microvilosidades. É provável que esta rede não esteja relacionada com a matriz peritrófica, pois pode ser identificada tanto em mosquitos alimentados quanto não alimentados, além de não ser afetada por quitinases (Zieler *et al.*, 2000). Tal rede também foi identificada em outras espécies de mosquitos, como *Anopheles aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* (Okuda *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2019). A provável função dessa estrutura em mosquitos hematófagos é a proteção imediata do epitélio do intestino médio dos componentes do sangue, enquanto a matriz peritrófica não está completamente formada (Zieler *et al.*, 2000). Ainda não há registros dessa estrutura em mosquitos não hematófagos.

1.4.3. Tipos celulares

O intestino médio dos mosquitos possui apenas uma camada de células ancoradas em uma lâmina basal. A maioria das células possuem um formato colunar, porém, essa forma pode se alterar. Por exemplo, quando o IMP fica cheio de sangue após uma refeição, as células epiteliais assumem um formato mais achatado, voltando ao normal quando o sangue é digerido (Hecker, 1977).

Existem três tipos de células encontradas no intestino médio de mosquitos, as células digestivas, células enteroendócrinas e células regenerativas.

1.4.3.1. Células digestivas

As células digestivas são as células mais abundantes do intestino médio dos mosquitos, estão dispostas em um epitélio simples, com formato que vai do cúbico ao colunar, possuindo um núcleo com nucléolo evidente (Hecker, 1977; Weaver & Scott, 1990). A presença do sangue no intestino médio faz com que o formato das células digestivas se altere, assumindo um formato achatado, voltando ao seu estado normal por volta do final do processo digestivo (Weaver & Scott, 1990). As células digestivas são responsáveis pela secreção de enzimas que atuam na digestão, bem como a absorção de nutrientes (Billingsley, 1990). As células digestivas apresentam uma

polaridade apical basal característica. A sua porção apical, voltada ao lúmen do intestino, possui microvilosidades, que atuam aumentando a superfície de contato para secreção e absorção (Bertram & Bird, 1961; Nation, 2016). Já a porção basal, ancorada à lâmina basal, estando voltada para a hemolinfa, possui dobramentos de membrana, o que é denominado de labirinto basal (Franz *et al.*, 2015; Hecker, 1977).

As junções intercelulares nas células digestivas do intestino médio são fundamentais para a resistência e manutenção da estrutura geral do epitélio. O tipo de junção intercelular mais comumente observado são as junções contínuas (*zonula continua*), que geralmente se apresentam na região apical do epitélio (Houk, 1977; Okuda *et al.*, 2002). Outros tipos de junções também são encontrados entre essas células, como as junções do tipo *gap* e desmossomos (Franz *et al.*, 2015).

Uma célula digestiva possui um alto número de mitocôndrias em seu citoplasma, tanto em mosquitos hematófagos quanto não hematófagos (Godoy *et al.*, 2015; Zieler *et al.*, 2000). Isso evidencia a alta necessidade energética nessas células. Tais organelas são distribuídas de maneira polarizada no citoplasma, havendo uma alta concentração de mitocôndrias na região apical, próximas às microvilosidades, e na porção basal (Hecker, 1977; Houk, 1977; Okuda *et al.*, 2002). A presença de um alto número de mitocôndrias nessas regiões pode indicar uma necessidade de fornecer energia as membranas apical e basal, que atuam no transporte de substâncias para dentro e fora da célula (Bertram & Bird, 1961). Em mosquitos hematófagos, a presença do sangue no intestino parece afetar as mitocôndrias, pois em *Culex tarsalis* essas se tornaram mais largas e com cristas mais convolutas após a refeição sanguínea (Houk, 1977). Esse aumento de volume das mitocôndrias também foi descrito em *Ae. aegypti* (Hecker *et al.*, 1974). Quando comparado o volume ocupado por mitocôndrias na célula entre as duas partes do intestino médio, foi mostrada uma maior densidade na porção posterior em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (Hecker, 1977).

O retículo endoplasmático rugoso é uma organela bastante evidente nas células digestivas. Tal estrutura se apresenta como lamelas concêntricas nas células digestivas do intestino médio em fêmeas de diferentes espécies de mosquitos não alimentadas com sangue (Okuda *et al.*, 2005; Weaver & Scott, 1990; Zieler *et al.*, 2000). Em *Ae. aegypti*, a presença de sangue no IMP faz com que essa organela sofra modificações, assumindo formas mais complexas e ramificadas, não sendo observada a estrutura em lamelas (Bertram & Bird, 1961). Em *Cx. tarsalis*, também ocorre uma expansão do retículo endoplasmático, quatro horas após a refeição sanguínea (Houk

& Hardy, 1981). As mudanças estruturais nessa organela, provocadas pela presença de sangue, podem ser explicadas devido à necessidade de secreção de enzimas digestivas por essas células (Okuda *et al.*, 2005). De modo distinto, a presença de lamelas concêntricas de retículo endoplasmático foi identificada em *Culiseta melanura* e *Cx. tarsalis* após a refeição sanguínea (Houk, 1977; Weaver & Scott, 1990). Dessa forma, é perceptível que a relação entre sangue e estrutura do retículo endoplasmático ainda não está clara. Por fim, quando analisado o efeito da não alimentação com sangue no intestino médio posterior em *Ae. aegypti*, foi mostrado que ocorre uma redução da densidade de membranas do retículo endoplasmático rugoso ao longo dos dias, o que ocorre para mosquitos que receberam apenas a dieta açucarada ou não tiveram nenhuma fonte de alimento (Bauer *et al.*, 1977).

Em relação ao retículo rugoso das células digestivas do intestino médio nos mosquitos não hematófagos, foi mostrado que essa organela é abundante nas células digestivas do IMA1 e IMP de *Tx. theobaldi*, também apresentando a estrutura em lamelas descrita para os mosquitos hematófagos. Isso mostra que a refeição açucarada estimula uma intensa atividade secretora de proteínas nessa espécie assim como a refeição sanguínea nos mosquitos hematófagos (Godoy *et al.*, 2015).

O papel do complexo de Golgi das células do intestino médio na digestão tem sido pouco discutido. Em relação às modificações nessa organela durante a refeição sanguínea, foi notado um aumento do volume das cisternas de Golgi bem como de grânulos associados cerca de 16 horas após a refeição sanguínea em *Cx. tarsalis* (Houk & Hardy, 1981). Em *Cs. melanura*, há uma redução da abundância de suas cisternas quatro dias após a refeição sanguínea (Weaver & Scott, 1990).

Outros componentes presentes em abundância no citoplasma são grânulos de secreção, vesículas, corpos lamelares, inclusões lipídicas e grânulos de glicogênio. A relação entre essas estruturas e o processo de digestão sanguínea no intestino médio tem sido discutido. Em fêmeas de *An. darlingi* não alimentadas com sangue, há um alto número de grânulos de secreção na porção apical das células digestivas. Porém, a presença do sangue no IMP faz com que esses grânulos desapareçam nas primeiras horas pós alimentação, reaparecendo 24 horas após a refeição, o que pode significar uma preparação das células para uma próxima refeição antes mesmo de terminar o processo atual (Okuda *et al.*, 2005). Estruturas na porção apical também foram encontradas nas fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, 16 horas após a refeição sanguínea, sendo estes corpos multivesiculares e vesículas abundantes (Okuda *et al.*, 2002). Em

fêmeas de *Cx. tarsalis* e *An. stephensi* não alimentadas com sangue, foram identificadas vesículas ligadas ao retículo rugoso nas células do IMP. É provável que tais vesículas estivessem repletas de proteases, que seriam liberadas após a refeição sanguínea (Houk, 1977; Staubli *et al.*, 1966). Inclusões lipídicas vão surgindo no citoplasma com o avanço do processo digestivo, sendo apontadas na região basal das células digestivas, 48 horas após a refeição sanguínea, em *Cx. quinquefasciatus*, e em *An. darlingi*, 60 horas após a alimentação (Okuda *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2005). Por fim, depósitos de glicogênio são encontrados no citoplasma em algumas espécies de mosquitos, como *Cx. quinquefasciatus* (Okuda *et al.*, 2002), atuando provavelmente como um reservatório de energia.

As estruturas supracitadas em mosquitos não hematófagos foram abordadas em *Tx. theobaldi*. Nessa espécie, foram encontrados no citoplasma vacúolos autofágicos e corpos de inclusão, estruturas provavelmente envolvidas na reciclagem de membranas. Além disso, há um grande número de corpos lamelares no citoplasma das células digestivas dessa espécie, sendo sua função desconhecida (Godoy *et al.*, 2015).

Existem poucos dados na literatura sobre os efeitos da dieta açucarada na ultraestrutura do intestino médio e nas células digestivas, seja de mosquitos hematófagos ou não. Como demonstrado, a maioria dos trabalhos focou em como o sangue afeta essa estrutura e suas células. Porém, já foi mostrado que a dieta açucarada em *Ae. aegypti* não ocasiona grandes diferenças nas células digestivas quando comparado com mosquitos não alimentados (Bauer *et al.*, 1977).

Em relação às células digestivas no intestino médio nas larvas dos mosquitos, essas também estão dispostas em um epitélio simples, apresentando em seu ápice uma borda estriada, que é fina na porção anterior do intestino médio e mais densa na porção posterior, e na sua porção basal um evidente labirinto basal. Essas células apresentam um formato achatado, cúbico ou ainda colunar, a depender da porção analisada ou mesmo da espécie. Além disso, apresentam grânulos de açúcares neutros em seu citoplasma e, na porção anterior, numerosas vesículas apicais (Godoy *et al.*, 2023).

A expressão gênica nas células digestivas do intestino médio dos mosquitos tem sido abordada, principalmente a alteração na abundância de transcritos após a refeição sanguínea. Com a refeição sanguínea, ocorre um aumento na transcrição de enzimas digestivas, como serina endopeptidases, tripsinas, catepsinas, além de

lipases e carboidrases (Bonizonni *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2020; Sanders *et al.*, 2003). Além disso, há um aumento na expressão de genes envolvidos na secreção, síntese de matriz peritrófica, transportadores de aminoácidos e açúcares, dentre outros (Bonizonni *et al.*, 2011; Sanders *et al.*, 2003). Por outro lado, foi apontada uma redução na expressão de genes envolvidos na resposta imune, o que favorece a infecção do vetor (Bonizonni *et al.*, 2011). A infecção do mosquito vetor por patógenos também leva a alterações na abundância de transcritos nas células digestivas, que são determinantes para o prosseguimento ou não do ciclo do parasito. Por exemplo, em *Ae. aegypti*, foi apontada uma redução nos transcritos envolvidos no metabolismo, transporte e atividade antioxidante frente a infecção por DENV (Bonizonni *et al.*, 2012). Nas células digestivas de *An. gambiae* infectadas por *Plasmodium bergeri*, foi detectado um aumento nos transcritos envolvidos na organização do citoesqueleto, sendo a polimerização de actina uma importante barreira no prosseguimento do ciclo do parasito. Além disso, ocorre um aumento na expressão de inibidores de caspase do tipo IAP, além de alterações variadas em transcritos envolvidos na resposta imune inata e atividade antioxidante (Vlachou *et al.*, 2005).

1.4.3.2. Células enteroendócrinas

As células enteroendócrinas se encontram distribuídas no intestino médio dos mosquitos. Nos adultos do mosquito não hematófago, *Tx. theobaldi*, as células enteroendócrinas foram encontradas no fim da porção anterior e porção posterior do intestino médio, como um total estimado de 99 células em todo o órgão (Godoy *et al.*, 2015). Em adultos de *Ae. aegypti*, estima-se que há aproximadamente 500 células enteroendócrinas ao longo de todo o intestino médio (Brown *et al.*, 1985). Nessa espécie, essas células apresentam um formato cônico, alcançando ou não o lúmen do intestino médio, apresentando microvilosidades quando alcançam. Sob microscopia de transmissão, essas células podem se apresentar como elétron-densas ou elétron-lucidas, dependendo de seu conteúdo citoplasmático (Billingsley, 1990; Brown *et al.*, 1985). Existem diferenças em relação à organização das células enteroendócrinas no intestino médio em larvas de mosquitos, pois em *Tx. theobaldi* essas células formam aglomerados, não encontrados nas larvas de *Ae. aegypti* (Godoy *et al.*, 2023). A característica mais marcante nas células enteroendócrinas em mosquitos é a presença de grânulos de secreção, que liberam seu conteúdo por

exocitose (Brown *et al.*, 1985; Godoy *et al.*, 2015; Weaver & Scott, 1990). Em *Ae. aegypti*, os grânulos se encontram associados à membrana basolateral, podendo ser densos ou apresentarem halos em sua periferia (Brown *et al.*, 1985). Além disso, essas células possuem um complexo de Golgi desenvolvido, numerosas vesículas e corpos lamelares em seu citoplasma (Billingsley, 1990).

A provável função das células enteroendócrinas no intestino médio é a secreção de hormônios, que influenciam na atividade do próprio órgão, seja regulando a secreção de enzimas pelas células digestivas, atuando na regulação de movimentos peristálticos no intestino médio, ou ainda na diferenciação de células regenerativas (Brown *et al.*, 1985; Godoy *et al.*, 2023; LaJeunesse *et al.*, 2010). Podem ainda, por meio da hemolinfa, chegar à outras estruturas do organismo do inseto e influenciar sua atividade (Brown *et al.*, 1985). Em *Ae. aegypti*, essas células liberam componentes por exocitose no espaço intercelular do epitélio (Billingsley, 1990).

1.4.3.3. Células regenerativas

As células regenerativas são pequenas, sendo encontradas geralmente na porção basal do epitélio do intestino médio. Assim como as células enteroendócrinas, essas células se encontram distribuídas ao longo do intestino médio dos mosquitos (Brown *et al.*, 1985; Nation, 2016; Okuda *et al.*, 2007). No intestino médio anterior de larvas de *Ae. aegypti* e *Tx. theobaldi*, as células regenerativas apresentam prolongamentos, além de um núcleo triangular, diferente do que ocorre em *An. gambiae*, cujos prolongamentos são ausentes e os núcleos são esféricos (Godoy *et al.*, 2023).

Essas células possuem a função de se diferenciar em outras células quando necessário. Sendo assim, atuam na reposição de células velhas, perdidas por dano ou perdidas devido a secreções apócrinas ou holócrinas, sendo por isso, também chamadas de células-tronco (Nation, 2016; Okuda *et al.*, 2007). Além disso, as células regenerativas são essenciais na metamorfose em mosquitos, pois no decorrer da fase de pupa em *Ae. aegypti*, se diferenciam em células digestivas e enteroendócrinas, renovando as células intestinais, degeneradas no processo de metamorfose (Fernandes *et al.*, 2014). Em *Cx. quinquefasciatus*, foi mostrado que as células regenerativas se diferenciam em digestivas para repor as células perdidas por apoptose durante a digestão do sangue. Além disso, há uma redução no número de

células regenerativas no intestino médio a cada refeição sanguínea (Okuda *et al.*, 2007). Em *Ae. albopictus*, foram identificadas células que apresentaram atividade regenerativa frente à danos químicos ou infecções microbianas no intestino médio (Janeh *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Os mosquitos são insetos de grande significância médica, devido ao fato de atuarem como vetores de diversos parasitos que acometem o ser humano, como o vírus da Dengue e os protozoários do gênero *Plasmodium*, causando um alto número de óbitos, além de impactos econômicos e sociais. Estudar órgãos chave na reprodução, como a espermateca, e na digestão sanguínea e infecção do vetor, como o intestino médio, é fundamental na compreensão da biologia desses insetos, servindo de base para estudos que visam o controle desses organismos.

Os mosquitos da espécie *Lt. bigoti* são predadores em sua fase larval. Na fase adulta, o comportamento alimentar dessa espécie não está completamente elucidado, em especial no tocante à alimentação sanguínea das fêmeas, pois não existem evidências de que são hematófagas ou mesmo se atacam o ser humano. Caso as fêmeas de *Lt. bigoti* não se alimentem no ser humano ou animais domésticos, sendo assim incapazes de atuarem como vetores, as larvas desses mosquitos apresentam um grande potencial como agentes de controle biológico de mosquitos vetores. Sendo assim, compreender a morfologia do intestino médio nessa espécie pode ajudar a esclarecer as dúvidas em relação ao seu comportamento alimentar.

Nesse trabalho, será abordada a morfologia e ultraestrutura da espermateca e intestino médio de *Lt. bigoti*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Compreender a morfologia geral e ultraestrutura da espermateca e intestino médio de *Lt. bigoti*.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar e mensurar as espermatecas virgens de *Lt. bigoti*;
- Descrever a morfologia geral da espermateca virgem de *Lt. bigoti*;
- Relatar a organização, morfologia e composição interna dos diferentes tipos celulares, tanto do reservatório quanto do ducto da espermateca virgem em *Lt. bigoti*;
- Descrever a morfologia geral do intestino médio em machos e fêmeas de *Lt. bigoti*;
- Identificar os diferentes tipos de células e sua organização no intestino médio de machos e fêmeas de *Lt. bigoti*;
- Abordar a ultraestrutura das células do intestino médio de machos e fêmeas de *Lt. bigoti*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e criação dos mosquitos

Imaturos de *Lt. bigoti* foram coletados de baldes com água, dispostos na Mata do Paraíso (latitudes de 20° 41'20"S 20° 49' 35"S e longitudes de 42° 41'20" W e 42° 54' 27" W), da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa/MG/Brasil) (licença do ICMBio de número 56917-2).

Os insetos foram levados ao insetário do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, do Departamento de Biologia Geral (UFV). No local, estiveram sem controle de temperatura ou de luz. As larvas foram acondicionadas individualmente em recipientes com aproximadamente 150 mL de água decolorada, sendo alimentadas diariamente com cinco larvas de *Ae. aegypti* (Linhagem PP-Campos, Campos dos Goytacazes), criadas sob temperatura aproximada de 28 °C, fotoperíodo de 12 horas, mantidas em bandejas plásticas com água da torneira decolorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife). Já as pupas foram colocadas em recipiente do mesmo tipo e mantidas em gaiolas de plástico, para manutenção dos adultos após a emergência. Nessas gaiolas, foi oferecida aos adultos solução de sacarose (10%) *ad libitum*, embebida em algodão. Os adultos foram mantidos nas gaiolas até aproximadamente sete dias após a emergência. O reconhecimento da espécie foi feito devido à presença de setas evidentes no palpo maxilar dos machos adultos e na distribuição geográfica de espécies do gênero *Lutzia* (Harbarch, 2014).

4.2. Microscopia eletrônica de varredura

Os adultos foram dissecados em tampão fosfato-salino (PBS), 0,1 M, sendo as amostras (espermatecas e intestino médio) retiradas e fixadas em Zamboni. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30 - 100%), sendo mantidas em álcool 100%.

As amostras desidratadas foram secas em aparelho de ponto crítico, Balzers CPD 030. Em seguida, foram metalizadas utilizando metalizador, Quorum Q 150 R S. As amostras foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura,

LEO 1430 VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM-UFV).

4.3. Microscopia óptica

Mosquitos adultos com aproximadamente sete dias foram dissecados em PBS, 0,1 M, pH 7.2, sob microscópio estereoscópio. As amostras foram retiradas e mantidas em fixador Zamboni, por cerca de duas horas.

As amostras fixadas foram lavadas em solução PBS, sendo desidratadas em séries crescentes de etanol (30-100%). Feito isso, foram incluídas em historesina Leica (2-hidroxietil metacrilato) com catalisador, para polimerização a vácuo por 48 horas.

As amostras polimerizadas foram seccionadas, utilizando micrótomo com navalhas de vidro, Reichert Jung 2050, sendo obtidas secções com 5 µm de espessura. Tais secções foram colocadas sobre lâmina de vidro e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas com meio de montagem, Entellan™, e fotografadas utilizando microscópio de luz, Olympus BX53, do Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE), da Universidade Federal de Viçosa-MG.

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Mosquitos foram dissecados em solução tampão, cacodilato de sódio 0,1 M. As amostras foram retiradas e fixadas em glutaraldeído (2,5%), por duas horas. As amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%), durante duas horas, seguida por nova lavagem.

As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70 - 100%). A seguir, foram embebidas em uma mistura de etanol (100%) e resina, LR White, (proporção 1:1), por 24 horas. Após, foram mantidas em resina, LR White, pura, por 24 horas. As amostras foram acondicionadas em cápsulas de gelatina, que foram preenchidas com resina, LR White para polimerização em estufa (60°C), por 72 horas.

Após a polimerização, as amostras foram seccionadas em ultramicrotomo, RMC Power Tome-X com lâmina de diamante, para a obtenção de cortes ultrafinos. Esses cortes foram contrastados com acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (0,2 %).

Por fim, foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão, Zeiss EM 109, do NMM-UFV.

5. RESULTADOS

5.1. Espermateca

As fêmeas da espécie *Lt. bigoti* possuem espermatecas com três reservatórios (Fig 4A). O formato dos reservatórios pode variar de esférico a oval. O reservatório mediano tem 130 μm ($133 \pm 5 \mu\text{m}$, $n = 7$) de diâmetro. Os dois reservatórios laterais têm 110 μm ($106 \pm 7 \mu\text{m}$, $n = 14$) de diâmetro. Cada reservatório está associado ao seu respectivo ducto e glândula espermatecal. A glândula está associada à parede do reservatório, próxima ao ponto de encontro entre ele e o ducto (Figs 4A e 4C).

O reservatório espermatecal é circundado por uma cutícula multilamelar, que delimita seu lúmen. As lamelas internas da cutícula são mais elétrons densas quando comparadas às externas (Figs 6A e D). A porção interna da cutícula do reservatório apresenta pequenas perfurações em sua porção próxima ao encontro com o ducto, quando visualizada por microscopia eletrônica de varredura (Figs 4E e F). Além disso, ocorre a presença de um material floculento associado à algumas dessas estruturas (Fig 4F).

Externamente ao reservatório, está presente um epitélio simples pavimentoso, com cerca de 1,4 μm de altura (Figs 5B e 6D). Os núcleos das células nessa estrutura apresentam um formato achatado. As células epiteliais estão maiores, com cerca de 2,7 μm de altura e com núcleos esféricos em alguns pontos do reservatório (Fig 5B).

Algumas dezenas de células glandulares estão associadas ao reservatório da espermateca, próximo ao ponto de encontro com o ducto, formando a glândula do reservatório. Essas células, que chegam à 10,5 μm de altura, possuem um núcleo grande e oval, com cromatina descondensada e um nucléolo bem evidente (Figs 5A e B). Além disso, a maior parte de seu citoplasma é tomada por uma substância granular elétrons-lúcida (Figs 6A e C). As células glandulares se comunicam com o reservatório por um pequeno ducto revestido por cutícula, que também se apresenta repleto de substância granular (Fig 6C).

O ducto da espermateca também é delimitado por cutícula, que não apresenta a estrutura lamelar encontrada no reservatório (Fig 5C). Externamente à cutícula, há um epitélio simples cujas células apresentam um formato colunar com um núcleo que varia de esférico a elíptico (Fig 5C). O epitélio do ducto apresenta em média 2,5 μm

de altura. Além disso, existem fibras musculares longitudinais associadas externamente ao ducto (Fig 4B).

Células glandulares individuais estão associadas ao ducto espermatecal, que se encontram localizadas externamente ao epitélio (Figs 4B e D). Essas células possuem um núcleo evidente com cromatina descondensada (Fig 5C), e se conectam com o ducto espermatecal por meio de um pequeno ducto (Figs 4D e 6B). Além disso, possuem a maior parte de seu citoplasma ocupado por uma substância granular, semelhante às células glandulares do reservatório (Fig 6B).

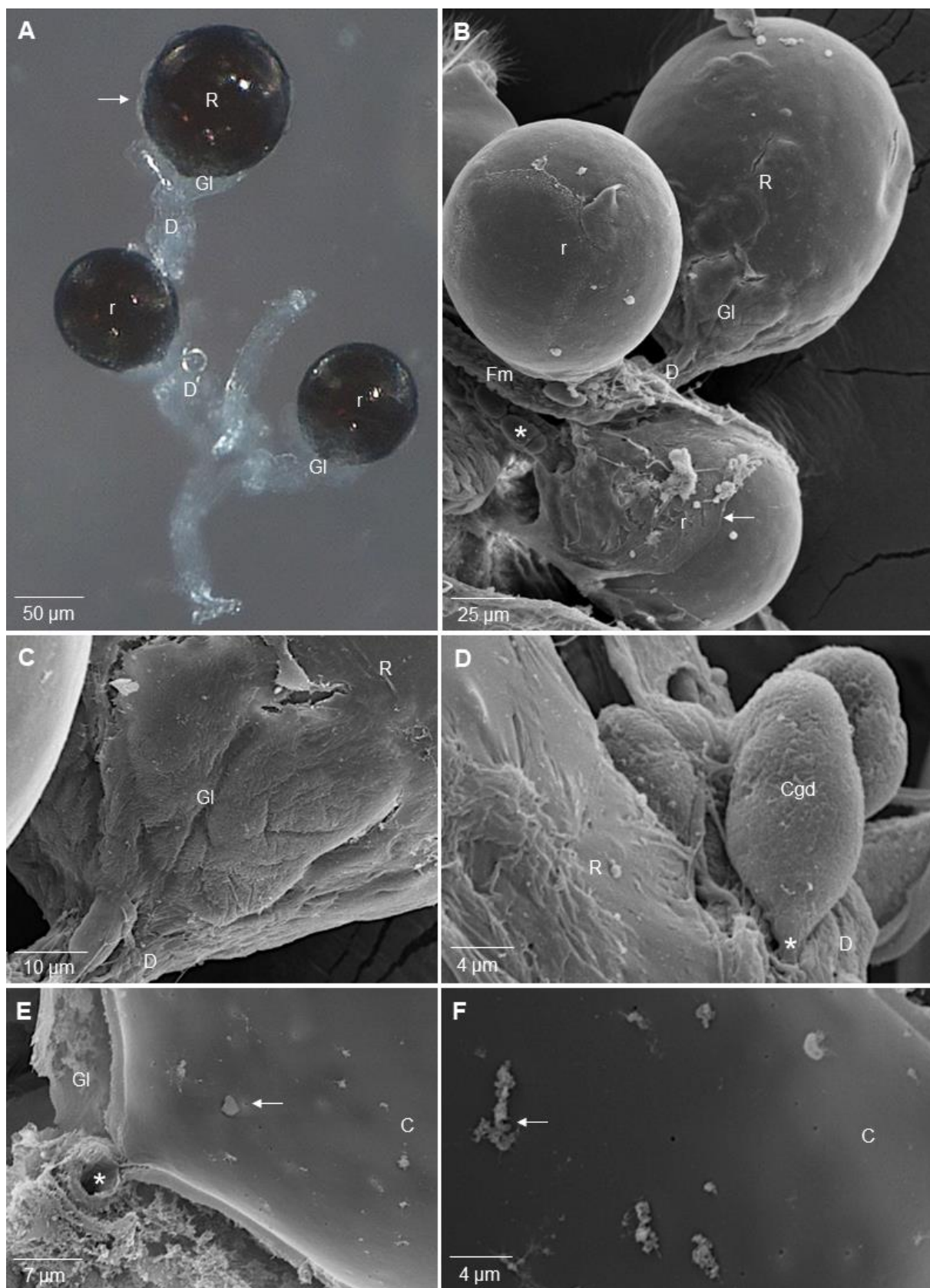


Figura 4: Espermateca de *Lutzia bigoti* sob microscópio estereoscópio (A) e micrografias eletrônicas de varredura (B-F). **A:** Espermatecas com um reservatório maior (R) e dois menores (r). Há um ducto (D) e uma glândula (Gl) associados a cada reservatório. Seta: epitélio do reservatório. **B:** Os ductos (D) conectados aos reservatórios (R e r) apresentam fibras musculares (Fm) e células glandulares (*) associados. Pode ser observada uma fina membrana (seta) associada à um dos reservatórios menores (r). Gl: glândula. **C:** Glândula (Gl) no ponto de encontro entre ducto (D) e reservatório (R). **D:** Célula glandular (Cgd) conectada ao ducto da espermateca (D) por um pequeno ducto (*). R: reservatório. **E:** Porção interna da cutícula do reservatório (C), mostrando pequenas perfurações (seta) na região da cutícula próxima à glândula. Asterisco: lúmen do ducto. Gl: glândula. **F:** Visão ampliada do lado interno da cutícula (C), mostrando uma substância floculenta associada às perfurações (seta).

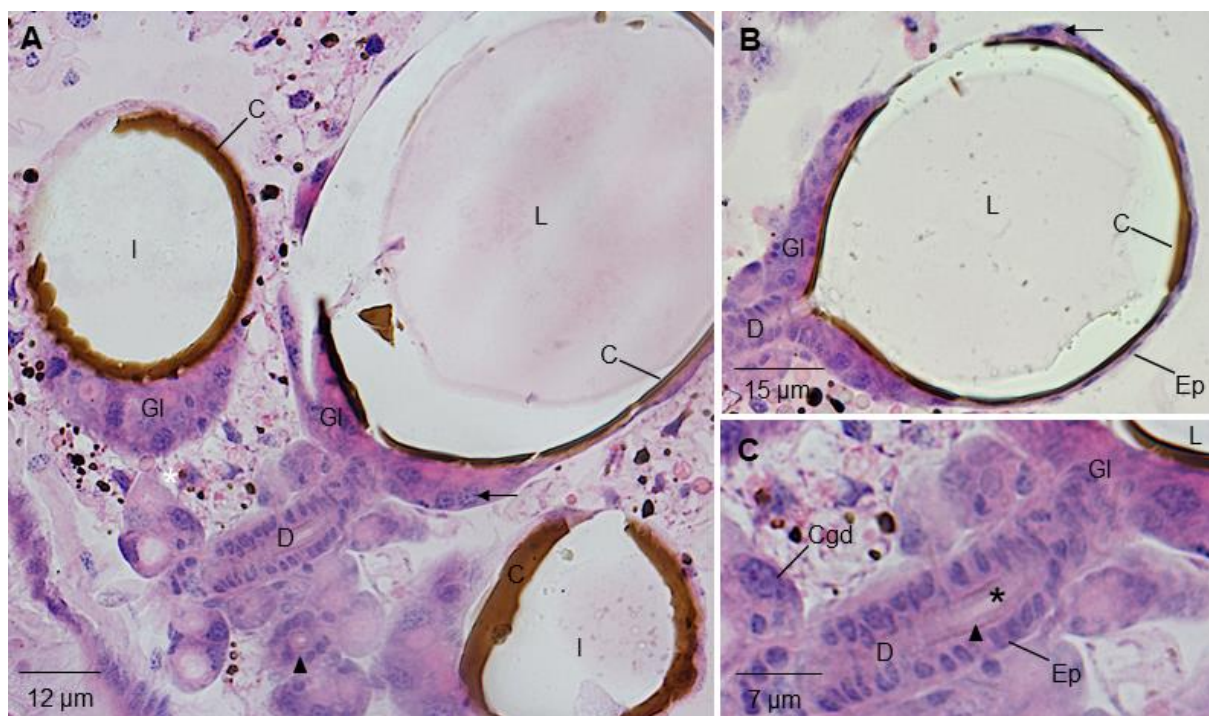


Figura 5: Secções histológicas das espermatecas de *Lutzia bigoti*. **A:** Lúmens dos três reservatórios (L e I) delimitados pela cutícula (C) e com glândula associada (Gl). O núcleo de uma célula glandular é apontado (seta). Um ducto (D) se conecta ao reservatório maior. Cabeça de seta: ducto em corte transversal. **B:** Reservatório maior, com ducto associado (D). O fino epitélio do reservatório apresenta células com núcleos achatados (Ep). C: cutícula. Gl: glândula. L: lúmen do reservatório. Seta: célula epitelial espessa. **C:** Ducto do reservatório maior com células colunares (Ep) e células glandulares associadas (Cgd). Asterisco: lúmen do ducto. Cabeça de seta: cutícula do ducto. Gl: glândula. L: lúmen do reservatório.

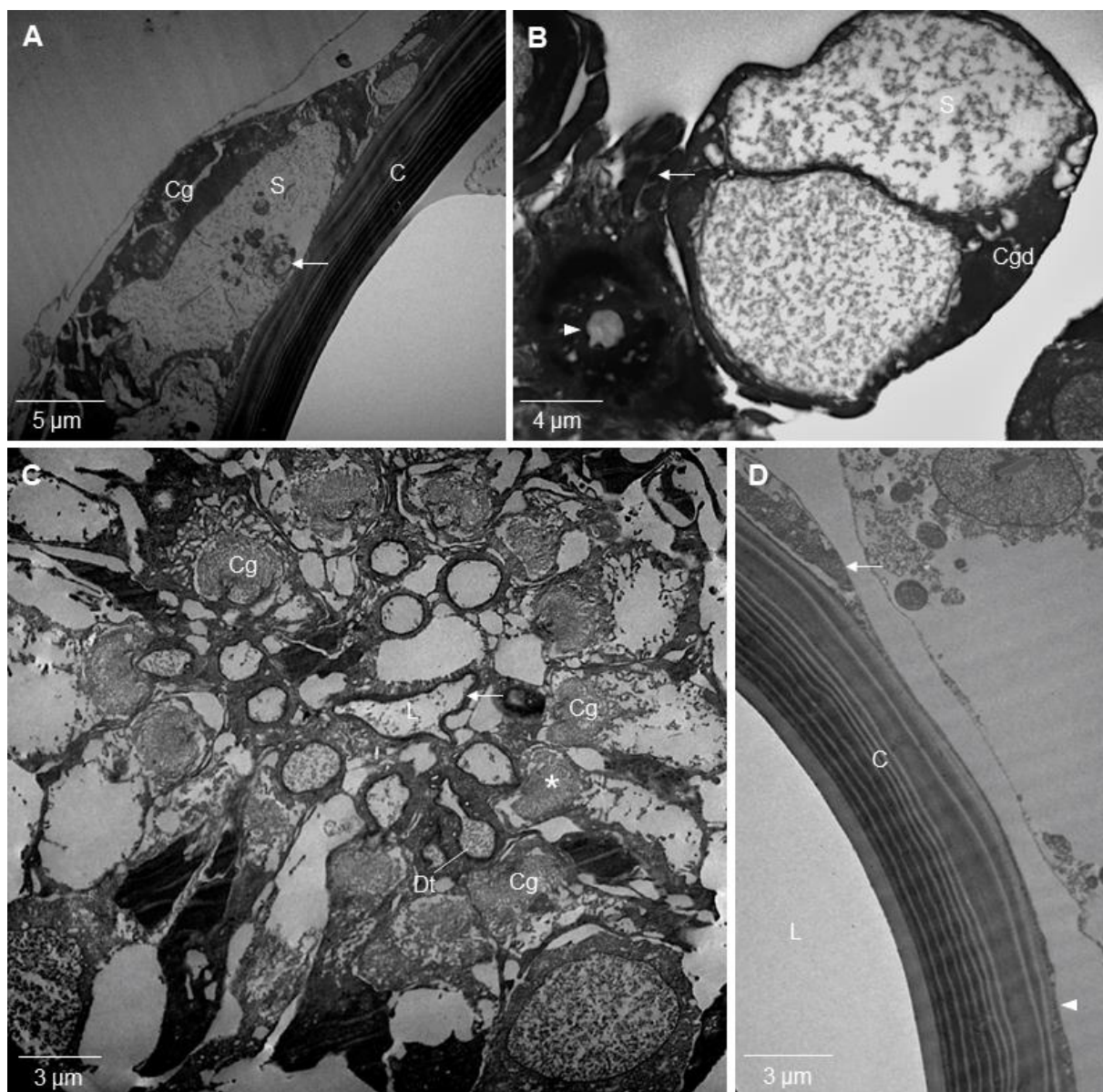


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão da espermateca de *Lutzia bigoti*. **A:** Célula glandular (Cg), com o citoplasma contendo substância granular elétrôn-lúcida (S). A célula está associada à cutícula do reservatório (C), se comunicando com o mesmo por meio de um ducto (seta). **B:** Célula glandular (Cgd) com reservatório de substância granular (S). A célula está conectada, por meio de seu pequeno ducto (seta), ao ducto da espermateca (cabeça de seta), que aparece em corte transversal. **C:** Células glandulares (Cg) do reservatório associadas à cutícula (seta), no ponto de encontro desse com o ducto. Ápice do citoplasma e ducto (Dt) com substância elétrôn-lúcida (asterisco). Ao centro é visto o lúmen com uma substância granular (L) **D:** Célula epitelial associada à cutícula do reservatório. O epitélio que envolve o reservatório é achatado (cabeça de seta), porém sendo mais espesso em determinados pontos (seta).

5.2. Intestino médio

O intestino médio em *Lt. bigoti* é dividido em duas porções: o intestino médio anterior, afilado e longo, localizado após a cárdia, e o intestino médio posterior, dilatado lateralmente e mais curto que a porção anterior, sendo conectado ao intestino posterior. No ponto de conexão entre intestino médio e posterior, encontram-se numerosos túbulos de Malpighi. A divisão do intestino médio em duas porções existe em machos e fêmeas (Figs 7A e B). Porém, nessas últimas, a porção posterior é mais desenvolvida em relação aos machos. Numerosas traquéolas estão associadas à parede do órgão, sendo essas mais abundantes na porção posterior (Figs 8E e F). Fibras musculares, circulares e longitudinais, formam uma trama que envolve externamente o intestino médio (Fig 10F). Tais fibras podem estar firmemente associadas ao órgão, chegando a formar sulcos na parede, o que é visto com mais frequência nas fibras circulares (Figs 8A a D).

O lúmen do intestino médio anterior é estreito, com a porção apical das células de lados opostos muito próximas. Já o lúmen da porção posterior é mais largo, sendo frequentemente encontrado com alimento em seu interior (Figs 9A a F).

No intestino médio de *Lt. bigoti* há um epitélio simples com células digestivas com formato que vai do cúbico ao colunar (Figs 9A a D). Os núcleos das células vizinhas estão posicionados em uma altura aproximada, tendo um formato que vai do esférico ao alongado (Figs 9C e D). Nas fêmeas, os núcleos estão mais próximos da porção basal, enquanto nos machos, estão mais centralizados (Figs 9C a F). As células digestivas possuem microvilosidades longas e densas em sua porção apical, formando a borda estriada (Figs 9E e F). Tais microvilosidades apresentam alturas similares quando comparadas as diferentes porções do intestino médio ou mesmo machos e fêmeas. Em ambas as porções do órgão na fêmea e na porção anterior do macho, as microvilosidades apresentam uma altura aproximada de 3 μm . A maior diferença está na porção posterior do macho, onde os valores são em média 5 μm . Foi detectada uma eosinofilia na porção basal das células digestivas do intestino médio posterior do macho (Fig 9D). Estas células estão apoiadas em uma lâmina basal (Figs 9E e F e 11A e E).

As células digestivas do intestino médio anterior são polarizadas, dispondo de microvilosidades numerosas na porção apical e um conjunto de dobras de membrana em sua porção basal, o labirinto basal (Fig 10A). É possível observar acúmulo de

substâncias com aspecto granular e elétron denso associadas às microvilosidades na porção luminal (Fig 10E). O núcleo das células digestivas é rico em eucromatina e com um nucléolo evidente (Fig 10G). Inúmeras mitocôndrias estão concentradas na porção supra nuclear das células digestivas, especialmente logo abaixo da membrana plasmática, ou associadas ao labirinto basal. Tais mitocôndrias podem ser circulares ou alongadas, ou ainda curvadas (Figs 10A a C). Na porção apical das células digestivas do intestino médio anterior são encontradas estruturas semelhantes a vesículas, em machos e fêmeas (Fig 10G). Por fim, o retículo endoplasmático é visto como cisternas alongadas, não empilhadas, próximo ao núcleo (Fig 10G).

Na porção posterior do intestino médio, a mesma polarização em microvilosidades e labirinto basal está presente, sendo as células também apoiadas em lâmina basal (Figs 11A e D). Do mesmo modo que na porção anterior, há uma abundância de mitocôndrias na porção apical da célula e também associadas ao labirinto basal (Figs 11B e E). Em relação ao retículo endoplasmático, a maioria de suas cisternas assumem formas concêntricas nas fêmeas, estando localizado próximo ao núcleo (Fig 11C).

Células basais se encontram ao longo do intestino médio, sendo menos numerosas que as digestivas. Tais células são encontradas na porção basal do órgão e dispõem de núcleos que apresentam frequentemente um formato cônico, sendo menores que os das células digestivas (Figs 9B e D). Sob microscopia de transmissão, essas células apresentam um citoplasma elétron-lúcido com poucas organelas detectadas (Fig 10H). Em cortes longitudinais da porção basal do intestino médio, encontram-se numerosas células basais (Fig 10D).

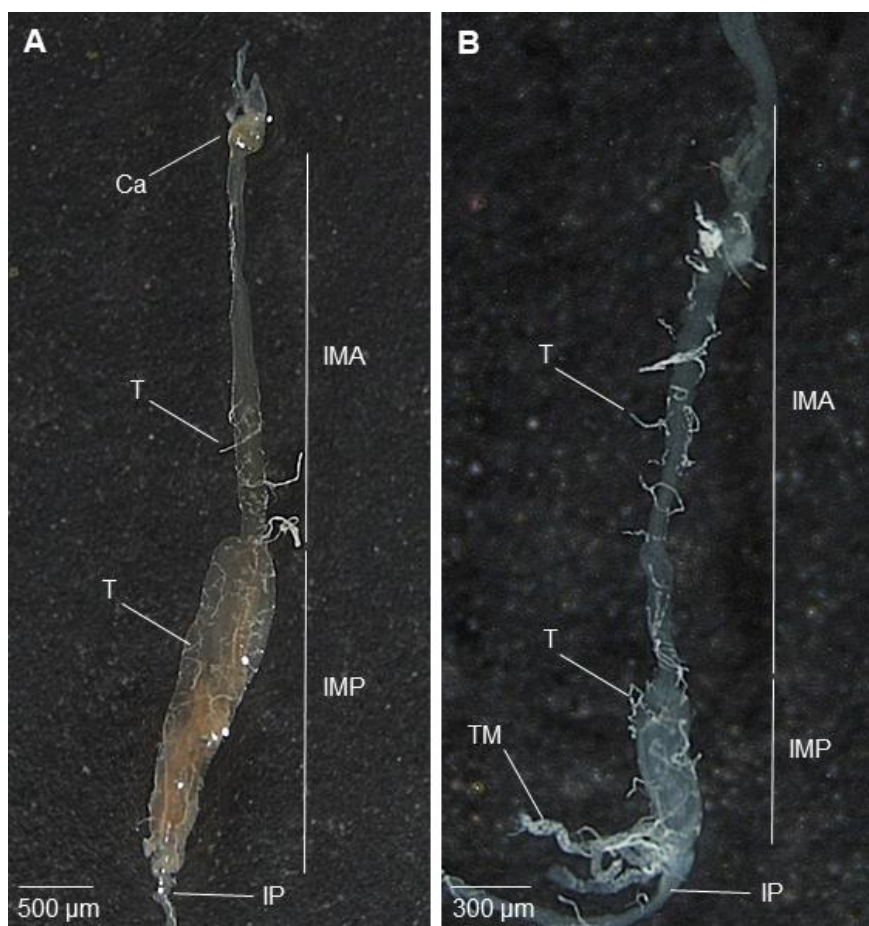


Figura 7: Intestino médio de (A) fêmea e (B) macho de *Lutzia bigoti*. O intestino médio possui uma porção anterior longa e fina (IMA) e uma porção posterior mais curta e dilatada (IMP). Ao longo da estrutura há várias traquéolas associadas (T). Ca: cárdia. IP: intestino posterior. TM: túbulos de Malpighi.

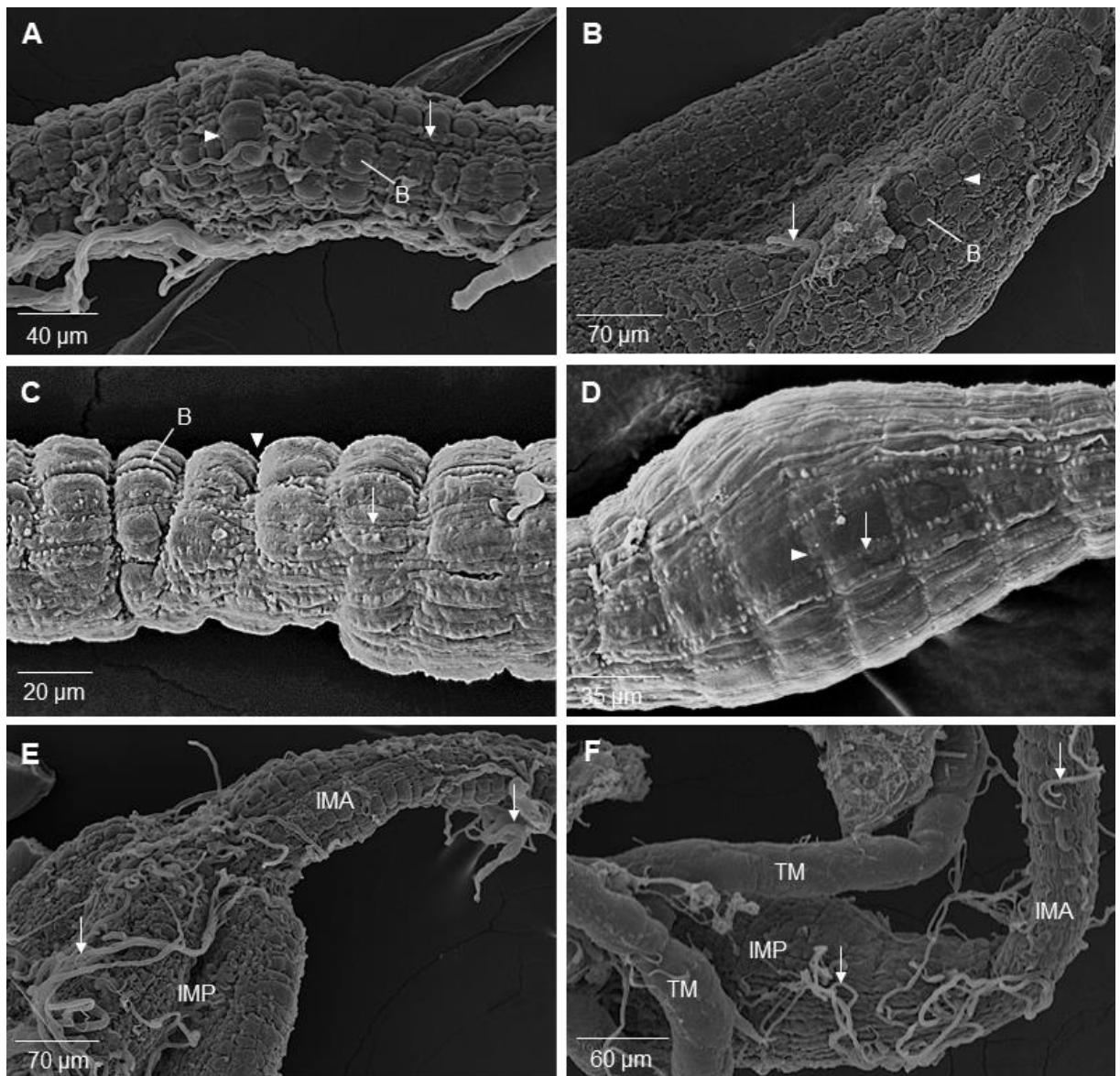


Figura 8: Micrografia eletrônica de varredura do intestino médio de adultos de *Lutzia bigoti*. **A:** Intestino médio anterior em fêmea. Fibras musculares longitudinais (seta) e circulares (cabeça de seta) envolvem externamente a estrutura, formando sulcos. B: base do epitélio. **B:** Intestino médio posterior em fêmea. Os sulcos formados pelas fibras musculares deixam a base das células do intestino (B) evidentes. Cabeça de seta: sulco formado por fibra circular. Seta: traquéola. **C:** Intestino médio anterior em macho, com fibras longitudinais (seta) e sulcos formados pelas fibras circulares (cabeça de seta). B: base de célula intestinal. **D:** Intestino médio posterior em macho, com fibras longitudinais (seta) e circulares (cabeça de seta) frouxamente associadas, não formando sulcos. **E:** Região de transição entre as porções anterior (IMA) e posterior (IMP) do intestino médio em fêmea. Seta: traquéolas. **F:** Região de transição entre as porções anterior (IMA) e posterior (IMP) em macho. Túbulos de Malpighi (TM) são mostrados ao final da porção posterior. Seta: traquéolas.

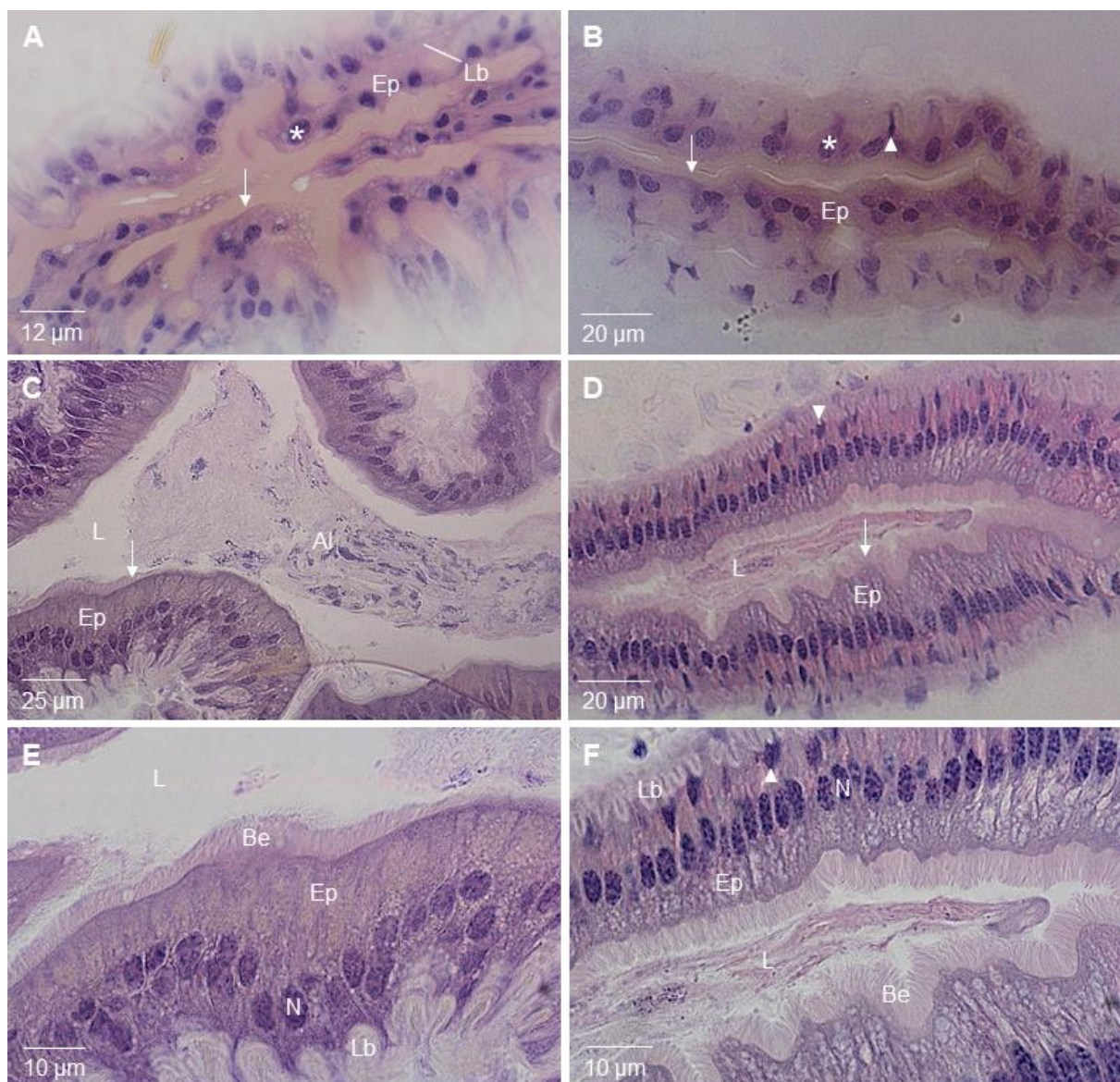


Figura 9: Secções histológicas do intestino médio de *Lutzia bigoti* corados com hematoxilina e eosina. **A:** Intestino médio anterior em fêmea, cujas células digestivas do epitélio (ep) possuem núcleos esféricos (*). A borda estriada está presente (seta), delimitando um estreito lúmen. Lb: lâmina basal. **B:** Intestino médio anterior de macho. O núcleo de uma célula basal pode ser visualizado (cabeça de seta). Ep: epitélio. Seta: borda estriada. Asterisco: núcleo de célula digestiva. **C:** Intestino médio posterior em fêmea, cujas células digestivas do epitélio (Ep) apresentam seus núcleos próximos da porção basal e com alturas aproximadas. Um amplo lúmen está presente (L), repleto de alimento (Al). Seta: borda estriada. **D:** Intestino médio posterior de macho, cujo epitélio (Ep) apresenta células colunares com a região basal acidófila e núcleos alinhados. Há um grande número de células basais, com núcleos menores que os das células digestivas (cabeça de seta). L: Lúmen. Seta: Borda estriada. **E:** Intestino médio posterior de fêmea, com o epitélio (Ep) ancorado na lâmina basal (Lb). Be: borda estriada. L: lúmen. N: núcleo de célula digestiva. **F:** Intestino médio posterior de macho, mostrando a cromatina descondensada dos núcleos (N) das células digestivas do epitélio (Ep). Be: borda estriada. L: lúmen. Lb: lâmina basal. Cabeça de seta: núcleo de célula basal.

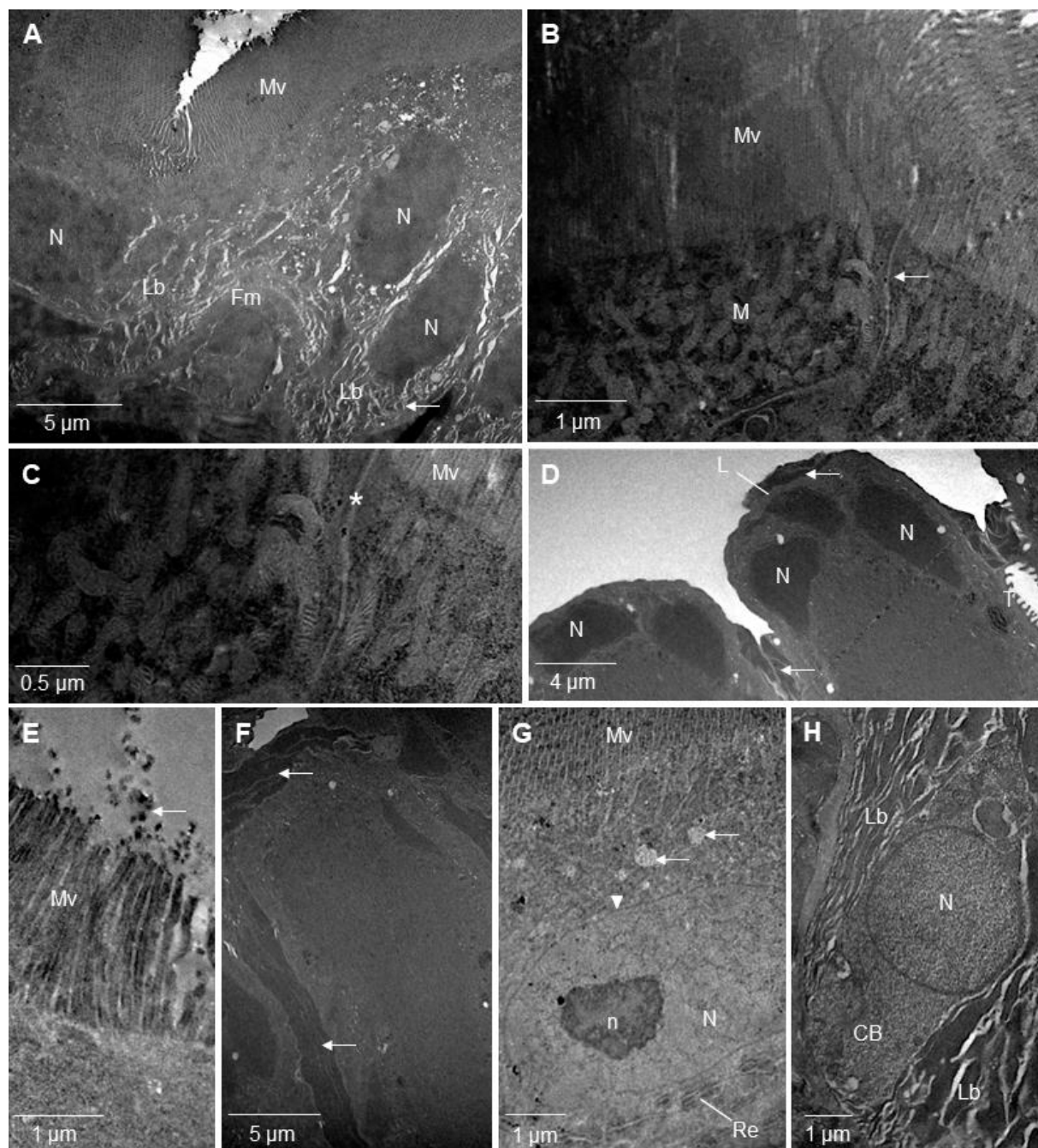


Figura 10: Micrografia eletrônica de transmissão do intestino médio anterior de adultos de *Lutzia bigoti*. **A:** Célula digestiva em macho, com microvilosidades (Mv) na porção apical e labirinto basal (Lb) na porção basal. Fm: fibras musculares. N: núcleo. Seta: mitocôndria. **B:** Porção apical de uma célula digestiva de fêmea, mostrando as densas e numerosas microvilosidades (Mv). O citoplasma apical está repleto de mitocôndrias (M). Seta: limite celular. **C:** Detalhe de “B” com mitocôndrias na porção apical. Mv: microvilosidades. Asterisco: limite celular. **D:** Porção basal do epitélio em fêmea. Os núcleos de várias células basais podem ser vistos (N). L: lâmina basal. T: traquéola. Seta: fibras musculares. **E:** Microvilosidades (Mv) com grânulos próximos à sua porção apical (seta) em fêmea. **F:** Fibras musculares circulares e longitudinais (setas) associadas à porção basal das células digestivas em fêmea. **G:** Célula digestiva em fêmea, mostrando o núcleo (N) com nucléolo (n) evidente. Na porção apical, é possível observar estruturas semelhantes a vesículas (seta). O retículo endoplasmático (Re) se apresenta como cisternas alongadas. Mv: microvilosidades. Cabeça de seta: envoltório nuclear. **H:** Célula basal (CB) na porção basal do epitélio em macho. Lb: labirinto basal. N: núcleo.

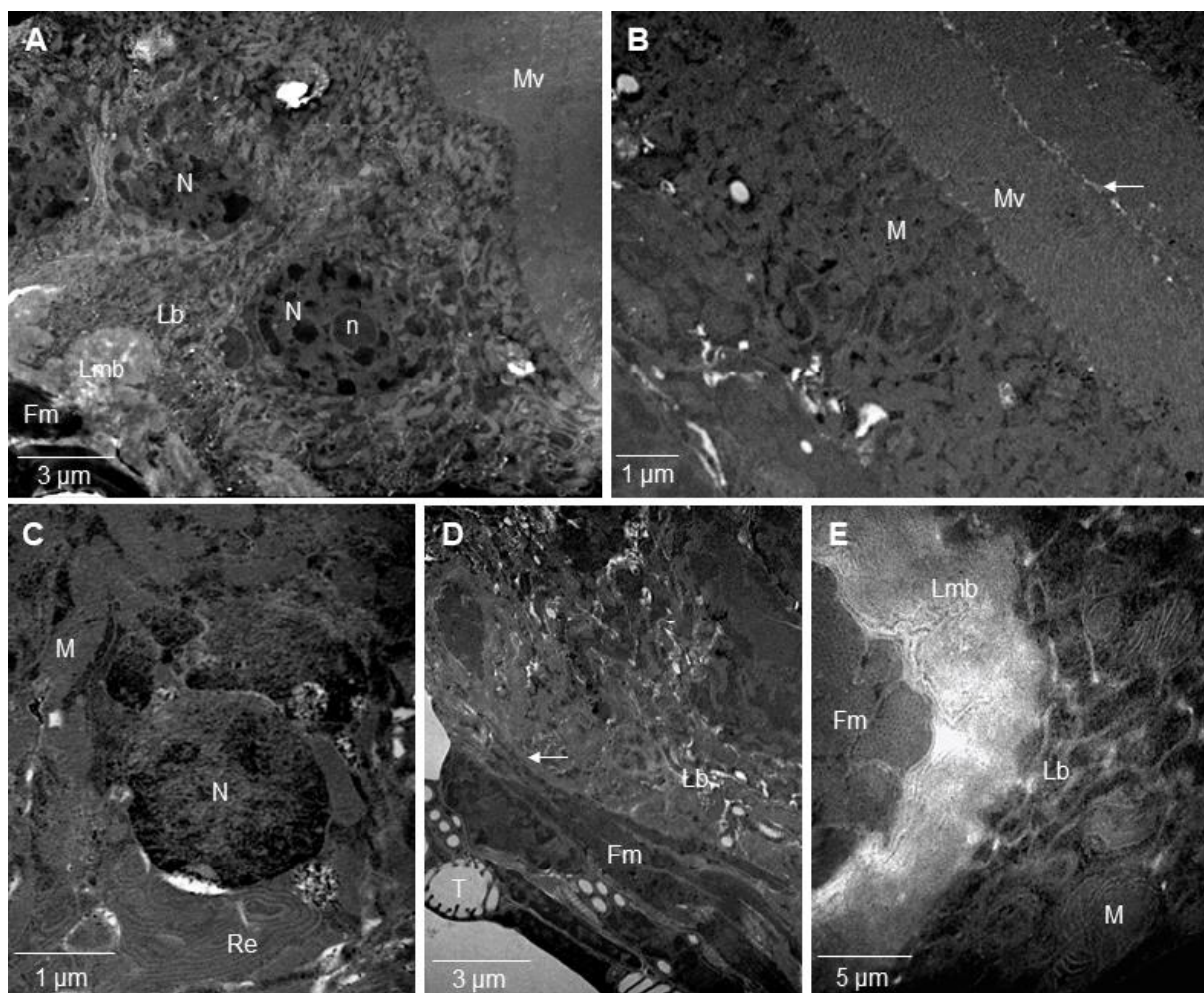


Figura 11: Micrografia eletrônica de transmissão do intestino médio posterior de adultos de *Lutzia bigoti*. **A:** Células digestivas em macho com microvilosidades (Mv) na porção apical e labirinto basal (Lb) na porção basal. Abaixo do labirinto basal é possível observar a lâmina basal (Lmb) e fibras musculares (Fm). N: núcleo. n: nucléolo. **B:** Porção apical de célula digestiva em fêmea mostrando numerosas mitocôndrias (M). São mostradas as microvilosidades densamente organizadas (Mv) e um estreito lúmen (seta). **C:** Célula digestiva em fêmea, mostrando as cisternas de retículo endoplasmático (Re) organizadas em um arranjo concêntrico, próximas ao núcleo (N). M: Mitocôndria. **D:** Porção basal de uma célula digestiva de fêmea mostrando as fibras musculares (Fm), em corte longitudinal, próximas ao labirinto basal (Lb). N: núcleo. T: traquéola. Seta: lâmina basal. **E:** Mitocôndrias (M), com cristas evidentes, associadas ao labirinto basal (Lb) em célula digestiva de fêmea. Fibras musculares (Fm) aparecem em corte transversal. Lmb: lâmina basal.

6. DISCUSSÃO

6.1. Espermateca

A espermateca é o órgão responsável pelo armazenamento dos espermatozoides após a cópula na fêmea dos insetos, permitindo um isolamento temporal entre cópula e fertilização dos ovos (Pascini & Martins, 2017). Existe uma carência de estudos sobre espermateca em mosquitos, sendo abordadas poucas espécies, principalmente aquelas do gênero *Aedes* e *Anopheles* (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2014). Nesse trabalho, foi descrita a estrutura geral e a organização celular da espermateca em *Lt. bigoti*, uma espécie cujas larvas são predadoras, encontrada em florestas (Moser *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2013).

Em *Lt. bigoti*, a espermateca apresenta três reservatórios, sendo o reservatório mediano maior (130 µm) que os reservatórios laterais (110 µm). A presença de três reservatórios foi descrita em várias espécies de mosquitos, como as dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Mansonia* e *Toxorhynchites* (Clements & Potter, 1967; Dehghan *et al.*, 2014; Ndiaye *et al.*, 1997). Algumas espécies, como as do gênero *Anopheles*, possuem apenas um reservatório (Pascini *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2014).

A diferença de volume entre reservatórios foi também descrita em outras espécies de mosquitos. No mosquito doméstico comum, *Culex pipiens*, o reservatório mediano é ligeiramente maior em comparação aos laterais (Dehghan *et al.*, 2014). Em *Ae. aegypti*, o reservatório mediano apresenta 100 µm de diâmetro, enquanto os laterais, 75 µm (Pascini *et al.*, 2012). Ao se comparar esses valores com os encontrados para *Lt. bigoti* é notável a maior dimensão presente em *Lt. bigoti*. Tal discrepância pode ser explicada devido ao fato de que as fêmeas de *Lt. bigoti* apresentam em média 0,8 centímetros, da cabeça até a extremidade do abdômen, sendo assim maiores quando comparadas às fêmeas da grande parte das espécies de mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*, cujas fêmeas apresentam aproximadamente 0,5 centímetros, medidas da mesma forma (dados pessoais). Portanto, tal diferença encontrada nas espermatecas pode ser explicada pelas proporções. Essa diferença parece não refletir na capacidade reprodutiva de *Lt. bigoti*, dado que *Ae. aegypti* possui maior distribuição e abundância, mesmo com uma menor capacidade de estocagem de gametas.

Os reservatórios da espermateca são delimitados por uma cutícula multilamelar em *Lt. bigoti*, como já demonstrado para outras espécies de mosquitos (Ndiaye *et al.*, 1997; Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013). As camadas internas da cutícula são mais elétricas densas em relação às externas, o que ocorre devido à síntese mais recente das camadas mais externas pelas células epiteliais. A cutícula é importante para o isolamento dos gametas no interior do reservatório, os protegendo de componentes presentes na hemolinfa ou no ambiente externo, além da manutenção da composição iônica e osmorregulação no lúmen (Pascini & Martins, 2017; Schoeters & Billen, 2000).

A espermateca de *Lt. bigoti* apresenta grandes células associadas, com núcleos esféricos e evidentes, as células glandulares. O citoplasma dessas células aparece repleto de uma substância elétrica-lúcida, que provavelmente se trata de uma substância a ser lançada na espermateca, para a manutenção dos gametas. Tais células nessa espécie podem ser divididas em dois grupos: células associadas ao reservatório e células associadas ao ducto. As primeiras se concentram próximo ao ponto de junção entre ducto e reservatório. Essa distribuição é similar ao encontrado em *Ae. aegypti* (Clements & Potter, 1967) e *Toxorhynchites theobaldi* (observação pessoal) e diferente do que ocorre em *An. aquasalis*, onde as células glandulares estão distribuídas ao redor do reservatório (Pascini *et al.*, 2013). Já as células associadas ao ducto, se inserem individualmente ao longo do mesmo, o que também ocorre nas outras espécies já descritas (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2013).

Em *Lt. bigoti*, a comunicação entre as células glandulares e o lúmen do reservatório fica evidente pela presença de pequenas perfurações na cutícula do reservatório em seu lado interno, por onde as secreções das células glandulares são liberadas pelos seus pequenos ductos celulares associados. Essas secreções podem ser vistas como uma substância floculenta próxima às perfurações na cutícula, quando observada sob microscopia eletrônica de varredura.

As secreções das células glandulares em *Lt. bigoti* podem ter diferentes funções. Essas secreções podem conter substâncias importantes para a nutrição dos gametas e metabolismo energético durante o período de estocagem (Bhatnagar & Musgrave, 1971; Costa-Leonardo & Patrício, 2005; Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2020; Prokupek *et al.*, 2008). Podem ainda ser essenciais no enchimento da espermateca, contendo substâncias que atraem os gametas para o reservatório por meio da quimiotaxia (Fritz & Turner, 2002; Grodner & Steffens, 1978). Além disso, as

secreções podem ser cruciais na manutenção da viabilidade dos espermatozoides durante o período de estocagem, possuindo enzimas que controlam o estresse oxidativo, regulam o balanço osmótico no interior do reservatório, e ainda substâncias antimicrobianas para a proteção dos gametas contra infecções (Pascini *et al.*, 2020; Shaw *et al.*, 2014; Weirich *et al.*, 2002). A natureza e funções precisas dos componentes dessas secreções em *Lt. bigoti* ainda precisam ser investigados.

Além das células glandulares, há um outro tipo de célula presente na espermateca de *Lt. bigoti*, as células epiteliais. No reservatório, essas células estão fortemente aderidas, formando um fino epitélio associado à cutícula. Essa estrutura é similar à encontrada em *Ae. aegypti* (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012) e *Tx. theobaldi* (observação pessoal), sendo distinta do presente em *An. aquasalis*, onde as células epiteliais do reservatório apresentam um formato irregular (Pascini *et al.*, 2013). É provável que as diferenças encontradas no epitélio da espermateca, bem como nas células glandulares e número de reservatórios em mosquitos, seja um reflexo da distância evolutiva entre Anophelinae e Culicinae (Harbach, 2007).

A provável função do epitélio do reservatório em mosquitos é a síntese e manutenção da cutícula, além do isolamento do reservatório do contato com a hemolinfa (Pascini *et al.*, 2012). Foi sugerido que a síntese da cutícula do reservatório já tenha sido finalizada antes da emergência do adulto em *Ae. aegypti*, o que contribui para explicar o fino epitélio do reservatório (Clements & Potter, 1967). Tal fato provavelmente se aplica à espécie desse trabalho. Em diferentes espécies de insetos, o epitélio do reservatório apresenta células mais desenvolvidas, ricas em organelas, como mitocôndrias, e dobramentos de membrana (Gschwentner & Tadler, 2000; Martins *et al.*, 2008). É provável que essas células estejam envolvidas nas funções de transporte e secreção de substâncias (Martins *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2019). O epitélio em mosquitos, sendo mais simples quando comparado à tais espécies, provavelmente não está envolvido em secreção e absorção. É possível que a simplicidade da estrutura em mosquitos seja um reflexo do menor tempo de armazenamento e consequentemente de demandas dos gametas na espermateca, dado o curto tempo de vida das espécies (Muir & Kay, 1998; Pascini *et al.*, 2012).

Em *Lt. bigoti*, há um ducto que conecta o reservatório da espermateca à bursa copulatória. Este ducto é revestido por cutícula, que não apresenta a estrutura lamelar encontrada no reservatório. Foi mostrado que a cutícula do ducto em *Ae. aegypti* possui resilina, uma proteína elástica, o que infere uma necessidade de contração e

relaxamento na estrutura (Clements & Potter, 1967). Externamente à essa cutícula, há um epitélio simples colunar, cujas células são provavelmente as responsáveis pela síntese da mesma. As células do epitélio do ducto não apresentam o formato achatado encontrado naquelas do reservatório, o que pode ser um indicativo de um papel ativo das mesmas durante a vida adulta da fêmea, não se limitando à manutenção da cutícula. Dessa forma, essas células podem estar envolvidas na secreção de produtos ou mesmo no transporte de substâncias oriundas da hemolinfa, durante a passagem dos espermatozoides ao longo da estrutura. Foi mostrado que as células epiteliais do ducto em fêmeas inseminadas de *Ae. aegypti* contêm transcritos envolvidos na atividade antimicrobiana e no balanço iônico (Pascini *et al.*, 2020). Além disso, os produtos liberados pelas células epiteliais podem ser importantes para o metabolismo dos gametas ao passarem pelo ducto, como sugerido para abelhas do gênero *Bombus*, ou ainda servirem para a lubrificação da estrutura, facilitando a passagem dos espermatozoides, como em *Zorotypus hubbardi* (Dalai *et al.*, 2012; Schoeters & Billen, 2000).

Células glandulares individuais estão distribuídas aderidas externamente ao longo do ducto espermatecal, associadas ao mesmo de maneira individual por meio de pequenos ductos revestidos por cutícula, o que também ocorre em outras espécies de mosquitos (Pascini *et al.*, 2012; Pascini *et al.*, 2013). Tais células são repletas de uma substância floculenta, que provavelmente é liberada no lúmen do ducto espermatecal. Existem algumas possibilidades para o papel dessas secreções no ducto, elas podem atuar nutrindo os espermatozoides ao longo de sua passagem ou como um lubrificante, facilitando a movimentação das células ao longo da estrutura. Além disso, podem atuar atraindo os gametas para dentro da espermateca.

Além das células glandulares, fibras musculares também estão associadas ao ducto espermatecal e se dispõem ao longo do ducto espermatecal. É provável que tais fibras tenham um papel na entrada dos gametas no reservatório, já que existem evidências de que somente o movimento dos espermatozoides não é suficiente para o enchimento da estrutura (Jones & Wheeler, 1965b). Em *An. gambiae*, foi sugerido que a contração das fibras musculares do ducto, gera um ambiente com pressão negativa no ambiente espermatecal durante a cópula, deslocando os gametas para dentro do reservatório (Giglioli, 1963).

A espermateca em mosquitos é um órgão essencial para a reprodução, porém pouco estudado. Compreender a estrutura geral e organização celular desse órgão é

fundamental para o aprofundamento do conhecimento sobre reprodução em mosquitos, consequentemente servindo de base para futuros métodos de combate desses insetos importantes do ponto de vista médico.

Em *Lt. bigoti*, a espermateca apresenta uma estrutura muito parecida com a encontrada em outros Culicini, incluindo *Ae. aegypti* (Clements & Potter, 1967; Pascini *et al.*, 2012) e espécies do gênero *Toxorhynchites* (observação pessoal). Nessas espécies, a espermateca apresenta três reservatórios, delimitados por uma cutícula multilamelar, com células glandulares e epiteliais associadas de maneira similar. A semelhança na espermateca entre diferentes espécies de Culicinae indica uma alta conservação da estrutura ao longo da história evolutiva no grupo. Por outro lado, os mosquitos do gênero *Anopheles* possuem uma espermateca diferente em termos de número de reservatórios (um) e organização celular (Pascini *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2014). Tais diferenças encontradas podem ser um reflexo da distância evolutiva entre Anophelinae e Culicinae (Harbach, 2007).

6.2. Intestino médio

A ultraestrutura do intestino médio foi abordada em diferentes espécies de mosquitos. A maioria desses estudos foca em mudanças na estrutura geral do órgão e em modificações no citoplasma das suas células, antes e durante a digestão sanguínea (Bertram & Bird, 1961; Hecker *et al.*, 1974; Houk, 1977; Okuda *et al.*, 2002; Weaver & Scott, 1990). Porém, a ultraestrutura do intestino médio em mosquitos hematófagos adultos, cujas larvas apresentam habito predador não tem sido abordada.

É provável que as fêmeas de *Lt. bigoti* se alimentem do sangue de animais domésticos e aves, sendo mosquitos não antropofílicos (Bai *et al.*, 1982; Consoli & oliveira, 1994; Moser *et al.*, 2009). Porém, as informações sobre hematofagia nesses organismos não são conclusivas. Em laboratório, fêmeas adultas de *Lt. bigoti* não se alimentam de sangue humano, de galinha ou bovino, esse último utilizando alimentador artificial (observação pessoal). Dessa forma, compreender a estrutura do intestino médio e de suas células nessa espécie pode ajudar a elucidar a questão da hematofagia.

O intestino médio em *Lt. bigoti* apresenta duas porções distintas, o intestino médio anterior, fino e alongado, e o intestino médio posterior, mais curto e dilatado. Tal aspecto está de acordo com o descrito para diferentes espécies de mosquitos

hematófagos (Hecker, 1977; Janeh *et al.*, 2017), e distinto do descrito para o não hematófago *Toxorhynchites theobaldi*, onde a porção anterior pode ainda ser dividida em duas partes e a posterior é menor quanto comparada à das fêmeas de mosquitos hematófagos (Godoy *et al.*, 2015). A diferença de estrutura entre ambas as porções nos mosquitos hematófagos é provavelmente um reflexo de sua diferença de função, já que a parte anterior é responsável pela digestão de açúcares e a posterior é responsável também pela digestão do sangue (Hecker, 1977; Silva *et al.*, 2019). Por fim, o intestino médio em *Lt. bigoti* apresenta dimorfismo sexual, sendo a porção posterior menos desenvolvida nos machos em comparação com as fêmeas. Tal dimorfismo é esperado em espécies hematófagas, dado que apenas as fêmeas se alimentam do sangue (Corena *et al.*, 2005; Janeh *et al.*, 2017).

O lúmen do intestino médio em *Lt. bigoti* é estreito na porção anterior, onde as bordas estriadas de células digestivas opostas chegam a se tocar, e mais aberto na porção posterior. Nas fêmeas alimentadas com solução de sacarose, a presença de alimento foi raramente detectada no intestino médio anterior. Porém, os grânulos densos associados às microvilosidades, detectados por microscopia de transmissão, podem estar relacionados à matriz peritrófica. Diferentemente da porção anterior, foi possível observar o lúmen do intestino médio posterior repleto de alimento na maioria dos espécimes. O alimento quase nunca aparece tocando as células epiteliais.

Existem três tipos celulares no intestino médio dos mosquitos, as células digestivas, enteroendócrinas e regenerativas. As células digestivas são as mais numerosas, apresentando um formato que vai do cúbico ao colunar, com microvilosidades voltadas para a porção apical e dobramentos de membrana na porção basal, o labirinto basal (Brown *et al.*, 1985; Hecker, 1977). Todas essas características gerais das células digestivas se confirmam para *Lt. bigoti*. Além das células digestivas, foram identificadas diversas células basais nessa espécie, que correspondem a células enteroendócrinas ou regenerativas. As células basais apresentam um formato fusiforme, com um citoplasma aparentemente pobre em organelas. Foi demonstrado que as células enteroendócrinas em outras espécies de mosquitos apresentam uma abundância de grânulos elétrons densos em seu citoplasma, provavelmente repletos de hormônios (Brown *et al.*, 1985; Weaver & Scott, 1990). Nas células basais descritas em *Lt. bigoti*, tais grânulos são raramente encontrados, sendo suas características mais compatíveis com as das células regenerativas (Billingsley & Lehane, 1996).

O citoplasma das células digestivas em *Lt. bigoti* apresenta um grande número de mitocôndrias, que estão concentradas nas porções apical e basal. Essa distribuição está presente em diferentes espécies de mosquitos hematófagos, como *Ae. aegypti* (Bertram & Bird, 1961). Nessa espécie, foi sugerido que a presença de mitocôndrias abundantes seja explicada devido ao requerimento de energia para secreção, absorção e o tráfego de vesículas que ocorrem nesses locais (Bertram & Bird, 1961). Fêmeas de *An. aquasalis*, não alimentadas com sangue, além de adultos do mosquito não hematófago, *Tx. theobaldi*, também apresentam mitocôndrias concentradas na porção apical nas células digestivas de ambas as porções do intestino médio, semelhante ao visto nesse trabalho (Godoy *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019). A distribuição semelhante de mitocôndrias no citoplasma em fêmeas e machos de *Lt. bigoti*, aliado aos exemplos acima citados, mostram que esse padrão de mitocôndrias não está relacionado apenas à digestão sanguínea, sendo também importante na digestão de açúcares e outros processos. Porém, seria necessário desvendar como uma possível digestão sanguínea poderia afetar a distribuição e abundância de mitocôndrias no citoplasma em *Lt. bigoti*.

A presença do retículo endoplasmático rugoso indica uma necessidade de produção e secreção de proteínas pelas células digestivas (Billingsley, 1990). Essa organela apresenta um aspecto diferente quando comparadas as diferentes porções do intestino médio em fêmeas de *Lt. bigoti*, se apresentando como cisternas alongadas na porção anterior e lamelas concêntricas na posterior. As células digestivas da porção anterior do intestino médio em fêmeas de *Ae. aegypti*, não alimentadas com sangue, também apresentam cisternas isoladas, semelhante ao encontrado para *Lt. bigoti* (Hecker *et al.*, 1974). O padrão em lamelas concêntricas do retículo endoplasmático nas células digestivas do intestino médio posterior é comum nos mosquitos, sendo descrito em fêmeas não alimentadas com sangue em diferentes espécies hematófagas (Okuda *et al.*, 2005; Zieler *et al.*, 2000) e em mosquitos não hematófagos (Godoy *et al.*, 2015). Vesículas associadas ao retículo rugoso foram descritas em diferentes espécies de mosquitos, sendo provavelmente relacionadas à digestão sanguínea (Bertram & Bird, 1961; Houk, 1977; Staubli *et al.*, 1966). Em *Lt. bigoti*, tais vesículas não foram detectadas. Por fim, alguns pontos ainda precisam ser explorados em relação à essa organela em *Lt. bigoti*, como a função das proteínas secretadas, os efeitos da presença de açúcar no intestino médio sobre o retículo

endoplasmático e ainda as mudanças sofridas por essa organela em uma possível refeição sanguínea.

Na porção apical das células digestivas do intestino médio anterior de *Lt. bigoti*, foram observadas estruturas semelhantes a vesículas. A identidade e função dessas estruturas não é clara, mas se assemelham à vacúolos encontrados nessas mesmas células em fêmeas de *An. aquasalis* não alimentadas com sangue (Silva *et al.*, 2019) e também a corpos lamelares encontrados nas células digestivas de *Tx. theobaldi* (Godoy *et al.*, 2015). Tais estruturas podem estar relacionadas à secreção e absorção que ocorrem devido a digestão de açúcares no intestino médio anterior.

O comportamento alimentar dos adultos de *Lt. bigoti* ainda não foi elucidado, portanto, compreender a estrutura do intestino médio pode fornecer informações relevantes. Nessa espécie, a estrutura geral do intestino médio, sua composição e características celulares, e o dimorfismo sexual, que indica um hábito alimentar diferente em machos e fêmeas, estão de acordo com o já descrito para outras espécies de mosquitos hematófagos. Dessa forma, pode se observar uma conservação da estrutura ao longo da história evolutiva de Culicidae, sendo similar em diversas linhagens (Bertram & Bird, 1961; Houk, 1977; Janeh *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019), que se separaram em diferentes pontos do processo evolutivo (Harbach, 2007), com a exceção de mosquitos conhecidamente não hematófagos (Godoy *et al.*, 2015). O posicionamento filogenético de *Lutzia* em Culicidae (Kitching *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2019), bem como a morfologia de seu intestino médio descrita nesse trabalho, fornecem suporte para o hábito hematofágico. Dessa forma, é provável que as fêmeas de *Lt. bigoti* se alimentem de sangue. Por outro lado, diante do comportamento observado nesses insetos, surge o questionamento sobre a possibilidade da hematofagia ter sido perdida recentemente no processo evolutivo do grupo, sendo a fonte proteica necessária para o desenvolvimento reprodutivo das fêmeas oriunda do hábito predador na fase larval, como ocorre nos mosquitos não hematófagos (Donald *et al.*, 2020). Sendo assim, a análise da expressão gênica no intestino médio, bem como estudos sobre o comportamento são alternativas para desvendar a questão da hematofagia em *Lt. bigoti*.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espermateca em *Lt. bigoti* apresenta características que estão em acordo com o já descrito para diferentes espécies em Culicinae, mostrando uma alta conservação dessa estrutura ao longo do processo evolutivo do grupo. São necessários mais estudos voltados para elucidar melhor a fisiologia do órgão. Desse modo, serão ampliados os conhecimentos sobre reprodução em mosquitos.

A presença da alimentação sanguínea ainda não está completamente elucidada para o gênero *Lutzia*. Nesse trabalho, foi mostrado que a morfologia geral e ultraestrutura do intestino médio de *Lt. bigoti* está de acordo com aquela dos mosquitos hematófagos, também evidenciando uma alta conservação desse órgão ao longo do processo evolutivo em Culicidae. Porém, a escassez de informações concretas e o comportamento das fêmeas em laboratório levanta questionamentos. Dessa forma, estudos em biologia molecular e comportamento podem fornecer informações relevantes. Caso esses mosquitos não sejam hematófagos, podem ser poderosas ferramentas de controle biológico de larvas de mosquitos vetores.

8. REFERÊNCIAS

Abraham EG, Lorena MJ. 2004. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34, 667-671.

Ariani CV, Smith SCL, Poku JO, Short K, Juneja P, Jiggins FM. 2015. Environmental and genetic factors determine whether the mosquito *Aedes aegypti* lays eggs without a blood meal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 92(4), 715–721.

Ayers JB, Coatsworth HG, Kang S, Dinglassan RR, Zhou L. 2021. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. *Communications Biology*. 4,69. 9p.

Baer B, Eubel H, Taylor NL, O'Toole N, Millar AH. 2009. Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honey bee *Apis mellifera*. *Genome Biology*. 10, R67.

Bai MG, Viswam K, Paniker KN. 1982. *Culex (Lutzia) fuscans* (Diptera: Culicidae) – a predator mosquito. *Indian Journal of Medical Research*. 76, 837–839.

Bhatnagar RDS, Musgrave AJ. 1971. Aspects of histophysiology of the spermathecal gland of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera). *Canadian Journal of Zoology*. 49, 275–277.

Bauer P, Rudin W, Hecker H. 1977. Ultrastructural changes in midgut cells of female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) after starvation or sugar diet. *Cell Tissue Research*. 177, 215–219.

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control. 2ªEd. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 577p.

Bertram DS, Bird RG. 1961. Studies on mosquito borne viruses in their vectors: the normal fine structure of the midgut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L.)

and the functional significance of its modification following a blood meal. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 55(5), 404–423.

Bhatnagar RDS, Musgrave AJ. 1970. Aspects of histophysiology of the spermathecal gland of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera). Canadian Journal of Zoology. 49, 275–277.

Billingsley PF. 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annual Review of Entomology. 35, 219–248.

Billingsley PF, Lehane MJ. 1996. Chapman & Hall: Biology of the insect midgut. 486 p.

Bonizzoni M, Dunn WA, Campbell CL, Olson KE, Marinotti O, James AA. 2012. Complex modulation of the *Aedes aegypti* transcriptome in response to Dengue virus infection. Plos One. 7(11), 14p.

Bonizzoni M, Dunn WA, Campbell CL, Olson KE, Dimon MT, Marinotti O, James AA. 2011. RNA-seq analysis of blood induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. BMC Genomics. 12, 82. 13p.

Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. 1985. Ultrastructure of the midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. Tissue & Cell. 17(5), 709–721.

Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R. 2010. Epidemiology of west nile in Europe and in the mediterranean basin. The Open Virology Journal. 4, 29–37.

Chowdhury A, Modahl CM, Tan ST, Xiang BWW, Missé D, Vial T, Kini RM, Pompon JF. 2020. JNK pathway restricts DENV-2, ZIKV and CHIKV infection by activating complement and apoptosis in mosquito salivary glands. Plos Pathogens. 24p.

Clements AN. 1963. The physiology of mosquitoes. Pergamon Press. 393p.

Clements AN, Potter SA. 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 13, 1825–1836.

Coetzee M, Craig M, Sueur D. 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*. 16(2), 74–77.

Colmenares MK, Cardo MV, Vezzani D. 2022. Blood feeding habits of mosquitoes: hardly a bite in South America. *Parasitology Research*. 121, 1829–1852.

Consoli RAGB, Oliveira RL. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz. 228p.

Corena MDP, VanEkeris L, Salazar MI, Bowers D, Fiedler MM, Silverman D, Tu C, Linser PJ. 2005. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *Journal of Experimental Biology*. 208, 3263–3273.

Costa-Leonardo AM, Patrício GB. 2005. Structure of the spermatheca in five families of Isoptera. *Sociobiology*. 45, 659–670.

Cui Y, Franz AWE. 2020. Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to bloodmeal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 127.

Dallai R, Mercati D, Gottardo M, Dossey AT, Machida R, Mashimo Y, Beutel RG. 2012. The male and female reproductive systems of *Zorotypus rubbardi* Caudell, 1918 (Zoraptera). *Arthropod Structure and Development*. 41, 337–359.

Darsie RF. 1996. A survey and bibliography of the mosquito fauna of Mexico (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. 12(2), 298–306.

Davila F, Botteaux A, Bauman D, Chérasse S, Aron S. 2018. Antibacterial activity of male and female sperm-storage organs in ants. *Journal of Experimental Biology*. 221. 6p.

Degner EC, Harrington LC. 2016. A mosquito sperm's journey from male ejaculate to egg: mechanisms, molecules, and methods for exploration. *Molecular Reproduction and Development*. 83, 89–911.

Dehghan H, Kasemi SHM, Sadraei J, Soleimani H. 2014. The ecological aspects of *Culex pipiens* in central Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 8(1), 35–42.

Donald CL, Siriyasatien P, Kohl A. 2020. *Toxorhynchites* species: a review of the current knowledge. *Insects*. 11, 747. 17p.

Downes JA. 1968. Notes on the organs and processes of sperm transfer in the lower Diptera. *The Canadian Entomologist*. 100, 608–617.

Edwards FW. 1932. *Genera Insectorum*. Diptera, Fam. Culicidae. Fasc. 194. Brussels: Desmet-Verteneuil.

Fernandes KM, Neves CA, Serrão JE, Martins GF. 2014. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*. 63, 506–512.

Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*. 7, 3741–3767.

Fritz AH, Turner FR. 2002. A light and electron microscopical study of the spermathecae and ventral receptacle of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) and implications in female influence of sperm storage. *Arthropod Structure & Development*. 30(4), 293–313.

Giglioli MEC. 1963. The female reproductive system of *Anopheles gambiae* Melas. *Rivista di Malariologia*. 42, 149–176.

Godoy RSM, Barbosa RC, Huang W, Secundino NFC, Pimenta PFP, Lorena MJ, Martins GF. 2023. The larval midgut of *Anopheles*, *Aedes* and *Toxorhynchites*

mosquitoes (Diptera, Culicidae): a comparative approach in morphophysiology and evolution. Cell and Tissue Research. 24 p.

Godoy RSM, Barbosa RC, Procópio TF, Costa BA, Lorena MJ, Martins GF. 2021. FMRF-related peptides in *Aedes aegypti* midgut: neuromuscular connections and enteric nervous system. Cell and Tissue Research. 385(3), 585–602.

Godoy RSM, Fernandes KM, Martins GF. 2015. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera: Culicidae). Scientific Reports. 5, 15836. 16p.

Gotoh A, Shigenobu S, Yamaguchi K, Kobayashi S, Ito F, Tsugi K. 2017. Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens. Scientific Reports. 7, 5972. 14 p.

Grodner ML & Steffens WL. 1978. Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the female boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). Transactions of the American Microscopical Society. 97, 116–120.

Gschwentner R, Tadler A. 2000. Functional anatomy of the spermatheca and its duct in the seed bug *Lyganeus simulans* (Heteroptera: Lygaeidae). European Journal of Entomology. 97, 305–312.

Gullan PJ, Cranston PS. 2014. The insects: an outline of entomology. John Wiley & Sons. 5^aed. 562p.

Harbach R. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 1668, 591–638.

Harbach R. 2014. Mosquito taxonomic inventory. Disponível em: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6194>. Acesso em 7 de agosto de 2023.

Harbach RE, Kitching IJ, Culverwell CL, Dubois J, Linton YM. 2012. Phylogeny of mosquitoes of tribe Culicini (Diptera: Culicidae) based on morphological diversity. *Zoologica Scripta*. 16p.

Hecker H. 1977. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell Tissue Research*. 184, 321–341.

Hecker H, Brun R, Reinhardt C. 1974. Morphometric analysis of the midgut of female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta: Diptera) under various physiological conditions. *Cell Tissue Research*. 152, 31–49.

Houk EJ. 1977. Midgut ultrastructure of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) before and after a bloodmeal. *Tissue & Cell*. 9(1), 103–118.

Houk EJ, Hardy JL. 1981. Midgut cellular responses to bloodmeal digestion in the mosquito *Culex tarsalis* Coquillett (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology & Embriology*. 11(2), 109–119.

Jackson N. 1953. Observations on the feeding habits of a predacious mosquito larva, *Culex* (*Lutzia*) *tigripes* Grandpré and Charmony. (Diptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 28, 153–159.

Janeh M, Osman D, Kambris Z. 2017. Damage-induced cell regeneration in the midgut of *Aedes albopictus* mosquitoes. *Scientific Reports*. 7, 44594. 10p.

Jin L, Luo J, Fu Y, Xu S. 2006. Prey and feeding behavior of larval *Culex* (*Lutzia*) *fuscanus* (Diptera: Culicidae) in Shantou, Guangdong Province, China. *Journal of Medical Entomology*. 43(4), 785–786.

Jones AG, Ratterman NL. 2009. Mate choice and sexual selection: what have we learned since Darwin? *PNAS*. 106(1), 10001–10008.

Jones JC, Wheeler RE. 1965. Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). II. Experimental. Marine Biological Laboratory. Biological Bulletin. 129(3), 532–545.

Kitching IJ, Culverwell CL, Harbach RE. 2015. The phylogenetic conundrum of *Lutzia* (Diptera: Culicidae: Culicini): a cautionary account of conflict and support. Insects Systematics & Evolution. 46, 269–290.

Kotsakiozi P, Soria AG, Caccone A, Evans B, Schama S, Martins AJ, Powell JR. 2017. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of Dengue, Chikungunya and Zika viruses. Plos Neglected Tropical Diseases. 11(7), e0005653. 20 p.

LaJeunesse DR, Johnson B, Presnell JS, Catignas KK, Zapotoczny G. 2010. Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. BMC Physiology. 10(14). 14p.

Llango K. 2005. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotominae sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): II: Post copulatory histophysiological changes during the gonotrophic cycle. Journal of Biosciences. 30, 711–731.

Manier MK, Belote JM, Berben KS, Novikov D, Stuart WT, Pitnick S. 2010. Resolving mechanisms of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. Science 328, 354–357.

Martins GF, Zanuncio JC, Serrão JE. 2008. Spermatheca morphology of the social wasp *Polistes erythrocephalus*. Bulletin of Insectology. 61(1), 37–41.

Monteiro MF, Lisboa LCO, Costa TMC, Nevoa JC, Oliveira CJF, Serrão JE, Souza EA. 2008. Morphology of the spermatheca of *Triatoma lecticularia* (Hemiptera: Reduviidae) (Stal, 1859). Brazilian Journal of Biology. 79(1), 144–148.

Moser JB, Rivas JG, Guzmán H, Liria J. 2009. Primer registro para el estado bolívar de *Culex (Lutzia) bigoti* Bellardi, 1862 (Diptera: Culicidae). Boletín de Malariología y Salud Ambiental. XLIX, nº2.

Mullen GR, Durden LA. 2019. Medical and veterinary entomology. 3ed. Academic Press. 769p.

Muir LE, Kay BH. 1998. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 58, 277–282.

Nation JL. 2016. Insect physiology and biochemistry. Taylor & Francis Group. 3ª ed. 672p.

Ndiaye M, Mattei X, Thiaw OT. 1997. Maturation of mosquito spermatozoa during their transit throughout the male and female reproductive systems. Tissue & Cell. 29(6), 675–678.

Okorie PN, Souza DK. 2016. Prospects, drawbacks and future needs of xenomonitoring for the endpoint evaluation of lymphatic filariasis elimination programs in Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 110, 90–97.

Okuda K, Almeida F, Mortara RA, Krieger H, Marinotti O, Bijovsky AT. 2007. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Physiology 53, 1307–1315.

Okuda K, Caroci AS, Ribolla PEM, Bianchi AG, Bijovsky AT. 2002. Functional morphology of the adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. Tissue & Cell. 34(3), 210–219.

Okuda K, Caroci A, Ribolla P, Marinotti O, Bianchi AG, Bijovsky AT. 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *Journal of Insect Physiology*. 51, 769–776.

Oliva CF, Damiens D, Vreysen MJB, Lemperière G, Gilles J. 2013. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *Plos ONE*. 8(11), e78884. 11p.

Pascini TV, Martins GF. 2017. The insect spermatheca: an overview. *Zoology*. 121, 56–71.

Pascini TV, Ortigão JMR, Martins GF. 2012. Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 107(6), 705–712.

Pascini TV, Ortigão JMR, Martins GF. 2013. The fine structure of the spermathecae in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 106(6), 857–867.

Pascini TV, Ortigão JMR, Ribeiro JM, Lorena MJ, Martins GF. 2020. Transcriptional profiling and physiological roles of *Aedes aegypti* spermathecal-related genes. *BMC Genomics*. 21, 143. 18 p.

Pascoa V, Oliveira PL, Petretski MD, Silva JR, Alvarenga PH, Lorena MJ, Lemos FJA. 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32, 517–523.

Prokupek A, Hoffmann F, Eyun SI, Moriyama E, Zhou M, Harshman L. 2008. An evolutionary expressed sequence TAG analysis of *Drosophila* spermathecal genes. *Evolution*. 62(11), 2936–2947.

Rajasekaran PT, Chowdiah BW. 1972. Biological markers in feeding experiments of mosquito larvae (*Culex (Lutzia) raptor*). *Experimentia*. 28, 981–982.

- Rossi GC, Lestani EA, D'oria JM. 2006. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 65(3–4), 51–56.
- Ruckert C, Ebel GD. 2017. How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends Parasitology*. 34(4), 310–321.
- Rueffler C, Van Dooren TJM, Leimar L, Abrams PA. 2006. Disruptive selection and then what? *Trends in Ecology and Evolution*. 21(5), 238–245.
- Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS. 2003. Bloodmeal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33, 1105–1122.
- Schnakenberg SL, Matias WR, Siegal ML. 2011. Sperm-storage defects and life birth in *Drosophila* females lacking spermatheca secretory cells. *PLoS Biology*. 9(11).
- Shao L, Devenport M, Lorena MJ. 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 47, 119–125.
- Shaw WR, Teodori E, Mitchell SN, Baldini F, Gabrieli P, Rogers DW, Catteruccia F. 2014. Mating activates the heme peroxidase HPX15 in the sperm storage organ to ensure fertility in *Anopheles gambiae*. *PNAS*. 111(16), 5854–5859.
- Shoeters E, Billen J. 2000. The importance of the spermathecal duct in bumblebees. *Journal of Insect Physiology*. 46, 1303–1312.
- Silva DCB, Orfanó AS, Pimenta RN, Melo FF, Guerra MGVB, Lacerda MVG, Monteiro WM, Pimenta PFP. 2019. Microanatomy of the American malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) midgut: ultrastructural and histochemical observations. *Journal of Medical Entomology*. 56(6), 1636–1649.
- Sousa ARM, Júnior WC, Urbinatti PR, Natal D, Carvalho GC, Paula MB, Fernandes A, Mello MSH, Oliveira RC, Orico LD, Gonçalves EFB, Marrelli MT. 2013.

Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I. Biota Neotropica. 13(1), 317–321.

Simpson SL, Douglas AE. 2013. The insects: structure and function. Cambridge University Press. 5^a ed. 929p.

Sinka ME, Palis YR, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Boeckel TV, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI. 2010. The dominant *Anopheles* vector of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasites & Vectors. 3, 72. 26p.

Snodgrass RE. 1935. Principles of insect morphology. 1^oed. 676p.

Staubli W, Freyvogel TA, Suter J. 1966. Structural modification of the endoplasmic reticulum of the midgut epithelial cells of mosquitoes in relation to blood intake. Journal Microscopie. 5, 189–204.

Steffan WA, Evenhuis NL. 1981. Biology of *Toxorhynchites*. Annual Review of Entomology. 26, 159–181.

Stohler HR. 1961. The peritrophic membrane of blood sucking Diptera in relation to their role as vectors of blood parasites. Acta Tropica. XVIII. 3, 263–266.

Strickman D, Fonseca DM. 2012. Autogeny in *Culex pipiens* complex mosquitoes from the San Francisco bay area. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 87(4), 719–726.

Sun L, Li TJ, Fu WB, Yan ZT, Si FL, Zhang YJ, Mao QM, Silva BD, Chen B. 2019. The complete mt genomes of *Lutzia halifaxia*, *Lt. fuscus* and *Culex pallidotorax* (Diptera: Culicidae) and comparative analysis of 16 *Culex* and *Lutzia* mt genome sequences. Parasites & Vectors. 12, 368. 13p.

Tanaka K. 2003. Studies on the pupal mosquitoes of Japan genus *Lutzia*, with establishment of two new subgenera: *Metalutzia* and *Insulalutzia* (Diptera: Culicidae). Japanese Journal of Systematic Entomology. 9, 159–169.

Theobald FV. 1903. A monograph of Culicidae or mosquitoes. London: British Museum (Natural History).

Tolle MA. 2009. Mosquito-borne diseases. Current problems in pediatric and adolescent health care. 39, 97–140.

Tombes AS, Roppel RM. 1972. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Insect Morphology & Embryology. 1(2), 141–152.

Vaidyanathan R, Scott TW. 2006. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. Apoptosis. 11, 1643-1651.

Verma LR. 1972. An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee (*Apis mellifera* L.). Comparative Biochemistry and Physiology. 44A, 1325–1331.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Christophides GK, Kafatos FC. 2005. Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. Current Biology. 15, 1185-1195.

Weaver SC, Scott TW. 1990. Ultrastructural changes in the abdominal midgut of the mosquito *Culiseta melanura*, during the gonotrophic cycle. Tissue & Cell. 22, 895–909.

Weirich GF, Collins AM, Williams VP. 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie. 33, 3–14.

Wheeler DE, Kruttsch PH. 1994. Ultrastructure of the spermatheca and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera, Formicidae). Zoomorphology. 114, 203–212.

Whiten SR, Ray WK, Helm RF, Adelman ZN. 2018. Characterization of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. PLoS ONE 13(3), e0194734. 17 p.

Wolfner MF. 2011. Precious essences: female secretions promote sperm storage in *Drosophila*. PLOS Biology. 9(11). 4p.

Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M. 2000. A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. The Journal of Experimental Biology. 203, 1599–1611.