

RAQUEL SOARES MAIA GODOY

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DO INTESTINO MÉDIO DE
MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE)**

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

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G589m Godoy, Raquel Soares Maia, 1988-
2019 Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de
mosquitos (Diptera, Culicidae) / Raquel Soares Maia Godoy. –
Viçosa, MG, 2019.
143f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Intestinos. 2. Mosquitos. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 595.772

RAQUEL SOARES MAIA GODOY

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DO INTESTINO MÉDIO DE
MOSQUITOS (DIPTERA, CULICIDAE)**

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

APROVADA: 5 de agosto de 2019.

Raquel Soares Maia Godoy
Autora

Gustavo Ferreira Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas:

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), instituição pela qual tenho um orgulho imensurável. Foi aqui que me formei na graduação, e obtive meus títulos de mestrado e doutorado. Passei por muitos momentos bons e ruins, mas hoje vejo que até os ruins foram bons, pois serviram de aprendizado. Posso dizer que aqui eu aprendi coisas que vão muito além do quesito acadêmico. Eu aprendi a viver, a entender as diferenças, a quebrar preconceitos que na verdade nunca foram meus. Eu aprendi a ser EU, Raquel, com meus próprios ideais, pensamentos e opiniões. Durante toda essa minha longa trajetória na UFV, tive oportunidade de conviver com pessoas de todas as classes sociais e de diferentes origens, crenças e orientação sexual. Digo que essa convivência me fez evoluir muito e que hoje sou uma pessoa muito melhor do aquela que entrou aqui no primeiro período da graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, onde tive oportunidade de aperfeiçoar meu aprendizado da graduação, além de ter tido acesso a diversas técnicas de microscopia, área que sempre foi minha maior paixão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 001; PVE 88881.030429/2013–01), pelo apoio financeiro ao meu projeto de pesquisa durante seis anos de pós-graduação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM), onde passei grande parte do tempo durante a análise das amostras, e aprendi a operar vários equipamentos, os quais foram importantes no desenvolvimento da minha pesquisa e das minhas habilidades com a microscopia.

Ao Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (JHSPH), por ter aceitado minha permanência durante 7 meses. Tive a experiência de conhecer outro país e conviver com pessoas de diversas nacionalidades, além de ter tido a oportunidade de aprender várias técnicas de biologia molecular. Essa experiência foi muito valiosa para minha formação.

Ao Professor Orientador Gustavo Ferreira Martins, por essa longa parceria desde o início do mestrado. Confesso que nunca imaginei que teria tanta liberdade para pensar e trabalhar como a que você me deu. Isso foi sensacional. Agradeço imensamente por tudo, pelos inúmeros conselhos, dicas, e principalmente pela confiança. Muito obrigada!

Ao Pesquisador Orientador Marcelo Jacobs-Lorena, pela convivência amigável durante sete meses, pelo auxílio durante a elaboração do meu projeto de doutorado e orientações durante a execução dos experimentos de biologia molecular.

À minha melhor amiga e colega de trabalho Renata Cristina Barbosa, pela convivência durante todos esses anos. Saiba que você é uma pessoa admirável, e que eu torço para que toda a sua bondade em relação às pessoas seja revertida a você em dobro. Você me provou que existe amizade de verdade nesse mundo, sem interesses, somente amizade. A sua companhia me deu forças para lidar com diversos momentos difíceis da minha vida. Digo que te considero uma irmã pra mim. Obrigada por tudo!

À minha família, especialmente minha mãe, Luciana, meu pai, Cláudio, e minha irmã Júlia, pois seu apoio foi muito importante para mim durante todos esses anos de doutorado, incluindo nos difíceis momentos finais.

À minha bisavó Elisa Soares Maia, pessoa que hoje me traz forças do além todas as vezes que penso em desistir ao encontrar dificuldades pelo caminho. Vó, saiba que eu faço de tudo para que você, de onde quer que esteja, sinta orgulho da minha trajetória.

A todos os funcionários do NMM, pela excelente convivência, auxílio e acolhimento. Serei eternamente grata a todos vocês.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração da minha tese, mesmo os que somente torceram para que tudo desse certo. Muito obrigada!

RESUMO

GODOY, Raquel Soares Maia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de mosquitos (Diptera, Culicidae).** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O intestino médio das fêmeas de mosquitos vetores é alvo de muitos estudos por ser a porta de entrada para diversos patógenos transmissíveis a vertebrados, incluindo humanos. No entanto, o conhecimento do órgão nas fases imaturas desses insetos é escasso, principalmente em relação à sua morfologia. Com o objetivo de entender a morfofisiologia do intestino médio de mosquitos e os processos envolvidos no desenvolvimento do órgão durante a metamorfose, foram utilizadas neste trabalho três espécies de mosquitos de gêneros diferentes, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi*. A fase larval das três espécies compartilha características morfológicas básicas do órgão, mas apresenta algumas particularidades. A histoquímica do intestino médio larval de *An. gambiae* indicou a existência de um metabolismo de lipídeos e carboidratos diferente daquele de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, e o compartimento do ceco gástrico foi o que mais variou entre as três espécies. A matriz peritrófica foi morfológicamente similar nas três espécies, e os processos envolvidos no desenvolvimento pós-embrionário do órgão, como diferenciação celular, proliferação e apoptose, também foram semelhantes. A presença de células enteroendócrinas FMRF-positivas no intestino médio posterior parece ser conservada em mosquitos. Durante a transição entre larva e pupa, foi visto que as fibras dos músculos circulares sofrem mitose, e uma nova camada de músculo circular aparece, evento que ocorreu concomitante com a presença de neuritos FMRF-positivos de posição específica e repetitiva nos músculos circulares. Isso indica que neuropeptídeos FMRF estão envolvidos no remodelamento muscular do órgão, o qual se iniciou antes da pupação. O epitélio digestivo larval foi completamente substituído por um novo durante o início da fase da pupa em um processo que envolve autofagia e apoptose. Esse novo epitélio apresentou células enteroendócrinas diferenciadas nessa fase. Antes da metade do tempo de duração da metamorfose houve um segundo descarte epitelial, e o epitélio digestivo íntegro visto nessa fase ainda não tinha completado seu processo de diferenciação, e correspondeu ao do adulto. Por fim, na fase final do estágio de pupa, o epitélio digestivo sofreu alterações no seu formato, processo que envolveu autofagia e apoptose de algumas células, além de proliferação celular.

Palavras-chave: Intestino médio. Desenvolvimento. Mosquitos

ABSTRACT

GODOY, Raquel Soares Maia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Post-embryonic development of mosquito midgut (Diptera, Culicidae)**. Advisor: Gustavo Ferreira Martins.

The midgut of females of vector mosquitos is a well known organ and comprises the gateway to several pathogens humans and other vertebrates. However, the knowledge of this organ in the immature stages in these insects is scarce, especially about its morphology. In the present work, the morphophysiology and the development of the midgut during larval and pupal stages were studied in three phylogenetically distant species, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Toxorhynchites theobaldi*. The larval midgut of the three mosquito species shared basic morphological characteristics, but has some peculiarities depending on the species. The histochemical analysis of the larval midgut indicated a different lipid and carbohydrate metabolism in *Ae. aegypti* and *T. theobaldi* and the gastric caecum was the most morphologically varied compartment between species. The peritrophic matrix was similar in three species, and the processes involved in post-embryonic organ development, such as cell differentiation, proliferation, and apoptosis, were also like. The presence of FMRF-positive enteroendocrine cells in the larval midgut appears to be conserved in mosquitoes. During the transition between larvae and pupae, circular muscle fibers were seen to undergo mitosis, and a new circular muscle layer appeared, occurring concurrently with the presence of FMRF-positive neurites disposed of in a specific and repetitive manner in the circular muscles. This organization indicated that FMRF neuropeptides are involved in muscle remodeling, which begins before pupation. The larval digestive epithelium was totally replaced by a new one at the beginning of the pupal phase in a process that involves autophagy and apoptosis. This new epithelium already presented differentiated enteroendocrine cells in this phase. At the time before the mid of metamorphosis, there was a probable second epithelial histolysis, and the intact epithelium seen in this period had not yet completed its differentiation process and corresponded to the epithelium that remains in the adult. Finally, at the end of the pupal stage, the digestive epithelium changed its shape, a process that involved autophagy and apoptosis of some cells, as well as cell proliferation.

Keywords: Midgut. Development. Mosquitoes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1. CULICIDAE.....	8
1.2. ANOPHELINEAE	11
1.3. CULICINAE.....	12
1.3.1. <i>Aedes</i>	13
1.3.2. <i>Toxorhynchites</i>	13
1.4. O INTESTINO MÉDIO DOS MOSQUITOS.....	15
1.5. CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS.....	16
1.6. CÉLULAS REGENERATIVAS	17
1.7. MODIFICAÇÕES DO INTESTINO MÉDIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO	18
2. REFERÊNCIAS	19
3. CAPÍTULO 1	24
4. CAPÍTULO 2	84
5. CAPÍTULO 3	125
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	143

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os mosquitos pertencem à família Culicidae (Insecta, Diptera) e são conhecidos por serem vetores de diversas doenças transmissíveis a vertebrados, as quais podem ser causadas por diferentes patógenos, incluindo vírus, protozoários ou helmintos (CIRIMOTICH *et al.*, 2011; GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; NARAYANAN KUTTY *et al.*, 2018; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; SABATINELLI *et al.*, 1994). A primeira barreira no inseto que os patógenos precisam atravessar para prosseguir com a invasão e se tornarem aptos a infectar o hospedeiro vertebrado é o intestino médio (HEGEDUS *et al.*, 2009; OLMO *et al.*, 2018; UKEGBU *et al.*, 2017; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Apesar de sua importância para o estabelecimento e a colonização do mosquito pelos parasitos, o intestino médio é um órgão que ainda apresenta lacunas na compreensão de sua biologia básica, inclusive no que diz respeito a sua formação durante o desenvolvimento pós-embriônico, metamorfose, e ao seu dinamismo e comportamento celular durante cada estágio até a fase adulta.

O conhecimento detalhado do processo de formação do intestino médio em diferentes gêneros de mosquitos informará se o desenvolvimento do órgão é conservado em Culicidae, apesar das diferenças evolutivas. Tal conhecimento dará suporte a diversos trabalhos, incluindo os da área de toxicologia que utilizam inseticidas nocivos ao intestino médio. Além disso, a descrição da dinâmica celular responsável pela formação do órgão do adulto fundamentará trabalhos que envolvem interação mosquito-vetor-parasita.

1.1. CULICIDAE

A família Culicidae é um táxon monofilético que engloba todas as espécies de mosquitos (NARAYANAN KUTTY *et al.*, 2018). Estes, quando adultos, possuem corpo tubular delgado, um típico aparelho bucal sugador alongado, um par de asas membranosas e três pares de longas pernas (HARBACH; KITCHING, 1998). Culicidae inclui atualmente 3.543 espécies catalogadas, que estão agrupadas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (HARBACH R, 2007; REIDENBACH *et al.*, 2009).

Culicídeos são holometábolos (metamorfose completa), pois possuem distintos estágios de desenvolvimento, com seu ciclo de vida incluindo as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os estágios imaturos são encontrados em um amplo espectro de ambientes aquáticos, incluindo corpos d'água temporários e permanentes, enquanto o estágio adulto é terrestre (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; HARBACH R, 2007).

A fase larval dos mosquitos compreende quatro instares (L1-L4) antes da pupação. As larvas L1 de todas as espécies são essencialmente filtradoras, com alimentação composta principalmente de microrganismos. Larvas dos demais estágios são majoritariamente detritívoras, alimentando-se de detritos presentes na água e insetos aquáticos mortos (WIEGMANN *et al.*, 2009). Em um pequeno número de espécies, como *Culex bigoti* e as do gênero *Toxorhynchites*, as L2-L4 são predadoras de pequenos invertebrados aquáticos, incluindo larvas de outros mosquitos (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; STEFFAN; EVENHUIS, 1981).

As larvas de culicídeos são ápodas e possuem corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça apresenta antenas e escovas com filamentos que auxiliam na alimentação. Larvas de espécies da subfamília Culicinae apresentam um sifão respiratório próximo à extremidade final do abdome, enquanto as da subfamília Anophelinae possuem um par de aberturas respiratórias nessa região e sifão ausente. As pupas são ápodas como as larvas, e possuem corpo em formato de vírgula, dividido em cefalotórax e abdome. No estágio adulto, o corpo é formado por cabeça, tórax e abdome. Asas e pernas surgem apenas nesse estágio, e estão conectadas ao tórax. A cabeça contém uma probóscide longa e flexível, adaptada para perfurar e sugar, e antenas com extensos flagelos (CLEMETS, 1992; GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; HARBACH R, 2007).

Larvas L4 sofrem metamorfose e se transformam em pupas, as quais não se alimentam. Durante a fase de pupa, ocorre acúmulo de ar no interior do corpo do inseto, evento que antecede a emergência do mosquito adulto. Este permanece em repouso sobre a exúvia na superfície da água até que ocorra endurecimento e escurecimento do tegumento (STEFFAN; EVENHUIS, 1981; WIEGMANN *et al.*, 2009).

Machos e fêmeas adultos de Culicidae são em geral morfológicamente distintos, principalmente quanto às antenas, peças bucais e genitália. As diferenças são mais visíveis em relação à morfologia das antenas e do aparelho bucal. Fêmeas possuem antenas pilosas, estruturas de perfuração no aparelho bucal e são geralmente mais robustas que os machos, os quais, por sua vez, têm antenas plumosas e não apresentam probóscide com peças perfurantes (HARBACH R, 2007; SIMPSON; CHAPMAN, 2012).

Todos os mosquitos adultos machos se alimentam exclusivamente de líquidos de plantas, como néctar, conteúdo de frutas e exsudatos. Com exceção dos gêneros *Toxorhynchites*, *Malaya* e *Topomya*, as fêmeas adultas também se alimentam de sangue de animais vivos, o que faz dos mosquitos um excelente veículo para transmissão de patógenos,

exibindo uma grande importância médica (HARBACH R, 2007). As principais doenças transmitidas por mosquitos vetores são dengue, febre amarela, encefalite viral, malária e filariose (A. FOSTER; WALKER, 2002; EL-BAHNASAWY; FADIL; MORSY, 2013; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016).

O sangue ingerido pelas fêmeas contém nutrientes necessários para o desenvolvimento dos ovos. As espécies cujas fêmeas são hematófagas podem ser classificadas como autógenas ou anautógenas de acordo com a dependência dos nutrientes do sangue para desenvolver os ovos. Nas espécies autógenas, as fêmeas produzem um lote de ovo após a emergência do estágio adulto, mas refeições de sangue são requeridas para a produção dos lotes posteriores. As espécies anautógenas não são capazes de produzir nenhum lote de ovo sem repasto sanguíneo (CLEMENTS, 1992; TOWNSON, 1993).

A hematofagia está associada a diversas características comportamentais, anatômicas e fisiológicas dos mosquitos (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; WU; ZHANG, 2011). Entre elas, podemos citar mandíbulas modificadas para facilitar o acesso ao sangue; glândulas salivares produtoras de moléculas anti-hemostasia; intestino médio com capacidade de neutralizar ou resistir a reações imunológicas mediadas pelo sangue e otimizar a digestão dos componentes sanguíneos (CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012; SIMPSON; CHAPMAN, 2012). No entanto, não se sabe se as fêmeas dos três gêneros que não apresentam hematofagia compartilham alguma(s) dessas características.

Nas espécies que apresentam hematofagia, o sangue ingerido pelas fêmeas é estocado e digerido no intestino médio (GAIO *et al.*, 2011; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). É nesse estágio que os parasitos presentes no sangue se instalam no mosquito ao atravessarem o epitélio intestinal e serem levados pela hemolinfa até as glândulas salivares, onde permanecerão até serem transmitidos para um novo hospedeiro durante a próxima picada (GAIO *et al.*, 2011; THAYER; TERZIAN; PRICE, 1971).

Apesar de sua importância para a colonização de parasitos no mosquito, o intestino médio é um órgão cuja biologia básica ainda não foi completamente entendida. A maioria das pesquisas envolvendo o órgão em mosquitos coloca em foco detalhes específicos de interação do parasito com os enterócitos (TARACENA *et al.*, 2018; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014), tipo celular mais abundante no epitélio intestinal (CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012). Informações básicas, como a dinâmica da formação do intestino médio desde a fase larval até adulta, a interação entre os tipos celulares que formam o epitélio em cada um desses estágios, permanecem a serem esclarecidas.

O presente estudo foi realizado com um representante anofelino (Subfamília Anophelinae), *Anopheles gambiae*; e dois representantes culicíneos (Subfamília Culicinae), *Aedes aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi*. Como visto anteriormente, os estágios do ciclo de vida de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* possuem dietas similares, com larvas detritívoras e fêmeas adultas hematófagas, enquanto *T. theobaldi* apresenta larvas predadoras e adultos exclusivamente fitófagos/nectarívoros. Dessa forma, com o objetivo de investigar se há diferenças no padrão de desenvolvimento do intestino médio entre as três espécies e/ou se a dieta é um fator que influencia nesse processo, foi feita uma análise morfológica comparativa do órgão durante os estágios larval e pupal desses mosquitos.

1.2. ANOPHELINAE

A subfamília Anophelinae (488 espécies reconhecidas atualmente) é uma linhagem monofilética basal em relação a todos os outros Culicidae, e inclui os gêneros *Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*. Esses dois últimos gêneros não possuem importância médica e apresentam um pequeno número de espécies em relação ao *Anopheles*, o qual representa a maioria das espécies de anofelinos. *Anopheles* contém diversas espécies que transmitem parasitas causadores de malária a humanos e outros animais, além de um pequeno número de espécies transmissoras de microfilárias e arbovírus (HARBACH, 2013).

As espécies de *Anopheles*, quando em estágio adulto, são facilmente reconhecíveis por apresentarem um corpo inclinado em ângulo de 30/45° quando em posição de pouso. As fêmeas depositam seus ovos um a um na superfície da água, os quais possuem flutuadores, permitindo que eles permaneçam na superfície. As larvas respiram através do tegumento, e não possuem sifão respiratório, e as pupas possuem trompas respiratórias de aberturas amplas apicalmente (SERVICE, 2012).

O *An. gambiae* é o principal vetor de malária humana na África, onde a doença é estimada causar mais de um milhão de mortes por ano (BASS *et al.*, 2007; COLLINS, F H; PASKEWITZ, 1996; SHIDRAWI, 1969; TUNO *et al.*, 2010). Por esse motivo, a espécie foi escolhida neste estudo como representante do gênero. *An. gambiae* é membro de um complexo que inclui pelo menos sete espécies morfológicamente indistinguíveis pertencentes ao subgênero *Cellia* (BASS *et al.*, 2007).

A distribuição geográfica de *An. gambiae* é praticamente restrita ao continente Africano, especificamente na região subsaariana (EL-BAHNASAWY; FADIL; MORSY, 2013; LEVINE; PETERSON; BENEDICT, 2004; TUNO *et al.*, 2010). Suas fases imaturas habitam corpos temporários de água doce, como depressões, poças e cascas de árvores. Essa

característica permite evitar predadores, uma vez que as larvas são capazes de se desenvolver rapidamente (cerca de seis dias de ovo para adulto em condições ótimas), possivelmente em resposta à efemeridade desses criatórios (AGYAPONG *et al.*, 2014; EL-BAHNASAWY; FADIL; MORSY, 2013; WILDLING *et al.*, 1995).

As fêmeas adultas de *An. gambiae* tem preferência pelo hospedeiro humano para realizar o repasto sanguíneo. No entanto, existem indicações de que a espécie pode ser oportunista na seleção do hospedeiro, sendo influenciada pela disponibilidade do mesmo. As fêmeas comumente entram nas residências para picar ao pôr-do-sol, com pico dessa atividade ao amanhecer (TUNO *et al.*, 2010; WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH, 2016).

O patógeno causador de malária humana mais comum no continente africano é o protozoário *Plasmodium falciparum*, conhecido por desenvolver a pior forma da doença (TWOHIG *et al.*, 2019; SNOW *et al.*, 2017) (Nchinda, 1998). A transmissão do *Plasmodium* pelo mosquito vetor se dá pela hematofagia (TWOHIG *et al.*, 2019; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Dentro de 24 hs após o mosquito picar e ingerir o sangue com o parasito, a fase evolutiva do *Plasmodium* denominada gametócito sofre fertilização e se desenvolve em oocinetos móveis, que invadem e atravessam o epitélio do intestino médio para alcançar a lâmina basal, onde se transformam em oocistos (VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). O *Plasmodium* encontra vários obstáculos no interior do mosquito para prosseguir com seu ciclo. Uma das principais barreiras é o epitélio do intestino médio, dentro do qual o parasita é atacado pelo sistema imune do mosquito (OSTA *et al.*, 2004; UKEGBU *et al.*, 2017; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). O *Plasmodium* em estágio de esporozoíto atinge a glândula salivar entre 8-10 dias após o repasto sanguíneo, e sua transmissão a um novo hospedeiro ocorre após invasão da saliva. Os parasitos presentes na saliva penetram nos vasos sanguíneos do hospedeiro durante um novo repasto, completando seu ciclo no mosquito (TWOHIG *et al.*, 2019; VEGA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

1.3. CULICINAE

Ae. aegypti e *T. theobaldi* pertencem à subfamília Culicinae e possuem maior grau de parentesco em relação à *An. gambiae*. Culicinae é a maior subfamília do táxon Culicidae, compreendendo cerca de 3077 espécies.

1.3.1. AEADES

Atualmente são conhecidas 15 espécies de *Aedes*. Os adultos desse gênero possuem corpo mais ou menos paralelo em relação à superfície quando em posição de pouso. As fêmeas depositam seus ovos em superfícies úmidas próximas a corpos d'água, e esses ovos não possuem flutuadores, como visto para anofelinos. Assim que são submersos, ocorre sua eclosão. Larvas de *Aedes* possuem sifão respiratório e as pupas possuem trompas respiratórias com aberturas delgadas.

O *Ae. aegypti* é o principal vetor de arbovírus para o homem (GOMES, 1998; NENE *et al.*, 2007), sendo o transmissor mais importante dos vírus Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), causando sérios problemas de saúde pública no Brasil, em outros países da América do Sul e no continente africano, com recorrentes surtos epidêmicos ocorrendo principalmente durante os períodos mais quentes e chuvosos (CALVEZ *et al.*, 2016; CARNEIRO; TRAVASSOS, 2016; OLMO *et al.*, 2018). Devido à sua importância, o *Ae. aegypti* foi utilizado neste estudo como representante do gênero. A espécie é originária da África, de onde foi transportada passivamente pelo homem aos distintos continentes, respeitando os limites geográficos impostos pela baixa temperatura. Hoje, sua distribuição é global (EL-BAHNASAWY; FADIL; MORSY, 2013; GOMES, 1998).

As fêmeas de *Ae. aegypti* picam geralmente durante o dia, mas podem também picar à noite (CHRISTOPHER, 1960). Após picar e ingerir o sangue de uma pessoa infectada, o *Ae. aegypti* adquire o vírus contido no sangue. No intestino médio, o vírus infecta as células epiteliais, onde sofre intensa replicação (ROMOSER *et al.*, 2004; SALAZAR *et al.*, 2007). A microbiota presente no intestino e o sistema imune do mosquito agem juntos nessa etapa na tentativa de restringir a infecção. O intestino médio do mosquito constitui, dessa forma, o sítio de entrada de arbovírus e a primeira barreira à disseminação viral subsequente (CIRIMOTICH *et al.*, 2011; SALAZAR *et al.*, 2007; TARACENA *et al.*, 2018).

1.3.2. TOXORHYNCHITES

O mosquito *T. theobaldi*, ao contrário de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, não é vetor de doenças. Devido à escassez de informações voltadas para culicídeos não-vetores, como os do gênero *Toxorhynchites*, sua classificação taxonômica acabou passando por diversas mudanças assim que novos estudos foram sendo realizados (HARBACH R, 2007; REIDENBACH *et al.*, 2009).

Toxorhynchites é encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Os principais ecossistemas que eles ocupam são as florestas (SCHREIBER, 2007; STEFFAN;

EVENHUIS, 1981). Suas larvas geralmente habitam corpos d'água em buracos de árvores e bambus, bainhas de folhas, fendas de rochas e recipientes artificiais (SCHREIBER, 2007).

Os mosquitos *Toxorhynchites* são os maiores já identificados, e por isso recebem a denominação de “mosquitos elefantes”. As larvas predadoras são grandes e apresentam cores que variam entre a rosa, vermelha e roxa, o que as torna de fácil identificação. Os adultos são facilmente reconhecidos pelo grande tamanho e pela peculiar probóscide dobrada. O corpo é coberto por escamas de cores vivas e os segmentos abdominais posteriores possuem tufo de escamas laterais (HARBACH, 2013).

Os ovos de *Toxorhynchites* são ovais; brancos ou amarelos; e encontram-se flutuando na superfície da água ou logo abaixo desta. O período de incubação do ovo variar de acordo com a temperatura, compreendendo geralmente de 40 a 60 horas. A viabilidade do ovo é de 57-100%, e diminui com a idade da fêmea em algumas espécies. O tempo da fase larval depende da espécie, temperatura e disponibilidade de alimento. O período pupal ocorre entre 3-12 dias e depende principalmente da temperatura (STEFFAN; EVENHUIS, 1981).

Diferentemente das larvas da maioria dos outros mosquitos, que são tipicamente detritívoras, as larvas de *Toxorhynchites* são predadoras e possuem aparelho bucal mastigador, especializado na captura de presas (WRBU, 2019). Sua estratégia de predação é de senta-e-espera. Cerdas presentes no corpo larval auxiliam na detecção de movimentos na água, os quais funcionam como sinais de aviso de quando o alvo se aproxima. As presas são pequenos invertebrados aquáticos, principalmente larvas de outros mosquitos (COLLINS, LARISSA E; BLACKWELL, 2000; STEFFAN; EVENHUIS, 1981).

Por serem predadoras, larvas de *Toxorhynchites* são passíveis de utilização em estudos de controle biológico de larvas de culicídeos de importância médica, já que ambas compartilham os mesmos tipos de criadouros. No entanto, o uso de *Toxorhynchites* como agente de controle biológico exige um vasto conhecimento a respeito de sua biologia, principalmente no tocante à alimentação e reprodução (COLLINS, LARISSA E; BLACKWELL, 2000; HARBACH, 2013; STEFFAN; EVENHUIS, 1981).

Outra característica marcante de *Toxorhynchites* relacionada à alimentação é a ausência do comportamento de hematofagia nas fêmeas adultas (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; SCHREIBER, 2007) (WRBU, 2019). Nesse caso, a maturação dos ovários não depende de repasto sanguíneo, e, na fase adulta, tanto o macho quanto a fêmea de *Toxorhynchites* se alimentam exclusivamente de néctar e de outras substâncias açucaradas (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011; STEFFAN; EVENHUIS, 1981) (WRBU, 2019).

Como o gênero não está incluído na lista de “espécies-praga”, e não é vetor de patógenos, tanto em animais quanto em plantas, a biologia geral e a posição filogenética de *Toxorhynchites* têm sido negligenciadas. Exceções foram algumas descrições de aspectos particulares da biologia de algumas espécies, somado a um pequeno número de estudos filogenéticos (COLLINS, LARISSA E; BLACKWELL, 2000; GODOY; FERNANDES; MARTINS, 2015; ZHOU *et al.*, 2014). Portanto, é de grande importância a investigação da morfologia e fisiologia do órgão digestivo de *Toxorhynchites*, a fim de revelar que tipos de modificações relacionadas com a dieta podem ter ocorrido durante sua evolução, em todas as suas fases de desenvolvimento. Dessa forma, *T. theobaldi* foi utilizado neste estudo como representante do gênero.

1.4. O INTESTINO MÉDIO DOS MOSQUITOS

O intestino médio dos mosquitos é constituído de um tubo formado por um epitélio simples, responsável pela síntese de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos; e duas camadas de tecido muscular, com funções de peristaltismo e suporte ao órgão. As células mais abundantes do epitélio intestinal são as digestivas, também chamadas de enterócitos. Essas são prismáticas e apresentam microvilosidades em sua porção apical, enquanto na região basolateral, se observam inúmeras invaginações de membrana, que constituem o labirinto. Além das células digestivas, o epitélio do intestino médio é composto de mais dois tipos celulares, as células regenerativas e enteroendócrinas (BILLINGSLEY, P., 1990; BROWN; RAIKHEL; LEA, 1985; CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012), que serão descritas adiante.

O intestino médio do estágio larval dos mosquitos é composto por uma região inicial contendo projeções em forma de sacos denominada ceco gástrico, e um tubo ou ventrículo que compreende quase toda a extensão do órgão. O ventrículo, por sua vez, é subdividido em duas regiões morfológicamente distintas: intestino médio anterior e intestino médio posterior (CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012). Durante o período de pupa, o intestino médio não possui um formato definido, pois sofre uma transição da fase larval para o seu formato final no mosquito adulto (FERNANDES *et al.*, 2014).

Nos mosquitos adultos, o intestino médio não possui ceco gástrico, e o tubo ou ventrículo também se subdivide em regiões anatomicamente distintas: a região anterior, delgada e diametralmente homogênea; e a posterior, dilatada e de formato elíptico. Nas fêmeas adultas hematófagas, a região posterior é volumosa e forma um saco expansível, que participa ativamente do armazenamento e da digestão de sangue (BILLINGSLEY, P., 1990;

CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012). Nos mosquitos adultos de *Toxorhynchites theobaldi* não-hematófagos, o intestino médio, tanto das fêmeas quanto dos machos, é subdividido em três regiões ao invés de duas: o intestino médio anterior 1 (IMA1), curto, dilatado e com pregas; o intestino médio anterior 2 (IMA2), longo e delgado; e o intestino médio posterior (IMP), porção mais dilatada dos três. Diferentemente do intestino médio das fêmeas hematófagas, cujo IMP é expandido, o IMP de fêmeas de *Toxorhynchites theobaldi* é relativamente reduzido (GODOY; FERNANDES; MARTINS, 2015).

Nas fêmeas hematófagas, o sangue é armazenado no IMP após o repasto sanguíneo. Durante o preenchimento dessa região com sangue, as células epiteliais sofrem estresse mecânico, passando do formato cilíndrico ao achatado, e secretam uma matriz extracelular denominada matriz peritrófica (BILLINGSLEY, P., 1990; HEGEDUS *et al.*, 2009). Muitas funções têm sido propostas para a matriz peritrófica dos mosquitos como: proteção das células epiteliais contra abrasão; defesa contra patógenos; e filtro semipermeável para as proteínas do sangue e enzimas digestivas (BILLINGSLEY, P., 1990; HEGEDUS *et al.*, 2009; LEHANE, 2002).

1.5. CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS

O intestino médio é o maior órgão endócrino dos mosquitos devido à abundância de células enteroendócrinas que possui. Estas sintetizam e secretam hormônios peptídeos encontrados em mamíferos, como por exemplo, o polipeptídeo pancreático e o FMRFamida (fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina-amida) (MOFFETT; MOFFETT, 2014). Estimase que há pelo menos 500 células enteroendócrinas no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* adultos recém-emergidos (BROWN; RAIKHEL; LEA, 1985; GLATTLI; RUDIN; HECKER, 1987; MOFFETT; MOFFETT, 2014).

Apesar de representarem um número expressivo no intestino médio dos mosquitos, a função dessas células ainda não é bem conhecida. No entanto, presume-se que as células enteroendócrinas funcionem regulando as funções do epitélio digestivo e das células musculares adjacentes, além de secretarem na hemolinfa hormônios que atuam no sistema nervoso central, em outras regiões do sistema digestivo e no corpo gorduroso. Esses hormônios provavelmente integram informações sobre o tipo, volume e composição do alimento ingerido (MOFFETT; MOFFETT, 2014).

Células enteroendócrinas FMRF-positivas estão concentradas no intestino médio posterior tanto nas fêmeas hematófagas de *Ae. aegypti* como em fêmeas e machos de *T. theobaldi* (GODOY; FERNANDES; MARTINS, 2015). Não se sabe se há um número maior

de células enteroendócrinas de todos os tipos nessa região, ou se ocorre uma divisão de função, com as células enteroendócrinas secretoras de FMRF sendo típicas do intestino médio posterior. Células enteroendócrinas FMRF-positivas também ocorrem em outras fases do desenvolvimento de *Ae. aegypti*, e sua quantidade é variável entre as fases e com idade das fêmeas adultas. O número dessas células é baixo em larvas e pupas (cerca de poucas dezenas), e aumenta após a emergência do adulto (BROWN; CRIM; LEA, 1986; FERNANDES *et al.*, 2014; MOFFETT; MOFFETT, 2014).

1.6. CÉLULAS REGENERATIVAS

As células regenerativas ou células-tronco encontram-se na região basal do epitélio de todo o intestino médio dos mosquitos (BROWN; RAIKHEL; LEA, 1985). Essas células são fundamentais para o desenvolvimento e metamorfose do intestino médio dos mosquitos devido à sua capacidade de proliferação e diferenciação, eventos necessários para a renovação do epitélio digestivo (BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, 2011; FERNANDES *et al.*, 2014).

Apesar de sua importância, ainda não há um método para detecção dessas células no epitélio intestinal que permita acompanhar mudanças em termo de número, localização e proliferação durante o desenvolvimento do intestino médio em mosquitos. Em *D. melanogaster*, a proteína escargot; fator de transcrição que impede a diferenciação das células regenerativas, mantendo-as como tronco; foi descoberta como um excelente marcador desse tipo celular (KORZELIUS *et al.*, 2014). Análises do transcriptoma de *An. gambiae* (PADRÓN *et al.*, 2014) e de *T. theobaldi* (dados ainda não publicados) mostraram que escargot também é sintetizada no intestino médio, mas ainda não foi testado se essa proteína serviria como marcador de células regenerativas também em mosquitos.

As células diferenciadas do epitélio digestivo não são capazes de dividir, função que é realizada apenas pelas células regenerativas (CHAPMAN; DOUGLAS; CHAPMAN, 2012). Por esse motivo, o método disponível para detectar esse tipo celular em mosquitos é a marcação de células em mitose, através da utilização de reagentes como o anticorpo anti-fosfohistona H3. Este identifica um evento de modificação pós-traducional típico do processo de mitose, correspondente à fosforilação das histonas do tipo H3 dos nucleossomos (HANS; DIMITROV, 2001). A desvantagem de utilização desse marcador é que ele se limita a detectar células regenerativas que se encontram em processo de divisão. Porém, ele permite identificar em quais fases do desenvolvimento e em que regiões específicas ocorrem os eventos de proliferação do órgão em mosquitos.

1.7. MODIFICAÇÕES DO INTESTINO MÉDIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

Durante a metamorfose dos insetos holometábolos, o trato gastrointestinal é completamente remodelado através de eventos de morte celular, proliferação e diferenciação. Esse remodelamento está ligado a alterações no comportamento do inseto, principalmente em relação à alimentação, a qual geralmente é diferente entre larva e adulto (BUSZCZAK; SEGRAVES, 2000). No caso dos mosquitos hematófagos, como *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, a alimentação larval, que é baseada em matéria orgânica em decomposição, passa a ser de fluidos vegetais e sangue de vertebrados nos adultos (HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2009; NISHIURA; HO; RAY, 2003; RAY *et al.*, 2010). Em *Toxorhynchites*, as larvas possuem uma dieta sólida, rica em proteínas, e os adultos se alimentam de fluidos açucarados (FOCKS, 2007; SCHREIBER, 2007; STEFFAN; EVENHUIS, 1981).

D. melonogaster é o representante da ordem Diptera cujo desenvolvimento do intestino médio foi estudado em maior profundidade, tanto no quesito molecular quanto morfológico. Por isso, para basear o desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de mosquitos, usaremos esta espécie como modelo. Em *D. melonogaster*, as células-tronco do endoderma originam o epitélio do intestino médio larval, com seus três tipos celulares (células digestivas, enteroendócrinas e regenerativas). Não ocorre renovação do epitélio intestinal a cada ecdise entre os estágios larvais. Nesse período, o crescimento do intestino se dá principalmente pelo aumento do tamanho das células digestivas pré-existentes (BUCHON *et al.*, 2013; TAKASHIMA *et al.*, 2011; ZENG; HOU, 2012). Ao mesmo tempo, ocorre um aumento progressivo do número de células regenerativas, que sofrem intensos eventos de mitose, alcançando o número máximo no fim do último estágio larval. No período próximo à transição larva-pupa, as células regenerativas se organizam de forma peculiar, formando ninhos de disposição circular na região basal do epitélio digestivo. Em *Ae. aegypti*, divisões das células regenerativas foram detectadas em L4 (48 horas após a ecdise), o que representa uma preparação para a formação das novas células do intestino do adulto durante a fase de pupa (FERNANDES *et al.*, 2014; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2009; RAY *et al.*, 2010).

Durante a fase de pupa de *D. melonogaster*, ocorrem duas trocas de epitélio digestivo. O epitélio larval é descartado e substituído por um epitélio pupal, de vida curta, que logo é também descartado e envolve externamente o epitélio larval em degeneração, denominado corpo amarelo. Antes de cada evento de descarte do tecido, as células do epitélio novo já se encontram pré-formadas na região basal. Provavelmente, esses epitélios descartados são

reaproveitados como fonte de energia para a pupa. O segundo epitélio formado na fase de pupa é o definitivo, que perdurará na fase adulta (TAKASHIMA *et al.*, 2011). Em mosquitos, ainda não se sabe se o tecido epitelial é trocado uma ou duas vezes após formação do intestino médio larval.

Em *Ae. aegypti* recém-emergido, algumas células regenerativas do epitélio do intestino médio ainda sofrem mitose, mas em adultos com mais de cinco dias as células parecem perder a capacidade de divisão (FERNANDES *et al.*, 2014). Diferentemente, em *D. melanogaster* as células regenerativas mantêm a capacidade proliferativa, e é comum encontrar figuras de mitose nos adultos.

2. REFERÊNCIAS

AGYAPONG, Jeffrey *et al.* **Ovipositional Behavior of *Anopheles gambiae***. Mosquitoes. *Tropical medicine and health*, v. 42, n. 4, p. 187–190, dez. 2014.

BASS, Chris *et al.* **Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay**. *Malaria Journal*, v. 6, n. 1, p. 155, nov. 2007.

BILLINGSLEY, Peter F. **The midgut ultrastructure of hematophagous insects**. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219–248, 1990.

BILLINGSLEY, Peter F.; LEHANE, M. J. **Structure and ultrastructure of the insect midgut**. *Biology of the Insect Midgut*, p. 3–30, 2011.

BROWN, Mark R.; CRIM, Joe W.; LEA, Arden O. **FMRFamide- and pancreatic polypeptidlike immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito**. *Tissue and Cell*, v. 18, n. 3, p. 419–428, 1986.

BROWN, Mark R.; RAIKHEL, Alexander S.; LEA, Arden O. **Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti***. *Tissue and Cell*, v. 17, n. 5, p. 709–721, 1985.

BUCHON, Nicolas *et al.* **Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila***. *Cell Reports*, v. 3, n. 5, p. 1725–1738, 2013.

BUSZCZAK, Michael; SEGRAVES, William A. **Insect metamorphosis: out with the old, in with the new**. *Current biology*, v. 10, n. 22, p. R830-3, nov. 2000.

CALVEZ, Elodie *et al.* **Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the pacific**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2016.

CARNEIRO, Leticia A. M.; TRAVASSOS, Leonardo H. **Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus***. *Microbes and infection*. France: [s.n.], mar. 2016

- CHAPMAN, Reginald F.; DOUGLAS, Angela E.; SIMPSON, Stephen. J. **The insects. Alimentary canal, digestion and absorption.** [S.l.: s.n.], 2012.
- CHEN, Xiao G.; MATHUR, Geetika; JAMES, Anthony A. **Advances in genetics. Chapter 2 Gene Expression Studies in Mosquitoes.** [S.l.]: Elsevier Masson SAS, 2008. v. 64.
- CHRISTOPHERS, S. Rickard. *Aedes aegypti* L. **The yellow fever mosquito.** Cambridge. *Aedes aegypti* L. *The yellow fever mosquito* Cambridge, 1960.
- CIRIMOTICH, Chris M. *et al.* **Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*.** *Science*, v. 332, n. 6031, p. 855–858, 2011.
- CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction.** [S.l.]: Chapman & Hall, 1992.
- COLLINS, F. H; PASKEWITZ, S. M. **A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species.** *Insect molecular biology*, v. 5, n. 1, p. 1–9, fev. 1996.
- COLLINS, Larissa E.; BLACKWELL, Alison. **The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents.** *Biocontrol News and Information*, v. 21, n. 4, p. 105N-116N, 2000.
- EL-BAHNASAWY, Mamdouh M.; FADIL, Eman Ebrahim Abdel; MORSY, Tosson A. **Mosquito vectors of infectious diseases: are they neglected health disaster in Egypt?** *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 43, n. 2, p. 373–386, ago. 2013.
- FERNANDES, Kenner M. *et al.* ***Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis.** *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506–512, 2014.
- FOCKS, Dana A. ***Toxorhynchites* as biocontrol agents.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. 2 Suppl, p. 118–127, 2007.
- FOSTER, Woodbridge; WALKER, Edward. **Mosquitoes (Culicidae).** *Medical and Veterinary Entomology*, p. 203–262, 2002.
- GAIO, Analiz de O *et al.* **Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.).** *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 105, jun. 2011.
- GLATTLI, E.; RUDIN, W.; HECKER, H. **Immunoelectron microscopic demonstration of pancreatic polypeptide in midgut epithelium of hematophagous dipterans.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, v. 35, n. 8, p. 891–896, ago. 1987.
- GODOY, Raquel S.M.; FERNANDES, Kenner M.; MARTINS, Gustavo F. **Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae).** *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–16, 2015.
- GOMES, Almério de Castro. **Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica.** *Informe Epidemiológico do Sus*, v. 7, p. 49–57, 1998.
- GOUVEIA DE ALMEIDA, A. P. **Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a Sua Importância**

Médica em Portugal: Desafios para o Século XXI. *Acta Medica Portuguesa*, v. 24, n. 6, p. 961–974, 2011.

HAKIM, Raziel S.; BALDWIN, Kate; SMAGGHE, Guy. **Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis.** *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593–608, 2009.

HANS, Fabienne; DIMITROV, Stefan. **Histone H3 phosphorylation and cell division.** *Oncogene*, v. 20, n. 24, p. 3021–3027, 2001.

HARBACH, R. E. *Mosquito Taxonomic Inventory*. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

HARBACH, R. E. **The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny.** *Zootaxa*, v. 1668, n. May, p. 591–638, 2007.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. A. N. J. **Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera).** *Systematic Entomology*, v. 23, n. 4, p. 327–370, 1998.

HEGEDUS, Dwayne *et al.* **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. 1, p. 285–302, 2009.

TWOHIG, A. Katherine *et al.* **Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa.** p. 1–16, 2019.

KORZELIUS, Jerome *et al.* **Escargot maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells.** *The EMBO journal*, v. 33, n. 24, p. 2967–2982, dez. 2014.

LEHANE, M. J. **Peritrophic matrix structure and function.** *Annual Review of Entomology*, v. 42, n. 1, p. 525–550, 2002.

LEVINE, Rebecca S; PETERSON, A Townsend; BENEDICT, Mark Q. **Geographic and ecologic distributions of the *Anopheles gambiae* complex predicted using a genetic algorithm.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 70, n. 2, p. 105–109, fev. 2004.

MOFFETT, Stacia B.; MOFFETT, David F. **Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*.** *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2014.

NARAYANAN KUTTY, Sujatha *et al.* **A phylogenomic analysis of Culicomorpha (Diptera) resolves the relationships among the eight constituent families.** *Systematic Entomology*, v. 43, n. 3, p. 434–446, 2018.

NENE, Vishvanath *et al.* **Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, jun. 2007.

NISHIURA, James T; HO, Polly; RAY, Kathryn. **Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis.** *Journal of medical entomology*, v. 40, n. 4, p. 498–507, jul. 2003.

OLMO, Roenick P *et al.* **Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic**

expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. *Nature microbiology*, v. 3, n. 12, p. 1385–1393, dez. 2018.

OSTA, Mike A. *et al.* **Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics.** *The Journal of experimental biology*, v. 207, n. Pt 15, p. 2551–2563, jul. 2004.

PADRÓN, Alejandro *et al.* **In depth annotation of the *Anopheles gambiae* mosquito midgut transcriptome.** *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 636, jul. 2014.

PATTERSON, Jessica; SAMMON, Maura; GARG, Manish. **Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world.** *Western Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

RAY, Kathryn *et al.* **Growth and differentiation of the larval mosquito midgut.** *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1–13, 2010.

REIDENBACH, Kyanne R. *et al.* **Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology.** *BMC Evolutionary Biology*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2009.

ROMOSER, William S. *et al.* **Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut.** *Journal of Medical Entomology*, v. 41, n. 3, p. 467–475, 2004.

SABATINELLI, G. *et al.* **Role of *Culex quinquefasciatus* in the transmission of bancroftian filariasis in the Federal Islamic Republic of Comoros (Indian Ocean).** *Parasite (Paris, France)*, v. 1, n. 1, p. 71–76, mar. 1994.

SALAZAR, Ma Isabel *et al.* **Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes.** *BMC microbiology*, v. 7, p. 9, jan. 2007.

SCHREIBER, E. T. ***Toxorhynchites*.** *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, p. 129–132, 2007.

SERVICE, Mike. **Medical Entomology for Students.** 5. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, 2012.

SHIDRAWI, G. R. **Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology.** p. 531–545, 1969.

SIMPSON, Stephen J.; CHAPMAN, R. F. **The insects. Mouthparts and feeding.** In: SIMPSON, STEPHEN J.; DOUGLAS, ANGELA E. (Org.). Cambridge: Cambridge University Press, 2012. p. 15–45.

SNOW, Robert W. *et al.* **The prevalence of *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa since 1900.** *Nature*, v. 550, n. 7677, p. 515–518, out. 2017.

STEFFAN, W. A.; EVENHUIS, N. L. **Biology of *Toxorhynchites*.** *Annual Review of Entomology*, v. 26, n. 1, p. 159–181, 1981.

TAKASHIMA, Shigeo *et al.* **A novel tissue in an established model system: The *Drosophila* pupal midgut.** *Development Genes and Evolution*, v. 221, n. 2, p. 69–81, 2011.

TARACENA, Mabel L. *et al.* **Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 5, p. e0006498, maio 2018.

THAYER, Donald W.; TERZIAN, Levon A.; PRICE, Paul A. **Digestion of the human blood-meal by the mosquito, *Aedes aegypti*.** *Journal of Insect Physiology*, v. 17, n. 12, p. 2469–2473, 1971.

TOWNSON, H. **The biology of mosquitoes.** Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). viii + 509 pp. Hard cover £50. ISBN 0-412-40180-0. *Bulletin of Entomological Research*, v. 83, n. 2, p. 307–308, 1993.

TUNO, Nobuko *et al.* **Blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* and *Anopheles melas* in Ghana, western Africa.** *Journal of medical entomology*, v. 47, n. 1, p. 28–31, jan. 2010.

UKEGBU, Chiamaka V. *et al.* ***Plasmodium berghei* PIMMS2 promotes ookinete invasion of the *Anopheles gambiae* mosquito midgut.** *Infection and Immunity*, v. 85, n. 8, 2017.

VEGA-RODRIGUEZ, Joel *et al.* **Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 4, p. E492-500, jan. 2014.

WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH. **Walter Reed Biosystematics Unit.** Disponível em: <wrbu.org>. Acesso em: 19 ago. 2019.

WIEGMANN, Brian M. *et al.* **Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects.** *BMC Biology*, v. 7, n. 1, p. 34, jun. 2009.

WILDLING, E. *et al.* **Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon.** *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, v. 46, n. 2, p. 77–82, jun. 1995.

WU, Dong-Dong; ZHANG, Ya-Ping. **Trypsin-like serine proteases and the evolution of hematophagy in mosquitoes.** *eLS*. [S.l.]: American Cancer Society, 2011.

ZENG, X.; HOU, S. X. **Broad relays hormone signals to regulate stem cell differentiation in *Drosophila* midgut during metamorphosis.** *Development*, v. 139, n. 21, p. 3917–3925, 2012.

ZHOU, Xiaofan *et al.* **Divergent and conserved elements comprise the chemoreceptive repertoire of the nonblood-feeding mosquito *Toxorhynchites amboinensis*.** *Genome biology and evolution*, v. 6, n. 10, p. 2883–2896, out. 2014.

3. CAPÍTULO 1

Morfologia comparativa do intestino médio larval de *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae)

Resumo

O intestino médio da fase larval dos mosquitos é responsável pela digestão e absorção da maior parte dos nutrientes que sustentarão os eventos da metamorfose e a vida adulta do inseto. Apesar de sua importância, a fase larval dos mosquitos é negligenciada, e os estudos envolvendo o órgão tem focado principalmente em fêmeas adultas das espécies de importância médica, deixando uma lacuna no entendimento de sua morfofisiologia nos demais estágios do ciclo de vida desses insetos. No intuito de preencher essa lacuna, foi realizada uma investigação morfofisiológica comparativa do intestino médio larval dos três mosquitos de diferentes gêneros *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, e *Toxorhynchites theobaldi*. *T. theobaldi* possui dieta predatória, em contraste com a dieta detritívora das outras duas espécies. Neste estudo, foi visto que as três espécies de mosquitos compartilham características histológicas básicas do órgão, mas diferem em outras, as quais foram relacionadas tanto ao parentesco filogenético como aos distintos tipos de dieta. A histoquímica do intestino médio larval de *An. gambiae* indicou a existência de um metabolismo de lipídeos e carboidratos diferente daquele de *Ae. aegypti* e *An. gambiae*. O ceco gástrico foi o compartimento que mais variou entre as espécies, e mostrou particularidades que provavelmente estão relacionadas à composição química da dieta. A matriz peritrófica foi morfológicamente similar nas três espécies, e os processos envolvidos no desenvolvimento pós-embrionário do órgão, como diferenciação celular, proliferação e apoptose, também foram semelhantes. Células enteroendócrinas FMRF-positivas apareceram agrupadas no intestino médio posterior de *T. theobaldi*, mas individualizadas em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*. Este trabalho permitiu supor que a condição predadora na fase larval pode ser uma característica ancestral na história evolutiva dos mosquitos.

1. Introdução

A evolução dos mosquitos (Diptera, Culicidae) tem sido alvo de constante investigação em diversos trabalhos através da utilização de ferramentas de biologia molecular. No entanto, propostas filogenéticas divergentes foram geradas, e o entendimento da história evolutiva desse

táxon permanece incerta ¹⁻⁵. Sabe-se que a morfologia é uma das ferramentas úteis para o entendimento de processos evolutivos dos organismos ⁶. Nesse sentido, o estudo comparativo da morfologia de diferentes espécies de mosquitos, e sua união com dados filogenéticos, torna-se uma importante estratégia no intuito de decifrar os passos evolutivos desses insetos.

Uma das pautas de investigação das análises filogenéticas de Culicidae diz respeito à evolução do hábito alimentar de seus indivíduos ⁷. Como a morfofisiologia do trato digestivo reflete mudanças no hábito alimentar ⁸, e o intestino médio é o órgão responsável por quase a totalidade do processo digestivo em mosquitos ^{9,10}, ele foi utilizado neste trabalho como indicador de mudanças evolutivas. A fase larval dos insetos holometábolos, como é o caso dos culicídeos, é considerada a fase onde os recursos necessários para o crescimento e desenvolvimento do inseto são recrutados, os quais serão utilizados para desencadear a metamorfose e suprir a fase adulta, encarregada pela reprodução ¹¹. Dessa forma, devido ao maior envolvimento com o processamento de nutrientes, os quais serão utilizados por toda a vida do organismo, o intestino médio da fase larval dos mosquitos foi o objeto do presente estudo.

O desenvolvimento larval dos mosquitos envolve 4 estágios e, portanto, três eventos de ecdise. Neste trabalho, foram escolhidas três espécies de mosquitos consideradas filogeneticamente distantes ¹² para traçar um panorama morfofisiológico geral do intestino médio de larvas de terceiro e quarto instares. A escolha dos dois últimos instares foi baseada nas já conhecidas alterações do órgão em estágio de L4 para a pupação, o que poderia refletir em mudanças morfológicas ¹³. Dentre as espécies estudadas, estão *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, mundialmente conhecidas pela transmissão de doenças a humanos ¹⁴⁻¹⁶; e *Toxorhynchites theobaldi*, mosquito sem importância médica, mas pertencente a um gênero que exibe uma variedade de características únicas em relação à maioria dos culicídeos ^{8,17}.

Em meio às características únicas de *Toxorhynchites*, suas larvas possuem hábito alimentar diferente das larvas da maioria dos culicídeos, como *An. gambiae* e *Ae. aegypti* ^{17,18}. Estas últimas passam quase todo o tempo à procura de alimento; o qual abrange detritos orgânicos, bactérias e fungos presentes na água ¹⁹. No entanto, as larvas de *T. theobaldi* são predadoras, com comportamento de “senta e espera”. Suas presas são invertebrados aquáticos em movimento, incluindo larvas de outros mosquitos ^{20,21}, que normalmente são engolidas inteiras. Os mosquitos *Toxorhynchites* também apresentam tamanho corporal maior quando comparados a *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, em todas as fases do desenvolvimento pós-

embrionário^{17,18}. Por ser uma espécie tão diferente, o estudo do intestino médio de larvas de *T. theobaldi* gerou pistas que podem auxiliar o entendimento da história evolutiva dos mosquitos.

O intestino médio dos mosquitos em fase larval é formado por três regiões distintas morfológicamente. No eixo anteroposterior, encontra-se primeiramente o ceco gástrico, que é seguido pelo intestino médio anterior, o qual, por sua vez, precede o intestino médio posterior²²⁻²⁴. O ceco gástrico se conecta anteriormente à cárdia, estrutura que produz uma membrana extracelular composta de quitina e proteínas ao redor do bolo alimentar que a atravessa, a matriz peritrófica²⁴⁻²⁶. Esta impede o contato direto do alimento com as células epiteliais, e compartimentaliza o processo digestivo gerando os espaços endo e ectoperitróficos, o que aumenta sua eficiência^{9,25,27}.

Todas as três regiões do intestino médio larval de mosquitos são compostas de tecidos epitelial e muscular^{10,22}. O epitélio digestivo possui uma única camada de células em toda a sua extensão, formada principalmente por enterócitos ou células digestivas, que estão sempre em contato com a lâmina basal e com o lúmen; e também por células regenerativas e enteroendócrinas, localizadas na porção mais basal do tecido. A camada epitelial é circundada externamente por músculos circulares e longitudinais, os quais se inter cruzam formando uma malha que dá suporte mecânico e funcional ao órgão digestivo^{23,28}. Apesar da importância do intestino médio para estudos em mosquitos, pois é através dele que patógenos como DENV^{14,15} e *Plasmodium*¹⁶ invadem os tecidos internos das fêmeas adultas e as tornam aptas para a transmissão de doenças, muitos aspectos da biologia básica do órgão e sua dinâmica funcional ainda não são conhecidos.

Com o objetivo de atualizar os dados acerca da morfologia e desenvolvimento do intestino médio de mosquitos durante a fase larval, além de unir dados moleculares e funcionais conhecidos com dados morfológicos, foi feito um apanhado comparativo do órgão entre as três espécies citadas. As três partes anatômicas do intestino médio larval foram analisadas comparativamente e, por fim, foram investigados a ocorrência de células enteroendócrinas FMRF-positivas e os dois principais eventos celulares relacionados ao desenvolvimento dos órgãos, apoptose e divisão celular.

2. Material e Métodos

2.1. MOSQUITOS

2.1.1. *An. gambiae*

Larvas nos estágios de L3 e L4 (essa última até no máximo 30 h após ecdise de L3 para L4) foram obtidas no insetário do Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Estados Unidos da América. Elas foram criadas em bandejas de plástico contendo água limpa declorada desde a fase de ovo e alimentadas com ração de tartaruga. As bandejas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

2.1.2. *Ae. aegypti*

Larvas nos estágios de L3 e L4 (essa última até no máximo 36 h após ecdise de L3 para L4) da linhagem PPCampos (Campos dos Goytacazes, RJ) foram obtidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Elas também foram criadas em bandejas de plástico contendo água limpa declorada desde a fase de ovo e alimentadas com ração de tartaruga Nutral Ouro (Brasil Ltda.). As bandejas foram mantidas em incubadora com temperatura de 26 ± 2 °C, umidade de 60% e fotoperíodo de 12 h.

2.1.3. *T. theobaldi*

Larvas nos estágios de L3 e L4 foram coletadas na Mata do Paraíso, Universidade Federal de Viçosa, Brasil. A preparação para a coleta foi feita distribuindo-se baldes pretos próximos a troncos de árvores no interior de mata fechada. Inicialmente, os baldes-armadilha foram abastecidos com água de torneira, mas depois foram mantidos com água da chuva e triados mensalmente à procura de larvas. O material obtido em cada coleta foi trazido para o insetário do DBG. As larvas foram criadas individualmente em pequenos potes de plástico contendo água declorada, e alimentadas com larvas de *Ae. aegypti* (PPCampos) e mantidas em sala sem controle de temperatura ou luminosidade, de forma a manter as condições de crescimento próximas à da natureza.

2.2. HISTOLOGIA

Intestinos médios de larvas L3 e L4 foram dissecados em PBS (0.1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, e 20 mM Na₂HP₄; pH 7.6), com auxílio de Microscópio Estereoscópico, e fixados

em solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0.4% em PBS) por duas horas. Para *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, foram utilizados 25 intestinos para cada estágio larval. A amostragem de *T. theobaldi* foi de oito intestinos por estágio larval, devido à dificuldade na obtenção de seus exemplares.

As amostras foram lavadas em PBS, e submetidas à desidratação em série etanólica sendo mantidas por 10 minutos em cada uma das concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%). Após a desidratação, o material foi embebido em Historesin (Leica), sem acréscimo de catalisador e deixado *overnight*, para posterior inclusão. Secções em série (2.5 µm) das amostras foram obtidas em micrótomo automático (Leica) com navalha de vidro. As secções foram acomodadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina. As secções coradas foram cobertas por lamínula de vidro utilizando-se meio de montagem Eukitt (Fluka), visualizadas em microscópio óptico Olympus BX53 e fotografadas com câmera Olympus DP 73 do Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

2.3. HISTOQUÍMICA

2.3.1. Proteínas totais

Parte das secções obtidas no passo anterior foram submetidas à técnica histoquímica de azul de bromofenol, que evidencia proteínas totais. As lâminas foram incubadas com solução de mercúrio bromofenol por uma hora, e em seguida, lavadas por 10 min em ácido acético 0,5% dissolvido em água destilada por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 horas, e montadas como descrito no item 2.2.

2.3.2. Lipídeos

Oito intestinos médios de cada fase larval de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* foram dissecados e fixados em glutaraldeído 2.5%; seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em PBS por 40 minutos ao abrigo da luz. Após esse passo, os intestinos foram lavados em PBS e submetidos aos processos de desidratação e inclusão. Secções (5 µm) foram montadas com sacarose 30% em água destilada, e fotografadas como descrito no item 2.2.

2.3.3. Carboidratos neutros

Parte das secções foram submetidas à técnica histoquímica de Periodic Acid Shiff (PAS) para evidenciar carboidratos neutros. Regiões ricas em carboidratos neutros, como o glicogênio

e mucopolissacarídeos, adquirem uma coloração magenta. As lâminas histológicas foram incubadas com solução aquosa de ácido periódico 1% durante 20 minutos. Após a incubação, elas foram lavadas em água destilada (três banhos de 10 minutos), e tratadas com reativo de Schiff durante 45 minutos. Seguiu-se novo processo de lavagem, porém em água corrente, durante 15 minutos. Por fim, as secções foram contracoradas com hematoxilina, montadas e fotografadas como descrito no item 2.2.

2.4. MONTAGEM TOTAL

2.4.1. Matriz peritrófica

As matrizes peritróficas de larvas L4 (quinze de *Ae. aegypti* e dez de *T. theobaldi*) foram removidas com o auxílio de pinças, fixadas como descrito no item 2.2 e incubadas com WGA (Wheat germ agglutinin, diluição 1:500, Sigma Aldrich,) por 30 minutos. O WGA é uma lectina do germe de trigo com afinidade específica de ligação com o carboidrato N-acetil-D-glicosamina, o qual é o monômero do polissacarídeo quitina, envolvido na composição das matrizes peritróficas de insetos ²⁵. As amostras foram lavadas em PBS e, em seguida, montadas com lamínula de vidro utilizando-se solução de Mowiol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP). As lâminas foram fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META Zeiss do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

2.4.2. Tecido muscular

Para visualização do tecido muscular dos mosquitos, foi utilizado o reagente Phalloidin-Alexa 546 (1:40, Life Technologies), marcador específico para filamentos de actina, os quais estão presentes em grande quantidade em miofibrilas musculares ²⁹. As amostras foram dissecadas e fixadas como no item 2.2, lavadas em PBS e incubadas com o reagente em questão por 40 minutos. Após incubação, as amostras foram lavadas em PBS, incubadas por 40 minutos com o intercalante nuclear TOPRO3 (1:1000, Thermo Fisher Scientific), lavadas novamente em PBS e finalmente montadas como no subitem anterior. Foram utilizados oito intestinos médios por estágio larval de *Ae. aegypti*, e cinco de *T. theobaldi*.

2.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

2.5.1. Mitose e células enteroendócrinas FMRF-positivas

Intestinos fixados foram lavados em PBS (item 2.2) e tratados com PBST (Triton X-100 1% em PBS) por três vezes de 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas

overnight a 4°C com os anticorpos primários diluídos em PBS: Anti-phospho histone H3 (1:100, Cell signaling); e anti-FMRF-amide (1:500, Genetex). No dia seguinte, as amostras foram lavadas, e incubadas em câmara escura com anticorpo secundário IgG FITC (1:200, Genetex). No terceiro dia de processamento, as amostras foram lavadas e incubadas com Phalloidin-Alexa 546 (1:40, Life Technologies) por 40 minutos, e TO-PRO3 (1:1000, Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos. Por fim, as amostras foram submetidas ao último processo de lavagem por três vezes de oito minutos, e montadas em lâminas como descrito no subitem 2.4.1.1. e fotografadas (item 2.4). Foram utilizados 25 intestinos de cada estágio (L3 e L4) por anticorpo primário no caso de *Ae. aegypti*, e oito para *T. theobaldi*.

2.5.2. Apoptose

Intestinos médios de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* foram dissecados em PBS e imediatamente incubados com o reagente Cell Event Caspase3/7 (1:350, Invitrogen) por 30 minutos em câmara escura. Após a incubação, as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos, lavadas em seguida por 3 vezes de 5 minutos, e incubadas com Alexa Fluor 546 Phalloidin (1:50, Life Technologies) por 40 minutos. Finalmente, as amostras foram lavadas, montadas e fotografadas como mencionado no subitem 2.4.1. O número de amostras analisadas foi o mesmo do subitem 2.5.1.

3. Resultados

3.1. MORFOLOGIA

O intestino médio larval (Fig. 1A) de *Anopheles gambiae* (Fig. 1B), *Aedes aegypti* (Fig. 1C), e *Toxorhynchites theobaldi* (Fig. 1D) aumenta em tamanho do estágio de L3 para L4, mas sua morfologia externa e histologia permanecem as mesmas (Figs. suplementar 1, e suplementar 2A). Porém, comparando entre espécies, o tecido preserva características histológicas básicas (Fig. 1E), mas difere em algumas características, as quais serão descritas adiante.

Levando em consideração as três regiões do intestino médio larval, cada uma possui epitélio com morfologia típica, e por isso, sua descrição foi dividida por partes. Por fim, o tecido muscular do intestino médio larval e a matriz peritrófica foram analisados comparativamente entre as espécies e descritos posteriormente.

3.1.1. Epitélio do ceco gástrico (GC)

O ceco gástrico dos dois estágios larvais das três espécies é facilmente identificado pela sua estrutura em forma de sacos (Fig. 1). As células digestivas dessa região são geralmente achatadas, com núcleos também achatados. O citoplasma é predominantemente básico, e a borda em escova é básica e alta. O labirinto basal ocupa grande parte das células, e possui invaginações emaranhadas e distorcidas em diversas direções (Fig. 2A-F).

Em ambos os estágios larvais das três espécies, o citoplasma dos enterócitos do GC é fortemente marcado para proteínas, e a borda em escova também se apresenta fortemente corada (Fig. 3B, 3D inset, e 3E). Quanto à histoquímica utilizando PAS (controle positivo está representado na fig. suplementar 2H), o citoplasma dos enterócitos é fortemente PAS-positivo em *Ae. aegypti* (Fig. 12B) e *T. theobaldi* (Fig. 3F e 12C), apresentando uma marcação granulosa em grande parte das células. Diferentemente, em *An. gambiae*, foram detectados apenas alguns grânulos individualizados, os quais foram restritos a algumas células (Fig. 12A). Grânulos citoplasmáticos positivos para ósmio foram encontrados apenas em *T. theobaldi*, e foram distribuídos tanto na região do labirinto basal quanto no ápice das células (Fig. 3H-I).

O GC é amarelo-claro em *Ae. aegypti* e *An. gambiae* quando visto ao microscópio estereoscópico, da mesma cor do restante do intestino médio (Fig. 1B e C). No entanto, em *T. theobaldi*, ele aparece cinza escuro ou negro devido ao conteúdo presente no lúmen dessa região (Fig. 1D e suplementar 3A-E). Devido a esta característica, durante a dissecação das larvas de *T. theobaldi*, foi possível relacionar a morfologia do intestino médio anterior e posterior com a do ceco gástrico. Nas amostras onde o lúmen intestinal se encontrava mais vazio e com conteúdo negro, o GC se apresentou mais protuberante (Figura suplementar 3 A-E).

O conteúdo do lúmen do GC de L3 e L4 das três espécies é geralmente granuloso (Fig. 3A-E e G). Em *An. gambiae* e *T. theobaldi*, ele apresentou um colóide contendo grânulos amarronzados (Fig. 3A e 3G). Diferentemente, em *Ae. aegypti*, a maioria dos grânulos detectados no GC foram eosinofílicos (Fig. 3D). Os grânulos do GC das três espécies foram PAS e bromofenol-positivos (Fig. 3B e C, e 3E-G). Pequenos grânulos amarronzados, da mesma cor do conteúdo luminal, foram vistos no interior de células digestivas do GC de *T. theobaldi* (Fig. 3G inset).

A entrada do ceco gástrico possui uma membrana acelular que isola seu conteúdo do espaço ectoperitrófico³⁰. Ela é facilmente detectada em *An. gambiae* através das colorações convencionais (Fig. 4D). Diferentemente, em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, a membrana cecal não corou com coloração convencional. Porém, nesse último, foi possível identifica-la ainda assim devido a presença do colóide amarronzado (Fig. 4E). Nas três espécies, essa estrutura é PAS-

positiva (Fig. 4A-C e 4G) e azul-clara quando corada com azul de bromofenol (Fig. 4F e 4H). Em *An. gambiae*, a membrana cecal aparece como uma camada linear espessa (Fig. 4B e 4D), enquanto em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, ela é amorfa e de aspecto distorcido (Fig. 4A, 4C, 4E e 7F). A membrana cecal se origina sempre a partir de um grupo de células delgadas cuja morfologia é similar nas duas fases das três espécies (Fig. 4H-J).

As regiões de epitélio entre cárdia e GC, e entre este último e o intestino médio anterior (AMG) diferiram entre as espécies (Fig. suplementar 5). Em ambos os estágios larvais de *T. theobaldi*, a região de transição entre cárdia e GC é morfologicamente idêntica ao AMG (Fig. 5C e F). Adicionalmente, nesta espécie, a transição entre GC e AMG é abrupta, não sendo identificado nenhum tipo celular diferente antes das células que dão origem à membrana cecal (Fig. 5C e F). Em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, existe um epitélio de transição entre as células que originam a membrana cecal e o AMG, e entre estas e a cárdia (GC-out). No entanto, a morfologia do epitélio difere nas duas espécies. As células da transição em *An. gambiae* lembram a morfologia das células da câmara do GC, achatadas e com borda em escova alta (Fig. 5A e D). Contrariamente, em *Ae. aegypti*, elas são pequenas, cúbicas, e possuem irregularidades na porção apical, sendo diferentes das células do interior da câmara (Fig. 5B, C e E). Tanto em *An. gambiae* quanto em *Ae. aegypti*, as células dessa região de transição estão internalizadas no compartimento do GC, no entanto, nesta última, elas se organizam de forma mais complexa, aparentando a formação de uma câmara secundária (Fig. 5E e suplementar 2B).

Com relação ao formato do GC, *An. gambiae* e *T. theobaldi* possuem duas protuberâncias acentuadas nesse compartimento, uma superior e uma inferior (Fig. 5A e C), enquanto em *Ae. aegypti* existe apenas a protuberância inferior (Fig. 5B).

Algumas amostras dos dois estágios larvais das 3 espécies apresentaram protrusões de células do GC em direção ao lúmen (Fig. suplementar 4A-I). Em *Ae. aegypti*, foram vistos dois tipos de protrusões (Fig. suplementar 4A e 4B). Em um deles, o citoplasma das células apareceu extravasado juntamente com o núcleo, morfologicamente íntegro, através de uma fenda da borda em escova (Fig. suplementar 4A). No outro tipo, o conteúdo citoplasmático extravasado não incluiu o núcleo (Fig. suplementar 4B). A maioria do material extravasado no lúmen do GC apresentou-se granuloso (Fig. suplementar 4A e 4B) e positivo para PAS (Fig. suplementar 4C) e bromofenol (Fig. suplementar 4E e 4F), porém, também foram vistos materiais vesiculosos PAS-negativos (Fig. suplementar 4D). Um tipo diferente de material extracelular também foi visto no lúmen do GC em L4 de *Ae. aegypti*. Este apresentou-se vesiculoso, e algumas vesículas apareceram conectadas com os microvilos das células digestivas (Fig.

suplementar 4G). Em *Ae. aegypti* e *An. gambiae*, as células da região de transição (GC-out) apresentaram projeções citoplasmáticas assim como as da porção interna do GC, isolada pela membrana cecal (GC-in) (Fig. suplementar 4E-F e H).

Células basais foram vistas no GC dos dois estágios larvais das três espécies (Fig. suplementar 2C). Em *T. theobaldi*, essas células foram vistas próximas umas das outras (Fig. suplementar 2D). Células regenerativas altas foram detectadas no GC de todas as espécies, as quais apresentaram núcleos arredondados e borda em escova baixa (Fig. 13E-G).

3.1.2. Epitélio do intestino médio anterior (AMG)

No eixo antero-posterior, posterior ao GC, está o epitélio digestivo do intestino médio anterior (AMG). Em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, as células digestivas do AMG apresentam-se cúbicas ou prismáticas, com núcleos esféricos ou alongados, respectivamente. Em *T. theobaldi*, as células digestivas aparecem achatadas, cúbicas ou prismáticas, com núcleos variando de achatados a alongados, respectivamente (Fig. 6A-F).

Em ambos os estágios larvais das três espécies, o citoplasma das células digestivas do AMG é predominantemente básico (eosinofílico), e o labirinto basal ocupa cerca de um terço à metade da altura celular, além de aparecer delgado, denso, formando ramos verticais organizados paralelamente uns aos outros (Fig. 6A-F e 7B). A borda em escova é delgada, quase imperceptível (Fig. 7A e E).

Tanto em L3 quanto em L4 das três espécies, a região das células digestivas entre o labirinto basal e a borda em escova da maioria das amostras apresentou-se preenchida por diversas vesículas de tamanhos variados (Fig. 7C-D e F-H). Em *T. theobaldi*, grande parte delas foi positiva para tetróxido de ósmio, aparecendo em tons cinza-claros a cinza-médios (Fig. 7F-G e suplementar 2G). Em *Ae. aegypti*, algumas amostras também apresentaram vesículas positivas para ósmio no AMG (Figura 7H), no entanto, nenhuma marcação para esta técnica foi vista em *An. gambiae*.

A quantidade de vesículas de todos os tipos presentes nas células digestivas do AMG variou entre as amostras (Fig. 7C e 7D). Esta variação foi identificada em ambos os estágios das três espécies. Em algumas amostras de uma mesma espécie, vesículas não foram identificadas, ou foram vistas restritas a poucas células (Fig. 7C). Em outras, as células digestivas do AMG apresentaram-se repletas de vesículas (Fig. 7D).

As células digestivas do AMG de ambas as fases larvais das três espécies apresentam borda em escova fracamente marcada para proteínas (Fig. 7E). Projeções citoplasmáticas foram vistas nas células do AMG das três espécies, mas seu tipo variou. Em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*,

as células apresentaram aberturas em forma de taça (Fig. 8B, 8C e 8E) contendo um material eosinofílico (Fig. 8B). Quando essas aberturas foram vistas, o citoplasma das células se encontrou preenchido por vesículas (Fig. 8A-E), as quais foram algumas vezes vistas em processo de fusão (Fig. 8B-C e 8E). Em *An. gambiae*, vesículas citoplasmáticas também foram vistas acumuladas no citoplasma ao mesmo tempo que ocorriam protrusões no ápice das células (Fig. 8F-G). Porém, nesse caso, as protrusões envolveram um acúmulo de vesículas não-fundidas formando projeções em direção ao lúmen (Fig. 8G).

Grande parte das amostras de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresenta o epitélio do AMG totalmente preenchido por grânulos PAS positivos (Fig. 12D-E). No entanto, em *An. gambiae*, foram vistos poucos grânulos PAS positivos, os quais foram encontrados individualizados e se concentraram na porção basal do epitélio digestivo (Fig. 12C).

No AMG de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, foram vistas células regenerativas basais de núcleos triangulares e citoplasma ramificado (Fig. 13B-D). Diferentemente, em *An. gambiae*, as células basais do AMG possuem formato arredondado sem ramificações citoplasmáticas (Fig. 13A). Células regenerativas altas também foram vistas nas duas fases das três espécies. Estas geralmente possuem citoplasma mais basófilo em relação aos enterócitos maduros, e borda em escova em desenvolvimento (Figs. 13H-J e suplementar 2E).

3.1.3. Epitélio do intestino médio posterior (PMG)

Em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, as células digestivas do intestino médio posterior (PMG) são geralmente primárias altas, com núcleos alongados (Fig. 9A-D). Em *T. theobaldi*, elas variaram de pavimentosas com núcleos achatados (Fig. 10G) a cúbicas (Fig. 10H) ou prismáticas altas (Fig. 10I) com núcleos arredondados a alongados. A borda em escova é alta e destacada no PMG de ambos os estágios larvais das três espécies (Fig. 9A-F). O citoplasma aparece geralmente básico, e o labirinto basal ocupa cerca de um terço da altura celular (sem contar com a borda em escova) e apresenta-se sinuoso e emaranhado, assim como o labirinto basal dos enterócitos do GC (Fig. 9A-F). O PMG não apresentou vesículas positivas para ósmio em nenhuma das três espécies.

O PMG de ambos os estágios larvais de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentou diferenças morfológicas entre sua porção anterior e posterior (Fig. 10D-F e G-I). As células da porção anterior do PMG apresentam-se quase totalmente preenchidas por um material fortemente PAS-positivo que não cora sob colorações convencionais, aparecendo esbranquiçado (Fig. 17C e F). O PMG anterior também apresenta acúmulos esbranquiçados nas células coradas com HE, no

entanto, sua quantidade é destacadamente menor (Fig. 10F e 10I). Em *T. theobaldi*, a distinção entre PMG anterior e posterior foi mais pronunciada que em *Ae. aegypti* (Fig. 10E-F e H-I). Diferentemente, o PMG de nenhuma amostra de *An. gambiae* apresentou diferenças ao longo de sua extensão (Fig. 10A-C).

Ambos os estágios larvais das três espécies apresentaram células do PMG com projeções citoplasmáticas em direção ao lúmen do órgão (Fig. 11A-I). Todas essas projeções envolveram fendas na borda em escova e extravasamento de material intracelular. Em *An. gambiae*, o conteúdo extravasado foi quimicamente diferente do encontrado para *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. O material protendido no PMG de *An. gambiae* é fortemente marcado para proteínas (Fig. 11B), mas sua composição é pobre em carboidratos neutros (Fig. 11C). As bordas da projeção formam uma linha mais eosinofílica que sua porção central (Fig. 11A). Diferentemente, em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* (Fig. 11D e 11G), as projeções são ricas em grânulos de carboidratos neutros (Fig. 11F e 11I), e possuem conteúdo proteico granuloso (Fig. 11E e 11H).

O PMG de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresenta forte marcação de carboidratos neutros por todo o citoplasma das células digestivas (Fig. 12G-H). Já em *An. gambiae*, só alguns grânulos individualizados e concentrados na porção basal das células aparecem marcados (Fig. 12F).

Células regenerativas altas foram vistas no PMG de ambos os estágios larvais das três espécies. Seus núcleos são menores que os das células digestivas já diferenciadas, e primórdios de microvilos são vistos no ápice dessas células (Fig. 13K-M e suplementar 2F).

3.1.4. Tecido muscular do intestino médio

Os músculos circulares formam anéis transversais em torno de todo o intestino médio larval e se inter cruzam com os longitudinais. Juntos, os dois tipos de músculo formam uma rede quadriculada (treliça) que encobre todo o órgão digestivo²⁸.

Foi identificado que os feixes de músculos circulares que envolvem as regiões de transição do GC (GC-out) em *Ae. aegypti* e *An. gambiae* possuem diâmetro maior em relação aos feixes circulares do epitélio interno do GC (GC-in), e aos da região do AMG (Fig. 14A-F). Em *Ae. aegypti*, o diâmetro desses músculos é ainda mais pronunciado (Fig. 14D).

Os músculos circulares de ambos os estágios larvais de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* são vistos formando um único feixe de fibras por anel no AMG (Fig. 15A-B) e PMG (Fig. 15D-E

e 15G). Diferentemente, em *T. theobaldi*, os anéis são constituídos por mais de um feixe de fibras (2 a 5), tanto no AMG (Fig. 15C) quanto no PMG (Fig. 15F e 15H).

3.1.5. Matriz peritrófica (PM)

A matriz peritrófica exibe a mesma morfologia em ambas as fases larvais das três espécies, e em toda a extensão do intestino médio (Fig. 16A-H). Ela é vista rente à borda em escova do epitélio do AMG e PMG, mas não do GC. A PM aparece a partir da cárdia, de onde segue junto com o bolo alimentar sem penetrar no lúmen do PM (Fig. 1E).

Em ambos os estágios das três espécies, a PM, quando submetida às técnicas histoquímicas, possui carboidratos neutros (Fig. 16A-C) e baixa marcação para proteínas (Fig. 16D-F). Tanto em *Ae. aegypti* como em *T. theobaldi*, ela é WGA-positiva, possuindo padrão similar de marcação para ambas as espécies (Fig. 16G-H).

3.2. IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.2.1. Apoptose

Células apoptóticas não foram encontradas no intestino médio de nenhuma fase larval de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. O controle positivo foi feito com pupas de *Ae. aegypti* 30 minutos após pupação, as quais apresentaram células apoptóticas no GC (Fig. suplementar 2I).

3.2.2. Divisão celular

Tanto L3 como L4 de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentaram células mitóticas espalhadas pelo epitélio do intestino médio, e seu padrão de marcação foi o mesmo para ambas as fases, e entre as amostras de uma mesma fase (Fig. 17A-E e 17F-H). Os eventos de mitose ocorreram individualmente, não sendo identificadas células mitóticas formando agrupamentos. Também não foram detectadas tendências de marcação em nenhuma região específica.

3.2.3. Células enteroendócrinas

Células enteroendócrinas FMRF-positivas foram vistas apenas no PMG de ambas as fases larvais de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. O número de células marcadas variou entre as amostras. Em algumas delas, nenhuma célula FMRF-positiva foi identificada. No entanto, em outras, células FMRF-positivas foram vistas espalhadas pelo PMG, sem formar agrupamentos em *Ae. aegypti* (Fig. 18A-B), e formando agrupamentos em *T. theobaldi* (Fig. 18C-D).

3.2.4. Tabela comparativa dos caracteres morfológicos do intestino médio

As principais semelhanças e diferenças morfológicas do epitélio digestivo e do tecido muscular do intestino médio de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* foram resumidas na Tabela 1.

4. DISCUSSÃO

4.1. Morfofisiologia

A mudança de estágio de L3 para L4 não determinou modificações histológicas nos intestinos médios de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Nas três espécies, o tamanho do órgão aumentou, mas manteve suas características morfofisiológicas. Isso provavelmente aconteceu porque o nicho ecológico de ambos os estágios é o mesmo. O requerimento energético para o metabolismo de um organismo é diretamente proporcional a sua massa corporal³¹, fato que explica o aumento do órgão em tamanho entre as fases L3 e L4.

Os epitélios digestivos do GC, AMG e PMG são morfológicamente distintos entre si nas três espécies, o que caracteriza a ocorrência de processos fisiológicos diferentes e determinados para cada região. Várias características foram preservadas entre as espécies, porém, singularidades também ocorreram. As semelhanças e diferenças morfológicas entre as espécies e suas implicações fisiológicas serão discutidas abaixo.

Ceco gástrico (GC)

A câmara do GC possui células digestivas geralmente achatadas. Epitélios achatados são mais permeáveis que epitélios cúbicos e cilíndricos, sendo, portanto, típicos de regiões onde ocorre muito intercâmbio de substâncias. Células achatadas permitem uma passagem mais rápida e eficiente de moléculas simples através de suas membranas por processos de difusão ou filtração. Desse modo, é possível inferir que o epitélio digestivo do GC dos três mosquitos é especializado em troca de substâncias simples entre o lúmen do órgão e a hemolinfa.

O labirinto das células do GC é tipicamente emaranhado e distorcido, e ocupa grande parte da altura celular. O labirinto basal é um tipo de especialização de membrana frequentemente vista em epitélios do trato digestivo de insetos. Ele é caracterizado por convoluções da membrana plasmática no domínio celular basal, formando dobras e pontes

interdigitais entre as células vizinhas ³². Essa configuração de membrana promove um grande aumento na superfície basolateral das células epiteliais, aumentando a eficiência do transporte transcelular. Juntamente com a morfologia achatada das células, a alta proporção do volume celular ocupada pelo labirinto garante alta eficiência de troca de substâncias na câmara do GC.

A borda em escova das células do GC possui microvilos longos. Essas especializações de membrana estão envolvidas em diversos processos fisiológicos das células. Além da clássica função de aumentar sua superfície de contato, permitindo maior intercâmbio de substâncias entre os meios intra e extracelular, elas abrigam diversas proteínas de membrana, como transportadores de glicose, enzimas, canais, bombas e trocadores iônicos ³³. Bombas de prótons H⁺ ATPases do tipo vacuolar estão abundantemente presentes nos microvilos da câmara do GC de larvas de *Ae. aegypti* ³⁴. Além disso, várias enzimas envolvidas na digestão terminal de proteínas como aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases, e na digestão terminal de carboidratos, como α e β -glicosidases, são ligadas à membrana dos microvilos do GC de outros insetos ³⁵. Dentre esses tipos de enzimas, aminopeptidases N já foram detectadas por imunolocalização na região dos microvilos do GC de *Ae. aegypti* ³⁶. A forte marcação para proteínas vista nos microvilos do GC das três espécies corrobora essa afirmação. Dessa forma, o grande investimento celular nessas membranas garante um eficiente sítio de atuação para reguladores iônicos e enzimas envolvidas na digestão final de carboidratos e proteínas no compartimento do GC.

A única espécie que apresentou marcação específica para lipídeos no GC foi *T. theobaldi*. Apesar de não terem sido observadas neste estudo, gotículas lipídicas foram vistas acumuladas no GC de larvas de *Ae. aegypti* por Wigglesworth ³⁷, 24h pós alimentação com óleo de oliva. A presença desses lipídeos no GC pode estar associada ao metabolismo normal das células, como foi sugerido para *Ae. aegypti* ³⁷, ou indica que as células do GC absorvem e acumulam lipídeos da dieta.

A observação em *T. theobaldi* da relação entre aspecto do conteúdo intestinal e morfologia do GC, onde os intestinos das larvas recém-alimentadas (cheios) possuíam GCs menores que os vazios, permite a inferência de que substâncias vão sendo acumuladas no GC à medida que o processo digestivo prossegue. Essa observação fortalece a hipótese do papel desse compartimento na digestão final de substâncias e acúmulo de material que não pode ser degradado ou absorvido ³⁸.

O conteúdo do GC é granuloso nas três espécies, e esses grânulos possuem forte marcação para proteínas e carboidratos. A formação desses grânulos pode ocorrer no sentido

de diminuir a osmolaridade do conteúdo do compartimento, facilitando o fluxo retrógrado do material parcialmente digerido pela ação das enzimas do AMG e PMG, juntamente com os fluidos vindos do PMG. No entanto, a composição exata desses grânulos, sua função e processo de síntese nunca foi investigada.

T. theobaldi foi a única espécie que apresentou conteúdo do GC escuro. A coloração negra apresentada no lúmen do GC de *T. theobaldi* parece estar relacionada com sua dieta predatória, pois outros artrópodes predadores também apresentam conteúdo intestinal escuro³⁹, o que pode ser o acúmulo de metabólitos resultante do processamento digestivo de dietas com alto teor de proteínas. Algumas células digestivas do GC de *T. theobaldi* apresentaram grânulos citoplasmáticos de conteúdo marrom, da mesma cor do conteúdo luminal desse compartimento. Dessa forma, é possível sugerir que as células têm a capacidade de absorver e processar os pigmentos escuros acumulados no lúmen cecal desta espécie.

As células digestivas do GC-in das larvas de todas as espécies apresentaram protrusões em direção ao lúmen do compartimento, e em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, as células do epitélio de transição do GC também apresentaram protrusões. Protrusões com descarregamento de grande parte do material citoplasmático são comuns no trato digestivo de insetos, e correspondem a secreções do tipo apócrina^{40,41}. Neste tipo de secreção, a célula perde uma porção do citoplasma, mas permanece íntegra. No GC de *Ae. aegypti* foram vistas células digestivas contendo fendas na borda em escova, com material citoplasmático externalizado juntamente com os núcleos para o lúmen do compartimento. Esta configuração é menos comum que a secreção apócrina, e se caracteriza como secreção do tipo holócrina, onde a célula acumula vesículas secretórias, até que todo o conteúdo celular é liberado como secreção. Secreções holócrinas também foram vistas no GC de outros insetos⁴¹.

A membrana cecal possui carboidratos neutros em sua composição, e baixa marcação para proteínas nas três espécies de mosquitos. Sua composição molecular parece similar à da matriz peritrófica, sendo provavelmente formada por uma rede de quitina e proteínas³⁸, no entanto, até hoje, nenhuma dessas duas estruturas extracelulares do intestino médio larval de mosquitos teve sua constituição definida. Os carboidratos neutros encontrados em sua estrutura provavelmente correspondem a moléculas de quitina, ou a porção glicídica de glicoproteínas, moléculas envolvidas na formação de todos os tipos de membranas extracelulares de insetos^{25,42}. Somado a isso, sua fraca marcação para proteínas permite inferir que a membrana cecal é principalmente constituída de carboidratos. Acredita-se que a função dessa membrana é produzir uma barreira semi-permeável, separando o conteúdo do espaço ectoperitrófico do

conteúdo do lúmen cecal³⁸. Ensaios de permeabilidade detectaram que as membranas cecais de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* são mais seletivas que suas MPs quanto ao peso molecular de substâncias⁴³, o que sugere que elas atuam restringindo a passagem de algumas moléculas parcialmente digeridas presentes no espaço ectoperitrófico, deixando passar para o compartimento do GC apenas aquelas de mais baixo peso molecular. Estas serão digeridas pelas enzimas envolvidas na digestão final de substâncias, abundantemente presentes nesse compartimento²⁷.

A membrana cecal de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* é amorfa e invisível em colorações convencionais, mas é fortemente eosinofílica (básica) e apresenta-se mais compacta e com aspecto esclerotizado em *An. gambiae*. A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água, tendo, portanto, a propriedade de formar camadas esclerotizadas em diversos órgãos de insetos⁴⁴. Sendo assim, a constituição da membrana cecal de *An. gambiae* provavelmente é diferente em relação à de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* por conter uma maior concentração de moléculas de quitina. Além disso, a presença de moléculas fortemente eosinofílicas na membrana cecal de *An. gambiae*, ausentes em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, indica que seu arcabouço proteico também deve ser diferente. Fortalecendo essa hipótese, foi visto por Edwards et al.⁴³ que a membrana cecal de *An. gambiae* é parcialmente permeável a moléculas de 42 kDa, enquanto que *Ae. aegypti* é parcialmente permeável a moléculas de 19.5 kDa. Isso indica que a membrana cecal de *An. gambiae* permite passagem de moléculas de mais alto peso molecular que a de *Ae. aegypti*, o que pode ser resultado da presença de distintos arcabouços moleculares na membrana cecal dessas espécies.

A membrana cecal é vista conectada a células delgadas que apresentaram morfologia similar nos intestinos médios das larvas das três espécies de mosquitos. Essas células marcam o início do epitélio da câmara do GC e são responsáveis pela síntese de seus componentes estruturais³⁰.

A entrada do GC de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* forma um microambiente anterior à membrana cecal, o que não é visto em *T. theobaldi*. A existência desse microambiente pode estar relacionada com a dieta detritívora dessas duas espécies, que requer um processamento diferente de nutrientes em relação à dieta predatória⁴⁵. A dieta predatória possui moléculas que são facilmente digeridas pelas enzimas digestivas, enquanto que a dieta detritívora possui compostos mais difíceis de digerir, como celulose, lignina e outros derivados de plantas^{39,46}. Possivelmente, as secreções fortemente marcadas para proteínas, vistas no epitélio de transição do GC de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, e não no de *T. theobaldi*, podem conter substâncias que

agem sobre os nutrientes vindos do fluido ectoperitrófico antes deles serem filtrados pela membrana cecal. Essas substâncias podem ser enzimas ou fluidos responsáveis pela alteração do pH do GC, e podem atuar otimizando o processo digestivo nessas duas espécies detritívoras.

Os intestinos médios das larvas das três espécies de mosquito possuem feixes de músculos circulares de maior diâmetro na entrada do GC em relação aos demais músculos dessa região e aos do AMG. Como o diâmetro muscular é diretamente proporcional a sua força tênsil⁴⁷, é possível sugerir que existe um movimento mais vigoroso de constrição nesse local, regulando a entrada do fluido ectoperitrófico para dentro do compartimento do GC.

Intestino médio anterior (AMG)

As células do AMG de ambos os estágios larvais das três espécies possuem borda em escova baixa, e o labirinto basal forma dobras delgadas altas e organizadas paralelamente umas às outras. É possível relacionar várias características a essa configuração das células. Uma delas é o baixo envolvimento do epitélio do AMG na absorção de substâncias que dependem de proteínas transportadoras, como é o caso de aminoácidos e glicose^{48,49}. Como dito anteriormente, os microvilos aumentam a superfície de contato entre os meios intra e extracelular, além de abrigarem diversos tipos de transportadores, enzimas e trocadores iônicos³³. Estes provavelmente estão presentes em pequena quantidade na membrana apical do AMG devido à baixa marcação de proteínas e pequena altura da borda em escova dessa região. Corroborando essa idéia, trocadores iônicos transmembrana V-ATPases e P-ATPases são ausentes nos microvilos do AMG de larvas de mosquitos^{34,50}, e o AMG de larvas de *An. gambiae* apresenta um baixo número de transcritos envolvidos no metabolismo de carboidratos e proteínas⁵¹. Ao mesmo tempo, as células do AMG apresentam um alto nível de expressão de genes ligados ao metabolismo e absorção de lipídeos⁵¹, os quais não são obrigatoriamente dependentes de transportadores de membrana⁹. Gotículas de lipídeos foram vistas acumuladas no AMG de larvas de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* no presente trabalho, o que sustenta essa afirmação.

O fato do AMG de larvas de *An. gambiae* não ter apresentado marcação de gotículas de lipídeos, ao contrário de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, e ainda assim apresentar alta expressão de genes envolvidos no metabolismo dessas moléculas⁵¹, leva a se considerar que nessa espécie, a absorção e o processamento de lipídeos é alta nessa região, mas não envolve formação de gotículas. Gotículas de armazenamento de lipídeo são compostas principalmente de

triacilgliceróis ⁵², e seu transporte para a hemolinfa envolve conversão em diacilgliceróis, os quais atravessam a membrana plasmática e se ligam a proteínas transportadoras do tipo lipoforinas. Larvas de *Ae. aegypti* apresentam diacilgliceróis como principal componente dessas lipoproteínas carreadoras, enquanto que larvas de *An. gambiae* possuem hidrocarbonetos como componente principal ⁵³. Isso é mais um indicativo de que na fase larval de *An. gambiae*, o processamento dos lipídeos absorvidos não envolve síntese de gotículas como ocorre em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*.

Sabe-se que larvas de mosquitos do gênero *Anopheles* não acumulam grande quantidade de reservas nutricionais, mesmo quando o alimento é abundante. Uma das explicações dadas para isso é que elas não possuem sifão respiratório e, por isso, gastam grande parte de suas vidas na superfície da água, tendo acesso principalmente a partículas de alimento flutuantes ⁵⁴. Estas partículas são menos recompensadoras nutricionalmente do que os detritos no do fundo ou em suspensão nos corpos d'água, o que resulta em reservas teneais mais baixas nesses mosquitos ⁵⁵. Tanto *Ae. aegypti* como *T. theobaldi* possuem sifão respiratório, o que permite que eles tenham acesso ao alimento presente em qualquer posição dos corpos d'água. Essa diferença também pode ser relacionada com o acúmulo de lipídeos no AMG de larvas de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, e sua ausência em *An. gambiae*.

Em contraste com a borda em escova baixa, o labirinto basal das células do AMG é altamente elaborado e ocupa grande proporção da altura celular ⁵⁰, o que permite sugerir que essas células possuem alta atividade de transportadores de membrana e trocadores iônicos em sua porção basal, além de envolverem elevado índice de intercâmbio de substâncias. De acordo com esta afirmação, V ATPases e P ATPases são abundantes no labirinto basal do AMG de *Aedes aegypti* ⁵⁰. Adicionalmente, os lipídeos absorvidos nas células digestivas da maioria dos insetos são processados e posteriormente conjugados com proteínas antes de sua transferência para a hemolinfa, processo que envolve a atuação de transportadores de membrana ^{56,57}. Sendo assim, o labirinto basal altamente desenvolvido no AMG de mosquitos provavelmente é um reflexo da especialização dessas células na troca de íons e transporte de lipídeos processados para a hemolinfa.

O epitélio do AMG apresentou diferenças morfológicas entre amostras de uma mesma espécie. Em algumas amostras, as células não apresentaram nenhum tipo de vesícula citoplasmática, porém, em outras, elas apareceram repletas de vesículas. Essa morfologia variável indica que o epitélio dessa região apresenta diversos fenótipos funcionais ao longo do processo digestivo. Em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, algumas vesículas corresponderam a

gotículas lipídicas, geralmente de grande tamanho nas células. No entanto, vesículas menores, com conteúdo proteico e eosinofílicas, também foram vistas com frequência e em grande quantidade. Concomitantemente, as células do AMG apresentaram protruções citoplasmáticas em direção ao lúmen, indicando a ocorrência de processos secretórios. De acordo com os diversos padrões de secreção descritos para insetos ^{41,58}, foi possível identificar que as três espécies apresentaram secreções do tipo apócrina envolvendo as vesículas citoplasmáticas. As configurações do citoplasma apical envolvidas nesse tipo de secreção em *An. gambiae* apresentaram destacamento de um conteúdo vesiculoso em direção ao lúmen. Já em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, vesículas eosinofílicas com conteúdo protéico pareceram fundir-se umas com as outras, formando uma grande vesícula, a qual se abria para o lúmen expulsando seu conteúdo. Portanto, é possível que o material contido nessas vesículas de secreção seja o mesmo nas três espécies de mosquitos, mas o mecanismo de secreção é diferente em *An. gambiae* em relação a *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*.

O epitélio do AMG de *T. theobaldi* variou de pavimentoso a prismático, em contraste com o epitélio do AMG de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, cujas células apareceram sempre prismáticas. Essa variação maior vista em *T. theobaldi* pode ser um reflexo de sua dieta predatória, onde um grande volume de alimento é internalizado de uma só vez, requerendo maior plasticidade de suas células no sentido de acomodar o bolo alimentar. Essa variação também é vista no intestino médio de fêmeas hematófagas de mosquitos, onde grande volume de sangue é internalizado rapidamente, levando a um forte estiramento das células do PMG ⁵⁹.

Intestino médio posterior (PMG)

As células do PMG das três espécies de mosquitos possuem borda em escova alta, e labirinto basal com invaginações emaranhadas e dispostas em diversas direções. Essa configuração é similar àquela encontrada no GC, o que sugere que esses dois compartimentos tem funções semelhantes. Corroborando essa idéia, as bombas iônicas P e V-ATPases possuem distribuição e abundância similares nas especializações de membrana dos dois compartimentos ^{34,60} Além disso, ambas as regiões do intestino médio larval de *An. gambiae* apresentam alta expressão gênica de transcritos envolvidos no metabolismo de proteínas e carboidratos ⁵¹.

Apesar das semelhanças entre essas duas regiões, uma diferença importante é que as células do PMG são geralmente colunares altas, em contraste com as células do GC, normalmente achatadas. A maior altura dessas células em relação ao GC pode estar ligada a

uma grande quantidade de síntese e armazenamento de materiais de secreção. Como visto para as três espécies de mosquitos, a porção apical do citoplasma apresentou protruções citoplasmáticas entre fendas da borda em escova. De acordo com a morfologia dessas protruções, é possível sugerir que estas correspondem a secreções do tipo apócrina ^{41,61}, pois envolvem o descarregamento de grande parte do conteúdo citoplasmático em direção ao lúmen. O conteúdo desse material possui grânulos espalhados fortemente marcados para proteínas e grânulos de carboidratos neutros em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, além de aparecer esbranquiçado nas colorações convencionais. No entanto, *An. gambiae* apresentou uma forte marcação para proteínas homogeneamente distribuídas, e ausência de grânulos de carboidratos neutros, indicando que ele possui uma composição química diferente.

Material morfológicamente similar ao visto nas protruções do PMG de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apareceu acumulado em maior quantidade nas células da porção posterior dessa região. Células secretórias são comuns nos intestinos médios de insetos, e geralmente acumulam substâncias até que haja um sinal para sua liberação ⁶¹. Em mosquitos, não existe especialização de células no PMG, porém, as células da porção posterior dessa região nessas duas espécies devem apresentar uma atividade secretória maior que as células de sua porção mais anterior. Esse material foi ausente em *An. gambiae*, o que leva a se considerar que nessa espécie as secreções não são estocadas previamente dentro das células.

Células enteroendócrinas FMRF-positivas foram vistas no PMG dos estágios de L3 e L4 de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Em adultos dessas duas espécies, elas também são encontradas no PMG ^{8,13}. Os neuropeptídeos FMRF pertencem a uma família de peptídeos de sequência curta de aminoácidos classificados como potenciais moduladores da atividade sináptica de neurônios ⁶². Sua presença é bastante difundida em invertebrados, onde são comumente encontrados tanto em neurônios, como em células enteroendócrinas ⁶²⁻⁶⁵. Sua exata função no intestino médio de insetos é desconhecida, mas acredita-se que eles podem ter papel no controle da contração muscular do trato digestivo ^{62,66}. O padrão de marcação de células enteroendócrinas FMRF-positivas em larvas de *T. theobaldi* foi diferente de *Ae. aegypti*. No primeiro, as células apareceram agrupadas, enquanto neste último, elas estão individualizadas. Uma possível explicação para esse fato é de que o maior número de feixes musculares por anel vistos em *T. theobaldi*, em contraste com a presença de apenas um feixe de fibras por anel em *Ae. aegypti*, pode requerer um maior número de células enteroendócrinas atuando no controle de sua função de contração.

Histoquímica de carboidratos do GC, AMG e PMG

Na maioria das amostras das três espécies de mosquitos, foi vista marcação de carboidratos neutros no citoplasma das células digestivas ao longo de todo o intestino médio. Em *An. gambiae*, essa marcação correspondeu principalmente a grânulos individualizados, que foram vistos principalmente no GC e PMG. Células digestivas comumente acumulam glicogênio durante o processo absorptivo. A glicose absorvida pelo intestino de insetos é rapidamente convertida em trealose, dissacarídeo solúvel utilizado prontamente como fonte de energia pelas células. Este é posteriormente convertido em glicogênio, que é um polissacarídeo insolúvel, e portanto promove a diminuição da osmolaridade no interior das células absorptivas, facilitando a captação de mais moléculas de glicose⁶⁷. Dessa forma, grande parte dos grânulos PAS positivos vistos nos intestinos médios das larvas das três espécies de mosquitos provavelmente correspondem a glicogênio. A visualização de maior quantidade de grânulos no GC e PMG em comparação com o AMG em *An. gambiae* está de acordo com os achados de que as células do GC e PMG possuem alto índice de transcritos envolvidos no metabolismo de carboidratos, enquanto que, no AMG, esse índice é baixo⁵¹.

Em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, a marcação de carboidratos neutros foi intensa em todas as regiões, de forma que foi impossível analisar a localização de grânulos de glicogênio. Essa marcação intensa não foi vista em nenhuma amostra de *An. gambiae*. Glicoproteínas do tipo mucinas (glycoprotein like-mucins) são PAS positivas pelo seu alto grau de glicosilação e sabe-se que elas são sintetizadas e secretadas pelas células intestinais de insetos para fazer parte da trama molecular da matriz peritrófica^{25,68}. Em *D. melanogaster*, mais de 30 genes foram descritos como correspondentes a proteínas relacionadas a mucinas (mucin-like proteins)⁴², e a existência de uma camada mucosa em seu intestino médio é sugerida devido a positividade para PAS apresentada pela superfície das células epiteliais do órgão^{69,70}. As mucinas tem papel de lubrificação e proteção da mucosa intestinal, tanto contra microorganismos invasores⁴², como contra forças agressivas externas causadas pelo atrito do alimento ingerido⁷¹, e sua biologia é dinâmica, com grau de glicosilação variável^{71,72}. Apesar de não ser estabelecido claramente que insetos secretam muco no lúmen intestinal, este trabalho fornece forte evidência da ocorrência dessa secreção em mosquitos. A fraca marcação de grânulos PAS-positivos vista nos intestinos médios das larvas de *An. gambiae* em comparação com *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* pode ser um indicativo que eles apresentam uma baixa glicosilação de glicoproteínas do tipo mucina, ou que eles sintetizam essas moléculas em menor quantidade.

Organização muscular do intestino médio

Os músculos circulares do intestino médio de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* possuem um feixe de fibras por anel, enquanto *T. theobaldi* apresentou de 2 a 5 feixes por anel. Diferentemente da relação direta entre força muscular e diâmetro de um músculo, o número de fibras não tem esse mesmo propósito. Músculos compostos por um maior número de feixes musculares tem a propriedade de realizar movimentos mais regulados, também chamados movimentos finos⁷³. Portanto, o maior número de feixes de fibras visto nos músculos circulares de larvas de *T. theobaldi* pode ser relacionado com sua dieta predatória, indicando que a presença de um bolo alimentar mais robusto pode requerer movimentos peristálticos de diferentes intensidades.

Matriz peritrófica

A matriz peritrófica apresentou morfologia similar nas três espécies, e a marcação de N-acetil-glicosamina com WGA também revelou um padrão semelhante em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Embora não seja possível afirmar que a rede organizacional da matriz peritrófica é idêntica nessas três espécies, pois a análise foi feita apenas em nível de microscopia de luz, tudo indica que as diferentes dietas larvais, detritívora e predatória, não remetem diferentes organizações dessas matrizes. Como a dieta predatória envolve a presença de um inseto inteiro com carcaça rígida dentro do lúmen intestinal, e mesmo assim não apresentou diferenças morfológicas em comparação com as larvas de dieta detritívora, o papel de proteção das células intestinais contra danos mecânicos das matrizes peritróficas não pode ser atribuído a nenhuma característica específica²⁶. Dessa forma, é possível sugerir que as matrizes peritróficas de larvas de mosquitos tem função conservada, e sua morfologia é eficiente para ambos os tipos de dieta, detritívora e predatória.

4.2. Desenvolvimento do intestino médio

Células de menor altura, e com núcleos menores que os das células digestivas foram vistas entremeadas no epitélio digestivo de todas as regiões do intestino médio de ambas as fases das três espécies. Essas células apresentaram primórdios de microvilos, sugerindo processo de diferenciação⁷⁴. De acordo com a morfologia dessas células, elas correspondem a enteroblastos^{74,75}. Em larvas de Lepidoptera, é estabelecido que células tronco regenerativas do intestino médio proliferam antes de cada muda, e se transformam em enteroblastos, os quais se diferenciam em grupos e se intercalam entre as células poliploides maduras apenas durante o

processo de ecdise larval ^{74,75}. Para mosquitos, foi sugerida a existência de diferenciação dessas células em todos os estágios larvais. No entanto, nenhum estudo anterior a este confirmou a sua presença em mosquitos.

Os processos de diferenciação dos enteroblastos do intestino médio de larvas de mosquitos ocorrem individualmente. Não foram vistos grupos de enteroblastos vizinhos se diferenciando juntos, como ocorre em *Manduca sexta* ⁷⁴. Além disso, em mosquitos, esses eventos de diferenciação ocorrem ao longo do crescimento do inseto, e não apenas nas fases entre mudas.

Células mitóticas foram vistas espalhadas em todas as regiões do intestino médio, sem formação de agrupamentos, tanto em L3 quanto em L4 de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Eventos de mitose também ocorrem durante os estágios larvais de *Drosophila melanogaster* e *Manduca sexta*. Na primeira, as células regenerativas se proliferam continuamente nas fases larvais, mas se diferenciam apenas na larva de último instar, e em um momento próximo à pupação. Já em *M. sexta*, a proliferação acontece nas intermudas, assim como o processo de diferenciação, dito anteriormente. Em mosquitos, em concordância com a hipótese de Ray *et al* ⁷⁶, o processo parece ser diferente, pois as células regenerativas do intestino médio têm a propriedade de se dividir e se diferenciar continuamente durante os estágios larvais.

Como as células maduras do epitélio ao redor de onde os enteroblastos foram localizados não apresentaram nenhum sinal de dano, é prudente sugerir que os processos de diferenciação das células regenerativas não ocorrem apenas para substituir células danificadas ou perdidas, mas que elas possuem um papel no crescimento do intestino médio ao longo dos estágios larvais, como sugerido anteriormente ⁷⁶.

Portanto, o desenvolvimento do intestino médio larval em mosquitos envolve aumento do tamanho do órgão, o qual se dá tanto por aumento do volume das células já diferenciadas ⁷⁶, quanto por aumento do número total de células. Ambos os processos ocorrem continuamente, não sendo restritos às intermudas, com células proliferando ao mesmo tempo que novas células se diferenciam.

4.3. Evolução

De acordo com os dados morfológicos obtidos nesse trabalho, é possível apontar várias características similares e divergentes entre as três espécies estudadas (Tabela 1). A família Culicidae é monofilética e subdividida em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae ^{5,12}.

Anophelinae engloba o gênero *Anopheles*, enquanto Culicinae inclui *Aedes* e *Toxorhynchites*. A classificação filogenética mais recente posiciona *Anopheles* como mais basal em relação a *Aedes* e *Toxorhynchites*, os quais, por sua vez, são filogeneticamente mais próximos (Figura 19, Adaptada) ¹².

Neste trabalho, fica claro que várias características são compartilhadas entre *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, como a distribuição de carboidratos nas células do intestino médio; tendência ao armazenamento de material de secreção, os quais apresentaram composição similar nas células do PMG; morfologia da membrana cecal; formato triangular das células basais, e acúmulo de gotículas de lipídeo no AMG. Como as larvas de *Ae. aegypti* são detritívoras e as de *T. theobaldi* são predadoras, e ainda assim se assemelham em relação a essas características, infere-se que tais semelhanças estão relacionadas com o maior grau de parentesco entre essas duas espécies, não estando ligadas à dieta.

O formato do apêndice do GC, apresentando duas protuberâncias, na região superior e na inferior, pode constituir uma característica basal, compartilhada entre *An. gambiae* e *T. theobaldi*. Como os mosquitos do gênero *Anopheles* divergiram antes dos demais membros do táxon, há um indicativo de que essa configuração representa o GC do ancestral de todos os Culicidae.

Uma evidência importante a ser considerada é a morfologia mais simples da entrada do GC de *T. theobaldi*, a qual possui células morfologicamente similares às do AMG. Em relação à evolução dos órgãos, sabe-se que configurações mais simples surgem primeiro, e se modificam ao longo do tempo, aumentando em complexidade e tendendo a especialização ⁷⁷. Desde que o GC tem origem como um brotamento de células do AMG, a presença de células morfologicamente idênticas às do AMG tanto nas transições entre cárdia e GC, e entre este e o AMG, mostra que não houve especialização das células da entrada desse compartimento, indicando que a conformação do GC de *T. theobaldi* representa uma característica basal.

Um dos fenômenos evolutivos que estão envolvidos no processo de diversificação dos organismos é a convergência adaptativa. Através desse fenômeno, pressões seletivas iguais levam um determinado grupo a adquirir características similares, mesmo que elas sejam de linhagens não relacionadas ⁷⁸. Isso poderia explicar o fato de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* apresentarem uma microrregião anterior ao compartimento do GC que é isolado pela membrana cecal (GC-in). Provavelmente, a origem dessa modificação foi independente, pois as células do GC-out em *Ae. aegypti* tem topologia irregular, e borda em escova baixa em relação à das células do GC-in. Contrariamente, em *An. gambiae*, as células do GC-out possuem morfologia

similar em relação às do GC-in, achatadas e com borda em escova alta. Dessa forma, é possível hipotetizar que uma mesma pressão seletiva pode ter sido responsável pela especialização das células do GC-out dessas duas espécies, mas a origem da formação da microrregião anterior ao GC-in foi independente.

O fato da morfologia do GC de *T. theobaldi* apresentar duas protuberâncias, assim como *An. gambiae*, somado à histologia mais simples desse compartimento em relação ao de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, fornece um forte indicativo de que o intestino médio larval do gênero *Toxorhynchites* preservou essas características do ancestral de Culicidae. Não se sabe se essa morfologia está atrelada ao hábito predatório, pois não há nenhum relato na literatura sobre morfologia do intestino médio de outras larvas predadoras de mosquitos. No entanto, sabe-se que dois gêneros de culicíneos da tribo Sabethini (*Malaya* e *Topomya*), cujos representantes foram posicionados em um grupo-irmão de *Toxorhynchites*, também possuem larvas predadoras, e compartilham várias características morfológicas com o gênero^{2,5}. Já foi relatado que larvas de *Anopheles* e *Aedes* apresentam comportamento de canibalismo⁷⁹⁻⁸¹, e a forma como elas sugam a presa é similar à apresentada por *T. theobaldi*. Isso gera um forte indício de que o ancestral de Culicidae apresentava larvas predadoras, e que a dieta detritívora seria uma condição derivada, a qual pode ter se originado pela mesma pressão seletiva que levou à especialização das células do GC-out nessas espécies.

As características exclusivas de *T. theobaldi* relativas ao maior número de feixes de fibras por anel de músculo circular, células epiteliais variando de pavimentosas a colunares altas no PMG, presença de um conteúdo negro no GC, e ausência de uma microrregião anterior ao GC-in, como explicado anteriormente, parecem estar ligadas ao seu comportamento alimentar predatório. As duas primeiras características provavelmente estão ligadas ao grande tamanho do bolo alimentar dessa espécie, o qual é ingerido de uma só vez, enquanto as duas últimas características provavelmente se relacionam com a composição química da dieta predatória.

Devido às grandes diferenças encontradas no epitélio do GC entre as espécies estudadas, possivelmente essa região do intestino médio foi constante alvo de pressões seletivas, as quais originaram fenótipos tão variados. Como o GC foi a região do intestino médio larval que mais apresentou diferenças morfológicas passíveis de ser relacionadas à composição da dieta, é possível afirmar que esse compartimento está envolvido com algum papel essencial do processamento de nutrientes dieta-específico. Dessa forma, apesar de ser muitas vezes ignorado, fica clara a importância em especial desse compartimento para a fisiologia do intestino médio larval de mosquitos.

Por fim, o estudo do intestino médio de larvas de mosquitos tem sido restrito a trabalhos de toxicologia, diversidade de bactérias, ou focado a características muito específicas envolvendo biologia molecular^{50,51,82-84}. Surpreendentemente, nenhum estudo realizou uma análise morfológica completa do órgão na fase larval de mosquitos até o momento. Visto que a morfologia das células do intestino médio desses insetos é variável, e pôde ser relacionada com diversas características moleculares, esse estudo comparativo envolvendo três espécies de diferentes gêneros de mosquitos pode servir de guia no embasamento de futuros trabalhos relacionados com evolução e funcionamento do trato digestivo de mosquitos.

5. Conclusão

Apesar de serem filogeneticamente distantes dentro de Culicidae, *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, e *T. theobaldi* compartilham características básicas que diferenciam as três regiões do intestino médio larval, como as que envolvem formato do núcleo, disposição e configuração das especializações das membranas apicais e basais. Os eventos relativos ao desenvolvimento do intestino médio, como diferenciação celular, mitose e apoptose também são semelhantes. No entanto, diversas características morfológicas variaram entre as espécies e puderam ser relacionadas tanto com o parentesco evolutivo como com o tipo de dieta. Este trabalho deixa claro que larvas de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, filogeneticamente mais relacionadas, compartilham diversas características do órgão que diferem em *An. gambiae*, apesar dos distintos tipos de dieta. A variação morfológica do GC entre as espécies pareceu estar ligada com a composição química da dieta, enquanto a morfologia da matriz peritrófica não foi afetada. Trabalhos de toxicologia envolvendo larvas de mosquitos de importância médica deveriam focar mais atenção ao GC, compartimento comumente ignorado, mas que, ao que tudo indica, pode ser potencialmente afetado pela ação de inseticidas. *T. theobaldi* apresentou um GC de histologia simples em relação ao de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*. Levando em conta as adversidades da dieta detritívora e o fato de que larvas de mosquitos comumente apresentam canibalismo, tudo indica que a condição predadora é uma característica ancestral de Culicidae. Futuros trabalhos envolvendo a comparação da composição química do conteúdo do GC de larvas de *Toxorhynchites* com a do GC de larvas detritívoras de mosquitos seriam importantes para entender que tipos de enzimas e/ou outros compostos podem estar envolvidos com as diferenças morfológicas encontradas neste trabalho, além de revelar novos indícios sobre a provável ancestralidade predadora larval de Culicidae.

6. Referências

1. Calvez, E. *et al.* Genetic Diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–17 (2016).
2. Harbach R. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* **1668**, 591–638 (2007).
3. Mitchell, A., Sperling, F. A. H. & Hickey, D. A. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for *Toxorhynchites*. *Insect Syst. Evol.* **33**, 163–174 (2002).
4. Shepard, J. J., Andreadis, T. G. & Vossbrinck, C. R. Molecular phylogeny and evolutionary relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the northeastern United States based on small subunit ribosomal DNA (18S rDNA) sequences. *J. Med. Entomol.* **43**, 443–54 (2006).
5. Reidenbach, K. R. *et al.* Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol. Biol.* **9**, 1–14 (2009).
6. Anthwal, N. & Tucker, A. S. Q&A: Morphological insights into evolution. *BMC Biol.* **15**, 1–4 (2017).
7. Wang, M.-S., Adeola, A. C., Li, Y., Zhang, Y.-P. & Wu, D.-D. Accelerated evolution of constraint elements for hematophagic adaptation in mosquitoes. *Zool. Res.* **36**, 320–327 (2015).
8. Godoy, R. S. M., Fernandes, K. M. & Martins, G. F. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep.* **5**, 1–16 (2015).
9. Terra, W. Evolution of digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* **35**, 181–200 (1990).
10. Billingsley, P. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* **35**, 219–248 (1990).
11. Truman, J. W. & Riddiford, L. M. The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447–452 (1999).

12. Narayanan Kutty, S., Wong, W. H., Meusemann, K., Meier, R. & Cranston, P. S. A phylogenomic analysis of Culicomorpha (Diptera) resolves the relationships among the eight constituent families. *Syst. Entomol.* **43**, 434–446 (2018).
13. Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E. & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol. Int.* **63**, 506–512 (2014).
14. Lounibos, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 233–266 (2002).
15. Patterson, J., Sammon, M. & Garg, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *West. J. Emerg. Med.* **17**, 671–679 (2016).
16. Cirimotich, C. M. *et al.* Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science (80-.)*. **332**, 855–858 (2011).
17. Collins, L. E. & Blackwell, A. The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol News Inf.* **21**, 105N–116N (2000).
18. Gouveia de Almeida, A. P. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: Desafios para o século XXI. *Acta Med. Port.* **24**, 961–974 (2011).
19. Garcia-Sánchez, D. C., Pinilla, G. A. & Quintero, J. Ecological characterization of *Aedes aegypti* larval habitats (Diptera: Culicidae) in artificial water containers in Girardot, Colombia. *J. Vector Ecol.* **42**, 289–297 (2017).
20. Juliano, S. A. & Gravel, M. E. Predation and the evolution of prey behavior: an experiment with tree hole mosquitoes. *Behav. Ecol.* **13**, 301–311 (2002).
21. Millado, J. B. H. & Sumalde, A. C. Voracity and prey preference of philippine population of *Toxorhynchites spledens* Wiedemann (Diptera: Culicidae) among *Aedes spp.* (Diptera, Culicidae). *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Publ. Health.* **49**, (2018).
22. Townson, H. The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). *Bull. Entomol. Res.* **83**, 307–308 (1993).
23. Chapman, R. F., Douglas, A. E. & Chapman, R. F. Alimentary canal, digestion and absorption. *The Insects* (2012). doi:10.1017/cbo9781139035460.006

24. Billingsley, P. F. & Lehane, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. *Biol. Insect Midgut* 3–30 (2011). doi:10.1007/978-94-009-1519-0_1
25. Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. & Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* **54**, 285–302 (2009).
26. Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* **42**, 525–550 (2002).
27. Terra, W. R., Ferreira, C. & de Bianchi, A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* **25**, 487–494 (1979).
28. Bernick, E. P., Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* **39**, 277–292 (2007).
29. da Silva, H., Godoy, R. S. M. & Martins, G. F. The basic plan of the adult heart is conserved across different species of adult mosquitoes, but the morphology of heart-associated tissues varies. *J. Med. Entomol.* **56**, 984–996 (2019).
30. Volkmann, A. & Peters, W. Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae-I. Fine structure. *Tissue Cell* **21**, 243–251 (1989).
31. Peters, R. H. Physiological correlates of size. in *The Ecological Implications of Body Size* 45–53 (Cambridge University Press, 1983). doi:10.1017/CBO9780511608551.005
32. Pavelka, M. & Roth, J. Basal labyrinth. (2010). doi:10.1007/978-3-211-99390-3_93
33. Lange, K. Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J. Cell. Physiol.* **226**, 896–927 (2011).
34. Patrick, M. L., Aimanova, K., Sanders, H. R. & Gill, S. S. P-type Na⁺ / K⁺ -ATPase and V-type H⁺ -ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. 4638–4651 (2006). doi:10.1242/jeb.02551
35. Ferreira, C. & Terra, W. R. Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem.*

- Physiol. Part B Biochem.* **66**, 467–473 (1980).
36. Manley, G. Public Access NIH Public Access. **71**, 233–236 (2013).
 37. Clements, A. N. *The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction*. (Chapman & Hall, 1992).
 38. Volkmann, A. & Peters, W. Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae-II. Functional aspects. *Tissue Cell* **21**, 253–261 (1989).
 39. Bowman, C. E. Gut contents, digestive half-lives and feeding state prediction in the soil predatory mite *Pergamasus longicornis* (Mesostigmata: Parasitidae). *Exp. Appl. Acarol.* **73**, 11–60 (2017).
 40. Li, K., Zhang, J. H., Yang, Y. J., Han, W. & Yin, H. Morphology and fine organization of the midgut of *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *PLoS One* **13**, 1–13 (2018).
 41. Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F. & Terra, W. R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* **47**, 143–155 (2001).
 42. Syed, Z. A., Härd, T., Uv, A. & van Dijk-Härd, I. F. A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. *PLoS One* **3**, (2008).
 43. Edwards, M. J. & Jacobs-Lorena, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J. Insect Physiol.* **46**, 1313–1320 (2000).
 44. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603–632 (2006).
 45. Rossi, L., di Lascio, A., Carlino, P., Calizza, E. & Costantini, M. L. Predator and detritivore niche width helps to explain biocomplexity of experimental detritus-based food webs in four aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecol. Complex.* **23**, 14–24 (2015).
 46. Louzada, J. & Nichols, E. Detritivorous Insects. *Insect Bioecology Nutr. Integr. Pest Manag.* 397–415 (2012). doi:10.1201/b11713-20
 47. Smith, D. S. The structure of insect muscles. in *Insect Ultrastructure: Volume 2* (orgs.

- King, R. C. & Akai, H.) 111–150 (Springer US, 1984). doi:10.1007/978-1-4613-2715-8_4
48. Castagna, M. *et al.* Molecular characteristics of mammalian and insect amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. *J. Exp. Biol.* **200**, 269–86 (1997).
 49. Wang, M. yun & Wang, C. Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Lett.* **317**, 241–244 (1993).
 50. Zhuang, Z., Linser, P. J. & Harvey, W. R. Antibody to H(+) V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Exp. Biol.* **202**, 2449–60 (1999).
 51. Neira Oviedo, M., Vanekeris, L., Corena-Mcleod, M. D. P. & Linser, P. J. A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Mol. Biol.* **17**, 61–72 (2008).
 52. Arrese, E. L. & Soulages, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207–225 (2010).
 53. Atella, G. C., Silva-Neto, M. A. C., Golodne, D. M., Arefin, S. & Shahabuddin, M. *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 375–386 (2006).
 54. Timmermann, S.E.; Briegel, H. Water depth and larval density affect development and accumulation of reserves in laboratory populations of mosquitoes. *Bull. Soc. Vector Ecol.* **18**, 174–187 (1993).
 55. Hernández-Martínez, S. *et al.* Juvenile hormone controls ovarian development in female *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
 56. Canavoso, L. E. & Wells, M. A. Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 783–790 (2001).
 57. Beenackers, A. M. T., der Horst, D. J. Van & Marrewijk, W. J. A. Van. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res.* **24**, 19–67 (1985).
 58. Terra, W. R. & Ferreira, C. 4.5 - Biochemistry of digestion. in *Comprehensive Molecular*

- Insect Science* (org. Gilbert, L. I.) 171–224 (Elsevier, 2005). doi:<https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00053-3>
59. Park, S. S. & Shahabuddin, M. Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *J. Struct. Biol.* **129**, 30–37 (2000).
 60. Pullikuth, A. K. Molecular characterization of sodium/proton exchanger 3 (NHE3) from the yellow fever vector, *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* **209**, 3529–3544 (2006).
 61. Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Machado, E. A. & Miranda, K. Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tissue Res.* **352**, 313–326 (2013).
 62. Li, C. & Kim, K. Neuropeptides. *WormBook* 1–36 (2008). doi:10.1895/wormbook.1.142.1
 63. Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Sci.* **5**, (2014).
 64. TG, G. *et al.* The pharmacology of FMRFamide-related neuropeptides in nematodes: New opportunities for rational anthelmintic discovery? *Int. J. Parasitol.* **25**, 1273–1280 (1995).
 65. Oliveira, A. H. *et al.* Morphology and morphometry of the midgut in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). *Insects* **10**, (2019).
 66. LaJeunesse, D. R., Johnson, B., Presnell, J. S., Catignas, K. K. & Zapotoczny, G. Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. *BMC Physiol.* **10**, 14 (2010).
 67. Trehalose. in *Encyclopedia of Entomology* (org. Capinera, J. L.) 3901 (Springer Netherlands, 2008). doi:10.1007/978-1-4020-6359-6_2525
 68. Shi, X. *et al.* Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 1101–1115 (2004).
 69. Lemaitre, B. & Miguel-Aliaga, I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu.*

- Rev. Genet.* **47**, 377–404 (2013).
70. Buchon, N. *et al.* Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* **3**, 1725–1738 (2013).
 71. Wagner, C. E., Wheeler, K. M. & Ribbeck, K. Mucins and Their Role in Shaping the Functions of Mucus Barriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 189–215 (2018).
 72. Corfield, A. P. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 236–252 (2015).
 73. Rods, M. R., Rice, C. L. & Vandervoort, A. A. Age-related changes in motor unit function. *Muscle and Nerve* **20**, 679–690 (1997).
 74. Baldwin, K. M. & Hakim, R. S. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molting in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* **23**, 411–422 (1991).
 75. Loeb, M. The role of stem cells in midgut growth and regeneration 1. 338–342 (2001).
 76. Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y. & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *J. Insect Sci.* **9**, 1–13 (2010).
 77. Schmidt-Rhaesa, A. Intestinal systems. in *The Evolution of Organ Systems* (Oxford University Press, 2007). doi:10.1093/acprof:oso/9780198566687.003.0012
 78. Castoe, T. A., de Koning, A. P. J. & Pollock, D. D. Adaptive molecular convergence: Molecular evolution versus molecular phylogenetics. *Commun. Integr. Biol.* **3**, 67–69 (2010).
 79. Koenekoop, R. & Livdahl, T. Cannibalism among *Aedes triseriatus* larvae. *Ecol. Entomol.* **11**, 111–114 (1986).
 80. Porretta, D. *et al.* Intra-instar larval cannibalism in *Anopheles gambiae* (s.s.) and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* **9**, 1–9 (2016). doi:10.1186/s13071-016-1850-5
 81. Mastrantonio, V. *et al.* Cannibalism in temporary waters: Simulations and laboratory experiments revealed the role of spatial shape in the mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS One* **13**, e0198194 (2018).

82. Leite, A. C. C. F. *et al.* Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **22**, 517–521 (2012).
83. Boissière, A. *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* **8**, 1–12 (2012).
84. Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T. & Bhatnagar, R. K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* **9**, 96 (2009).

FIGURAS

Figura 1: A: Esquema geral do trato digestivo da fase larval de mosquitos. Adaptado de Okech *et al.*, 2018. B-D: Intestinos médios de larvas de *An. gambiae* (B), *Ae. aegypti* (C), e *T. theobaldi* (D). GC: ceco gástrico; AMG: Intestino médio anterior; PMG: Intestino médio posterior; SG: glândulas salivares; CR: cárdia; MT: túbulos de malpighi; RG: reto; End: espaço endoperitrófico; asterisco: espaço ectoperitrófico; Cl: lúmen cecal; linha pontilhada: limite entre AMG e PMG.

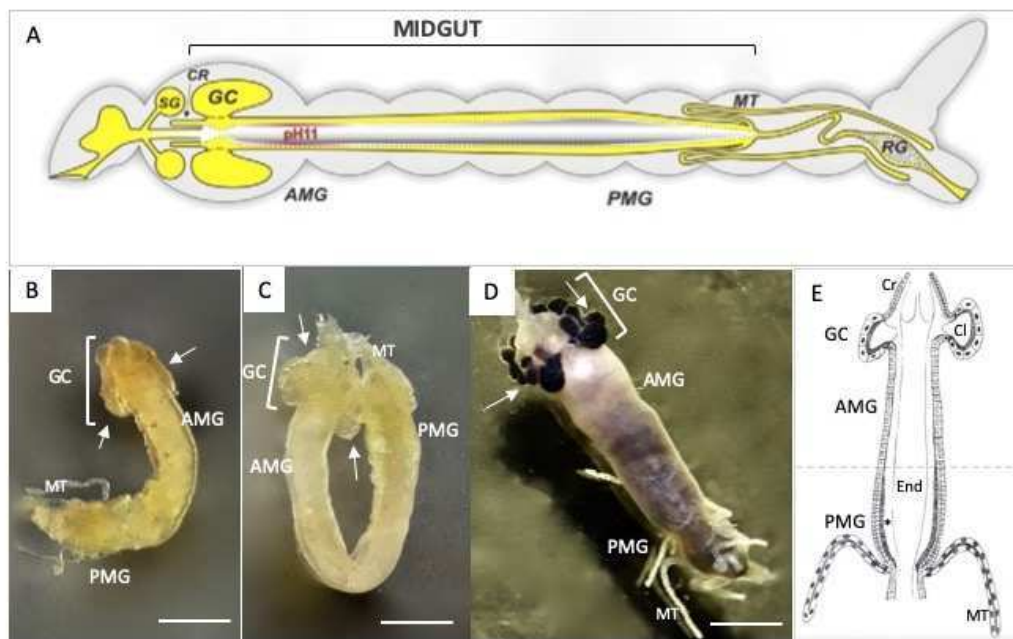


Figura 2: A-F: Histologia do ceco gástrico de larvas L3 (A, C, E) e L4 (B, D, F) de *An. gambiae* (A e B), *Ae. aegypti* (B e C) e *T. theobaldi* (E e F). Coloração: HE. BB: borda em escova; Lu: lúmen; Bl: labirinto basal; Nu: núcleos. Barras: 10 μ m.

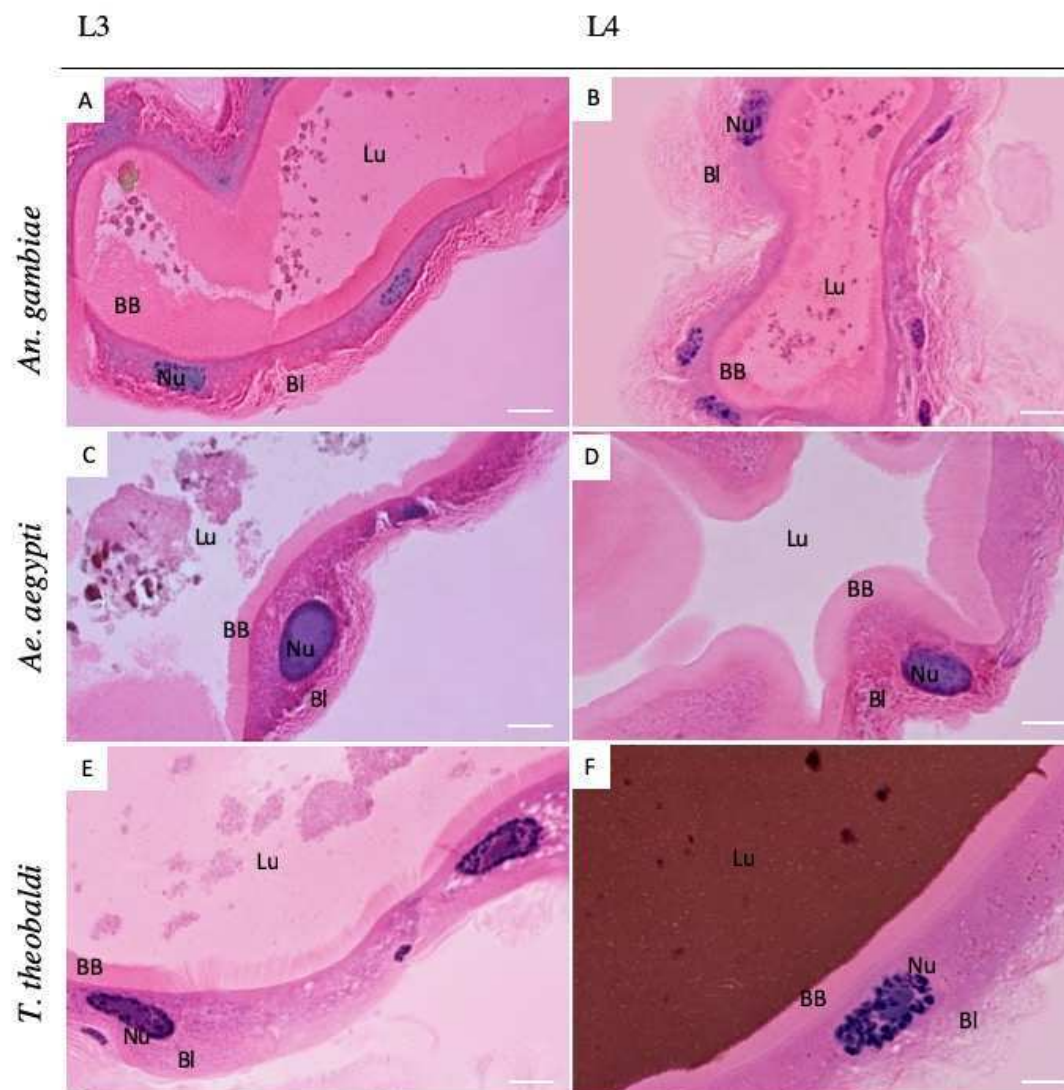


Figura 3: Epitélio do ceco gástrico (GC) de larvas de *An. gambiae* (A-C), *Ae. aegypti* (D) e *T. theobaldi* (E-I). **A:** Presença de conteúdo eosinofílico preenchido por grânulos amarronzados em L3 de *An. gambiae*. Coloração: HE. **B:** Histoquímica do GC de L4 de *An. gambiae*. O colóide (Co) e os grânulos (Gr) do lúmen do GC possuem proteínas na composição, com alta concentração delas nesse último. Coloração: Azul de bromofenol. **C:** Histoquímica do GC de L4 de *An. gambiae*. Os grânulos possuem alta concentração de carboidratos neutros. Coloração: PAS. **D:** Presença de grânulos (Gr) eosinofílicos no lúmen da câmara do GC de L3 de *Ae. aegypti*. Coloração: HE. **D inset:** Note que a borda em escova (asterisco) de *Ae. aegypti* é fortemente marcada para azul de bromofenol. **E:** GC de L3 de *T. theobaldi*. O conteúdo (Co) do lúmen (Lu) possui proteínas na composição e a borda em escova é intensamente marcada para proteínas. Coloração: Azul de bromofenol. **F:** Conteúdo do GC de L4 de *T. theobaldi* com carboidratos neutros na composição. Coloração: PAS. **G:** GC de L4 de *T. theobaldi*. O conteúdo do lúmen (Lu) possui coloração marrom. **G Inset:** Detalhe do citoplasma das células apresentando grânulos da mesma cor do colóide (Co) do lúmen (Lu). Coloração: HE. **H-I:** Presença de gotículas de lipídeo (setas) em L3 de *T. theobaldi*. Coloração: Tetróxido de ósmio e Azul de toluidina. Nu: núcleo; asterisco: borda em escova; Bl: labirinto basal. Barras: 10 μ m.

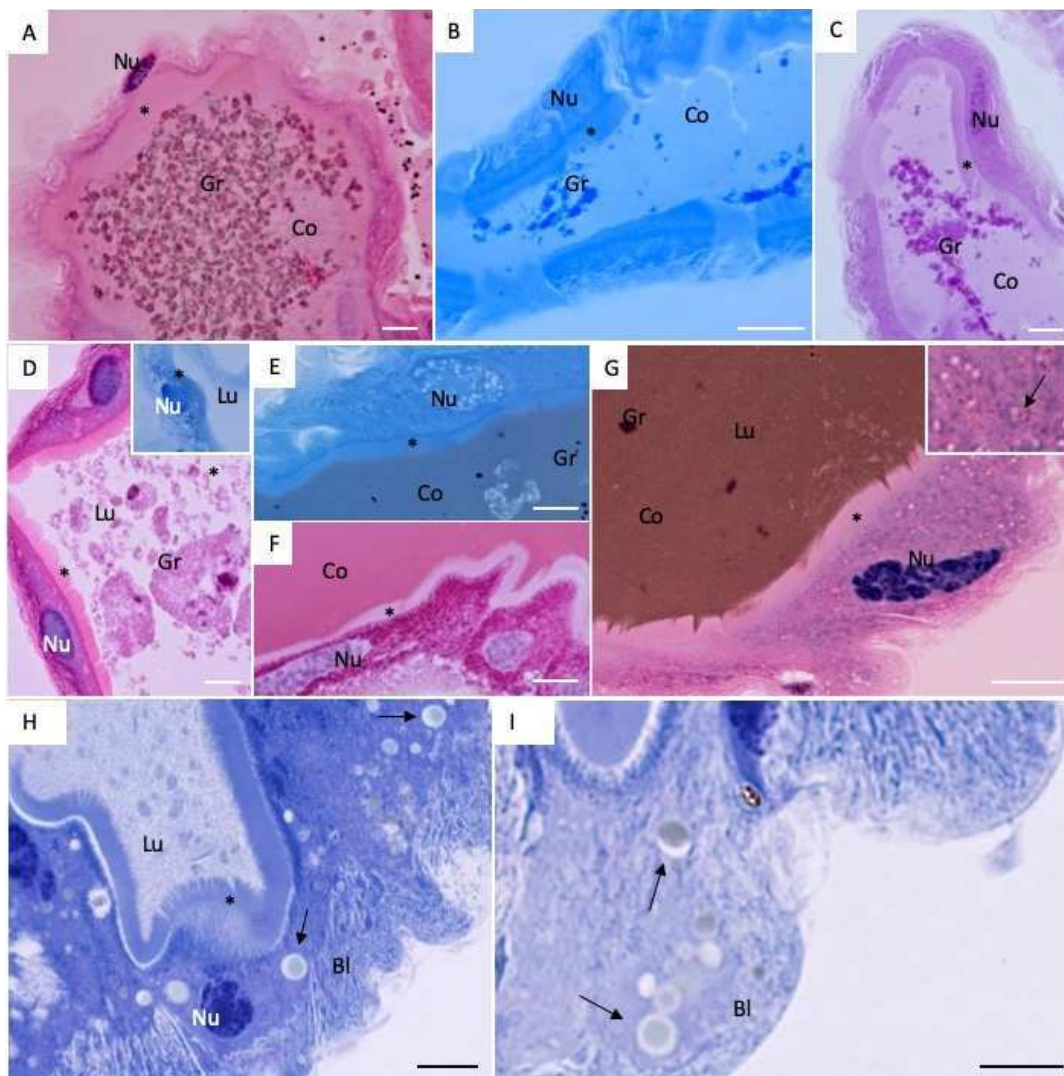


Figura 4: Membranas da entrada da câmara do ceco gástrico (GC) de larvas de *Ae. aegypti* (A), *An. gambiae* (B e D) e *T. theobaldi* (C, F e G). A: Membrana cecal amorfa de L4 de *Ae. aegypti*. Coloração: PAS. B: Membrana cecal córnea de L3 de *An. gambiae*. Coloração: PAS. C: Membrana cecal amorfa de L4 de *T. theobaldi*. Coloração: PAS. D: Detalhe da membrana cecal córnea de *An. gambiae*. E, F: Detalhe da membrana cecal amorfa de L4 de *T. theobaldi* em coloração HE (E) e coloração histoquímica de mercúrio bromofenol (F). G: Secção transversal da membrana cecal de de L3 de *T. theobaldi*. Coloração: PAS. ES: Espaço ectoperitrófico; Lu: lúmen da câmara do ceco gástrico; PM: matriz peritrófica; Gr: grânulos. Ep: epitélio; asterisco: borda em escova. Barras: 10 μ m. H-J: Detalhe das células delgadas (setas largas) de onde surge a membrana cecal (setas finas) de larvas L4 de *An. gambiae* (H), *Ae. aegypti* (I), e *T. theobaldi* (J). ES: espaço ectoperitrófico; Lu: lúmen; Nu: núcleo; GC-in: epitélio do GC que está isolado do restante do intestino pela membrana cecal; GC-out: epitélio de transição do GC; Gr: grânulos; Setas largas: membrana cecal; setas finas: células delgadas que dão origem à membrana cecal. Barras: 10 μ m.

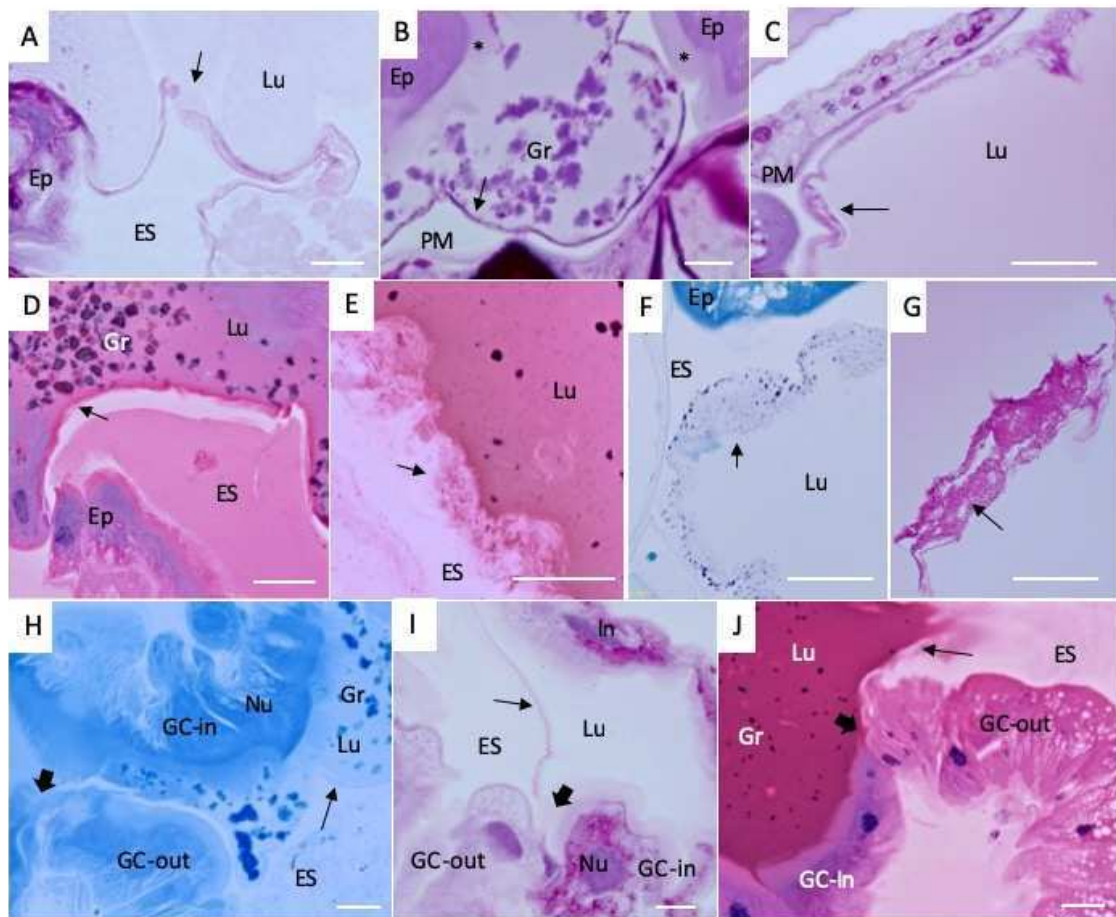


Figura 5: A-F: Comparação da entrada do ceco gástrico (GC-out) de L4 de *An. gambiae* (A), *Ae. aegypti* (B), e *T. theobaldi* (C) e seus respectivos detalhes (D), (E), (F). Note que as células da transição para o ceco gástrico (GC-out) em *An. gambiae* e *Ae. aegypti* são diferentes. Nesse primeiro, elas possuem borda em escova (asterisco) alta (D), enquanto no último a borda em escova é quase imperceptível (asterisco), e as células têm ápices irregulares (E). Em *T. theobaldi*, as células da transição são morfologicamente semelhantes às do AMG (F, setas largas). Note que em *An. gambiae* e *T. theobaldi*, o GC possui protuberâncias superiores (PS) e inferiores (PI), enquanto em *Ae. aegypti*, há apenas uma protuberância inferior (PI). CA: Epitélio da cárdia; AMG: Intestino médio anterior; setas: células que originam a membrana cecal. A, B, D e E: Coloração: HE. C e F: Coloração: azul de bromofenol. Ca: epitélio da cárdia; AMG: intestino médio anterior; setas pretas largas: membrana cecal; setas pretas finas: transição entre epitélio que fica em contato com o lúmen cecal e epitélio em contato com espaço ectoperitrófico; PM: matriz peritrófica; Lu: Lúmen do GC; GC-in: epitélio da porção do GC que é isolada do restante do intestino médio pela membrana cecal; setas brancas largas: semelhança morfológica entre epitélio de transição do GC e epitélio do AMG. Barras: 50 μ m.

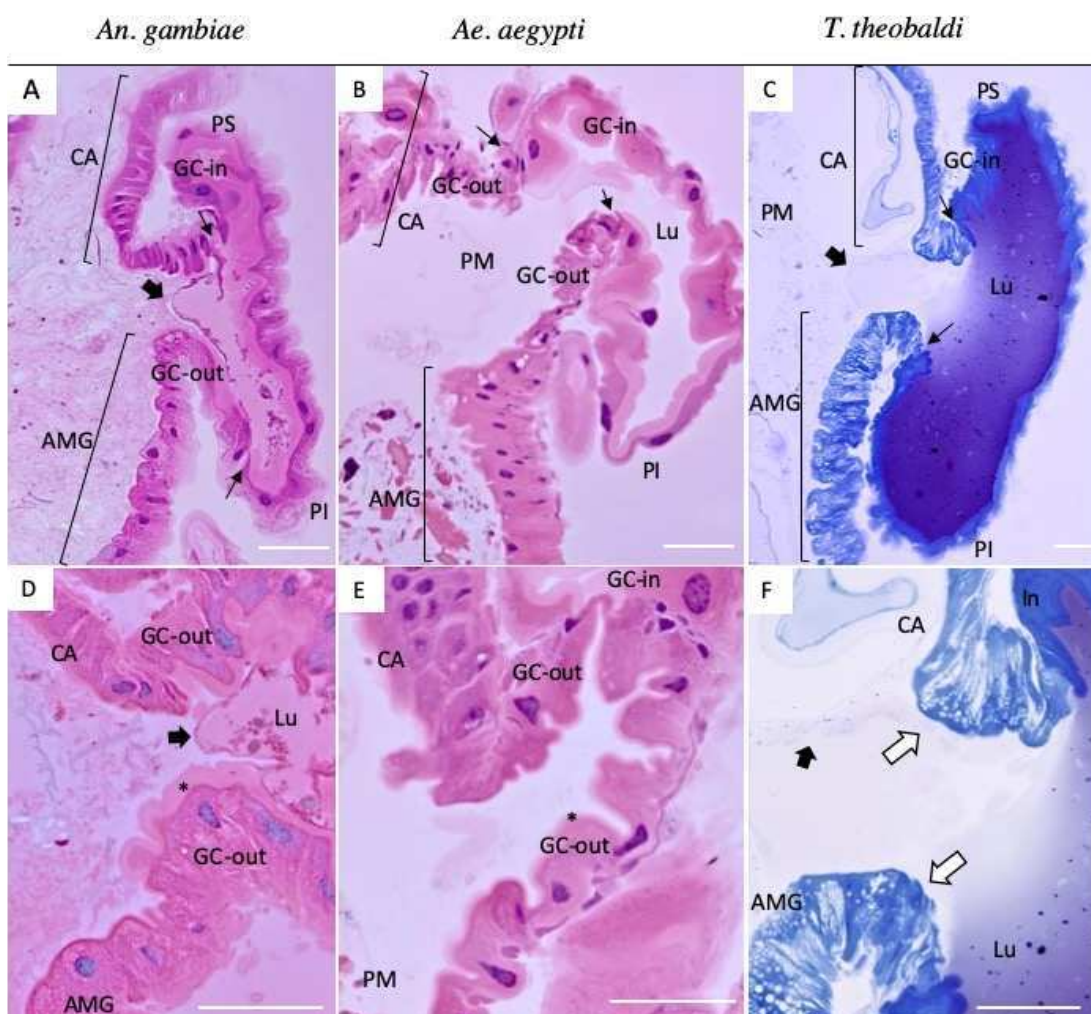


Figura 6: A-F: Histologia do intestino médio anterior (AMG) de larvas L3 (A, C, E) e L4 (B, D, F) de *An. gambiae* (A e B), *Ae. aegypti* (B e C) e *T. theobaldi* (E e F). PM: Matriz peritrófica; End: espaço endoperitrófico; Nu: núcleos; V: vesículas citoplasmáticas; MF: feixes musculares; BL: labirinto basal; asterisco: espaço ectoperitrófico. Coloração: HE. Barras: 10 μ m.

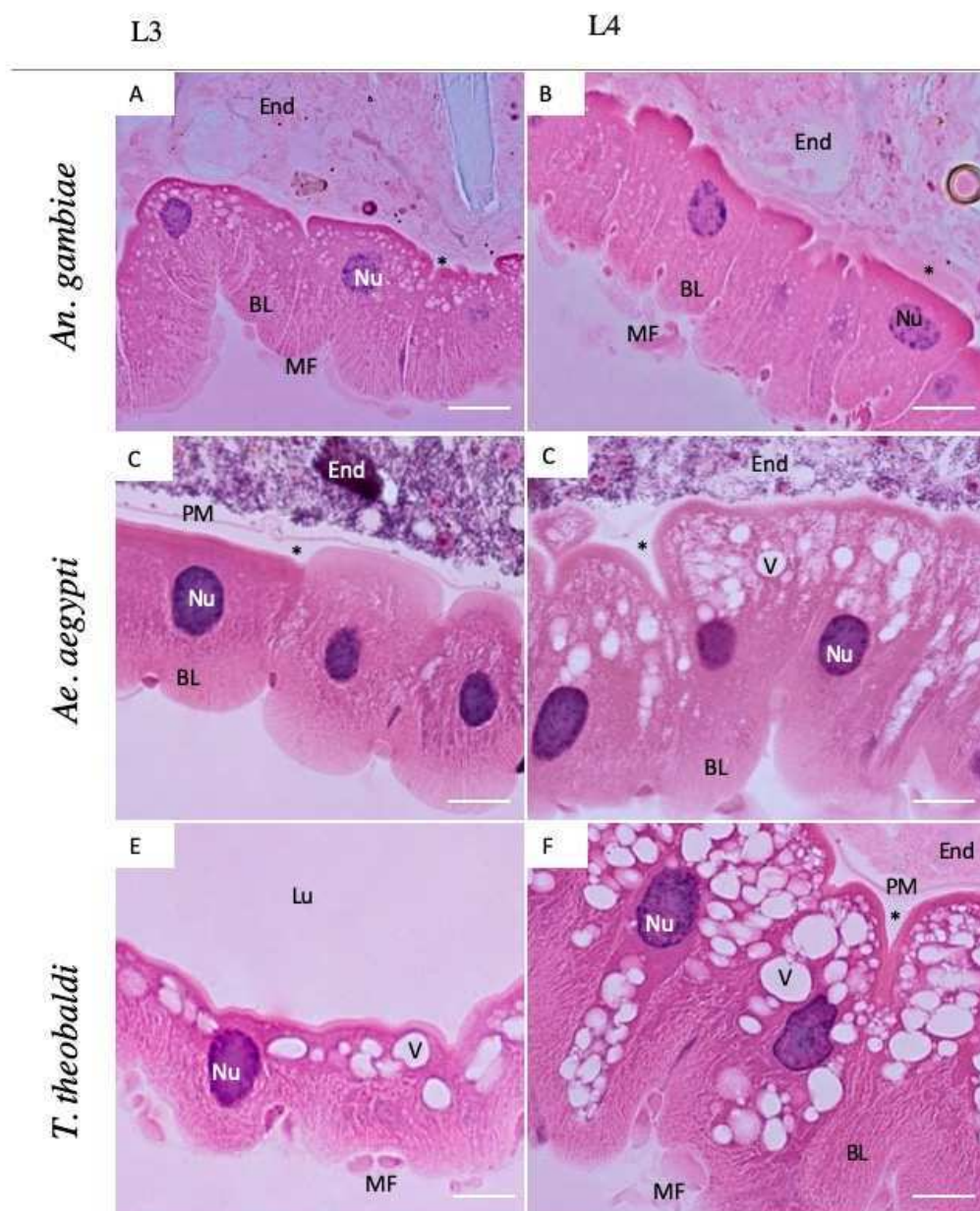


Figura 7: Detalhes das células do intestino médio anterior (AMG) de larvas de *Ae. aegypti* (A, G), *An. gambiae* (B) e *T. theobaldi* (C, D, E, F, G). **A-B:** Note a camada delgada da borda em escova (colchetes) (A), e o labirinto basal alto e paralelo (Bl), típico dessa região (B). Coloração: HE. **C e D:** Note a variação morfológica do AMG, apresentando poucas (C) ou muitas vesículas citoplasmáticas (D) (seta). Coloração HE. **E:** A borda em escova do AMG apresenta pouca marcação para proteínas. Coloração Bromofenol. **F-G:** Abundância de gotículas lipídicas no AMG de *T. theobaldi*. Coloração: Tetróxido de ósmio e azul de toluidina. **H:** Gotículas lipídicas no AMG de *Ae. aegypti*. Coloração: Tetróxido de ósmio. Bl: labirinto basal; MF: fibras musculares; Nu: núcleo; CA: Ápice celular; asterisco: espaço endoperitrófico; PM: matriz peritrófica; Ld: gotículas de lipídio; V: vesículas citoplasmáticas. Barras: 10 μm .

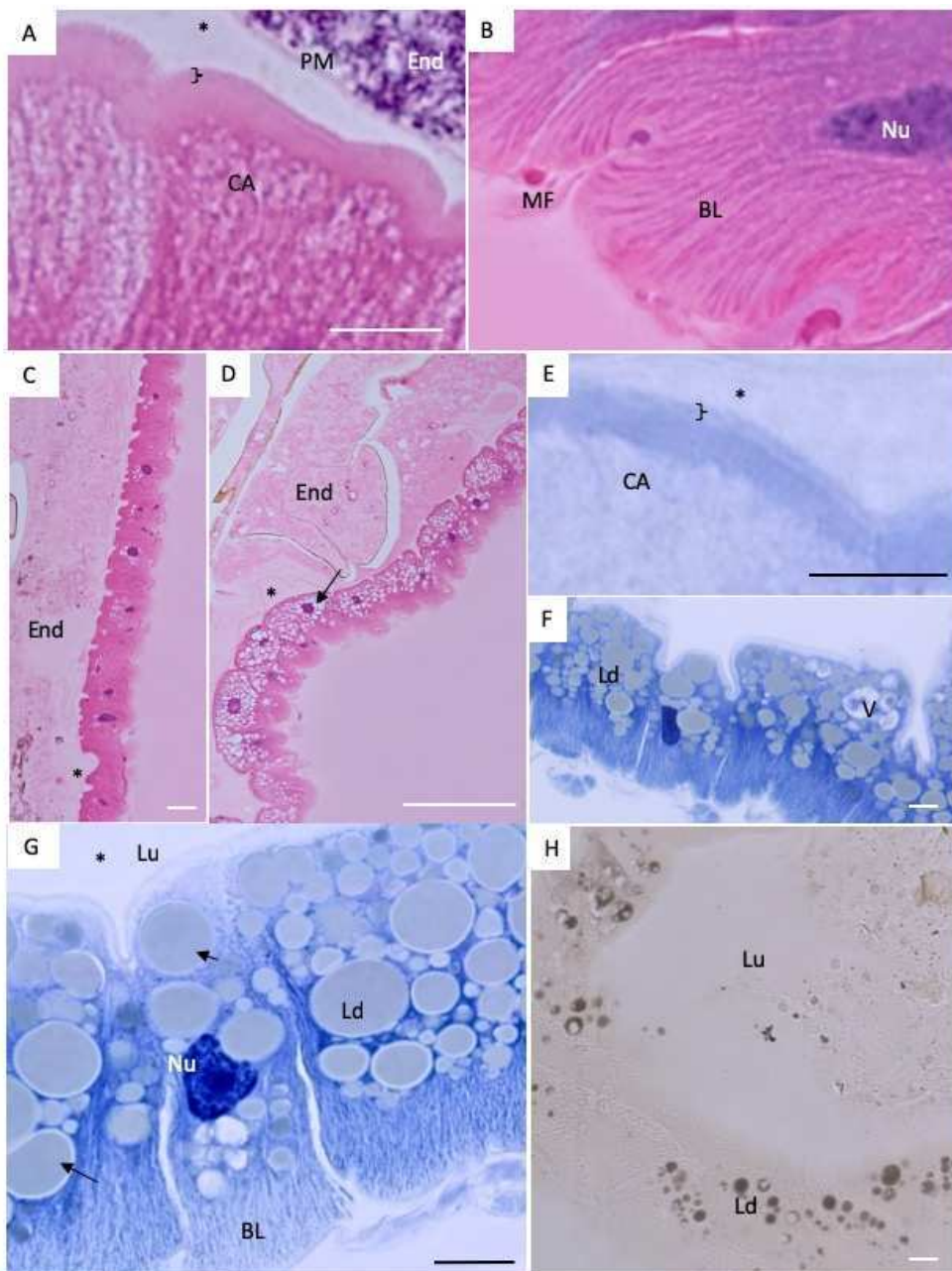


Figura 8: A-G: Vesículas, modificações do ápice celular (Am) e protrusões citoplasmáticas de células do intestino médio anterior (AMG) de *Ae. aegypti* (D e E), *An. gambiae* (F e G) e *T. theobaldi* (A, B e C). Note que em *Ae. aegypti* (D e E) e *T. theobaldi* (A, B e C), vesículas citoplasmáticas (V) se fundem (setas) e formam configurações apicais em forma de taça (Am). Em *An. gambiae*, vesículas citoplasmáticas são vistas em projeções (P) sem se fundirem (F e G). Nu: núcleos; ES: Espaço ectoperitrófico; End: espaço endoperitrófico; CA: ápice celular; Am: configurações apicais em forma de taça. Barras: 10 μ m.

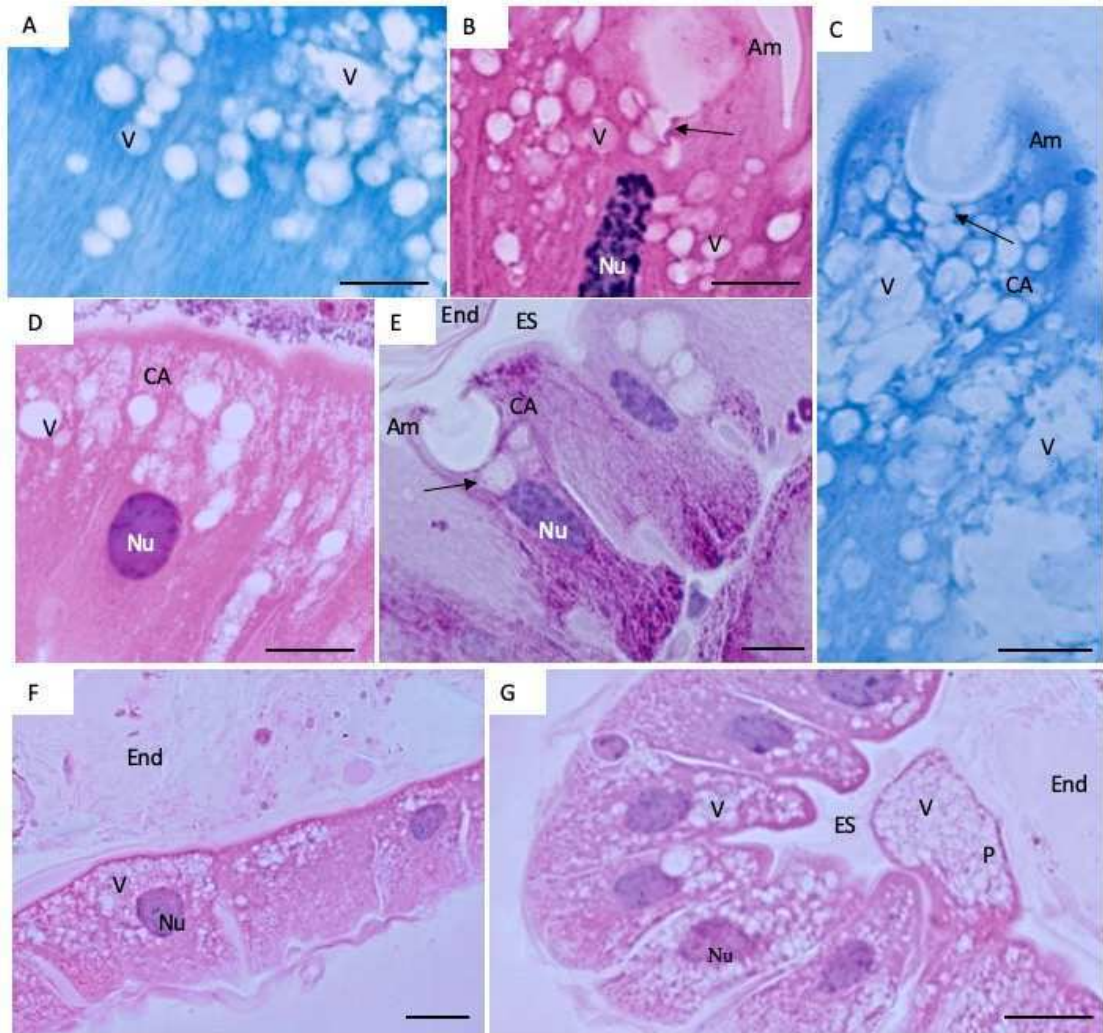


Figura 9: A-F: Histologia do intestino médio posterior (PMG) de larvas L3 (A, C, E) e L4 (B, D, F) de *An. gambiae* (A e B), *Ae. aegypti* (B e C) e *T. theobaldi* (E e F). End: espaço endoperitrófico; Nu: núcleos; Bl: labirinto basal; BB: borda em escova. Coloração: HE. Barras de escala: 10 μ m.

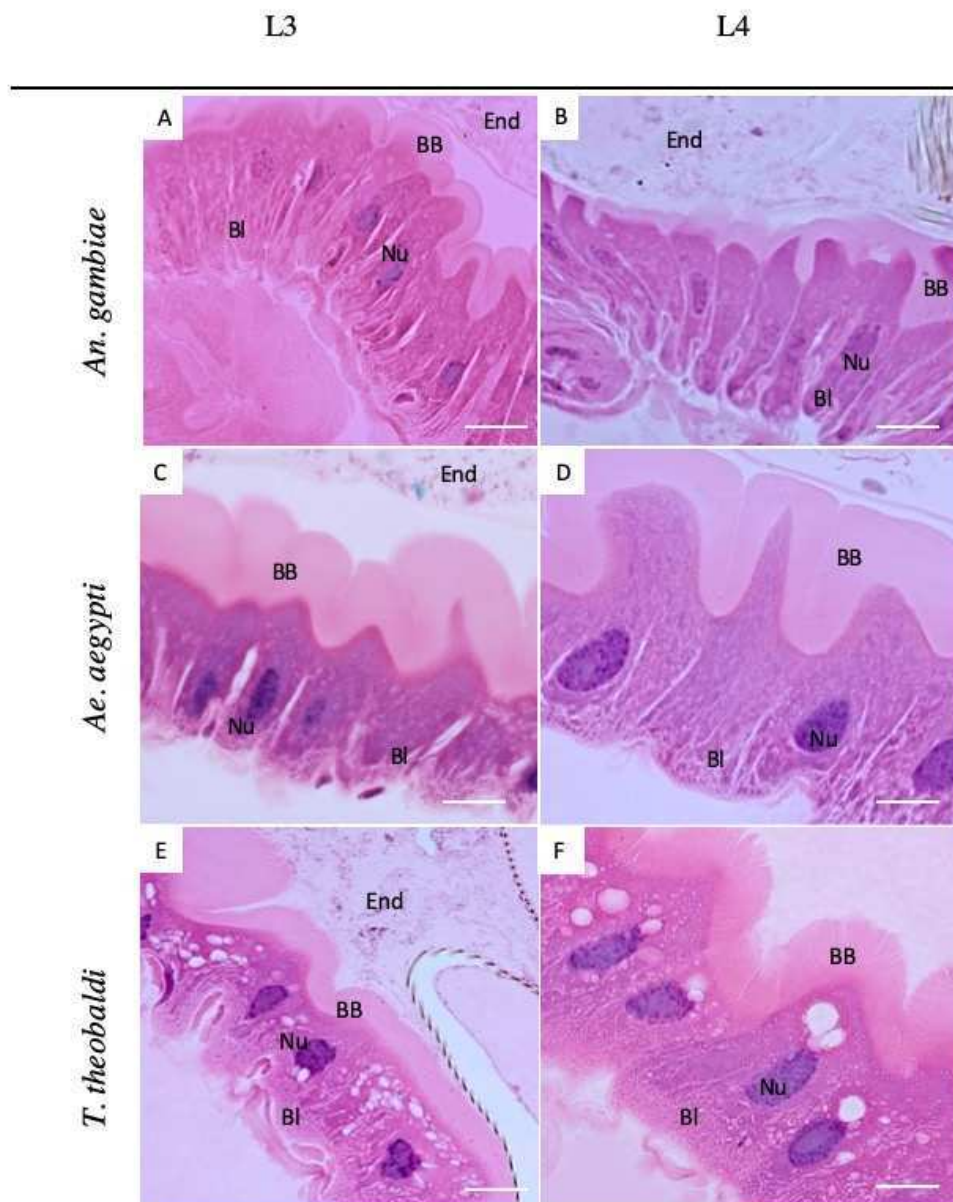


Figura 10: A-I: Porção inicial e final do intestino médio posterior (PMG) de larvas de *An. gambiae* (A-C), *Ae. aegypti* (D-F) e *T. theobaldi* (G-I). Note as diferenças morfológicas ao longo da extensão do epitélio do PMG de larvas de *Ae. aegypti* (D-F) e *T. theobaldi* (G-I). Nessas duas espécies, o PMG posterior apresenta substâncias claras acumuladas no citoplasma (F e I). Em larvas de *An. gambiae* (A-C), o PMG posterior é morfologicamente similar ao PMG posterior. Coloração: HE. Ep: epitélio digestivo; BB: borda em escova; Nu: núcleos, Lu: Lúmen, setas: regiões claras no interior do citoplasma das células digestivas.

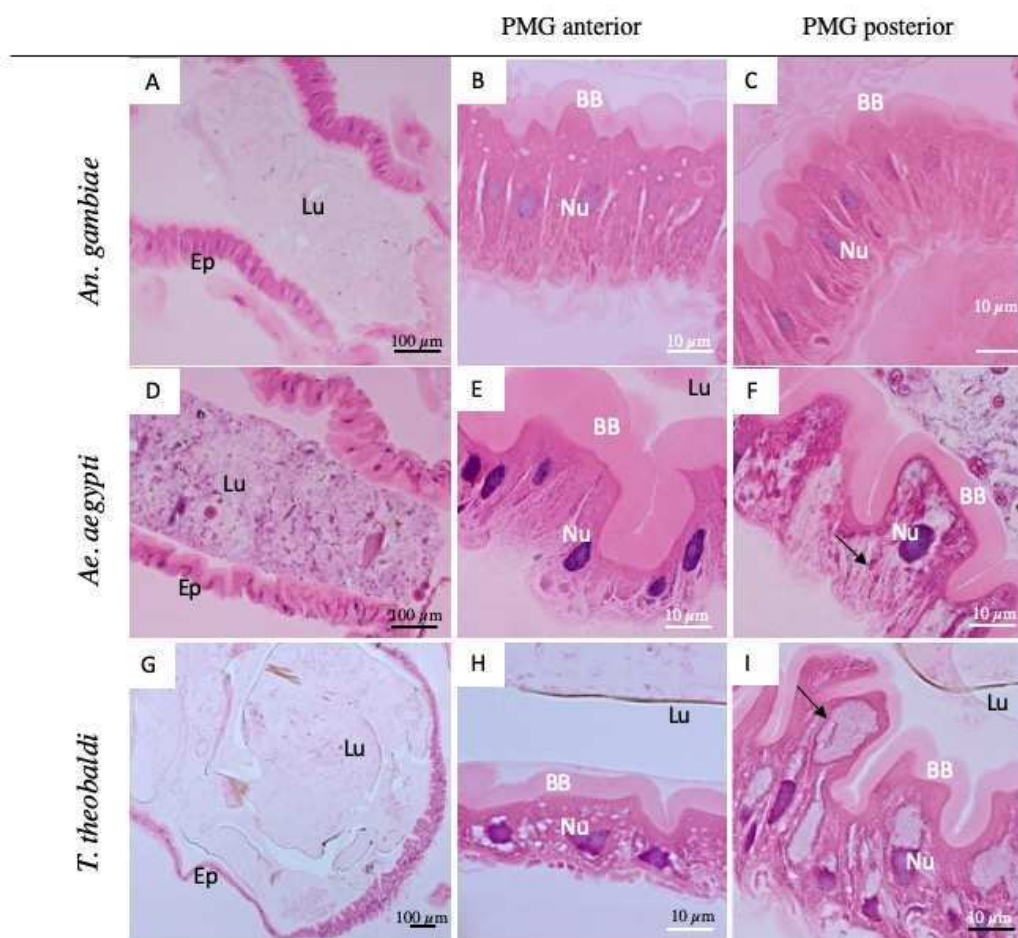


Figura 11: Protrusões citoplasmáticas das células digestivas do PMG de *An. gambiae* (A-C), *Ae. aegypti* (D-F), e *T. theobaldi* (G-I). A, D, G: Coloração HE; B, E, H: Coloração: mercúrio bromofenol; C, F, I: Coloração PAS. Note que no PMG de *An. gambiae*, as protrusões possuem a borda fortemente eosinofílica em relação ao interior (A), possuem alta concentração de proteínas homoganeamente distribuídas (B), e não apresentam grânulos PAS-positivos (C). Diferentemente, no PMG de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, as protrusões possuem conteúdo bromofenol-positivo granuloso (E e H), e repleto de grânulos PAS-positivos (F e I). BB: borda em escova; setas: protrusões; Lu: lúmen. Barra de escala: 10 μ m.

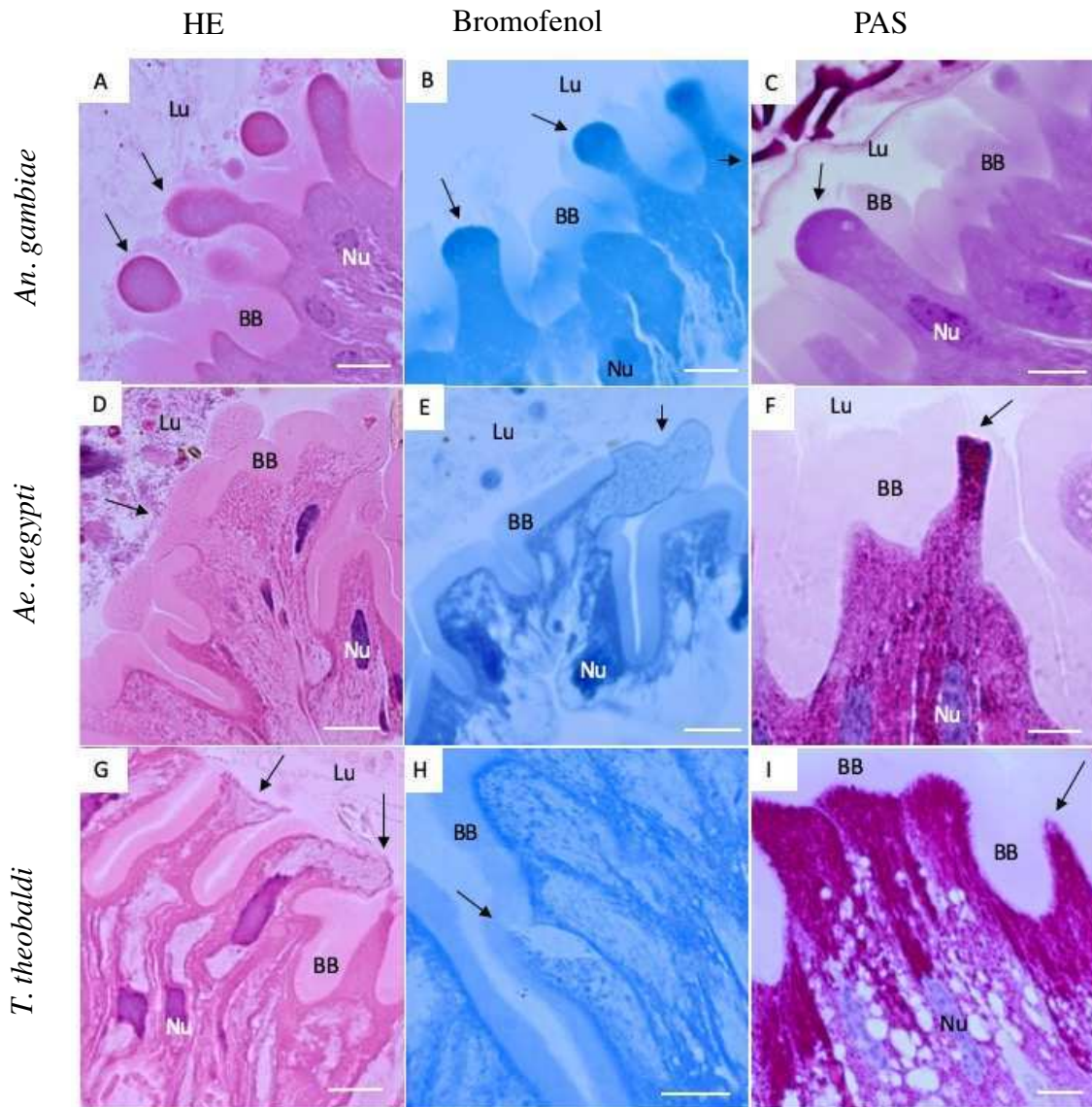


Figura 12: A-H: Presença de carboidratos neutros no GC (A-B), AMG (C-E) e PMG (F-H) de larvas de *An. gambiae* (A, C, F), *Ae. aegypti* (B, D, G), e *T. theobaldi* (C, E, H). Note que em todas as regiões do intestino médio de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, todo o citoplasma das células digestivas apresenta grânulos de carboidratos neutros (setas). Em *An. gambiae*, só é possível visualizar poucos grânulos, os quais se encontram individualizados. Nu: núcleos; Lu: lúmen; BB: borda em escova; Bl: labirinto basal. Barras: 10 μ m.

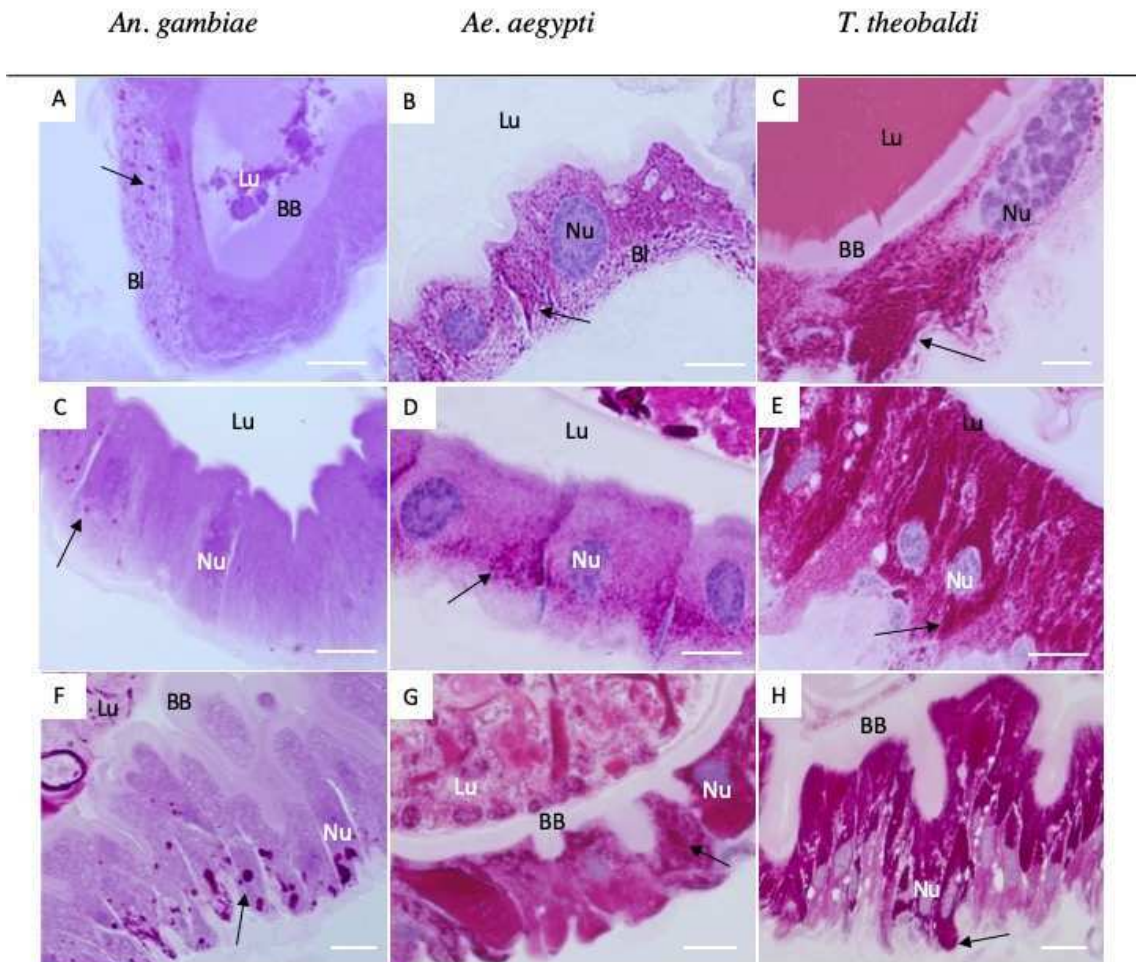


Figura 13: A-D: Células basais do AMG de *An. gambiae* (A), *Ae. aegypti* (B e D) e *T. theobaldi* (C e D inset). Note que as células basais de *An. gambiae* são globosas, e não apresentam ramificações evidentes, enquanto as de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* são triangulares e ramificadas. Coloração: HE; setas brancas: ramificações; nu: núcleo de células basais. E-M: Células regenerativas com borda em escova no GC (E-G), AMG (H-J), e PMG (K-M) de larvas de *An. gambiae* (E, H e K), *Ae. aegypti* (F, I e L), e *T. theobaldi* (G, J e M). Asterisco: microvilos de células regenerativas. BB: borda em escova das células digestivas. Nu: núcleos das células digestivas maduras; nu: núcleos das células regenerativas com borda em escova; setas pretas: células regenerativas altas. Barras: 10 μ m.

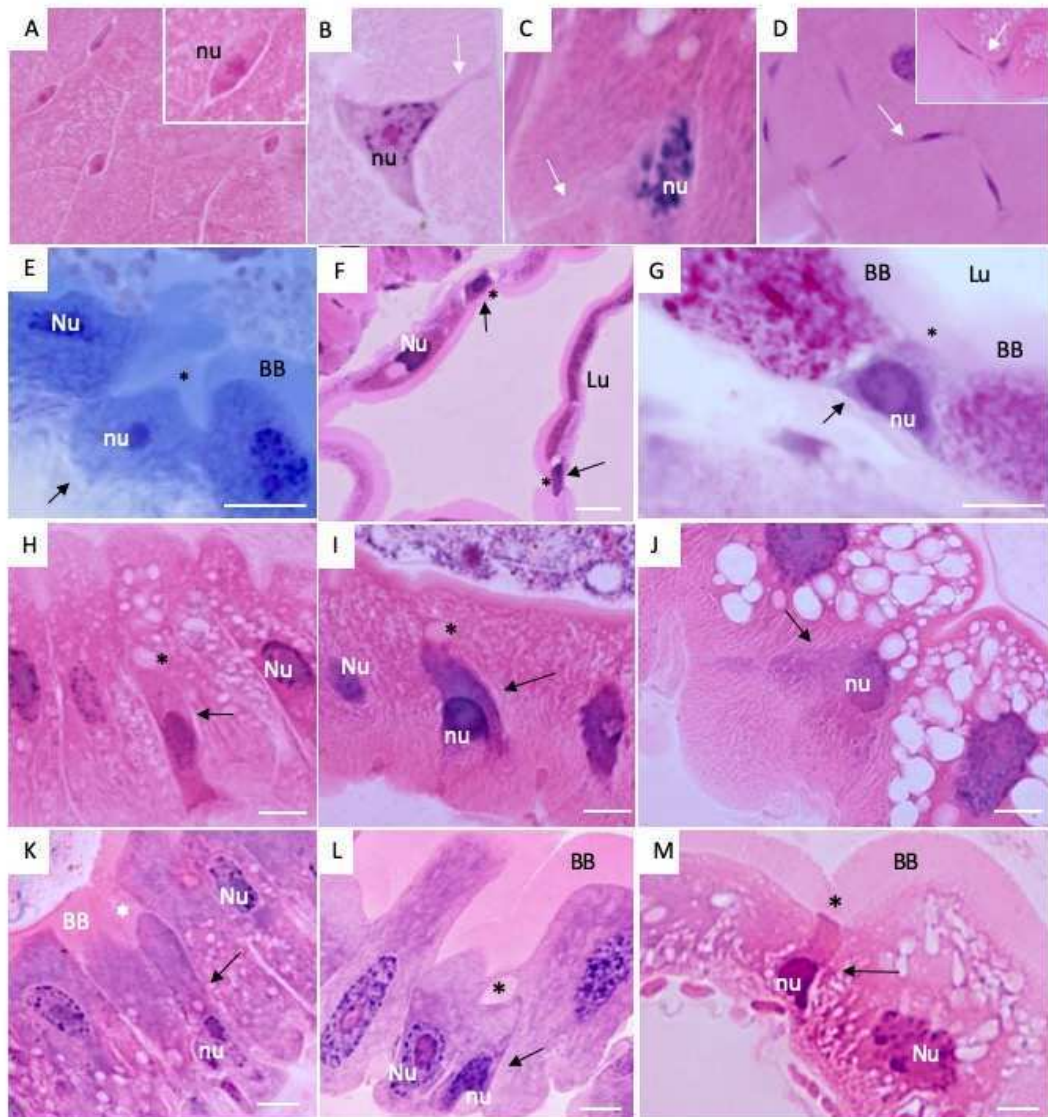


Figura 14: Presença de fibras musculares de grande diâmetro no epitélio de transição do ceco gástrico (GC-out) de larvas L4 de *An. gambiae* (A, B), *Ae. aegypti* (C, D) e *T. theobaldi* (E, F). Setas: fibras musculares. End: espaço endoperitrófico; GC-out: Epitélio da região de transição do GC.

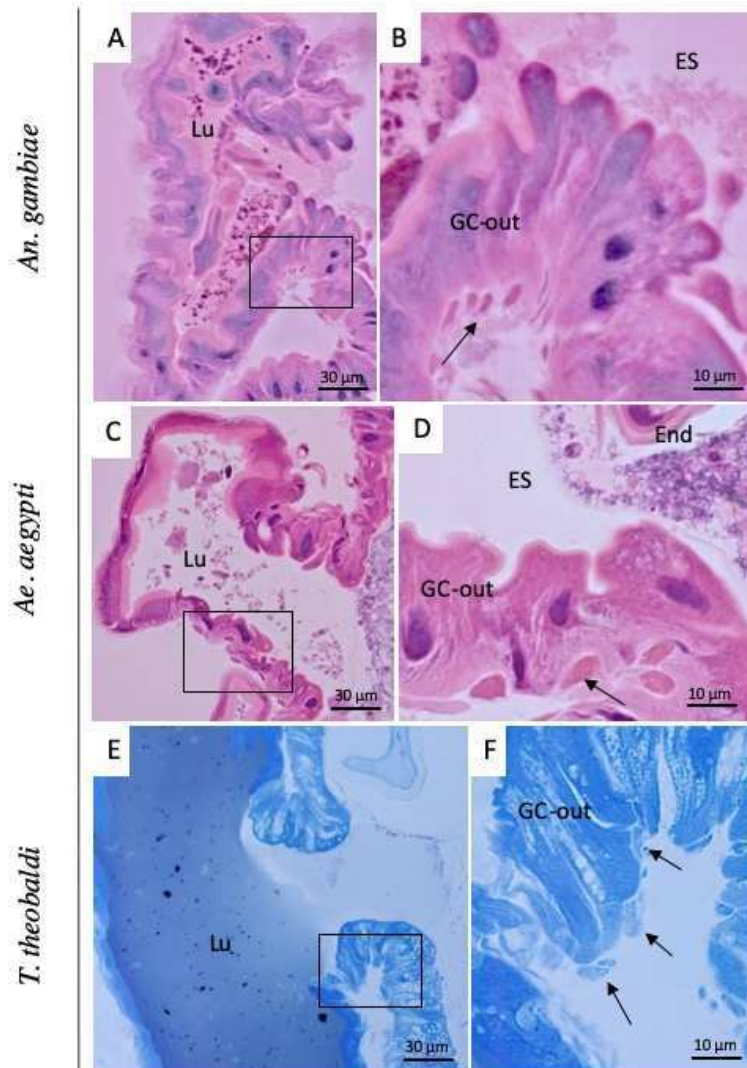


Figura 15: Comparação do número de feixes de fibras por anel de músculo circular do intestino médio de larvas L4 de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. **A-F:** Secção transversal das fibras musculares por anel circular no AMG (**A**) e PMG (**D**) de *An. gambiae*; AMG (**B**) e PMG (**E**) de *Ae. aegypti*; e AMG (**C**) e PMG (**F**) de *T. theobaldi*. Cada anel de músculo circular em corte transversal está indicado pelos quadrados. Note que cada anel de músculo circular possui apenas um feixe de fibras (setas pretas finas) em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*. Diferentemente, em *T. theobaldi*, é possível identificar mais de um feixe de fibras (setas pretas finas) por anel. **A:** coloração de PAS; **B:** Coloração de azul de bromofenol. **C-F:** HE. **G-H:** Visão longitudinal dos músculos circulares do PMG de intestinos médios de larva L4 de *Ae. aegypti* (**G**) e *T. theobaldi* (**H**), mostrando o maior número de fibras circulares por anel em *T. theobaldi* em relação a *Ae. aegypti*. Cada anel de músculo circular em visão longitudinal está indicado pelos quadrados. Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares; Nu: núcleos. Setas finas: feixes de músculos circulares; setas largas: feixes de músculos longitudinais. AMG: intestino médio anterior; PMG: intestino médio posterior.

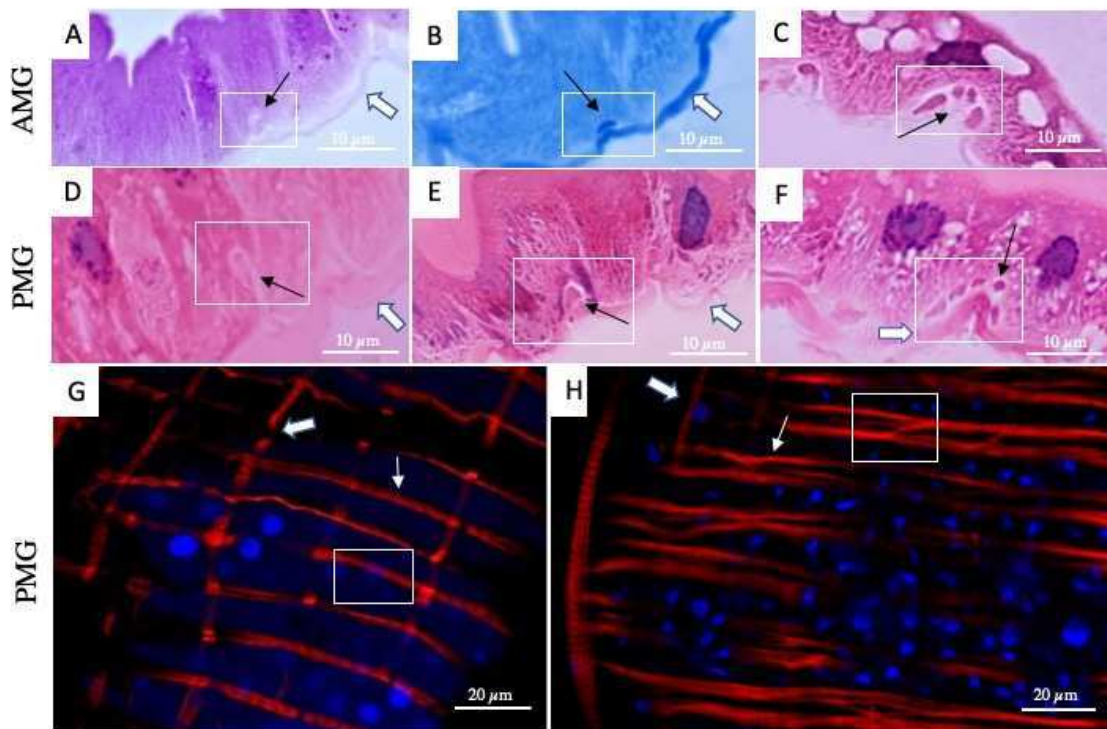


Figura 16: A-H: Matriz peritrófica (PM) de larvas L4 de *An. gambiae* (A e E), *Ae. aegypti* (B, E e G), e *T. theobaldi* (C, F e H). Note que o padrão de carboidratos neutros (A, B, C) e proteínas (D, E, F) é similar no intestino médio das três espécies. Em microscopia de luz, o arcabouço de quitina é similar em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. A-C: Coloração PAS. D-F: Coloração: azul de bromofenol. Setas pretas: matriz peritrófica, Ep: epitélio. G-H: Microscopia confocal com WGA. Setas brancas: arcabouço de quitina da matriz peritrófica.

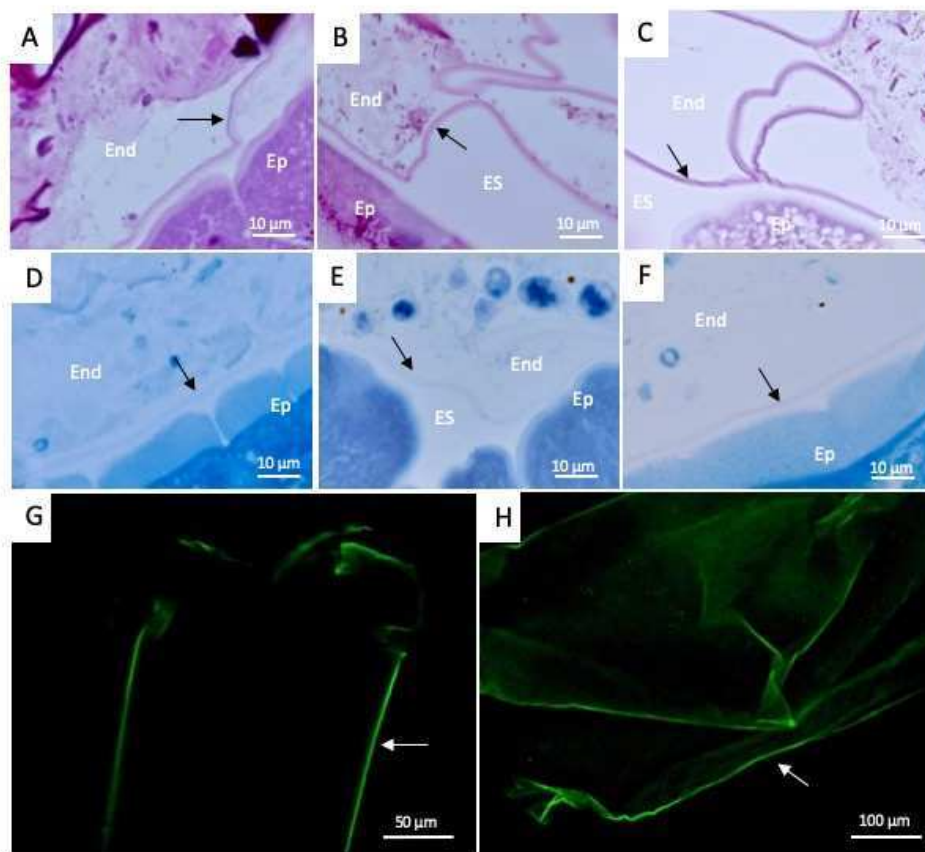


Figura 17: Células em divisão mitótica no intestino médio de larva de *Ae. aegypti* (A-E) e *T. theobaldi* (F-H). Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: núcleos de células em divisão. A: intestino inteiro; B: GC e AMG; C: Detalhe do AMG. D: PMG; E: Detalhe do PMG. Inset: Detalhe dos núcleos em mitose.

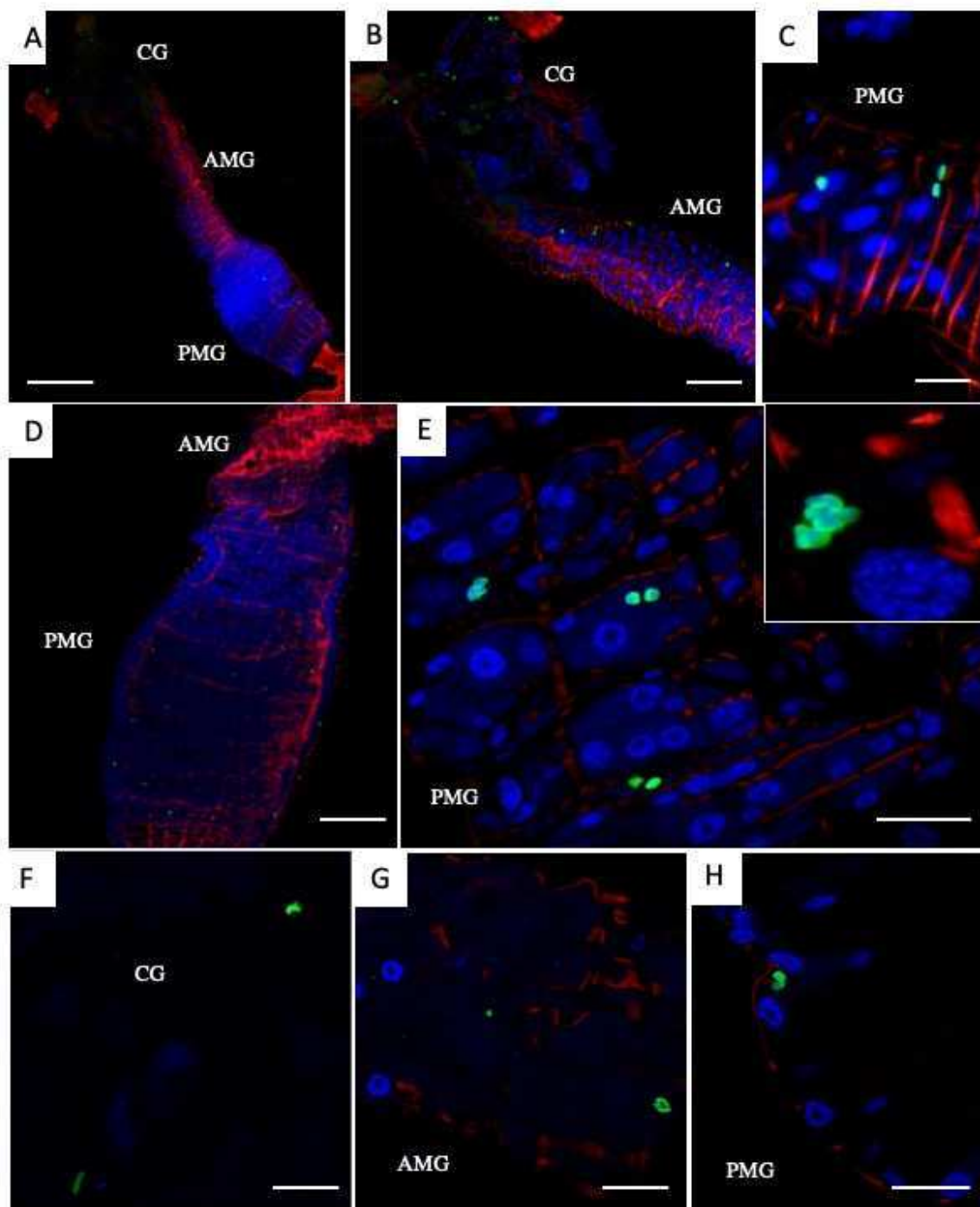


Figura 18: Presença de células enteroendócrinas FMRF-positivas isoladas no PMG de *Ae. aegypti* (A e B) e agrupadas no PMG de *T. theobaldi* (C e D). Vermelho: feixes musculares; azul: núcleos; verde: neuropeptídios FMRF no citoplasma de células enteroendócrinas. PMG: Intestino médio posterior. Setas: células enteroendócrinas FMRF-positivas.

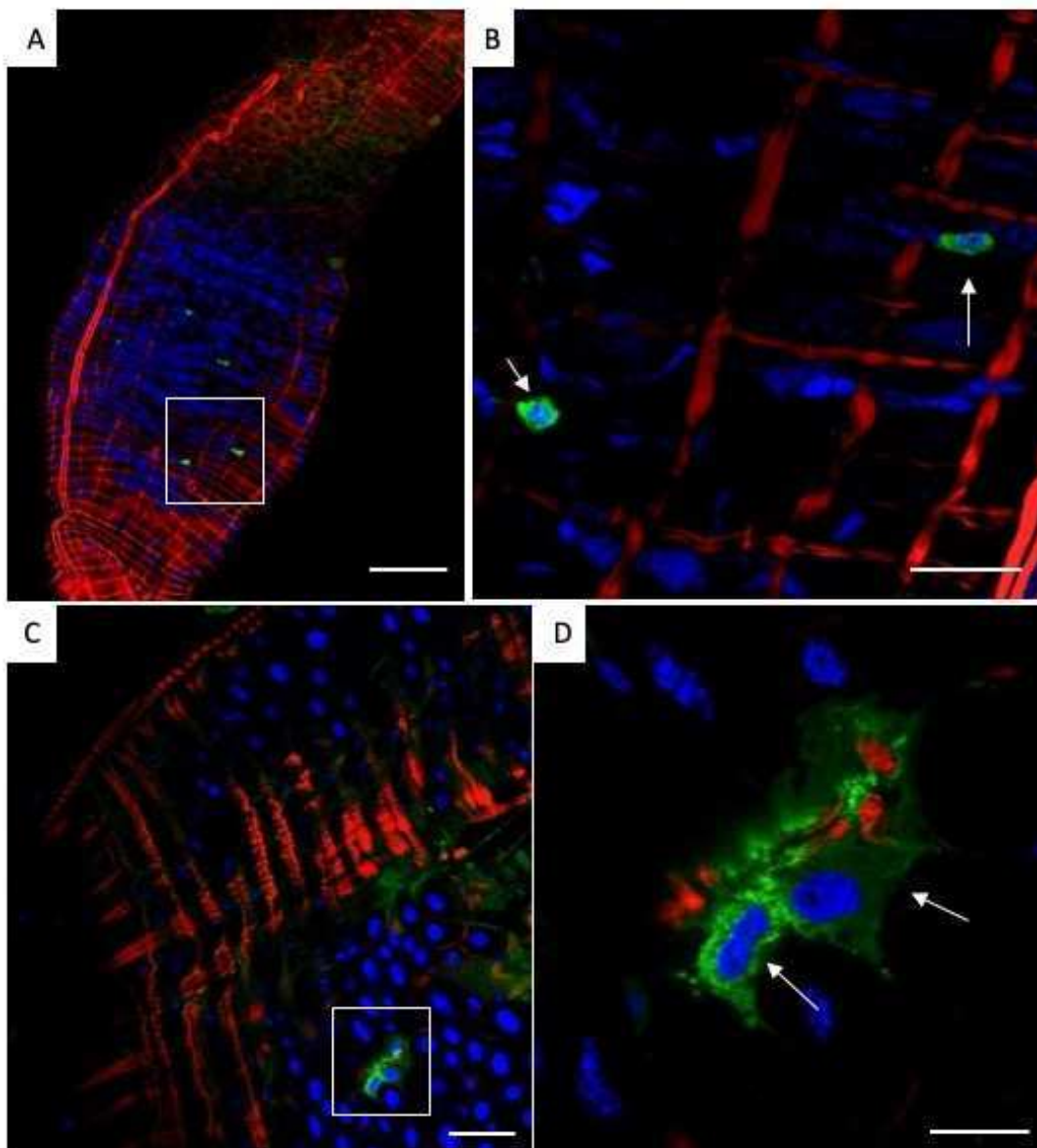


Figura 19: Árvore filogenética de Culicidae. Adaptado de Narayanan *et al.*, 2018.

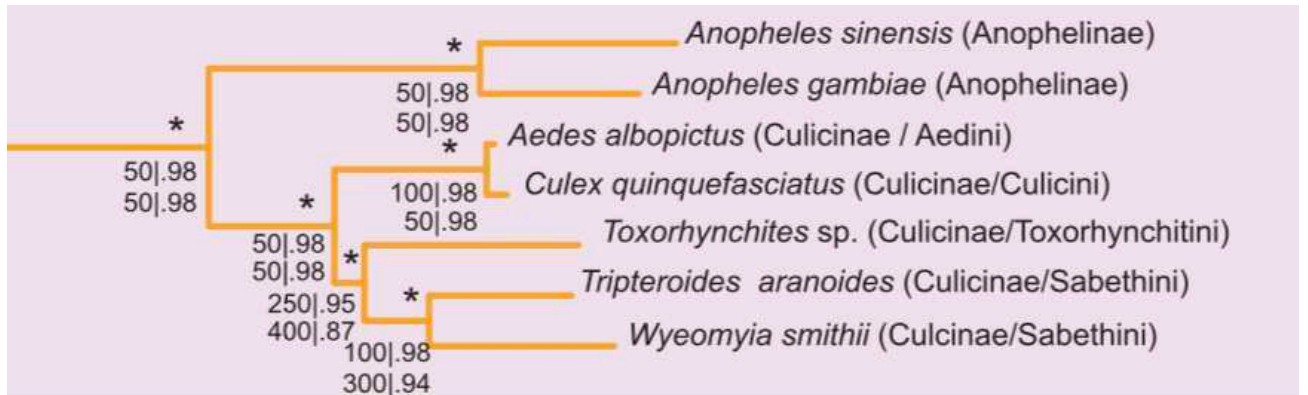


Tabela 1: Comparação de caracteres morfológicos do intestino médio de larvas de *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, e *T. theobaldi*.

Caracteres morfológicos	<i>An. gambiae</i>	<i>Ae. aegypti</i>	<i>T. theobaldi</i>
Protuberância superior e inferior acentuadas no apêndice do GC	X		X
Apenas protuberância inferior acentuada		X	
Forte marcação de carboidratos neutros em todo o intestino médio		X	X
Marcação de carboidratos neutros concentradas no GC e PMG	X		
Protusões das células do PMG ricas em carboidratos neutros		X	X
Protusões das células do PMG pobres em carboidratos neutros	X		
Configurações em forma de taça das células do AMG com material oriundo de fusão de vesículas		X	X
Protusões das células do AMG contendo material vesiculoso	X		
Acúmulo de substâncias de secreção no PMG		X	X
Nenhum acúmulo de substâncias detectável no PMG	X		
Formação de uma microrregião anterior à membrana cecal no GC	X	X	
Ausência de microrregião antes da membrana cecal no GC			X
Mais de um feixe de fibras de músculo circular por anel			X
Apenas um feixe de fibras por anel de músculo circular	X	X	
Acúmulo de gotículas de lipídios no AMG		X	X
Ausência de gotículas de lipídios no AMG	X		
Membrana cecal com aspecto esclerotizado	X		
Membrana cecal amorfa		X	X

Figura suplementar 1: Intestinos médios de larvas de *An. gambiae* (A-D), *Ae. aegypti* (E-H), e *T. theobaldi* (I-L). **A-D:** Histologia do AMG de L3 (A) e L4 (B); e do PMG de L3 (C) e L4 (D) de *An. gambiae*. **E-H:** Histologia do AMG de L3 (E) e L4 (F); e do PMG de L3 (G) e L4 (H) de *Ae. aegypti*. **I-L:** Histologia do AMG de L3 (I) e L4 (J); e do PMG de L3 (K) e L4 (L) de *T. theobaldi*. Lu: Lúmen do intestino médio; Ep: epitélio; GC: ceco gástrico; AMG: Intestino médio anterior; PMG: Intestino médio posterior. Coloração: HE.

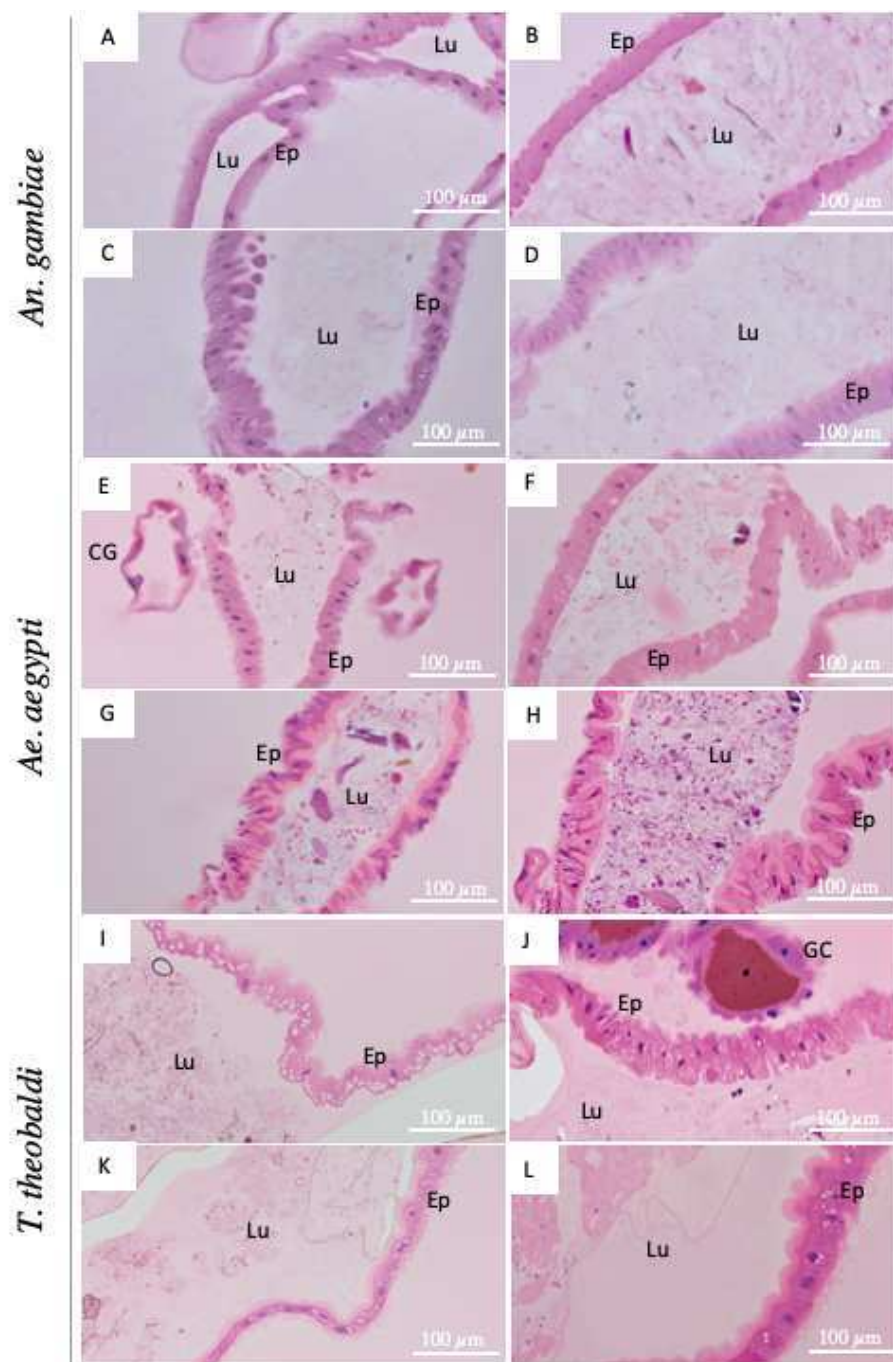


Figura Suplementar 2: **A:** Comparação de tamanhos entre L3 e L4 de *Ae. aegypti*. Foto em microscópio estereoscópico. **B:** Histologia do GC de L4 de *Ae. aegypti*. Note a presença de uma microrregião anterior (MA) à porção do GC que é isolada do restante do intestino médio pela membrana cecal em *Ae. aegypti*. **C-D:** células regenerativas altas (setas) com borda em escova primordial (*) no AMG (C) e PMG (D) de *Ae. aegypti*. **E:** Gotículas lipídicas (Ld) no AMG de L3 de *T. theobaldi*. **F:** Intestino médio de pupa de *Ae. aegypti* como controle positivo para marcação de apoptose. Microscopia confocal. Verde: Núcleos de células apoptóticas no GC. Vermelho: fibras musculares. AMG: Intestino médio anterior; GC: ceco gástrico. Microscopia de luz: Ca: cárdia; Ld: gotículas de lipídeo; BB: borda em escova; setas: células regenerativas altas com borda em escova primordial (asterisco).

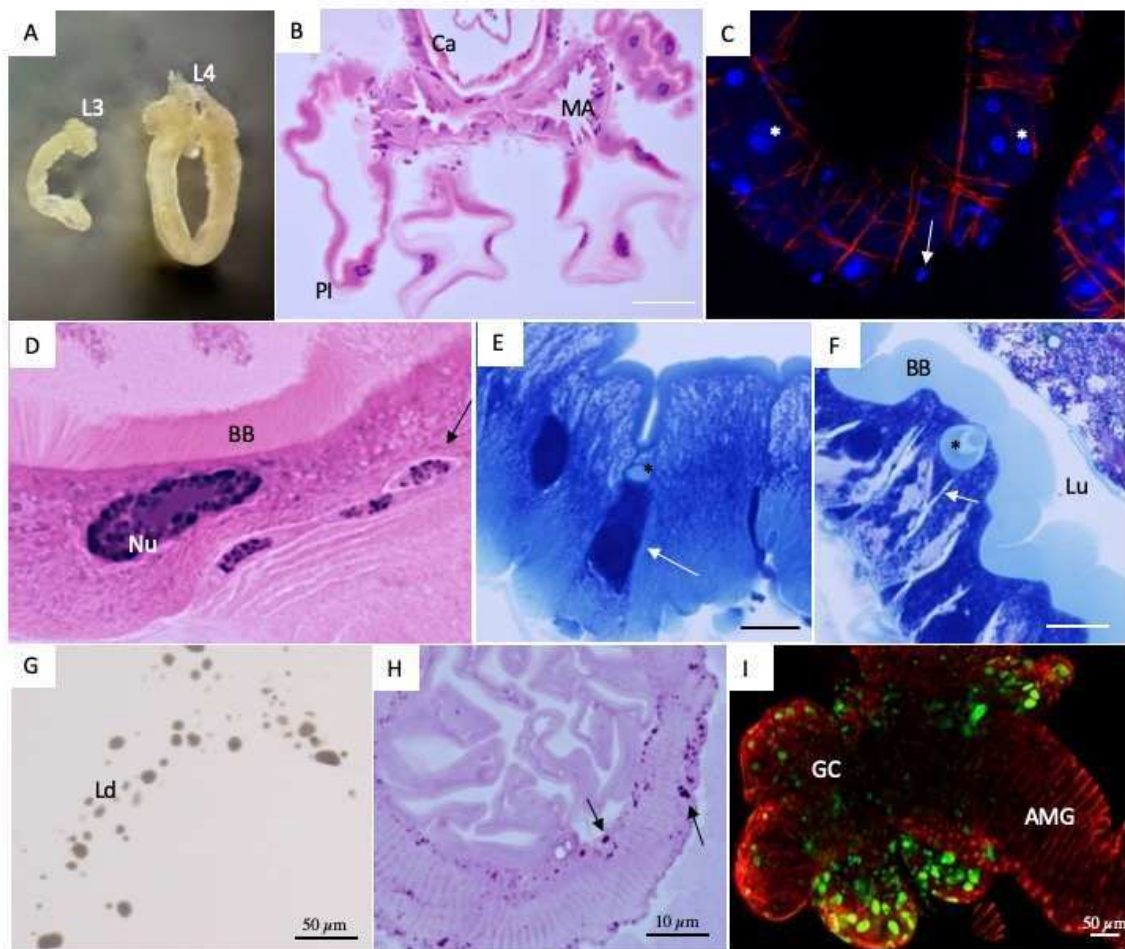


Figura suplementar 3: A-E: Dinâmica morfológica do intestino médio de L4 de *T. theobaldi*. **A:** Larva L4 recém-alimentada. **B-D:** Morfologia do intestino médio em estágios intermediários do processo digestivo. O ceco gástrico aparece mais volumoso quando o intestino médio se encontra vazio (**E**). **C inset:** conteúdo negro isolado da câmara do GC. GC: ceco gástrico; AMG: intestino médio anterior; PMG: intestino médio posterior. Barra: 50 μ m.

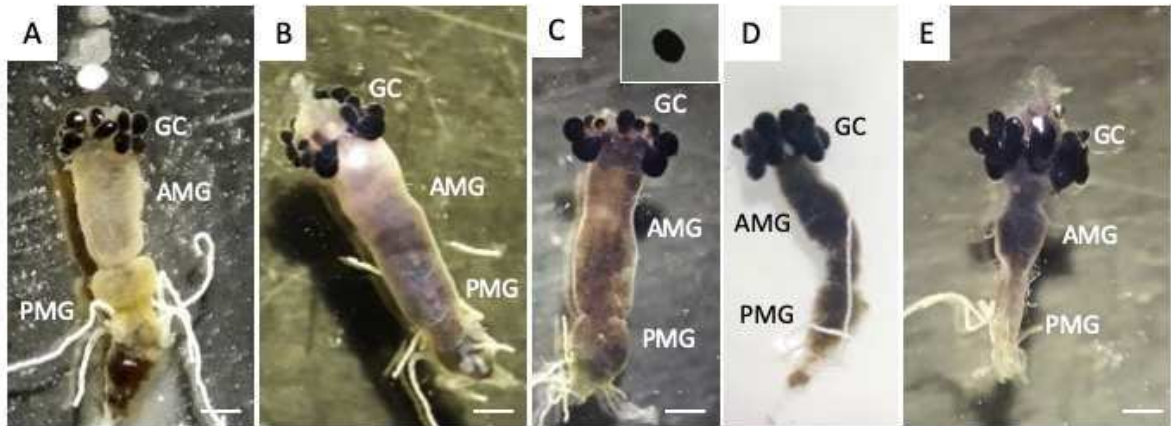


Figura suplementar 4: Protrusões citoplasmáticas de células do apêndice do GC de *Ae. aegypti* (A-G), *An. gambiae* (H) e *T. theobaldi* (I). A, B, G: coloração HE; C, D: coloração PAS; E, F: Coloração azul de bromofenol; H: coloração azul de toluidina. Ep: epitélio; Lu: Lumen; BB: borda em escova; setas: protrusões citoplasmáticas; asterisco: borda em escova; ES: espaço ectoperitrófico. Barras: 10 μ m.

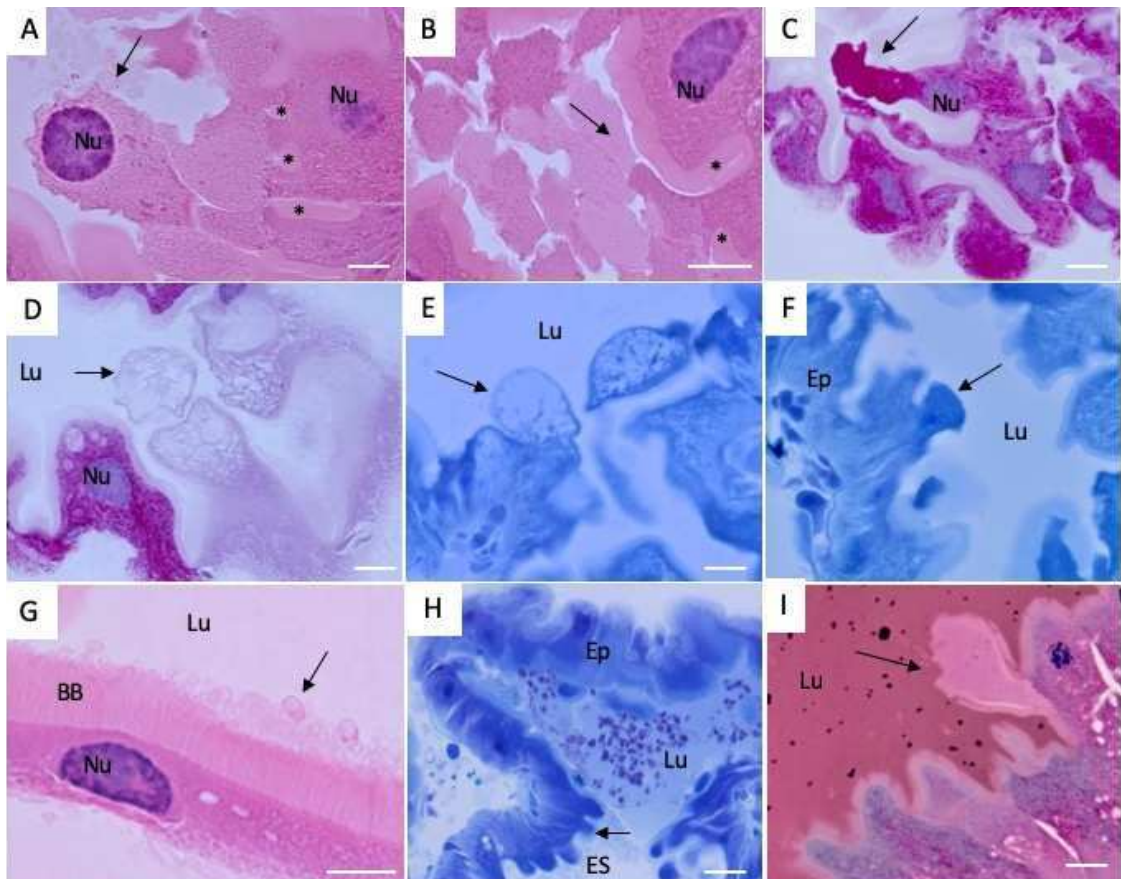
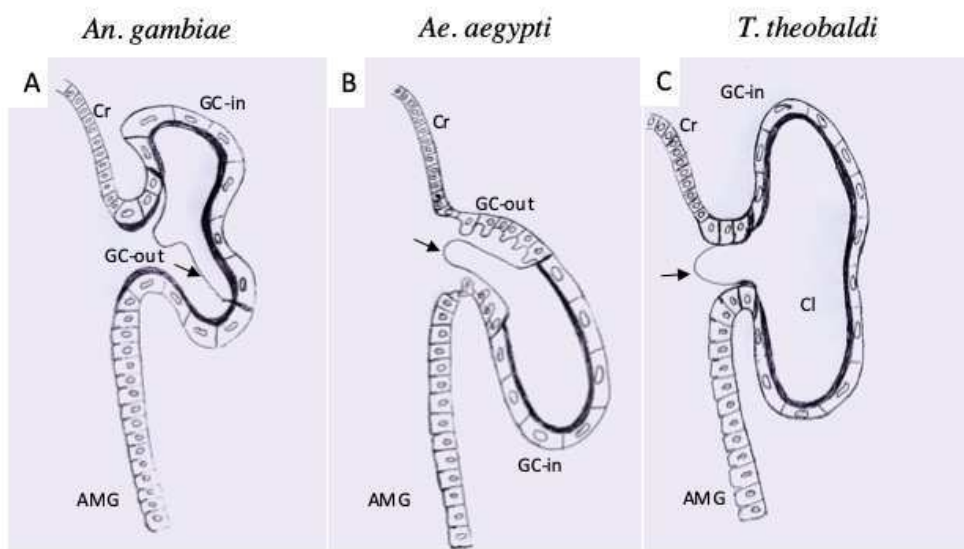


Figura suplementar 5: Desenho esquemático das células do GC de *Ae. aegypti* (A), *An. gambiae* (B) e *T. theobaldi* (C). AMG: Intestino médio anterior; Cr: cárdia; GC-out: região de transição do GC; GC-in: compartimento interno, cercado pela membrana cecal; setas: membrana cecal.



4. CAPÍTULO 2

Desenvolvimento do intestino médio de *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi* durante a metamorfose

Resumo

O intestino médio dos mosquitos é remodelado durante a metamorfose, processo que está intimamente ligado às diferentes necessidades fisiológicas desses insetos entre o estágio larval e adulto. Apesar da importância do intestino médio em mosquitos, por ser a porta de entrada para patógenos, como vírus e protozoários causadores de doenças a humanos, os eventos relacionados com o desenvolvimento do órgão são desconhecidos. Neste trabalho, mostramos que o remodelamento do intestino médio de *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi* se inicia no fim do estágio larval, e que a histólise do epitélio digestivo larval ocorre na fase inicial do estágio de pupa, e envolve eventos de autofagia e apoptose. O epitélio recém-formado se diferencia rapidamente, e já possui células enteroendócrinas funcionais. Pouco antes da metade do curso do estágio de pupa, ocorre um novo descarte epitelial correspondente ao epitélio pupal que se formou na pupa inicial, e o epitélio íntegro visto nessa fase corresponde ao definitivo, que perdurará durante a fase adulta. Este não se encontra completamente diferenciado, por apresentar morfologia diferente da encontrada nos estágios adultos, ausência de células enteroendócrinas FMRF-positivas e ocorrência de eventos de mitose em toda a extensão do órgão. Suas células apresentam inúmeras gotículas de lipídios, as quais são provavelmente oriundas da absorção de lipídeos a partir dos restos celulares descartados no lúmen. Na fase de pupa tardia, as células epiteliais já apresentam sinais de regionalização, o divertículo ventral e a cárdia já estão se formando, e as células passam por novos eventos de autofagia e apoptose, os quais provavelmente ocorrem no sentido de modificar o formato do órgão até a sua conformação final, típica do estágio adulto.

1. Introdução

O trato digestivo dos mosquitos (Diptera, Culicidae) passa por intensas modificações durante seu desenvolvimento pós-embrionário^{1,2}, o que é explicado, em grande parte, pelas diferentes necessidades fisiológicas desses insetos nas fases larval e adulta³. As larvas de mosquitos são aquáticas e possuem um aparelho bucal mastigador, enquanto os adultos são terrestres, com aparelho bucal picador-sugador^{4,5}. Seguindo esta mudança de hábitat e comportamento alimentar, a morfologia do trato digestivo é completamente alterada entre larva e adulto¹, e é na fase pupal quando a maior parte dessas modificações acontecem⁶.

O intestino médio é o órgão do trato digestivo de mosquitos responsável por quase a totalidade da digestão e absorção de nutrientes, além de ser sítio de ação de inseticidas e outros agentes tóxicos⁷⁻¹³. Nas fêmeas adultas hematófagas das espécies capazes de transmitir doenças a humanos, como *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, o intestino médio é constante alvo de estudos por ser a porta de entrada para patógenos como o protozoário *Plasmodium*^{14,15} e vários tipos de arbovirus, como DENV, ZIKV e CHIKV¹⁶⁻¹⁸. Sabe-se que no estágio de pupa os mosquitos não se alimentam¹⁰, e que a exposição das larvas a diferentes tipos de dieta afeta a reprodução do adulto, , longevidade, permissividade a infecção por patógenos, e capacidade vetorial¹⁹⁻²³. Como componentes da dieta são digeridos e absorvidos no intestino médio, fica clara a relação entre atividade do órgão e a geração do estágio adulto. No entanto, apesar de sua importância, o intestino médio de mosquitos possui várias lacunas na compreensão de sua morfofisiologia, principalmente no tocante ao seu desenvolvimento pós-embrionário.

Com o objetivo de esclarecer o que ocorre durante a metamorfose no intestino médio desses insetos desde o início de seu remodelamento tecidual até a sua condição na fase final do estágio de pupa, foram utilizadas neste trabalho três espécies de mosquitos filogeneticamente distantes para desenhar um panorama geral do desenvolvimento do órgão em Culicidae. Uma das espécies escolhidas foi *An. gambiae*, representante da subfamília Anophelinae; e as outras duas foram *Ae. aegypti* e *Toxorhynchites theobaldi*, ambas da subfamília Culicinae^{24,25}.

Como mencionado anteriormente, *An. gambiae* e *Ae. aegypti* são importantes vetores de patógenos a humanos. No estágio larval, essas duas espécies possuem dieta detritívora, a qual inclui detritos orgânicos, bactérias e fungos^{19,22,26}. Porém, quando adultos, tanto machos quanto fêmeas se alimentam de néctar exudatos de plantas, e as fêmeas se alimentam adicionalmente de sangue de vertebrados para auxiliar no desenvolvimentos de seus ovos^{5,27-29}. No caso de *T. theobaldi*, as larvas são predadoras, e o estágio adulto é exclusivamente fitófago, pois as fêmeas adultas não apresentam hematofagia, não sendo, portanto, vetoras³⁰. Larvas de *Toxorhynchites*

se alimentam de invertebrados aquáticos, principalmente larvas de outros mosquitos, motivo pelo qual já foram inclusive utilizadas em estratégias de controle biológico de espécies de importância médica ^{31,32}.

O intestino médio dos mosquitos, tanto na fase larval quanto adulta, constitui-se de um epitélio digestivo simples que é circundando externamente por músculos circulares e longitudinais ³³⁻³⁶. O epitélio digestivo apresenta três tipos celulares distintos, que são as células digestivas ou enterócitos, majoritariamente presentes; as células regenerativas, responsáveis pela renovação epitelial; e as células enteroendócrinas, envolvidas com o controle funcional do órgão através da liberação de hormônios peptídicos ^{1,8,35,37}. Na fase larval, a distinção morfológica das células digestivas permite reconhecer no intestino médio três regiões principais: o ceco gástrico (GC), o intestino médio anterior (AMG) e o intestino médio posterior (PMG) ⁶. No estágio adulto, o órgão é delgado em relação ao do estágio larval, não possui GC, e é dividido em AMG e PMG ^{6,9}.

Já é conhecido que na larva de quarto instar tardia de *Ae. aegypti*, o intestino médio inicia os eventos de modificação tecidual relativos à metamorfose tanto no epitélio digestivo quanto no músculo (capítulo 2) ^{2,6,38}. No entanto, devido à escassez de informações em relação aos demais estágios da metamorfose do intestino médio de mosquitos, o desenvolvimento do órgão na fase pupal de *Drosophila melanogaster* foi utilizado como referência para o presente estudo. *D. melanogaster* é o representante da ordem Diptera que possui maior leque de informações a respeito da morfofisiologia do intestino médio durante a metamorfose ³⁹⁻⁴³. Neste inseto, células regenerativas formam ninhos na fase final da larva de último instar, quando o descarte do epitélio larval se inicia, seguido do processo de diferenciação do epitélio pupal em ascensão ⁴³. Na fase de pupa, o epitélio do intestino médio larval é histolizado e descartado junto com o epitélio pupal recém-formado, os quais, por sua vez, passam a formar os restos presentes no lúmen do órgão, denominados conjuntamente de corpo amarelo ^{41,44}. A partir daí, se inicia um novo processo de diferenciação que originará o epitélio definitivo da fase adulta, o qual é completado somente após sua emergência ⁴³. Em mosquitos, o remodelamento do epitélio digestivo foi pouco investigado, e não se sabe se ocorre um descarte adicional de epitélio na fase de pupa além do epitélio larval.

Para averiguar o que ocorre durante o remodelamento epitelial do intestino médio de *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, e *T. theobaldi* entre o fim do último instar larval e o fim do estágio pupal, neste trabalho, foi feita uma descrição morfológica detalhada do intestino médio de três fases do estágio de pupa, e os principais eventos envolvidos no desenvolvimento do órgão, como

apoptose, autofagia e proliferação celular, foram analisados. A presença e localização de células enteroendócrinas também foi investigada. Por fim, foi verificado se a origem filogenética é um fator que interfere no processo de remodelamento tecidual do órgão nesses mosquitos.

2. Material e métodos

2.1. MOSQUITOS

An. gambiae, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* possuem tempos de duração diferentes para o estágio de pupa. Além disso, sabe-se que fatores como temperatura do ambiente, e tipo e a quantidade de alimento fornecido às larvas reflete no tempo de desenvolvimento dos mosquitos^{22,23,45}. Dessa forma, para cada espécie, o tempo total de duração desse estágio foi calculado e utilizado para detectar a pupa tardia (LP). As pupas na metade da pupação também foram analisadas, e chamadas de pupas intermediárias (IP). Sabe-se que na fase de pupa inicial (EP), o epitélio digestivo larval de mosquitos é histolizado², e, por isso, as EP foram analisadas em três tempos no sentido de visualizar momentos antes e após a substituição do epitélio larval por um novo.

2.1.1. *An. gambiae*

Foram utilizados os seguintes estágios e fases de *An. gambiae*: Larvas de quarto instar (L4), com aproximadamente 40 h após ecdise de L3 para L4 (L4 tardias-LL), Pupas iniciais com 0; 20; e 40 min após pupação, Pupas intermediárias com 18 ± 1 h após pupação e Pupas tardias com 36 h após pupação. Os exemplares foram obtidos no insetário do Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Estados Unidos da América. As larvas foram criadas em bandejas de plástico contendo água limpa declorada desde a fase de ovo e alimentadas com ração de tartaruga. As bandejas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada de 26 ± 2 °C, umidade de 60% e fotoperíodo de 12h.

2.1.2. *Ae. aegypti*

Foram utilizadas as seguintes fases de *Ae. aegypti*: pupas iniciais com 0 (de coloração branca); 30; e 60 min após pupação, Pupas intermediárias com 24 ± 1 h após pupação e Pupas tardias com 48 h após pupação. Os exemplares utilizados foram os da linhagem PPCampos (Campos dos Goytacazes, RJ) e foram obtidos no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Eles foram criados em bandejas de plástico,

contendo água limpa declorada desde a fase de ovo e alimentados com ração de tartaruga Reptolife, Alcon ®, Santa Catarina, Brasil. As bandejas foram mantidas em incubadora com temperatura de 26 ± 2 °C, umidade de 60% e fotoperíodo de 12 h.

2.1.3. *T. theobaldi*

Foram utilizadas as seguintes fases de *T. theobaldi*: pupas iniciais com 0; 75 min e 150 min após pupação, pupas intermediárias com 2,5 dias \pm 1h após pupação e pupas tardias com 5 dias após pupação. Larvas nas fases L3 e L4 foram coletadas na Mata do Paraíso (situada entre as latitudes de 20° 41' 20" S 20° 49' 35" S e entre as longitudes de 42° 41' 20" W e 42° 54' 27" W), Universidade Federal de Viçosa, Brasil, sob licença do ICMBio de número 56917-2. A coleta foi feita distribuindo-se baldes pretos próximos a troncos de árvores no interior de região de mata. Inicialmente, os baldes-armadilha foram abastecidos com água de torneira, mas depois foram mantidos com água da chuva e triados mensalmente à procura de imaturos. Os imaturos coletados foram trazidos para o insetário do DBG. As larvas foram criadas individualmente em pequenos potes de plástico contendo água declorada, e alimentadas com larvas de *Ae. aegypti* (PPCampos, criadas como descrito acima) e mantidas em sala sem controle de temperatura ou luminosidade, de forma a manter as condições de crescimento próximas às da natureza.

2.2. HISTOLOGIA

Intestinos médios dos exemplares das três espécies, descritos nos subitens anteriores, foram dissecados em PBS (0.1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, e 20 mM Na₂HP₄; pH 7.6), com auxílio de microscópio estereoscópico, e fixados em solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0.4% em PBS) por duas horas. Para *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, foram utilizados 24 intestinos para a fase de EP (oito para cada um dos três tempos definidos); e 16 intestinos para cada um dos estágios de IP e LP. Para *T. theobaldi* foram utilizados 15 intestinos para a fase de EP (cinco para cada um dos tempos definidos), e sete para cada um dos estágios de IP e LP, devido à dificuldade na obtenção de seus exemplares. Após a fixação, as amostras foram lavadas em PBS, e submetidas à desidratação em série alcoólica sendo mantidas por 10 minutos em cada concentração (70, 80, 90 e 100%). Após a desidratação, o material foi embebido em Historesin (Leica), sem acréscimo de catalisador, e deixado *overnight*, para posterior inclusão. Secções em série (2.5 μ m) das amostras foram obtidas em micrótomo automático (Leica) utilizando-se navalhas de vidro. As secções foram acomodadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (HE). As secções coradas foram cobertas por lamínula utilizando-

se meio de montagem Eukitt (Fluka), visualizadas em microscópio Olympus BX53 e fotografadas com câmera Olympus DP 73 do Laboratório de Sistemática Molecular da UFV.

2.3. HISTOQUÍMICA

2.3.1. Lipídeos

Seis intestinos médios de cada fase de pupa (n = 18) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* foram dissecados e fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio, pH 7,4; seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em PBS por 40 minutos ao abrigo da luz. Após esse passo, os intestinos foram lavados em PBS e submetidos aos processos de desidratação e inclusão. Secções (5 µm) foram fotografadas e montadas com sacarose 30% em água destilada, e fotografadas como descrito no item 2.2.

2.3.2. Carboidratos neutros

Parte das secções das larvas tardias de *An. gambiae* foram submetidas à técnica histoquímica de P.A.S. (Periodic Acid Schiff) para detecção de carboidratos neutros. Regiões ricas em carboidratos neutros, como o glicogênio e mucopolissacarídeos, adquirem uma coloração magenta. As lâminas histológicas foram incubadas com solução aquosa de ácido periódico 1% durante 20 minutos. Após a incubação, elas foram lavadas em água destilada (três banhos de 10 minutos), e tratadas com reativo de Schiff durante 45 minutos. Seguiu-se novo processo de lavagem, porém em água corrente, durante 15 minutos⁴⁶. Por fim, as secções foram coradas com hematoxilina, montadas e fotografadas como descrito no item 2.2.

2.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

2.4.1. Mitose, autofagia, e células enteroendócrinas FMRF-positivas

Intestinos fixados foram lavados (item 2.2) e tratados com PBST (Triton X-100 1% em PBS) por três vezes de 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas overnight a 4°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em PBS: anti-phospho histone H3 (1:100, Cell Signaling); anti-LC3B (1:200, Cell Signaling) e anti-FMRF-amide (1:500, Genetex). No dia seguinte, as amostras foram lavadas, e incubadas em câmara escura com anticorpo secundário IgG FITC (1:200, Genetex). No terceiro dia de processamento, as amostras foram lavadas e incubadas com Phalloidin-Alexa 546 (1:40, Life Technologies) por 40 minutos, e TO-PRO3

(1:1000, Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos. Por fim, as amostras foram submetidas ao último processo de lavagem por três vezes de oito minutos, e finalmente montadas em lâminas de vidro com solução de Mowiol coberta por lamínulas. As amostras foram fotografadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss 510 Meta do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. Foram utilizados 25 intestinos por anticorpo primário para cada fase de pupa no caso de *Ae. aegypti*, e oito para *T. theobaldi*.

Os controles negativos foram feitos com cinco exemplares de cada fase por espécie para os três anticorpos primários repetindo-se o mesmo procedimento, porém, com ausência da incubação por estes.

2.4.2. Apoptose

Intestinos médios de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* foram dissecados em PBS e imediatamente incubados com o reagente Cell Event Caspase3/7 (1:350, Invitrogen) por 30 minutos em câmara escura. Após a incubação, as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7% (em PBS, pH 7,4) por 30 minutos, lavadas em seguida por 3 vezes de 5 minutos, e incubadas com Alexa Fluor 546 Phalloidin (1:50, Life Technologies) por 40 minutos. Finalmente, as amostras foram lavadas, montadas e fotografadas como mencionado no subitem anterior. O número de amostras analisadas também foi o mesmo do subitem anterior.

Os controles negativos foram feitos utilizando-se cinco exemplares de intestino médio de L3 de *Ae. aegypti*, o qual não apresentou células em apoptose (capítulo 1).

3. Resultados

O epitélio digestivo dos intestinos médios das três fases de pupa analisadas de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentaram similaridades morfológicas entre as espécies, mas difere entre as fases de uma mesma espécie. Por esse motivo, as características referentes a cada fase do estágio de pupa foram discutidas separadamente e divididas nos tópicos de pupa inicial (EP), pupa intermediária (IP) e pupa tardia (LP). A morfologia do epitélio digestivo do intestino médio da larva tardia de *An. gambiae* foi descrita primeiramente.

LARVA TARDIA (LL) DE AN. GAMBIAE

O intestino médio das LLs de *An. gambiae* não apresenta matriz peritrófica e o alimento também não é visto no lúmen do órgão. Diferente disso, o que se encontra é um material

granuloso PAS-positivo eosinofílico preenchendo tanto o lúmen do ceco gástrico (GC), como do intestino médio anterior (AMG) e posterior (PMG) (Fig. 1A-B).

As células digestivas do AMG apresentam polaridade relativa à presença de moléculas ácidas e básicas, com sua porção apical apresentando-se ácida (corada com hematoxilina), ao contrário da porção basal, a qual apresenta-se eosinofílica (Fig. 1B-C). Os núcleos se encontram intactos, sem sinais aparentes de picnose, e a borda em escova é altamente eosinofílica. Células basais são vistas em toda a extensão do AMG, mas encontram-se isoladas umas das outras e inseridas entre as células digestivas (Fig. 1B-C). Em alguns exemplares, as células digestivas do AMG foram vistas emitindo protrusões em direção ao lúmen (Fig. 1C).

As células digestivas do PMG apresentam inúmeras protrusões em direção ao lúmen do órgão, as quais contêm grânulos fortemente PAS-positivos (Fig. 1D-F). Os núcleos não possuem sinais de picnose e, diferentemente do AMG, as células basais do PMG são vistas enfileiradas e unidas em toda a extensão dessa região (Fig. 1D e 1F).

PUPA INICIAL (EP)

Os intestinos médios das pupas iniciais de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentam sinais claros de remodelamento tecidual (Fig. 2A-C). O lúmen do órgão nas três espécies é preenchido por um material homogêneo eosinofílico, e o epitélio digestivo referente à fase larval encontra-se em degeneração, processo que é visto tanto no GC (Fig. 2D-F) como nos AMG (Fig. 2G-I) e PMG (Fig. 2J-L). Concomitantemente, um novo epitélio digestivo é visto em processo de ascensão (Fig. 2D-L).

O tempo onde o epitélio se encontra no auge do remodelamento tecidual corresponde às EPs com 20 min, 30 min e 75 min após pupação em *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, respectivamente. As células do epitélio larval apresentam citoplasma acinzentado e núcleos picnóticos, os quais são escuros, e muitas vezes são vistos fragmentados (Fig. 2D, G-H, J e L). Em *T. theobaldi*, é possível identificar a morfologia das células em degeneração em maiores detalhes (Fig. 5B e D). Nessa fase, as células do epitélio novo possuem núcleos achatados e apresentam-se pavimentosas (Fig. 2D, 2G-I e 2J-L).

Nos intestinos médios das EPs das três espécies que foram dissecados imediatamente após o início da pupação, o epitélio larval em degeneração ainda se encontra adjacente ao novo epitélio em ascensão (Fig. 3A, C e E). Nas EPs de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* com 40min, 60 min, e 150 min após pupação, respectivamente, o antigo epitélio larval já se encontra

dissociado do novo (Fig. 3B, D e F), o qual, por sua vez, é visto mais proeminente em relação aos intestinos médios das EPs dos respectivos tempos anteriores (Fig. 2).

O tecido epitelial correspondente ao GC das larvas se degenera e o formato de saco típico desses compartimentos se desfaz, porém, células basais também são vistas em torno do epitélio em degeneração dessa região (Fig. 4A-C). As células digestivas do antigo GC larval puderam ser identificadas no lúmen da região correspondente ao AMG, por possuírem borda em escova alta e núcleos grandes em relação aos das demais regiões (Fig. 4D).

O epitélio digestivo recém-formado do PMG é visto em um estado mais avançado de diferenciação em relação ao AMG em algumas amostras de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* (Fig. 4E-F). Porém, em outras, que aparentaram estar e um tempo um pouco mais avançado de pupação, todo o epitélio do intestino médio apresenta morfologia similar (Fig. 4F). Nessas últimas, núcleos em degeneração são vistos pouco corados e em pequena quantidade (Fig. 4F). Diferentemente, nas EPs de *T. theobaldi* com 150 min após pupação, todos os indivíduos analisados apresentaram epitélio morfologicamente similar em toda extensão do intestino médio, e núcleos em degeneração não foram mais vistos no seu lúmen (Fig. 4G).

Nas EPs de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* que foram dissecadas imediatamente após pupação, tanto a região correspondente ao AMG quanto ao PMG larval possui células basais basofílicas proeminentes inseridas entre as células digestivas do epitélio digestivo larval (Figs. 3C, 3E, 5A e 5C). As células basais ainda não se encontram unidas formando uma camada única nesta fase, como visto para *An. gambiae* (Fig. 3A). Em algumas EPs de *T. theobaldi*, o epitélio larval correspondente ao AMG e PMG ainda se encontra intacto (Fig. 5A e C).

Na fase de EP de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* correspondente a 30 min e 75 min após início da pupação, respectivamente, as células basais do epitélio recém-formado do AMG e PMG já se encontram unidas (Figs. 2H-I, 2K-L, 5B e 5D), assim como as de *An. gambiae*, formando uma nova camada de células (Fig. 2G e J).

Nos intestinos médios das EPs de *Ae. aegypti* foram detectados vacúolos autofágicos em grande parte das amostras, porém, sua presença não foi sincrônica em todo o epitélio digestivo (Fig. 6A-B e D, inset). Em algumas amostras, vacúolos autofágicos foram vistos apenas no GC em degeneração (Fig. 6D, inset), enquanto em outras, eles foram vistos nos AMG e PMG larval. A quantidade de vacúolos também foi variável. Algumas amostras não apresentaram vacúolos autofágicos em nenhuma região do intestino médio. Nessa mesma fase, as células digestivas em degeneração também apresentaram inúmeras células em processo de apoptose (Fig. 6C-F). Da mesma forma que a presença de vacúolos autofágicos, a presença de

células apoptóticas também não foi sincrônica, sendo restrita ou ao GC (Fig. 6C-D), ou às regiões referentes ao AMG e PMG larval (Fig. 6E-F). Tanto os vacúolos autofágicos como os núcleos apoptóticos pertencem às células do epitélio larval em degeneração, não sendo vistos nas células do epitélio recém-formado, nem em fibras musculares (Fig. 6).

Nas EPs de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, foram vistas células enteroendócrinas FMRF-positivas na região basal do epitélio digestivo recém-formado. Em ambas as espécies, essas células têm formato triangular e aparecem individualizadas, e não em grupos (Fig. 7).

Nenhuma célula do epitélio digestivo recém-formado das EPs de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentou núcleos em processo de mitose (capítulo 3).

PUPA INTERMEDIÁRIA (IP)

No intestino médio de todas as IPs de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, o lúmen apresentou algumas células em degeneração com núcleos picnóticos nítidos e citoplasma acinzentado (Fig. 8A-C). As regiões do lúmen mais próximas ao epitélio digestivo também apresentaram um material acinzentado, da mesma cor do citoplasma das células de núcleos picnóticos (Fig. 8D-E, 8H-I, 9A, 9C-D). Em algumas amostras de *T. theobaldi*, foi possível identificar uma camada acinzentada nas bordas do epitélio do intestino médio (Fig. 9A), e em outras, esse material acinzentado se encontrava destacado e presente no meio do lúmen (Fig. 9B). Nesse último caso, o material acinzentado apareceu envolvido por uma camada de fibras eosinofílicas, as quais apareceram exclusivamente em *T. theobaldi* (Fig. 8F, 8I e 9E). Em *An. gambiae*, um material pouco corado espesso também foi visto em torno de células em degeneração próximas à borda em escova do epitélio digestivo (Fig. 8G). No entanto, em *Ae. aegypti*, nenhuma camada discernível foi identificada em torno das células em degeneração do intestino médio das IPs.

A morfologia do epitélio digestivo da região mais anterior do intestino médio foi similar à da região mais posterior nas três espécies (Fig. 8D-I). O epitélio digestivo do intestino médio das IPs das três espécies é formado por células cúbicas, com borda em escova delgada. Os núcleos apareceram predominantemente arredondados ou ovais, porém, núcleos achatados também foram vistos (Fig. 8D-I e 9D). Inúmeras gotículas lipídicas proeminentes ocupam grande parte do citoplasma das células digestivas (Fig. 12C).

No epitélio do intestino médio de algumas IPs de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, foram vistas células anexadas rentes ao ápice das células digestivas (Figs. 8D, 8G e 9F).

Nem vacúolos autofágicos nem células apoptóticas foram vistos nas IPs de *Ae. aegypti* (Fig. 10A). Células enteroendócrinas FMRF-positivas também não foram encontradas no intestino médio de nenhuma das IPs de *Ae. aegypti* ou *T. theobaldi*. Diferentemente, células epiteliais, porém poucas, em processo de mitose foram vistas por todo o intestino médio de *Ae. aegypti* (Fig. 10 B-D). Os núcleos em mitose exibiram morfologia e tamanho semelhantes aos demais núcleos que não se apresentaram em mitose (Fig. 10B-C).

PUPA TARDIA (LP)

O epitélio dos intestinos médios das LPs das três espécies apresentou células digestivas com borda em escova e labirinto basal facilmente discerníveis. Além disso, as três espécies também exibiram diferenças entre os epitélios da região anterior e posterior (Fig. 11D-I).

O lúmen da região posterior do intestino médio das LPs das três é preenchido por um material eosinofílico. Em *Ae. aegypti*, nenhuma camada ou conteúdo acelular é vista contornando esse conteúdo luminal. No entanto, em *An. gambiae* e *T. theobaldi*, um conteúdo acelular é visto em torno do conteúdo luminal (Fig. 11A-C e G-I).

Nas LPs de *An. gambiae*, a região anterior do intestino médio apresenta borda em escova alta, e a região do labirinto basal não está cora por HE (Fig. 11D). No PMG, as células também apresentam borda em escova alta, mas o labirinto basal apresenta-se eosinofílico (Fig. 11G). Ambas as regiões do intestino médio das LPs de *An. gambiae* não mais apresentam lipídios, ou os possuem em pequena quantidade.

Em *Ae. aegypti*, o epitélio do AMG apresentou células cúbicas de núcleos arredondados a alongados e borda em escova delgada facilmente discernível (Fig. 11E). A região mais posterior apresentou borda em escova similar à da região mais anterior, porém, as células apresentaram-se pavimentosas com núcleos achatados (Fig. 11H). Gotículas lipídicas foram observadas em pequena quantidade nesse estágio em *Ae. aegypti*. Células epiteliais foram vistas se destacando em direção ao lúmen da região mais anterior do intestino médio das LPs de *Ae. aegypti* (Fig. 12A).

As células digestivas das LPs de *T. theobaldi* apresentaram borda em escova proeminente no AMG, são cúbicas, com núcleos arredondados e não possuem gotículas lipídicas (Fig. 11F). No PMG, as células digestivas também são cúbicas e com núcleos arredondados, porém, são repletas de gotículas lipídicas e a borda em escova não é discernível (Fig. 11C, 11I e 12D).

O intestino médio das LPs dos três mosquitos já apresenta cárdia e divertículo ventral em formação (Fig. 12B, 13A, 13C e 14B).

Em *Ae. aegypti*, a região mais anterior do AMG, correspondente à cárdia em formação e a região próxima a ela, apresenta epitélio contendo vacúolos autofágicos (Fig. 13A-B). Concomitantemente, a mesma região apresentou células apoptóticas concentradas. Na maioria das amostras, células apoptóticas foram vistas apenas no AMG das LPs de *Ae. aegypti* (Fig. 13C-G), porém, em algumas amostras, células apoptóticas também foram vistas em pequena quantidade na região mediana e no PMG. Nessa mesma fase, algumas células em divisão foram vistas isoladas no epitélio do intestino médio de algumas amostras de LPs de *Ae. aegypti* (Fig. 14G).

O intestino médio das LPs das três espécies é mais largo em relação ao das IPs (Fig. 10A e 14A). Gânglios nervosos FMRF-positivos foram vistos acima da cárdia em todas as LPs de *Ae. aegypti* (Fig. 14B-C e E). Neurônios FMRF-positivos também foram vistos em algumas amostras e localizaram-se apenas no AMG (Fig. 14F). No entanto, células enteroendócrinas FMRF-positivas não foram vistas em nenhuma das amostras dessa fase em *Ae. aegypti* (Fig. 14A e D).

4. Discussão

O processo de remodelamento do epitélio do intestino médio de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* se inicia no estágio final do último instar larval (L4 tardias-LL) ^{2,38}. Outros insetos holometábolos também iniciam esse processo no último instar larval, como por exemplo??? ¹¹. Em *An. gambiae*, foi visto que o intestino médio das LL não possui matriz peritrófica nem membrana cecal, e, ao invés de alimento, o que se vê no lúmen é um material PAS-positivo eosinofílico. Concomitantemente com a presença desse material, células digestivas do AMG e PMG das LLs foram vistas emitindo protusões citoplasmáticas em direção ao lúmen. O conteúdo das protusões também foi granuloso e apresentou um material fortemente PAS-positivo, o que indica que o material presente no lúmen provavelmente está sendo liberado pelas células digestivas nessa fase do último instar larval.

As células digestivas das LLs de *An. gambiae* liberam grande parte do conteúdo apical através das protusões citoplasmáticas, porém, os núcleos celulares não foram perdidos nessas protusões, e as células se mantiveram intactas. Prova disso é que na fase de EP com 0h, as células do epitélio digestivo larval ainda são vistas intactas e anexadas ao epitélio digestivo

em formação. Protusões envolvendo perda de porções consideráveis do conteúdo celular são típicas de insetos, e configuram-se como secreções do tipo apócrina ⁴⁷⁻⁴⁹. Sendo assim, é possível inferir que as LLs de mosquitos secretam substâncias para o lúmen por mecanismo apócrino.

Os grânulos fortemente PAS-positivos vistos no interior das protusões citoplasmáticas das LLs de *An. gambiae* provavelmente correspondem a glicoproteínas do tipo mucinas, pois a técnica histoquímica de PAS adquire uma cor magenta escura quando detecta mucosubstâncias e glicogênio, e esse último é um carboidrato de reserva, nunca sendo visto envolvido em nenhum tipo de processo secretório. Já foram identificados mais de 30 genes relacionados a mucinas em *D. melanogaster* ⁵⁰, e a presença de uma camada mucosa no intestino médio desses insetos foi sugerida devido à presença de material PAS-positivo na superfície das células epiteliais ^{42,51}. Essas proteínas altamente glicosiladas têm papel de lubrificação e proteção da mucosa intestinal contra microorganismos invasores ⁵⁰. Desde que o intestino médio das LLs de *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, e das EPs de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentaram esse material preenchendo o lúmen, e as células digestivas se mantiveram intactas nas EPs de 0 h das três espécies, é possível inferir que nas LLs tardias de mosquitos, as células digestivas larvais ainda não se destacam do epitélio, mas secretam substâncias que provavelmente envolvem mucinas. Essas substâncias provavelmente atuam preparando o lúmen para a substituição do epitélio larval pelo epitélio digestivo novo, além de oferecer ao epitélio recém-formado uma proteção adicional contra microorganismos.

Nas EPs de 0 h de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, o epitélio digestivo do intestino médio larval apresenta morfologia alterada em relação à morfologia de suas respectivas L3 e L4 não-tardias (capítulo 1), pois apresentam citoplasma acinzentado e/ou contendo projeções e irregularidades apicais atípicas, além de células basais proeminentes e em grande quantidade. Apesar da morfologia alterada, nessa fase de EP, o epitélio larval ainda não se destacou em direção ao lúmen.

Na fase de EP de 0 h, as células regenerativas que formarão o novo epitélio do intestino médio se organizam de maneira diferente entre as espécies. Em *An. gambiae*, essas células já se encontram unidas formando uma camada nas EPs de 0h. Diferentemente, em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, as células regenerativas das EPs dessa fase não se encontram totalmente unidas. Isso demonstra que o início do destacamento do epitélio larval em *An. gambiae* acontece com o epitélio novo já em disposição típica de um tecido epitelial, com as células justapostas ⁵²,

enquanto que em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, as células regenerativas se organizam em camada à medida que o processo de degeneração do epitélio digestivo larval prossegue.

A fase onde o epitélio digestivo larval encontra-se no auge do processo degenerativo, apresentando núcleos picnóticos e fragmentados, além de citoplasma desorganizado, correspondeu aos tempos de 20 min, 30 min e 75 min em *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, respectivamente. Nessa fase, os AMG e PMG larval das três espécies formam uma camada epitelial discernível, e as células são pavimentosas e de núcleos achatados. Essa morfologia é típica de epitélios digestivos em formação em outros insetos^{44,53}.

Nas EPs de 40 min, 60 min, e 150 min de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, respectivamente, o epitélio larval já se encontra completamente destacado do epitélio recém-formado, e é mais proeminente em relação à fase anterior. Isso indica que um intervalo de tempo menor ou igual a 20 min, 30 min e 75min é suficiente para a histólise do epitélio digestivo larval em *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, respectivamente.

Nas três espécies, os CGs ainda estão presentes nas EPs de 0 h. No entanto, eles são completamente degenerados ao longo do processo de metamorfose, perdendo a forma de apêndice⁶. Apesar desses apêndices não terem sido mais vistos nas EPs em estágio mais avançado, células regenerativas foram vistas em torno dos CGs em degeneração nas três fases de EPs das três espécies. Isto indica que os CGs desaparecem durante o início do processo de metamorfose, mas as células regenerativas próprias desse compartimento perduram e fazem parte do epitélio recém-formado no AMG.

Células típicas do GC larval, com núcleos grandes em relação às demais células do intestino médio, e borda em escova alta, foram vistas no lúmen da região anteriormente correspondente ao AMG larval em EPs de estágio mais avançado das três espécies. Esse fato evidencia que as células do GC larval, e provavelmente também as demais células histolizadas do intestino médio, tendem a se mover posteriormente em relação ao eixo antero-posterior do órgão durante seu remodelamento.

Em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, o epitélio recém-formado referente à região do PMG larval foi visto mais proeminente em relação ao do AMG em algumas amostras de EPs em estágio avançado, mas, em outras amostras dessa mesma fase, o novo epitélio é morfologicamente idêntico. Durante a dissecação das amostras de cada fase das EPs, houve uma pequena diferença de tempo entre uma e outra correspondente a alguns minutos. Com isso, é possível concluir que o epitélio recém-formado da região referente ao PMG larval se diferencia antes do AMG, no entanto, em uma pequena diferença de tempo, ambos os epitélios já se encontram em um mesmo

estágio de diferenciação, e passam a ser morfológicamente idênticos. Isso não foi visto para *T. theobaldi*, o que pode ser um reflexo de seu maior tempo em estágio de pupa (cinco dias) em relação à *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, fato que provavelmente acarreta uma taxa mais lenta de mudanças relativas à metamorfose.

No lúmen do intestino médio das EPs em fase mais avançada das três espécies, núcleos em degeneração não foram vistos, ou apareceram pouco evidentes e em pequena quantidade. Isso indica que o processo de destruição dos núcleos do antigo epitélio larval é quase totalmente concluído durante as primeiras horas da pupação.

Em *Ae. aegypti*, várias amostras do intestino médio de EPs apresentaram vacúolos autofágicos no citoplasma de células digestivas do epitélio larval em degeneração, as quais também apresentaram núcleos apoptóticos. Isso demonstra que ambos os eventos, tanto de apoptose quanto autofagia, ocorrem no remodelamento do intestino médio de mosquitos. Eventos de autofagia e apoptose ocorrendo em momentos próximos ou simultâneos já foram relatados durante a metamorfose do intestino médio de outros insetos⁵³⁻⁵⁵. Apesar de ser um tema é controverso, em Lepidoptera, a atividade de autofagia encontrada durante o remodelamento do intestino médio no início da metamorfose foi considerada um fator de sobrevivência, e não de morte celular⁵⁶. Em mosquitos, nenhum trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a importância do evento de autofagia durante o remodelamento do trato digestivo, e nem que efeito a inibição do processo autofágico acarretaria na metamorfose do intestino médio. É provável que a autofagia ocorra durante o remodelamento do intestino médio de mosquitos no sentido de também auxiliar no reaproveitamento de nutrientes e de outras substâncias presentes nas células digestivas em degeneração^{11,56}, e que a apoptose é responsável pela autodestruição dessas células. Os eventos de apoptose não apareceram em todas as regiões do intestino médio nas amostras de EPs ao mesmo tempo, e os vacúolos autofágicos também seguiram o mesmo padrão. Dessa forma, conclui-se que o processo de degeneração do epitélio larval não é sincrônico em mosquitos.

Não foram encontradas células regenerativas do epitélio em mitose nas EPs de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Isso indica que todas as células epiteliais que substituirão o epitélio digestivo larval já se encontram formadas, as quais apenas se unem, se diferenciam e sofrem modificações morfológicas para originar o novo epitélio digestivo.

Células enteroendócrinas FMRF-positivas foram vistas no novo epitélio do PMG das EPs de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. Isso significa que as células do epitélio digestivo recém-formado das EPs já se encontram diferenciadas. Em *D. melanogaster*, a diferenciação das células

regenerativas também ocorre na fase inicial do estágio de pupa, e um dos fatores que determina a diferença entre diferenciação em células enteroendócrinas e células digestivas é a concentração da proteína Notch ^{41,43,57}. Células regenerativas com alta expressão de Notch se diferenciam em células digestivas, enquanto que as que possuem baixa expressão dessa proteína, se diferenciam em enteroendócrinas ⁴⁴. Não se sabe se esse mecanismo é conservado em mosquitos, pois, nenhum estudo foi realizado no sentido de determinar quais fatores estão envolvidos na diferenciação das células regenerativas.

Neuropeptídeos relacionados ao FMRF (FaRPs) são comumente encontrados em neurônios e células enteroendócrinas do intestino médio de insetos ^{35,37,58-60}. Porém, a função exata que exercem no órgão ainda é desconhecida. Diversos trabalhos indicam que essas moléculas estão relacionadas com o controle da função muscular ⁶⁰⁻⁶⁴. Em LLs de *Ae. aegypti*, FaRPs são vistos em prolongamentos neuronais mantendo contato íntimo com regiões específicas dos músculos circulares viscerais, enquanto uma nova camada de músculo aparece (apítulo 2). Isso reafirma o envolvimento dessas moléculas com o controle muscular. Em *D. melanogaster*, foi visto que os FaRPs derivam de uma mesma proteína, a qual sofre modificações pós-traducionais, gerando uma diversidade de neuropeptídios de localização e funções provavelmente distintas ao longo da extensão do trato digestivo ⁶⁵⁻⁶⁷. Dessa forma, não é possível determinar se os FaRPs das células enteroendócrinas são os mesmos encontrados nos neurônios, e nem mesmo se todas as células enteroendócrinas FMRF-positivas possuem FaRPs de uma mesma sequência de aminoácidos. Apesar disso, é provável que uma das funções dos FaRPs encontrados nas células enteroendócrinas do intestino médio de mosquitos seja auxiliar no controle dos movimentos peristálticos do órgão durante o processo digestivo ⁶⁸.

Como os neuropeptídios FaRPs são sintetizados e secretados, não é possível estabelecer um número confiável de células enteroendócrinas FMRF-positivas presentes no intestino médio dos mosquitos através da utilização desse método. Além disso, insetos possuem diferentes tipos de células enteroendócrinas, as quais expressam outros tipos de neuropeptídios, e não FaRPs ^{59,69,70}. Esse fato torna difícil fazer uma estimativa da quantidade total de células enteroendócrinas de todos os tipos presentes no intestino médio de mosquitos.

Assim como ocorre nos estágios larvais e adultos de *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, as células enteroendócrinas FMRF-positivas aparecem apenas na porção mais posterior do intestino médio das EPs desses mesmos insetos (capítulo 1) ^{35,59}. Isso significa que no intestino médio das EPs de mosquitos, apesar do epitélio digestivo ser morfológicamente similar em toda a extensão do órgão, sua expressão gênica é diferente. As células regenerativas do intestino médio de *D.*

melanogaster são multipotentes, e expressam genes diferentes ao longo da extensão do órgão^{51,71}. Em mosquitos, processo semelhante pode acontecer, e a determinação das características específicas de cada região do intestino médio pode ser intrínseca das células regenerativas que as dão origem. Esse pode ser o motivo de células enteroendócrinas FMRF-positivas aparecerem apenas na porção posterior do intestino médio de mosquitos, independente do seu estágio do ciclo de vida.

O intestino médio de pupas intermediárias (IPs) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentou células em degeneração. Como relatado anteriormente, as EPs em estágio avançado das três espécies de mosquitos não apresentaram núcleos na região luminal, ou os apresentaram em pequena quantidade e menos evidentes, indicando que eles já teriam sido degradados ou estariam em um estágio avançado de degradação. Além disso, o tempo entre a fase inicial de EP e a fase de IPs foi de 18 h, 24 h, e 2,5 dias em *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, respectivamente, tempo que, de acordo com a relativa rapidez do processo de degradação tecidual visto nas EPs, seria mais que suficiente para finalizar a destruição das células. De acordo com essa afirmação, já foi visto para o intestino médio de *Ae. Aegypti*, que a partir de 9 h após pupação, núcleos não são mais vistos no lúmen intestinal⁷². Dessa forma, fica clara a impossibilidade dos núcleos em degradação vistos nos intestinos médios das IPs serem resquícios do processo de histólise do epitélio digestivo larval. Isso gera um forte indicativo de que, em mosquitos, existe um processo adicional de histólise epitelial correspondente ao epitélio pupal que se formou durante as etapas iniciais da pupação nesses insetos.

Em *D. melanogaster*, já é conhecido que o processo de remodelamento do intestino médio envolve o descarte de dois epitélios digestivos, correspondentes ao epitélio larval e pupal. Nesses insetos, o epitélio que se forma nas etapas iniciais da fase de pupa se diferencia, possui células digestivas e enteroendócrinas, mas é transiente, e é rapidamente descartado em torno do epitélio larval em degeneração, formando o corpo amarelo. Simultaneamente, um novo epitélio se diferencia, o qual corresponde ao epitélio digestivo que perdurará na fase adulta⁴⁴. Em mosquitos, como foi visto, o provável descarte do epitélio pupal ocorre próximo à metade do tempo total de duração do estágio de pupa. Assim como os mosquitos, *D. melanogaster* está incluída na ordem Diptera. No entanto, a família Drosophilidae, a qual inclui *D. melanogaster*, é considerada mais derivada em relação aos representantes de Culicidae⁷³. Dessa forma, é possível que o ancestral comum de Diptera tenha apresentado um epitélio digestivo próprio para cada estágio do ciclo de vida, porém, em *Drosophila*, o tempo de permanência do epitélio

pupal foi drasticamente reduzido, enquanto que, em mosquitos, o epitélio específico da fase pupal perdura por mais tempo, e é descartado em meados da fase de IP.

Apesar do aparecimento dos núcleos picnóticos nas células do intestino médio das IPs de *Ae. aegypti*, não houve marcação de núcleos apoptóticos nem de vacúolos autofágicos nessa fase. Como o marcador de apoptose utilizado é baseado na atividade das caspases efetoras ⁷⁴, as células apoptóticas detectadas por esse marcador devem estar ainda íntegras, o que não foi o caso das células em degeneração encontradas nas IPs dos mosquitos. É provável que em um momento mais anterior ao meio do estágio pupal de mosquitos, células apoptóticas sejam detectadas.

Células enteroendócrinas FMRF-positivas não foram detectadas em nenhuma amostra de IPs de *Ae. aegypti* nem de *T. theobaldi*, porém, células em mitose foram vistas nessa fase em *Ae. aegypti*. Isso é mais um indicativo de que houve um descarte epitelial adicional, e o epitélio digestivo íntegro visto na fase de IPs de mosquitos é um novo epitélio, correspondente ao que perdurará na fase adulta. Em *D. melanogaster*, após o descarte do epitélio pupal, o epitélio digestivo correspondente ao do estágio adulto não se diferencia completamente, e as células regenerativas continuam se dividindo ⁴³. Ao que tudo indica, processo semelhante também ocorre em mosquitos.

O epitélio do intestino médio das IPs das três espécies de mosquitos apresentou células digestivas com formato cúbico, borda em escova delgada, e citoplasma repleto de gotículas lipídicas. Uma alta expressão de transcritos relacionados ao metabolismo de lipídios foi descrita para o intestino médio de pupas de estágio mais avançado em *Ae. aegypti*, reafirmando a presença desses lipídeos ⁷⁵. Como o estágio de pupa dos mosquitos não se alimenta, é provável que esses lipídeos sejam absorvidos a partir dos restos celulares dos epitélios em degeneração e se acumulem dentro das células.

As células do AMG larval possuem borda em escova delgada e estão estreitamente envolvidas com o metabolismo de lipídeos (capítulo 1)⁷⁶. No intestino médio de pupas de estágio mais avançado de *Ae. aegypti*, há um baixo número de transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas, contra um alto número de transcritos relacionados ao metabolismo de lipídeos ⁷⁵. Sabe-se que microvilosidades intestinais comumente abrigam grande quantidade de transportadores de membrana envolvidos com a absorção de carboidratos e proteínas, e que a absorção de lipídeos em insetos não envolve necessariamente a presença de transportadores. Isso pode explicar em parte a borda em escova quase imperceptível no epitélio das IPs.

Uma camada de espessa de material pouco corado foi vista circundando as células em degeneração no epitélio digestivo do intestino médio das IPs de *An. gambiae* e *T. theobaldi*. É provável que esse material seja secretado pelas células digestivas dessas duas espécies e atue como uma matriz extracelular, auxiliando no processo de degradação dos debrís celulares oriundos do descarte epitelial.

As LPs das três espécies de mosquitos apresentam sinais de regionalização do intestino médio, pois as células do AMG são morfológicamente distintas das células do PMG. Em *An. gambiae* e *T. theobaldi*, a mesma camada de material vista nas IPs dessas duas espécies perdurou em torno do material em degeneração do lúmen, o qual foi presente apenas no PMG. No entanto, nenhuma camada acinzentada foi mais vista nem nas bordas do epitélio digestivo, nem na região mais central do lúmen do intestino médio das LPs. Em *Ae. aegypti*, diferentemente de *An. gambiae* e *T. theobaldi*, nenhuma camada discernível foi vista em torno do conteúdo luminal do intestino médio das LPs.

O intestino médio das LPs de *An. gambiae* não apresentou marcação de gotículas de lipídio, ao mesmo tempo que a borda em escova tanto das células da porção mais anterior quanto posterior foi mais proeminente. Isso reafirma a relação entre espessura da borda em escova e o metabolismo de lipídeos. Diferentemente, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* ainda apresentaram gotículas lipídicas no epitélio, as quais foram mais abundantes nesse último. Isso provavelmente ocorre porque o estado de diferenciação do epitélio digestivo das LPs de *An. gambiae* se encontra mais avançado em relação à *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*.

Vacúolos autofágicos e células apoptóticas foram vistos AMG das LPs de *Ae. aegypti*. O aparecimento simultâneo dos eventos de autofagia e apoptose na mesma região fortalece a inter-relação desses processos no remodelamento do intestino médio de mosquitos. Células isoladas em divisão também foram vistas ao longo da extensão do intestino médio das LPs de *Ae. aegypti*. A ocorrência de apoptose na fase de LPs de *Ae. aegypti* somada aos eventos de mitose provavelmente se referem às modificações que estão ocorrendo no formato do intestino médio, o qual nessa fase ainda não adquiriu seu formato final típico do adulto^{6,35}. Células isoladas se destacando em direção ao lúmen também foram detectadas na histologia do AMG das LPs de *Ae. aegypti*.

A cárdia e o divertículo ventral estão em formação na fase de LP das três espécies de mosquitos. Gânglios nervosos FMRF-positivos foram vistos na região acima da cárdia em *Ae. aegypti*, e, em algumas amostras, neurônios isolados e prolongamentos neuronais FMRF-positivos foram vistos na região mais inicial do intestino médio. A presença desses gânglios e

prolongamentos neuronais FMRF-positivos já foi detectada em adultos de *T. theobaldi*³⁵, o que significa que na fase de LP de mosquitos, o sistema nervoso anexo ao intestino médio está tomando seu formato final e já se encontra funcional.

Não foram vistas células enteroendócrinas FMRF-positivas em nenhuma amostra do intestino médio das LPs de *Ae. aegypti*. Em *D. melanogaster*, o epitélio digestivo do intestino médio referente ao estágio adulto só se diferencia completamente após a emergência. A ausência de células enteroendócrinas FMRF-positivas no intestino médio das LPs de *Ae. aegypti* é um indicativo de que o epitélio digestivo dessa fase ainda não completou seu processo de diferenciação, assim como *D. melanogaster*.

A análise comparativa da histologia do intestino médio do estágio pupal das três espécies de mosquitos permite concluir que *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* apresentam semelhanças em relação ao descarte do epitélio larval na fase de EP, e durante a diferenciação final do epitélio digestivo na fase de LP, características que foram diferentes em *An. gambiae*. Como *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* compartilham um ancestral comum mais recente em relação a *An. gambiae*, a origem filogenética pode ser o fator responsável por essas semelhanças entre as duas espécies. Por outro lado, *An. gambiae* e *T. theobaldi* apresentaram uma camada de material fibroso em torno dos restos celulares derivados da degeneração epitelial, o que não foi visto para *Ae. aegypti*. A presença desse material pode indicar que esta é uma característica do ancestral que foi mantida nessas duas espécies, porém, perdida em *Ae. aegypti*, ou que *An. gambiae* e *T. theobaldi* adquiriram esta característica de forma independente.

5. Conclusão

O processo de remodelamento do intestino médio de mosquitos se inicia na fase final do último instar larval desses insetos. No entanto, o epitélio digestivo larval é descartado somente na fase inicial do estágio de pupa. Em *An. gambiae*, as células do novo epitélio se organizam em camada antes do início da histólise do tecido larval, diferentemente do que ocorre em *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*, onde o novo epitélio se organiza ao longo do processo de descarte do epitélio digestivo larval. Houve uma forte evidência de que o epitélio do intestino médio de mosquitos, que é formado nos estágios iniciais do estágio de pupa, também é descartado, e novamente substituído por um novo, o qual corresponderá ao epitélio digestivo do estágio adulto. Esse processo é semelhante ao que ocorre em *D. melanogaster*, porém, em mosquitos, o descarte do epitélio pupal é mais demorado, provavelmente acontecendo poucas horas antes

do tempo médio de duração do estágio de pupa. O epitélio do intestino médio que perdurará no estágio adulto já se encontra formado nas IPs, e acumula grande quantidade de gotículas lipídicas, indicando que lipídeos originários da degradação dos epitélios descartados provavelmente são absorvidos e utilizados pelas células. Tudo indica que esse epitélio ainda não completou seu estado de diferenciação final nas LPs, pois células enteroendócrinas FMRF-positivas não foram encontradas, e eventos de mitose foram recorrentes, semelhantemente ao que ocorre em *D. melanogaster*. Os resultados encontrados nesse trabalho indicam que o processo de remodelamento do intestino médio durante a metamorfose é conservado em mosquitos, e apresenta inúmeras similaridades com *D. melanogaster*. Como o conhecimento dos eventos envolvidos na metamorfose do intestino médio em mosquitos é escasso, esse trabalho potencialmente auxiliará no embasamento de futuros trabalhos envolvendo o órgão tanto nas fases imaturas quanto no estágio adulto de mosquitos.

6. Referências

1. Billingsley, P. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* **35**, 219–248 (1990).
2. Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E. & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol. Int.* **63**, 506–512 (2014).
3. Truman, J. W. & Riddiford, L. M. The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447–452 (1999).
4. Simpson, S. J. & Chapman, R. F. Mouthparts and feeding. in *The Insects: Structure and Function* (orgs. Simpson, S. J. & Douglas, A. E. E.) 15–45 (Cambridge University Press, 2012). doi:10.1017/CBO9781139035460.005
5. Gouveia de Almeida, A. P. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: Desafios para o Século XXI. *Acta Med. Port.* **24**, 961–974 (2011).
6. Christopher, S. R. *Aedes aegypti* L. The yellow fever mosquito Cambridge. *Aedes aegypti* L. *yellow fever Mosq. Cambridge* (1960).
7. Fernandes, K. M. *et al.* Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Med. Vet. Entomol.* **29**, 245–254 (2015).

8. Billingsley, P. F. & Lehane, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. *Biol. Insect Midgut* 3–30 (2011). doi:10.1007/978-94-009-1519-0_1
9. Chapman, R. F., Douglas, A. E. & Chapman, R. F. *Alimentary canal, digestion and absorption. The Insects* (2012). doi:10.1017/cbo9781139035460.006
10. Clements, A. N. *The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction.* (Chapman & Hall, 1992).
11. Hakim, R. S., Baldwin, K. & Smaghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 593–608 (2009).
12. Alves, S. N., Serrão, J. E. & Melo, A. L. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* **41**, 592–597 (2010).
13. Procópio, T. F. *et al.* *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
14. Osta, M. A., Christophides, G. K., Vlachou, D. & Kafatos, F. C. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J. Exp. Biol.* **207**, 2551–2563 (2004).
15. Vega-Rodriguez, J. *et al.* Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E492–500 (2014).
16. Carneiro, L. A. M. & Travassos, L. H. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microbes and infection* **18**, 169–171 (2016).
17. Olmo, R. P. *et al.* Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. *Nat. Microbiol.* **3**, 1385–1393 (2018).
18. Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E. & Beaty, B. J. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* **7**, 9 (2007).
19. J. G. Bond, A. Ramírez-Osorio, C. F. Marina, I. Fernández-Salas, P. Liedo, A. Dor, T. W. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS*

- One* **12**, 1–13 (2017).
20. Joy, T. K., Arik, A. J., Corby-Harris, V., Johnson, A. A. & Riehle, M. A. The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Exp. Gerontol.* **45**, 685–690 (2010).
 21. Souza, R. S. *et al.* Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional Reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Front. Physiol.* **10**, 152 (2019).
 22. Linenberg, I., Christophides, G. K. & Gendrin, M. Larval diet affects mosquito development and permissiveness to *Plasmodium* infection. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
 23. da-Silva Araújo, M., Herman Gil, L. S. & de-Almeida e-Silva, A. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malar. J.* **11**, 1–9 (2012).
 24. Narayanan Kutty, S., Wong, W. H., Meusemann, K., Meier, R. & Cranston, P. S. A phylogenomic analysis of Culicomorpha (Diptera) resolves the relationships among the eight constituent families. *Syst. Entomol.* **43**, 434–446 (2018).
 25. Reidenbach, K. R. *et al.* Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol. Biol.* **9**, 1–14 (2009).
 26. Souza, R. S., Diaz-Albiter, H. M., Dillon, V. M., Dillon, R. J. & Genta, F. A. Digestion of yeasts and beta-1,3-glucanases in mosquito larvae: Physiological and biochemical considerations. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
 27. Attardo, G. M., Hansen, I. A. & Raikhel, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 661–675 (2005).
 28. Wu, D.-D. & Zhang, Y.-P. Trypsin-like serine proteases and the evolution of hematophagy in mosquitoes. in *eLS* (American Cancer Society, 2011). doi:10.1002/9780470015902.a0022880
 29. Tsuji, N., Okazawa, T. & Yamamura, N. Autogenous and anautogenous mosquitoes: a mathematical analysis of reproductive strategies. *J. Med. Entomol.* **27**, 446–453 (1990).

30. Steffan, W. A. & Evenhuis, N. L. Biology of *Toxorhynchites*. *Annu. Rev. Entomol.* **26**, 159–181 (1981).
31. Collins, L. E. & Blackwell, A. The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *Biocontrol News Inf.* **21**, 105N-116N (2000).
32. Focks, D. A. *Toxorhynchites* as biocontrol agents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**, 118–127 (2007).
33. Baia-Da-Silva, D. C. *et al.* The midgut muscle network of *Anopheles aquasalis* (Culicidae, Anophelinae): Microanatomy and structural modification after blood meal and *Plasmodium vivax* (Haemosporida, Plasmodiidae) Infection. *J. Med. Entomol.* **56**, 421–431 (2019).
34. Bernick, E. P., Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* **39**, 277–292 (2007).
35. Godoy, R. S. M., Fernandes, K. M. & Martins, G. F. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep.* **5**, 1–16 (2015).
36. Park, S. S. & Shahabuddin, M. Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *J. Struct. Biol.* **129**, 30–37 (2000).
37. Žitňan, D., Šauman, I. & Sehnal, F. Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **22**, 113–132 (1993).
38. Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H. & Palli, S. R. Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.* **123**, 530–547 (2006).
39. Lowe, N., Chen, J., Sayadian, A.-C., St Johnston, D. & Lovegrove, H. E. An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLOS Biol.* **16**, e3000041 (2018).
40. Dimitrova, N. *et al.* Public Access NIH Public Access. *PLoS One* **32**, 736–740 (2017).
41. Takashima, S., Younossi-Hartenstein, A., Ortiz, P. A. & Hartenstein, V. A novel tissue in an established model system: The *Drosophila* pupal midgut. *Dev. Genes Evol.* **221**, 69–81 (2011).

42. Lemaitre, B. & Miguel-Aliaga, I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 377–404 (2013).
43. Takashima, S. *et al.* Development of the *Drosophila* entero-endocrine lineage and its specification by the Notch signaling pathway. *Dev. Biol.* **353**, 161–172 (2011).
44. Takashima, S. *et al.* Development of the *Drosophila* entero-endocrine lineage and its specification by the Notch signaling pathway. *Developmental Biology* **353**, 161–172 (2011).
45. Christiansen-Jucht, C. D., Parham, P. E., Saddler, A., Koella, J. C. & Basanez, M.-G. Larval and adult environmental temperatures influence the adult reproductive traits of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasit. Vectors* **8**, 456 (2015).
46. ATERMAN, K. & NORKIN, S. The Periodic Acid – Schiff Reaction. *Nature* **197**, 1306 (1963).
47. Tamaki, F. K. *et al.* Physiology of digestion and the molecular characterization of the major digestive enzymes from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **70**, 22–35 (2014).
48. Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Machado, E. A. & Miranda, K. Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tissue Res.* **352**, 313–326 (2013).
49. Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F. & Terra, W. R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* **47**, 143–155 (2001).
50. Syed, Z. A., Härd, T., Uv, A. & van Dijk-Härd, I. F. A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. *PLoS One* **3**, (2008).
51. Buchon, N. *et al.* Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* **3**, 1725–1738 (2013).
52. Escudero, L. M. *et al.* Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. *Nat. Commun.* **2**, 526 (2011).
53. Malta, J. *et al.* Midgut morphological changes and autophagy during metamorphosis in

- sand flies. *Cell Tissue Res.* **368**, 513–529 (2017).
54. Franzetti, E. *et al.* Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* **17**, 305–324 (2012).
 55. Franzetti, E. *et al.* The midgut of the silkworm *Bombyx mori* is able to recycle molecules derived from degeneration of the larval midgut epithelium. *Cell Tissue Res.* **361**, 509–528 (2015).
 56. Romanelli, D., Casartelli, M., Cappellozza, S., De Eguileor, M. & Tettamanti, G. Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 57. Beehler-Evans, R. & Micchelli, C. A. Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* **142**, 654–664 (2015).
 58. Oliveira, A. H. *et al.* Morphology and morphometry of the midgut in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). *Insects* **10**, (2019).
 59. Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Sci.* **5**, (2014).
 60. PRICE, D. A. & GREENBERG, M. J. The Hunting of the FaRPs: The Distribution of FMRFamide-Related Peptides. *Biol. Bull.* **177**, 198–205 (2007).
 61. Mercier, A. J. & Lee, J. Differential effects of neuropeptides on circular and longitudinal muscles of the crayfish hindgut. *Peptides* **23**, 1751–1757 (2002).
 62. Price, D. A. & Greenberg, M. J. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* **7**, 261–281 (1977).
 63. Milakovic, M., Ormerod, K. G., Klose, M. K. & Mercier, A. J. Mode of action of a *Drosophila* FMRFamide in inducing muscle contraction. *J. Exp. Biol.* **217**, 1725–1736 (2014).
 64. Cazzamali, G. & Grimmelikhuijzen, C. J. P. Molecular cloning and functional expression of the first insect FMRFamide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12073–

- 12078 (2002).
65. Nichols, R., McCormick, J. & Lim, I. Regulation of *Drosophila* FMRFamide neuropeptide gene expression. *J. Neurobiol.* **39**, 347–358 (1999).
 66. Nichols, R., McCormick, J., Lim, I. & I, L. C. Cellular expression of the *Drosophila melanogaster* FMRFamide neuropeptide. *Gene Product.* **6**, 1–10 (1995).
 67. White, K., Hurteau, T. & Punsal, P. Neuropeptide-Fmrfamide-Like immunoreactivity in *Drosophila*: Development and distribution. *J. Comp. Neurol.* **247**, 430–438 (1986).
 68. Krajniak, K. G. Invertebrate FMRFamide Related Peptides. *Protein Pept. Lett.* **20**, 647–670 (2013).
 69. Strand, M. R., Brown, M. R. & Vogel, K. J. Mosquito peptide hormones: Diversity, production, and function. *Adv. In Insect Phys.* **51**, 145–188 (2016).
 70. Brown, M. R., Crim, J. W. & Lea, A. O. FMRFamide- and pancreatic polypeptidelike immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue Cell* **18**, 419–428 (1986).
 71. Strand, M. & Micchelli, C. A. Quiescent gastric stem cells maintain the adult *Drosophila* stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17696–17701 (2011).
 72. Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H. & Palli, S. R. Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.* **123**, 530–547 (2006).
 73. Wiegmann, B. M. *et al.* Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5690–5695 (2011).
 74. Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104 (1999).
 75. Harker, B. W. *et al.* Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*. *BMC Dev. Biol.* **13**, 1 (2013).
 76. Neira Oviedo, M., Vanekeris, L., Corena-Mcleod, M. D. P. & Linser, P. J. A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Mol. Biol.* **17**, 61–72 (2008).

FIGURAS

Figura 1: A-F: Histologia do intestino médio de larvas L4 tardias de *An. gambiae*. **A-C:** Nessa fase, o intestino médio não possui matriz peritrófica nem alimento no lúmen (Lu). Ao invés disso, ele é preenchido por um material granuloso eosinofílico (Gr). As células digestivas do intestino médio anterior (AMG) possuem ápice (CA) repleto de material ácido, ao contrário na base (CB), com material predominantemente eosinofílico. A borda em escova é fortemente eosinofílica (*). Algumas células digestivas são vistas emitindo protusões em direção ao lúmen (P), e as células basais (setas finas pretas) são vistas individualizadas entre as células digestivas. **D-F:** As células digestivas do intestino médio posterior (PMG) também emitem protusões (P) em direção ao lúmen., as quais são preenchidas por material mucoso (setas largas brancas). As células basais (setas pretas finas) dessa região se organizam de forma alinhada e já se encontram conectadas umas às outras. A-D: Coloração HE. E-F: Técnica histoquímica de PAS. GC: ceco gástrico; AMG: intestino médio anterior; N: núcleo de células digestivas; n: núcleo de células basais; Lu: lúmen; asterisco: borda em escova; CA: ápice celular; CB: base das células digestivas; P: protusões citoplasmáticas; setas largas brancas: material mucoso. A: Barra equivale a 50 μm ; B-F: Barras: 10 μm .

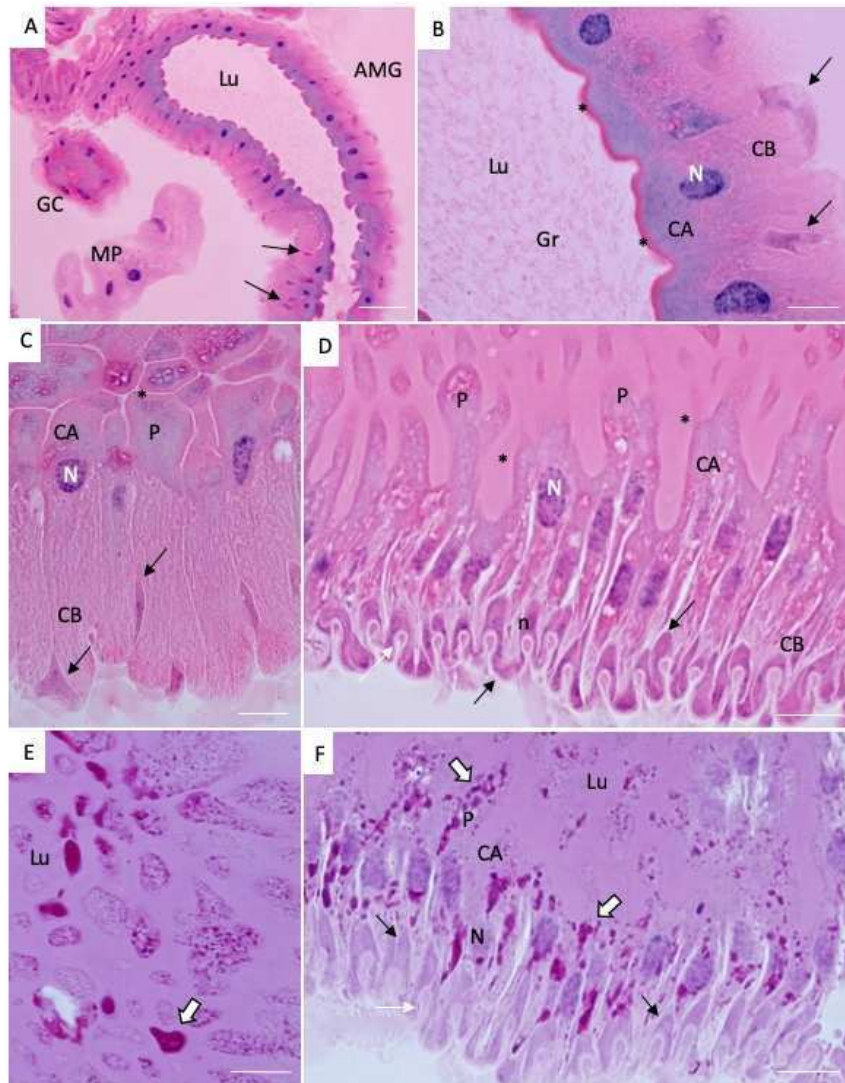


Figura 2: Histologia de pupas iniciais (EP) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* com 20 min, 30 min e 75 min h após pupação, respectivamente. **A-C:** Visão geral do intestino médio no ápice do remodelamento tecidual. **D-L:** Células do epitélio larval são vistas em degeneração nas regiões referentes ao GC (D-F), AMG (G-I) e PMG (J-L) larval nas três espécies. Coloração: HE. GC: ceco gástrico; AMG: intestino médio anterior; PMG: intestino médio posterior; Lu: lúmen; N: núcleo de células do epitélio digestivo larval em degeneração; n: núcleo de células basais em ascensão; asterisco: borda em escova de células do ceco gástrico; asterisco: borda em escova de células referentes ao GC larval; estrela: borda em escova de células referentes ao PMG larval. Setas pretas: células regenerativas; setas brancas: fibras musculares. A-C: Barras equivalem a 50 μ m; D-L: Barras: 10 μ m.

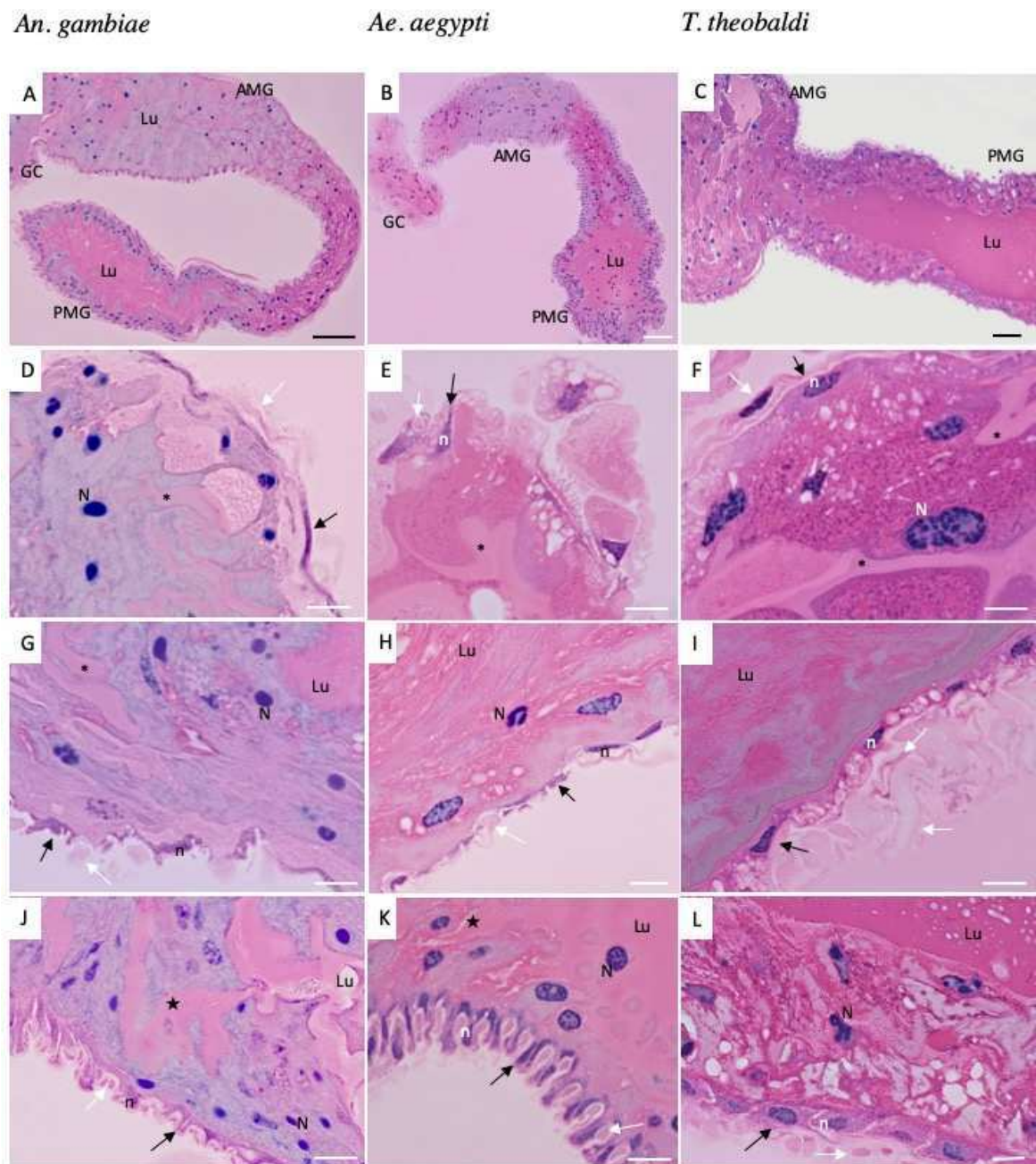


Figura 3: A, C e E: Histologia de pupas iniciais (EP) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* com 0hs após pupação. B, D e F: Histologia de pupas iniciais (EP) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi* com 40 min, 60 min e 150 min após pupação, respectivamente. Coloração: HE. N: núcleo de células do epitélio digestivo larval em degeneração; n: núcleo de células do epitélio recém-formado; Lu: lúmen; setas: fibras musculares. Barras: 10 μ m.

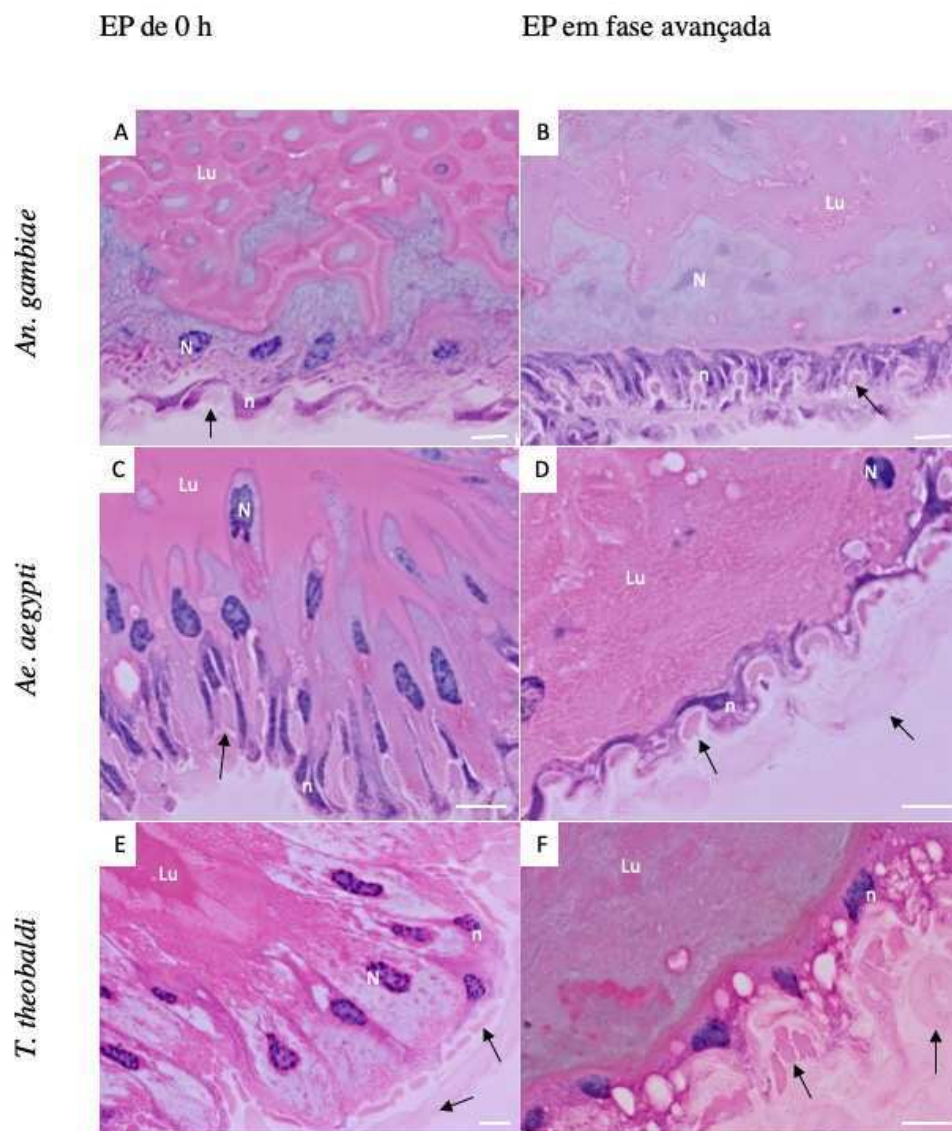


Figura 4: A-G: Histologia do intestino médio de pupas iniciais (EP) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. **A-C:** Região referente ao ceco gástrico (GC) larval em processo de degeneração em *An. gambiae* (A), *Ae. aegypti* (B) e *T. theobaldi* (C). **D:** Células oriundas do GC larval (setas) são encontradas na região referente ao AMG larval. **E-F:** Algumas amostras de EPs com 40min após pupação de *An. gambiae* apresentaram o epitélio recém-formado da região mais posterior do intestino médio em um estado de diferenciação mais avançado (E), enquanto em outras, as células digestivas de toda a extensão foram morfologicamente similares (F). **G:** O epitélio digestivo recém-formado na fase de EP de *T. theobaldi* com 150 min após pupação é morfologicamente similar em toda a extensão do órgão, e o lúmen do intestino médio dessa fase não apresenta núcleos de células em degeneração derivadas do epitélio digestivo larval. Coloração: HE. GC: região referente ao ceco gástrico larval; AMG: região referente ao intestino médio anterior larval; PMG: região referente ao intestino médio posterior larval; Lu: Lúmen; Ep: epitélio; setas: células derivadas do GC larval em degeneração. A-G: Barras: 20 μ m.

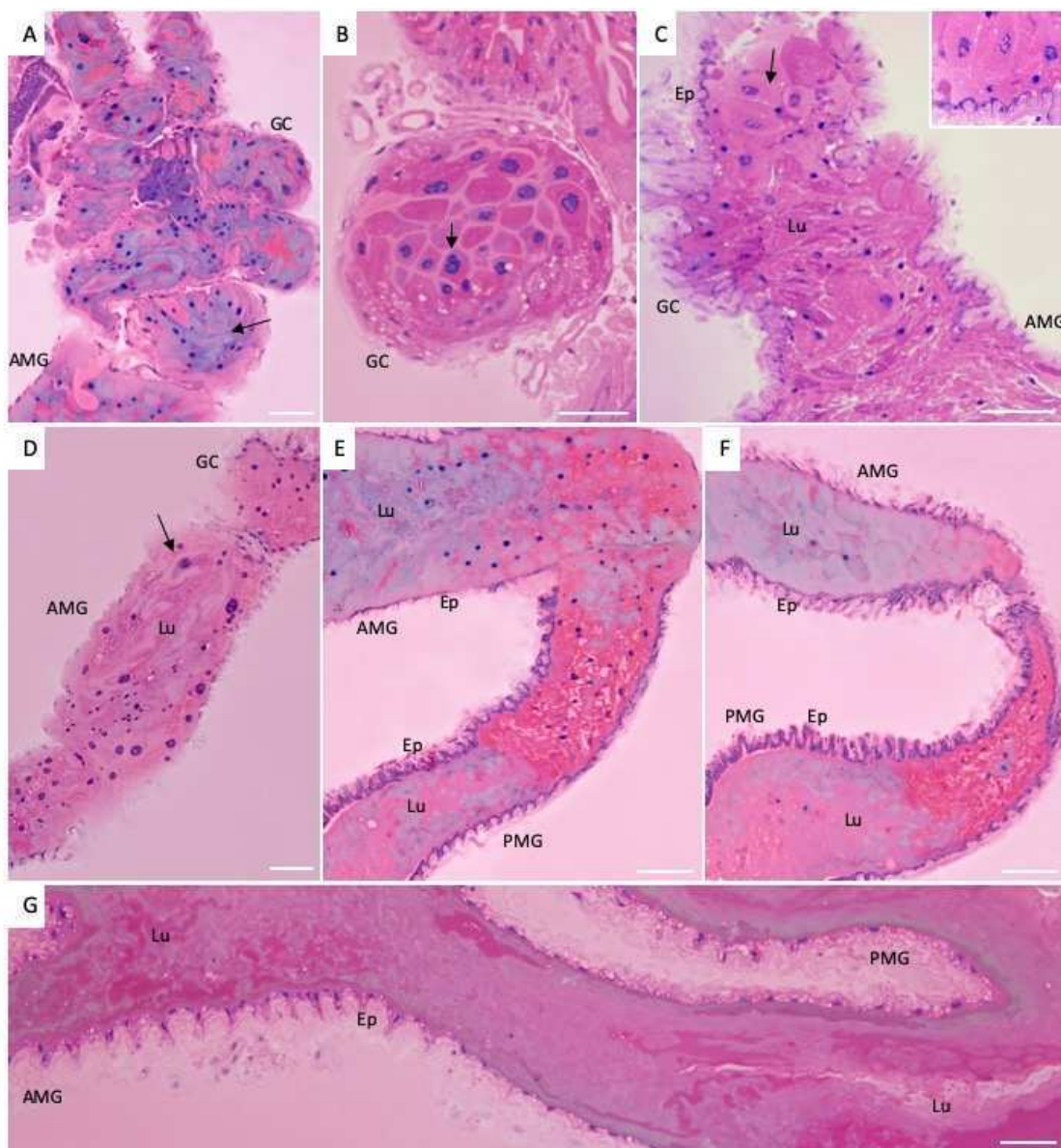


Figura 5: A-D: Histologia do intestino médio de pupas iniciais de *T. theobaldi* com 0h (A e C) e 1,15 h (B e D) após pupação. A, C: Células regenerativas de citoplasma basofílico (setas) são vistas individualizadas, ou agrupadas, mas sem formação de uma camada epitelial nas EPs de 0 h. Nas EPs de 1,15 h, as células já formam uma camada, e as células com núcleos picnóticos (N) oriundas do epitélio digestivo larval são vistas se degenerando. Coloração: HE. AMG: região referente ao intestino médio anterior larval; PMG: região referente ao intestino médio posterior larval. Lu: lúmen, N: núcleos das células epiteliais do intestino médio larval; n: núcleos de células do epitélio digestivo recém-formado; Mf: fibras musculares; colchetes: borda em escova. A-D: Barras: 20 μ m.

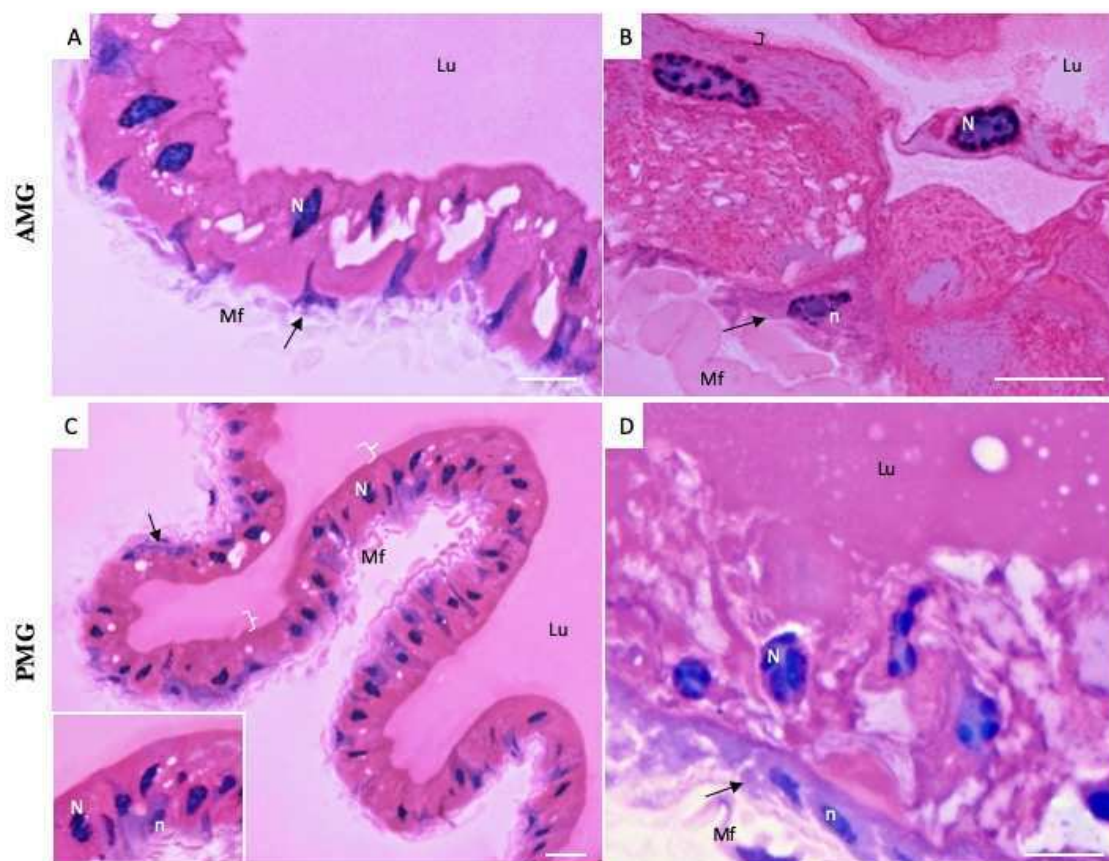


Figura 6: A-F: Detecção de autofagia (A, B e D inset) e apoptose (C, D, E e F) no intestino médio de pupas iniciais (EP) de *Ae. aegypti*. Microscopia confocal. A, B, e D inset: vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: vacúolos autofágicos. C-F: vermelho: fibras musculares; verde: núcleos de células apoptóticas. GC: região referente ao antigo ceco gástrico larval; AMG: região referente ao intestino médio anterior larval; PMG: região referente ao intestino médio posterior larval. Barras: 20 μ m.

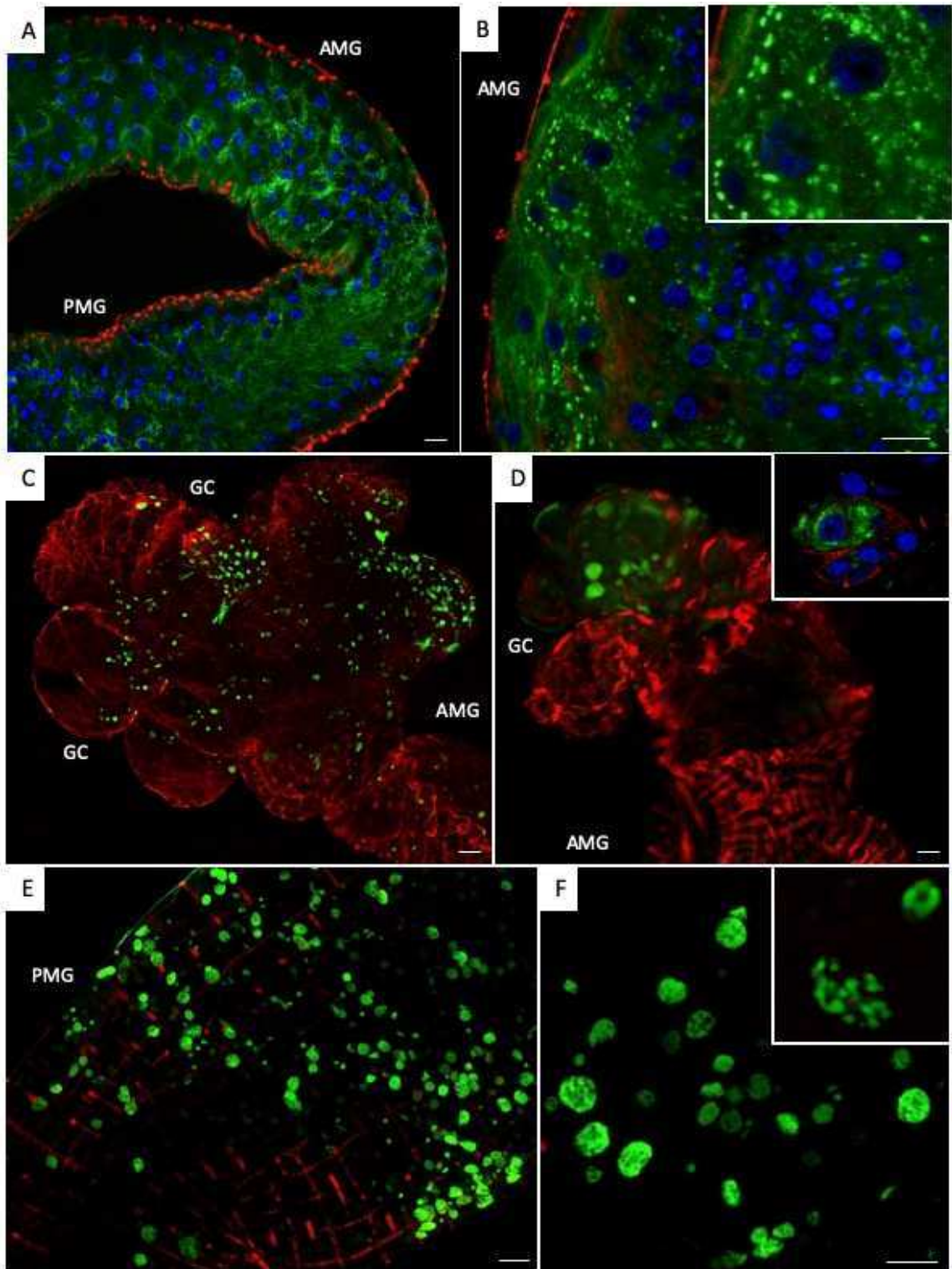


Figura 7: A-E: Detecção de células enteroendócrinas FMRF-positivas na região mais posterior do intestino médio de pupas iniciais (EP) de *Ae. aegypti* (A-D) e *T. theobaldi* (E). As células enteroendócrinas FMRF-positivas (verde) estão presentes no epitélio digestivo recém-formado. Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: células enteroendócrinas FMRF-positivas; N: núcleo de células do epitélio larval; n: núcleo das células do epitélio recém-formado; BB: borda em escova do epitélio recém-formado; CF: fibras musculares circulares; LF: fibras musculares longitudinais. A-E: Barras: 20 μ m.

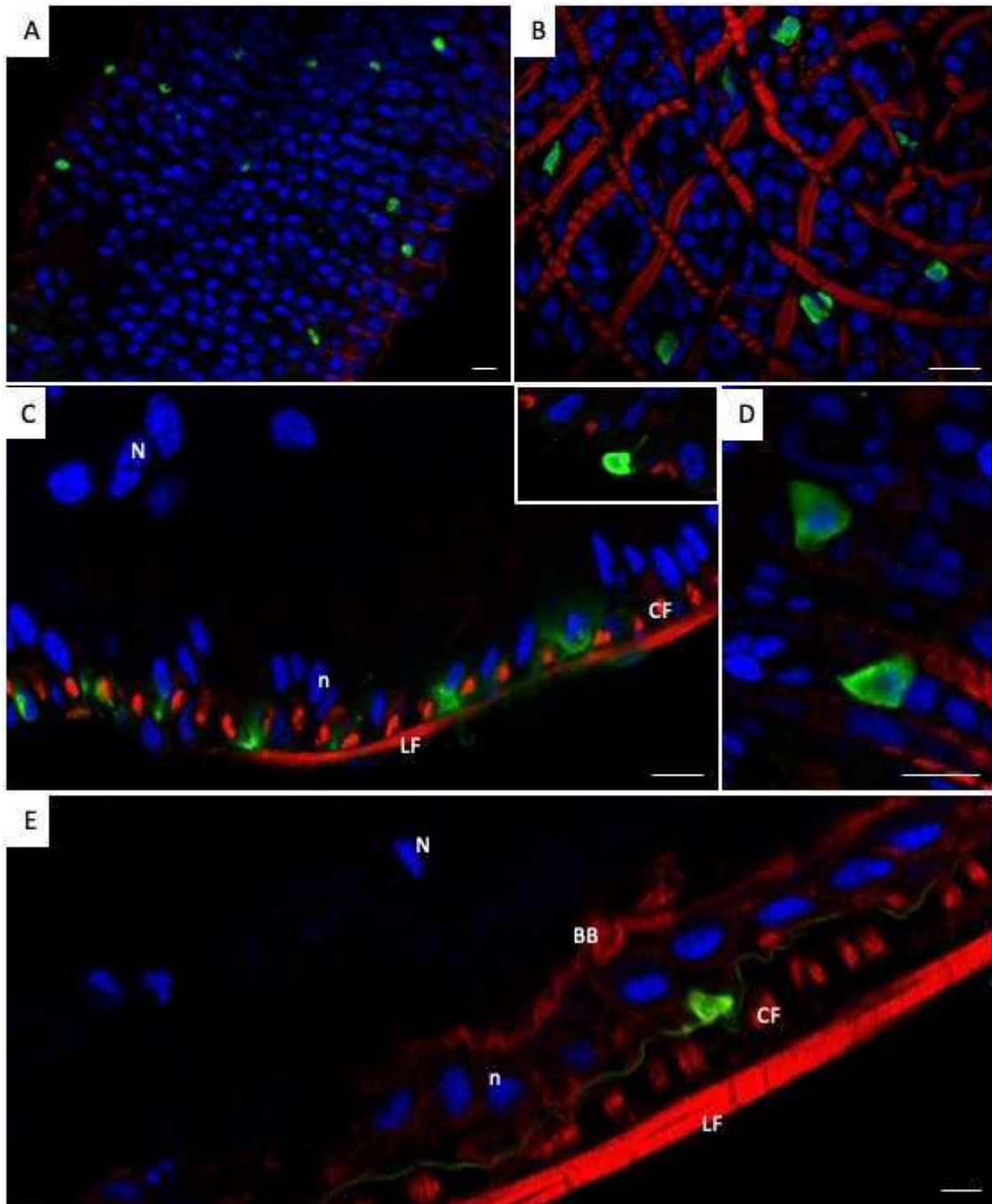


Figura 8: A-I: Histologia do intestino médio de pupas intermediárias (IP) de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *T. theobaldi*. **A-C:** Presença de células com núcleos picnóticos e citoplasma acinzentado soltas no lúmen do intestino médio das IPs das três espécies. **D-I:** A morfologia do epitélio digestivo do intestino médio é similar entre a região mais anterior (D-F) e mais posterior (G-I) das três espécies. Células em degeneração são vistas anexadas ao ápice do epitélio digestivo da região mais anterior do intestino médio de *An. gambiae* (setas largas) (D). Material acinzentado é visto no lúmen e rente ao epitélio digestivo do intestino médio das três espécies (D-F e H-I). A borda em escova das células digestivas dessa fase é delgada, e o citoplasma é repleto de gotículas de lipídio (Ld) (D-I). Uma camada de material fibroso (M) é vista no lúmen do intestino médio de *An. gambiae* (G) e *T. theobaldi* (F). Coloração: HE. Lu: lúmen; N: núcleo de células em degeneração; n: núcleo das células digestivas intactas; M: material fibroso em torno do conteúdo intestinal; setas finas pretas: fibras musculares; colchete: camada de células em degeneração. A-I: Barras equivalem a 10 μ m.

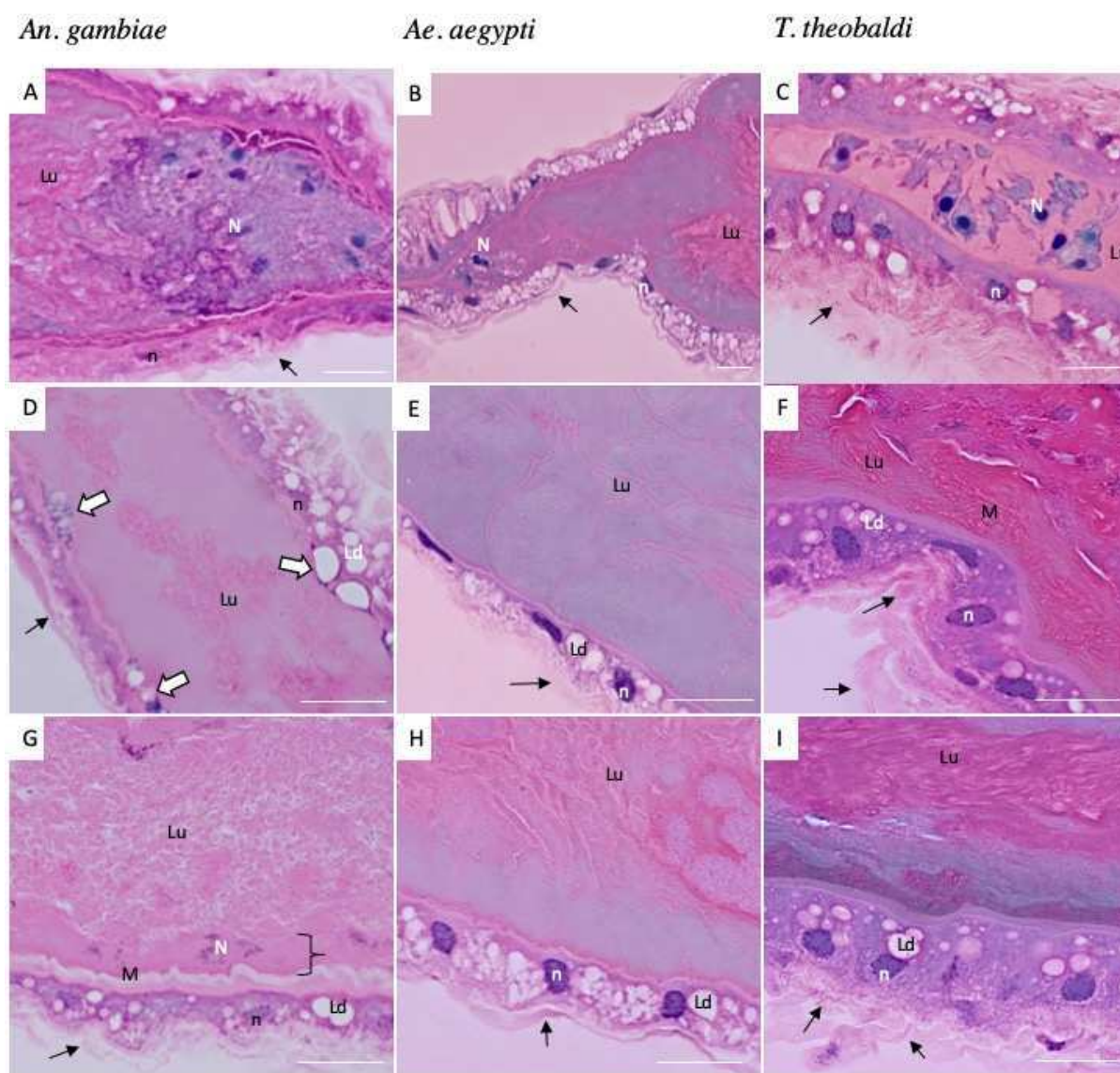


Figura 9: A-F: Histologia de pupas intermediárias (IP) de *Ae. aegypti* (C-D e F) e *T. theobaldi* (A-B e E). Regiões acinzentadas oriundas de processo de degeneração de células (setas largas) são vistas nas bordas do epitélio digestivo das IPs. Coloração: HE. MF: fibras musculares; Lu: lúmen; N: núcleo de células em degeneração; n: núcleo de células do epitélio digestivo normal; setas brancas largas: regiões acinzentadas típicas de células em degeneração; setas pretas finas: material fibroso em camada. A-C: Barras equivalem a 50 μ m. D-F: Barras: 10 μ m.

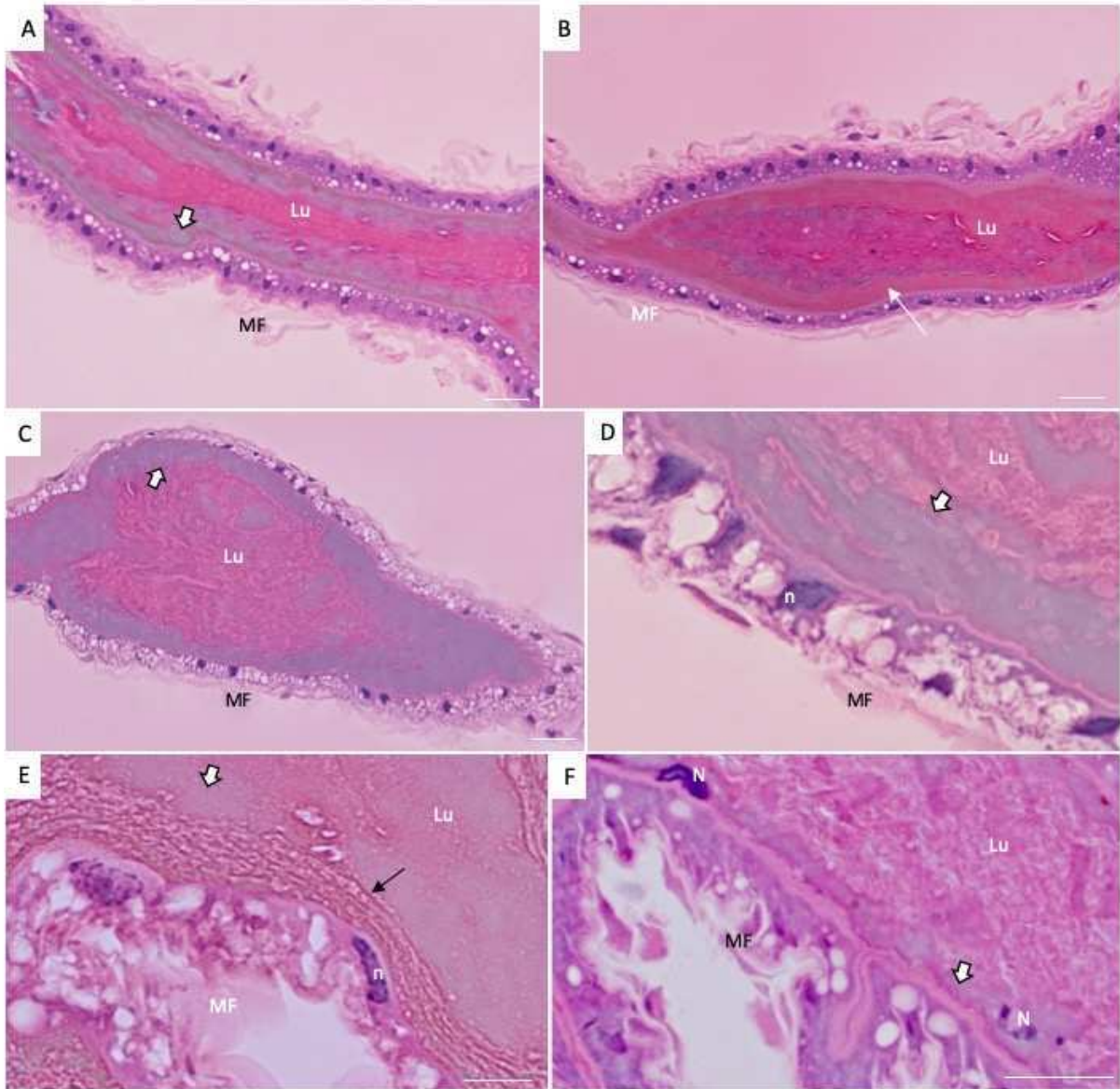


Figura 10: A-D: Intestino médio de pupas intermediárias (IP) de *Ae. aegypti*. A: Nenhuma estrutura FMRF-positiva é vista no intestino médio das IPs. B-D: Detecção de núcleos de células em mitose (verde) isoladas em todas as regiões do intestino médio das IPs. Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: núcleo de células em mitose. AR: Região mais posterior do intestino médio; MR: Região média do intestino médio; PR: Região mais anterior do intestino médio. MT: Túbulos de Malpighi. A: Barras equivalem a 100 μm . B-D: Barras: 20 μm .

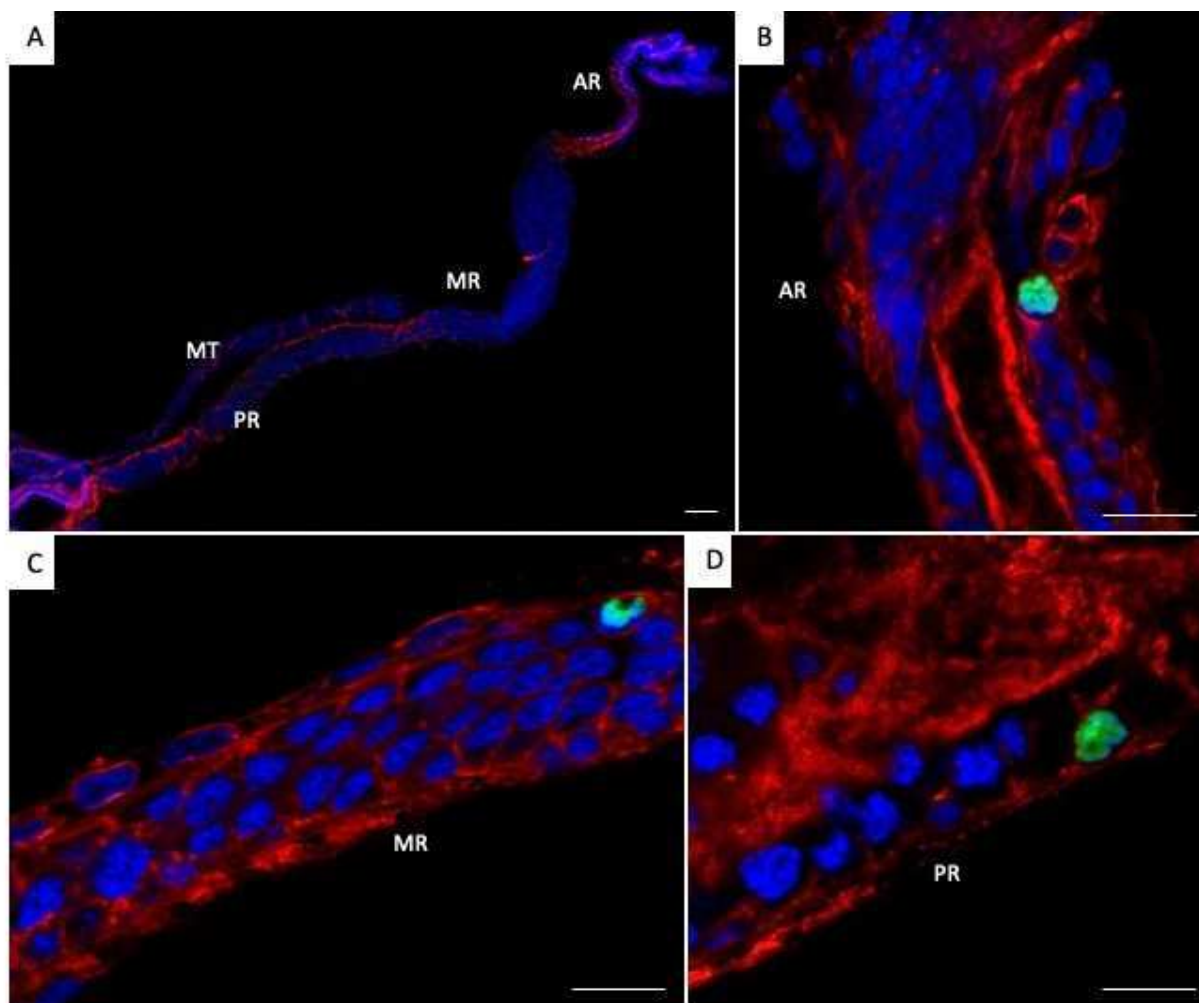


Figura 11: A-I: Histologia de pupas tardias (LP) de *An. gambiae* (A, D e G), *Ae. aegypti* (B, E e H) e *T. theobaldi* (C, F e I). A-C: Visão geral da região mais posterior do intestino médio de LPs. D-F: Detalhe da região mais anterior do intestino médio. G-I: Detalhe da região mais posterior do intestino médio. Coloração: HE. Setas brancas: fibras musculares; Cd: debris celulares; Lu: lúmen; setas pretas: material fibroso em torno de debris celulares; n: núcleos. A-C: Barras equivalem a 50 μ m. D-I: Barras: 10 μ m.

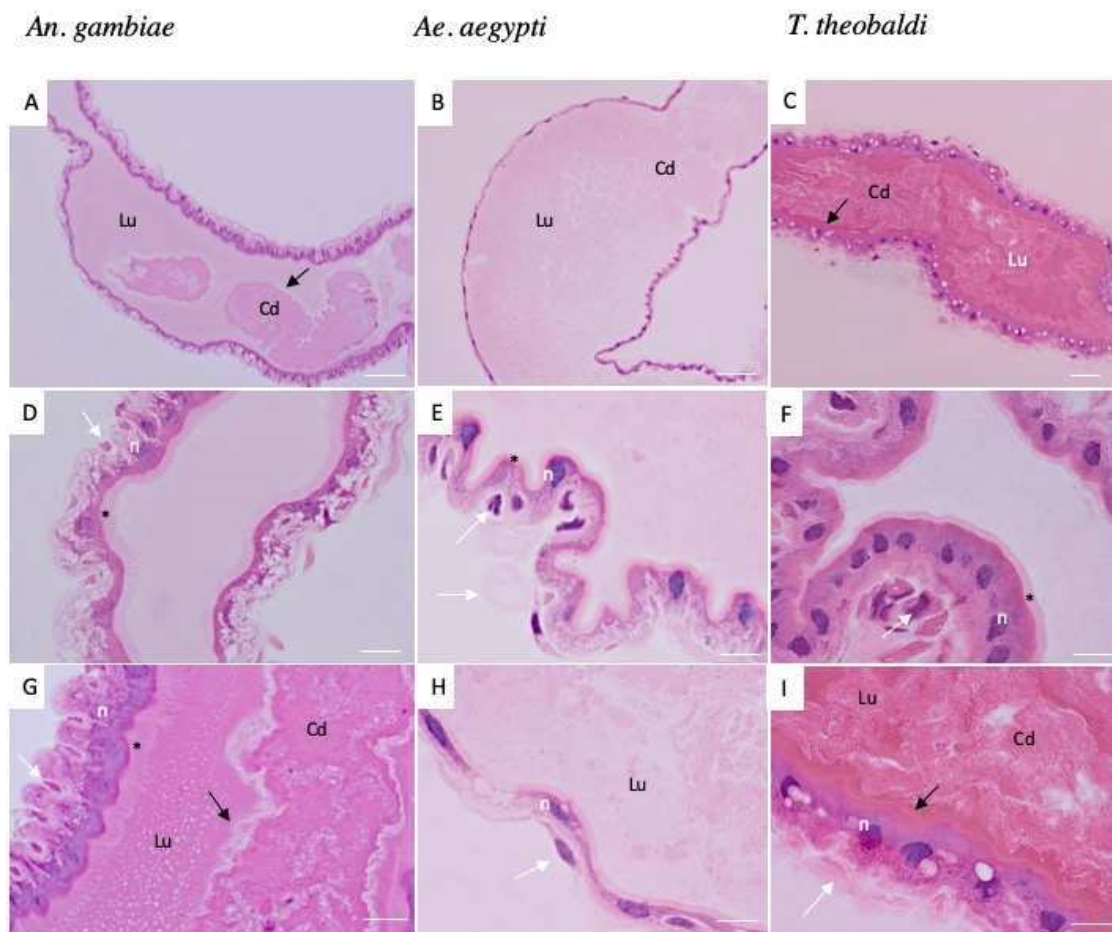


Figura 12: A-B: Histologia do intestino médio de pupas tardias de *Ae. aegypti* (A) e *T. theobaldi* (B). Note que em *Ae. aegypti* células são vistas se destacando em direção ao lúmen (A, inset). Coloração: HE. C-D: Detecção de gotículas lipídicas no intestino médio de IP de *An. gambiae* (C) e LP de *T. theobaldi* (D). Impregnação por tetróxido de ósmio. AR: Região anterior; PR: região posterior; Ep: epitélio digestivo; Lu: lúmen; setas: gotículas de lipídeos. A-D: Barras: 20 μ m.

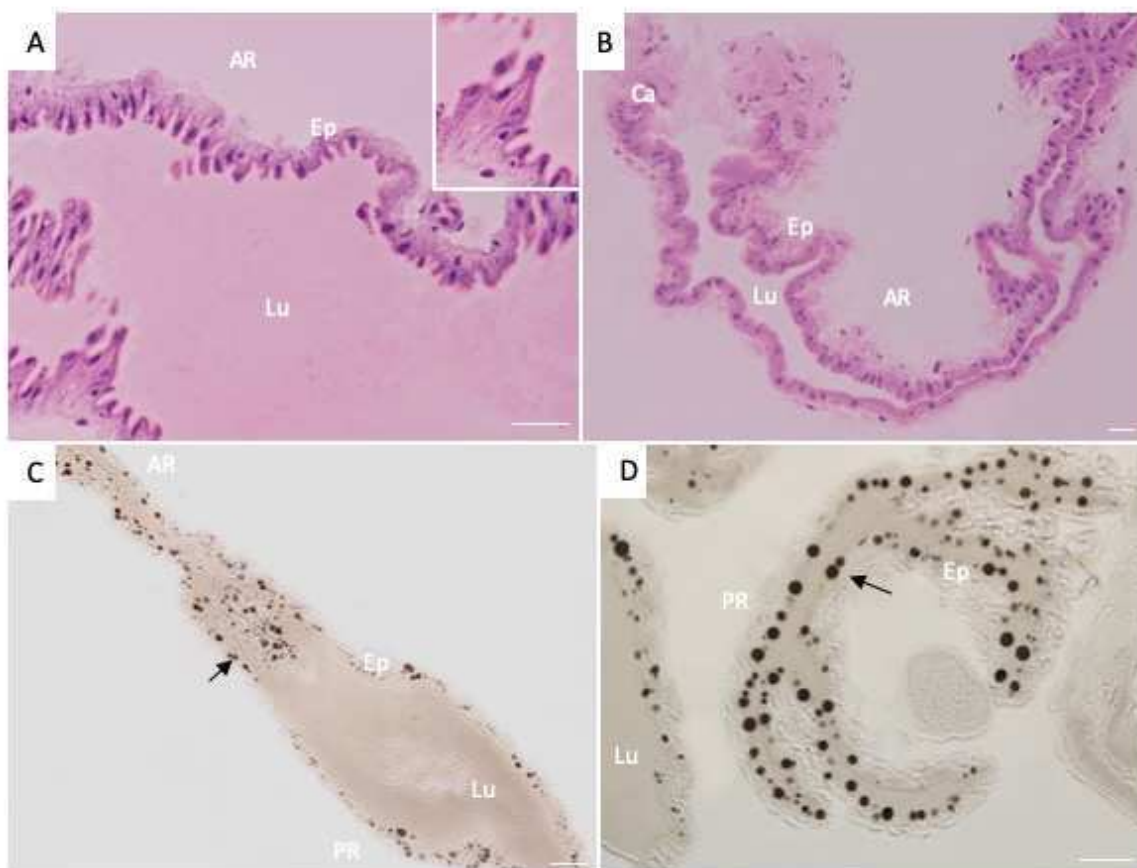


Figura 13: A-G: Detecção de autofagia (A-B) e apoptose (C-G) no intestino médio de pupas tardias (LP) de *Ae. aegypti*. Microscopia confocal. A-B: vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: vacúolos autofágicos. C-D: vermelho: fibras musculares; verde: núcleos de células apoptóticas. Ca: cárdia em formação, Cr: divertículo ventral em formação; AR: região mais anterior do intestino médio; PR: região mais posterior do intestino médio. A-G: Barras: 20 μ m.

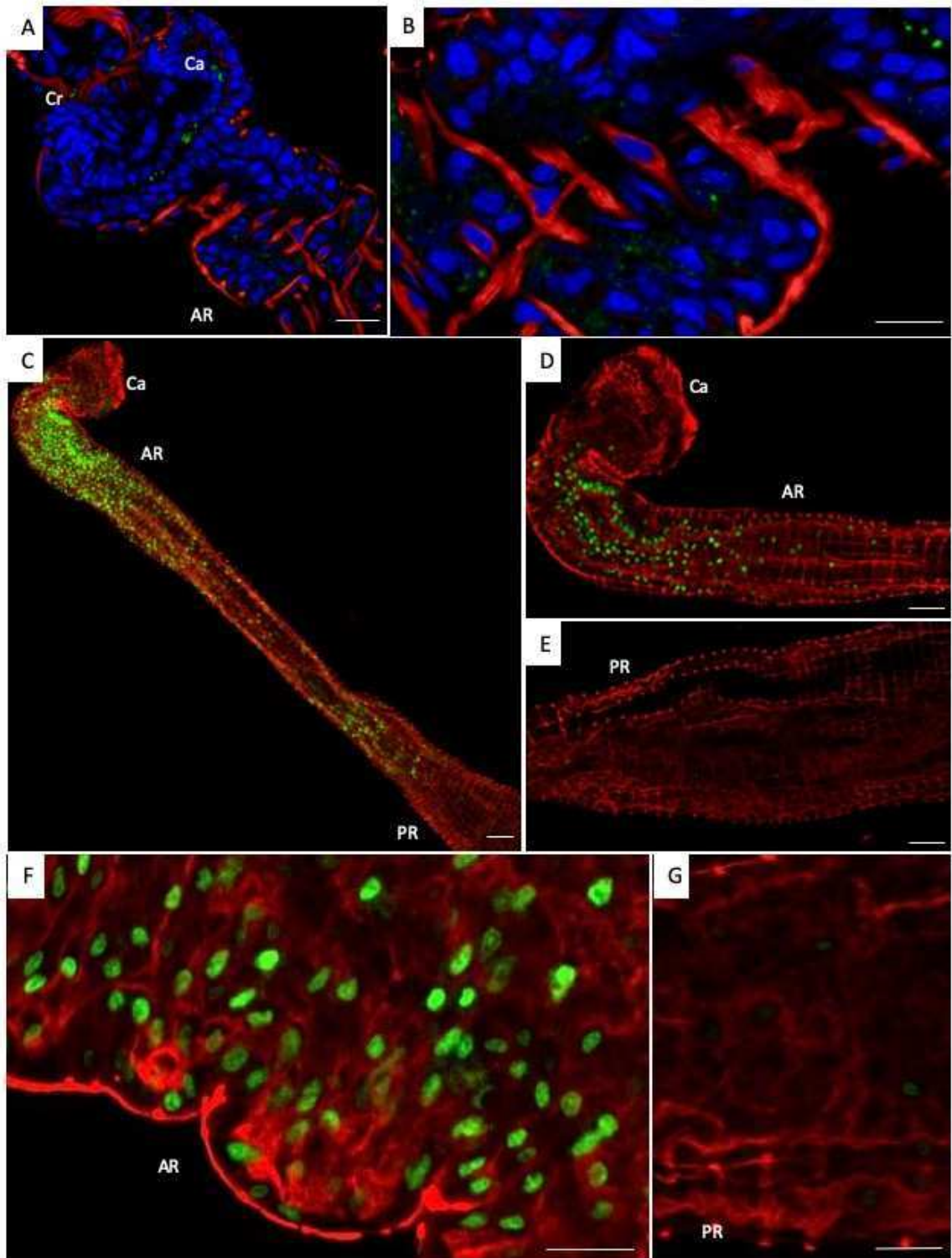
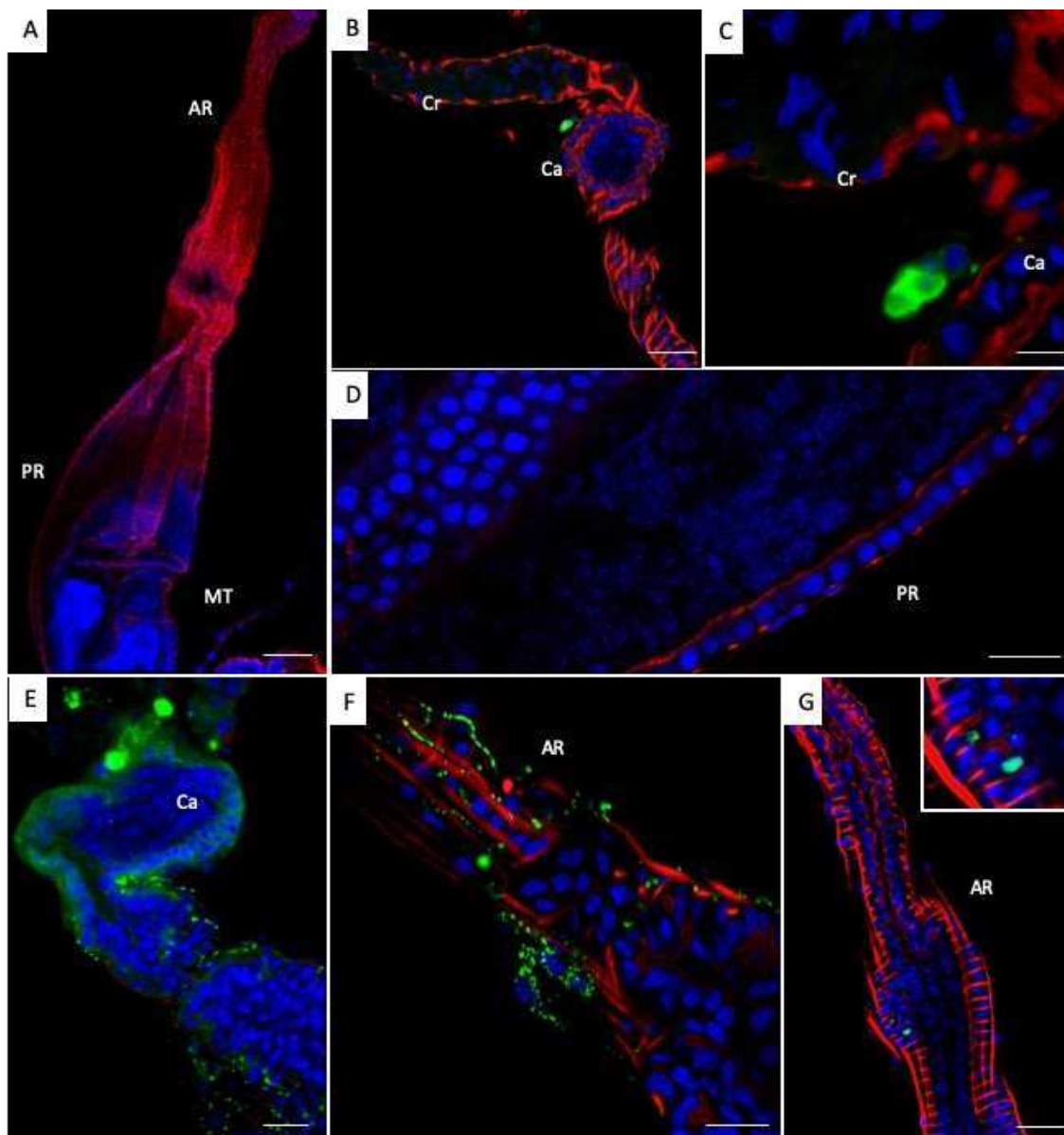


Figura 14: A-G: Intestino médio de pupas tardias (LPs) de *Ae. aegypti*. AR: região anterior do intestino médio; PR: região mais posterior do intestino médio. MP: túbulos de Malpighi; Ca: cárdia. Cr: divertículo ventral. Microscopia confocal. A e D: vermelho: fibras musculares; azul: núcleos. B, C, D e E: vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: neurônios FMRF-positivos. G: vermelho: fibras musculares; azul: núcleos; verde: núcleos de células mitóticas. A, B e G: Barras equivalem a 100 μm . C, D, E e F: Barras equivalem a 20 μm .



5. CAPÍTULO 3

Peptídeos relacionados ao FMRFamida estão envolvidos na sinalização de remodelamento dos músculos circulares do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

Resumo

FMRFamida é membro da família de peptídeos conhecida como FaRP (FMRFamide related peptides). FaRPs constituem a principal classe de peptídeos neurotransmissores de invertebrados, e foram detectados no intestino médio de mosquitos. Nos mosquitos adultos, estes peptídeos são detectados em axônios da região anterior e em células enteroendócrinas da região posterior do intestino médio. O papel desses peptídeos no trato gastrointestinal de mosquitos ainda não está claro, mas há evidências de sua relação com a função muscular. Neste trabalho, mostramos que em larvas de quarto instar tardias de *Aedes aegypti*, FaRPs se localizam em neuritos posicionados em regiões específicas do músculo circular do intestino médio, ao mesmo tempo que uma nova camada de músculos circulares aparece. Além de reforçar o envolvimento dessas moléculas com a função muscular, foi visto que o remodelamento dos músculos do intestino médio de mosquitos se inicia em uma etapa anterior à metamorfose.

1. Introdução

O FMRF é o principal membro da extensa família de peptídeos relacionados ao FMRFamida (FaRP), que inclui todos os peptídeos contendo a sequência C-terminal de X1X2RFamida (X1X2-Arg-Phe-amida), onde X1 pode ser F (fenilalanina), Y (tirosina) ou W (triptofano), e X2 pode ser F (fenilalanina), I (isoleucina), L (leucina), M (metionina), T (treonina) ou V (valina)^{1,2}. O FMRFamida foi primeiramente isolado do molusco *Macrocallista nimbosa* e descrito como um neuropeptídeo acelerador de batimentos cardíacos^{3,4}. Posteriormente, peptídeos compartilhando sequências similares foram vistos em outros moluscos e em membros de outros grupos de invertebrados, como os insetos (Arthropoda)^{1,5-7}. FaRPs constituem a família de peptídeos neurotransmissores mais importante de invertebrados⁸, e foram detectados no trato gastrointestinal de uma variedade de insetos⁹⁻¹⁴, incluindo os mosquitos *Aedes aegypti*^{10,15} e *Toxorhynchites theobaldi*¹². Em larvas de *A. aegypti*, FaRPs são vistos em células enteroendócrinas isoladas e distribuídas no intestino médio posterior. No entanto, a presença desses neuropeptídeos nunca foi investigada no intestino médio de larvas

L4 em fase de pré-pupação nesses insetos. Nos adultos dessas espécies, os FaRPs são vistos no interior de axônios da região anterior do intestino médio e em células enteroendócrinas da região posterior do órgão ¹⁰.

A técnica de imunofluorescência tem sido usada em muitos trabalhos para detectar e contar células enteroendócrinas FMRF-positivas no trato digestivo de insetos através da utilização de anticorpos anti-FMRFamida ^{10,11,14}. No entanto, o papel exato desses peptídeos nessas células ainda é desconhecido. Foi sugerido que as células enteroendócrinas FMRF-positivas do intestino médio de insetos podem atuar captando informações sobre o conteúdo de nutrientes no lúmen do órgão e/ou a tensão em sua parede muscular, assim agindo localmente regulando a produção de enzimas digestivas pelas células digestivas e a contração muscular ⁹. Ensaio funcionais usando FaRPs em insetos também indicam que uma de suas ações é modular a função muscular, controlando os movimentos peristálticos do trato digestivo ^{2,16}.

Desde que o *A. aegypti* é um dos principais vetores de arbovírus em diversas regiões do mundo ^{17,18}, seu controle populacional tem sido constantemente realizado através da utilização de inseticidas. Por regularem processos biológicos-chave, envolvidos no crescimento, reprodução, metabolismo e desenvolvimento dos insetos, vários tipos de neuropeptídeos, como os FaRPs, e seus receptores, tem sido alvos para uma nova geração de potenciais agentes de controle de vetores e insetos-praga ¹⁹⁻²¹.

Mosquitos são insetos holometábolos, pois seu ciclo de vida inclui os estágios imaturos de larva e pupa, além do adulto ²². A morfofisiologia dos órgãos muda completamente entre larvas e adultos, o que leva esses insetos a passarem por intensas modificações estruturais durante a metamorfose em fase de pupa. Uma dessas modificações é vista no intestino médio, órgão que é completamente remodelado até atingir sua forma final no mosquito adulto ¹⁵.

O intestino médio de larvas de *A. aegypti* é formado por um epitélio digestivo simples, que é circundado externamente por dois tipos de músculos, os circulares e os longitudinais. Os músculos circulares formam anéis interconectados que se inter cruzam com os músculos longitudinais, envolvendo o intestino médio em uma malha que lhe dá sustentação ²³. Durante a metamorfose, é estabelecido que os músculos viscerais do intestino médio larval de *A. aegypti* apresentam sinais de degeneração e sofrem atrofia, com as células musculares perdendo seu conteúdo de miofibrilas, mas permanecendo com suas membranas celulares intactas ²⁴. Porém, nenhum estudo foi realizado no intuito de verificar o possível surgimento de novas fibras musculares durante o remodelamento muscular do órgão.

As demonstrações de envolvimento de neuropeptídios da família FaRP na regulação da função muscular foram feitas a partir de ensaios funcionais ^{2,25,26}, nunca sendo mostradas *in situ*. No entanto, neste trabalho, mostramos que estes neuropeptídeos tem envolvimento direto com a função muscular, pois foram vistos em contato com regiões específicas dos músculos circulares do intestino médio de *A. aegypti* através de marcações *in situ*. Seu padrão de localização entre as fibras musculares do intestino médio é mostrado, além de sua possível implicação no desenvolvimento e remodelamento da musculatura visceral. Além de reforçar o papel dos FaRPs como reguladores da função muscular em invertebrados, este trabalho também trouxe novidades a respeito do remodelamento dos músculos viscerais do intestino médio de mosquitos.

2. Material e métodos

MOSQUITOS

Larvas de *A. aegypti* (Linhagem PPCampos, Campos dos Goytacazes, RJ) foram criadas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa e foram coletadas nos estágios de L4 em fase pré-pupa (72 h a partir da ecdise de L3 para L4) e em estágio de pupa inicial (0 a 3 horas após a entrada na pupação ou na ecdise de L4 para pupa). Os insetos foram alimentados com ração de tartaruga Nutral Ouro (Brasil Ltda.), e mantidos em estufas BOD a uma temperatura de 26 ± 2 ° C, umidade de 60% e fotoperíodo de 12 h.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os intestinos médios de 25 larvas L4 em fase de pré-pupa e 15 pupas em fase inicial (0 a 2 horas após pupação) foram fixados em solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0.4% em PBS, pH 7.3), lavados três vezes por 30 min cada em PBS (0.1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, and 20 mM Na₂HP₄; pH 7.6) / 1% Triton X-100 (PBST) e incubados por 24 horas a 4 °C com anticorpo primário anti-FMRFamide (Peninsula Laboratories, Inc. , San Carlos, CA, EUA) (1:400) em PBST a 1%. As amostras foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma Aldrich, Brasil Ltda, São Paulo, SP) (1: 500) em PBS durante 24 h a 4 °C, seguido por três lavagens em PBS de 10 min cada. Para a identificação do tecido muscular, os intestinos foram corados com Phalloidin-Alexa 546 (Thermo Fisher Scientific) por 60 minutos, e contrastados com TO-PRO-3 Iodide (Life Technologies) por 30 minutos para contrastar os núcleos das células. Procedimento similar foi

realizado utilizando intestinos médios de 15 larvas L4 em fase de pré-pupa e 10 pupas em fase inicial (0 a 2 horas após pupação), porém o anticorpo primário utilizado foi o anti-fosfohistona H3 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, U.S.A.) (1:100).

Todas as amostras foram lavadas em PBS após a incubação com os anticorpos secundários, montadas com solução de Mowiol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP) e analisadas sob Microscópio Confocal de Varredura a Laser 510 META do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Os controles negativos foram feitos utilizando as mesmas fases do ciclo de vida do *A. aegypti* (5 de cada) e repetindo todo o processo com a ausência dos anticorpos primários. Controles positivos para FMRF foram feitos utilizando-se mosquitos *T. theobaldi* adultos, cuja marcação já foi detectada em trabalho anterior¹²; e os controles positivos para fosfohistona H3 foram feitos utilizando-se intestinos médios de larvas L3 de *A. aegypti*, as quais apresentam divisões mitóticas das células regenerativas do epitélio digestivo (dados ainda não publicados).

3. Resultados e discussão

Dos 25 intestinos médios de larvas L4 tardias que foram incubados com o anticorpo primário anti-FMRFamida, 21 apresentaram uma imunorreatividade padrão relativa a regiões específicas dos músculos circulares (Figs. 1, 2, e suplementar 1A). Todas as regiões imunorreativas foram vistas em locais de posição mediana entre os pontos de intercruzamento dos músculos circulares com os músculos longitudinais (Fig. 2A-D). A maioria dessas regiões correspondeu a estruturas bem definidas em forma de anel em torno dos músculos circulares (Figs. 1C, 1F-G e 1I e 2A-B), porém, também foram vistos prolongamentos FMRF-positivos delgados e densos que se repetiram em série ao longo da extensão do órgão (Figs. 1C-D, 1H e 2E). Prolongamentos neuronais podem pertencer tanto a axônios quanto a dendritos, sendo ambos denominados de neuritos, os quais frequentemente transportam e liberam neuropeptídeos^{6,7,20}. Como as estruturas FMRF-positivas foram vistas por fora do epitélio digestivo, e apresentam morfologia típica de neuritos²⁷⁻³³, é possível afirmar que elas correspondem a neurônios, e não a células enteroendócrinas (Figs. suplementares 1B-D).

O padrão de imunorreatividade dos neuritos do intestino médio de *A. aegypti* não é encontrado em todo o intestino médio de um mesmo indivíduo, pois a localização da marcação foi variável (Fig. 1A). Além disso, a imunorreatividade apareceu em todas as regiões do órgão larval, mas sua frequência maior foi no intestino médio anterior. Isso significa que a sinalização envolvendo FaRPs nos músculos circulares das larvas tardias de *A. aegypti* não é sincrônica, sendo, portanto, realizada por etapas durante a pré-metamorfose.

Neuritos FMRF-positivos de localização repetida e restrita a sítios específicos, como os vistos no presente trabalho, nunca foram detectados em nenhum órgão visceral de insetos. Isso pode ser um reflexo da escassez de estudos sobre o controle neural dos músculos viscerais em invertebrados. Pelo menos na musculatura das pernas de insetos, sabe-se que há um controle baseado em reflexos de estiramento, assim como ocorre em vertebrados, nos quais os músculos do trato digestivo são regulados por arcos reflexos viscerais³⁴. Esses arcos reflexos possuem basicamente três componentes: um neurônio sensorial, um neurônio motor, e o músculo-alvo. Quando o músculo sofre extensão, o estiramento é detectado pelo neurônio sensorial, o qual fornece informação excitatória ao neurônio motor, que por fim, leva à contração muscular^{29,35}. Similarmente a esses músculos não-viscerais, músculos viscerais da porção final do trato digestivo de larvas de *Drosophila melanogaster* apresentam neurônios sensoriais receptores de estiramento e neurônios motores participando do controle da defecação³⁶. Isso indica que arcos reflexos também ocorrem nos músculos viscerais do trato digestivo de insetos, o que pode explicar a presença dos neuritos em regiões específicas dos músculos circulares do intestino médio de *A. aegypti*.

Não se sabe sobre o controle dos ritmos de contração dos músculos viscerais do intestino médio de insetos, e nem como eles são transmitidos entre as fibras musculares individuais. Alguns trabalhos sugeriram a inexistência de inervação em grande parte do intestino médio de insetos³⁷, e há uma hipótese de que os movimentos peristálticos dos músculos viscerais do intestino médio de larvas de *Anopheles gambiae* se iniciariam e seriam controlados por fibras miogênicas, as quais se intercomunicariam com as fibras vizinhas repassando o estímulo contrátil³⁸. No entanto, nenhuma junção intercomunicante do tipo gap foi vista por Bernick et al²³ entre as células musculares viscerais do órgão em *A. aegypti*, o que embasou sua hipótese de que provavelmente existem neurônios intrínsecos da musculatura visceral que iniciam e coordenam a atividade autônoma de peristalse do intestino médio de mosquitos. Apesar disso, não é possível detalhar que tipos de neurônios associados aos músculos correspondem aos vistos no presente trabalho. Nossos dados sugerem que os neuritos FMRF-positivos pertencem a neurônios sensoriais ou motores envolvidos na regulação funcional dos músculos circulares do intestino médio de *A. aegypti*.

A expressão de FaRPs em localizações padronizadas (locais específicos e em repetições) dos músculos circulares detectada somente em L4 tardias indica que esses neuropeptídeos estão envolvidos com o controle de alguma atividade muscular do intestino médio, e que ele é específico dessa fase em *Ae. aegypti*. Como as L4 tardias estão próximas ao

evento de metamorfose, não é possível dizer se os neuritos alí presentes são constitutivos, e expressam FaRPs apenas nesse estágio, ou se expressam FaRPs constantemente, mas surgem apenas durante o processo de remodelamento neuromuscular, típico da metamorfose em insetos^{24,39}.

Fibras circulares delgadas localizadas por baixo das fibras longitudinais foram detectadas nas L4, formando uma terceira camada muscular, a qual não foi vista em contato direto com nenhuma estrutura FMRF-positiva (Figs. 1C-E, 1H, 2A-D). Essas fibras delgadas foram vistas sempre no meio de duas fibras circulares principais, e não foram vistas nas regiões sem marcação para FMRF (Figs. 1E, 2A-B). Concomitantemente, os intestinos médios das L4 analisadas apresentaram células musculares em mitose (Fig. 3). Portanto, na pré-pupação de *A. aegypti*, novas fibras viscerais circulares são formadas a partir das fibras pré-existentes e passam a fazer parte da rede muscular do novo intestino médio em formação.

Diferentemente dos músculos circulares, nos músculos longitudinais de L4 tardias de *A. aegypti*, não foram vistos neuritos positivos para FMRF em posições específicas e repetidas. Controle diferencial de músculos circulares e longitudinais viscerais envolvendo sinalização de FaRPs já foi descrito para intestino posterior de invertebrados^{23,40}. Isso pode ser explicado pela evidência de que os dois tipos de músculos possuem diferentes origens^{39,41}. Em larvas de *D. melanogaster*, durante o desenvolvimento embrionário, os músculos circulares do intestino médio derivam da região do tronco do mesoderma, enquanto que os músculos longitudinais se originam de sua extremidade posterior³⁹. Dessa forma, é possível sugerir que o controle do remodelamento durante a metamorfose dos músculos longitudinais é diferente da que acomete os músculos circulares de *A. aegypti*.

Fibras musculares alargadas foram vistas em uma metade lateral do intestino médio anterior (Figs. 4A-C) de pupas iniciais (1 h após início da pupação) de *A. aegypti*. Estas fibras circulares alargadas não estavam presentes na região posterior do intestino médio destas pupas (Fig. 4D). De acordo com Bernick et al²⁴, pelo menos durante a primeira metade do processo de metamorfose, as fibras musculares do intestino médio de *A. aegypti* apresentam sinais de degeneração, mas preservam sua membrana plasmática intacta, indicando que as células musculares não morrem. Um dos sinais de degeneração visto por ele foi a desorganização e destruição dos miofilamentos em proteossomos²⁴. Isso pode explicar a presença de fibras musculares alargadas, com grande quantidade de filamentos de actina, somente em algumas partes do intestino médio, enquanto em outras elas não são vistas, pois provavelmente já tiveram seu conteúdo de miofibrilas degradado. O fato de as fibras musculares alargadas

estarem ausentes em uma metade do eixo lateral do intestino médio anterior, e presentes em outra, indica que o processo de degeneração das miofibrilas não ocorre de forma ascendente nem descendente ao longo do intestino médio, mas sim de forma assincrônica, ocorrendo em uma onda lateral.

Outro fato notável visto nos músculos circulares do intestino médio de pupas iniciais de *A. aegypti* foi a ausência de filamentos de actina nas fibras circulares alargadas exatamente nas regiões onde os neuritos FMRF-positivos circulares não-ramificados se localizavam nas L4 (Fig. 4B, e 4B-inset). Em algumas fibras circulares de L4, essa ausência já pôde ser detectada pela presença de neuritos com a região central negativa para FMRF (Fig. 2F). Isso demonstra que as fibras musculares circulares alargadas presentes nas pupas iniciais correspondem às mesmas fibras circulares envolvidas com imunorreatividade de FaRPs nas L4 tardias. Além disso, a ausência de filamentos de actina exatamente nessas regiões é um indicativo de que a sinalização dos FaRPs pode estar envolvida com o início da destruição das miofibrilas dos músculos circulares durante a metamorfose do intestino médio de *A. aegypti*.

Fibras circulares delgadas foram vistas por todo o intestino médio de pupas iniciais de *A. aegypti* (Figs. 4A e 4C-D) entre as fibras musculares alargadas. Devido à sua posição, é possível inferir que estas fibras delgadas correspondem às mesmas fibras recém-formadas vistas nas L4. O destino final das fibras musculares larvais pré-existentes e das novas fibras é desconhecido. Futuros estudos a respeito do remodelamento muscular envolvendo outras fases da metamorfose são necessárias no sentido de esclarecer quais eventos estão envolvidos no remodelamento dos músculos viscerais do intestino médio de mosquitos.

Todas as pupas de *A. aegypti* em fase inicial de metamorfose apresentaram células musculares em processo de mitose (Fig. 5 e Vídeo). No entanto, o padrão de neuritos imunorreativo para FMRF entre as fibras circulares não foi mais visto. Diferentemente, nessa fase, no intestino médio anterior, há corpos de neurônios FMRF-positivos individuais (sem formação de gânglios nervosos) dispostos em fileira (Figs. 4E-G), os quais provavelmente correspondem às regiões intumescidas dos músculos circulares e longitudinais descritas por Bernick et al.²⁴ no intestino médio anterior de *A. aegypti*. A função exata desses neurônios nessa fase é desconhecida, mas é possível sugerir que eles atuam reconstruindo e remanejando a rede neuromuscular dos músculos viscerais do intestino médio até a obtenção de sua conformação final no adulto.

Sabe-se que neuropeptídeos FaRPs são vistos no interior de axônios do intestino médio anterior, e em células enteroendócrinas do intestino médio posterior de mosquitos, tanto em

fases larvais que não se encontram próximas a metamorfose, quanto em adultos ^{10,12}. No trato digestivo de *D. melanogaster*, diferentes tipos de FaRPs apresentam a mesma imunogenicidade relativa ao anticorpo anti-FMRFamida e são encontrados em estruturas e/ou locais diferentes, exercendo também funções diferentes ^{9,42}. Sendo assim, é possível que os FaRPs presentes nos axônios do intestino médio anterior, nas células enteroendócrinas, e nos dendritos neuronais de mosquitos também sejam de diferentes tipos e exerçam diferentes funções reguladoras.

O trabalho de Milakovic et al ⁴³ indicou que a contração muscular da parede corporal de larvas de *D. melanogaster* pode ser mediada pela ligação de um tipo específico de FaRP a receptores FR localizados diretamente nesses músculos, dando ao neuropeptídeo uma função efetora direta. Apesar disso, FaRPs parecem estar envolvidos tanto com funções sensoriais de mecanorecepção, como com funções de neurotransmissão e neuromodulação ^{2,6,8,43,44}. Portanto, apesar de poder afirmar que neuropeptídios FaRPs estão envolvidos no remodelamento muscular do intestino médio de *A. aegypti*, a escassez de estudos conclusivos a respeito da sua atuação nos tecidos musculares, e a ampla variedade molecular e funcional que eles apresentam, não permitem apontar os mecanismos exatos da sinalização que eles exercem nesse processo.

4. Conclusão

Neste trabalho, mostramos que nas larvas L4 de *A. aegypti* em fase pré-pupa, FaRPs são encontrados em neuritos localizados em regiões específicas dos músculos circulares do intestino médio, reforçando o papel biológico destes peptídeos no controle da função muscular, e indicando seu local de ação nas proximidades dos músculos circulares desses insetos. Ao mesmo tempo que os neuritos FMRF-positivos aparecem nesses sítios, uma nova camada de músculos circulares é vista, indicando que FaRPs tem relação com a renovação dos músculos circulares do intestino médio durante a passagem de larva para adulto em *A. aegypti*. Esse melhor conhecimento do controle neural dos músculos viscerais do intestino médio de mosquitos e a identificação de sua relação com neuropeptídios FaRPs serve como base para o entendimento da atividade neuromuscular dos insetos holometábolos, tanto em aspectos funcionais, como no que diz respeito à modificação atrelada ao remodelamento tecidual. Futuros trabalhos na área são necessários para ajudar a entender melhor o mecanismo de controle realizado pelos FaRPs no remodelamento muscular visceral de insetos, podendo inclusive apontar novos agentes potenciais de controle de vetores e pragas agrícolas.

5. Referências

1. PRICE, D. A. & GREENBERG, M. J. The Hunting of the FaRPs: The Distribution of FMRFamide-Related Peptides. *Biol. Bull.* **177**, 198–205 (2007).
2. Krajniak, K. G. Invertebrate FMRFamide Related Peptides. *Protein Pept. Lett.* **20**, 647–670 (2013).
3. Price, D. A. & Greenberg, M. J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science (80-.)*. **197**, 670–671 (1977).
4. Price, D. A. & Greenberg, M. J. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* **7**, 261–281 (1977).
5. Žitňan, D., Šauman, I. & Sehnal, F. Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **22**, 113–132 (1993).
6. Elphick, M. R. & Mirabeau, O. The evolution and variety of RFamide-type neuropeptides: Insights from deuterostomian invertebrates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–11 (2014).
7. Nassel, R. D., Bayraktaroglu, E. & Dirksen, H. Neuropeptides in neurosecretory and efferent neural systems of insect thoracic and abdominal ganglia. *Zool. Sci.* **11**, 15–31 (1994).
8. Cottrell, G. A. The wide range of actions of the FMRFamide-related peptides and the biological importance of peptidergic messengers. in *Comparative Molecular Neurobiology* (ed. Pichon, Y.) 279–285 (Birkhäuser Basel, 1993). doi:10.1007/978-3-0348-7265-2_15
9. Nichols, R., McCormick, J. & Lim, I. Regulation of *Drosophila* FMRFamide neuropeptide gene expression. *J. Neurobiol.* **39**, 347–358 (1999).
10. Brown, M. R., Crim, J. W. & Lea, A. O. FMRFamide- and pancreatic polypeptidelike immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue Cell* **18**, 419–428 (1986).

11. de Souza, D. L. L., Zanuncio, J. C. & Serrão, J. E. FMRFamide-cells in the midgut of *Scaptotrigona xanthotricha* (Apidae: Meliponini) of different ages and fed different diets. *J. Apic. Res.* **55**, 428–432 (2016).
12. Godoy, R. S. M., Fernandes, K. M. & Martins, G. F. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep.* **5**, 1–16 (2015).
13. Haselton, A. T., Yin, C.-M. & Stoffolano, J. G. FMRFamide-Like immunoreactivity in the central nervous system and alimentary tract of the non-hematophagous blow fly, *Phormia regina*, and the hematophagous horse fly, *Tabanus nigrovittatus*. *J. Insect Sci.* **8**, 1–17 (2008).
14. Oliveira, A. H. *et al.* Morphology and morphometry of the midgut in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). *Insects* **10**, (2019).
15. Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E. & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol. Int.* **63**, 506–512 (2014).
16. S Park, S. & Shahabuddin, M. Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *J. Struct. Biol.* **129**, 30–37 (2000).
17. Calvez, E. *et al.* Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004374 (2016).
18. Weetman, D. *et al.* *Aedes* mosquitoes and *Aedes*-Borne arboviruses in Africa: Current and future threats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, (2018).
19. Scherkenbeck, J. & Zdobinsky, T. Insect neuropeptides: structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4071–4084 (2009).
20. Fónagy, A. Insect neuropeptides and their potential application for pest control. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* **41**, 137–152 (2007).
21. Bureau, I. PCT Novel neuropeptides useful as insecticides. Field of the invention the present invention relates to peptide fragments and analogs derived from background of the invention neuropeptides play a key role in the regulation of a variety of physiological. (2015).

22. Peters, R. S. *et al.* The evolutionary history of holometabolous insects inferred from transcriptome-based phylogeny and comprehensive morphological data. *BMC Evol. Biol.* **14**, 52 (2014).
23. Bernick, E. P., Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* **39**, 277–292 (2007).
24. Bernick, E. P., Moffett, S. B. & Moffett, D. F. Ultrastructure and morphology of midgut visceral muscle in early pupal *Aedes aegypti* mosquitoes. *Tissue Cell* **40**, 127–141 (2008).
25. Hill, S. R. & Orchard, I. The influence of diet and feeding state on FMRFamide-related peptides in the gut of *Locusta migratoria* L. **25**, 105–114 (2004).
26. Duttlinger, A., Berry, K. & Nichols, R. The different effects of three *Drosophila melanogaster* dFMRFamide-containing peptides on crop contractions suggest these structurally related peptides do not play redundant functions in gut. **23**, 1953–1957 (2002).
27. Tuthill, J. C. & Wilson, R. I. Parallel transformation of tactile signals in central circuits of *Drosophila*. *Cell* **164**, 1046–1059 (2016).
28. McLachlan, I. G., Beets, I., de Bono, M. & Heiman, M. G. A neuronal MAP kinase constrains growth of a *Caenorhabditis elegans* sensory dendrite throughout the life of the organism. *PLoS Genet.* **14**, 1–22 (2018).
29. Tuthill, J. C. & Wilson, R. I. Mechanosensation and adaptive motor control in insects. *Curr. Biol.* **26**, R1022–R1038 (2016).
30. Dowling, J. E. Dopamine release from interplexiform cells in the retina: Effects of bicuculline, and enkephalin on Horizontal. (1991).
31. K, S. & C, L. Localization of FMRFamide-like peptides in *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* **316**, 251–260 (1992).
32. Xu, Y., Cleary, L. & Byrne, J. Identification and characterization of pleural neurons that inhibit tail sensory neurons and motor neurons in *Aplysia*: correlation with FMRFamide

- immunoreactivity. *J. Neurosci.* **14**, 3565–3577 (2018).
33. Wikgren, M. & Fagerholm, H. P. Neuropeptides in sensory structures of nematodes. *Acta Biol. Hung.* **44**, 133–136 (1993).
 34. Heyden, R. J. *et al.* The autonomic nervous system and visceral sensory neurons. *Anat. Physiol.* 467–487 (2005).
 35. Orchard, I. & Lange, A. B. Neuromuscular transmission in an insect visceral muscle. *J. Neurobiol.* **17**, 359–372 (1986).
 36. Zhang, W., Yan, Z., Li, B., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Identification of motor neurons and a mechanosensitive sensory neuron in the defecation circuitry of *Drosophila* larvae. *Elife* **3**, e03293 (2014).
 37. Miguel-Aliaga, I., Jasper, H. & Lemaitre, B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **210**, 357–396 (2018).
 38. Jones, J. C. & Zeve, V. H. The fine structure of the gastric caeca of *Aedes aegypti* larvae. *J. Insect Physiol.* **14**, 1567–1575 (2003).
 39. Klapper, R. The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech. Dev.* **95**, 47–54 (2000).
 40. Mercier, A. J. & Lee, J. Differential effects of neuropeptides on circular and longitudinal muscles of the crayfish hindgut. *Peptides* **23**, 1751–1757 (2002).
 41. Jacobs, M. *et al.* Distinct genetic programs guide *Drosophila* circular and longitudinal visceral myoblast fusion. *BMC Cell Biol.* **15**, 27 (2014).
 42. Nichols, R., McCormick, J., Lim, I. & I, L. C. Cellular Expression of the *Drosophila melanogaster* FMRFamide Neuropeptide Gene Product. **6**, 1–10 (1995).
 43. Milakovic, M., Ormerod, K. G., Klose, M. K. & Mercier, A. J. Mode of action of a *Drosophila* FMRFamide in inducing muscle contraction. *J. Exp. Biol.* **217**, 1725–1736 (2014).
 44. Lee, J. S. *et al.* FMRFamide-like peptides expand the behavioral repertoire of a densely connected nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E10726–E10735 (2017).

FIGURAS

Figura 1: A-E: Estruturas imunorreativas para FMRF no intestino médio de larvas L4 tardias de *Ae. aegypti*. **A:** Várias regiões da musculatura circular apresentam estruturas FMRF-positivas com uma organização padronizada. Este padrão é ausente nas fibras musculares longitudinais. Quadrados: destaque das áreas imunorreativas. Note que a imunorreatividade padronizada não aparece em todo o intestino médio ao mesmo tempo. **B-D:** Note as estruturas FMRF-positivas ramificadas enfileiradas ao longo do eixo antero-posterior do intestino médio. Estruturas curvas não-ramificadas também são vistas. Tanto as estruturas ramificadas quanto as não-ramificadas estão presentes somente em músculos circulares. **E:** Novas fibras de músculos circulares finas (setas finas) aparecem em outro plano focal, somente em regiões onde a imunorreatividade se encontra entre as fibras circulares pré-existentes. Cada fibra nova (setas finas) se localiza sempre entre duas fibras circulares principais (pré-existentes). **F-I:** Detalhe das estruturas imunorreativas curvas não-ramificadas (**F, G e I**) e das estruturas ramificadas em fileira (**H**). Vermelho: fibras musculares viscerais. Verde: estruturas imunorreativas para FMRF. LM: Fibras musculares longitudinais; CM: fibras musculares circulares. Setas duplas: A=anterior, P=posterior.

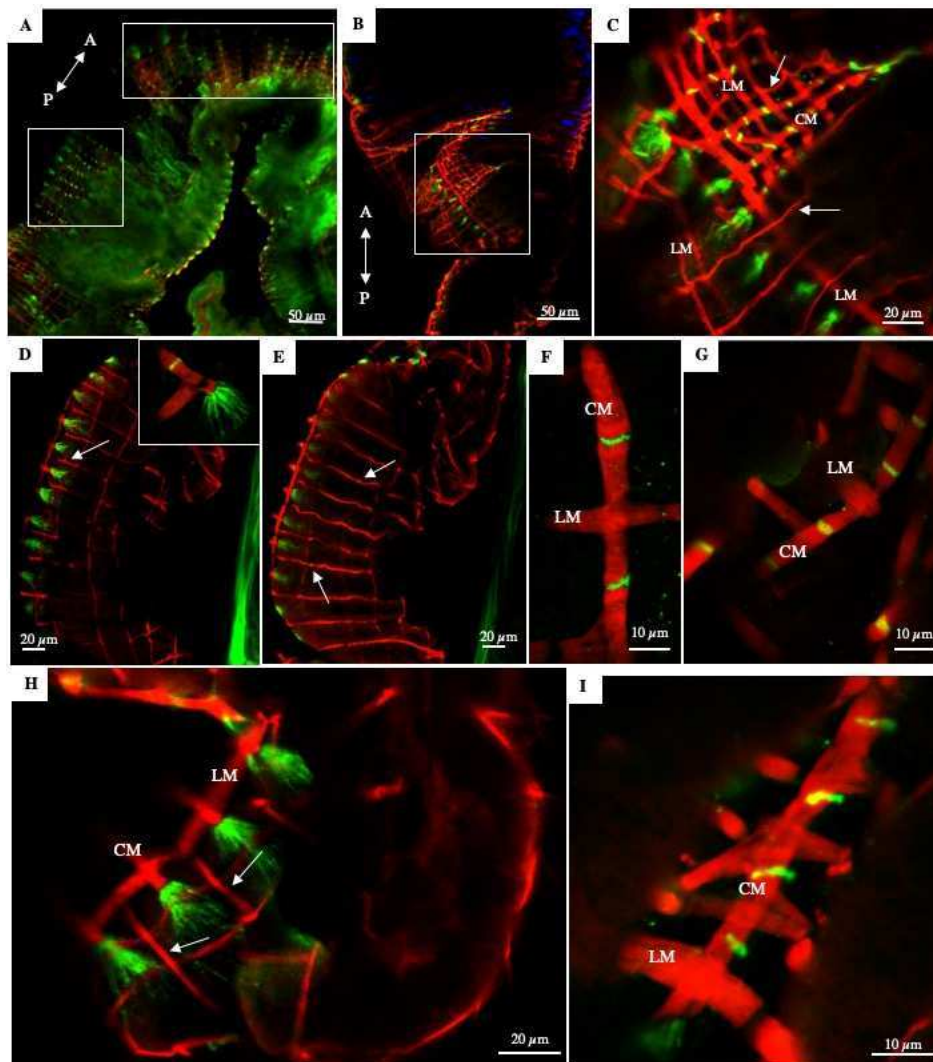


Figura 2: A-F: 3D de neuritos imunorreativos para FMRF no intestino médio de larvas L4 tardias de *Ae. aegypti*. **A-B:** Note a presença de neuritos FMRF-positivos (verde) exatamente na região mediana dos músculos circulares (CM), entre os pontos de intercruzamento entre eles e os músculos longitudinais (LM). As fibras musculares longitudinais (setas largas) não apresentam imunorreatividade. **C:** Uma nova camada de músculos circulares (setas) pode ser vista abaixo do plano da malha muscular principal. **D:** As novas fibras (setas) circulares são vistas unidas em alguns pontos às fibras circulares principais. **E:** Em alguns locais, os neuritos são enfileirados e de ramificação densa entre fibras de músculo circular. **F:** Detalhe da malha muscular do intestino médio, mostrando que em alguns pontos, não se vê filamentos de actina (setas sem preenchimento) no local onde os neuritos imunorreativos se localizam, enquanto em outros, os filamentos de actina se encontram intactos (seta larga branca). Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares do intestino médio; verde: imunorreatividade para FMRF. LM: fibras musculares longitudinais; CM: fibras musculares circulares; setas finas: novas fibras circulares.

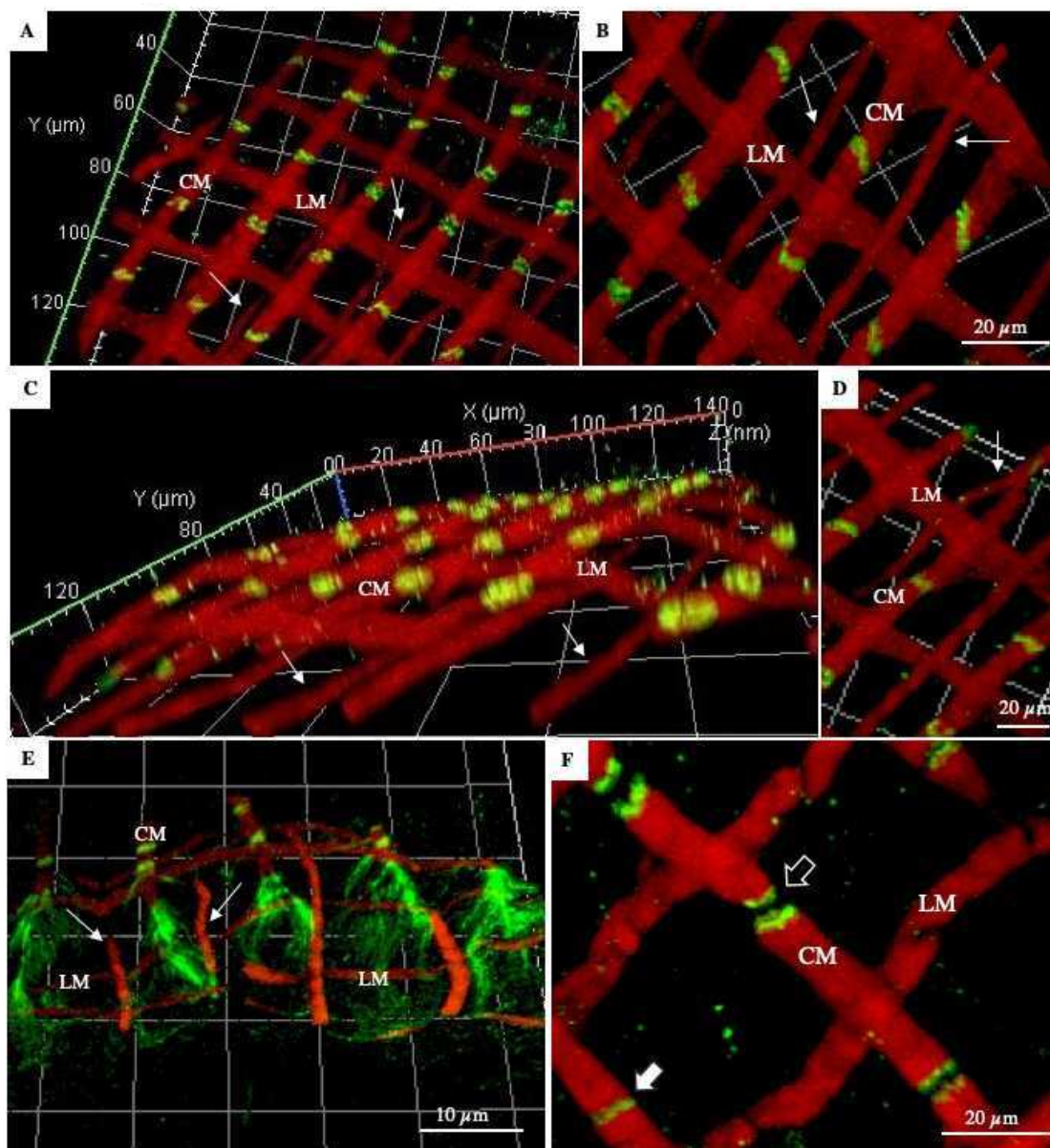


Figura 3: A-D: Células dos músculos circulares em mitose no intestino médio de larvas L4 tardias de *A. aegypti*. Células dos músculos circulares do ceco gástrico (A), do intestino médio anterior (B) e do intestino médio posterior (C-D) do intestino médio. D: Detalhe de núcleos em anáfase nos músculos circulares do intestino médio posterior. Vermelho: fibras musculares viscerais do intestino médio; verde: núcleos em mitose. Barras: 20 μm .

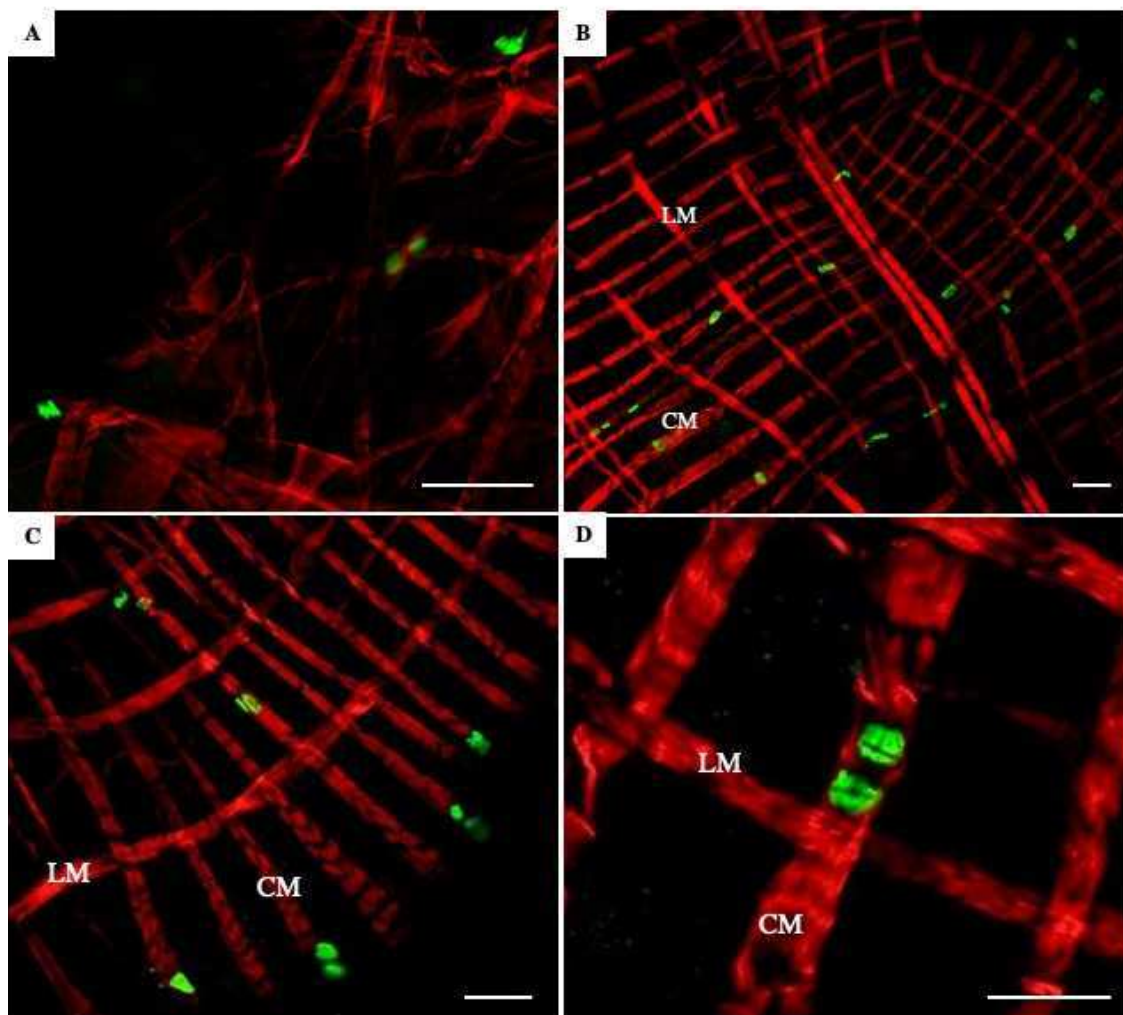


Figura 4: A-G: Organização das fibras musculares e neurônios no intestino médio de pupas iniciais de *A. aegypti*. **A-D:** Fibras musculares do intestino médio anterior (A-C) e intestino médio posterior (D) de pupas. Note as fibras musculares circulares alargadas somente em uma metade do intestino médio anterior. Fibras circulares finas se encontram em torno de todo o órgão. O intestino médio posterior não apresenta fibras alargadas. **E-G:** Corpos de neurônios FMRF-positivos são vistos no intestino médio anterior de pupas de 2 horas após pupação. **B inset:** Detalhe das fendas sem filamentos de actina (setas) nas regiões medianas dos músculos circulares entre os pontos de inter cruzamento de fibras circulares e longitudinais. Microscopia confocal. **A-D:** Vermelho: fibras musculares; verde: estruturas FMRF-positivas; setas: fibras musculares delgadas. **E-F:** Vermelho: núcleos; verde: corpos neuronais FMRF-positivos. Setas simples: corpos de neurônios; Setas duplas: A= anterior e B= posterior.

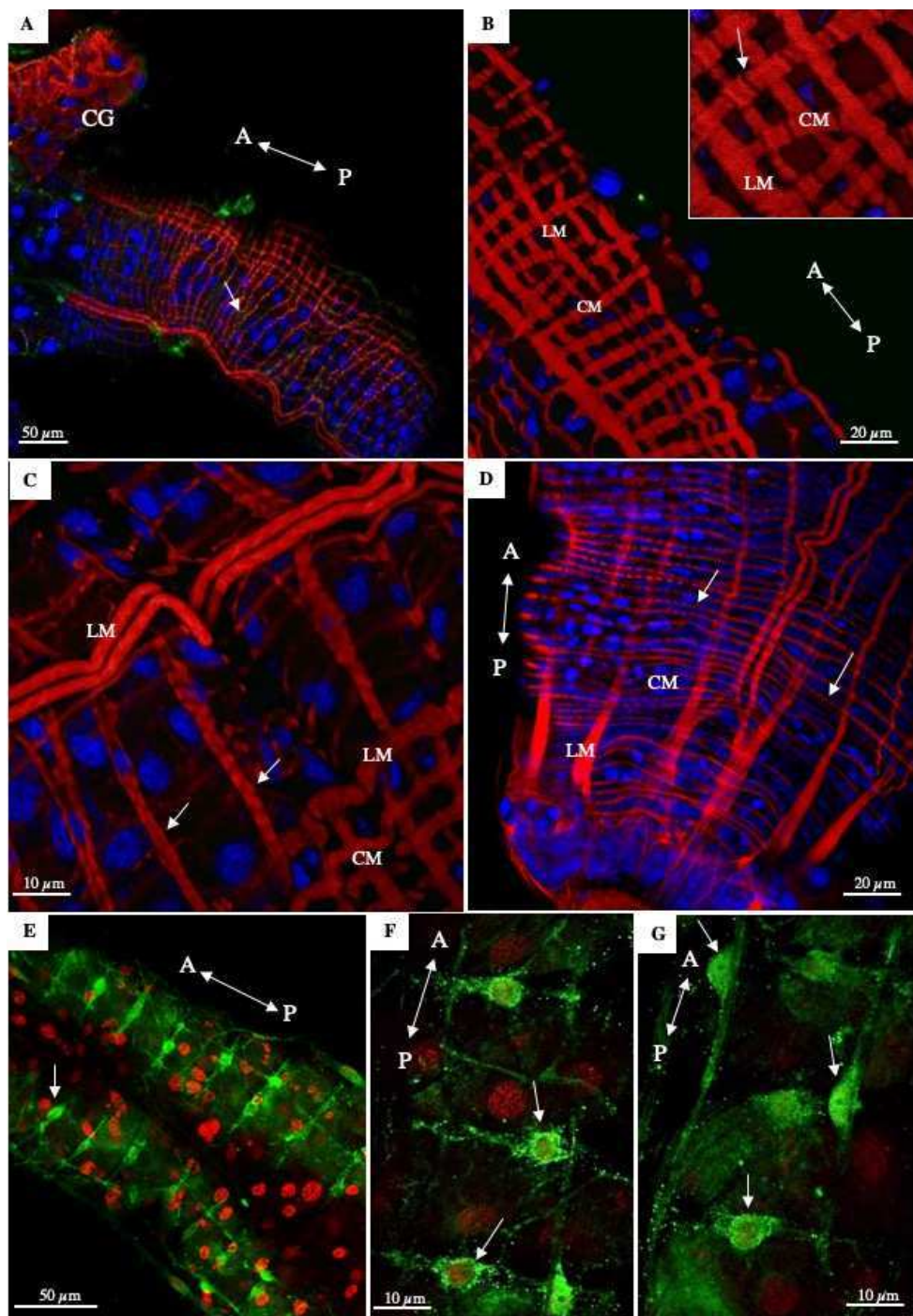


Figura 5: A-E: Células musculares em mitose (verde) no intestino médio de pupa inicial de *Ae. aegypti*. As células dos músculos circulares foram vistas se dividindo tanto no intestino médio anterior (A-B) quanto posterior (C-E). Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares viscerais do intestino médio; verde: núcleos de células musculares em mitose; azul: núcleos. CM: Músculos circulares; LM: Músculos longitudinais.

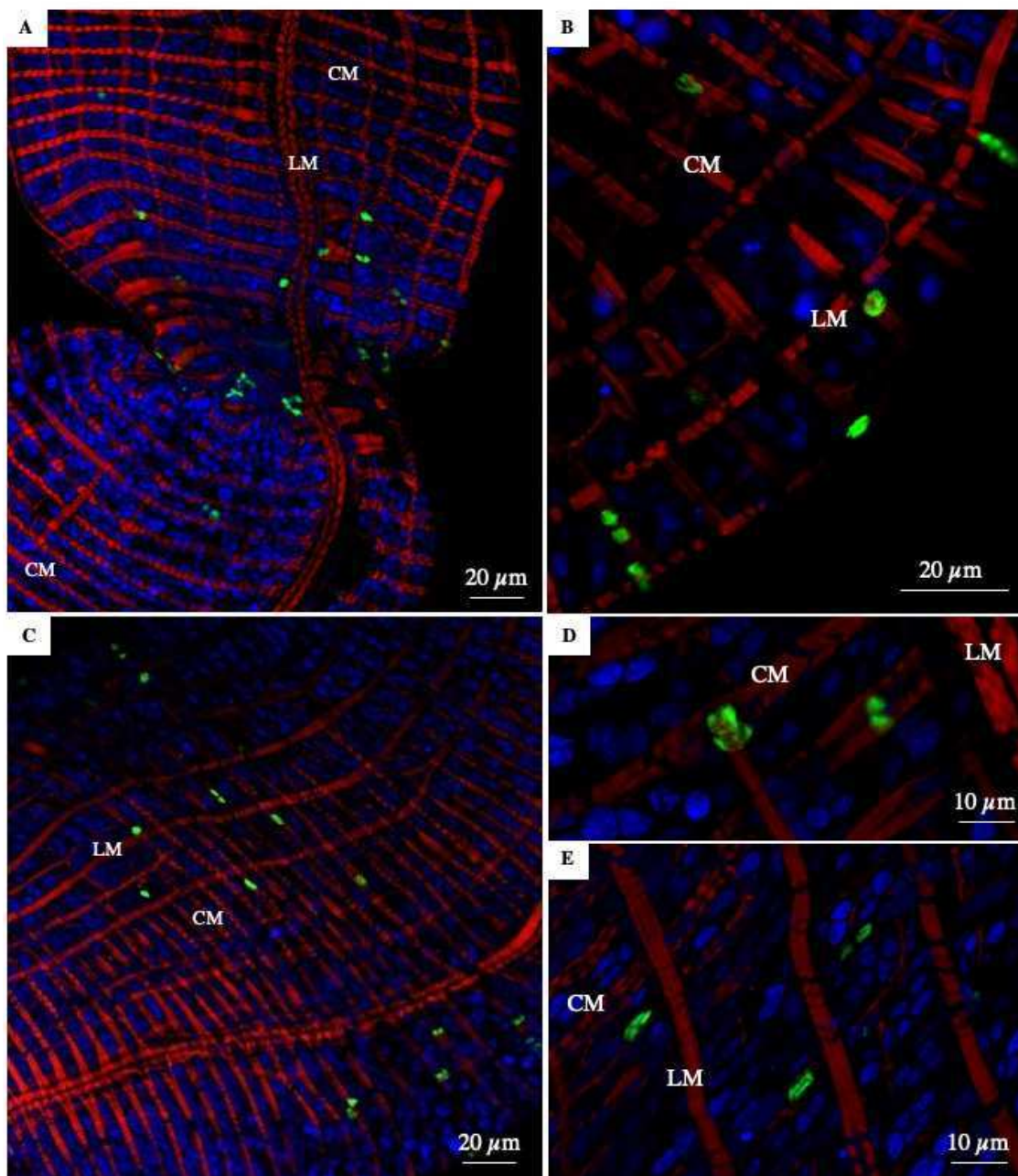
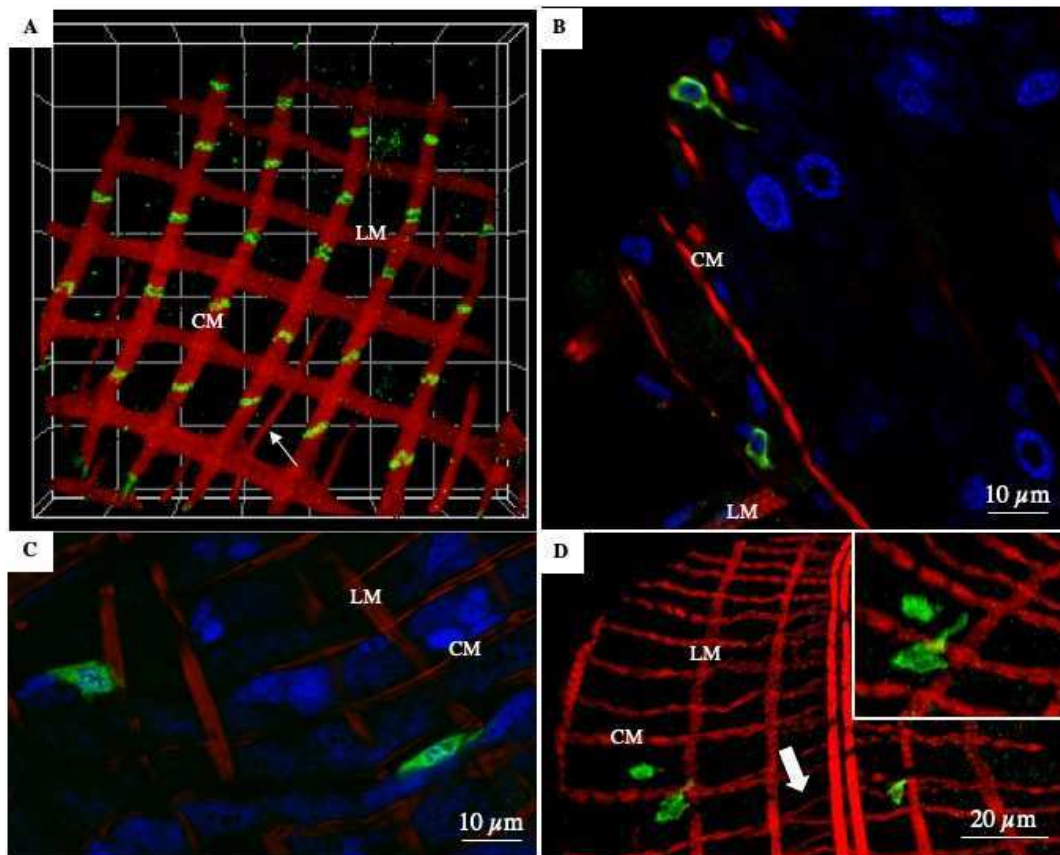


Figura suplementar 1: **A:** 3D da malha muscular do intestino médio de larvas L4 tardias de *Ae. aegypti* mostrando os neuritos FMRF-positivos de localização padronizada nas fibras circulares pré-existentes, e a presença de fibras circulares delgadas (setas) posicionadas entre duas fibras musculares principais. **B-D:** Células enteroendócrinas (verde) no intestino médio posterior de L3 (**B**) e L4 não-tardias (**C-D**) de *A. aegypti*. Note que nessas fases não há neuritos FMRF-positivos, e os músculos circulares não possuem fibras delgadas. Ao invés disso, é possível notar bifurcações dos músculos circulares (setas largas), normais da organização muscular do intestino médio larval. **D inset:** Detalhe de uma célula enteroendócrina com projeções apontadas em direção ao epitélio. Microscopia confocal. Vermelho: fibras musculares do intestino médio; azul: núcleos; verde: imunorreatividade para FMRF; azul: núcleos. CM: Músculos circulares; LM: Músculos longitudinais.



6. CONCLUSÕES GERAIS

O intestino médio dos mosquitos aumenta em tamanho durante o desenvolvimento larval, processo que envolve a diferenciação de células regenerativas e, portanto, aumento do número de células. Apesar desse aumento em tamanho do órgão na fase larval, as características histológicas dos seus tecidos permanecem similares. Durante o fim do último instar larval, o tecido muscular inicia um processo de remodelamento que provavelmente envolve sinalização de neuropeptídeos FMRF. Ao mesmo tempo, as matrizes peritróficas e o alimento desaparecem do intestino médio, e o epitélio digestivo passa por modificações morfológicas e passa a secretar um material mucoso no lúmen. Na fase de pupa inicial, o epitélio larval é descartado, e substituído por um novo, o qual se diferencia rapidamente. Esse novo epitélio originário no início do estágio pupal provavelmente é descartado em meados do tempo médio da metamorfose, e substituído pelo epitélio definitivo que permanecerá no estágio adulto. Ao que tudo indica, o processo de diferenciação do epitélio definitivo se inicia no final da fase de pupa, onde as células já exibem traços de regionalização, mas termina somente após a emergência do mosquito adulto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as modificações do intestino médio de mosquitos ocorridas durante a metamorfose apresentam características similares em relação a *D. melanogaster*, sugerindo que os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do órgão durante a fase de pupa são conservados dentro da ordem Diptera.