

ANA CAROLINA MACHADO LEÓDIDO

**MODIFICAÇÕES DO CORAÇÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DE *Aedes aegypti***

**Dissertação 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
Magister Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L577m
2012

Leódido, Ana Carolina Machado, 1988-

Modificação do coração durante o desenvolvimento pós-
embrionário de *Aedes aegypti* / Ana Carolina Machado
Leódido. – Viçosa, MG, 2012.

x, 73f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 70-73

1. *Aedes aegypti*. 2. Coração. 3. Mosquito. 4. Citologia.
5. Entomologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.772

ANA CAROLINA MACHADO LEÓDIDO

MODIFICAÇÕES DO CORAÇÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DE *Aedes aegypti*

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de junho de 2012

Paulo Pimenta

José Eduardo Serrão

Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

ANA CAROLINA MACHADO LEÓDIDO

MODIFICAÇÕES DO CORAÇÃO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DE *Aedes aegypti*

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de junho de 2012

Paulo Pimenta

José Eduardo Serrão

Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

Dedico esta dissertação aos meus pais, Maria Donete e Mariano que sempre estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Biologia Geral e a Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento através da bolsa REUNI.

Agradeço ao meu orientador Gustavo Martins, pela paciência e compreensão diante das minhas limitações, pelos ensinamentos, estímulo e pelas horas de leitura gastas no meu trabalho. Obrigada pelo exemplo de simplicidade e profissionalismo.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, Gilmar, Patrícia e Karla.

Aos professores com quem tive aulas na pós-graduação e aos colegas de mestrado que me fizeram aprender com as discussões e conversas.

Minha eterna gratidão aos meus pais, Maria Donete e Mariano, pela oportunidade e por contribuírem diretamente por tudo o que sou. Obrigada pelo exemplo de força, perseverança e sabedoria. Aos meus irmãos Mariane e Victor, pelo apoio e valiosos momentos de alegria. Obrigada a toda a minha família, por me incentivarem, apoiarem e incluírem em suas orações.

Às flores do Programa de pós-graduação da Biologia Celular e Estrutural (UFV), Glenda, Helen e Ana Cláudia pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

À equipe do insetário do DBG: Tales, Kenner e Wiviane pela obtenção dos mosquitos necessários para a realização dos experimentos.

Aos colegas do laboratório Wagner e Riudo.

À Samara grande companheira da minha jornada desde a graduação, obrigada pelo apoio e amizade.

Àos amigos de Viçosa, Mariana e Alexandre pela ótima convivência. E em especial ao Raphael por ter contribuído de forma diferente, pelo carinho e bons momentos.

Gostaria de expressar minha gratidão e apreço por todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização dessa conquista. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	01
1.1. O <i>Aedes aegypti</i>	01
1.2. Sistema Circulatório de Insetos	01
1.3. Morfologia do coração dos Insetos	02
1.4. Funcionamento do coração dos insetos	04
1.6. Embriogênese e modificações do coração ao longo do desenvolvimento de <i>Drosophila melanogaster</i>	07
1.7. Estrutura e função das células pericardiais	08
1.8. Fibras alares	09
2. OBJETIVO	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Mosquitos	11
3.2. Morfologia	11
3.2.2. Microscopia de Luz (ML)	11
3.2.3. Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) - Marcação do citoesqueleto e núcleo	12
3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	12
3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	12
3.2.4. Morfometria e análise estatística	13
4. RESULTADOS	15
4.1. Montagem total	14
4.2. Histologia	17
4.3. Microscopia confocal de varredura a laser	24
4.4. Microscopia eletrônica de varredura	31

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão	38
4.6. Morfometria	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

LEODIDO, Ana Carolina Machado, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Modificações do coração durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Aedes aegypti*.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O coração dos insetos consiste de um vaso mediano dorsal que se estende ao longo de todo o comprimento do abdômen e é responsável pelo bombeamento da hemolinfa. Apesar de sua importância, a morfologia do coração dos insetos incluindo os da Família Culicidae é pouco explorada. Este estudo teve como objetivo investigar as alterações morfológicas do coração de *Aedes aegypti* durante o desenvolvimento pós-embrionário (incluindo larvas [L4] e fêmeas de pupas e adultos) usando uma combinação de microscopia de luz, microscopia confocal de varredura a laser e eletrônicas de varredura e transmissão. Em todas as fases estudadas o coração é um órgão em forma de tubo que consiste de músculo estriado em arranjo helicoidal. O mesmo é subdividido em câmaras ou compartimentos e cada câmara contém um par de ostia, sendo que em L4 e pupa as ostia são aberturas simples na parede do coração, enquanto no adulto elas possuem válvulas. Dois tipos celulares se encontram associados ao coração de *A. aegypti*: as fibras musculares alares e as células pericardiais. As fibras alares são polinucleadas, enquanto as células pericardiais são binucleadas em todas as fases estudadas. As fibras alares possuem ramificações que englobam as células pericardiais e se espalham sobre a superfície do coração, sendo essas ramificações mais desenvolvidas nos adultos. Em L4 a superfície ventral do coração é enrugada, enquanto que nos adultos ela possui depressões longitudinais. A membrana da célula do músculo cardíaco tem invaginações formando os túbulos T e seu citoplasma é preenchido quase inteiramente por sarcômeros delimitados por linhas Z descontínuas, enquanto as mitocôndrias estão localizadas principalmente na periferia da célula. As células pericardiais tem o seu citoplasma bastante heterogêneo com estruturas elétron-densas que são maiores e mais abundantes nas pupas. Além delas, também são encontrados vacúolo com conteúdo heterogêneo e várias invaginações de membrana citoplasmática são encontradas em todos os estádios de desenvolvimento. No presente estudo foram observadas algumas diferenças morfológicas durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. aegypti* como as mudanças do aspecto da superfície do órgão, o surgimento de válvulas e fibras alares bem desenvolvidas e espalhadas sobre a superfície do coração das fêmeas adultas.

Apesar das diferenças observadas, o coração de *A. aegypti* não é drasticamente modificado durante a metamorfose como ocorre com outros órgãos viscerais, mas por outro lado, as células pericardiais de *A. aegypti* sofrem mudanças mais aparentes em função do desenvolvimento. Esses resultados contribuem para o entendimento do coração de *A. aegypti* e para uma melhor compreensão da biologia e do sistema circulatório do mosquito.

ABSTRACT

LEODIDO, Ana Carolina Machado, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2012. **Morphological assessment of the heart of the mosquito *Aedes aegypti* during the post-embryonic development.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins.

The heart of insects consists of a mid-dorsal vessel that extends along their abdomen length and is responsible for pumping the haemolymph. In spite of this importance for insect homeostasis, the morphology of the insect heart, specifically in Culicidae, is still unexplored. This study aimed to investigate the morphological changes of the heart of *Aedes aegypti* during the post-embryonic development (including larvae [L4] and pupa and adult females) through using a combination of light, confocal and scanning and transmission electron microscopies. In all studied stages the heart is a tubular-shaped organ, consisting of striated muscle in helical arrangement. The organ is divided into chambers or compartments, in which each one has a pair of ostia. However, in L4 and pupa the ostia are simple openings in the heart wall, while in the adult have a valve-like structure. The heart of mosquito is physically associated with polinucleated alary muscle fibers and pericardial cells. The formers occur in pairs and form branches that include pericardial cells inside them and anastomose above heart surface, and these branches are more developed in adults. The heart ventral surface is wrinkled in L4, while in adults it has longitudinal depressions. The cell membrane of the cardiac muscle has invaginations forming the T tubules and their cytoplasm is almost entirely filled by sarcomeres delimited by discontinuous Z lines, while mitochondria are located mainly in the cell periphery. The pericardial cells are rounded and have a heterogeneous cytoplasm, with electron-dense structures resembling lysosomes that are more abundant and prominent in pupae. In these cells, vacuoles with heterogeneous content and several cell membrane invaginations are also observed in all developmental stages. In the present study we pointed some morphological changes of the heart during the post-embryonic development of the yellow fever mosquito. They include changes in the heart surface and the arising of valves and well-developed alary fiber ramifications in the adult females. In this work we show that the heart of *A. aegypti* is not rebuilt during metamorphosis, unlike other visceral organs. Moreover, the pericardial cells of *A. aegypti* undergo changes during the post-embryonic development, that include the increase of the cytoplasm and cell inclusions. These new data contribute to our

understanding of *A. aegypti* heart and to an improved general understanding of mosquito biology and circulatory system.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O *Aedes aegypti*

Os mosquitos estão incluídos na Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae e Subfamília Culicinae. Os mosquitos também conhecidos como pernilongos, muriçocas e carapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Dentro da entomologia médica, os mosquitos são os que mais têm atraído a atenção dos pesquisadores de saúde pública. Isso se deve provavelmente ao fato dos Culicidae abrigarem insetos hematófagos envolvidos na transmissão de múltiplos patógenos ao homem e aos animais domésticos (FORATINI, 2002).

As fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* se alimentam de sangue, sendo essa espécie, vetora de muitos vírus causadores de doenças, como a dengue e a febre amarela. Tais doenças têm ressurgido nos países em desenvolvimento e também estão emergindo como surtos epidêmicos em alguns países desenvolvidos (CLEMONS et al., 2010).

Uma série de fatores contribui para a incapacidade de prevenir ou controlar doenças transmitidas por mosquitos. Além do lento progresso no desenvolvimento de vacinas, a resistência a inseticidas em algumas populações, a falta geral de apoio para controle de mosquitos e o aumento global de viagens, contribuem para a grande prevalência de doenças transmitidas por mosquitos vetores (<http://www.cdc.gov>). O estudo da biologia de mosquitos vetores, incluindo o estudo da biologia do desenvolvimento, constitui potencial para traçar novas estratégias de controle e combate desses insetos.

1.2. Sistema Circulatório de Insetos

O aparelho circulatório dos insetos é normalmente aberto, diferente do sistema fechado dos vertebrados. Nesse caso, o sistema circulatório dos insetos não desempenha papel no transporte de oxigênio para os tecidos. Sendo assim, esse sistema apresenta como principal função, o transporte de nutrientes, de produtos de excreção e de hormônios e possibilita a comunicação química entre os diferentes órgãos, além de participar do transporte das células da hemolinfa ou hemócitos e de substâncias que

participam direta e indiretamente da resposta imune humoral (revisado por GALLO et al., 2002).

No sistema circulatório dos insetos a hemolinfa circula principalmente pela atividade de contração de um tubo ou vaso longitudinal mediano-dorsal, localizado no sinus pericárdico, limitado pelo tegumento e pelo diafragma dorsal em algumas espécies. O tubo dorsal diminui de diâmetro à medida que se direciona da região posterior para a anterior, sendo que no abdômen o vaso dorsal é chamado de coração e é caracterizado pela presença de aberturas laterais (ostia). No tórax e na cabeça o vaso dorsal recebe o nome de aorta, um tubo simples, desprovido de aberturas laterais (CHAPMAN, 1998).

1.3. Morfologia do coração dos insetos

De modo geral, o coração dos insetos é formado por células musculares estriadas, dispostas de forma helicoidal ou circular. Segundo Cruz-Landim (1981), em abelhas, uma única célula perfaz o perímetro do vaso dorsal e o seu citoplasma está preenchido por miofibrilas arranjadas irregularmente e mitocôndrias com formas e tamanhos variados. Já em *Protophormia terraenovae* (Diptera) o coração possui um maior número de mitocôndrias e uma grande distribuição de traquéolas em relação à aorta, facilitando o fornecimento de energia e oxigênio para a porção do vaso que possui atividade contrátil (ANGIOY et al., 1999).

A disposição das mitocôndrias na periferia, no centro da fibra e entre as miofibrilas nas células musculares do coração em *Apis mellifera* (Hymenoptera) indica os locais intracelulares de maior consumo de energia, principalmente entre os sarcômeros (CRUZ-LANDIM, 1974). Também do ponto de vista subcelular, um estudo do vaso dorsal em *Calpodes sp.* (Lepidoptera) e *Rhodnius sp.* (Hemiptera) mostrou que as células musculares cardíacas supostamente secretam proteínas para a hemolinfa. Isso pôde ser inferido pelo fato dessas fibras apresentarem complexos de Golgi, retículo endoplasmático rugoso (RER) e vesículas com material denso em grande quantidade. Portanto, além de ser responsável pela circulação de nutrientes, moléculas do sistema imune e produtos do metabolismo, o coração dos insetos também supostamente atua como um órgão secretor, sendo, portanto, plausível assumir que ele atua na homeostase desses organismos (LOCKE, 1989).

O coração dos insetos apresenta algumas semelhanças com os dos vertebrados, de maneira que ele constitui o principal órgão pulsátil e apresenta contrações rítmicas.

Também nas fibras cardíacas dos insetos existem invaginações da membrana citoplasmática, formando os túbulos T, os quais constituem díades com o retículo sarcoplasmático, contribuindo para uma contração eficiente e uniforme das fibras cardíacas. Acredita-se que essas formações e associações da membrana permitem que o estímulo nervoso chegue igualmente até o centro da fibra muscular, resultando em contração mais rápida e uniforme (CURTIS et al., 1999).

O coração de alguns insetos, como por exemplo, das abelhas, possuem duas lâminas basais, uma externa e outra interna que unem as fibras musculares cardíacas em uma única massa funcional. Especula-se que essa união entre as células facilita a propagação de impulso nervoso, além de impedir o contato direto das fibras cardíacas com a hemolinfa (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006).

Em um estudo no qual foi feita a descrição histológica do coração do gafanhoto *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Romaleidae), além da camada muscular foi caracterizado um tecido classificado como do tipo conjuntivo revestindo a luz do órgão. As características histológicas descritas para o coração de *T. collaris* foram as mesmas encontradas em insetos Archaeognatha, Zygentoma e Ephemeroptera, indicando uma conservação da estrutura básica desse órgão nessas ordens (CORREIA et al., 2005)

As fibras que compõem o coração de *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) são unidas por discos intercalares, que possuem dois componentes: junções interfibrilares e desmossomos. A análise de cortes em diferentes segmentos do coração dessa espécie revelou que não há diferença no tamanho das fibras, estrutura do sarcômero, distribuição de mitocôndrias, túbulos transversos, retículo sarcoplasmático e discos intercalares, revelando homogeneidade do coração em relação a estrutura muscular (SANGER & MCCANN, 1968).

A organização do coração dos insetos acompanha a metameria abdominal de forma que esse órgão é composto por uma série de segmentos ou câmaras que contém aberturas laterais chamada de ostia. Ostia “incurrent” são válvulas simples que permitem a entrada da hemolinfa no lúmen do coração na diástole e previnem a saída durante a sístole para a hemocele. O coração possui também outro tipo de abertura, chamada de ostia “excurrent”, sendo que essas não possuem válvulas e algumas vezes abrem-se na parte posterior do coração em alguns Diptera ou lateralmente como em Thysanura, Orthoptera e Plecoptera. Em alguns poucos insetos, válvulas internas estão presentes e previnem o fluxo de volta da hemolinfa entre as câmaras dentro do coração (revisado por KLOWDEN, 2007).

De modo geral, o coração dos insetos possui dois tipos celulares lateralmente associados a ele: as fibras musculares alares (ou simplesmente fibras alares) e as células pericardiais ou nefrócitos. As fibras alares estão dispostas em pares, apoiando fisicamente o coração e auxiliando na sustentação do mesmo de maneira que essas fibras se estendem do órgão até a parede do corpo dos insetos. Além disso, os músculos alares ajudam o vaso dorsal a impulsionar o fluxo da hemolinfa para o tubo cardíaco e orientam a inervação do coração de *Drosophila melanogaster* durante o desenvolvimento embrionário (DULCIS & LEVINE, 2003). Outros tipos celulares podem também ser encontrados externamente ao coração de *T. collaris*, sendo eles considerados hemócitos, grupo de células associado ao diafragma, estando em geral aderidos à superfície do órgão, com morfologia variada e citoplasma acidófilo (CORREIA et al., 2005).

Alguns estudos sugerem que as células pericardiais participam na homeostase e na eliminação de toxinas, uma vez que elas são capazes de recrutar substâncias da hemolinfa como demonstrado em *Hyalophora cecropia* (Leptoptera) (SANGER & MCCANN, 1968) e *Locusta migratoria* (Orthoptera) (BREHBLIN & HOFFMANN, 1980) e transformam certos componentes tóxicos em moléculas solúveis não tóxicas que são liberados para serem eliminados pelos túbulos de Malpighi (MILLS & KING, 1965). Além disso, acredita-se que devido à proximidade ao coração, as células pericardiais influenciem a morfogênese desse órgão (CHARTIER et al., 2002) e sua atividade após o desenvolvimento pós-embrionário (JOHNSON et al., 2007). Entretanto, segundo DAS et al. (2008) a ausência de células pericardiais no período pós-embrionário não altera a frequência cardíaca, mas a mesma promove uma redução significativa no tempo de vida de *D. melanogaster* mediante tratamento com substâncias tóxicas, como o nitrato de prata.

1.4. Funcionamento do coração dos insetos

Ainda há muito que investigar a respeito do bombeamento da hemolinfa pelo coração dos insetos. Uma vez dentro do órgão, a mesma é bombeada através de ondas peristálticas de forma que essas ondas se movem para a porção anterior do corpo, bombeando a hemolinfa que entrou no coração durante o relaxamento das câmaras cardíacas. A frequência de contrações cardíacas varia entre as espécies e entre estágios de desenvolvimento, sendo impossível generalizar a frequência de contrações do coração através das ordens de insetos (revisado por KLOWDEN, 2007). Por exemplo,

em *D. melanogaster* o coração da larva bate a uma frequência aproximada de 2,5-2,7Hz até parar completamente na pupação, enquanto o coração do adulto apresenta batimentos bidirecionais que atingem em média 4-5Hz (SLAMA & FARKAS, 2004).

Apesar da escassez de dados, recentemente foi feito um trabalho com uma abordagem funcional do mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera; Culicidae), cuja observação revelou o caminho percorrido pela hemolinfa ao entrar no coração e o papel exercido pelas contrações abdominais potencializando a propulsão da hemolinfa extracardíaca. Nesse modelo, o fluxo da hemolinfa na hemocele torácica e abdominal é controlado primariamente pela ação contrátil do coração. A hemolinfa entra no coração através de válvulas unidirecionais ou ostia, e uma vez no coração, a hemolinfa é impulsionada por contrações peristálticas. As contrações do coração podem se originar tanto na porção posterior do abdômen, movendo a hemolinfa para a cabeça (direção anterógrada), como na junção tórax-abdominal, impulsionando a hemolinfa para a parte posterior do abdômen (direção retrograda) (GLEN et al., 2010). Além disso, foi mostrado que as contrações do coração de *An. gambiae* alternam-se em impulsionar a hemolinfa na direção anterógrada e retrógrada (GLEN et al., 2010; ADERECK et al., 2010).

As contrações do coração são reguladas de forma autônoma ou miogênica, no entanto, elas podem ser influenciadas por nervos e estímulos endócrinos. O coração de adulto de *D. melanogaster* tornar-se inervado durante a metamorfose e é suprido com os neurônios que usam ácido glutâmico como um neurotransmissor na junção neuromuscular. Esses neurônios também inervam os músculos longitudinais que iniciam o batimento cardíaco reverso em determinados momentos. Nervos segmentares decorrentes do cordão nervoso ventral também podem inervam os músculos alares e do coração, sendo isso mais uma evidência da atuação desses músculos durante os batimentos cardíacos, especialmente na diástole (revisado por KLOWDEN, 2007).

Nesse contexto, vários neuropeptídios e neurotransmissores são conhecidos por regular parcialmente a fisiologia cardíaca. Entre eles um muito conhecido é o peptídeo cardioacelerador (CAP) produzido pela *corpora cardiaca* e pelo cordão nervoso ventral. Em *Manduca sexta* (Lepidoptera) o CAP estimula o coração a contrair imediatamente após a emergência de adultos, permitindo as asas inflarem. O mesmo peptídeo exerce papel similar durante o voo, o que ocasiona um aumento das taxas de batimento cardíaco facilitando a transferencia da hemolinfa entre o abdomen e o torax, evitando assim o superaquecimento dos músculos do voo. Outro peptídeo inicialmente

identificado em crustáceos, o Peptídeo Crustáceo Cardioaceleratório (CCAP), que foi identificado primeiro como CAP2a em *M. sexta*, é capaz de interferir também em *D. melanogaster* e *L. migratoria*, aumentando a taxa de batimento cardíaco, estimulando contrações intestinais e atuando nos tubulos de Malpighi para aumentar a secreção de fluidos (revisado por KLOWDEN, 2007).

Vários outros estudos têm ajudado a elucidar o papel dos neuropeptídios no controle da função cardíaca. Duve et al. (1993) estudou o efeito de calliFMRFamida e seus análogos não aminados no coração de *Callifora vomitoria* (Diptera; Calliphoridae), e fez comparações com os peptídeos exógenos estruturalmente relacionados (FMRFamida, leucomiosupressina e Schisto-FLRF-amida) que em coração de insetos tem predominantemente papel inibidor. Os resultados indicaram que existe uma alta especificidade entre neuropeptídio e receptor, visto que pequenas diferenças na estrutura primária desses peptídeos, impostas por variações na região N-terminal, acompanhada por mudanças de conformação são suficientes para causar considerável variação no efeito fisiológico.

Recentemente foi observado que a octopamina, um importante modulador da atividade cardíaca possui efeito bifásico em *A. mellifera macedonica* e *Bactrocera oleae* (Diptera; Tephritidae). O efeito inibitório da octopamina na atividade rítmica do coração sugere a presença de outro tipo de receptor também presente no coração, estando esse acoplado a canais de potássio e cloreto, e sendo responsável pela hiperpolarização no potencial de repouso da membrana como observado em células do marca-passo cardíaco de abelhas (PAPAEFTHIMIOU & THEOPHILIDIS, 2011).

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos de regulação do bombeamento da hemolinfa em mosquitos, foi feito um estudo em *An. gambiae* com o neuropeptídeo corazonina (do inglês *corazonin*), inicialmente descoberto por sua atividade cardioaceleradora, revelando que esse neuropeptídeo não modula a fisiologia do coração de mosquitos (HILLYER, et al., 2012). Porém, esse neuropeptídeo pode estar associado a outras atividades dependendo da espécie. Em *M. sexta*, por exemplo, foi observado que o mesmo induz o processo de ecdise (KIM et al., 2004). A literatura mostra vários neuropeptídeos e neurohormônios influenciando os batimentos cardíacos em insetos, no entanto os fatores que regulam os batimentos cardíacos em mosquitos ainda não são bem compreendidos.

Existem trabalhos na literatura que consideram outros aspectos que influenciam a atividade cardíaca. Por exemplo, no caso de adultos machos e fêmeas de *Acheta*

domesticus (Orthoptera) foi mostrado através de preparações que consistiam do próprio músculo cardíaco incluindo as células pericardiais, músculos alares e gânglios associados, que a frequência dos batimentos aumenta com a idade e declinam durante as últimas semanas de vida. Os corações dos jovens adultos tende a ser acelerado com a acetilcolina, serotonina, e dopamina, enquanto os corações dos adultos mais velhos, as contrações tendem a ser inibidas por essas substancias na mesma na concentração. Essa diferença quanto à sensibilidade as essas substancias pode estar relacionada ao envelhecimento (MCFARLANE, 1967).

1.5. Embriogênese e modificações do coração ao longo do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*

A parede do coração dos insetos é constituída de tecido muscular derivado dos cardioblastos, ou células formadoras do coração, a partir do mesoderma embrionário, que são convertidas em fibras musculares estriadas semicirculares ou circulares (revisado por SNODGRASS, 1993).

De forma não surpreendente, o coração de *D. melanogaster* é o mais bem estudado entre os insetos, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento. Apesar de parecer um simples tubo contrátil algumas características como o número de células que compõem o tubo em cada segmento e a localização ao longo da linha média abaixo da epiderme dorsal indicam que formação do tubo ocorre através de um processo regulado de forma altamente precisa que gera regiões funcionamente especializadas. Dessa forma, os cardioblastos se diferenciam em subtipos que contituem os pares de ostia, os subtipos encontrados no coração e na aorta (TAO & SCHULZ, 2006).

Durante os estágios finais da embriogênese de *D. melanogaster*, o tubo cardíaco, uma vez fechado, progressivamente adquire sua propriedade funcional. Nessa fase cerca de 120 células pericardiais podem ser encontradas em torno do órgão (DENHOLM BARRY & SKAER HELEN, 2009). Durante os estágios larvais, o número e a identidade das células que constituem o sistema cardiovascular permanecem inalterados, de forma que a morfologia que o coração adquire durante a embriogênese de maneira geral é conservada ao longo da vida pós-embrionária (MEDIONI et al., 2009).

Nas proximidades das células pericardiais ocorre a fixação dos músculos alares ao tubo cardíaco, sendo razoável propor que as células pericardiais produzam ou apresentem algumas moléculas para os músculos alares anexarem, embora a natureza

dessas moléculas não tenha ainda sido definida. Em *D. melanogaster*, os sete pares de músculo alares embrionários se unem às células pericardiais ao longo do coração. Esses músculos alares persistem através do desenvolvimento larval, desempenhando um importante papel no estabelecimento e localização do coração na cavidade do corpo durante a metamorfose (LABEAU et al., 2009).

Mudanças importantes ocorrem no coração de *D. melanogaster* durante a metamorfose como: a formação de uma câmara no primeiro e no segundo segmento abdominal, em seguida o coração curva-se para adquirir o contorno do abdômen do adulto, observa-se também o surgimento de uma camada de músculo estriado na superfície ventral do coração e a adição de um quarto par de ostia ao terceiro par já presente na pupa, sendo que a ostia no coração da pupa parece como uma abertura simples, enquanto no adulto encontram-se como estruturas mais complexas, consideradas do ponto de vista funcional como válvulas (CURTIS et al., 1999).

1.5. Estrutura e função das células pericardiais

O diafragma dorsal presente no abdômen dos insetos pode ser caracterizado como uma membrana delgada que se estende através do abdômen e separa o sinus pericárdico do perivisceral. O sinus pericárdico é um compartimento que rodeia o vaso dorsal sobre a qual se estendem as fibras alares que contêm as células pericardiais (revisado por KLOWDEN, 2007).

Externamente ao coração de *T. collaris* evidenciou-se a presença de células pericardiais com um citoplasma claro, bastante volumoso e com granulações, além do núcleo esférico, variando em número de um a três (CORREIA et al., 2005). Em *H. cecropia* essas células apresentam contorno irregular e múltiplas invaginações da membrana celular, sendo que cada célula é circundada por uma membrana basal. Ainda nessa espécie, as células pericardiais apresentam núcleos com formato irregular e próximo a ele são encontrados RER bastante desenvolvido. Além disso, muitas mitocôndrias, complexo de Golgi e microtúbulos encontram-se distribuídos em todo o citoplasma. Vacúolos com formato irregular e matriz finamente granular estão também presentes em toda a célula, muitos dos quais contêm material eletrôn-denso (SANGER & MCCANN, 1968).

Segundo MILLS & KING (1965) a ultraestrutura de células pericardiais de fêmeas adultas de *D. melanogaster* sugere que essas células internalizem por pinocitose

possíveis componentes tóxicos presentes em suspensão na hemolinfa. Acredita-se que esses componentes internalizados são transformados em moléculas solúveis dentro de vacúolos semelhantes a lisossomos.

Na tentativa de estudar a função das células pericardiais em *H. cecropia*, as mesmas foram expostas diretamente à solução de ferritina, mostrando que o transporte intracelular de ferritina ocorre através de vesículas. Muitas vesículas foram observadas ligadas a membrana plasmática e elementos tubulares foram encontrados próximo ao vacúolo. Acredita-se que as vesículas podem ser convertidas a estruturas membranosas descritas como elementos tubulares que então executariam o papel de transporte das substâncias endocitadas para o vacúolo (SANGER & MCCANN, 1968).

As células pericardiais supostamente tem a função de regular a composição da hemolinfa por meio de endocitose, que ocorre através da formação de invaginações da sua membrana citoplasmática. Em *D. melanogaster* essas células são envolvidas por uma membrana basal carregada negativamente, de forma que a carga negativa provavelmente atua como um filtro seletivo prevenindo a passagem de moléculas com carga negativa elevada (DENHOLM & SKAER, 2009).

Muitas das características das células pericardiais descritas para *D. melanogaster* não são exclusivas da espécie. Dessa forma, a membrana das células pericardiais da abelha *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera; Apidae) também apresenta dobras e está associada a uma lâmina basal, formando uma barreira seletiva para substâncias da hemolinfa. Nos indivíduos mais velhos, tanto em operárias como em rainhas, as células apresentam uma grande quantidade de inclusões citoplasmáticas, vacúolos heterogêneos contendo os produtos finais da digestão intracelular e vacúolos autofágicos. Acredita-se que tais características estão associadas ao papel executado por este tipo celular, como a captura e o armazenamento de metabólitos da hemolinfa (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006). Entretanto isso ainda não testado nessa espécie.

1.6. Fibras alares

Uma descrição bastante detalhada da morfologia do coração do mosquito *An. gambiae* foi feita por GLENN et al. (2010). Nesse trabalho foi mostrado que o coração do mosquito *An. gambiae* é sustentado por seis pares completos e três incompletos de músculos alares, a maioria das fibras predem-se a parte ventral do coração. Os mesmos originam-se perto da junção entre tergitos e pleuritos na parte anterior de cada segmento abdominal, enquanto a fibra se ramifica próximo ao coração, originando cerca de 10-30

feixes que se estendem até o órgão, prendendo-o à parede do corpo (GLENN et al., 2010).

Os músculos alares estão presentes nos sete segmentos abdominais anteriores de diferentes espécies de mosquitos, incluindo: *Aedes albopictus*, *A. aegypti*, *Aedes fluvitilis*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis*, e se estendem diretamente do corpo gorduroso para a superfície do coração. Ao microscópio eletrônico de varredura, essas células possuem aspecto estriado e ramificações que fornecem um local de abrigo para as células pericardiais. Através de uma detalhada descrição morfológica dessas células em mosquitos, se concluiu que as ramificações dos músculos alares exercem pressão na superfície das células pericardiais levando a deformidades na sua superfície (MARTINS et al., 2011).

Em adultos de *Periplaneta americana* (Blattaria) as miofibrilas dos músculos alares estão espalhadas pelo citoplasma e o núcleo geralmente ocupa a periferia do mesmo. A membrana citoplasmática dessas células possui invaginações que são equivalentes ao sistema de túbulos T ou túbulo transverso nos vertebrados. O sarcômero apresenta banda A, banda I e uma discreta linha Z. As mitocôndrias são localizadas próximas a linha Z e estão ausentes na porção média do sarcômero (ADAMS et al., 2007).

Apesar de recentemente um estudo ter fornecido uma visão detalhada da microanatomia do coração de seis espécies de mosquitos adultos através da microscopia eletrônica de varredura (MARTINS et al., 2011), a literatura ainda carece de trabalhos sobre a morfologia e desenvolvimento desse órgão nesse grupo de insetos vetores. Apesar da morfologia do coração do *A. aegypti* já ter sido parcialmente descrita, até então pouco se sabia como suas características histológicas e ultraestruturais variam durante o desenvolvimento pós-embrionário dessa espécie.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a microanatomia e as mudanças do coração e suas estruturas associadas (fibras alares e células pericardiais) durante o desenvolvimento pós-embrionário do mosquito *A. aegypti*, incluindo larvas de quarto instar (L4), fêmeas de pupas e adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Mosquitos

Os exemplares de *A. aegypti* (linhagem PPCampos – Campos dos Goytacazes, RJ) foram obtidos de ovos advindos da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral, UFV. Os mesmos foram mantidos a $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo aproximado de 12h/12h (claro/escuro). As larvas foram criadas em bandejas de plástico contendo água declorada e alimentadas com ração de tartaruga Tetramin®. Foram utilizadas L4 e fêmeas de pupas (com 24 horas após o início da metamorfose) e fêmeas adultas (24 h após emergência), sendo pelo menos 20 espécimes de cada fase. Para coleta das amostras, as L4 e as pupas foram anestesiadas em água gelada, enquanto que os adultos eram anestesiados em geladeira e mantidos em gelo até o momento da dissecação. Os espécimes foram dissecados com o auxílio do estereomicroscópio, microtesoura e pinças cirúrgicas. O órgão isolado ou região dorsal da carcaça contendo o coração foram separados do corpo e transferidos imediatamente para tubos de centrífuga com solução fixadora que variou dependendo da finalidade.

3.2. Morfologia

3.2.1. Montagem total

Após a abertura da cavidade abdominal de indivíduos das três fases supracitadas, foi feita a remoção das traqueias dorsais e dos órgãos viscerais e a solução fixadora de Zamboni (STEFANINI, 1967) foi gotejada sobre o órgão e em seguida o mesmo foi extraído com o auxílio de pinça e transferidos para lâminas histológicas e cobertos por lamínula montadas em PBS (Tampão Fosfato de Sódio) 0,1M pH 7,6. As preparações foram observadas e fotografadas no microscópio de luz Olympus BX60 com o auxílio da câmera digital Q-3 do mesmo fabricante.

3.2.2. Microscopia de Luz (ML)

Como no item 3.2.1, os órgãos viscerais foram retirados e a região dorsal do abdômen foi transferida para tubos de centrífuga contendo a solução fixadora de Zamboni ou formalina 4%. As amostras foram mantidas no fixador a 4°C até a etapa subsequente. Em seguida as amostras foram desidratadas em solução alcoólica crescente (70-95), infiltradas em solução historesina JB4 (EMS) por 24h. Após a infiltração, as amostras foram embebidas em historesina com endurecedor em moldes de plástico, ao abrigo do ar e à temperatura ambiente, de acordo com protocolo do

fabricante. Blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram seccionados (3-4µm) com o auxílio de um micrótomo e navalhas de vidro. As secções foram coradas com eosina e hematoxilina (HE). As lâminas foram montadas com Eukitt (Fluka), observadas e fotografadas em microscópio óptico.

3.2.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) - Marcação do citoesqueleto e núcleo

A porção dorsal do abdômen foi utilizada nesta etapa, as amostras foram fixadas em formalina 4%, por 30 minutos. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com faloidina conjugada com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) 1:100 em PBS/Triton 1% por 30 minutos para evidenciar o citoesqueleto. Após a marcação do citoesqueleto, algumas amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com TOPRO-3 Iodide (Invitrogen) 1:500 em PBS por 30 minutos para a evidenciação do núcleo celular seguida e três lavagens em PBS. Todas as etapas foram feitas ao abrigo da luz. As amostras foram montadas com solução de MOWIOL (Fluka) e analisadas no MCVL Zeiss LSM 510 para registro de imagens no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM/UFV).

3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nesta etapa foi utilizada a porção dorsal do abdômen, as amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e mantidas como no item anterior. Após a fixação as amostras foram lavadas com PBS 0,1M, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas como anteriormente e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%). Em seguida, as mesmas foram submetidas à secagem rápida no aparelho de ponto crítico, montadas em suportes apropriados e metalizadas com ouro. Posteriormente as amostras foram observadas e as imagens foram registradas no MEV LEO, modelo 1430VP do NMM/UFV.

3.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Exceto em L4, em que o coração foi processado aderido à carcaça, os órgãos de pupas e adultos foram dissecados, pós-fixados e desidratados como descrito para a MEV e em seguida, mergulhados e mantidos em solução de acetona/Spurr (1:1) durante

a noite e posteriormente em resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, EMS) por 24h, seguido da polimerização por 58h a 60°C. Após a polimerização, foram obtidas secções semifinas (700nm) e ultrafinas (70-90nm) no ultramicrotomo com o auxílio de navalha de diamante. As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina 1% sobre placa aquecida para pré-visualização. As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre (300 mesh), contrastadas por 20min em acetato de uranila aquosa, lavadas com água destilada, contrastadas por 20min em citrato de chumbo e novamente lavadas. O material foi observado e fotografado com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Transmissão Marca Zeiss, modelo EM 109 do NMM/UFV.

3.2.4. Morfometria e análise estatística

As células pericardiais de *A. aegypti* foram contadas e as áreas citoplasmáticas e nucleares foram medidas nas secções histológicas em 90 células de doze indivíduos (quatro L4, três pupas e cinco adultos) com o auxílio do Programa Image-Pro Plus v.4.5. Os valores médios da área citoplasmática e nuclear foram comparados através da análise de variância (ANOVA) e do Teste de Tukey, com o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Montagem total

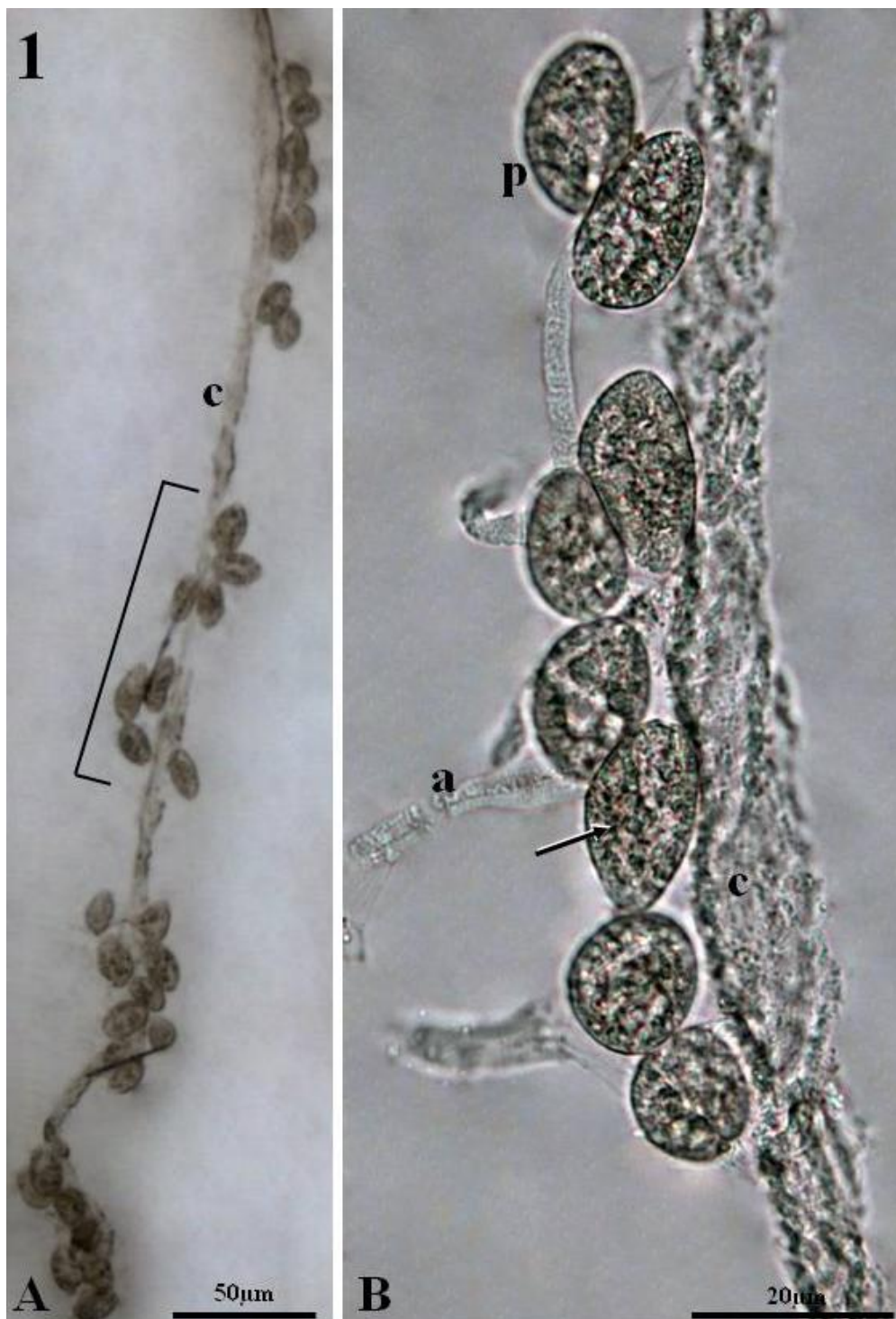
A organização geral do coração, incluindo as fases L4, pupa e adulto está representada na Figura 1A que corresponde a uma montagem total do órgão na fase de pupa (com 24h de idade). Exceto em adultos, os corações de L4 e de pupas apresentam duas traqueias associadas lateralmente ao longo de todo comprimento do órgão, sendo uma de cada lado (dado não mostrado), que foram retiradas durante o processo de dissecação para facilitar a visualização do órgão.

Ainda nas montagens totais, externamente ao coração de L4, pupas e adultos de *A. aegypti* se observa a presença de uma população de células, conhecidas como células pericardiais, sendo possível observar um padrão de organização em número de oito por região intersegmental (Fig. 1A). Elas apresentam formato oval e citoplasma marrom claro, bastante volumoso, contendo componentes citoplasmáticos que lembram inclusões (Fig. 1B). Como as células pericardiais estão associadas às fibras alares, esses dois tipos celulares possuem localização coincidente (Fig. 1B).

Figura 1. Montagem total do coração de pupas de *Aedes aegypti* analisadas ao microscópio de luz convencional. Nesse caso, o órgão foi dissecado tendo as traqueias retidas.

A. Visão geral do coração (c), que apresenta formato de um tubo delgado, onde se pode observar os grupos de oito células pericardiais por região intersegmentar de coloração marrom associadas à parede externa do órgão (colchetes).

B. Detalhe de um grupo de oito células pericardiais (p) e fibras alares (a) associadas ao coração (c). A coloração marrom das células pericardiais é devida à presença de componentes citoplasmáticos que lembram inclusões (seta). Aqui também já é possível perceber o padrão das fibras cardíacas na espiral.



4.2. Histologia

Nas secções histológicas o coração de *A. aegypti* consiste de um órgão em formato de tubo (Fig. 2A) com luz relativamente ampla e de diâmetro irregular ao longo do seu comprimento em L4, pupas e adultos (Figs. 2C, 4A). A parede do coração é constituída por uma única camada de músculo com fibras estriadas transversalmente, fracamente acidófila, disposta em arranjo helicoidal, contendo vários núcleos com formato arredondado ou alongado (Figs. 2B-C). Em todas as fases estudadas se observou células semelhantes à hemócitos aderidas às faces externa e interna da parede do coração e suspensas na luz do mesmo (Figs. 2C, 3A).

O coração pode ser subdividido em câmaras que se repetem nos locais de transição entre um segmento e outro do corpo e são separadas por regiões onde a luz do órgão se estreita e onde estão localizadas aberturas ou ostia (Fig. 3). As ostia na L4 e pupa são aberturas mais simples (Figs. 3A-C), enquanto que no adulto elas são estruturas mais complexas, possuem válvulas, formadas a partir de projeções das fibras cardíacas para o interior do coração (Fig. 3D).

As fibras alares também apresentam citoplasma fracamente acidófilo e são polinucleadas (Fig. 2B), cujos núcleos se localizam próximos do início das ramificações, que são mais longas nas fêmeas adultas quando comparadas a L4 e pupa (Fig. 4A).

As células pericardiais se encontram entre as ramificações das fibras alares e são binucleadas (Figs. 4A-B). Quando coradas com HE as mesmas apresentam citoplasma acidófilo, com inclusões citoplasmáticas esféricas e de cor marrom ou preta. Aqui é possível observar que o conteúdo dessas células se modifica conforme a idade, de forma que na pupa essas inclusões são mais abundantes em comparação com as demais fases (Figs. 4A-C).

Figura 2. Secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina mostrando alguns aspectos gerais e outros detalhados do coração de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

A. Secção longitudinal mostrando uma visão geral do coração na cavidade abdominal observe a musculatura do coração (c) e outros componentes associados como as células pericardiais (p) e algumas ramificações das fibras alares (ponta de seta). Note que a célula pericardial (p) é binucleada e apresenta o formato oval. *- núcleo da célula pericardial; cg- corpo gorduroso.

B. Fotomicrografia do coração do adulto de *A. aegypti*, mostrando detalhes do órgão e de outras células associadas. A fibra alar (a) forma várias ramificações (ponta de seta) próximo ao coração que apresenta uma camada muscular (m) com núcleos evidentes (n), revestindo o lúmen (l) do órgão. *- núcleo da célula pericardial p- células pericardiais.

C. Observar a disposição em espiral da musculatura cardíaca (m). Note a presença de células semelhantes a hemócitos (h) suspensas no lúmen (l) ou aderidos a parede do coração. Ponta de seta- ramificações da fibra alar; l- lúmen do coração; seta- núcleo da fibra alar.

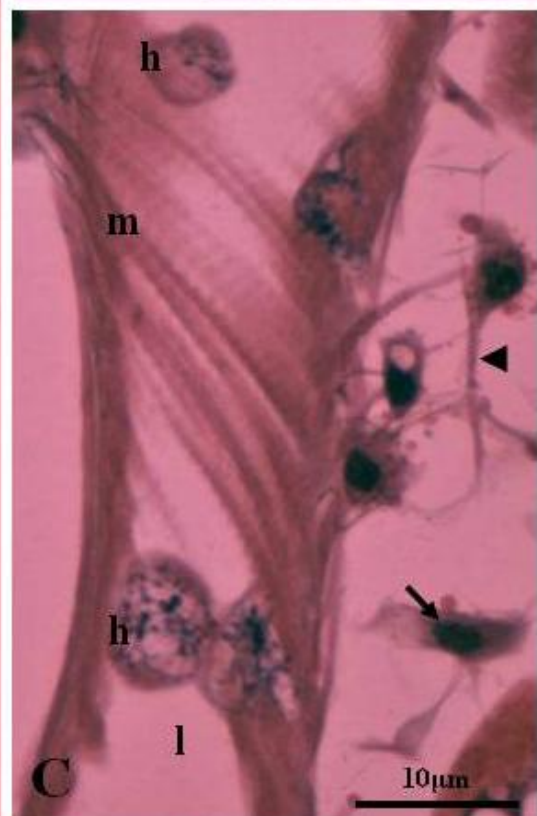
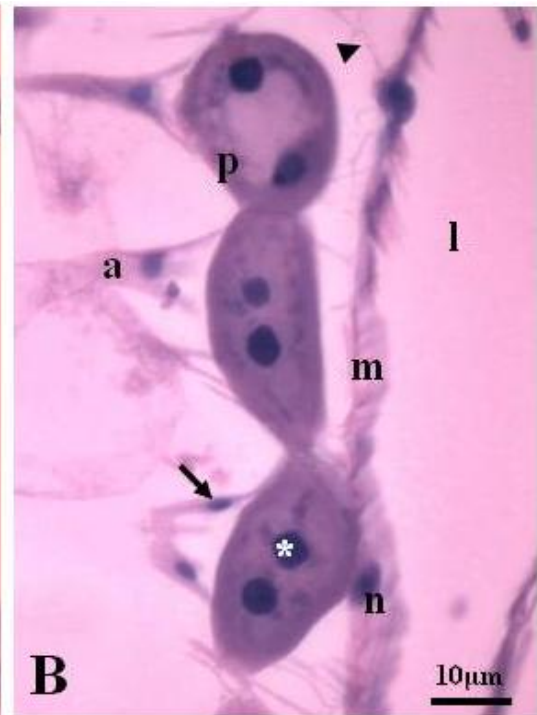
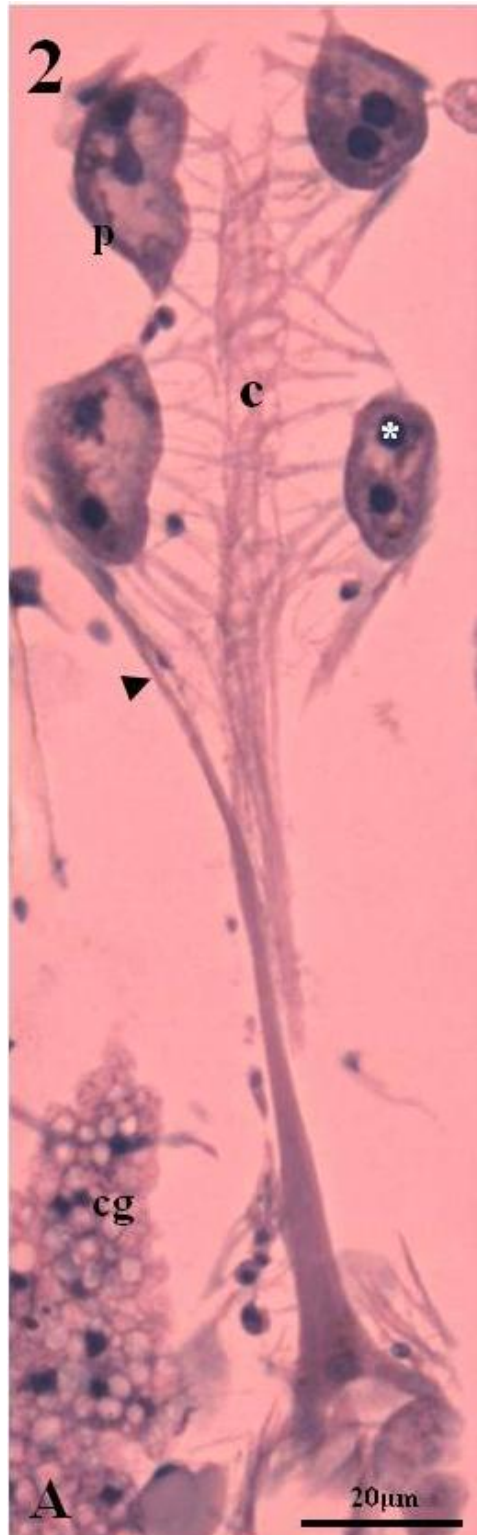


Figura 3. Secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina, mostrando aspectos detalhados do coração de *Aedes aegypti*.

A. Secção longitudinal do coração de L4. Observe que o coração é dividido em câmaras definidas por aberturas ou ostia (seta). h- células semelhantes a hemócitos; m- músculo cardíaco.

B. Detalhe mostrando o par de ostia (setas) que no coração da L4 são aberturas simples na parede do coração onde o músculo cardíaco (m) é mais estreito.

C. Secção longitudinal do coração da pupa mostrando note que o ostium (seta) no coração da pupa é uma abertura simples, ou seja, sem invaginações da parede do coração. Ponta de seta- ramificações da fibra alar; m- músculo cardíaco; p- célula pericardial.

D. Secção longitudinal do coração do adulto em que o par de ostia (setas) onde pode se observar a descontinuidade da parede muscular (m) do órgão. Nessa mesma região há invaginações que formam uma estrutura semelhante a válvula (v) formada a partir de projeções da fibra cardíaca para o interior do coração. *região voltada para a porção anterior do abdome.

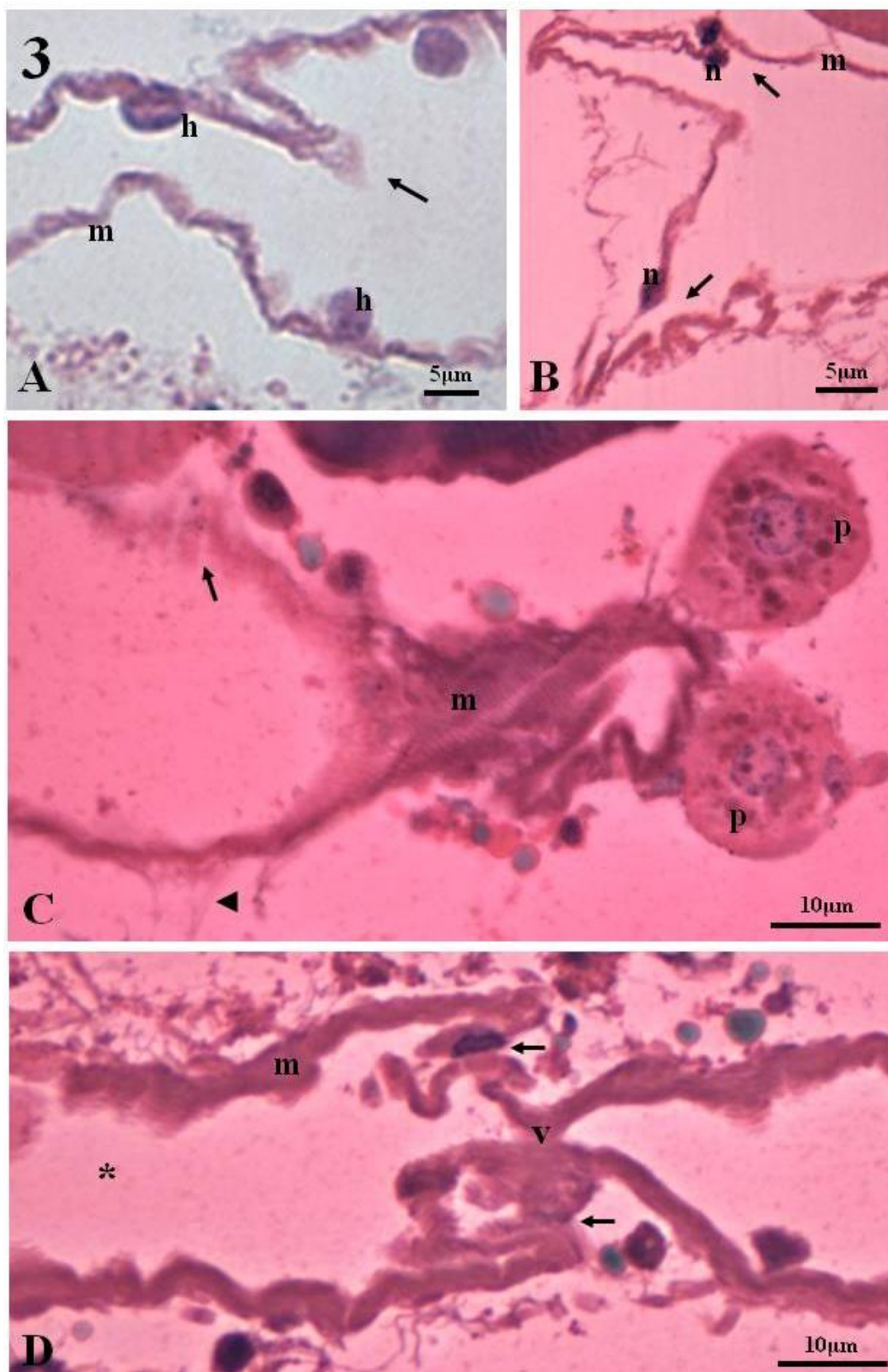
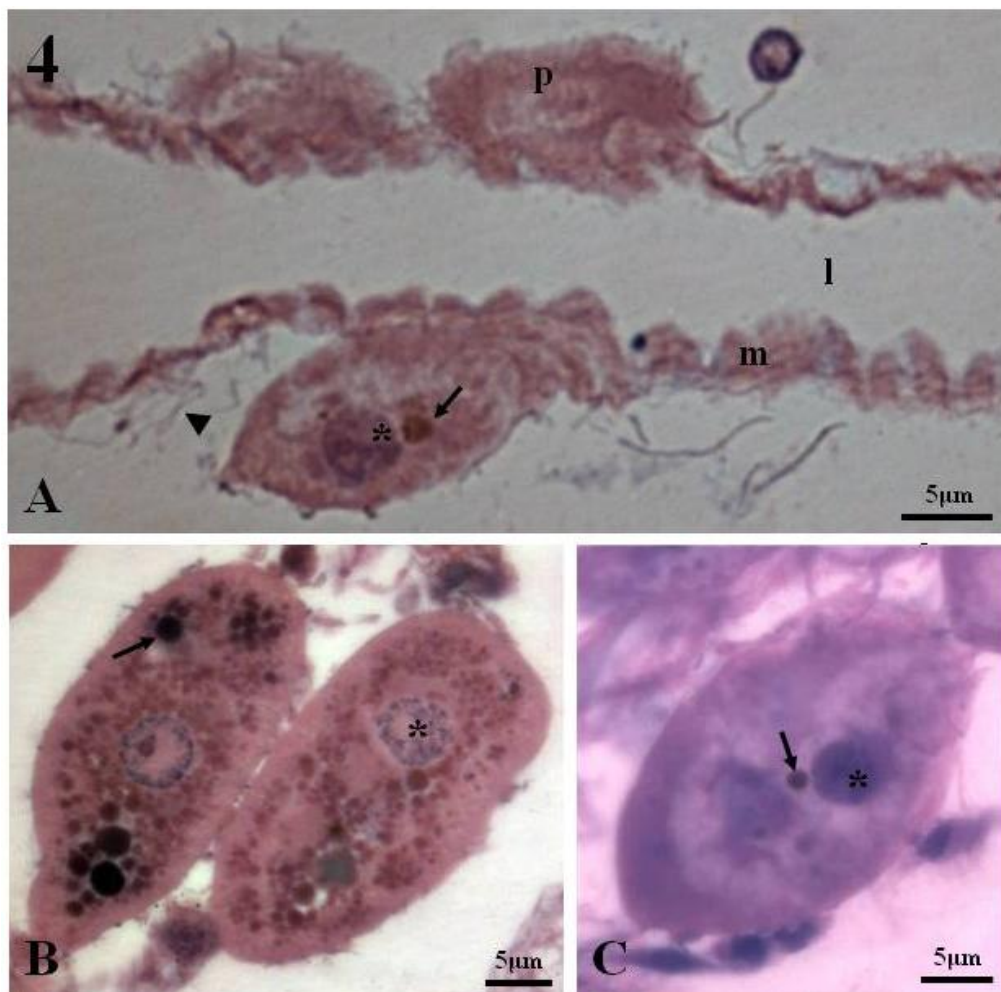


Figura 4. Secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina, mostrando aspectos das células pericardiais de *Aedes aegypti*.

A. Secção longitudinal do coração de L4 e os componentes a ela associados como as células pericardiais (p) e algumas ramificações das fibras alares (ponta de seta). Note a presença de componentes citoplasmáticos que lembram inclusões (seta) e do núcleo da célula pericardial (*), com cromatina predominantemente descondensada. m- músculo cardíaco.

B. Par de células pericardiais da pupa, mostrando o citoplasma quase todo preenchido por componentes citoplasmáticos que lembram inclusões (seta) de diferentes intensidades de cor. Observe que no núcleo da célula pericardial (*) a cromatina é predominantemente descondensada, com grumos de cromatina condensada na periferia nuclear.

C. Detalhe da célula pericardial de adulto com o citoplasma contendo componentes que lembram inclusões (seta). Observe que o núcleo da célula pericardial (*) corou-se fortemente com hematoxilina.



4.3. Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

A marcação para o citoesqueleto mostra a presença dos filamentos de actina nos sarcômeros e confirma mais uma vez que o coração de *A. aegypti* é formado por músculo estriado em orientação helicoidal (Figs. 5A, 5C, 6C, 7A). Na MCVL as fibras que compõem o músculo cardíaco podem ser vistas de forma individualizadas (Figs. 5C, 7A). Enquanto que as células pericardiais em todas as fases aqui estudadas apresentaram marcação fraca para o citoesqueleto com faloidina-FITC (Figs. 5C, 6A, 7B).

As fibras alares apresentam um padrão de estrias transversais com regiões fortemente positivas alternadas com regiões negativas para o marcador. As fibras alares se ramificam e adquirem o arranjo de cálice à medida que se aproximam do coração (Figs. 5B-C, 6A-B). Esse padrão de estriamento transversal é visto ao longo das ramificações das fibras alares em todas as fases de desenvolvimento do inseto. Em L4 e pupa essas ramificações são curtas quando comparadas ao adulto, onde as mesmas são longas e se espalham sobre a superfície do coração, diferentemente das duas fases jovens (Figs. 4C, 5A-B).

A marcação por TOPRO-3 mostrou a presença de vários núcleos espaçados na musculatura cardíaca de *A. aegypti* (Fig. 7A), confirmando que as fibras cardíacas e alares são polinucleadas (Figs. 7C-E) e que as células pericardiais são binucleadas (Fig. 7B).

Figura 5. Detalhes da musculatura cardíaca e fibras alares do coração da L4 (A) e pupa (B e C) de *Aedes aegypti* submetidas à marcação do citoesqueleto por faloidina-FITC e analisadas ao MCVL.

A. Arranjo em espiral das fibras musculares cardíacas (c) de uma porção dilatada do órgão de L4. M- músculo intersegmentar.

B. Detalhe da fibra alar da pupa, observe o padrão de estrias com regiões fortemente positivas (setas) e negativas para a técnica. A fibra alar apresenta várias ramificações (cabeça de seta) na extremidade que se aproxima do coração.

C. Visão do coração (c) da pupa, mostrando o arranjo em espiral das fibras cardíacas (f). As células pericardiais (p) são encontradas no diafragma dorsal entre as ramificações das fibras alares (a) em torno do coração (ponta de seta).

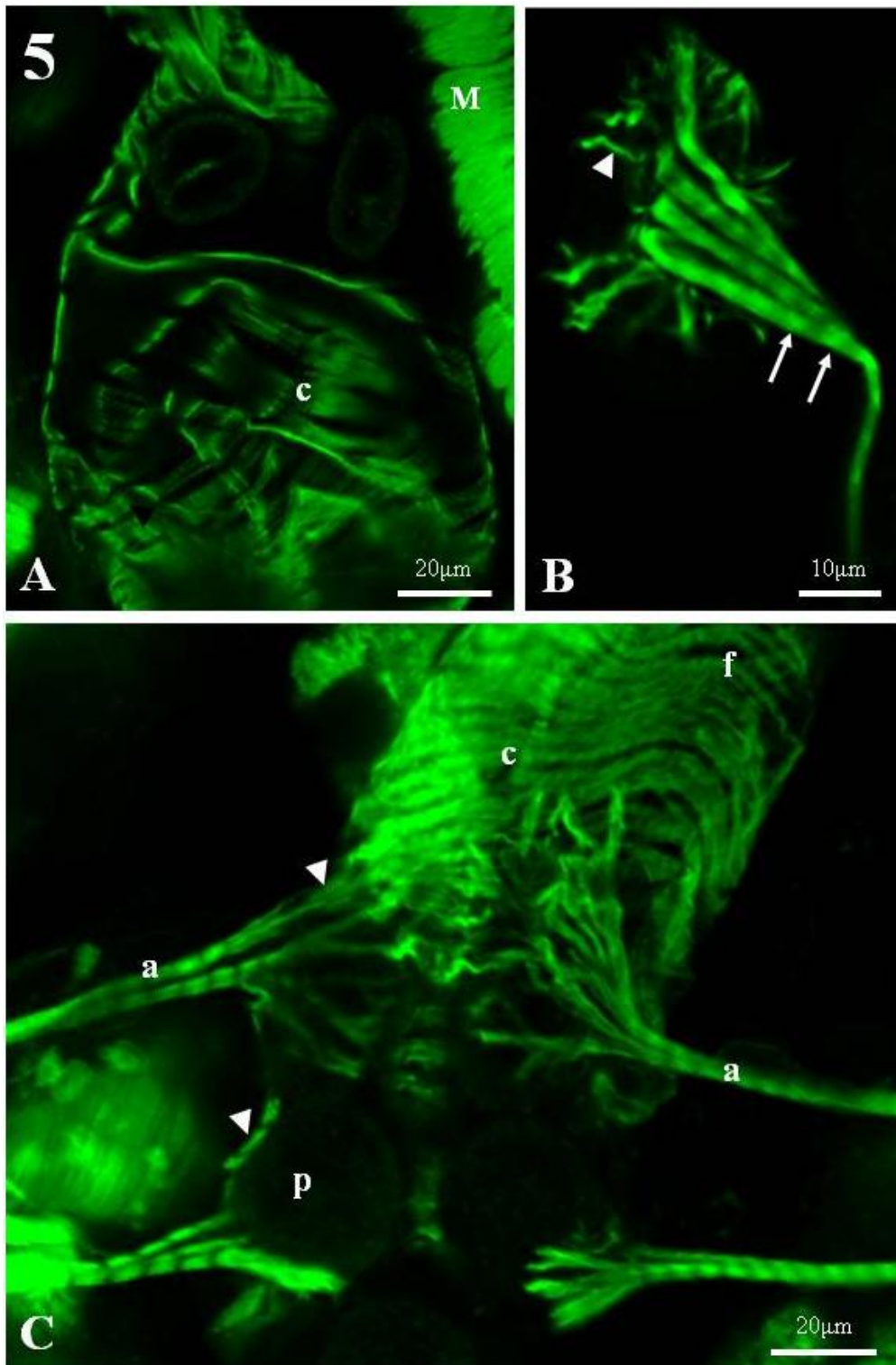


Figura 6. Detalhes da musculatura cardíaca e fibras alares do coração de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* submetidas à marcação do citoesqueleto por faloidina-FITC e analisadas ao MCVL.

A. As fibras alares (a) apresentam ramificações (ponta de seta) delicadas que se prendem à linha mediana ventral do coração (c). M- músculo intersegmentar.

B. Detalhe da fibra alar (a) e suas ramificações (ponta de seta) longas e delicadas, note o arranjo de cálice das ramificações que se aproximam da superfície do coração (c).

C. Visão do coração (c) mostrando o arranjo em espiral das fibras cardíacas. As regiões negativas para a marcação são provavelmente áreas ocupadas pelos núcleos (n) do músculo cardíaco.

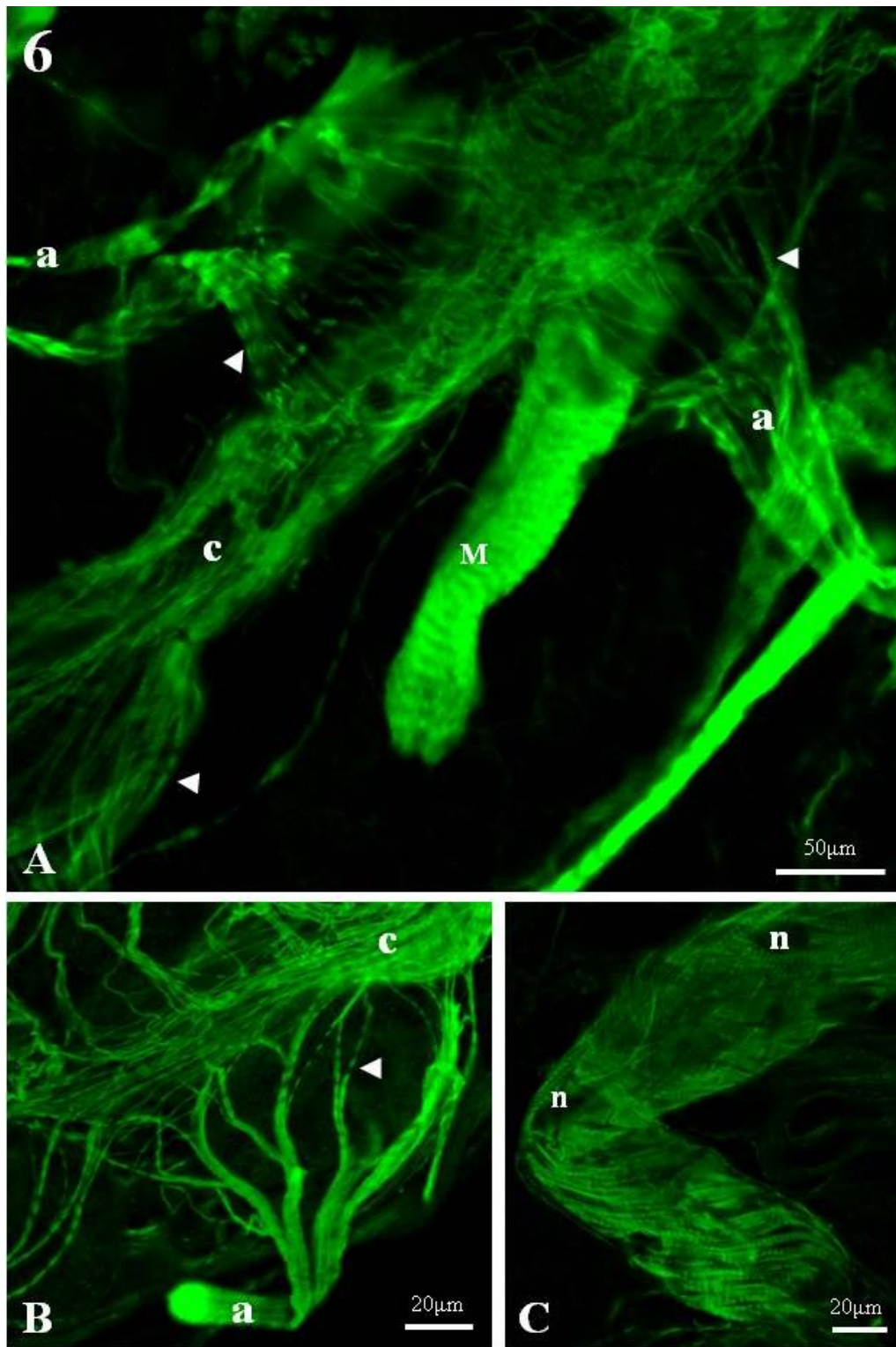


Figura 7. Imagens da musculatura cardíaca e fibras alares do coração de *Aedes aegypti* submetidas à marcação do citoesqueleto por faloidina-FITC e do núcleo por TOPRO-3 e analisadas ao MCVL.

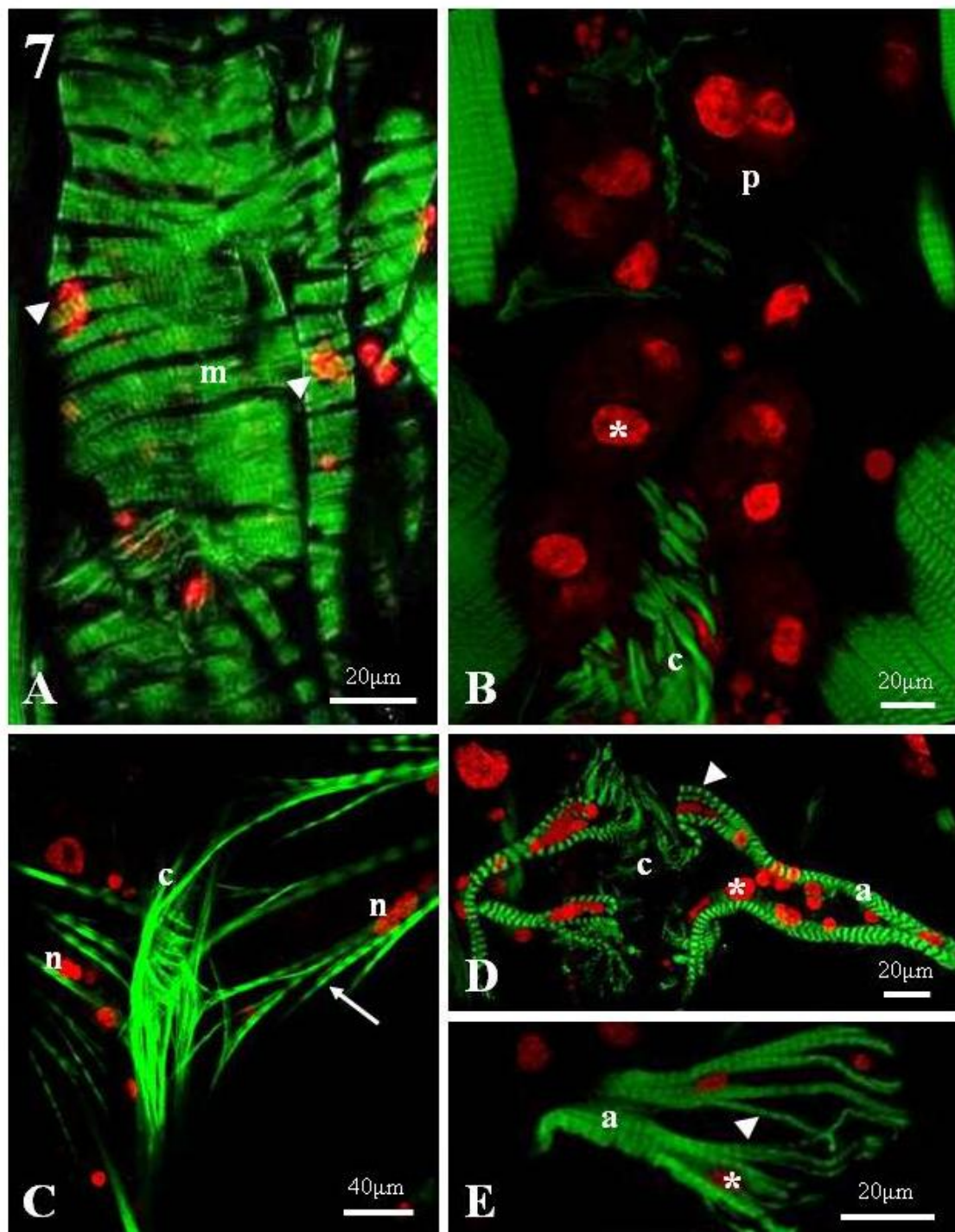
A. Observe o arranjo das fibras cardíacas (m) em espiral em L4. A marcação em vermelho mostra os núcleos (ponta de seta) das fibras cardíacas.

B. As células pericardiais (p) pupais são binucleadas e estão associadas ao coração (c).
*- núcleo da célula pericardial.

C. Fibras alares de adultos com aspecto estriado e com os núcleos (n) localizados na periferia celular. As fibras alares são finas e a maioria delas se prende a linha mediana ventral do coração (c).

D. Par de fibras alares (a) pupais com ramificações (ponta de seta) curtas que se aproximam do coração por lados opostos. Como mostrado na Fig. 5B, é nítida a presença de bandas claras e escuras confirmando que a fibra alar é estriada até mesmo em suas ramificações (cabeça de seta). Pode ser claramente visto que a fibra alar possui mais de um núcleo (*) de formato variado.

E. Imagem da fibra alar (a) de adulto, observe a longas ramificações e a presença das bandas claras e escuras (ponta de seta) em todo o citoplasma. *- núcleo da fibra alar.



4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises em MEV mostram mais uma vez que o coração de *A. aegypti* está localizado linha média do abdômen associado as fibras alares, células pericardiais e também rodeado pelas células do corpo gorduroso parietal (Fig. 8A). Nas L4 e pupas, o coração apresenta superfície ventral com aspecto enrugado (Figs. 9B, 10A). Diferente de L4 e pupa, a superfície ventral do coração do adulto apresenta sulcos dispostos longitudinalmente (Fig. 8C). Os núcleos das fibras do músculo cardíaco estão geralmente localizados na periferia do citoplasma e se projetam para superfície externa do órgão (Fig. 9B). Durante a dissecação e processamento das amostras, a musculatura cardíaca foi eventualmente rompida, possibilitando a visualização da face interna do órgão na pupa que apresenta superfície com aspecto irregular disposto circularmente (Fig. 9B).

As ramificações das fibras alares repousam sobre a superfície do coração (Figs. 8C, 9A, 10A). Como já exposto anteriormente, nas fases imaturas essas ramificações são curtas e pouco desenvolvidas (Figs. 9A, 10A), enquanto no adulto, as mesmas são longas e se espalham sobre a superfície do coração com orientação longitudinal (Fig. 8B). As fibras alares de forma geral exibem ondulações com aparência de estrias transversais, no entanto à medida que essas fibras se ramificam essas ondulações se tornam menos evidentes (Fig. 10B).

Aqui também as células pericardiais se encontram distribuídas em fileiras ao redor do coração e aprisionadas por entre ramificações das fibras alares (Figs. 8B, 9A). Essas células no adulto apresentam superfície irregular (Fig. 8D) quando comparadas as fases jovens que exibem menos irregularidade (Figs. 9A, 10B).

Figura 8. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da superfície ventral do coração de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

A. Parte do interior do abdome mostrando o coração (c), ramificações das fibras alares (ponta de seta) aderindo à superfície e o corpo gorduroso (cg) ao redor do mesmo.

B. Detalhe da superfície do coração (c) mostrando uma região que corresponde ao local de associação com células pericardiais (p). Notar que elas estão presas entre as ramificações (ponta de seta) das fibras alares (a).

C. Detalhe da superfície do coração (c) de adulto, com as delicadas ramificações das fibras alares (ponta de seta) em contato com o órgão. Essas ramificações se dispõem ao longo do eixo longitudinal do coração.

D. Observe a superfície irregular da célula pericardial (p) de adulto que também apresenta uma ramificação da fibra alar (ponta de seta) muito fina sobre sua superfície.*- debris celular; c- coração.

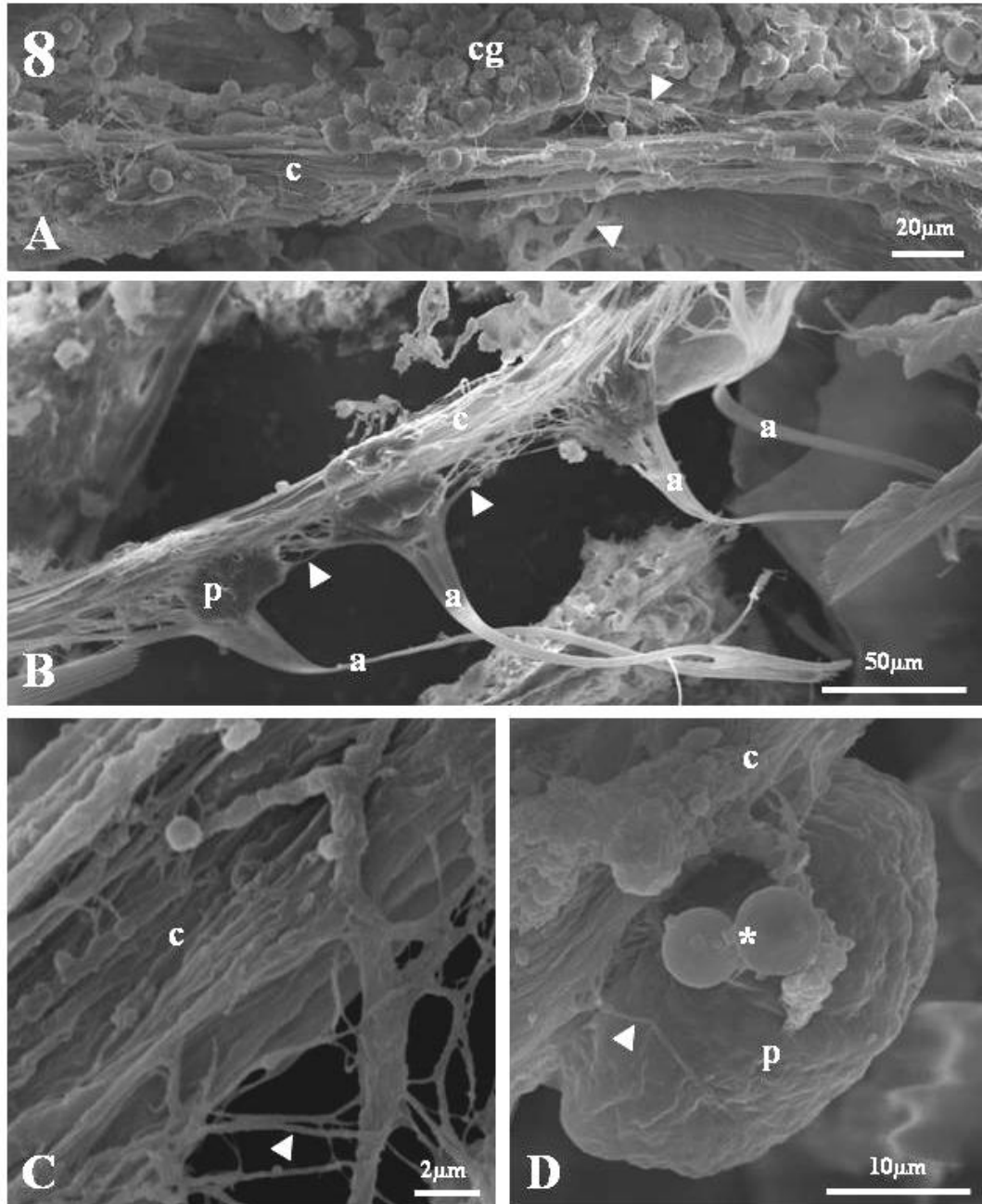


Figura 9. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da microanatomia do coração da larva de *Aedes aegypti*.

A. Visão do órgão (c) na posição ventral onde se pode ver dois pares de células pericardiais (p) “aprisionadas” pelas ramificações (cabeça de seta) das fibras alares (a). Detalhe da superfície estriada da fibra alar (*).

B. Região do coração (c) onde eventualmente ocorreu uma fratura que possibilitou visualizar a parede interna (*) do órgão. Essa parede é composta por fibras dispostas circularmente. Observe o núcleo (seta) proeminente e com formato arredondado e voltado para o lado externo do órgão.

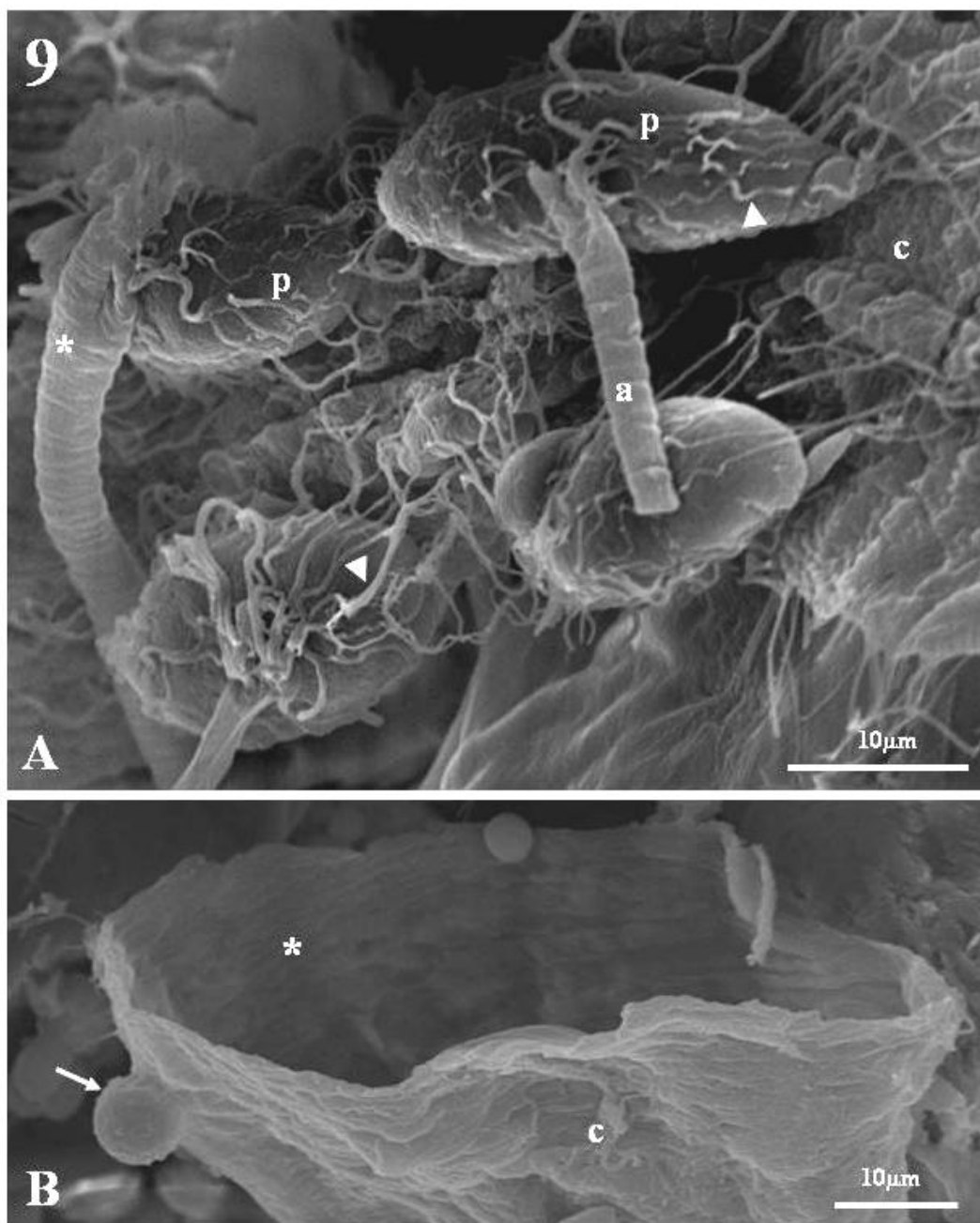
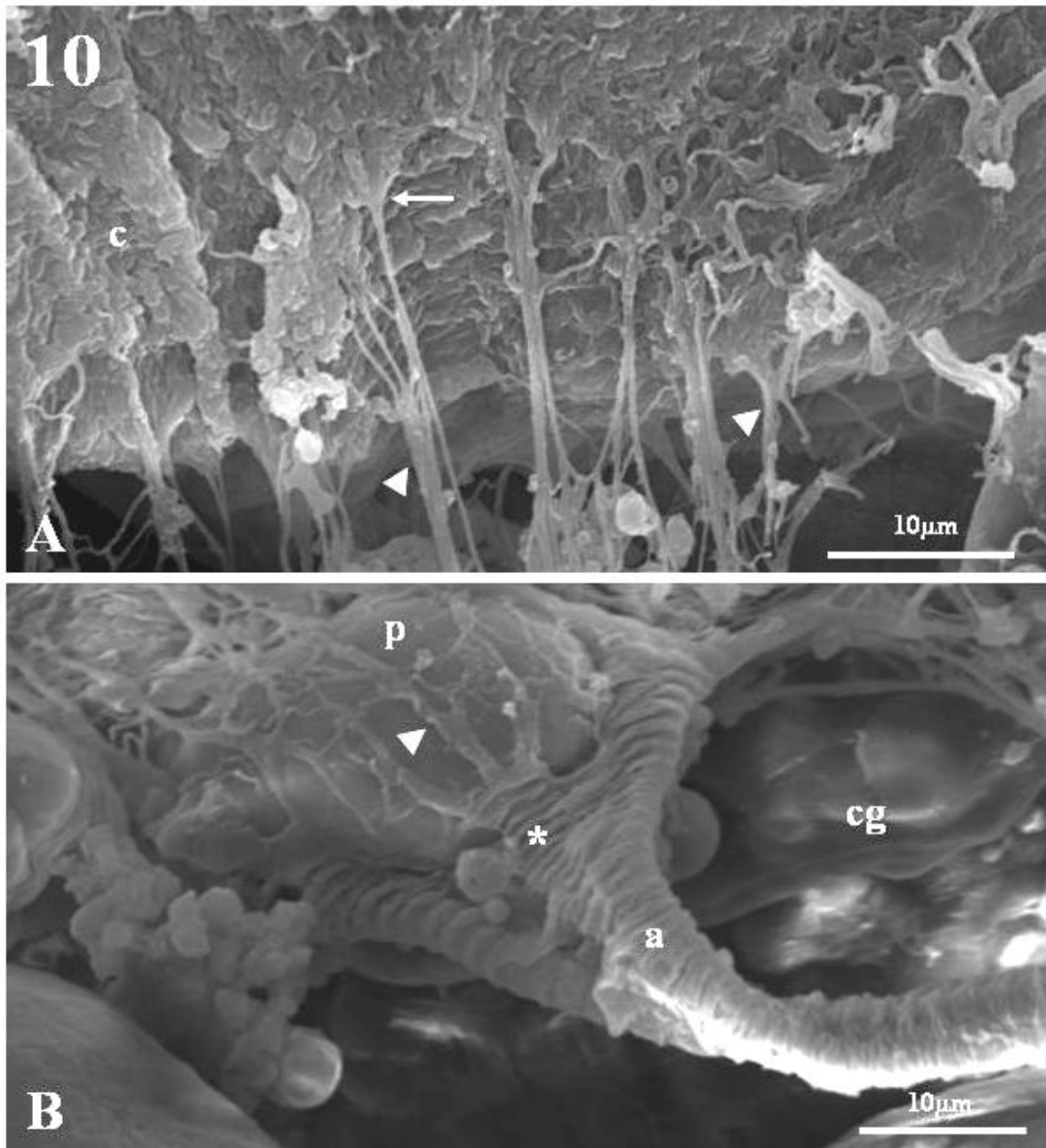


Figura 10. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície do coração da pupa de *Aedes aegypti*.

A. Detalhe da superfície ventral e irregular do coração (c). A seta indica a região de contato entre das ramificações das fibras alares (ponta de seta) a superfície do coração (c).

B. Detalhe da superfície estriada do músculo alar (*). Note que as suas ramificações (ponta de seta) apresentam estrias menos evidentes e se espalham sobre a célula pericardial (p). cg- corpo gorduroso .



4.5. Microscopia eletrônica de transmissão

As análises ultraestruturais mostram que a membrana citoplasmática das fibras que compõem o músculo cardíaco de L4, pupa e adulto de *A. aegypti* são limitadas por uma lâmina basal fina e granular que reveste a face interna e externa do órgão (Figs. 11B, 14).

A parede do coração é formada uma camada de músculo estriado com espessura que varia ao longo do desenvolvimento de *A. aegypti*. Nas larvas a espessura média é 0,06 μm , na pupa 2 μm , enquanto que no adulto é 1,2 μm .

Em todas as fases do ciclo de vida de *A. aegypti* ocorrem invaginações da membrana citoplasmática das células musculares formando estruturas parecidas com os túbulos T (Figs. 11B, 12B, 14). Os sarcômeros dessas células são curtos e medem aproximadamente 0,04 μm na L4, 0,9 μm na pupa e 0,8 μm no adulto. Essas estruturas subcelulares são separadas pelas linhas Z que aparecem como linhas bastante elétrondensas e descontínuas (Figs. 11B, 12B, 14). As miofibrilas junto com as mitocôndrias ocupam praticamente todo o sarcoplasma, sendo que essas organelas se concentram na periferia da fibra, com perfil predominantemente arredondado e matriz pouco elétrondensa. Por outro lado, as miofibrilas estão reunidas no interior da fibra (Figs. 11B, 12B). Os núcleos das fibras musculares cardíacas estão dispostos na periferia celular com cromatina predominantemente descondensada (Figs. 11A, 13), enquanto que alguns apresentam nucléolo evidente (Figura 13A).

Em todos os indivíduos das três fases analisadas, em geral as células pericardiais estão contatos com o músculo cardíaco e as ramificações das fibras alares (Figs. 12A, 13A), contudo, nenhum tipo de junção celular especializada foi observado entre essas estruturas. Essas células binucleadas apresentam cromatina predominantemente descondensada na região central e nucléolo evidente (Figs. 15A, 16A, 18A). Também na ultra-estrutura as células pericardiais se caracterizam por apresentarem membrana citoplasmática repleta de invaginações que formam longos canais no córtex celular (Fig. 15B, 19B). Além disso, a superfície dessas células é revestida por uma lâmina basal que não acompanha as invaginações da membrana (Figs. 15B, 19A). Esses canais são preenchidos por um material granular (Figs. 19A).

Além das invaginações da membrana citoplasmática, o córtex da célula pericardial apresenta estruturas revestidas por membrana que lembram vesículas revestidas (Fig. 15B). Além delas, o citoplasma das células pericardiais contém

vesículas electrón-densas e estruturas semelhantes a vacúolos que são preenchidos parcialmente ou completamente com material eletrondenso (Figs. 15B, 18, 19). Entretanto, no citoplasma das células pericardiais das pupas, as vesículas elétron-densas e as estruturas que se assemelham a vacúolos são maiores em relação às outras fases estudadas (Figs. 16 A-B, 17 A-B).

As mitocôndrias das células pericardiais são bastante elétron-densas e em geral apresentam um perfil alongado, mas muitas vezes é possível observar mitocôndrias curvadas exibindo cristas desenvolvidas (Fig. 15A, 16B, 18B). Particularmente nas fêmeas adultas de *A. aegypti* é possível visualizar inclusões lipídicas próximas das mitocôndrias (Figs. 18B). No citoplasma dessas células também existem regiões onde se concentram sistemas de membranas intracelulares semelhantes ao RER e complexo de Golgi, ambos pouco desenvolvidos (Figs. 15A, 16 B, 17A).

Figura 11. Micrografia eletrônica de transmissão do coração de L4 de *Aedes aegypti*.

A. Observe a organização geral e a espessura delgada do músculo cardíaco (c) revestindo o lúmen (l). Note o aspecto irregular do músculo cardíaco e o núcleo proeminente (n) da fibra. m- regiões ricas em mitocôndrias.

B. Detalhe da fibra muscular cardíaca, onde é possível ver a lamina basal (setas pequenas) revestindo a superfície externa e interna do coração. A fibra muscular é formada por sarcômeros (s) que são limitados pelas linhas Z (ponta de seta) que é bastante elétron-densa e descontínua. Aqui mitocôndrias (m) podem ser vistas concentradas na periferia da fibra cardíaca voltada para o exterior e invaginações (setas grandes) da membrana plasmática da fibra voltada para o lúmen (l) co-localizadas com as linhas Z (cabeça de seta) que correspondem aos túbulos T.

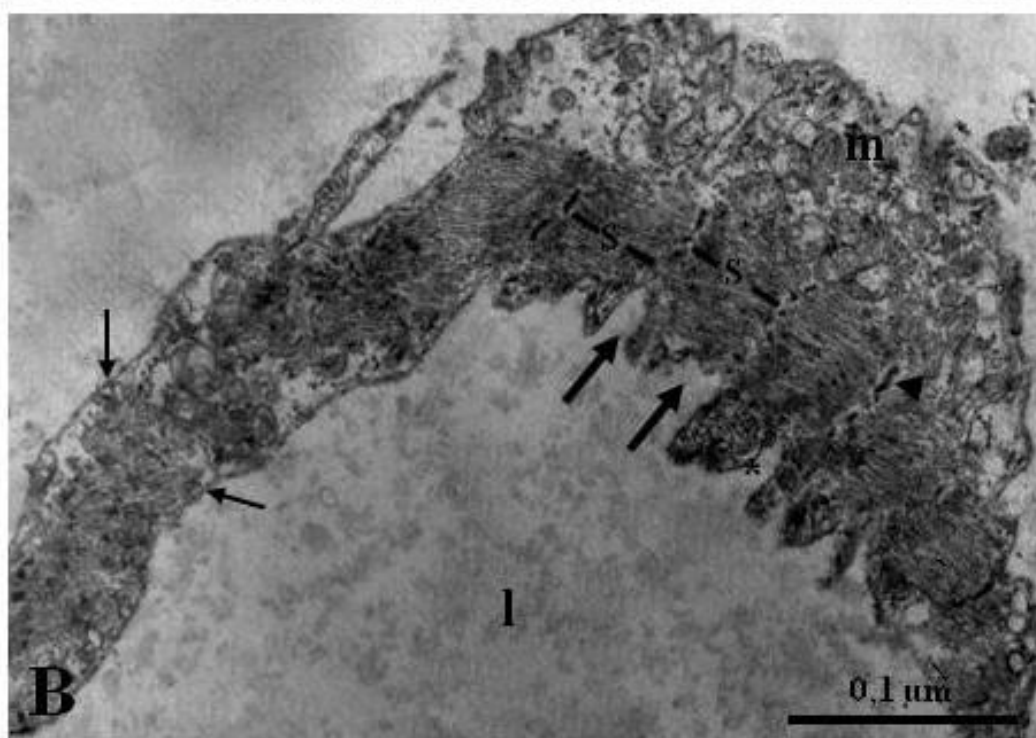
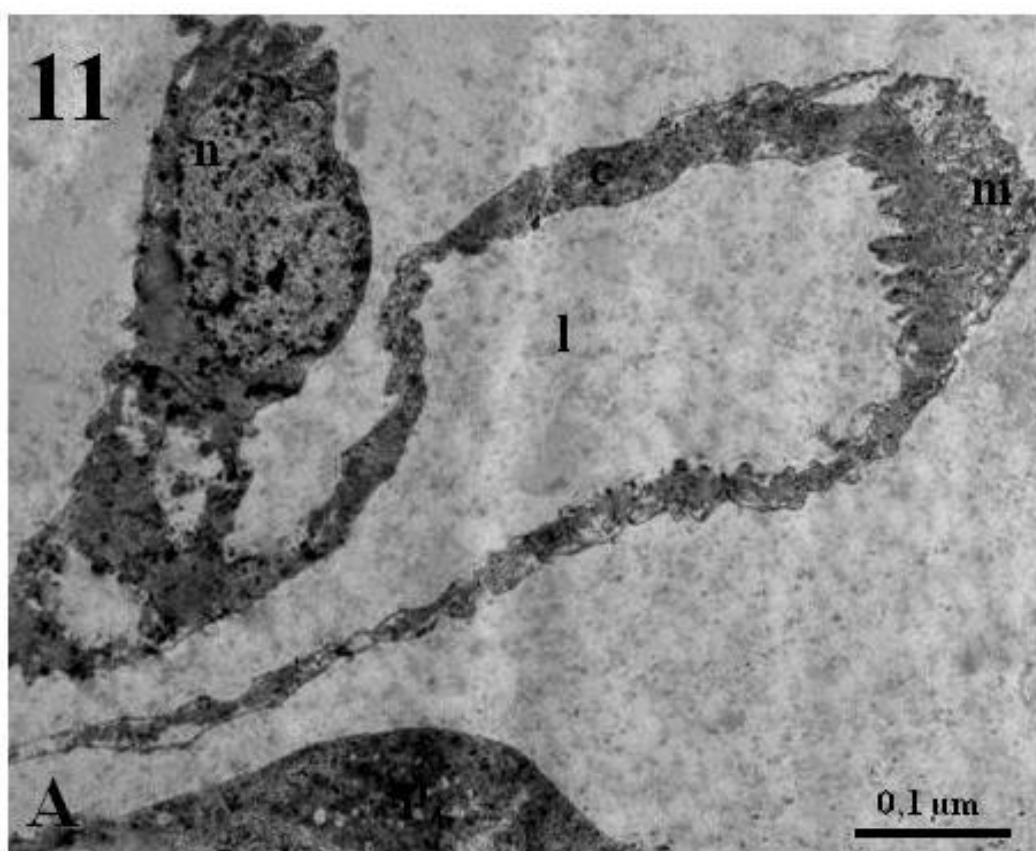


Figura 12. Micrografias eletrônicas de transmissão do coração da pupa de *Aedes aegypti*.

A. Aspecto geral do interior da fibra cardíaca (c). O corte transversal mostrando que o citoplasma da fibra é quase todo preenchido por miofibrilas (mi). Observe a presença de fibras alares (a) entre o músculo cardíaco (c) e a célula pericardial (p). No citoplasma da célula pericardial é possível visualizar várias estruturas elétron-densas que supostamente correspondem a lisossomos (*) e a vacúolo (v).

B. Detalhes do citoplasma da fibra cardíaca onde é possível visualizar sarcômeros (s) distribuídos por toda a fibra e limitados pelas linhas Z (ponta de seta). Note que as mitocôndrias (m) estão presentes em abundância nas dobras da parede do miocárdio. As setas apontam para invaginações da membrana da fibra cardíaca que correspondem aos túbulos T.

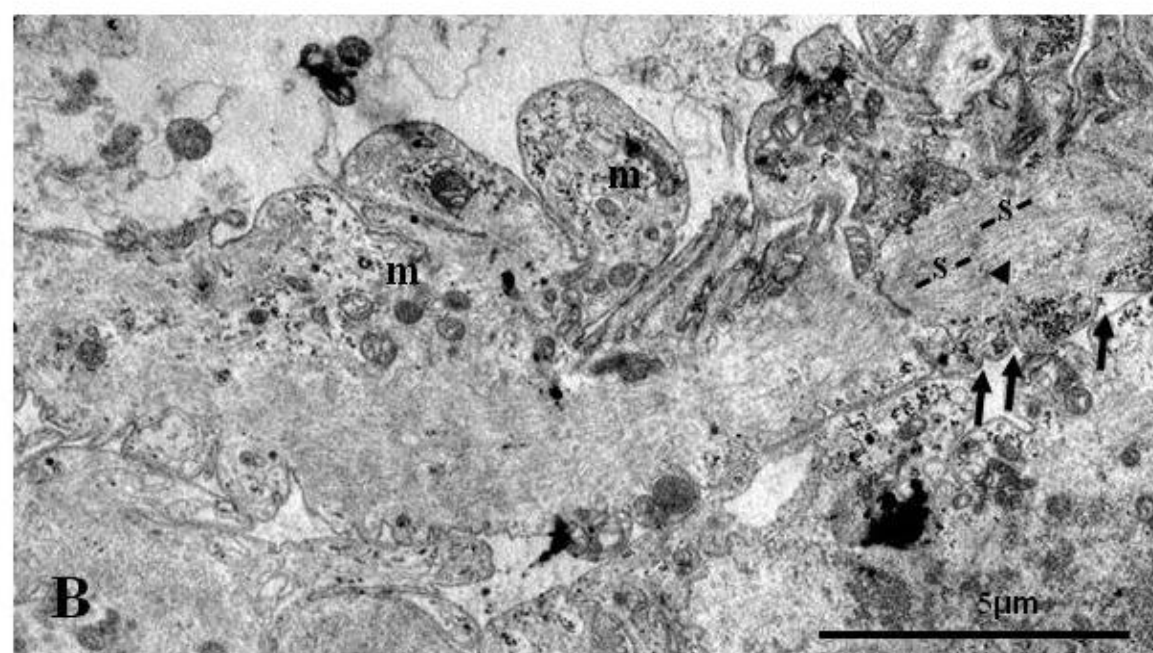
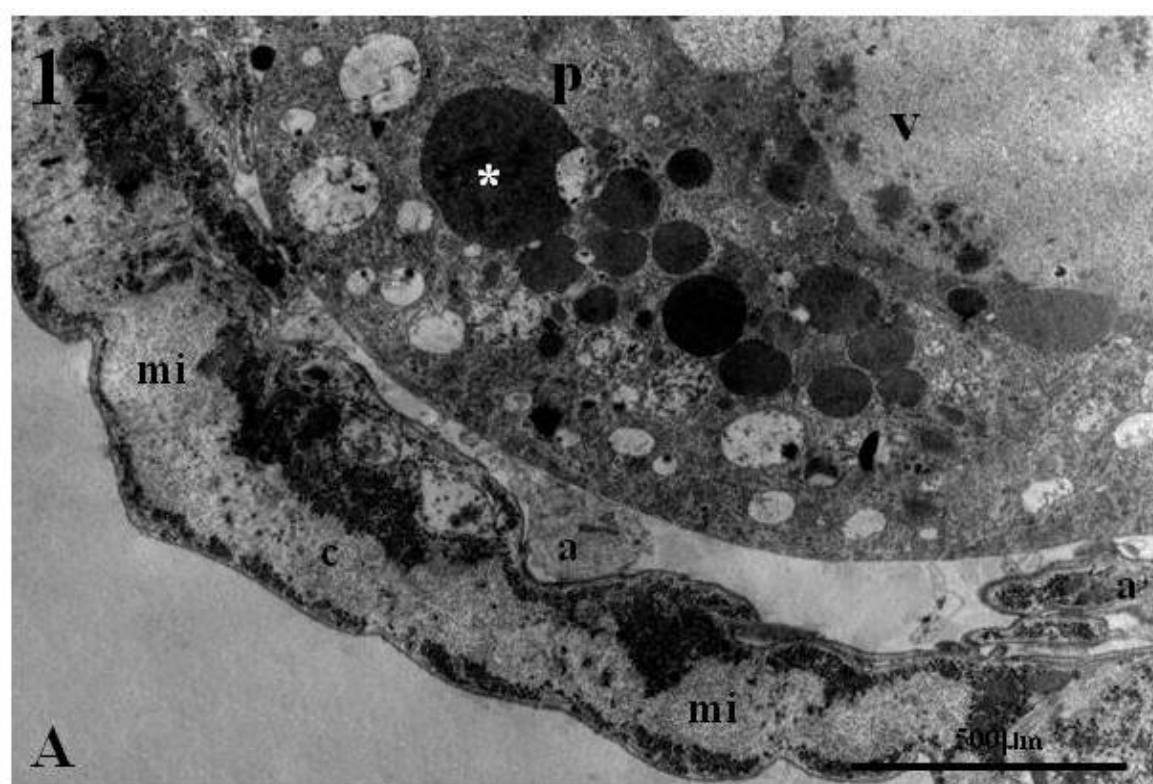


Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão do coração de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

A. Região onde há contato físico (setas) entre a fibra cardíaca e a célula pericardial (p). Observe o núcleo (n) da fibra cardíaca (c) voltado para o exterior do coração com o nucléolo (nu) desenvolvido e cromatina descondensada predominante. Notar a presença de várias invaginações (i) da membrana citoplasmática da célula pericardial formando extensos canais. O citoplasma contém estruturas elétron-densas (*) que correspondem a lisossomos. a- secção transversal da fibra alar; cabeça de seta- lâmina basal externa à célula pericardial.

B. Organização geral do músculo cardíaco de adulto. Note a separação entre as fibras musculares (setas). Os sarcômeros (s) estão distribuídos por toda a fibra e são delimitados pelas linhas Z (ponta de seta), que é bastante elétron-densas e descontínua. a- ramificação da fibra alar, l- lúmen do coração; n- núcleo da fibra cardíaca; p- célula pericardial.

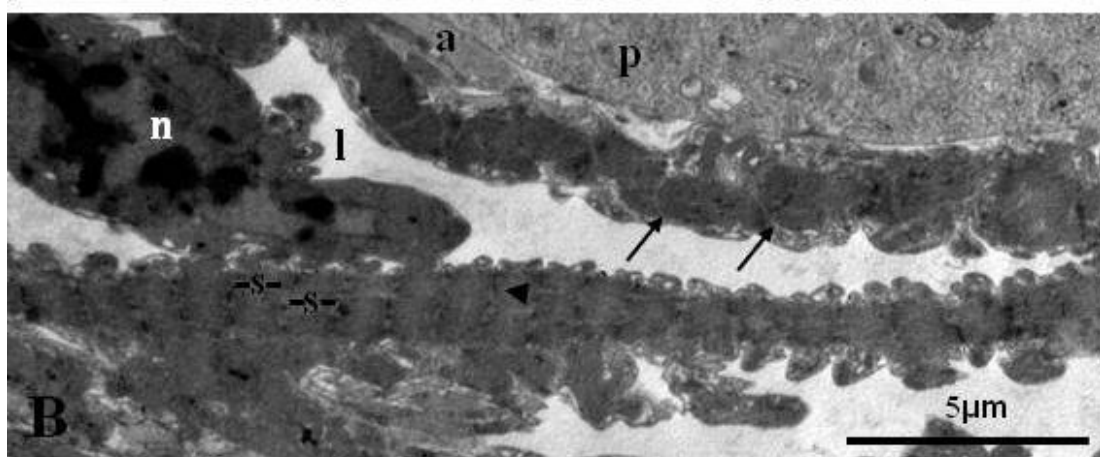
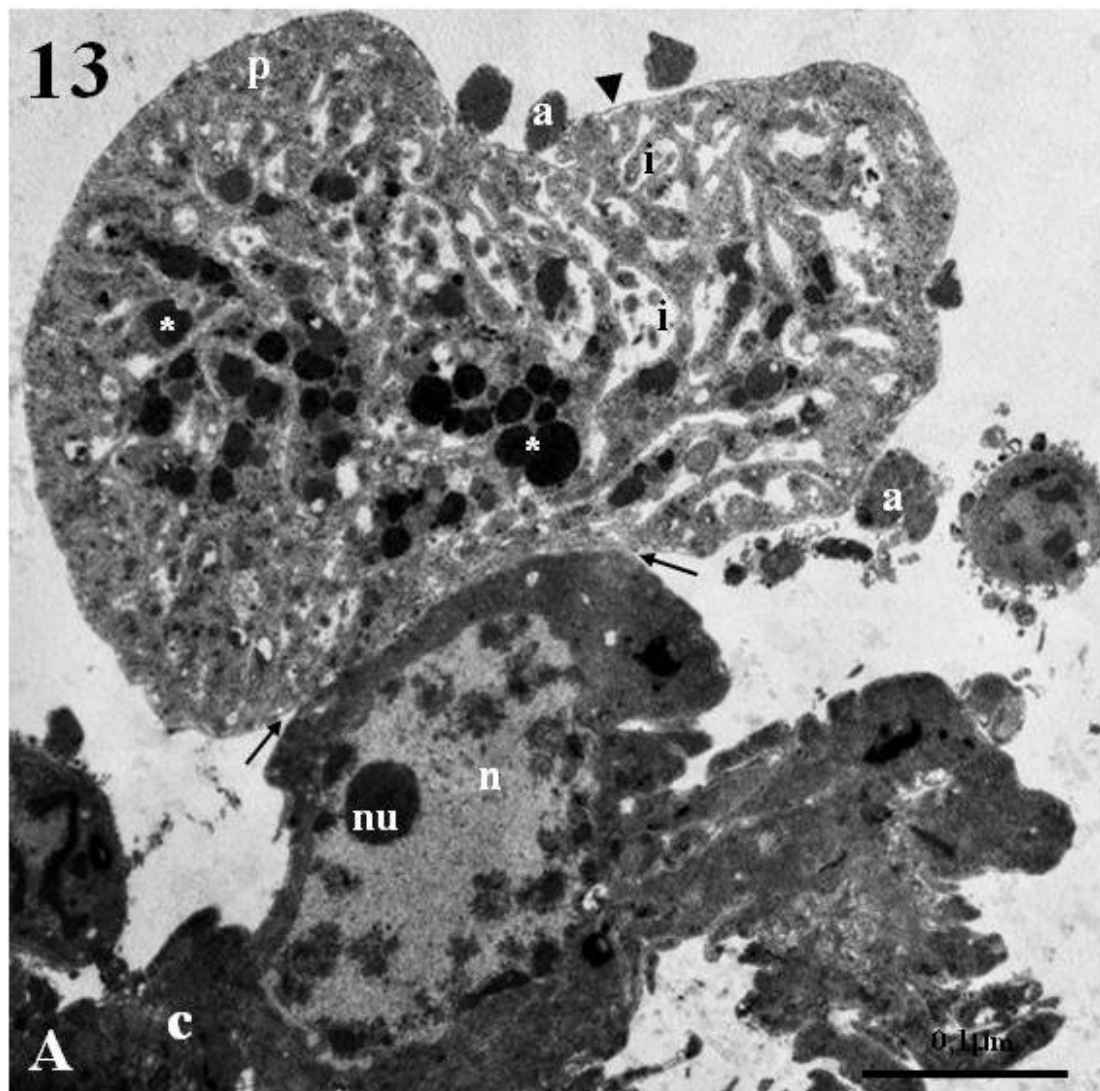


Figura 14. Micrografia eletrônica de transmissão do coração de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. Notar a presença de uma delicada lamina basal (setas) com aspecto granulado acompanhando a membrana citoplasmática tanto na face externa quanto interna do coração. O citoplasma da fibra cardíaca é quase todo preenchido por sarcômeros (s) limitados pelas linhas Z (ponta de seta) que são descontínuas e bastante elétron-densas. a- ramificação da fibra alar; m- mitocôndria.

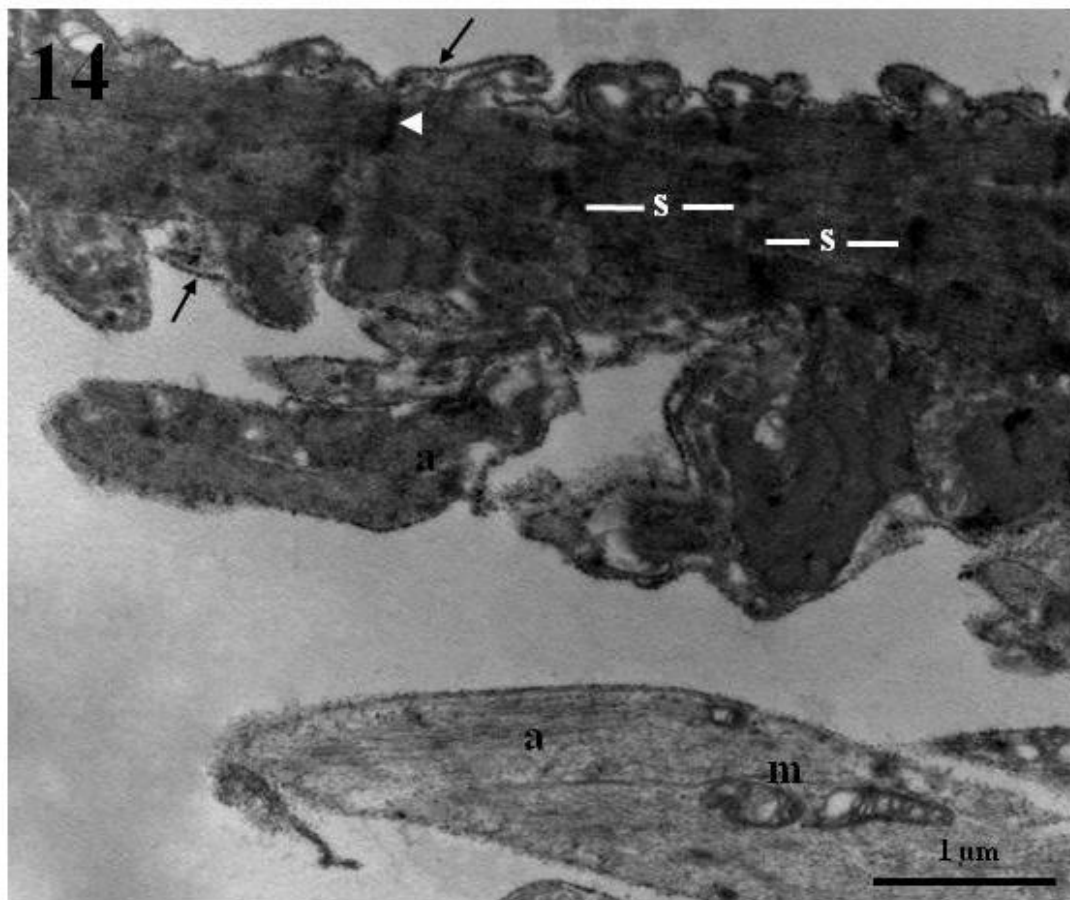


Figura 15. Micrografias eletrônicas de transmissão da célula pericardial de L4 de *Aedes aegypti*.

A. Aspecto geral do citoplasma e núcleo (N). O núcleo é volumoso com cromatina condensada (seta) distribuída preferencialmente na periferia e nucléolo (nu) evidente. O citoplasma contém mitocôndrias (m) com diversos perfis e regiões onde se concentram sistemas de membranas intracelulares bem desenvolvidos, semelhantes ao retículo endoplasmático (r), corpos multivesiculares (cm), estruturas elétron-densas (*) e estruturas semelhantes a vacúolos (v). a- ramificação da fibra alar (a).

B. Detalhe da região periférica da célula pericardial onde se observa muitas invaginações da membrana citoplasmática (setas), supostas vesículas endocíticas (Ve) e estruturas semelhantes a vacúolos (v) de diferentes tamanhos e com conteúdo heterogêneo e mitocôndrias (m) com diferentes perfis e matrizes-densas.

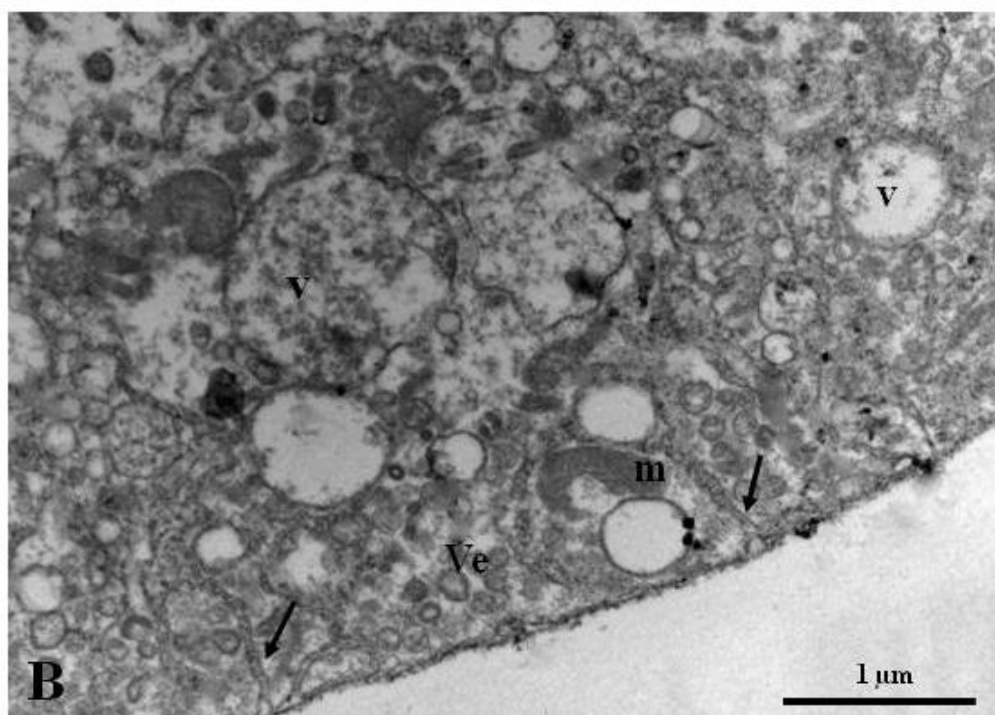
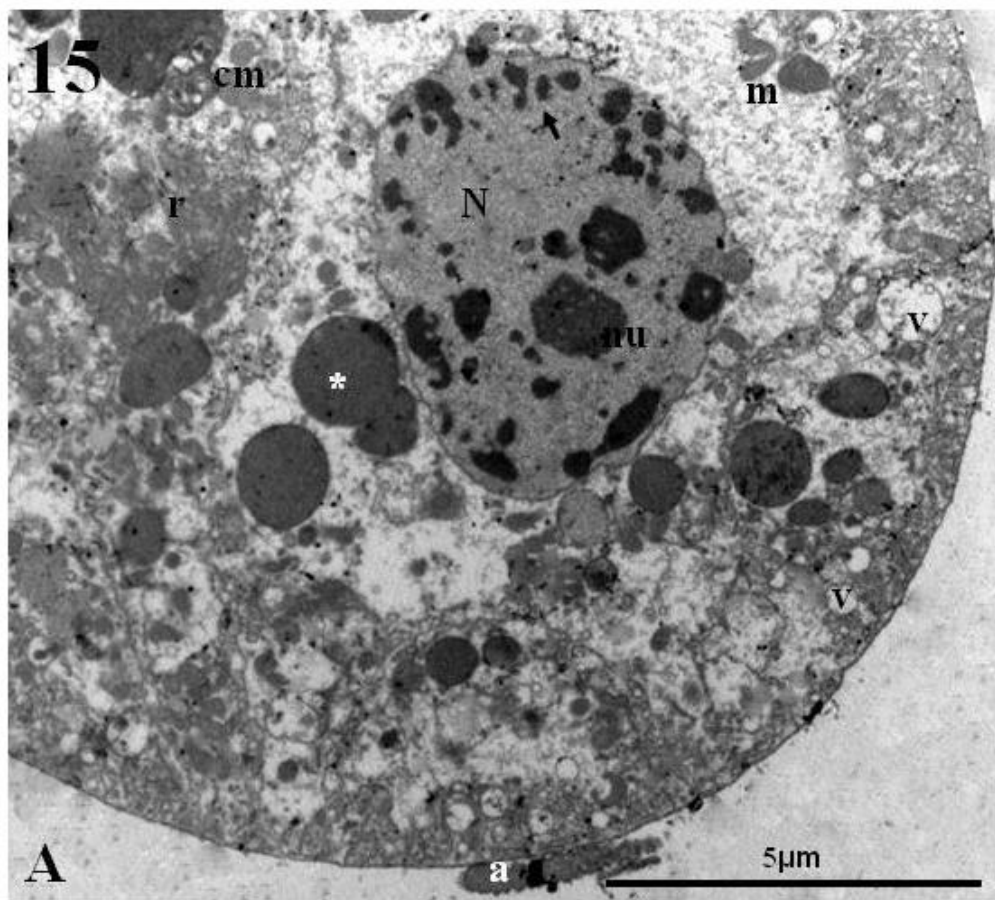


Figura 16. Micrografias eletrônicas de transmissão da célula pericardial de pupa de *Aedes aegypti*.

A. Observe o citoplasma da célula pericardial repleto de estruturas elétron-densas de diferentes tamanhos (*) e vacúolo (v) bastante desenvolvido. Notar a presença de mais de um núcleo (N) com cromatina predominantemente descondensada e o nucléolo (n) evidente. Notar a região onde se concentram sistemas de membranas intracelulares bem desenvolvidos, semelhantes ao retículo endoplasmático (r) próximo ao envoltório nuclear.

B. Porção do citoplasma da célula pericardial onde pode ser visto o complexo de Golgi (G) e um sistema de membranas intracelulares semelhantes ao retículo endoplasmático (r), mitocôndria (m) e estruturas elétron-densas (*) semelhantes a vesículas com diferentes tamanhos e elétron-densidades.

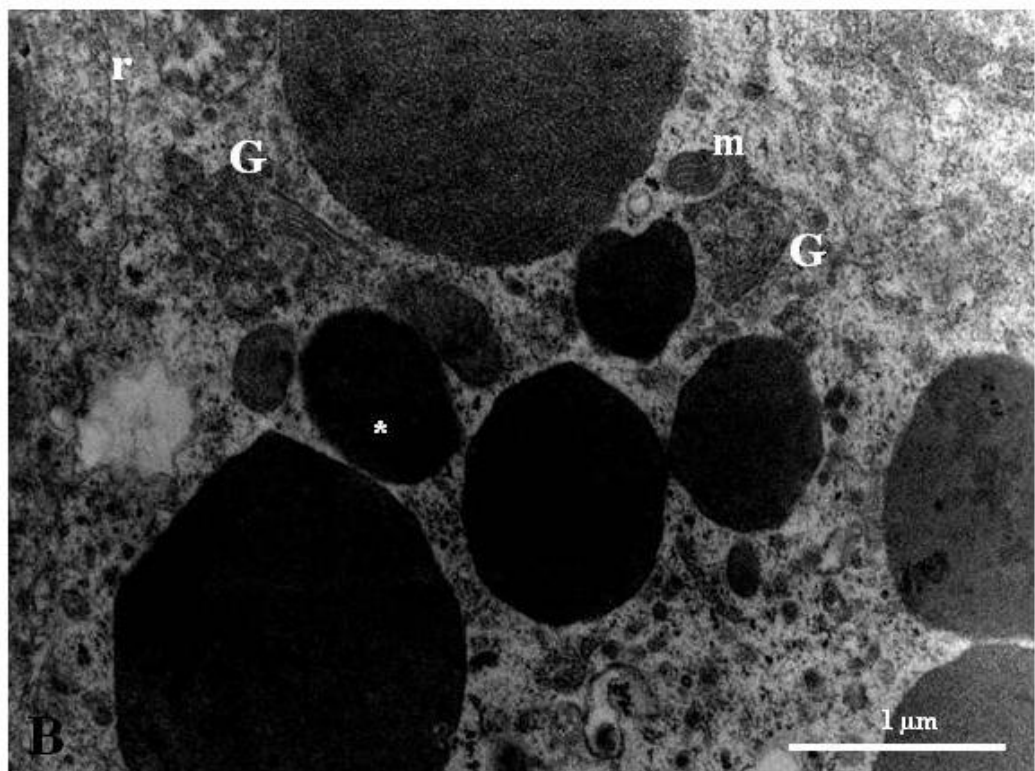
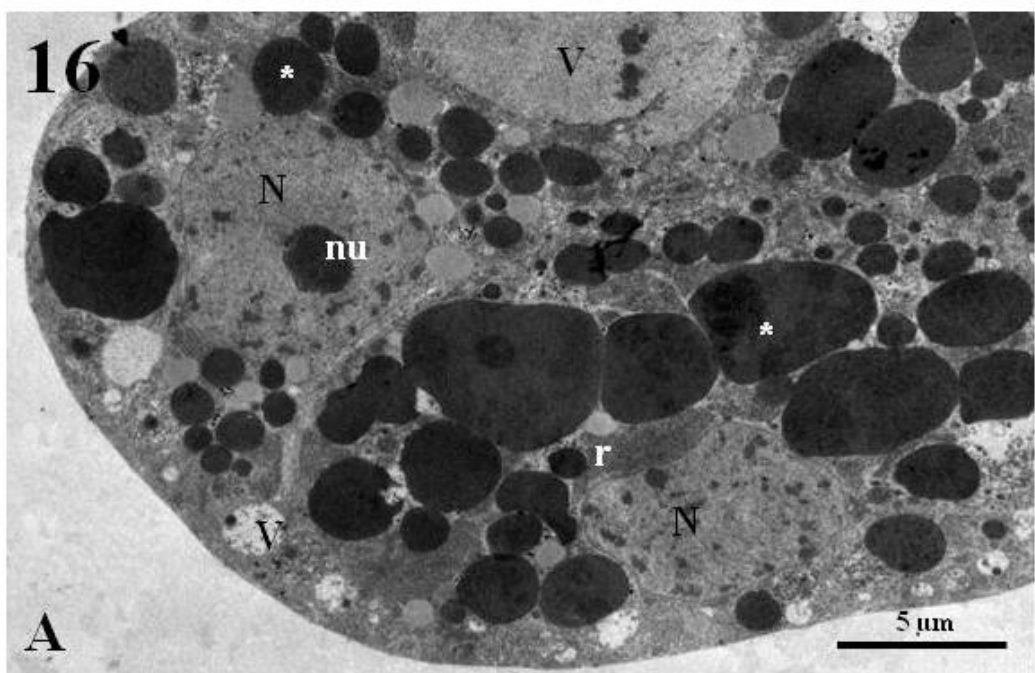


Figura 17. Micrografias eletrônicas de transmissão da célula pericardial de pupa de *Aedes aegypti*.

A. Região de transição entre núcleo (N) e citoplasma, evidenciando a membrana do envoltório nuclear (en). O nucléolo (nu) é bastante proeminente e a cromatina que prevalece é do tipo descondensada. Também é possível ver o retículo endoplasmático (r), inclusões lipídicas (i); estruturas elétron-densas (*) de vários tamanhos.

B. Região de contato (setas) entre a célula pericardial (p) e uma ramificação da fibra alar (a). Aparentemente não há estruturas de membrana especializadas, como por exemplo, junções. No citoplasma da célula pericardial é possível ver estruturas semelhantes a vacúolos (v). *- estruturas elétron-densas semelhantes a lisossomos.

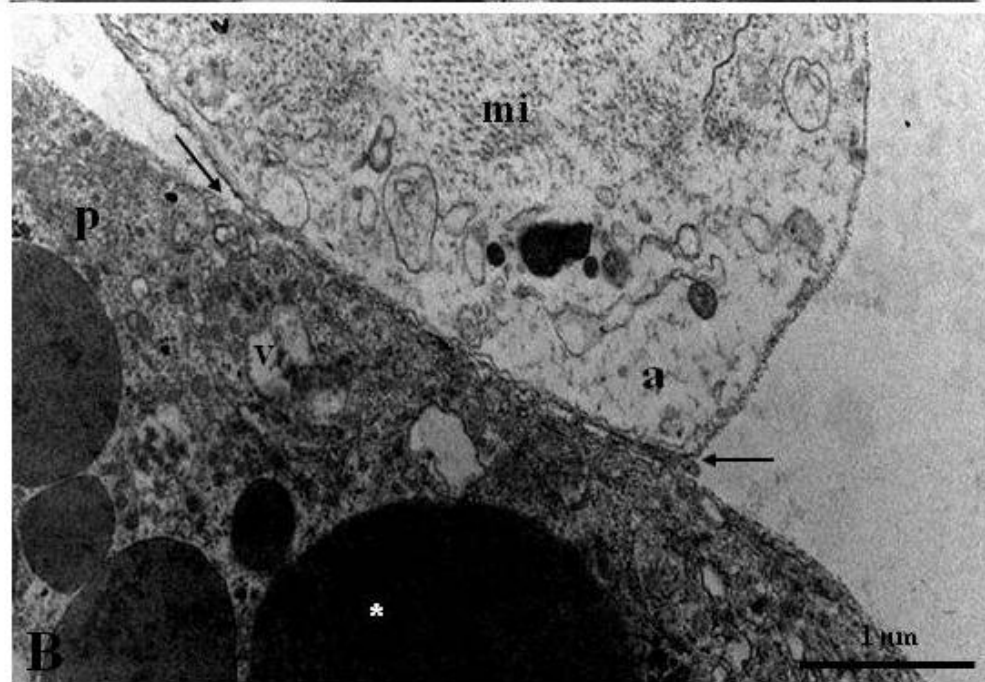
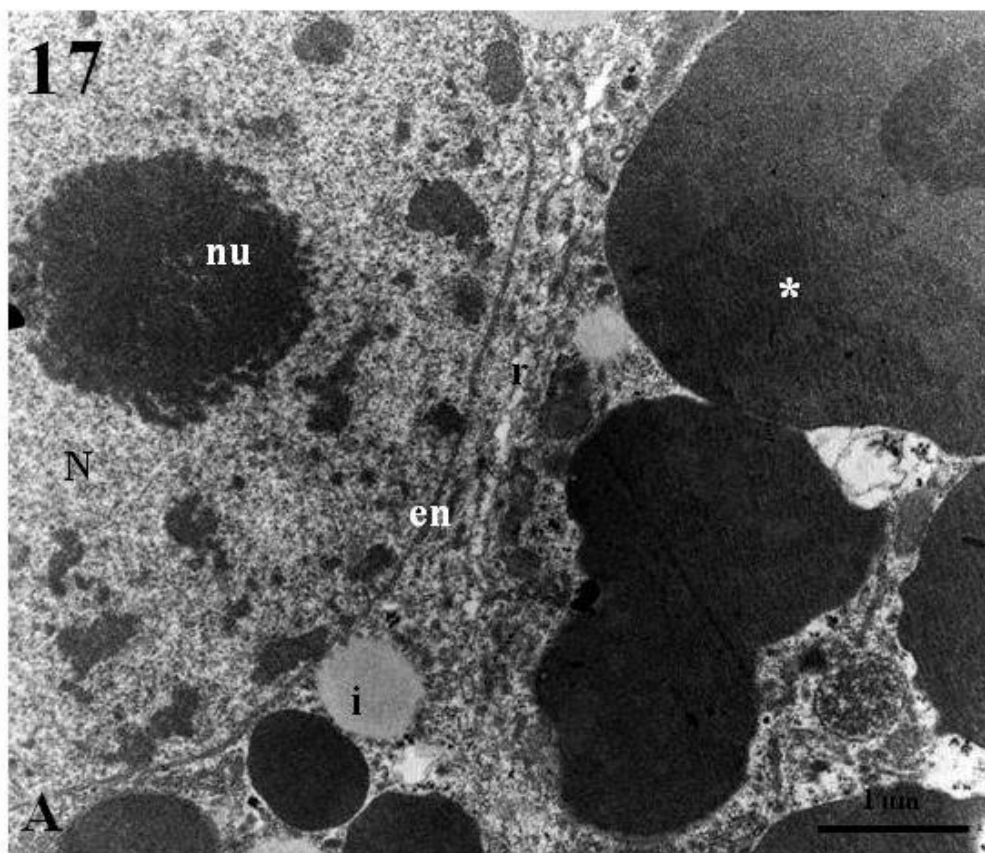


Figura 18. Micrografias eletrônicas de transmissão de células pericardiais de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

A. Visão geral da célula pericardial com mais de um núcleo (N) e nucléolo (nu) bastante evidente. Note a distribuição da cromatina condensada predominantemente periférica. Detalhe do citoplasma repleto de estruturas bastante elétron-densas (*), inclusões lipídicas (i), vacúolos (v) heterogêneos quanto ao tamanho e elétron-densidade. Notar no córtex celular a presença de invaginações (seta) da membrana citoplasmática.

B. Detalhe de transição entre o núcleo (N) e o citoplasma mostrando a membrana do envoltório nuclear (en), mitocôndrias (m) com perfil alongado e matriz elétron-densa, inclusões lipídicas (i) e estruturas elétron-densas (*).

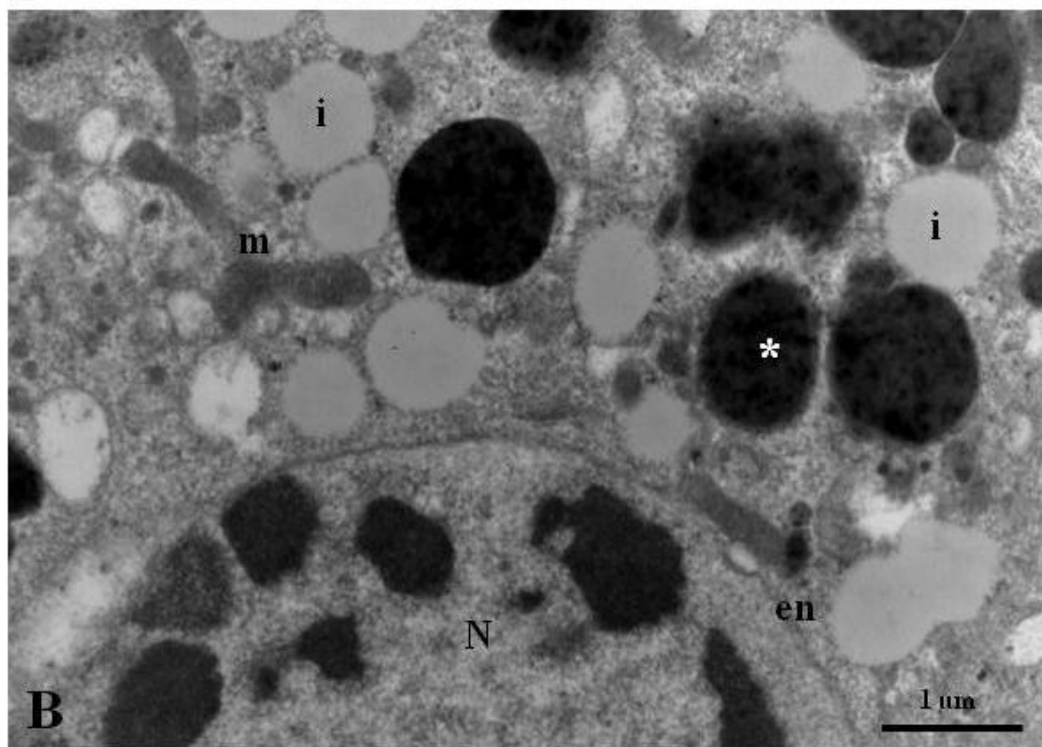
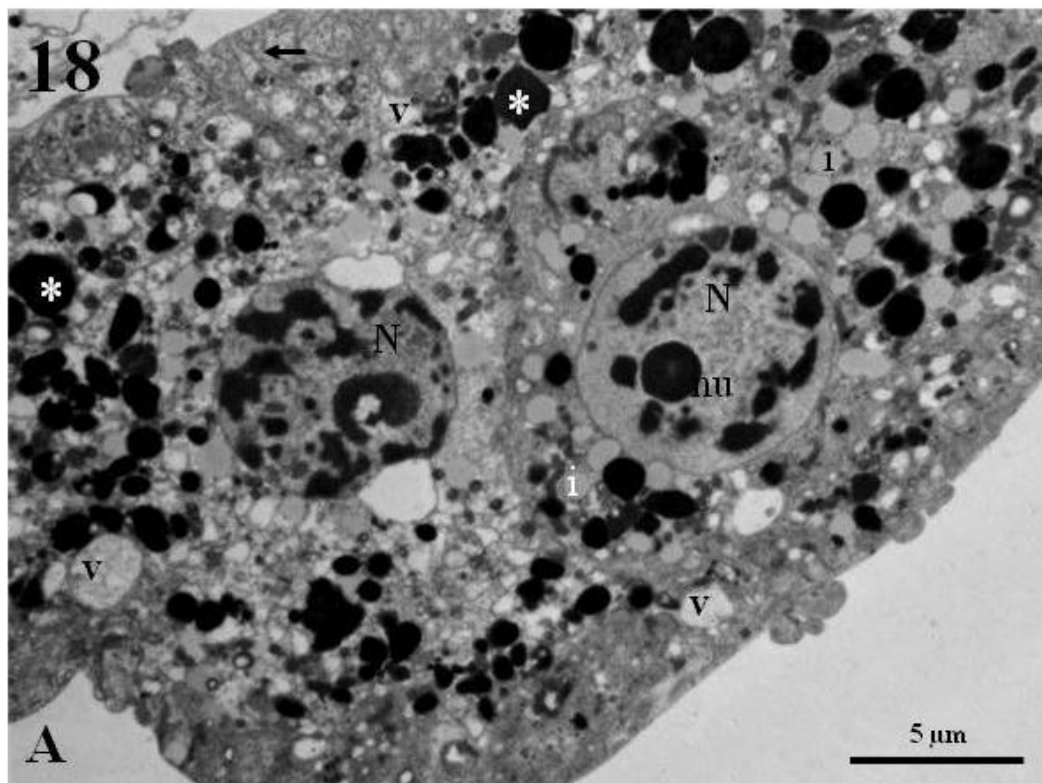
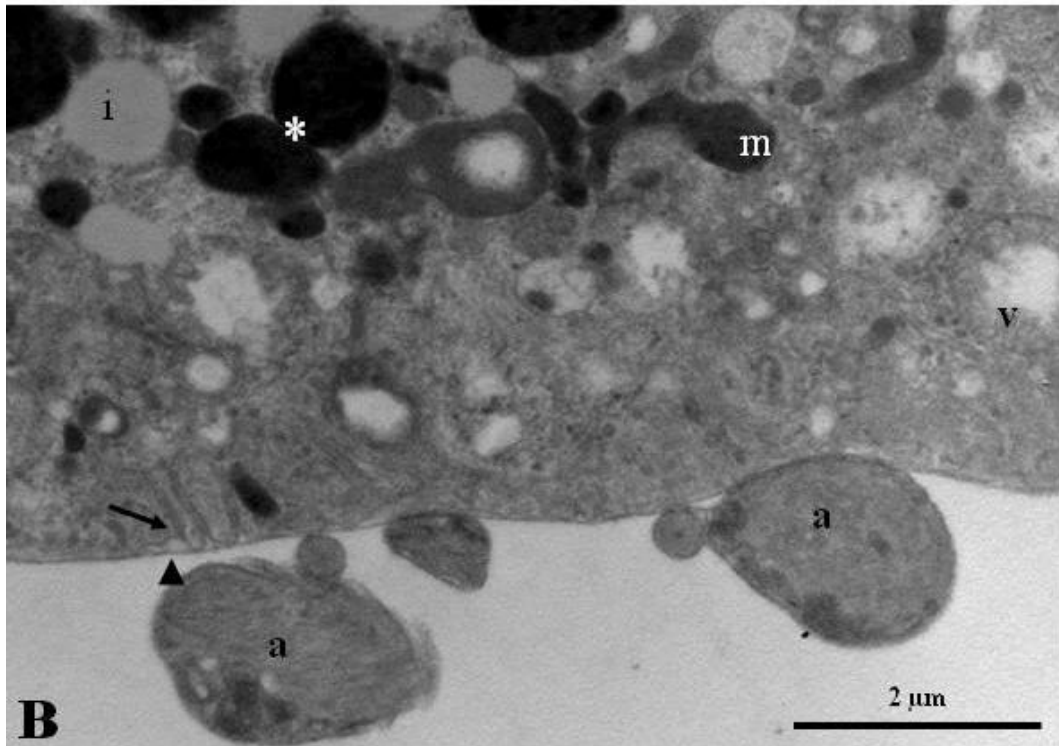
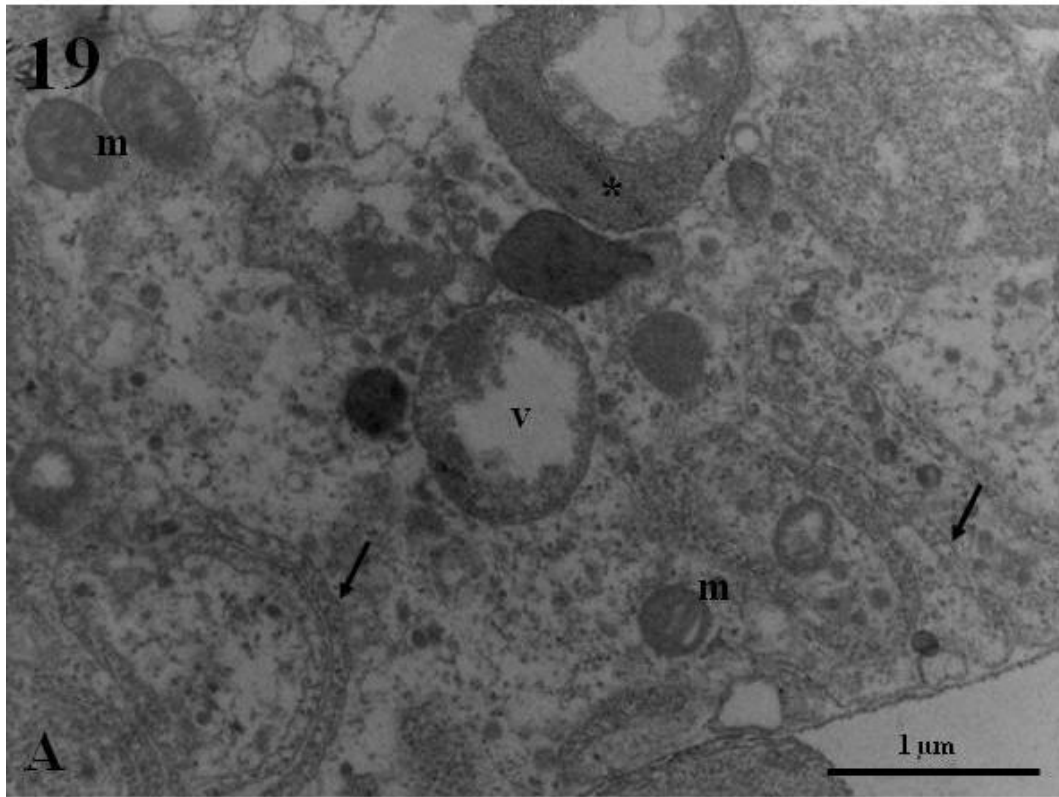


Figura 19. Micrografias eletrônicas de transmissão da célula pericardial de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*.

A. Detalhe do córtex citoplasmático com as várias invaginações (setas) da membrana citoplasmática. Note a presença de um material granular no interior das invaginações. *- possível lisossomo; m- mitocôndria; v- vacúolo.

B. Detalhe do córtex citoplasmático em contato com ramificações das fibras alares (a) com diferentes espessuras. A membrana citoplasmática apresenta várias invaginações (seta) e adjacente a ela está uma delicada lâmina basal (cabeça de seta). *- possível lisossomo; i- inclusão lipídica; m- mitocôndria.



4.6. Morfometria

As medições da área total e nuclear das células pericardiais durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. aegypti* obtidas a partir de secções histológicas estão representadas na tabela abaixo.

A área das células pericardiais da L4 é menor que nos outros estágios ($p < 0,001$), medindo $232,16 \pm 61,08 \mu\text{m}^2$, enquanto que na pupa e no adulto as áreas foram respectivamente, $345,90 \pm 91,73 \mu\text{m}^2$ e $309,69 \pm 55,12 \mu\text{m}^2$, sendo que para pupa e adulto não há diferença ($p > 0,05$). As células pericardiais das pupas apresentam área nuclear maior que os outros estágios analisados ($p < 0,001$), medindo $23,08 \pm 34,62 \mu\text{m}^2$. Em se tratando de área nuclear, não há diferença significativa entre a área nuclear das células pericardiais da L4 e do adulto ($p > 0,05$), que mediram respectivamente, $18,91 \pm 4,44 \mu\text{m}^2$; $19,54 \pm 3,34 \mu\text{m}^2$ (Tabela).

Tabela: Valores da área total e nuclear das células pericardiais durante o desenvolvimento pós-embrionário de *Aedes aegypti*.

	Área citoplasmática (μm^2) (média $\pm$ desvio padrão)	Área nuclear (μm^2) (média $\pm$ desvio padrão)
L4 (n=30)	$232,16 \pm 61,08^a$	$18,91 \pm 4,44^b$
Pupa (n=30)	$345,90 \pm 91,73^b$	$23,08 \pm 34,62^a$
Fêmeas adultas (n=30)	$309,69 \pm 55,12^b$	$19,54 \pm 3,34^b$

N- número ou quantidade. Resultados expressos em Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes minúsculas diferem pelo teste de Turkey a 5% de significância.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho constitui a primeira descrição de aspectos morfológicos gerais e ultra-estruturais do coração de *A. aegypti* durante o desenvolvimento pós-embrionário (incluindo L4, pupa e adulto) usando uma combinação de diferentes microscopias.

A organização, morfologia e composição do coração dessa espécie de mosquito apresenta várias semelhanças com os de outros insetos. Nesse sentido, temos que em todas as fases estudadas, o coração de *A. aegypti* consiste de um vaso longitudinal mediano-dorsal localizado diretamente abaixo do tegumento e que apresenta grupos de células pericardiais e fibras alares como descrito em adultos de diferentes insetos, como por exemplo, *D. melanogaster* (CURTIS et al., 1999), *Stomox calcitrans* (Diptera) (COOK & MEOLA, 1983), *Rhodnius prolixus* (Heteroptera) (CHIANG et al., 1990), *An. gambiae* (GLENN et al., 2010; ANDERECK et al., 2010) e outras espécies de mosquitos de importância médica, incluindo *A. aegypti* (MARTINS et al., 2011). Assim como nesses insetos, o coração de *Ae. aegypti* é um tubo que se estende até ao oitavo segmento abdominal e se associa a aorta na junção torácico-abdominal. Também corroborando esses autores, nossos resultados mostraram que mesmo após a metamorfose quando ocorre atrofiamento do oitavo segmento abdominal, o coração *A. aegypti* percorre todo o abdômen.

A musculatura cardíaca possui orientação helicoidal que foi bem descrita em larva, pupa e adulto de *An. quadrimaculatus* (JONES, 1954) e em larva e adulto de *D. melanogaster* (ALAYARIN et al., 2009). Como nesses insetos, em *A. aegypti*, a orientação em espiral da musculatura cardíaca também é mantida ao longo do desenvolvimento pós-embrionário. Essa musculatura forma a parede do coração que é constituída por uma única camada de músculo com fibras estriadas transversalmente.

A marcação para citoesqueleto confirma que o coração de L4, pupas e adultos de *A. aegypti* é formado por uma única camada de células musculares estriadas como observado para insetos em geral como, por exemplo, *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968), *A. strepens* (BACCETTI & BIGLIARDI, 1969), *S. calcitrans* (COOK & MEOLA, 1983), *D. melanogaster* (CURTIS et al., 1999) e *P. terraenovae* (ANGIOY et al., 1999). Na MCVL as fibras que compõem o músculo cardíaco de *A. aegypti* podem ser vistas de forma individualizadas e os espaços observados entre as fibras provavelmente é um artefato em consequência das contrações cardíacas em

conjunto com tensão criada pelas fibras alares, que aumenta e diminui o espaço entre as fibras no momento da fixação (GLENN et al., 2010).

O coração de *A. aegypti* é dividido em câmaras ou compartimentos, que segundo a literatura são separados por estreitamentos coincidentes com o par de ostia como descrito em diferentes insetos como, por exemplo, *S. calcitrans* (COOK & MEOLA, 1983), *P. terraenovae* (ANGIOY et al., 1999) e *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006). Devido a presença das ostia cada câmara se comunica com a hemocele (ANGIOY et al., 1999) uma vez que a hemolinfa entra no coração através das ostia.

Nas L4 e pupa de *A. aegypti* as ostia são aberturas simples, que segundo KLOWDEN (2007) permitem a entrada da hemolinfa durante a diástole, mas evita a sua saída durante a sístole. Exclusivamente nas fêmeas adultas de *A. aegypti*, a presença de válvulas nas regiões de ostia sugere que essas estruturas tem a função impedir o retorno da hemolinfa entre as câmaras cardíacas durante a sístole, portanto, essas ostia são do tipo “incurrents”, como observado em adultos de *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006) e *An. gambiae* (GLENN et al., 2010). Em L4 e pupa de *A. aegypti* não foi observada a presença de válvulas no coração, isso sugere que o movimento da hemolinfa ocorre unicamente em função do gradiente de pressão entre uma câmara e outra (ANGIOY et al., 1999). No adulto a presença de válvulas evita o refluxo da hemolinfa na sístole tornando o transporte mais eficiente, permitindo, por exemplo, que as asas inflem logo após a emergência e evitando o aquecimento excessivo dos músculos do voo (KLOWDEN, 2007).

A hemolinfa entra no coração através das ostia, uma vez no coração, a hemolinfa é impulsionada por contrações peristálticas. As contrações do coração são reguladas de forma autônoma ou miogênica, no entanto, elas podem ser influenciadas por nervos e estímulos endócrinos, como observado no coração de adulto de *D. melanogaster* (revisado por KLOWDEN, 2007). Entretanto no presente trabalho não foi observada a presença de processos nervosos no coração de *A. aegypti*, isso sugere que o coração de *A. aegypti* é regulado de forma autônoma, como descrito em adulto de *H. cecropia* (SANGER & MACCAN., 1968).

Outra observação a pontuar sobre mudanças no coração de *A. aegypti* é a perda do aspecto enrugado da superfície do órgão nas fases jovens. Nos adultos o coração adquire uma superfície com sulcos que acompanham as ramificações as fibras alares. Nos corações de L4 e pupa o enrugamento pode ser um artefato ocasionado pela

contração do órgão durante a fixação por glutaraldeído, o que seria amenizado no coração dos adultos por eles terem paredes mais resistentes.

Em todos os grupos analisados, não foi observada a presença de discos intercalares entre as fibras cardíacas, similar ao descrito em *S. postica* onde a lâmina basal, além de unir as células musculares, facilita a propagação do estímulo nervoso (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006). Em *A. strepens* também não foi observada a presença de discos intercalares entre as fibras cardíacas, entretanto, foram visualizadas camadas de tecido conjuntivo revestindo internamente e externamente o coração (BACCETTI & BIGLIARDI, 1969).

SLAMA & FARKAS (2004) sugerem que as mudanças morfológicas ocorridas durante a metamorfose do coração *D. melanogaster* podem ser responsáveis pelo novo padrão de batimentos cardíacos após a mudança de estágio. Aqui vimos que a parede do coração de *A. aegypti* é formada por uma camada de músculo estriado com espessura que varia ao longo do desenvolvimento, no entanto não sabemos se essa mudança influencia o padrão de batimentos cardíacos de *A. aegypti*, sendo isso algo interessante para ser investigado no futuro.

Em todas as fases de *A. aegypti* analisadas, a membrana citoplasmática das fibras musculares cardíacas apresentam invaginações que originam os túbulos T. Essa característica também foi descrita em *D. melanogaster* (MEDIONI et al., 2009) e acredita-se que essas formações e associações da membrana permitem que o estímulo nervoso chegue até o centro da fibra muscular, resultando em contração mais rápida e uniforme do órgão (CURTIS et al., 1999).

Em cortes longitudinais das fibras musculares cardíacas, os sarcômeros são separados pelas linhas Z que parecem linhas descontínuas, sendo essa disposição muito comum nos músculos estriados de invertebrados e permite que os miofilamentos passem pelas regiões descontínuas das linhas Z, resultando em maior força de contração (SANGER & MACCAN, 1968).

As fibras musculares que compõe a parede do coração possuem núcleos geralmente localizados na periferia do citoplasma das mesmas e se projetam para superfície externa do órgão. Essa também parece ser uma característica que não pode ser generalizada para o grupo dos insetos, visto que em *P. terraenovae* (ANGIOY et al., 1999) e *B. germanica* foi observado que os núcleos das células cardíacas estão geralmente voltados para o lúmen do coração (EDWARDS & CHALLICE, 1960). Os núcleos das fibras cardíacas de *A. aegypti* possuem matriz finamente granular com

cromatina dispersa e com um ou mais nucléolos similar ao observado em *B. germanica* (EDWARDS & CHALLICE, 1960).

Em *Calpodes sp.* e *Rhodnius sp.* as fibras cardíacas supostamente secretam proteínas para a hemolinfa. Isso pôde ser inferido pelo fato dessas fibras apresentarem complexos de Golgi, RER e vesículas com material denso em grande quantidade (LOCKE, 1989). Em nossas análises essas organelas não foram observadas nessas células e da mesma forma em *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968) e *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006), enquanto que as mitocôndrias foram as únicas organelas claramente visualizadas na periferia da fibra. As mesmas se agrupam no interior das invaginações da membrana citoplasmática, seguindo o mesmo padrão observado em *B. germanica* (EDWARDS & CHALLICE, 1960), *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968) e *P. terraenovae* (ANGIOY et al., 1999).

CURTIS et al. (1999) descreveram varias modificações que ocorrem no coração de *D. melanogaster* durante a metamorfose, entre elas o surgimento de uma camada de músculo estriado na superfície ventral do coração. Entretanto em nossas análises não observamos o surgimento dessa estrutura no coração do adulto, similar ao descrito em *An. quadrimaculatus* (JONES, 1954) e *An. gambiae* (ANDERECK et al., 2010; GLENN et al., 2010). Apesar dessas diferenças vistas através das análises feitas em diferentes microscópios, nenhuma evidencia foi encontrada de maneira a confirmar que o coração de *A. aegypti* e suas células associadas foram reconstruídos ou drasticamente modificado durante a metamorfose como é o caso do corpo gorduroso (MARTINS, 2008). Sendo assim, nossos resultados corroboram com os achados de outros autores ao analisarem insetos holometábolos como os dípteros *An. quadrimaculatus* (JONES, 1954) e *D. melanogaster* (MEDION et al., 2009).

Em relação as fibras alares foi visto que em *A. aegypti* elas estão presentes nas interseções entre os segmentos abdominais e se ramificam a medida que se aproximam do coração similar ao descrito em adultos de *R. prolixus* (CHIANG et al., 1990) e de *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968). Em *A. aegypti* foi observado que as fibras alares apresentam citoplasma fracamente acidófilo e possuem vários núcleos, essas características corroboram os resultados de SANGER & MCCANN (1968) que mostraram que a ultraestrutura das fibras alares de *H. cecropia* são polinucleadas.

A marcação por TOPRO-3 confirma a presença de vários núcleos com localização preferencialmente periférica no citoplasma das fibras alares, o que parece também não ser regra para os insetos em geral. Por exemplo, em *P. americana* foi

observado que o núcleo dessas fibras geralmente ocupa a periferia da fibra, mas podem também estar presentes na região central (ADAMS et al., 1973).

A MCVL revelou que as fibras alares de *A. aegypti* apresentam um padrão de estrias transversais ao longo das ramificações das fibras alares similar ao visto em adultos de *An. gambiae* (ANDERECK et al., 2010; GLENN et al., 2010). Foi observado também em adultos de *H. cecropia* que as fibras alares facilitam a diástole por puxarem a parede do coração, entretanto elas não são essenciais para a sístole, uma vez que isoladas do coração, o mesmo continua contraindo (SANGER & MCCANN, 1968). A MEV confirmou os resultados obtidos pela MCVL mostrando que as fibras alares de *A. aegypti* possuem aspecto estriado e que nesse caso as regiões de estriamento transversal se manifestam através de ondulações, mas à medida que essas fibras se ramificam essas ondulações se tornam menos evidentes.

Uma característica importante observada foi que as fibras alares persistem ao longo do desenvolvimento de *A. aegypti* e as mesmas se ramificam e se espalham sobre a superfície do coração como descrito em adultos de *An. gambiae* por (GLENN et al., 2010) e em seis espécies de mosquitos adultos (*Ae. albopictus*, *A. aegypti*, *Ae. fluviatilis*, *C. quinquefasciatus*, *An. darlingi* e *An. aquasalis*) por MARTINS et al. (2011). A manutenção das fibras alares ao longo do desenvolvimento pode estar associada a importância delas para a fisiologia do coração dos insetos, pois segundo LABEAU et al. (2010), além de sustentar o coração na cavidade, as fibras alares ajudam a movimentar a hemolinfa, facilitando a entrada da mesma durante o relaxamento do coração.

Segundo CURTIS et al. (1999) as fibras alares nas pupas de *D. melanogaster* são responsáveis também pela abertura das ostia durante a diástole, pois foi observado que essas estruturas assumem uma posição fechada na ausência de tensão das fibras alares. Em adultos de *R. prolixus* foi observado a existência de fibras alares de diferentes tamanhos, sendo que as fibras alares que auxiliam a expansão do coração são mais desenvolvidas (CHIANG et al., 1990). Considerando que o desenvolvimento das fibras alares pode estar relacionado à sua atividade de bombeamento da hemolinfa, é razoável propor que o tamanho da ramificação da fibra alar de *A. aegypti* reflète sua atividade. Nesse sentido, considerando que as fibras alares auxiliam o relaxamento do coração para promover a entrada da hemolinfa no interior do vaso, é provável que a atividade dessas fibras seja mais intensa nos adultos alados que necessitam de um fluxo maior e mais eficiente da hemolinfa (KLOWDEN, 2007). Além de fibras alares mais desenvolvidas, o coração dos adultos também tem uma parede mais resistente e que

suporta uma maior tensão promovida pela atividade das fibras alares e/ou até mesmo para um maior bombeamento de hemolinfa no adulto.

Em *H. cecropia* foi observada através de microscopia eletrônica que as ramificações das fibras alares aderem ao músculo cardíaco através de uma junção composta de desmossomos e junção interfibrilar (SANGER & MCCANN, 1968). No presente trabalho nenhum tipo de junção especializada foi observada entre as ramificações das fibras alares e o músculo cardíaco de *A. aegypti*. A ausência de junções pode se explicada pelo fato de ambas estruturas estarem envolvidas por lâminas basais.

As ramificações das fibras alares de adultos de *H. cecropia* estão orientadas em camadas; a primeira delas é paralela ao coração e derivada da segunda camada que é composta de fibras perpendiculares, sendo que algumas dessas fibras formam a camada mais ventral enquanto outras continuam dorsalmente e formam uma terceira camada (SANGER & MCCANN, 1968). Apesar dessa subdivisão não ser clara em *A. aegypti*, a presença de sulcos dispostos longitudinalmente na superfície ventral do coração de fêmeas adultas de *A. aegypti* provavelmente reflete disposição das ramificações das fibras alares como visualizado através das análises da MCVL e MEV, de maneira que as mesmas se estendem pela superfície do órgão indo ao encontro das ramificações de células pertencentes a grupos vizinhos. Esses resultados corroboram as observações de ANDERECK et al. (2010) que mostraram em *An. gambiae* que as ramificações das fibras alares se espalham sobre o coração e se juntam as ramificações de fibras alares provenientes de um segmento abdominal adjacente. Essas ramificações fornecem um local de abrigo para as células pericardiais de maneira a formar um arcabouço semelhante a uma cesta de basquete onde as células estão abraçadas (MARTINS et al., 2011).

Externa e lateralmente associadas ao coração de *A. aegypti* além das fibras alares se observa a presença das células pericardiais. Nas montagens totais se observa que as células pericardiais de L4, pupa e fêmeas adultas de *A. aegypti* possuem formato oval e um padrão de organização em número de oito por segmento. Como observado por PAL (1944), em *Culex fatigans*, *A. aegypti* e *Anopheles stephensi*, para cada região entre segmentos abdominais existem quatro pares de células pericardiais, sendo que em *C. fatigans* havia 64 células no total. Por outro lado, de acordo com esse mesmo autor, entre o sétimo e o oitavo segmento abdominal de *An. stephensi* e *A. aegypti* foram observadas algumas variações no número de células, sendo que em *A. aegypti* o último grupo é composto por dois ou três pares de células (nunca quatro). De acordo com

contagem de células pericardiais no órgão isolado, existem 64 células em L4, pupa e adulto de *A. aegypti*. Apesar disso, não foi possível determinar com acurácia o número de células pericardiais tanto na região de transição com o tórax, como no último segmento abdominal. Isso porque durante a dissecação algumas vezes as extremidades do órgão ficavam danificadas, enquanto que a presença do tegumento prejudicou a contagem das células quando o órgão era mantido com a carcaça. Segundo JONES (1954) em *An. quadrimaculatus* existem mais de 150 pares de células pericardiais sendo difícil determinar esse número com precisão, pois, muitas vezes essas células estão amontoadas, sendo difícil distingui-las isoladamente. Todavia, de acordo com Jones (1954) em *An. quadrimaculatus* elas são mais numerosas que em *A. aegypti*.

A quantidade de células pericardiais por grupo aparentemente varia bastante entre os dípteros. Diferentemente dos mosquitos, em *D. melanogaster* as células pericardiais formam fileiras de 20-25 células ao redor do coração e se estendem do primeiro ao sexto segmento abdominal (MILLER, 1950). Portanto, essas observações sugerem que existem variações em relação ao número e ao arranjo de células pericardiais não só entre diferentes espécies de mosquitos, mas também entre os diferentes gêneros de Diptera.

As células pericardiais de *A. aegypti* observadas através das montagens totais apresentam componentes citoplasmáticos de cor marrom clara. Enquanto que nas secções histológicas coradas com HE foi observado que esses componentes correspondem a inclusões citoplasmáticas de formato esférico e cor marrom ou preta, similar ao observado em *An. quadrimaculatus* (JONES, 1954). De acordo com BUZZI & MIYAZAKI, (1999) essas células podem apresentar pigmentos no citoplasma que variam em coloração e a presença deles é devido a essas células terem como principal função a absorção e o armazenamento de substâncias a partir da hemolinfa (BUZZI & MIYAZAKI, 1999). Essa função também é relatada por diversos autores em diferentes artrópodes como *Dermacentor variabilis* (Arachnida) (COONS et al., 1988), *D. melanogaster* (MILLS & KING, 1965) e *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968).

Além das células pericardiais e fibras alares, outras células foram frequentemente encontradas associadas na luz do vaso ou aderidas à parede do coração de *A. aegypti*. Essas são consideradas hemócitos, pois segundo revisado por KLOWDEN (2007) os hemócitos são encontrados em suspensão na hemolinfa, mas podem ser encontrados aderidos a outros tecidos do corpo como, por exemplo, o vaso dorsal.

Em todas as fases aqui estudadas as células pericardiais apresentaram marcação fraca para actina provavelmente devido ao plano focal. No entanto, WEAVERS et al. (2009) sugerem que as dobras da membrana das células pericardiais de *Drosophila* são estabilizadas por proteínas que interagem com o citoesqueleto de actina resultando na formação de diafragmas na região cortical. Porém, no caso de *A. aegypti*, essas estruturas nem mesmo foram observadas através da MET, sugerindo que provavelmente essas estruturas são restritas a certas espécies de insetos.

CURTIS et al. (1999) observaram através de MEV que as células pericardiais em pupa e adulto de *D. melanogaster* apresentam superfície lisa e estão aderidas ao coração por meio de tecido chamado de conjuntivo pelo autor. Nas nossas análises, as células pericardiais das fêmeas adultas de *A. aegypti* apresentam superfície irregular em comparação as fases jovens. Provavelmente as fibras alares mais desenvolvidas e ramificadas presentes nessa fase do desenvolvimento exercem pressão que resultam em deformidades na superfície das células pericardiais (MARTINS et al., 2011).

As células pericardiais já foram estudadas através de ML, MET em vários insetos incluindo *An. quadrimaculatus* (JONES, 1954), *D. melanogaster* (MILLS & KING, 1965), *H. cecropia* (SANGER & MACCAN, 1968), *L. migratoria*, *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (BREHÉLIN & HOFFMANN, 1980), *A. mellifera* (CRUZ-LANDIM, 1981) e *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006). Algumas características observadas nesses trabalhos são compartilhadas com as células pericardiais de *A. aegypti*. Entre elas, a presença de uma região cortical com canais e vesículas endocíticas e região interna com vesículas elétron-densas e vacúolos de elétron-densidade variável. Além disso, nenhuma junção especializada foi observada entre células pericardiais, músculo cardíaco e/ou fibras alares, com descrito em um estudo feito em pupa e adulto de *D. melanogaster* (CURTIS et al., 1999).

As células pericardiais apresentam características peculiares como, por exemplo, a presença de uma membrana citoplasmática repleta de dobras ou invaginações no córtex celular que também foram observadas em outros insetos (JONES, 1954; CRUZ-LANDIM, 1981; POIANI & CRUZ-LANDIM, 2006). Considerando que a existência de invaginações na membrana das células pericardiais aumenta a superfície total, esse fato facilitaria a captação de compostos da hemolinfa (DENHOLM & SKAER, 2009).

A presença de vesículas revestidas no córtex das células pericardiais de *A. aegypti* também ocorre em *D. melanogaster*, de maneira que partículas são sequestradas pelas invaginações da membrana citoplasmática e em seguida internalizadas mediante a

formação dessas vesículas (MILLS & KING, 1965) *H. cecropia* (SANGER & MCCANN, 1968). Nesse modelo proposto para *D. melanogaster* as vesículas endocíticas das células pericardiais combinam-se com enzimas produzidas no RER dando origem aos vacúolos semelhantes a lisossomos (MILLS & KING, 1965). Apesar da ultraestrutura mostrar a presença de organelas que estão presentes nos eventos de endocitose, a ocorrência deles ainda precisa ser investigada em *A. aegypti*. Acredita-se que a presença de RER nas células pericardiais de *S. postica* forneça a essas células a capacidade de produzir proteínas lisossomais e isso é sustentado pela presença de vesículas elétrons-densas que se assemelham a lisossomos de tamanho médio e pequeno na região central do citoplasma (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2007). Essas estruturas se assemelham às observadas em nosso estudo e essa semelhança abre as portas para que futuras investigações sejam feitas para confirmar a existência de proteínas lisossomais nessas vesículas (como fosfatase ácida).

Segundo POIANI & CRUZ-LANDIM (2007) as inclusões citoplasmáticas elétrons-densas podem consistir de materiais armazenados na célula pericardial para serem inativados. Considerando que durante a metamorfose ocorrem grandes transformações que envolvem mudanças morfofisiológicas e comportamentais dos insetos holometábolos, o armazenamento de substâncias absorvidas a partir da hemolinfa nessa fase poderia explicar o fato das células pericardiais das pupas de *A. aegypti* apresentarem inclusões citoplasmáticas elétrons-densas maiores e mais abundantes que os demais estágios.

Considerando esse suposto papel das células pericardiais na homeostase dos insetos, foi demonstrado que as mesmas em *D. melanogaster* transformam certos componentes tóxicos presentes em suspensão na hemolinfa em moléculas solúveis não tóxicas que são liberados para serem eliminados pelos túbulos de Malpighi (MILLS & KING, 1965). Além disso, a transformação de substâncias tóxicas em não tóxicas relatada em várias espécies de insetos, constitui um importante mecanismo de resistência a inseticidas (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Mais uma vez, o estudo mais aprofundado dessas células poderá contribuir de maneira significativa para compreendermos a biologia dos insetos.

Sabe-se que o vacúolo com atividade lisossomal é transformado em corpos residuais elétrons-densos uma vez que a digestão é finalizada nas células pericardiais (MILLS & KING, 1965). Nesse sentido, o aumento de inclusões citoplasmáticas nas células pericardiais de *A. aegypti* pode ser considerado similar ao observado durante o

envelhecimento de *S. postica* (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2007). Portanto, o aumento de inclusões citoplasmáticas nas células pericardiais ao longo do desenvolvimento pós-embrionário do mosquito pode consistir de materiais armazenados para serem inativados e também devido ao acúmulo de corpos residuais resultantes da digestão intracelular (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2007).

As células pericardiais têm sido associadas a outras funções. BREHBLIN & HOFFMANN (1979) demonstraram que parte das partículas de ferro injetadas na hemolinfa de *Locusta* foram capturadas pelas células pericardiais. Posteriormente essa substância foi observada no interior do RER da mesma, levantando a questão se isso está relacionado a função de desintoxicação ou se alternativamente, com a síntese de heteroproteínas que contém átomos de ferro presentes em grande quantidade. Pelo visto, o possível papel das células pericardiais na eliminação de substâncias tóxicas e na manutenção da homeostase tem sido também apontado por outros autores. Entretanto, até o momento, o papel das células pericardiais parece está restrito ao discutido anteriormente. Isso porque DAS et al. (2008) observaram em *D. melanogaster* que taxa de batimentos cardíacos permaneceu normal na ausência dessas células, demonstrando que as mesmas não secretam moléculas capazes de modular a função cardíaca em condições de laboratório. Apesar dessa suposta independência do coração em relação às células pericardiais a sua influência direta para o funcionamento do coração é outro campo a ser explorado.

As mitocôndrias das células pericardiais são relativamente abundantes e exibem cristas desenvolvidas (MILLS & KING, 1965) e nas fêmeas adultas de *A. aegypti* é possível visualizar estruturas semelhantes a inclusões lipídicas próximas a elas. As inclusões lipídicas são observadas em fases tardias de *A. aegypti* e essa característica pode estar relacionada a capacidade dessas células de capturar e até mesmo armazenar e metabolizar compostos da hemolinfa (POIANI & CRUZ-LANDIM, 2007).

Em *A. aegypti*, a área citoplasmática das células pericardiais de L4 é menor que nos outros estágios, não havendo diferença significativa entre pupa e adulto. Nas fases mais tardias foi observado que o citoplasma das células pericardiais aumenta e passa a conter mais organelas e inclusões citoplasmáticas. Provavelmente o maior aumento se deve ao armazenamento de conteúdo ainda desconhecido no interior do citoplasma dessas células ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, principalmente devido ao desenvolvimento de estruturas elétron-densas semelhantes a lisossomos. De acordo com os nossos resultados, o diâmetro nuclear das células pericardiais de *A. aegypti* também

varia com a idade. Considerando que a síntese de proteínas pode estar relacionada com o desenvolvimento nuclear, como descrito para o corpo gorduroso de *A. aegypti* (MARTINS, 2008) é razoável propor que o aumento do diâmetro nuclear das células pericardiais na pupa possa estar relacionado ao aumento da síntese de proteínas pelas mesmas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O coração de *A. aegypti* foi estudado pela primeira vez considerando aspectos morfológicos e ultra-estruturais durante o desenvolvimento pós-embrionário. Esse estudo fornece a base para que sejam feitas futuras investigações, uma vez que a compreensão do desenvolvimento do coração de *A. aegypti* requer além de uma detalhada descrição e identificação de todos os tipos de células bem como a elucidação dos mecanismos celulares e genéticos que regulam o desenvolvimento do órgão.

Aqui também foram apontadas algumas modificações durante o desenvolvimento pós-embrionário do coração de *A. aegypti*. Entre essas mudanças vimos a variação da espessura da parede do órgão, o surgimento de válvulas, o surgimento do aspecto enrugado da superfície do coração e a presença de fibras alares bem desenvolvidas sobre a superfície do coração das fêmeas adultas. Apesar dessas mudanças, elas não representam uma drástica mudança ou reconstrução do coração durante a metamorfose do mosquito. Porém, como essas modificações podem alterar aspectos funcionais do coração, por exemplo, a frequência de batimentos e a quantidade de hemolinfa bombeada, é algo que precisa ainda ser investigado.

Por outro lado, as células pericardiais de *A. aegypti* sofrem mudanças em função do desenvolvimento. Isso porque foi observado que nas fases mais tardias, isto é em pupas e adultos jovens, o citoplasma das células pericardiais aumenta e passa a conter mais organelas e inclusões citoplasmáticas. Se uma quantidade maior de conteúdo armazenado nessas células é o resultado de atividade endocítica e de posterior digestão intracelular são outros aspectos dessas células que merecem ser estudados adiante através da utilização de microinjeções de partículas de látex, substâncias tóxicas ou corantes diretamente na hemolinfa seguido de técnicas de citoquímicas. Isso poderá abrir as portas para um melhor esclarecimento sobre o papel dessas células na manutenção da homeostase e como coadjuvantes do sistema imune dos mosquitos.

A caracterização do coração e de estruturas associadas (fibras alares e células pericardiais) durante o desenvolvimento pós-embrionário representa uma contribuição

importante para o entendimento da biologia do *A. aegypti*, uma vez que o coração promove o movimento da hemolinfa que é responsável pelo transporte de nutrientes, de produtos de excreção e de hormônios e possibilita a comunicação química entre os diferentes órgãos, além de participar do transporte de substâncias que participam direta e indiretamente da resposta imune humoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS M.; MILLER T.; THOMSON W. Fine structure of the alary muscles of the american cockroach. **Journal Insect Physiology**, 19:2199-2207. 1973.

ALAYARI N.; VOGLER G.; TAGHLI-LAMALLEM O.; OCORR K.; BODMER R.; CAMMARATO A. Fluorescent labeling of *Drosophila* heart structures. **Journal of Visualized Experiments**, 1-4. 2009. doi: 10.3791/1423.

ANGIOY AM.; BOASSA D.; DULCIS D. Functional morphology of the dorsal vessel in the adult fly *Protophormia terraenovae* (Diptera, Calliphoridae). **Journal of Morphology**, 240 (1) :15-31. 1999.

ANDERECK JW.; KING JG.; HILLYER JF. Contraction of the ventral abdomen potentiates extracardiac retrograde hemolymph propulsion in the mosquito hemocoel. **Plos One**, 5. 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012943

BACCETTI B.; BIGLIARDI E. Studies on the fine structure of the dorsal vessel of Arthropods. **Zeitschrf Zellforsch**, 99:13-24. 1969.

BREHBLIN M.; HOFFMANN J. Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*: study of ultrastructure and clearance. **Journal Insect Physiology**, vol. 26:103-111. 1980.

BUZZI Z.; MIYAZAKI R. *Entomologia didática*. 3.ed. Curitiba: Ed. da UFPR.1999.

CONSOLI R.; OLIVEIRA L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 225. 1994.

CORREIA A.; FERREIRA A.; TEIXEIRA A.; TEIXEIRA V. Descrição histológica do coração do gafanhoto *Tropidacris Collaris* (STOLL,1813) (ORTHOPTERA: ROMALEIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, 72:41-44. 2005.

COOK B.; MEOLA S. Heart structure and beat in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Physiological Entomology**, 8:139-149. 1983.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Dengue/>>. Acessado em: 10/01/2011.

CHAPMAN RF. *The Insects: structure and function*. 4.ed. London, English Press. 420. 1998.

CHARTIER A.; ZAFFRAN S.; ASTIER M.; SÉMÉRIVA M.; GRATECOS D. Pericardin, a *Drosophila* type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. **Development**, 129:3241-3253. 2002.

CHIANG R.; CHIANG J.; DAVEY K. Morphology of dorsal vessel in the abdomen of the blood-feeding Insect *Rhodnius prolixus*. **Journal of Morphology**, 204:9-23. 1990.

1.1 CLEMONS A.; HAUGEN M.; FLANNERY E.; TOMCHANEY M.; KAST K.; JACOWSKI C.; LE, C.; MORI A.; HOLLAND W.; SARRO J.; SEVERSON D.; SCHEEL M. *Aedes aegypti*: An emerging model for vector mosquito development. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2010. 10.1101.pdb141.

CRUZ-LANDIM C. Aspectos ultra-estruturais do músculo cardíaco de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 34:105-113. 1974.

CRUZ-LANDIM C. Ultra-estrutura das células pericárdicas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Naturalia**, 6:63-74. 1981.

CRUZ-LANDIM C. *Morfologia de abelhas*. Editora UNESP. 2008.

CURTIS NJ.; RINGO JM.; DOWSE HB. Morphology of the pupal heart, adult heart and associate tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **Journal of Morphology**, 240:225-235. 1999.

DAS D.; ARADHYA R.; ASHOKA D.; INAMDAR M. Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. **Cell and Tissue Research**, 331:565-570. 2008.

DENHOLM B.; SKAER H. Bringing together components of the fly renal system. **Current Opinion in Genetics & Development**, 19:526-532. 2009.

DUVE H.; ELIA A.; ORCHARD I.; JOHNSEN A.; THORPE A. The effects of CalliFMRFamides and other FMRFamide-related neuropeptides on the activity of the heart of the blowfly *Calliphora vomitoria*. **Journal Insect Physiology**, 39:31-40. 1993.

DULCIS D.; LEVINE B. Innervation of the heart of the adult fruit fly *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Comparative Neurology**, 465:560-578. 2003.

EDWARDS GA.; CHALLICE CE. The Ultrastructure of the heart of the cockroach, *Blattella germanica*. **A finals of the Entomological Society of America**, 5. 1960.

FORATTINI OP. *Culicidologia médica*. 2.ed. São Paulo. 2002.

GALLO D.; MARCHINI C.; LOPES S.; OMATO. *Entomologia agrícola*. 10d.140-141. 2002.

GLENN JD.; KING JG.; HILLYER JF. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. **The Journal of Experimental Biology**, 213:541-550. 2010.

HILLYER JF.; ESTÉVEZ-LAO TY.; FUNKHOUSER LJ.; ALUOCH VA. *Anopheles gambiae* corazonin: gene structure, expression and effect on mosquito heart physiology. **Insect Molecular Biology**, 21:343-355. 2012.

JOHNSON A.; BURNETT L.; SELLIN J.; PAULULAT A.; NEWFELD S. Defective decapentaplegic signaling results in heart overgrowth and reduced cardiac output in *Drosophila*. **Genetics**, 176:1609-1624. 2007.

JONES JC. The heart and associated tissues of *Anopheles quadrimaculatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Morphology**, 94:71-124. 1954.

KIM YJ.; SPALOVSKÁ-VALACHOVÁ I.; CHO KH.; ZITNANOVA I.; PARK Y.; ADAMS ME.; ZITNAN D. Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101:6704-6709. 2004.

KLOWDEN MJ. *Physiological Systems in Insects*. 2.ed. Academic, San Diego. 357-388. 2007.

LABEAU EM.; TRUJILLO DL.; CRIPPS RM. Bithorax Complex genes control alary muscle patterning along the cardiac tube of *Drosophila*. **Mechanisms of Development**, 126:478-486. 2010.

LOCKE, M. Secretion by insect heart muscle cells. **Journal of Insect Physiology**, 35:53-56. 1989.

MARTINS GF. O Corpo gorduroso de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera; Nematocera) (Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz. 2008.

MARTINS GF.; ORTIGÃO JMR.; PIMENTA PFP. Morphological features of the heart of six mosquito species by scanning electron microscopy. **International Journal of Tropical Insect Sciences**, 31:98-102. 2011.

MCFARLANE J. Aging in an adult insect heart. **Canadian Journal of Zoology**, 45. 1967.

MEDIONI C.; SENATORE S.; SALMAND PA.; LALEVEE N.; PERRIN L.; SEMERIVA M. The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. **Genetics & Development**, 19:518-525. 2009.

MILLER A. In *The biology of Drosophila*. New York (Wiley). 1950.

MILLS R.; KING R. The pericardial cells of *Drosophila melanogaster*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, 106:261-268. 1965.

PAL R. Nephrocytes in some culicidae-diptera. **Indian Journal Entomology**, 6:143-148. 1944.

PAPAEFTHIMIOU C.; THEOPHILIDIS G. Octopamine - a single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and

Bactrocera oleae): acceleration vs. inhibition. **Journal of Insect Physiology**, 57:316-325. 2011.

POIANI S.; CRUZ-LANDIM C. Histologia e ultra-estrutura do vaso dorsal de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae) em operárias e rainhas de diferentes idades. **Iheringia, Série Zoologia**, 96:121-126. 2006.

POIANI S.; CRUZ-LANDIM C. Histology and ultrastructure of pericardial cells of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae) in workers and queens of different ages. **Micron**, 38:766-770. 2007.

RIZKI TM. The circulatory system and associated cells and tissues. In: Ashburner M, Wright TRF (eds). The genetics and biology of *Drosophila*, vol. 2. Academic Press, London. 397-452. 1978.

SANGER JW.; MCCANN FV. Ultrastructure of moth alary muscles and their attachment to the heart wall. **Journal Insect Physiology**, 14:1539-1544. 1968.

SANGER JW.; MCCANN FV. Fine structure of the pericardial cells of the moth, *Hyalophora cecropia*, and their rôle in protein uptake. **Journal Insect Physiology**, 14:1839-1845. 1968.

SANGER, JW.; MCCANN FV. Ultrastructure of the myocardium of the moth, *Hyalophora cecropia*. **Journal Insect Physiology**, 14:1105-1111. 1968.

SLAMA K.; FARKAS R. Heartbeat patterns during the postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, 51:489-503. 2005.

SNODGRASS RE. *Principles of insect morphology*. New York. 389-421. 1993.

TAO Y.; SCHULZ R. Heart development in *Drosophila*. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 18:3-15. 2007.

WEAVERS H.; PRIETO-SÁNCHEZ S.; GRAWE F.; GARCIA-LÓPEZ A.; ARTERO R.; WILSCH-BRAEUNINGER M.; RUIZ-GÓMEZ M.; SKAER H.; DENHOLM B. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. **Nature**, 457:322-326. 2009.